

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

На правах рукописи

ШУВАТОВА ВАЛЕНТИНА ГЕОРГИЕВНА

ХАРАКТЕРИСТИКА РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ MCF-7 И ЕЁ
СНИЖЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ
АКТИВНОСТЬЮ ИНГИБИТОРОВ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

1.5.1. Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор
Москалева Елизавета Юрьевна

Москва, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Концепция опухолевых стволовых клеток и их характеристика	10
1.2. Резистентность ОСК к действию повреждающих факторов.....	24
1.2.1. Резистентность ОСК к химиотерапии	24
1.2.2. Резистентность ОСК к действию редкоионизирующего излучения	25
1.2.3. Эффективность плотноионизирующего излучения в отношении ОСК.....	29
1.3. Модификаторы радиочувствительности ОСК.....	31
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1. Культивирование клеток.....	44
2.2. Определение времени удвоения клеток прикрепляющейся культуры, культуры маммосфер и ОСК маммосфер линии MCF-7	44
2.3. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла	45
2.4. Определение содержания белка Ki67 в клетках 2D- и 3D-культуры линии MCF-7.....	46
2.5. Определение доли ОСК в прикрепляющейся культуре и культуре маммосфер линии MCF-7 по фенотипу CD44 ⁺ /CD24 ^{-low} , размеру фракции SP и активности альдегиддегидрогеназы.....	46
2.6. Анализ эффективности клонирования клеток 2D-культуры и клеток маммосфер.....	47
2.7. Облучение клеток.....	48
2.8. Анализ влияния γ - и γ ,n-облучения на относительное и абсолютное содержание ОСК линии MCF-7.....	48
2.9. Анализ влияния γ - и γ ,n-облучения на клоногенную выживаемость клеток	48
2.10. Анализ радиочувствительности клеток 2D- и 3D-культуры при действии γ - и γ ,n- излучения.....	49
2.11. Расчет относительной биологической эффективности γ ,n-излучения.....	49
2.12. Анализ содержания гистона γ H2AX в клетках 3D-культуры с помощью конфокальной микроскопии.....	49
2.13. Анализ содержания гистона γ H2AX в клетках 3D-культуры с помощью проточной цитофлуориметрии	50
2.14. Определение доли клеток маммосфер линии MCF-7 в состоянии апоптоза и некроза	50
2.15. Анализ содержания активных форм кислорода в клетках 3D-культуры линии MCF-7 после облучения.....	50
2.16. Анализ уровня экспрессии белков сигнального пути Wnt в клетках 3D-культуры линии MCF-7.....	50

2.17. Приготовление растворов препаратов для оценки их радиосенсибилизирующего действия.....	51
2.18. Статистический анализ	51
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	52
3.1. Характеристика клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, культивируемых в виде 2D-культуры и культуры маммосфер	52
3.2. Сравнение радиочувствительности клеток линии MCF-7, культивируемых в виде 2D-культуры и культуры маммосфер, и ОСК в этих культурах при действии γ -излучения	61
3.2.1. Радиочувствительность клеток 2D-культуры и культуры маммосфер при действии γ -излучения.....	61
3.2.2. Сравнение радиочувствительности ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер при действии γ -излучения.....	62
3.2.3. Влияние γ -излучения на пролиферативную активность и уровень апоптоза в клетках 2D-культуры и культуры маммосфер	64
3.3. Радиочувствительность клеток культуры маммосфер и ОСК линии MCF-7 при действии γ ,n-излучения.....	65
3.3.1. Чувствительность клеток культуры маммосфер к действию γ ,n-излучения	65
3.3.2. Радиочувствительность ОСК в 3D-культуре при γ ,n-облучении	67
3.3.3. Влияние γ ,n-излучения на пролиферативную активность и уровень апоптоза в клетках культуры маммосфер	70
3.3.4. Репарация двунитевых разрывов ДНК в клетках маммосфер при действии γ ,n-излучения.....	70
3.4. Исследование возможности снижения радиоустойчивости клеток маммосфер и ОСК линии MCF-7 при использовании лекарственных средств, обладающих активностью ингибиторов сигнальных путей	74
3.4.1. Противоопухолевый препарат доцетаксел.....	74
3.4.2. Противоопухолевый препарат дазатиниб	82
3.4.3. Никлозамид – противогельминтный препарат, ингибитор сигнальных путей Wnt, NF-kB, Stat3, Notch и mTORC1	84
3.4.4. Противодиабетический препарат метформин	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
ВЫВОДЫ	111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113
БЛАГОДАРНОСТИ	138
ПРИЛОЖЕНИЕ	139

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования молочной железы занимают ведущее место среди опухолей всех локализаций в структуре онкологических заболеваний у женщин. В схеме лечения рака молочной железы (РМЖ) в сочетании с хирургическим удалением опухоли используется гормональная и/или химиотерапия, а также послеоперационная лучевая терапия (ЛТ), которая обеспечивает значительное снижение риска локальных рецидивов и повышение 20-летней выживаемости пациентов [1, 2, 3].

В соответствии с современными представлениями возникновение опухоли определяется появлением в результате накопления мутаций уникальной популяции клеток со свойствами стволовых клеток (СК), получивших название опухолевых стволовых клеток (ОСК). ОСК способны как к репопуляции, в результате которой происходит воспроизведение ОСК, так и к асимметричному делению, при котором происходит как воспроизведение ОСК, так и образование ограниченно пролиферирующих клеток-предшественников более дифференцированных опухолевых клеток. Роль ОСК в возникновении и развитии опухолей была доказана сначала для лейкоза [4, 5], а позднее – для РМЖ, и других солидных опухолей. ОСК РМЖ характеризуются фенотипом $CD44^{+}/CD24^{-low}$, высокой активностью ABC-транспортеров и высокой туморогенной активностью при трансплантации иммунодефицитным мышам [6]. Перенос ОСК с кровью или лимфой из опухоли в те зоны организма, в которых имеется комфортное для этих клеток микроокружение, определяет появление отдаленных метастазов. Сохранение ОСК после удаления опухоли и окончания ЛТ лежит в основе рецидивирования РМЖ, что свидетельствует об актуальности изучения радиобиологии ОСК.

Для характеристики СК и ОСК молочной железы разработан метод выделения и культивирования клеток с использованием специальных добавок и факторов роста (EGF и FGF) в виде плавающих сферических кластеров, которые формируют 3D-культуру и получили название маммосфер [7, 8]. Этот метод позволяет значительно увеличить содержание ОСК в культуре. Маммосферы РМЖ характеризуются более высокой радиоустойчивостью, чем клетки 2D-культуры [9], однако не ясно, как влияют условия культивирования на радиочувствительность собственно ОСК.

Известно, что ОСК устойчивы как к конвенциональной химиотерапии [10, 11], так и к радиационным воздействиям при использовании редкоионизирующего излучения [12, 13], но высоко чувствительны к действию протонов, нейтронов и других типов плотноионизирующего излучения [14, 15, 16, 17]. Эти данные свидетельствуют об

актуальности поиска мало токсичных радиосенсибилизаторов для повышения эффективности ЛТ при использовании редкоионизирующего излучения.

Перспективным подходом в этом направлении, наряду с синтезом новых ингибиторов специфических сигнальных путей, поддерживающих жизнеспособность и пролиферацию ОСК, является исследование лекарственных препаратов, для которых помимо известной терапевтической активности, обнаружена способность ингибировать сигнальные каскады в ОСК [13, 18]. Использование таких препаратов в составе комбинированной терапии может ингибировать пролиферацию ОСК и повышать их радиочувствительность.

Степень разработанности темы исследования

Высокая эффективность ЛТ с использованием реакторных нейтронов при лечении радиорезистентных опухолей, включая РМЖ [19], и создание компактных терапевтических генераторов нейтронов [20] стимулировали повышение интереса к развитию ЛТ с использованием нейтронов и изучению эффектов облучения нормальных клеток и ОСК нейтронами [21, 22, 15]. Однако радиобиологические параметры, характеризующие радиочувствительность ОСК РМЖ и их способность к репарации после облучения нейтронами, зависимость относительной биологической эффективности (ОБЭ) нейтронов от используемых доз исследованы недостаточно. Вопрос о возможности повышения радиочувствительности ОСК РМЖ с помощью известных лекарственных препаратов, способных ингибировать сигнальные пути, стимулирующие пролиферацию ОСК, остается мало изученным. Эти проблемы определили актуальность, цель и задачи диссертационного исследования.

Цель и задачи исследования

Целью исследования явилось изучение чувствительности клеток РМЖ линии MCF-7, культивируемых в виде 3D-культуры, и ОСК в этой культуре к редко- и плотноионизирующему излучению и поиск способов снижения радиоустойчивости ОСК при использовании лекарственных средств, обладающих активностью ингибиторов сигнальных путей ОСК.

Для достижения указанной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Сравнить радиочувствительность ОСК в 2D- и 3D-культуре клеток линии MCF-7.
2. Оценить радиоустойчивость клеток 3D-культуры и ОСК в этой культуре при облучении γ -квантами и нейтронами по показателям D_0 и D_q и определить величину ОБЭ γ ,n-излучения в зависимости от дозы облучения.

3. Сравнить механизмы устойчивости клеток маммосфер линии MCF-7 к действию γ - и γ ,n-излучения.

4. Оценить возможность повышения чувствительности клеток маммосфер и ОСК к действию γ -излучения при использовании противоопухолевых лекарственных препаратов доцетаксела, обладающего активностью ингибитора сигнальных путей PI3/AKT/mTOR и EGFR, и дазатиниба, ингибирующего активность тирозинкиназы BCR-ABL, семейства киназ SRC и рецептора c-KIT.

5. Изучить возможность повышения чувствительности клеток маммосфер и ОСК к действию γ -излучения при использовании противогельминтного препарата никлозамида, обладающего активностью ингибитора сигнальных путей Wnt, Notch, Hedgehog, NF- κ B.

6. Оценить возможность повышения чувствительности клеток маммосфер и ОСК к действию γ - и γ ,n-излучения при использовании противодиабетического препарата метформина, обладающего активностью ингибитора сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и MEK/ERK1/2.

Научная новизна

Обнаружено, что радиочувствительность ОСК линии MCF-7 одинакова при культивировании клеток в виде маммосфер и в виде 2D-культуры, несмотря на более высокую радиоустойчивость клеток маммосфер.

Установлены значения радиобиологических параметров D_0 и D_q для клеток маммосфер и ОСК линии MCF-7, которые свидетельствуют о высокой устойчивости и клеток маммосфер, и ОСК к γ -излучению и высокой чувствительности к γ ,n-излучению.

Высокая чувствительность клеток маммосфер к действию γ ,n-излучения, в отличие от γ -излучения, определяется низкой скоростью репарации ДР ДНК, глубоким ингибированием пролиферации и высоким уровнем апоптоза клеток.

Действие γ ,n-излучения на клетки маммосфер линии MCF-7 характеризуется высокой величиной ОБЭ, которая при увеличении дозы от 1 Гр до 6 Гр снижалась с 31 до 5 и с 35 до 17 при анализе выживаемости по количеству клеток и по клоногенной способности соответственно.

Противоопухолевые препараты доцетаксел и дазатиниб, противогельминтный препарат никлозамид и противодиабетический препарат метформин при добавлении в субтоксических концентрациях перед облучением клеток маммосфер линии MCF-7 повышают их чувствительность к γ -облучению и перспективны для использования в качестве радиосенсибилизаторов при ЛТ.

Теоретическая и практическая значимость работы

На примере клеток РМЖ линии MCF-7 обнаружено, что радиоустойчивость ОСК в культуре маммосфер и 2D-культуре одинакова и, таким образом, не зависит от способа культивирования клеток.

Установленная зависимость величины ОБЭ γ ,n-излучения от дозы может быть использована для уточнения взвешивающих коэффициентов для нейтронов в соответствии с актуальным диапазоном доз, и для выбора дозы облучения при планировании ЛТ.

Представленные данные о повышении радиочувствительности клеток РМЖ линии MCF-7 при совместном использовании противоопухолевых препаратов доцетаксела и дазатиниба и противодиабетического препарата метформина и облучения свидетельствуют о целесообразности проведения доклинических и клинических испытаний эффективности использования этих препаратов в комбинированной ЛТ для повышения радиочувствительности опухолей и ОСК. Полученные в диссертационной работе результаты будут полезны в процессе преподавания таких дисциплин, как «Биофизика» и «Радиобиология».

Методология и методы исследования

Теоретическую основу диссертационной работы составили сведения, представленные в научных статьях, опубликованных в рецензируемых высокорейтинговых изданиях, специализирующихся в выбранной автором области исследований. Методология работы основана на современных радиобиологических подходах и концепциях, апробированных в исследованиях последних лет.

При проведении исследований в соответствии с задачами работы были использованы методы культивирования клеток, γ -облучение клеток на гамма-установке «ГУТ-200М», облучение клеток нейтронами с сопутствующим γ -излучением на реакторе «ИР-8». В работе использована современная приборная база и методы исследований: световая, флуоресцентная и конфокальная микроскопия, проточная цитофлуориметрия и статистические методы обработки полученных данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Установленные значения радиобиологических параметров D_0 и D_q свидетельствуют о более высокой радиоустойчивости клеток маммосфер, чем клеток 2D-культуры линии MCF-7 при действии γ -излучения, которая обусловлена более медленной скоростью пролиферации, более высокой скоростью репарации ДР ДНК и устойчивостью к индукции апоптоза. При этом радиочувствительность ОСК в этих культурах одинакова.

2. Клетки маммосфер и ОСК линии MCF-7 высоко чувствительны к облучению нейтронами, что обусловлено более высоким уровнем образования ДР ДНК, низкой скоростью репарации ДР ДНК и более высоким, чем при γ -облучении, уровнем индукции апоптоза.

3. При облучении 3D-культуры клеток MCF-7 нейтронами обнаружена высокая величина ОБЭ, которая при увеличении дозы с 1 Гр до 6 Гр при анализе выживаемости по количеству клеток снижалась с 31 до 5, а при анализе клоногенной выживаемости – с 35 до 17.

4. Противоопухолевый препарат доцетаксел эффективно снижает количество ОСК линии MCF-7 и оказывает радиосенсибилизирующее действие при γ -облучении клеток маммосфер.

5. Противоопухолевый препарат дазатиниб в субтоксической концентрации повышает чувствительность клеток маммосфер линии MCF-7 к действию γ -излучения.

6. Противогельминтный препарат никлозамид повышает чувствительность ОСК и клеток маммосфер линии MCF-7 к действию γ -излучения благодаря подавлению их способности к пролиферации, уменьшению активности сигнального пути Wnt, активированного под действием γ -излучения, увеличению уровня образования пострadiационных разрывов ДНК и ингибированию репарации ДР ДНК.

7. Гипогликемический препарат метформин повышает радиочувствительность клеток 3D-культуры и ОСК линии MCF-7 как при действии γ -излучения, так и при облучении нейтронами.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность представленных в работе материалов основана на использовании тех актуальных экспериментальных методов и методов обработки и представления данных, включая статистические, которые широко апробированы в современной радиационной, клеточной и молекулярной биологии. Полученные результаты представлены в виде публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций (6 статей), в 2-х зарубежных изданиях и в виде 12 тезисов докладов, представленных на отечественных и международных конференциях.

Связь работы с научными программами

Исследование выполнено в соответствии с темами НИОКР тематического плана НИЦ «Курчатовский институт» «Фундаментальные междисциплинарные исследования в нано-, био-, инфо- и когнитивных технологиях» и «Фундаментальные исследования и разработки по развитию применения ядерных технологий в медицине» и при частичной

финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашения о предоставлении субсидии № 14.604.21.0072 и № 14.607.21.0198).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.1 «Радиобиология» (п.4 и п.6).

Личный вклад автора

Автор лично выполнял все этапы работы от разработки дизайна исследования и проведения экспериментов согласно рабочему плану, до обработки полученных результатов и подготовки текстов статей и тезисов. Полученные результаты были представлены на профильных конференциях автором лично.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа построена по классическому образцу и включает разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы» и «Приложение». Библиографический список содержит 304 источника, 288 из которых англоязычные. В описании результатов представлено 54 рисунка и 17 таблиц. Работа изложена на 140 стр.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Концепция опухолевых стволовых клеток и их характеристика

Возникновение и развитие опухоли является многостадийным процессом, связанным с появлением и накоплением генетических изменений, возникающих под действием различных мутагенных факторов внешней и/или внутренней среды и приводящих к трансформации нормальной клетки в опухолевую [23]. В рамках современных представлений о канцерогенезе злокачественные новообразования принято рассматривать как комплексные динамичные системы, обладающие молекулярной, клеточной и пространственной неоднородностью [24]. Для объяснения механизмов канцерогенеза в настоящее время разработаны две концепции: клональной селекции опухоли и опухолевых стволовых клеток (ОСК).

Концепция клональной селекции опухоли, или стохастическая модель, предложенная Питером Новеллом в 1976 г., предполагает, что большая часть злокачественных новообразований возникает вследствие накопления первичных мутаций в одной или нескольких соматических клетках, а прогрессирование опухоли происходит в результате приобретенной генетической нестабильности клеток в пределах исходного клона и последующего отбора опухолевых клеток и клонов, обладающих селективным преимуществом.

Согласно этой модели клетки одного субклона характеризуются одинаковым происхождением, генотипом и аналогичным туморогенным потенциалом. Непрерывное накопление дальнейших мутаций в отдельных клетках способствует появлению эволюционно новых субклонов, отличающихся как от материнского клона, так и друг от друга, которые могут сосуществовать в опухоли и обуславливать внутриопухолевую гетерогенность [25].

Гетерогенная опухоль рассматривается как динамичная экосистема, популяционный состав которой меняется при изменении селективного давления микроокружения. Направляющим элементом селективного отбора клонов, устойчивых к воздействию повреждающих факторов, может стать терапевтическое воздействие [26].

Неблагоприятные условия приводят к отбору жизнеспособных клонов. Результатом такой селекции становится формирование резистентности к противоопухолевому лечению и образование клонов, способных выживать в условиях метастатической ниши. Таким образом, клональная селекция определяет развитие опухолевого процесса, начиная с его инициации и заканчивая образованием метастазов [27].

Согласно концепции ОСК, или иерархической концепции канцерогенеза, злокачественные новообразования имеют иерархическую клеточную организацию,

аналогичную организации нормальных тканей. На вершине клеточной иерархии злокачественных опухолей находятся клетки, получившие название ОСК. Клетки этой субпопуляции характеризуются способностью не только к симметричному делению для их самовоспроизведения, но и к асимметричному делению, в результате которого образуется как ОСК, так и клетка, коммитированная к дифференцировке с ограниченным по времени пролиферативным потенциалом. Таким образом, разные опухолевые клетки характеризуются разным потенциалом к пролиферации, и, как следствие, разной способностью к инициации и прогрессированию опухолевого процесса. В рамках этой модели постулируется, что возникновение и рост злокачественной опухоли обусловлены малочисленной, но наивысшей в иерархии опухолевых клеток популяцией ОСК [4, 5].

Важно отметить, что согласно последним исследованиям, наиболее реальной моделью онкогенеза, вероятно, является комбинация иерархической и клональной модели, поскольку сами ОСК подвергаются клональной эволюции, как показано для стволовых клеток лейкоза [28].

Такая модель, включающая обе концепции, предполагает существование первичных ОСК, которые в дальнейшем могут приобретать мутации и трансформироваться в популяции вторичных ОСК, а затем, после накопления дальнейших генетических изменений, становиться метастатическими ОСК с потенциалом формирования опухолей в отдаленных от первичного очага локализациях [29].

Первые доказательства существования ОСК были получены в 1994 г, когда Цвее Липидот и соавт. идентифицировали поверхностные маркеры ОСК острого миелолейкоза человека (ОМЛ) и показали, что трансплантация иммунодефицитным мышам только клеток с фенотипом $CD34^+/CD38^-$, выделенных из крови пациентов с ОМЛ, приводит к появлению заболевания [30]. Доминик Боннет и Джо Дик продолжили эти исследования и в 1997 г. показали, что клетки ОМЛ человека с фенотипом $CD34^+/CD38^-$ обладают ключевыми критериями, которые позволяют определить их как ОСК. После трансплантации только эта фракция клеток была способна к пролиферации и дифференцировке, приводя к появлению у иммунодефицитных мышей заболевания, идентичного заболеванию донора, и кроме того, эта фракция клеток обладала потенциалом к самообновлению, который проявлялся в формировании ОМЛ у мышей-вторичных реципиентов. Также авторы получили доказательства иерархической структуры клона ОМЛ *in vivo* [4]. Эти открытия привели к признанию существования лейкозных стволовых клеток и послужили основой для последующей разработки и углубления концепции ОСК [5].

Эта концепция оказалась применимой и для солидных опухолей. В 2003 г. Мухаммад Аль-Хадж и соавт. впервые обнаружили ОСК РМЖ человека и установили, что только те клетки, которые характеризовались присутствием на их поверхности антигена CD44 при отсутствии или низком уровне экспрессии молекулы CD24, были способны индуцировать развитие опухолей при трансплантации этих клеток иммунодефицитным мышам. Введение всего 200 таких клеток приводило к образованию опухолей у мышей-реципиентов в течение 12 недель. Эти клетки сохраняли туморогенный потенциал при серийном пассировании. Клетки рака молочной железы с другим фенотипом такими свойствами не обладали [6].

Почти в то же время Шейле К. Сингх и соавт. удалось выделить субпопуляцию ОСК с фенотипом CD133⁺ из различных опухолей головного мозга и установить их способность воспроизводить исходные опухоли и потенциал к самообновлению *in vivo* [31]. Впоследствии были накоплены убедительные доказательства присутствия ОСК в солидных опухолях различных типов, включая рак предстательной железы, легких, толстой кишки, поджелудочной железы, головы и шеи, печени, а также меланомы [32].

В 2011 г. Пиюш Б. Гупта и соавт. показали, что в изолированных по фенотипическим маркерам (CD44, CD24, EpCAM) фракциях ОСК и более дифференцированных опухолевых клеток РМЖ линий SUM149 (люминальный тип) и SUM159 (базальноподобный тип) при последующем культивировании возвращаются исходные пропорции клеточных субпопуляций, характерные для несортированных культур. В случае значительного истощения пула ОСК его пополнение возможно за счет дедифференцировки опухолевых клеток. С помощью математической модели авторы рассчитали, что вероятность перехода более дифференцированной опухолевой клетки в ОСК составляет 0,01–0,04. Таким образом, возможно возникновение ОСК из более дифференцированной опухолевой клетки, но этот процесс представляет собой редкое стохастическое явление, имеющее низкую вероятность [33].

В настоящее время иерархическая концепция ОСК, основанная на идее о том, что популяция ОСК обладает постоянными характеристиками, не изменяющимися с течением времени и не свойственными более дифференцированным опухолевым клеткам, получила развитие в динамической концепции ОСК. Последняя постулирует, что ОСК имеют гибкий фенотип, который регулируется опухолевым микроокружением (ОМО). Под влиянием ОМО опухолевые клетки могут дедифференцироваться в ОСК. Эта теория подразумевает пластичность опухолевых клеток на разных стадиях дифференцировки, которая выражается в фенотипическом равновесии между стволовыми и не стволовыми

опухолевыми клетками, а также тесную связь между опухолевыми клетками и компонентами ОМО [34].

Таким образом, в рамках современной динамической концепции ОСК не считают фиксированной единицей в иерархии последующего одностороннего процесса дифференцировки, а допускают возможность формирования и сохранения ОСК с известными свойствами при участии тех факторов, которые формируются клетками микроокружения опухоли.

Происхождение ОСК

В качестве возможных предшественников ОСК принято рассматривать нормальные стволовые клетки и прогениторные клетки, нормальные и опухолевые дифференцированные клетки, а также клетки, образующиеся в результате слияния клеток.

Нормальные стволовые и прогениторные клетки, как источник появления ОСК

Для многих тканей организма медленно пролиферирующие СК являются единственными долгоживущими клетками, поэтому именно в них могут накапливаться мутации, приводящие к трансформации в ОСК. Это предположение основано на том, что по ряду функциональных свойств и фенотипу ОСК, как правило, аналогичны нормальным СК. В частности, обнаружено, что ОСК опухолей мозга, аденокарциномы легких, гепатоцеллюлярной холангиокарциномы и рака молочной железы обладают набором поверхностных маркеров, характерным для нормальных СК соответствующих тканей [35, 36].

В нескольких исследованиях была показана возможность трансформации мышинных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) в ОСК. При добавлении к iPSC кондиционированной среды, полученной от клеток карциномы поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы или предстательной железы, они приобретали характерные для ОСК свойства, включая способность к формированию сфероидов, экспрессию генов стволовости и наличие соответствующих поверхностных маркеров, а также высокую туморогенность *in vivo* [37, 38, 39].

При культивировании iPSC с внеклеточными везикулами клеток мышинной карциномы легкого Льюиса были получены похожие результаты, свидетельствующие о возможности трансформации нормальных стволовых/прогениторных клеток в ОСК под действием компонентов опухолевой ниши [40].

Нормальные/опухолевые дифференцированные клетки, как предшественники ОСК

Согласно второму механизму в нормальных дифференцированных клетках могут появляться мутации, в результате которых клетка восстанавливает свойства стволовости и становится злокачественной, либо под действием сигналов ОМО более

дифференцированные опухолевые клетки дедифференцируются, в результате чего они также восстанавливают свойства ОСК.

В нескольких исследованиях *in vivo* были получены результаты, показывающие возможность трансформации дифференцированных соматических клеток в клетки-предшественники, инициирующие злокачественные опухоли. В частности показано, что в случае появления онкогена BRAFV600E и потери опухолевого супрессора PTEN зрелые пигмент-продуцирующие меланоциты могут дедифференцироваться в клетки-предшественники, инициирующие образование меланомы [41].

Значительно большее количество экспериментальных доказательств было получено в отношении возможности пополнения пула ОСК путем дедифференцировки опухолевых клеток, которая коррелирует с процессом эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). ЭМП характеризуется изменением эпителиального фенотипа на мезенхимальный, и сопровождается потерей маркеров эпителиальной морфологии (включая Е-кадгерин, десмоплакин, Мис-1, цитокератин-18, окклюдины, клаудины и ZO-1) и приобретением маркеров мезенхимальной морфологии (включая N-кадгерин, виментин, фибронектин, витронектин, α -актин гладких мышц). Опухолевые клетки, в результате ЭМП, приобретают инвазивные и метастатические свойства, характерные для ОСК [42].

На дедифференцировку и образование ОСК значительное влияние оказывают факторы микроокружения (гипоксия, цитокины и NO) путем активации различных сигнальных путей. Например, активация сигнального каскада, индуцируемого TGF- β , приводит к образованию ОСК из более дифференцированных клеток колоректального рака [43]. Дедифференцировку клеток рака поджелудочной железы в ОСК с высоким туморогенным потенциалом может индуцировать активация пути HIF-1 α /Notch при гипоксии [44].

Секретируемые фибробластами в стрессовых условиях цитокины интерлейкин-6, активин-А и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор при совместном культивировании с клетками карциномы легких активируют пути Wnt, Notch и Hedgehog, что приводит к их дедифференцировке в ОСК [45]. В переносе лигандов рецептора Notch, секретируемых опухолевыми клетками, и его активации важную роль могут играть экзосомы [46]. В таком пути образования ОСК РМЖ и переходе последних в дормантное состояние в периваскулярной области костного мозга важная роль принадлежит внеклеточным везикулам, секретируемым мезенхимными стволовыми клетками костного мозга и активирующими путь Wnt/ β -катенин [47].

Образование ОСК рака легких из более дифференцированных опухолевых клеток может происходить под действием индуцируемой NO стабилизации важного для ОСК фактора транскрипции OCT4 [48].

Слияние клеток

Третий механизм образования ОСК основан на возможности слияния двух клеток разных типов с образованием гибридной клетки. В этом случае мутации, приводящие к образованию ОСК, могут возникнуть как в исходных клетках, так и в гибридной клетке после слияния. Так, установлено, что гибридные клетки, полученные из мезенхимальных СК костного мозга и клеток немелкоклеточного рака легких трех линий, проявляли фенотипические и функциональные характеристики ОСК *in vitro*, наряду с увеличением метастатического потенциала *in vivo* [49]. К появлению ОСК может приводить также слияние двух типов стволовых/прогениторных клеток, присутствующих в тканях. Обнаружено, что ОСК карциномы печени человека с фенотипом CD34⁺ могут образовываться путем слияния резидентных стволовых/прогениторных клеток печени и CD34⁺ гемопоэтических клеток-предшественников [50].

Кроме того, ОСК могут образовываться без участия СК. Так, было показано, что слияние нормальных эпителиальных клеток молочной железы человека и клеток РМЖ приводит к образованию гибридных клеток, обладающих определенными функциональными и фенотипическими свойствами ОСК [51]. Обнаружено также, что гибридные клетки, полученные при слиянии макрофагов, ассоциированных с опухолью, и клеток аденокарциномы молочной железы человека линий MCF-7 и MDA-MB-231, имеют фенотип ОСК, характеризуются более высокой туморогенностью и способностью к метастазированию *in vivo* [52].

Более того, установлено, что спонтанное слияние фибробластов легкого человека линий E6E7 (клетки линии IMR-90, частично трансформированные онкогенами E6 и E7) и RST (полностью трансформированные клетки линии IMR-90), приводит к образованию клеток с повышенной активностью альдегиддегидрогеназы (ALDH), которая является маркером ОСК. В образующихся после слияния клетках увеличивалась активность фактора транскрипции NANOG, который участвует в проявлении стволовых свойств [53].

Свойства ОСК

В настоящее время ОСК обнаружены в солидных опухолях различных локализаций, и, согласно экспериментальным данным, они составляют лишь небольшой процент общей массы опухолевых клеток (табл. 1).

Таблица 1 – Фенотип и содержание ОСК в злокачественных опухолях различных типов

Тип рака	Маркер ОСК	Доля ОСК, %	Ссылка
Аденокарцинома молочной железы	CD44 ⁺ /CD24 ^{-low}	0,1–1,5	[6]
Глиома	CD133 ⁺	0,5–3,0	[54]
Плоскоклеточный рак головы и шеи	CD44 ⁺	0,1–2,0	[55]
Аденокарцинома поджелудочной железы	CD44 ⁺ /CD24 ⁺	0,2–0,8	[56]
Карцинома легкого	CD133 ⁺	0,3–2,2	[57]
Гепатоцеллюлярная карцинома	CD90 ⁺	0,03–6,0	[58]
Карцинома прямой кишки	CD133 ⁺	1,1–3,9	[59]
Рак яичника	CD44 ⁺ /CD24 ⁺	0,5–3,0	[60]
Рак предстательной железы	CD44 ⁺ /CD133 ⁺	Около 0,1	[61]
Меланома	ABC5 ⁺	1,6–10	[62]

Свойство «стволовости» ОСК определяется их следующими особенностями:

1) способность к самообновлению, обеспечивающая сохранение пула ОСК. Эта способность поддерживается симметричным делением, в результате которого образуются две дочерние ОСК. Потенциал к самообновлению подразумевает способность ОСК пролиферировать длительное время, сохраняя недифференцированное состояние [63].

2) способность к дифференцировке, которая обеспечивается асимметричным делением, приводящим к образованию ОСК и прогениторной клетки – клетки, коммитированной к дифференцировке в определенном направлении и обладающей ограниченным пролиферативным потенциалом. Способность ОСК к дифференцировке обеспечивает сохранение клеточного состава опухоли [64].

3) способность к регуляции процессов самообновления и образования дифференцированных клеток в зависимости от особенностей опухолевой ткани [65].

Другими важными характеристиками ОСК, аналогичными нормальным СК, являются долгая продолжительность жизни и возможность пребывать в состоянии пролиферативного покоя. При этом покоящиеся ОСК могут повторно входить в клеточный цикл через большие промежутки времени [66]. Результаты исследований показывают, что ОСК экспрессируют гены, характерные для нормальных СК, включая OCT4, NOTCH1, SOX1 [29].

Представленные выше характеристики позволяют объяснить роль ОСК в инициации опухолевого процесса и метастазировании. Таким образом, изучение ОСК имеет решающее значение для понимания механизмов канцерогенеза и поиска эффективных терапевтических подходов.

Энергетический метаболизм ОСК

Известно, что основной пул быстро пролиферирующих опухолевых клеток покрывает энергетические потребности преимущественно путем анаэробного гликолиза даже в присутствии достаточного количества кислорода – явление, известное как эффект Варбурга. При анаэробном гликолизе синтез АТФ происходит менее эффективно, но быстрее, чем при окислительном фосфорилировании. Гликолиз обеспечивает опухолевые клетки субстратом для синтеза макромолекул, поддерживает окислительно-восстановительный баланс и, за счет образования большого количества молочной кислоты, создает специфическую для опухоли кислую среду [67].

В отличие от более дифференцированных опухолевых клеток для ОСК получены противоречивые данные относительно их энергетического метаболизма. Так, в ряде исследований показано, что ОСК разных типов рака, включая гепатоцеллюлярную карциному, аденокарциному молочной железы, глиобластому, карциному яичников, рак носоглотки, остеосаркому, для синтеза АТФ используют преимущественно анаэробный гликолиз, о чем свидетельствует высокая активность гликолитических ферментов и сниженная функциональная активность митохондрий [68, 69, 70, 71, 72, 73]. Обнаружено также, что в процессе ЭМП клеток базальноподобного рака молочной железы транскрипционный репрессор Snail участвует в метилировании промотора фруктозо-1,6-бисфосфатазы, что приводит к активации гликолитического окисления глюкозы в клетках с приобретенными свойствами стволовости [74].

Результаты других исследований ОСК, выделенных из образцов опухолей различных локализаций, свидетельствуют об увеличении количества митохондрий в этих клетках и зависимости их стволовых характеристик и туморогенного потенциала от окислительного фосфорилирования [75, 76, 77, 78, 79, 80]. Вероятно, такие расхождения могут быть связаны с типом опухоли, экспериментальными условиями и динамическими изменениями клеточного фенотипа, включая переход ОСК от покоящегося состояния к пролиферативному.

Кроме того, показана способность ОСК переключать энергетический метаболизм между окислительным фосфорилированием и гликолизом, которая позволяет им выживать в неблагоприятных условиях гипоксии, дефицита питательных веществ или в метастатических нишах [81, 82, 83].

Совокупность представленных результатов свидетельствует о том, в отличие от более дифференцированных опухолевых клеток ОСК обладают выраженной пластичностью энергетического метаболизма.

В условиях дефицита глюкозы важным источником энергии для опухолевых клеток становятся липиды, которые кроме выполнения энергетической и трофической функции участвуют в регуляции самообновления и туморогенности ОСК [84, 85, 86]. Метаболиты липидов в ОСК могут активировать внутриклеточные сигнальные пути NF-κB и Notch, необходимые для поддержания свойств стволовости [87, 88].

Показано, что ОСК карциномы поджелудочной железы характеризуются высокой активностью липогенеза, и ингибирование синтазы жирных кислот приводит к выраженному снижению их пролиферативного потенциала [89]. Установлено также, что в ОСК РМЖ происходит интенсивное окисление жирных кислот, имеющее большое значение для поддержания их свойств [90].

Для ОСК также характерна активация путей обмена аминокислот. Известно, что ОСК имеют особенно высокую потребность в глутамине, и глутаминализ является существенным фактором для поддержания свойств ОСК [91, 92]. Показано, что повышенный метаболизм глутамина усиливает окислительное фосфорилирование и способствует выживанию ОСК ОМЛ [93], а дефицит глутамина приводит к значительному увеличению радиационно-индуцированных активных форм кислорода (АФК), и сенсibilизации ОСК аденокарциномы протоков поджелудочной железы к фракционированному облучению (ФО) [94].

Метаболизм лизина и серина вносит вклад в поддержание динамического окислительно-восстановительного гомеостаза ОСК, в том числе благодаря участию в синтезе митохондриальных форм антиоксидантов [95, 96].

Таким образом, описанные выше адаптивные механизмы метаболической пластичности, активирующиеся при неблагоприятных условиях, играют решающую роль в сохранении пула, ОСК и прогрессировании опухоли.

Механизмы регуляции метаболизма и функциональных характеристик ОСК

Поддержание свойств ОСК находится под контролем специфических для этих клеток регуляторных механизмов, которые включают транскрипционный, посттранскрипционный и эпигенетический уровень, а также сигнальные каскады. Кроме того, свойства ОСК во многом зависят от их взаимодействия с ОМО [97]. Основные уровни и элементы регуляции ОСК обобщены в табл. 2 и на рис. 1.

В транскрипционном контроле ОСК выделяют шесть основных факторов транскрипции (ФТ): PBX1, Oct4, Sox2, c-Myc, KLF4 и Nanog [97]. Перечисленные ФТ экспрессируются в нормальных (эмбриональных) СК и регулируют их плюрипотентность и самообновление. Сверхэкспрессия указанных ФТ в ОСК приводит к активации

сигнальных путей, обеспечивающих высокую туморогенность и устойчивость этих клеток к повреждающим воздействиям [98].

Посттранскрипционный контроль опосредуется РНК-связывающими белками, микроРНК, днРНК и модификациями аденозина в мРНК [97]. Характерные для ОСК изменения посттранскрипционного контроля могут привести к неконтролируемой пролиферации клеток, формированию сосудистой сети, ЭМП и другим процессам, связанным с прогрессированием опухоли [99].

Регуляция на эпигенетическом уровне связана с процессом метилирования и деметилирования ДНК и гистонов, который влияет на экспрессию соответствующих генов, включая гены перечисленных выше ФТ, важных для поддержания свойств СК [97].

Основными внутриклеточными сигнальными путями, которые участвуют в регуляции метаболизма и свойств ОСК, являются Wnt/ β -катенин, Notch, Sonic Hedgehog, JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTOR, TGF- β /SMAD и др. [100]. Активация пути Wnt/ β -катенин в ОСК обуславливает поддержание стволовых свойств, в т.ч. способности к самообновлению. Пути Notch и Sonic Hedgehog также поддерживают стволовость и замедляют дифференцировку ОСК [101]. Путь JAK/STAT3 регулирует самообновление, пролиферацию ОСК, а также метастазирование [100]. Сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR оказывает влияние на метаболические процессы в ОСК и их способность к самообновлению [102]. Основные эффекты пути TGF- β /SMAD зависят от условий окружающей среды и проявляются либо в активации, либо в ингибировании самообновления ОСК. Активация этого пути регулирует самообновление ОСК, а также метастатическое распространение опухоли [103].

Сигнальные каскады в совокупности образуют динамичную регуляторную сеть, которая определяет образование и функционирование ОСК. Баланс между процессами самообновления и дифференцировки ОСК имеет решающее значение в инициации и прогрессировании опухоли [104].

В регуляции активности ОСК большое значение имеют белки, секретируемые такими клетками ОМО, как клетки мезенхимного происхождения, лимфоциты и макрофаги. К этим белкам относится широкий спектр цитокинов и факторов роста, а также белки внеклеточного матрикса, которые играют важную роль в межклеточных взаимодействиях [105, 106]. Взаимодействие между ОСК и элементами ОМО определяет регуляцию активности ОСК. Оно способствует развитию и прогрессированию опухоли, формированию резистентности и метастазированию [107, 108].

Таблица 2 – Механизмы регуляции активности и свойств ОСК по [97, 109, 110]

Фактор регуляции	Эффекты
Транскрипционный контроль	
Факторы транскрипции	Регуляция транскрипции
PBX1	Самообновление ОСК
Oct4	Самообновление ОСК, метастазирование, ЭМП, химиорезистентность
Sox2	Самообновление ОСК, ЭМП, химиорезистентность, регуляция между стволовым и дифференцированным состоянием
c-Myc	Поддержание стволовости ОСК, метастазирование, активация «спящих» ОСК, ЭМП, химиорезистентность
KLF4	Самообновление ОСК, пролиферация, миграция ОСК, метастазирование, химиорезистентность
Nanog	Поддержание характеристик ОСК, метастазирование, ЭМП, регуляция клеточного цикла ОСК, химиорезистентность
Посттранскрипционный контроль	
РНК-связывающие белки	Активность и свойства ОСК
MSI1	Самообновление ОСК, химио- и радиорезистентность
MSI2	Самообновление ОСК, поддержание стволовости, химио- и радиорезистентность
LIN28	Поддержание характеристик ОСК, метастазирование, ЭМП
Метилирование/деметилирование мРНК	Активность и свойства ОСК
N6-метиладенозин	Поддержание стволовости
Дезаминирование аденозина в инозин	Туморогенез, пролиферация ОСК
Эпигенетический контроль	
Модификация ДНК и гистонов	Активность и свойства ОСК
Метилирование ДНК	Поддержание стволовости ОСК и химиорезистентность
Деметилирование ДНК	Химиорезистентность
Метилирование гистонов	Самообновление ОСК и химиорезистентность
Некодирующие РНК	Активность и свойства ОСК
миРНК21	Поддержание стволовости ОСК, метастазирование и устойчивость к терапии
миРНК221	Туморогенез, химиорезистентность
днРНК	Пролиферация ОСК, активация сигнальных каскадов и увеличение экспрессии ФТ, поддерживающих стволовость ОСК

Фактор регуляции	Эффекты
Активация сигнальных путей	
Сигнальный путь	Активность и свойства ОСК
Wnt/ β -катенин	Самообновление ОСК, инициация опухоли и метастазирование, химио- и радиорезистентность
Notch	Контроль самообновления и дифференцировки ОСК, метастазирование, ЭМП, формирование иммуносупрессивной среды
Sonic Hedgehog	Пролиферация ОСК, метастазирование, химио- и радиорезистентность
TGF- β /SMAD	Самообновление, миграция ОСК, ЭМП, метастазирование, ангиогенез химио- и радиорезистентность
JAK/STAT3	Поддержание стволовости, ЭМП и метастазирование, химио- и радиорезистентность
NF- κ B	Поддержание стволовости, ЭМП, метастазирование, химио- и радиорезистентность, привлечение макрофагов и ангиогенез
PI3K/AKT/mTOR	Поддержание стволовости, ЭМП, метастазирование, химио- и радиорезистентность
Элементы опухолевого микроокружения	
Клетки	Активность и свойства ОСК
Опухоль-ассоциированные фибробласты	Поддержание стволовости ОСК, метастазирование и резистентность к терапии, активация пути STAT3
Опухоль-ассоциированные макрофаги	Поддержание стволовости, пролиферация ОСК, ЭМП, активация пути PI3K/4EBP1/Sox2, поддержание ОСК с помощью иммуномодулирующего действия и секреции интерлейкина-6

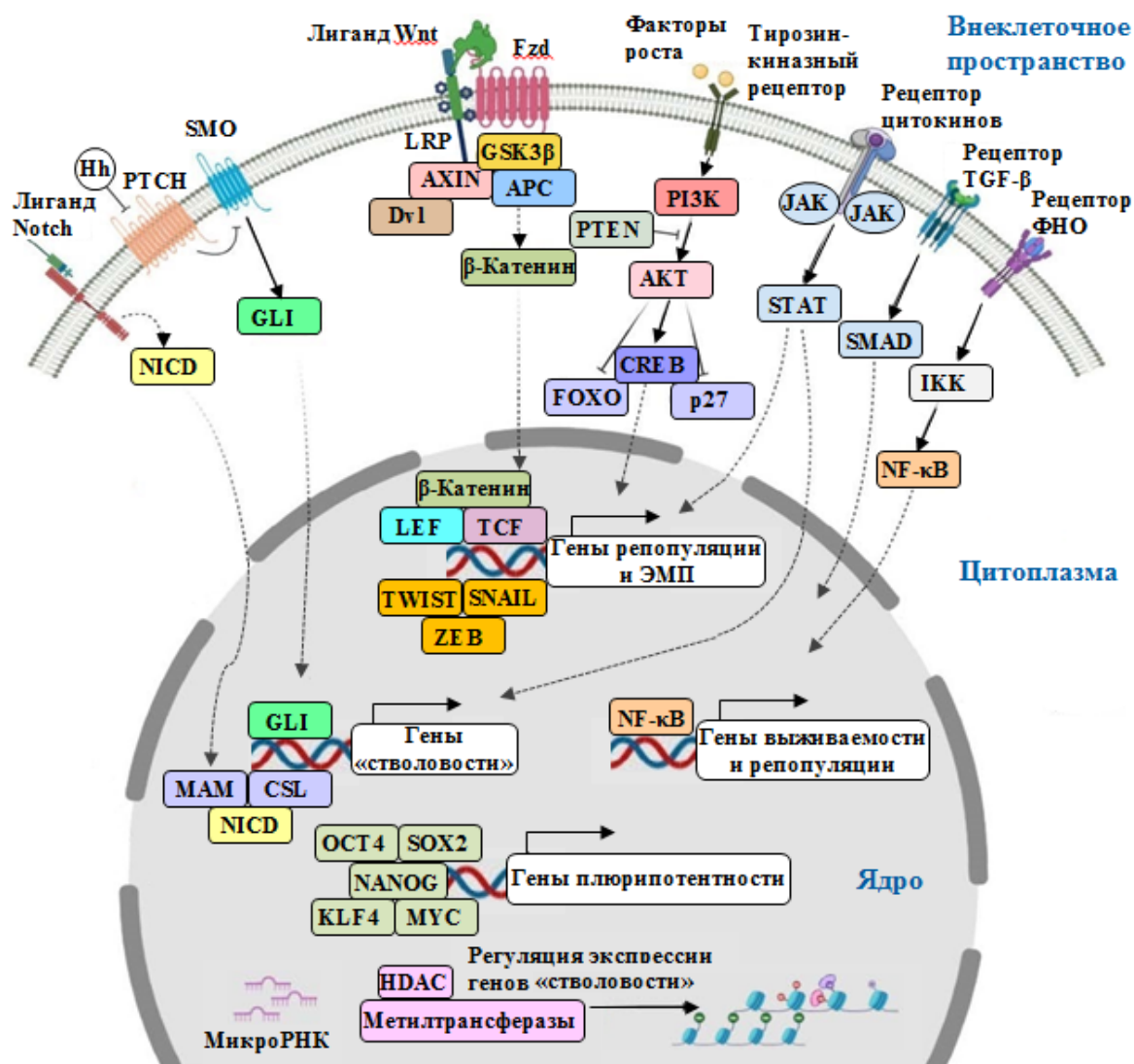


Рисунок 1 – Механизмы поддержания стволовых свойств ОСК на уровне транскрипции при активации сигнальных путей и эпигенетической регуляции по [111]. Описание в тексте.

Биомаркеры, используемые для идентификации ОСК

Для идентификации ОСК разработаны различные методы *in vitro* и *in vivo*. Наиболее точным подходом к обнаружению ОСК, отражающим основное свойство этих клеток, является способность к формированию опухоли при их трансплантации модельным животным. Фракция ОСК способна образовывать опухоль с характерной для родительской опухоли фенотипической гетерогенностью и обладает свойством самовоспроизведения при серийном пассировании [6].

In vitro свойства самообновления и репопуляции проявляются в способности ОСК образовывать плавающие колонии при культивировании в низкоадгезивных условиях, в отличие от более дифференцированных опухолевых клеток, которые в отсутствие межклеточных контактов и связи с матриксом подвергаются гибели по пути апоптоза. Такое селективное культивирование можно использовать как для обогащения культуры

ОСК, так и для определения количества ОСК по числу образовавшихся колоний-сфероидов [8].

Наиболее часто в качестве маркеров для идентификации ОСК с помощью проточной цитометрии используют поверхностные антигены, в том числе CD24, CD34, CD38, CD44, CD90, CD133 по отдельности или в комбинации, специфичной для конкретного типа опухоли (см. табл. 1). Например, для ОСК рака поджелудочной железы и яичников характерен фенотип $CD44^+/CD24^+$, а для аденокарциномы молочной железы – $CD44^+/CD24^{-/low}$.

CD24 – гликопротеин, который является молекулой клеточной адгезии, а также опосредует активацию нескольких сигнальных путей, приводящих к усилению стволовости опухолевых клеток [112].

CD44 или фагоцитарный гликопротеин-1 (Pgp-1) – рецептор гиалуроновой кислоты, который опосредует адгезию и клеточные взаимодействия. Кроме того, он принимает участие в активации путей PI3K/AKT и Src/MAPK и служит в качестве корецептора фактора c-Met [113].

Как было описано выше, большое значение для поддержания свойств ОСК имеют такие ФТ, как Oct4, Sox2, Nanog, c-Мyc и Klf4, а также сигнальные каскады: Wnt, Hedgehog, Notch, JAK/STAT. Эти ФТ и элементы сигнальных путей также могут быть использованы в качестве маркеров ОСК [114, 115].

Другой способ идентификации ОСК основан на способности этих клеток исключать витальные липофильные красители (Хёхст 33342, родамин-123). Малочисленная фракция неокрашенных клеток образует так называемую SP популяцию (от англ. side-population – боковая популяция). Способность ОСК исключать красители связана с высоким уровнем экспрессии генов, кодирующих различные ABC-транспортёры, которые обеспечивают элиминацию различных веществ из клетки [116].

При этом необходимо отметить, что доля ОСК, определяемая при использовании разных маркеров, может значительно различаться [117].

Еще одной характерной особенностью ОСК, которая может применяться для обнаружения этой фракции клеток в различных типах опухолей, является высокая активность фермента альдегиддегидрогеназы (ALDH) [118].

Таким образом, точная идентификация ОСК является сложной задачей, что связано со значительной гетерогенностью и пластичностью этой субпопуляции клеток [119], а также сходством их фенотипа с нормальными СК [120, 121]. Наиболее часто применяемые способы идентификации ОСК обобщены в табл. 3.

Таблица 3 – Методы идентификации ОСК по [122, 123]

Метод идентификации ОСК	Принцип метода	Назначение метода
Определение количества сфероидов	Только ОСК способны образовывать колонии-сфероиды <i>in vitro</i>	Оценка количества ОСК в культуре, оценка способности ОСК к репопуляции
Иммунофенотипирование клеток	ОСК отличаются от остальных опухолевых клеток по набору поверхностных маркеров, характерных для конкретного типа опухоли	Оценка доли ОСК в культуре, сортировка ОСК с помощью проточной цитометрии; в клинической практике для оценки ответа на лечение
Определение ALDH ⁺ -клеток	ОСК характеризуются более высокой активностью ALDH	
Анализ SP	ОСК более эффективно исключают липофильные красители вследствие большого количества ABC-транспортеров	
Трансплантация небольшого количества отсортированных субпопуляций опухолевых клеток животным	ОСК опосредуют инициацию и развитие опухолевого процесса, а также метастазирование	Оценка туморогенного потенциала и идентификация субпопуляции ОСК после фракционирования клеток

1.2. Резистентность ОСК к действию повреждающих факторов

К настоящему времени накоплены убедительные доказательства, что ОСК более устойчивы по сравнению с общей массой опухолевых клеток к действию повреждающих факторов, в том числе к лучевой и химиотерапии [10, 9].

Клетки, выжившие и сохранившие способность делиться после терапевтического воздействия, могут стать причиной рецидива опухоли в первичном очаге или появления метастазов [124]. Поэтому актуальной проблемой является изучение механизмов резистентности отдельных субпопуляций опухолевых клеток, в частности ОСК, а также поиск способов преодоления их устойчивости.

1.2.1. Резистентность ОСК к химиотерапии

Химиотерапия остается одним из основных методов лечения практически всех типов злокачественных опухолей. Химиотерапевтические препараты вызывают гибель основной массы опухолевых клеток и приводят к уменьшению объема опухоли. Однако у многих пациентов развиваются такие неблагоприятные последствия, как рецидивы заболевания и резистентность к химиотерапии, которые связывают с присутствием в опухолях ОСК [125]. Эти медленно пролиферирующие клетки обладают высокой

устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам, включая цисплатин, таксол и доксорубин, которые в основном действуют в отношении клеток с быстрой скоростью пролиферации [60, 126]. Показано, что выжившие после лекарственного воздействия покоящиеся ОСК могут повторно входить в клеточный цикл в ответ на повреждение общей массы опухолевых клеток, вызванное гемцитабином и цисплатином, что приводит к рецидиву опухоли после цикла химиотерапии [127].

Известные механизмы хеморезистентности ОСК также включают высокую активность антиапоптотических путей, ALDH и антиоксидатных систем, которые способствуют выживанию ОСК во время курса лечения [128].

Кроме того, устойчивость ОСК к противораковым препаратам часто определяют белки семейства ABC-транспортёров ABCB1, ABCC2 и ABCG2 [129, 130]. Эти белки элиминируют ксенобиотики из клеток, снижая внутриклеточную концентрацию цитотоксических веществ, и обеспечивают резистентность ОСК к химиотерапевтическим препаратам с разным механизмом действия, что определяет множественную лекарственную устойчивость [131].

1.2.2. Резистентность ОСК к действию редкоионизирующего излучения

Высокая устойчивость ОСК к действию редкоионизирующего излучения является одной из ключевых проблем современной лучевой терапии. Считается, что радиорезистентность ОСК может быть связана как с активностью внутренних факторов, то есть с особенностями метаболизма этих клеток, так и с внешними факторами, а именно с влиянием ОМО.

Так, высокий уровень выживаемости ОСК после радиационного воздействия может формироваться в результате преобладания таких внутренних факторов, как высокая активности систем репарации ДНК, высокое содержание антиоксидантов и белков, формирующих устойчивость к апоптозу, пребывания ОСК преимущественно в состоянии покоя, активации аутофагии и устойчивости к радиационно-индуцированному старению из-за низкого уровня экспрессии белка p21 и высокой активности теломеразы [13, 132, 133].

Известно, что наиболее опасными для выживания клетки являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК. Репарация ДР ДНК может идти по механизму гомологичной рекомбинации (ГР), которая, в отличие от репарации путем нехомологичного соединения концов (НГСК), характеризуется восстановлением изначальной последовательности ДНК без появления ошибок [134]. Таким образом, доступный клетке механизм репарации ДР в значительной мере может определять качество репарации и, тем самым, её отдаленные

биологические последствия. Особенностью ОСК является повышенная экспрессия ряда генов, вовлеченных в ответ на радиационно-индуцированное повреждение ДНК, таких как BRCA1, Eho1, Mre11, Rad51, Ku70 [135, 136]. При оценке изменения количества ДР ДНК во времени оказалось, что через 24 ч после облучения в ОСК оставалось меньшее количество фокусов фосфорилированного гистона H2AX, чем в других опухолевых клетках, что свидетельствует о способности ОСК более быстро репарировать ДР ДНК [135]. Примечательно, что ОСК восстанавливают повреждения ДНК, преимущественно с помощью более точного процесса – ГР. После облучения в ОСК, по сравнению с более дифференцированными опухолевыми клетками, обнаружен более высокий уровень фосфорилированной АТМ-киназы, которая является иницирующим фактором ГР, тогда как активность системы репарации по пути НГСК была одинаковой в обеих популяциях клеток [137]. Облучение в дозе 4 Гр приводило к образованию значимо большего числа фокусов RAD51 и меньшего числа фокусов γ H2AX в отсортированных ОСК трижды негативного РМЖ по сравнению с клетками родительской линии [138]. Таким образом, ОСК обладают такими механизмами, которые обеспечивают не только более эффективную, но и более точную репарацию благодаря использованию ГР.

Биологические эффекты ИИ развиваются не только за счет прямого повреждения клеточных структур, но и косвенно, в результате действия таких продуктов радиолиза внутриклеточной воды, как АФК, которые вызывают окислительный стресс [139]. Показано, что ОСК некоторых опухолей имеют относительно более высокое содержание антиоксидантов (глутатиона) и повышенную активность ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, супероксидредуктазы и каталазы), которые эффективно предотвращают возникновение повреждений, индуцируемых АФК [140].

Высокая эффективность инактивации АФК была показана в ОСК рака молочной железы [141] и карциномы яичников [142]. Ингибирование активности ферментов, участвующих в антиоксидантной защите, приводит к снижению клоногенной способности ОСК РМЖ и повышению их чувствительности к облучению [141].

Как было сказано выше, ОСК характеризуются высокой активностью фермента ALDH, которая вносит вклад в инактивацию АФК [143]. ALDH вовлечена в регуляцию клеточного цикла, поддерживая скорость пролиферации ОСК на низком уровне, что также может обуславливать их радиорезистентность [144].

Медленную скорость пролиферации ОСК (и состояние пролиферативного покоя) относят к факторам, связанным с их радиорезистентностью, поскольку более чувствительными к действию редкоионизирующего излучения являются пролиферирующие клетки, находящиеся в G₂/M-фазе клеточного цикла [145].

Кроме того, низкая чувствительность ОСК глиомы к действию ИИ связана с активацией аутофагии в этих клетках в ответ на облучение. Ингибирование аутофагии увеличивало радиочувствительность CD133⁺ клеток, что указывает на важную роль этого процесса в радиорезистентности ОСК [132].

Значительный вклад в устойчивость ОСК к действию ИИ вносит радиационно-индуцированная активация антиапоптотических сигнальных каскадов.

ИИ активирует сигнальный путь STAT3, который приводит к увеличению доли ОСК. Ингибирование сигнального каскада STAT3 предотвращает радиационно-индуцированное увеличение субпопуляции ОСК и повышает чувствительность этих клеток к действию γ -излучения [146].

В увеличение количества ОСК после облучения также вносит вклад сигнальный путь Notch. Ингибирование этого пути практически полностью предотвращает индуцированную облучением активацию экспрессии генов, кодирующих ФТ Sox2, Oct4, Nanog и Klf4, которые поддерживают репопуляцию ОСК [147]. Сигнальный путь Notch также играет важную роль в радиационно-индуцированном увеличении метастатического потенциала опухолевых клеток, повышая их способность к миграции и инвазии [148]. Показано, что после облучения отсортированные более дифференцированные клетки РМЖ переходили в пул ОСК, что подтверждалось повышенной туморогенностью и экспрессией генов стволовости на уровне, обнаруженном в необлученных ОСК. Ингибирование пути Notch частично предотвращало этот переход, что позволяет предположить большое значение этого каскада в радиационно-индуцированном увеличении доли ОСК [147].

Установлено, что облучение приводит к увеличению уровня антиапоптотического белка Bcl-2, а также повышает активность внутриклеточных каскадов PI3K и ERK в ОСК рака печени с фенотипом CD133⁺ [149]. Ингибирование пути PI3K/Akt/mTOR позволяет снизить радиорезистентность клеток рака поджелудочной железы за счет усиления апоптоза и ослабления репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК [150].

Индукцированная облучением активация пути Wnt/ β -катенин также вносит вклад в радиорезистентность ОСК разных типов опухолей, таких как РМЖ, рак толстой кишки, рак шейки матки [151, 152, 153]. Каскад Wnt/ β -катенин поддерживает устойчивость ОСК к действию ИИ поскольку, кроме регуляции самообновления, он способствует репарации ДР ДНК и снижению апоптоза после облучения [154].

Показано, что ИИ приводит к увеличению доли ОСК в разных типах опухолей, включая РМЖ, гепатоцеллюлярную карциному, глиому, рак предстательной железы [54, 155–157], что может происходить как в результате сохранения ОСК, как наиболее

радиоустойчивых клеток опухоли, так и в результате дедифференцировки дифференцированных клеток опухоли в ОСК [147]. В индуцированное излучением увеличение доли ОСК может вносить вклад и активация ЭМП [158]. Так, показано, что выжившие после однократного воздействия γ -облучения в дозе 5 Гр клетки немелкоклеточного рака легкого линий A549 и H460 имели не только высокое содержание белков CD166, CD44, β -катенина, Oct-4 и Sox-2, характерных для ОСК, но и характеризовались увеличением экспрессии маркеров ЭМП, в том числе N-кадгерина, виментина и Snail, а также более активной миграцией [159, 160]. Аналогичные результаты получены при исследовании опухолевых клеток рака головы и шеи [161] и клеток глиомы [162].

Помимо указанных биохимических особенностей резистентность ОСК к действию редкоионизирующего излучения определяется также их локализацией в опухоли. Концентрация кислорода в опухоли играет важную роль в реакции клеток на облучение, поскольку присутствие кислорода усиливает цитотоксический эффект облучения вследствие формирования большего количества АФК. В опухолях присутствуют зоны острой и хронической гипоксии [163], которые являясь нишами покоящихся ОСК, способствуют их выживаемости во время лучевой терапии (ЛТ) с использованием гамма- и рентгеновского излучения [164].

Взаимодействие между опухолевыми клетками и ОМО имеет решающее значение для активации инвазивного роста и метастазирования. Опухолевые клетки выделяют множество биологически активных молекул, таких как факторы роста, цитокины и хемокины, которые влияют на состав и организацию ОМО [164]. ИИ может приводить к различным изменениям в ОМО, обусловленным фиброзом, гипоксией и воспалительным ответом. Эти изменения могут быть благоприятными для метастазирования опухоли, самообновления и поддержания пула ОСК [165]. ИИ активирует высвобождение клетками ОМО факторов роста, включая TGF- β , который непосредственно воздействует на опухолевые клетки и стимулирует их ускользание от иммунного ответа. Кроме того, TGF- β опосредованно активирует экспрессию генов белков ряда сигнальных каскадов вследствие чего в процессе ЛТ или сразу после её окончания активируется пролиферация ОСК [166].

TGF- β играет важную роль в радиорезистентности, активируя пути репарации ДНК [167, 168]. Ингибирование сигнального пути, индуцируемого TGF- β , повышает радиочувствительность клеток РМЖ *in vitro* и задерживает рост опухоли в ответ на облучение *in vivo* [169]. Радиационно-индуцированное изменение ОМО также способствует ангиогенезу, инвазии опухолевых клеток и метастазированию [170]. Кроме

того, ИИ может вызывать повреждение эндотелиальных клеток, которое приводит к увеличению синтеза HIF-1, индуцирующего ангиогенез и васкулогенез за счет активации VEGF и CXCL12 [171]. Эти радиационно-индуцированные изменения в ОМО могут быть дополнительной причиной развития радиорезистентности, рецидивов и метастазирования.

Хорошо известно, что ЛТ опухолей проводят с использованием режима ФО, при этом наиболее часто используют редкоионизирующее излучение. Поскольку в настоящее время роль ОСК в рецидивировании опухолей хорошо известна, ОСК рассматривают и как мишень, и как маркер эффективности ЛТ. При этом оказалось, что помимо того, что ОСК резистентны и к ФО, что связывают с репарацией ДР и других повреждений ДНК в интервалах между облучениями [172], они успешно восстанавливают содержание всех типов клеток, характерных для конкретной опухоли. Такие данные были получены при исследовании ФО ксеногенных опухолей глиомы, трансплантированных иммунодефицитным мышам, и при ФО культивируемых клеток РМЖ человека разных типов [54, 173]. В этих исследованиях было установлено, что ФО повышает скорость размножения ОСК в результате стимуляции выхода ОСК из состояния покоя [173].

1.2.3. Эффективность плотноионизирующего излучения в отношении ОСК

Развитие адронной ЛТ и её высокая эффективность в отношении радиоустойчивых опухолей закономерно привели к вопросу об особенностях ответа ОСК на новые для такой терапии типы излучения. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что в отличие от редкоионизирующего излучения, ОСК не обладают резистентностью к действию плотноионизирующего излучения. В 1986 г. Конопляников А. Г. и соавт. впервые показали более высокую чувствительность колониеобразующих клеток карциномы легкого Льюиса к действию плотноионизирующего излучения. Найденное значение D_0 при гамма-облучении (^{60}Co) составляло 2,24 Гр, а при гамма-нейтронном облучении (^{252}Cf) – 0,56 Гр (по нейтронной компоненте). ОБЭ гамма-нейтронного излучения было равно 2,5 [174].

В 2012 г. Матчук О. Н. и соавт. на примере ОСК меланомы мышцы линии B16, идентифицированных по способности исключать краситель Хёхст 33342 и формировать боковую популяцию (SP), показали высокую чувствительность этой субпопуляции клеток к действию плотноионизирующего излучения. Клетки SP и не SP сортировали и определяли их выживаемость после воздействия редкоионизирующего излучения (^{60}Co) и плотноионизирующего излучения (смешанное гамма-нейтронное излучение с энергией нейтронов 14,8 МэВ и вкладе нейтронов в суммарную дозу 90–95%). Авторами показано, что клетки SP имеют более высокую устойчивость к действию γ -излучения, чем клетки,

неспособные элиминировать краситель: средние значения D_0 составляли $2,3 \pm 0,3$ Гр и $1,4 \pm 0,2$ Гр соответственно. При этом после воздействия нейтронного излучения выживаемость ОСК не отличалась от остальных клеток. Полученные авторами результаты позволили впервые связать высокую эффективность нейтронной ЛТ с элиминацией ОСК [14].

Позднее было показано, что чувствительность клеток глиобластомы линии A172, культивируемых в разных условиях, обеспечивающих как высокое, так и низкое содержание ОСК в культуре, была одинаковой к действию нейтронов. В то же время при действии на эти культуры γ -излучения, к которому ОСК устойчивы, культуры с высоким содержанием ОСК также были более резистентны. Анализ динамики образования и репарации ДР ДНК по числу фокусов гистона γ H2AX показал, что после гамма-облучения репарация ДР ДНК в ОСК происходит более быстро и полно, чем в родительских клетках, в то время как после облучения нейтронами динамика образования и репарации ДР ДНК в ОСК и исходной культуре имела одинаковые профили. По сравнению с действием γ -излучения облучение нейтронами приводило к сохранению большего числа остаточных нерепарируемых ДР ДНК как в более дифференцированных клетках глиобластомы, так и в ОСК [175].

Интересно отметить, что при исследовании одновременного действия нейтронов с энергией 14 МэВ и γ -излучения (^{60}Co) при разном вкладе плотно- и редкоионизирующего излучения в суммарную дозу в отношении клеток меланомы B16 обнаружен синергизм действия двух типов излучения при вкладе нейтронов около 30 %. При увеличении этого параметра наблюдали снижение эффекта до аддитивного уровня [176].

Сложности с достижением регрессии злокачественных новообразований и сохранением длительной ремиссии заболевания при использовании ЛТ чаще всего обусловлены высокой радиоустойчивостью ряда опухолей. Для решения этой проблемы были разработаны клинические протоколы ЛТ, основанные на использовании плотноионизирующего излучения. В частности, ингибирование развития опухоли и улучшение состояния больных было достигнуто при ЛТ с использованием быстрых нейтронов для лечения радиоустойчивых форм РМЖ, слюнной и щитовидной желез и раке гортани [19].

В то же время следует отметить, что ЛТ с использованием реакторных быстрых нейтронов ограничена особенностями локализации опухоли в связи с небольшой глубиной проникновения нейтронов в ткани. Эта проблема может быть преодолена благодаря тому, что в настоящее время уже созданы генераторы нейтронов, позволяющие оптимизировать процесс ЛТ с использованием нейтронов [20].

Кроме того, необходимо отметить перспективы применения плотноионизирующего излучения при адронной терапии с использованием тяжелых ионов. Авторы отмечают, что опыт нейтронной терапии радиоустойчивых опухолей будет полезен при разработке протоколов адронной ЛТ [177]. В частности показано, что ОСК, устойчивые к γ -излучению, более чувствительны не только к облучению нейтронами, но и к действию ускоренных ионов углерода [178, 179].

Необходимо подчеркнуть, что биологическое действие плотноионизирующего излучения характеризуется рядом особенностей, совокупность которых определяет более высокую чувствительность ОСК к действию излучения такого вида. К ним относятся отсутствие кислородного эффекта, что определяет эффективность плотноионизирующего излучения, в отличие от действия гамма- и рентгеновского излучения, в отношении гипоксических клеток, одинаковая эффективность действия в отношении всех фаз клеточного цикла пролиферирующих клеток и клеток в состоянии покоя [180] и индукция образования сложно репарируемых кластерных ДР ДНК [181].

Обобщая все сказанное выше, можно заключить, что ОСК обладают устойчивостью к действию γ -излучения, механизмы которой достаточно подробно изучены, но значительно более чувствительны к облучению быстрыми нейтронами и ускоренными тяжелыми ионами. В то же время доступность и разработанность адронной терапии пока недостаточна и её практическое использование ограничено. Поэтому для повышения эффективности конвенциональной ЛТ с использованием γ -излучения для элиминации ОСК и уменьшения лучевой нагрузки на нормальные ткани пациента целесообразно использовать нетоксичные радиосенсибилизаторы, поиск которых следует проводить исходя из необходимости снижения радиорезистентности именно ОСК.

1.3. Модификаторы радиочувствительности ОСК

Технологические достижения в ЛТ позволяют более точно доставлять дозу облучения, сводя к минимуму воздействие на нормальные ткани. Несмотря на это, частыми осложнениями лечения являются приобретенная радиорезистентность, рецидивы и метастазирование опухоли. Поэтому в настоящее время актуальной остается разработка способов увеличения эффективности ЛТ, в том числе с помощью использования химических радиомодификаторов, повышающих чувствительность опухолевых клеток к облучению.

Увеличение эффективности ЛТ может достигаться с помощью влияния на пять аспектов, составляющих «5R» концепцию радиобиологии опухолевых клеток: радиоустойчивость, репарация повреждений ДНК, перераспределение клеток по фазам

клеточного цикла, репопуляция опухолевых клеток и реоксигенация гипоксических участков опухоли [182].

На первых этапах применения радиосенсибилизаторов наиболее широко были изучены вещества из класса нитроимидазолов. Нитроимидзолы являются миметиками кислорода и усиливают радиационно-индуцированные повреждения за счет образования АФК, в том числе в гипоксических областях опухоли [183]. Результаты клинических исследований нитроимидазолов мизонидазола и метронидазола показали их эффективность в качестве радиосенсибилизаторов, однако были выявлены нежелательные явления и выраженная токсичность, которые делают использование этих соединений совместно с ЛТ нецелесообразным [184].

В дальнейшем после появления различных цитостатических препаратов, в том числе 5-фторурацила, митомицина С, цисплатина, оксалиплатина, метотрексата, цитозинарабинозида стали появляться схемы их совместного использования с ЛТ. Противоопухолевые препараты, нарушающие механизмы репарации ДНК, увеличивающие долю опухолевых клеток в радиочувствительных фазах клеточного цикла и повышающие радиочувствительность за счет реоксигенации гипоксических областей, могут увеличивать эффективность ЛТ. Однако сильные общетоксические эффекты таких препаратов ограничивают их совместное применение с ионизирующим излучением (ИИ). Более того, применение этих агентов при ЛТ приводит к улучшению локо-регионарного контроля заболевания, но не снижает риска образования отдаленных метастазов, что, вероятно, указывает на сохранение ОСК при использовании таких терапевтических схем [185].

Концепция ОСК стимулировала разработку новых терапевтических стратегий, направленных не только на уменьшение объема новообразования, но и на элиминацию ОСК, поскольку ответ на облучение обратно пропорционален количеству ОСК в опухоли. При этом даже неполное устранение ОСК может значительно улучшить контроль опухолевого процесса [13]. Радиорезистентность ОСК предполагает использование более высоких доз облучения для их элиминации, что не безопасно для нормальных клеток. Стратегия повышения радиочувствительности ОСК с помощью специальных сенсибилизаторов направлена на обеспечение баланса между контролем опухоли и развитием нежелательных явлений со стороны нормальных тканей.

Принимая во внимание роль ОСК в возникновении рецидивов и метастазировании, а также их более высокую радиорезистентность, очевидно, что использование препаратов, направленных на увеличение чувствительности ОСК к облучению, может иметь преимущества по сравнению с применением радиосенсибилизаторов, эффективных в

отношении более дифференцированных опухолевых клеток. Эффективные в отношении ОСК радиосенсибилизаторы по молекулярному механизму действия можно разделить на следующие группы: ингибиторы систем репарации ДНК; ингибиторы антиоксидантных систем и/или соединения, повышающие содержание АФК в клетке; модификаторы метаболизма; ингибиторы сигнальных каскадов и модификаторы сигналов ОМО.

Ингибиторы систем репарации ДНК

Репарация ДНК является сложным многостадийным процессом, в который вовлечено большое число молекул [186]. Потенциальные модификаторы устойчивости ОСК, влияющие на разные этапы ответа на радиационно-индуцированные повреждения ДНК, можно отнести к трем классам, представленным ниже.

1. Препараты, ингибирующие активность сенсорных молекул, распознающих появление разрыва ДНК. Одним из примеров таких молекул может быть поли(АДФ-рибоза)-полимераза (PARP), которая распознает одноцепочечные разрывы ДНК, активируется, стимулирует синтез поли(АДФ-рибозы) и поли(АДФ-рибозил)ирование белков и стимулирует рекрутирование ферментов репарации к месту повреждения ДНК [187]. Показано, что ингибитор PARP олапариб повышает радиочувствительность клеток РМЖ [188]. Также обнаружено, что совместное действие γ -излучения и димерных производных бисбензимидазолов, способных ингибировать ряд ферментов, в том числе PARP, приводит к значительному сокращению пула ОСК линии MCF-7 и ингибированию радиационно-индуцированного ЭМП [189].

2. Препараты, ингибирующие активность ряда ферментов, обладающих протеинкиназной активностью и определяющих реакцию клетки на повреждение ДНК. ДНК-зависимая киназа рекрутируется в область ДР и активируется с участием связанного с ДР белка Ku70/80, АТМ-киназа – с участием связанного с ДР комплекса белков MRN; ATR-киназа рекрутируется и активируется белком ATRIP в область участков одностранных ДНК, покрытых белком RPA [190]. Эти киназы участвуют в активации процессов репарации ДР и остановке клеточного цикла, необходимой для репарации разрыва ДНК. Обнаружено, что специфический ингибитор фосфорилирования АТМ KU-55933 значительно сенсибилизирует радиорезистентные клетки рака мочевого пузыря и ОСК глиобластомы к облучению, благодаря замедлению репарации ДР ДНК [191, 192]. Показано также, что ингибирование ATR-киназы с помощью соединения VE-821 значительно повышает чувствительность опухолевых клеток различных типов рака, в том числе находящихся в гипоксических условиях, к действию излучения [193].

DNA-PK восстанавливает радиационно-индуцированные ДР ДНК, участвуя в процессе репарации по пути НГСК, действуя как сенсор ДР ДНК [194]. Одним из первых

высокоселективных ингибиторов DNA-РК является SU11752, который, ингибирует репарацию ДР ДНК в клетках глиобластомы и сенсibiliзирует их к действию ИИ [195]. Впоследствии было обнаружено, что ингибирование каталитической субъединицы DNA-РКs с помощью соединения NU7441, приводит к значительному снижению способности ОСК глиомы образовывать сфероиды, а также повышает эффективность ЛТ *in vivo* [196].

3. Препараты, ингибирующие эффекторные молекулы репарации, такие как CHK1/2 и RAD51. Киназы контрольных точек CHK1 и CHK2, являясь нижележащими эффекторами, передают сигналы от ATR и ATM соответственно. Активация CHK1/2 участвует в различных клеточных процессах, таких как остановка клеточного цикла и апоптоз. Показан радиосенсибилизирующий эффект ингибитора CHK1/2 дебрoмгимениальдизина в отношении ОСК глиомы и РМЖ [54, 197]. CHK1 активирует белок RAD51, который участвует в репарации ДР ДНК по механизму ГР. Установлено, что ингибирование RAD51 с помощью соединения RI-1 повышает чувствительность радиорезистентных клеток глиомы, приводя к замедлению репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК и активации апоптоза [198].

4. Препараты, ингибирующие ДНК-полимеразы и индуцирующие появление разрывов в ДНК. К таким препаратам относится известный противоопухолевый препарат 1-β-D-арабинофуранозилцитозин (AraC). AraC блокирует активность ДНК-полимераз α и β, которые участвуют в процессе репарации ДНК. Это приводит к фиксации радиационно-индуцированных одноцепочечных разрывов ДНК, которые при попытке репарации в присутствии AraC трансформируются в ДР ДНК. Показано, что облучение привитой мышам сингенной опухоли меланомы B16 *in vivo* протонами в пике Брэгга в дозе 10 Гр после введения AraC приводило к более медленному росту опухоли и более низкому содержанию ОСК меланомы в опухоли, чем только при действии протонов [199].

Ингибиторы антиоксидантных систем

Как упоминалось выше, ОСК характеризуются способностью эффективно обезвреживать АФК, поэтому ингибиторы компонентов антиоксидантной системы, в том числе глутатиона и тиоредоксина, могут быть потенциальными радиосенсибилизаторами ОСК. Показано, что ингибитор синтеза глутатиона бутионинсульфоксимин снижает способность ОСК инактивировать АФК и повышает их радиочувствительность, активируя радиационно-индуцированный апоптоз [200]. Также обнаружено, что ингибирование активности тиоредоксинредуктазы с помощью ауранофина повышает чувствительность ОСК РМЖ к действию излучения с помощью механизма, включающего тиолзависимый окислительный стресс, и этот эффект усиливается при совместном использовании ауранофина с бутионинсульфоксимином [201].

Установлено, что наночастицы титана пероксида (TiO₂NP) способствуют формированию большого количества радиационно-индуцированных АФК в сочетании с ингибированием сигнального пути АКТ, приводят к увеличению цитотоксического эффекта облучения в отношении обогащенных ОСК сфероидов рака поджелудочной железы [202].

К веществам, повышающим чувствительность опухолевых клеток к действию излучения благодаря инактивации компонентов антиоксидантной системы и увеличения уровня АФК, относятся некоторые соединения растительного происхождения, например куркумин и ресвератрол [203]. Обнаружено, что куркумин повышает чувствительность ОСК рака шейки матки к действию излучения *in vitro* и при совместном действии с облучением приводит к более значительному уменьшению размера первичной опухоли, чем при действии только облучения [204]. Также было показано, что куркумин в сочетании с частицами нанозолота уменьшает радиорезистентность ОСК РМЖ линий MCF-7 и MDA-MB-231, благодаря увеличению уровня радиационно-индуцированных АФК в условиях гипоксии, подавлению экспрессии HIF-1α и активации апоптоза [205].

Модификаторы метаболизма ОСК

Потенциальными радиомодификаторами могут быть соединения, влияющие на измененный метаболизм ОСК, включая энергетический обмен, синтез жирных кислот и обмен глутамина. Так, 2-дезоксид-глюкоза ингибирует активность транспортера глюкозы 1 типа (GLUT1), усиливает радиационно-индуцированный апоптоз и повышает чувствительность радиорезистентных опухолевых клеток к облучению [206]. Ингибитор лактатдегидрогеназы FX11 в сочетании с облучением индуцировал гибель опухолевых клеток, зависящих от гликолиза, и приводил к активации дифференцировки ОСК глиобластомы [207].

Ингибирование изоформы M2 пируваткиназы (PK-M2) под воздействием радиационно-индуцированного окислительного стресса приводит к переключению метаболизма ОСК, что способствует их выживанию в неблагоприятных условиях. Применение низкомолекулярного активатора PK-M2 TEP46 совместно с облучением привело к уменьшению субпопуляции ОСК трижды негативного РМЖ *in vitro* [208].

Известно, что ОСК могут переключаться с окислительного фосфорилирования на гликолиз в зависимости от внешних условий. Показано, что дихлорацетат, препятствующий такому метаболическому переключению ОСК глиобластомы, приводил к образованию митохондриальных АФК и активировал апоптоз в этих клетках. Более того, у пациентов с глиобластомой, получающих дихлорацетат совместно с ЛТ и темозоломидом наблюдали снижение скорости роста опухоли [209].

В отношении веществ, влияющих на обмен липидов, обнаружено, что ингибитор синтазы жирных кислот C75 снижает жизнеспособность ОСК, а также повышает радиочувствительность этих клеток [210]. Ингибирование карнитин-пальмитоилтрансфераз I и II с помощью этомоксира блокирует процесс окисления жирных кислот, ингибирует путь ERK, снижает инвазивные свойства и повышает чувствительность ОСК РМЖ к облучению [211].

Субпопуляция ОСК РМЖ характеризуется высоким содержанием липидных капель и высокой активностью фермента диацилглицеролацилтрансферазы 2 (DGAT2), который участвует в их биогенезе [212]. Показано, что обработка клеток РМЖ линии MCF-7 селективным ингибитором DGAT2 PF-06424439 с последующим их облучением увеличивает их радиочувствительность, ингибирует ЭМП, снижает способность опухолевых клеток к миграции [213].

ОСК характеризуются активным катаболизмом глутамина, который необходим не только для производства энергии, но и для поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза. Ингибирование глутаминазы, регуляторного фермента в обмене глутамина, с помощью соединения СВ-839 приводит к значительному повышению чувствительности ОСК рака предстательной железы к облучению [214].

Ингибиторы сигнальных каскадов

Для ОСК характерно повышение активности антиапоптотических путей, которое способствует резистентности этих клеток к действию повреждающих факторов. Например, показано, что антиапоптотические белки семейства Bcl-2 сверхэкспрессированы в клетках РМЖ линии MDA-MB-231R с приобретенной радиорезистентностью, а добавление к этим клеткам соединения АВТ-737, ингибитора белков семейства Bcl-2, позволяет восстановить радиочувствительность этих клеток *in vitro* и *in vivo*, благодаря активации радиационно-индуцированного апоптоза [215]. Еще одним активным антиапоптотическим путем в ОСК является сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR. Показано, что рапамицин и темсиролимус (ингибиторы mTOR), бупарлисиб и LY294002 (ингибиторы AKT) блокируют самообновление ОСК и приводят к уменьшению фракции этих клеток [216]. Кроме того, соединение LY294002 повышает эффективность облучения и замедляет рост опухоли мочевого пузыря после облучения *in vivo* [217].

Ингибитор AKT перифозин снижает долю выживших после облучения ОСК молочной железы и уменьшает способность ОСК инициировать опухоль [218]. Как показано в работе [219], двойной ингибитор PI3K/mTOR BEZ235 повышает чувствительность радиорезистентных клеток рака предстательной железы к облучению,

что регистрируется по увеличению уровня апоптоза опухолевых клеток, уменьшением относительного содержания ОСК и активности ЭМП.

Добавление экстракта семян мапранга (*Bouea macrophylla*), который ингибирует пути PI3K/АКТ и MAPK, к клеткам РМЖ линий MCF7 и MDA-MB231 до облучения повышает радиочувствительность клеток, приводя к увеличению радиационно-индуцированных повреждений ДНК, ингибированию ЭМП и уменьшению фракции ОСК [220].

Ингибитор PI3K/mTOR PKI-402 эффективно активирует радиационно-индуцированный апоптоз в клетках РМЖ и повышает их чувствительность к облучению [221]. Таким образом, ингибирование антиапоптотических сигнальных путей может снизить выживаемость ОСК во время или после ЛТ.

Как было сказано выше для поддержания свойств ОСК решающее значение имеет активация различных сигнальных путей, включая Hedgehog, Wnt и Notch [101]. Поэтому ингибиторы этих сигнальных каскадов могут быть потенциальными радиомодификаторами, повышающими чувствительность ОСК облучению.

Например, ингибитор пути Hedgehog GANT61 эффективно элиминирует ОСК рака поджелудочной железы, а также сенситизирует клетки рака предстательной железы к облучению *in vitro* и *in vivo* [222, 223].

Другой ингибитор пути Hedgehog, GDC-0449 (висмодегиб), значительно уменьшает количество ОСК рака поджелудочной железы благодаря активации апоптоза [224]. У пациентов с неоперабельной местнораспространенной базальноклеточной карциномой совместное применение висмодегиба и ЛТ привело к увеличению локорегионального контроля и выживаемости без прогрессирования [225]. Обнаружено, что экстракт витании снотворной (*Withania somnifera*), который ингибирует путь Hedgehog, приводит к увеличению радиационно-индуцированной гибели ОСК рака легких, а также подавляет их способность к образованию сфероидов [226].

Известно, что активация сигнального каскада Wnt/ β -катенин способствует дедифференцировке опухолевых клеток в ОСК и участвует в поддержании самообновления ОСК [101]. Ингибирование пути Wnt/ β -катенин с помощью соединения ХАV939 приводит к уменьшению популяции ОСК рака предстательной железы и повышает их чувствительность к облучению, вызывая снижение активности ALDH [227]. Ингибитор β -катенина FH535 усиливает радиочувствительность резистентных клеток рака пищевода, нарушая репарацию радиационно-индуцированных ДР ДНК и препятствуя ЭМП [228].

Ингибирование фактора транскрипции STAT3 и экспрессии гена сурвивина, который является геном-мишенью STAT3, повышает радиочувствительность HER2-положительных клеток РМЖ [229]. Показано, что производное анминденола А АМ-18002, ингибируя путь STAT3, стимулирует радиационно-индуцированный апоптоз и снижает выживаемость клеток РМЖ после облучения [230]. Синергизм цитотоксического действия облучения и ингибитора STAT3 FL392 в составе липосом, обнаружен как в отношении клеток рака поджелудочной железы *in vitro* и *in vivo*, так и в отношении популяции ОСК, идентифицированных по активности ALDH1 [146].

Ингибиторы других путей, вовлеченных в поддержание стволовых свойств, также могут быть потенциальными радиомодификаторами ОСК. Например, вактосертиб, ингибитор рецептора TGF- β , совместно с облучением уменьшает количество ОСК РМЖ, ингибируя радиационно-индуцированный ЭМП. Более того, совместное действие вактосертиба и излучения показало выраженный антиметастатический эффект *in vivo* [231].

Для пролиферации ОСК некоторых типов рака большое значение имеет эпидермальный фактор роста (EGF). Показано, что ингибитор рецептора этого фактора афатиниб не только снижает радиоустойчивость опухолевых клеток плоскоклеточной карциномы, но и препятствует пострadiационному повышению содержания ОСК как в культуре клеток, так и в ксенотрансплантированных опухолях карциномы у иммунодефицитных мышей [232].

Доцетаксел относится к противоопухолевым препаратам с хорошо изученным механизмом действия [233, 234]. Последний определяется нарушением скорости полимеризации микротрубочек и, как следствие, веретена деления, что приводит к ингибированию пролиферации и/или появлению клеток с гиподиплоидным набором хромосом. Показано также, что вызываемые доцетакселом нарушения цитоскелета приводят к ингибированию рецептора EGF и соответствующих сигнальных путей, участвующих в регуляции деления опухолевых клеток [235]. Другой важнейший механизм действия этого препарата определяется его способностью ингибировать сигнальный каскад PI3K/AKT, что может, как показано на примере ОСК гепатоцеллюлярной карциномы, приводить к гибели ОСК [236]. Эти данные позволяют рассматривать доцетаксел в качестве потенциального радиосенсибилизатора ОСК.

Еще одним противоопухолевым препаратом с потенциальным радиосенсибилизирующим эффектом в отношении ОСК является дазатиниб. Механизм противоопухолевого действия этого препарата, используемого для лечения некоторых форм хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), связан с ингибированием

протеинтирозинкиназ BCR-ABL и семейства киназ SRC [237, 238]. Однако следует отметить, что сверхактивация SRC-киназы происходит не только при ХМЛ, но также обнаружена в некоторых типах солидных опухолей, а в случае РМЖ активация SRC-киназы играет важную роль в путях передачи сигналов ряда стероидных и пептидных гормонов [239]. Показано, что дазатиниб эффективно ингибирует SRC-киназу в клетках базальноподобного типа РМЖ [240]. Установлено также, что дазатиниб снижает способность образовывать колонии и способность к инвазии HER2-положительных клеток РМЖ [241]. Кроме того, дазатиниб избирательно влияет на ОСК разных линий РМЖ *in vitro* и подавляет рост трижды негативного РМЖ *in vivo* [242].

Механизм действия дазатиниба на ОСК может быть опосредован потенциалом этого препарата ингибировать сигнальные пути PI3K и ERK благодаря его способности блокировать тирозинкиназную активность рецептора c-KIT [243]. Описано также радиосенсибилизирующее действие этого препарата в отношении клеток ряда линий рака легкого человека, при этом выжившие после γ -облучения клетки имели фенотип ОСК и признаки способности к эпителиально-мезенхимному переходу [159]. Представленные данные позволяют рассматривать дазатиниб в качестве потенциального модификатора радиочувствительности ОСК линии MCF-7.

Модификаторы сигналов ОМО

Поскольку опухоли имеют гипоксические области, которые являются нишами ОСК и снижают эффективность ЛТ, стратегии, направленные на реоксигенацию или, на ингибирование сигналов, усиливающихся при гипоксии, потенциально могут способствовать преодолению радиорезистентности ОСК. Важным следствием гипоксии является активация путей, опосредуемых HIF. Известно, что HIF приводит к активации VEGF-зависимого ангиогенеза, а также активирует биогенез антиоксидантов, что способствует повышению выживаемости клеток после облучения [244].

Обнаружено, что апигенин сенсибилизирует резистентные клетки глиомы к облучению *in vitro* и *in vivo*, уменьшает долю ОСК и снижает репарацию радиационно-индуцированных повреждений ДНК путем ингибирования пути HIF-1 α /NF- κ B [245]. 2-Метоксиэстрадиол ингибирует рост и миграцию ОСК карциномы носоглотки и снижает их радиорезистентность посредством инактивации сигнального пути HIF-1/NF- κ B и ЭМП [246].

Сунитиниб, в сочетании с облучением усиливает гибель клеток рака предстательной железы по сравнению с действием только излучения. Радиомодифицирующее действие препарата связано со значительным снижением уровня

HIF-1 α *in vitro* и уменьшением гипоксии в опухоли *in vivo*. Более того, сунитиниб снижает количество ОСК и sensibilizует их к облучению [247].

Индукцированная гипоксией карбоангидраза IX (CAIX) участвует во внутриклеточной и внеклеточной регуляции pH, которое имеет решающее значение для опухолевого роста и метастазирования. Ингибирование активности карбоангидразы IX в клетках РМЖ линий MDA-MB-231 и MCF-7 в условиях гипоксии с помощью U104 привело к уменьшению клоногенной способности, способности к миграции и радиочувствительности этих клеток [248].

Различные терапевтические препараты с доказанной низкой токсичностью и хорошей переносимостью, особенно если их механизм действия связан с влиянием на сигнальные или метаболические пути, обуславливающие устойчивость ОСК к облучению, могут оказаться перспективными средствами для sensibilizации ОСК к действию облучения.

Например, антибактериальный препарат сульфасалазин, ингибирующий транспорт цистина, который необходим для обеспечения окислительно-восстановительного гомеостаза, селективно индуцирует апоптоз в ОСК плоскоклеточного рака головы и шеи, снижая резистентность опухоли к терапевтическому воздействию [249].

Ритонавир, ингибитор протеазы вируса иммунодефицита человека типа I (ВИЧ), ингибируя антиапоптотический белок Bcl-2, приводит к увеличению радиационно-индуцированного апоптоза в клетках карциномы головы и шеи *in vitro*, а также совместно с облучением уменьшает ангиогенез и синергически замедляет рост опухоли *in vivo* [250].

Ингибитор синтазы жирных кислот орлистат, который применяется в качестве гипополипидемического средства, sensibilizует радиорезистентные клетки рака легкого к облучению [251].

Золедроновая кислота, которая используется как ингибитор резорбции костной ткани при остеопорозе, повышает чувствительность клеток рака пищевода к действию излучения, блокируя клеточный цикл между S- и G₂/M-фазой, что приводит к увеличению гибели опухолевых клеток. Радиосensibilizующий эффект этого препарата также связан с ингибированием VEGF-зависимых путей, активность которых повышается под действием ИИ [252].

В работе [253] показано повышение радиочувствительности ОСК РМЖ таких линий, как MDA-MB-231, SUM149, SUM190 и SUM159, регистрируемое по способности клеток образовывать маммосферы, при действии препарата симвастатина, используемого при гиперлипидемии.

Глимепирид, препарат для лечения сахарного диабета 2 типа, в сочетании с ЛТ значительно замедляет рост опухоли и увеличивает выживаемость животных с ортотопической ксенотранспланцией клеток глиобластомы. Кроме того, установлено, что препарат способен сенсibilизировать ОСК глиобластомы к облучению за счет подавления их гликолитической активности и способности к самообновлению [254].

Представленные данные позволяют полагать, что наиболее выраженным радиомодифицирующим эффектом будут обладать препараты, которые влияют одновременно на несколько молекулярных механизмов, определяющих радиорезистентность ОСК.

Результаты скринингового исследования показали, что никлозамид может обладать цитотоксическим действием в отношении ОСК [255]. Такая активность этого препарата может определяться, как его способностью снижать мембранный потенциал митохондрий и приводить к разобщению дыхания и окислительного фосфорилирования, что сопровождается повышением АФК [256], так и блокированием сигнальных путей Wnt, NF-kB, Stat3, Notch и mTORC1, которые играют важную роль в стимуляции пролиферации и дифференцировки ОСК [257].

Обнаружено, что никлозамид обладает сенсibilизирующим действием к облучению в отношении клеток рака легкого и назофарингеальной карциномы *in vitro* [258, 259]. Этот эффект никлозамида может быть связан с его способностью значительно повышать количество радиационно-индуцированных ДР ДНК в клетках через 1 и 12 ч после облучения [259]. Таким образом, никлозамид может быть перспективным препаратом для преодоления резистентности ОСК к облучению.

Еще одним потенциальным радиомодификатором ОСК может быть давно применяемый в клинике антидиабетический препарат метформин. В частности установлено, что метформин в экспериментах на культурах клеток обладает способностью уменьшать количество ОСК в культурах клеток РМЖ, не изменяя количество нормальных клеток при культивировании в течение 24–48 ч [260]. Позднее аналогичные данные были получены в отношении опухолевых клеток других типов, в том числе клеток глиобластомы [261, 262]. Такая активность метформина в отношении ОСК может быть связана с его способностью снижать синтез АТФ благодаря ингибированию комплекса I цепи переноса электронов (ЦПЭ), что приводит к снижению активности энергозатратных биохимических процессов. В частности, J. Liu и соавт. показали, что в основе повышения гибели клеток гепатомы при совместном действии низких концентраций метформина и ИИ лежит ингибирование репарации индуцированных облучением повреждений ДНК, обусловленное снижением концентрации АТФ в клетках [263]. При этом следует

отметить, что повышение радиочувствительности клеток разных линий гепатоклеточной карциномы при действии метформина было обнаружено как при действии γ -излучения, так и при облучении клеток быстрыми нейтронами [264], хотя несколько неожиданными в этой работе представляются данные о практически одинаковой чувствительности клеток к действию γ -излучения и нейтронов. Однако при действии метформина и снижение выживаемости этих клеток, и увеличение уровня апоптоза были более интенсивными в случае облучения нейтронами.

Установлено также, что метформин повышает радиочувствительность опухолевых клеток рака предстательной железы как *in vitro*, так и *in vivo*. При этом обнаружено повышение уровня образования ДР ДНК и ингибирования их репарации при облучении клеток в присутствии метформина [265].

Другой механизм действия метформина на опухолевые клетки связан с ингибированием конститутивно активных в ОСК сигнальных путей, поддерживающих репопуляцию пула ОСК и повышающих их резистентность к действию повреждающих факторов, в том числе ИИ. Как было сказано выше метформин ингибирует комплекс I ЦПЭ, в результате чего в клетке снижается уровень АТФ при одновременном увеличении содержания АМФ, который активирует фермент АМФ-активируемую протеинкиназу (АМФК). АМФК является ингибитором сигнального каскада mTOR, который имеет большое значение для активной пролиферации опухолевых клеток [266].

Помимо вышеперечисленных эффектов метформина показано также, что этот препарат ингибирует пролиферацию и снижает метастатический потенциал опухолевых клеток благодаря угнетению таких сигнальных путей, как PI3K/Akt/mTOR и MEK/ERK1/2 [267]. Кроме того, метформин подавляет экспрессию гена стволовости OCT4 в ОСК РМЖ линии MCF-7 и ингибирует способность этих клеток к самообновлению [268].

Еще один механизм повышения чувствительности опухолевых клеток к действию ИИ при использовании метформина связан с уменьшением уровня гипоксии в опухолевой ткани. Ингибируя ЦПЭ, препарат предотвращает использование кислорода опухолевыми клетками в процессе синтеза АТФ, в результате чего увеличивается степень оксигенация опухоли [269]. Эти данные позволяют ожидать, что метформин будет эффективно повышать чувствительность ОСК к облучению.

Заключая анализ литературы, касающейся высокой радиорезистентности ОСК и их роли в формировании рецидивов опухолей и метастазировании, можно констатировать, что радиоустойчивость именно ОСК является одной из основных причин недостаточной эффективности ЛТ. Пластичность ОСК, связанная с процессом ЭМП, усложняет идентификацию и элиминацию этих клеток. В устойчивости ОСК к действию ИИ

немаловажную роль также играет влияние ОМО. Можно полагать, что те лекарственные препараты, которые способны ингибировать механизмы, определяющие устойчивость ОСК к действию ИИ, смогут обеспечить как повышение эффективности ЛТ, так и снизить лучевую нагрузку на пациента. Поэтому, поиск низкотоксичных радиомодификаторов устойчивости ОСК к облучению остается важной и до конца нерешенной задачей.

В связи с этим, целью настоящей работы явилась характеристика чувствительности ОСК маммосфер клеток РМЖ линии MCF-7 к действию гамма-излучения и нейтронов и исследование возможности повышения радиочувствительности ОСК с помощью используемых в клинической практике ингибиторов сигнальных путей, таких как доцетаксел, дазатиниб, никлозамид и метформин.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Культивирование клеток

Рутинное культивирование клеток линии MCF-7 в виде прикрепляющейся 2D-культуры проводили в полистрирольных культуральных сосудах (Corning, Германия) в полной культуральной среде следующего состава: среда DMEM (Gibco, США), с 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС; HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) до плотности монослоя 80–90%, после чего рассеивали в соотношении 1:4. Клетки снимали с подложки 0,05% раствором трипсина в 0,02% растворе ЭДТА (Thermo Fisher Scientific, США).

Для получения 3D-культуры клетки 2D-культуры снимали с подложки, собирали центрифугированием при 300×g, и помещали в количестве 20–30 клеток/мкл в культуральные сосуды для суспензионных культур (Greiner, Австрия), содержащие полную среду для 3D-культуры (табл. 4). В таких условиях клетки формировали плавающие сфероиды – первичные маммосферы. Для пересева клеток маммосферы собирали центрифугированием при 100×g, диссоциировали с помощью смеси протеаз в составе реактива Accutase (Gibco, США) в соответствии с рекомендациями производителя и далее культивировали в условиях 3D-культуры с образованием вторичных маммосфер, которые использовали в экспериментах.

Клетки и 2D- и 3D-культуры культивировали в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере с содержанием 5% CO₂ при 37°C. Для подсчета клеток во всех экспериментах использовали камеру Горяева.

Таблица 4 – Состав полной среды для 3D-культуры

Название компонента	Содержание	Производитель
Среда DMEM/F12 без фенолового красного	Основной компонент	Gibco, США – все эксперименты, кроме исследований с дазатинобом; HiMedia Laboratories, Индия – исследования с дазатинибом
Эпидермальный фактор роста	20 нг/мл	PeptoTech, США
Фактор роста фибробластов	20 нг/мл	PeptoTech, США
Добавка ITS (смесь инсулина, трансферрина и натрия селенита)	0,5 %	Sigma-Aldrich, США
Гепарин	4 мкг/мл	Serva, Германия
Добавка B27	2 %	Life Technologies, США
Гентамицин	50 мкг/мл	Gibco, США

2.2. Определение времени удвоения клеток прикрепляющейся культуры, культуры маммосфер и ОСК маммосфер линии MCF-7

При анализе времени удвоения клеток 2D-культуры их рассеивали по 30 тыс. клеток в лунку 12-луночного планшета (Corning, США). Клетки 3D-культуры рассеивали по 30 тыс. клеток в лунку низкоадгезивного 24-луночного планшета (Corning, США).

Количество клеток определяли с помощью камеры Горяева ежедневно в течение 7 сут. Для этого клетки 2D-культуры снимали с подложки, а маммосферы диссоциировали, как описано выше. В культурах маммосфер определяли долю ОСК по фенотипу (см. раздел 2.5) и рассчитывали количество ОСК в образцах по формуле:

$$\text{Количество ОСК} = \text{Общее количество клеток в образце} \times \text{Доля ОСК}$$

По полученным значениям строили графики изменения количества клеток прикрепляющейся культуры, культуры маммосфер и ОСК маммосфер в зависимости от времени культивирования. Время удвоения клеток определяли по следующей формуле:

$$TD = D * \ln(2) / \ln\left(\frac{a_{\text{конеч.}}}{a_{\text{нач.}}}\right),$$

где: TD – время удвоения, D – длительность культивирования от начала до конца логарифмической фазы, $a_{\text{нач.}}$ – количество клеток в начале логарифмической фазы, $a_{\text{конеч.}}$ – количество клеток в конце логарифмической фазы. Начало и конец логарифмической фазы определяли по линейному участку полученных графиков.

2.3. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла

Клетки прикрепляющейся культуры снимали с подложки через 3 сут после посева, маммосферы диссоциировали на отдельные клетки на 5-е сут культивирования, как указано выше.

После промывания фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ; НПП «ПанЭко», Россия) клетки фиксировали в 70% ледяном этаноле в течение 1 ч на ледяной бане и до исследования хранили при -20°C. В день анализа клетки дважды отмывали от этанола ФСБ с помощью центрифугирования при 300×g, ресуспендировали в 200 мкл раствора для окрашивания (см. табл. 5) и выдерживали перед анализом в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре.

Таблица 5 – Состав раствора для окрашивания

Название компонента	Содержание	Производитель
Фосфатно-солевой буферный раствор	Основной компонент	НПП «ПанЭко», Россия
Пропидия йодид	50 мкг/мл	(Sigma-Aldrich, США)
Тритон X-100	0,1%	(Panreac, Испания)
ЭДТА	0,1 моль/л	(Sigma-Aldrich, США)
Инактивированная при кипячении рибонуклеаза А	0,05 мг/мл	(Gibco, США)

Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью проточной цитометрии на приборе BD FACSAria Fusion (BD Biosciences, США). Условия детектирования пропидия йодида и ряда флуоресцентно меченых соединений приведены в табл. 6.

Таблица 6 – Условия детектирования использованных флуорофоров и флуоресцентно меченых соединений при проточной цитометрии

Флуорофор	$\lambda_{\text{возб}}$, нм	$\lambda_{\text{эм}}$, нм
Пропидия йодид	488	530±30
AlexaFluor 488	488	530±30
ФИТЦ	488	530±30
Фикоэритрин		
- при измерении на FACSCalibur	488	585±42
- при измерении на BD FACSAria Fusion	488	560±20
Хёхст 33342	364	670±30 и 424±20
ALDEFLUOR	488	530±30
Carboxy-H2DCFDA (C400)	488	530±30

2.4. Определение содержания белка Ki67 в клетках 2D- и 3D-культуры линии MCF-7

Клетки 2D-культуры снимали с подложки, а маммосферы диссоциировали, как описано выше. Клетки, промытые ФСБ, фиксировали в 70% ледяном этаноле в течение 1 ч на ледяной бане. В день анализа после двукратного промывания ФСБ клетки ресуспендировали в ФСБ, содержащем 5% ФБС. Меченные AlexaFluor 488 антитела к белку Ki67 (BioLegend, США) вносили в разведении 1:20. Окрашивание проводили в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, после чего клетки дважды промывали ФСБ и анализировали на проточном цитометре BD FACSAria Fusion (см. табл. 6).

2.5. Определение доли ОСК в прикрепляющейся культуре и культуре маммосфер линии MCF-7 по фенотипу $CD44^{+}/CD24^{-/low}$, размеру фракции SP и активности альдегиддегидрогеназы

Анализ содержания ОСК в культуре по фенотипу $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ проводили, как описано в [6] с модификациями: использовали антитела к CD44, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), и к CD24, меченные фикоэритрином (ФЭ) (оба антитела BioLegend, США). Антитела по 5 мкл вносили к 100 мкл суспензии клеток, предварительно промытых и ресуспендированных в холодном ФСБ, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА; MP Biomedicals, Германия) и 0,1% натрия азида (Merck, Германия). Образцы инкубировали в течение 30 мин в ледяной бане в темноте. Далее клетки дважды промывали при 4°C холодным ФСБ, содержащим 0,1% БСА и 0,1% натрия азида и хранили в этих условиях до исследования не более 1 ч. Анализ проводили на проточном цитометре FACSCalibur (BD Bioscience, США) или BD FACSAria Fusion в условиях, указанных в табл. 6.

При анализе доли ОСК по размеру фракции SP готовили суспензию клеток прикрепляющейся культуры и маммосфер в соответствии с протоколом, приведенном в работах [189, 270]. Часть клеток в соответствующей культуральной среде в концентрации

1 млн/мл предварительно инкубировали с 50 мкг/мл верапамила (Sigma-Aldrich, США) при 37°C в течение 20 мин. Затем во все пробы добавляли 5 мкг/мл красителя Хёхст 33342 (Sigma-Aldrich, США) и продолжали инкубацию при 37°C в течение 60 мин, после чего клетки отмывали от красителя холодным раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия), содержащим 2% ФБС и 10 ммоль/л HEPES (Sigma, США), и ресуспендировали в 200 мкл этого же раствора. Для исключения из анализа погибших клеток использовали раствор йодистого пропидия в конечной концентрации 1 мкг/мл. Клетки до анализа хранили в ледяной бане. Анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSAria Fusion (см. табл. 6). Преинкубация с верапамилем приводила к переходу клеток из SP в популяцию окрашенных клеток, что использовали для выделения на гистограмме образцов с верапамилем области с минимальным количеством событий, которая соответствовала популяции SP в образцах без верапамила.

Анализ доли ОСК по активности альдегиддегидрогеназы (ALDH) проводили с использованием набора ALDEFLUOR (STEMCELL Technologies, Канада) согласно методике производителя. Клетки собирали, как описано выше, промывали, подсчитывали их количество и доводили до концентрации 0,5 млн клеток/мл буферным раствором из набора. В половину проб добавляли реактив ALDEFLUOR DEAB (раствор N,N-диэтиламинобензальдегида – конкурентного ингибитора ALDH) в разведении 1:100, затем во все пробы добавляли реактив ALDEFLUOR в разведении 1:200 и инкубировали образцы при 37°C в течение 45 мин. После этого клетки собирали при 4°C, ресуспендировали в 0,5 мл буферного раствора (входит в состав набора). При анализе использовали не менее 100 тыс. клеток в образце. Исследование флуоресценции проводили на цитометре BD FACSAria Fusion (см. табл. 6). Добавление DEAB приводило к уменьшению клеток с высокой активностью ALDH в культурах, что использовали для выделения на гистограмме области с минимальным количеством событий, которая соответствовала популяции ALDH⁺-клеток в образцах без DEAB.

2.6. Анализ эффективности клонирования клеток 2D-культуры и клеток маммосфер

Клетки 2D-культуры собирали, ресуспендировали в полной среде, подсчитывали количество клеток, помещали в 6-луночный планшет (Corning Costar, США) по 500 клеток в лунку в 2 мл полной среды и культивировали в стандартных условиях в течение 14 сут. Каждые 3-и сутки проводили частичную (0,5 мл) замену среды на свежую. Через 14 сут среду удаляли, колонии промывали ФБС и окрашивали 0,5% раствором кристаллического фиолетового (Serva, Германия) в 70% метаноле в течение 15 мин. После отмывания красителя подсчитывали количество колоний, состоящих не менее чем из 50 клеток.

Клетки маммосфер собирали, ресуспендировали в полной среде, вносили по 100 клеток в лунки низкоадгезивного 96-луночного планшета (Corning Costar, США) в 100 мкл среды и культивировали в течение 7 сут. Количество образовавшихся маммосфер подсчитывали с помощью светового микроскопа. При анализе учитывали колонии диаметром не менее 50 мкм (не менее 50 клеток). Эффективность клонирования (PE – plating efficiency) рассчитывали по формуле: $PE = \frac{\text{Количество колоний}}{\text{Количество высаженных клеток}} \times 100\%$

2.7. Облучение клеток

Клетки как 2D-, так и 3D-культуры подвергали облучению в виде суспензии в питательной среде без сыворотки, факторов роста и добавок при комнатной температуре. После облучения клетки культивировали в стандартных условиях. γ -Облучение проводили от радиоизотопного источника ^{60}Co на аттестованной гамма-облучательной установке «ГУТ-200М». Облучение нейтронами проводили на горизонтальном экспериментальном канале реактора «ИР-8» НИЦ «Курчатовский институт». Условия облучения клеток на разных источниках ИИ представлены в табл. 7.

Таблица 7 – Условия облучения клеток на источниках ионизирующего излучения

Параметры	γ -Излучение	γ, n -Излучение
Дозы облучения	1–8 Гр	0,05–2 Гр
Мощность дозы	0,75±0,08 Гр/мин	0,07±0,01 Гр/мин, вклад нейтронов – 33 %.
Энергетический диапазон: - γ -кванты - нейтроны	1,17 МэВ и 1,33МэВ –	От 0,1 МэВ до 4,0 МэВ От 0,5 эВ до 10 МэВ

Примечание: расчет поглощенных доз нейтронов и сопутствующих γ -квантов подробно описан в работе [271].

2.8. Анализ влияния γ - и γ, n -облучения на относительное и абсолютное содержание ОСК линии MCF-7

Оценку относительного содержания ОСК в контрольных и облученных культурах проводили через 5 сут после воздействия по доле клеток с фенотипом $\text{CD44}^+/\text{CD24}^{\text{low}}$, выраженной в процентах, как описано в разделе 2.5. Абсолютное содержание ОСК в образцах рассчитывали по данным общего количества клеток и доли ОСК в них.

2.9. Анализ влияния γ - и γ, n -облучения на клоногенную выживаемость клеток

Клоногенную выживаемость (survival fraction, SF), рассчитывали по формуле:

$SF = PE_{\text{обл.}}/PE_{\text{контр.}}$, где $PE_{\text{обл.}}$ и $PE_{\text{контр.}}$ – эффективность клонирования облученных и контрольных клеток соответственно, которую определяли, как указано выше (см. раздел 2.6). Количество высаженных в лунку 96-луночного планшета клеток 3D-культуры при дозах свыше 2 Гр увеличивали в 2–4 раза пропорционально увеличению дозы облучения. Объем среды в лунке составлял 200 мкл. По полученным результатам строили графики зависимости клоногенной выживаемости от дозы радиационного воздействия.

2.10. Анализ радиочувствительности клеток 2D- и 3D-культуры при действии γ - и γ ,n-излучения

Радиочувствительность клеток линии MCF-7 при культивировании в виде 2D- и 3D-культуры оценивали по выживаемости клеток и их клоногенной выживаемости. Радиочувствительность ОСК – по выживаемости клеток в составе этих культур. Данные аппроксимировали с помощью многомишенной одноударной модели:

$SF = 1 - (1 - \exp(-D/D_0))^n$. Значение D_0 устанавливали по полученным графикам дозовой зависимости. Значение D_q рассчитывали по формуле: $D_q = D_0 \ln(n)$.

2.11. Расчет относительной биологической эффективности γ ,n-излучения

ОБЭ γ ,n-излучения рассчитывали по формуле:

$$ОБЭ = \frac{D \text{ референтного излучения}}{D \text{ исследуемого излучения}}$$

где: D референтного излучения и D исследуемого излучения – равноэффективные дозы γ - и γ ,n-излучения соответственно. Дозы двух типов излучений, приводящих к одинаковому эффекту, определяли по графикам зависимости выживаемости клеток 3D-культуры, клоногенной выживаемости клеток 3D-культуры и выживаемости ОСК 3D-культуры от дозы соответствующего типа излучения. Строили график зависимости найденных значений ОБЭ γ ,n-излучения от дозы γ -излучения.

2.12. Анализ содержания гистона γ H2AX в клетках 3D-культуры с помощью конфокальной микроскопии

После облучения клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, затем, после однократного промывания ФСБ и фиксации в охлажденном абсолютном метаноле на льду в течение 1 ч, их помещали на хранение при -20°C. При проведении анализа к предварительно промытым ФСБ клеткам добавляли раствор ФСБ комнатной температуры, содержащий 3% ФБС и 0,05% тритона X-100, для блокирования неспецифического связывания. Через 10 мин к клеткам добавляли немеченные мышинные антитела к гистону H2AX (Merck Millipore, Германия) в разведении 1:1000 и инкубировали клетки с антителами при комнатной температуре в течение 1 ч при периодическом перемешивании. После этого клетки трижды промывали ФСБ и ресуспендировали в ФСБ, содержащем 3% ФБС и 0,5% вторичных козых антител, меченных Alexa Fluor 488 (BioLegend, США), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После окончания инкубации клетки трижды промывали ФСБ и в образцы добавляли раствор 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) с концентрацией 100 нг/мл в ФСБ для окрашивания ядер клеток. Через 10 мин клетки промывали и ресуспендировали в 20 мкл ФСБ. На покровные стекла наносили клеточную суспензию каплями объемом около 5 мкл, сушили под ламинарным потоком воздуха и монтировали

на предметные стекла в 10% растворе поливинилового спирта Mowiol (Calbiochem, США). Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа CBIS-LSM-900 (Carl Zeis, Германия).

2.13. Анализ содержания гистона γ H2AX в клетках 3D-культуры с помощью проточной цитофлуориметрии

После облучения клетки культивировали в течение необходимого времени при 37°C, затем их промывали ФСБ, фиксировали и хранили до исследования, как описано в разделе 2.12. При анализе к предварительно промытым ФСБ клеткам, добавляли 100 мкл раствора ФСБ комнатной температуры, содержащего 3% ФБС и 0,05% тритона X-100, для блокирования неспецифического связывания. Через 10 мин к клеткам вносили 1 мкл антител к гистону γ H2AX, меченных Alexa Fluor 488 (BD Pharmingen, США) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч при периодическом перемешивании. Затем образцы 2 раза промывали, ресуспендировали в ФСБ с 3% ФБС и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur или BD FACSAria Fusion (табл. 6).

2.14. Определение доли клеток маммосфер линии MCF-7 в состоянии апоптоза и некроза

Анализ проводили с использованием набора (кат. № 640914, BioLegend, США) согласно рекомендациям производителя. Маммосферы диссоциировали, клетки дважды промывали ФСБ и ресуспендировали в буферном растворе для окрашивания, входящем в состав набора. Затем к клеткам добавляли антитела к аннексину V в разведении 1:20 для идентификации клеток в состоянии апоптоза и раствор пропидия йодида в разведении 1:10 для идентификации клеток в состоянии некроза и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки анализировали без отмывания на проточном цитометре BD FACSCalibur (см. табл. 6).

2.15. Анализ содержания активных форм кислорода в клетках 3D-культуры линии MCF-7 после облучения

После облучения клетки 3D-культуры инкубировали в течение 1 ч при 37°C, затем после однократного промывания ФСБ их ресуспендировали в ФСБ, содержащем 10 мкмоль/л реактива carboxy-H2DCFDA (C400; Thermo Fischer, США) и выдерживали 30 мин при 37°C. Флуоресценцию образцов анализировали после трехкратного промывания клеток ФСБ на проточном цитометре BD FACSCalibur (см. табл. 6).

2.16. Анализ уровня экспрессии белков сигнального пути Wnt в клетках 3D-культуры линии MCF-7

Для оценки активности сигнального каскада Wnt анализировали уровень содержания белков β -катенина и Disheveled-2 в клетках 3D-культуры. Для этого промытые ФСБ клетки фиксировали в 2% растворе параформальдегида в течение 20 мин, 2 раза

промывали ФСБ и инкубировали при комнатной температуре в растворе ФСБ, содержащем 2% БСА, 0,3% тритона X-100 и 0,05% натрия азиды в течение 1 ч, после чего промывали ФСБ, ресуспендировали в 100 мкл блокирующего раствора (ФСБ, 2% БСА и 0,05% натрия азиды) и делили на две части. К одной части образцов добавляли 5 мкл антител к β -катенину, меченных AlexaFluor 488 (eBioscience, США). Через 1 ч клетки, окрашенные антителами к β -катенину, промывали, ресуспендировали в ФСБ и до проведения анализа хранили в ледяной бане. Ко второй части образцов добавляли 5 мкл первичных антител к белку Dishevelled-2 (Santa Cruz, США). Через 1 ч инкубации при комнатной температуре клетки дважды промывали ФСБ, ресуспендировали в блокирующем растворе, вносили 5 мкл вторичных антител, меченных Alexa Fluor 488 (BioLegend, США) и инкубировали клетки с этими антителами в течение 1 ч. Далее клетки готовили для анализа также, как после окрашивания антителами к β -катенину. В этом случае для контроля неспецифического связывания вторичных антител клетки еще инкубировали в блокирующем буферном растворе со вторичными антителами в разведении 1:200 в течение 1 ч при комнатной температуре. Анализ проводили на проточном цитометре FACSCalibur (см. табл. 6).

2.17. Приготовление растворов препаратов для оценки их радиосенсибилизирующего действия

Для исследования возможности повышения чувствительности клеток маммосфер и ОСК в их составе к действию ИИ использовали: доцетаксел (Qilu pharmaceutical, Китай), дазатиниб (MedChemExpress, США), никлозамид и метформин (Sigma-Aldrich, США). Концентрация исходных растворов в ДМСО (Sigma-Aldrich, США) составила 10 ммоль/л. Их тарировали и хранили при -20°C .

2.18. Статистический анализ

Для статистического анализа полученных экспериментальных данных с помощью t-критерия Стьюдента использовали программное обеспечение Origin 8.1 (Microcal Software, Inc.) и Excel (Microsoft, США). Порог статистической значимости установлен на уровне $p < 0,05$. Набор данных для каждого эксперимента включал результаты не менее 3 отдельных повторов с не менее чем тремя параллельными измерениями в каждом. Для описательной статистики использовали среднее значение и стандартное отклонение. При указании значимости различий использовали следующие обозначения: * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем; ** – $p < 0,05$ при сравнении между группами, если нет других указаний.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, культивируемых в виде 2D-культуры и культуры маммосфер

Анализ пролиферативной активности клеток 2D-культуры и культуры маммосфер

Как упоминалось выше, существенным затруднением для исследований ОСК является очень низкое содержание этих клеток в культурах при стандартном культивировании. Размер фракции ОСК можно увеличить при использовании специальных условий культивирования, которые включают: низкоадгезивные культуральные флаконы, бессывороточную среду, факторы роста и специальные добавки (см. раздел «Материалы и методы»). В таких условиях более дифференцированные опухолевые клетки погибают по пути апоптоза, а ОСК пролиферируют с образованием сферических плавающих колоний – маммосфер. На рис. 2 представлены микрофотографии клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, культивируемых в виде 2D- и 3D-культуры.

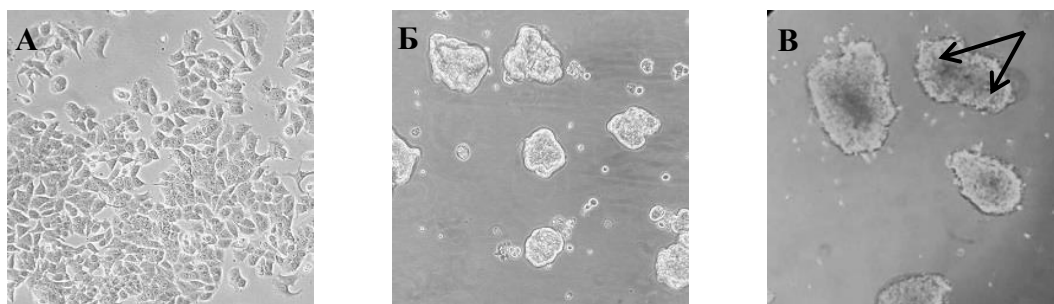


Рисунок 2 – Микрофотографии клеток линии MCF-7, культивируемых в виде 2D- (А) и 3D-культуры в течение 5 (Б) и 7 суток (В). Стрелками показаны слившиеся маммосферы. Увеличение: 100х.

Пролиферативную активность клеток 2D- и 3D-культуры линии MCF-7 оценивали по времени удвоения количества клеток (рис. 3 А, Б).

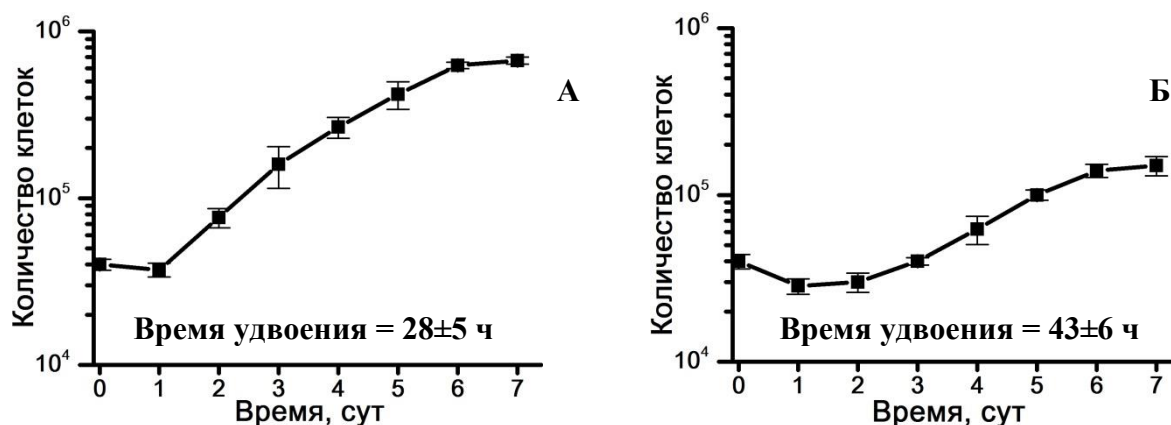


Рисунок 3 – Динамика роста клеток в 2D-культуре (А) и в культуре маммосфер (Б)

Динамика изменения количества клеток линии MCF-7, культивируемых в виде 2D-культуры и культуры маммосфер, существенно различается. Для клеток 2D-культуры характерна фаза адаптации в течение 1-х суток после пересева, переходящая в логарифмическую фазу роста, которая продолжалась до 6 сут, после чего клетки достигали состояния монослоя, и рост клеток прекращался. Время удвоения клеток 2D-культуры в логарифмической фазе роста (1–6 сут) составило 28 ± 5 ч.

При культивировании клеток в виде маммосфер в первые сутки после пересева отмечали снижение их количества на 30% от количества высаженных клеток. Это может быть связано с отсутствием у более дифференцированных опухолевых клеток способности выживать без контакта с поверхностью, в отличие от ОСК, которые не нуждаются в таком контакте для сохранения жизнеспособности и пролиферативной активности, что согласуется с данными работы [8]. Время удвоения клеток культуры маммосфер в логарифмической фазе роста (2–6 сут) составило 43 ± 6 ч, что статистически значимо больше, чем для 2D-культуры. На 7-е сут культивирования значительно увеличивался размер маммосфер, часть маммосфер могла агрегировать (рис. 2В), происходила остановка увеличения числа клеток (рис. 3), что частично могло быть связано с гибелью части клеток в глубине сфероидов.

Необходимо подчеркнуть, что маммосферы представляют собой культуру гетерогенного клеточного состава, включающую ОСК и ранние прогениторные клетки. Динамика относительного содержания, или доли ОСК с фенотипом $CD44^+/CD24^{-/low}$ в процентах, и абсолютного количества ОСК при культивировании маммосфер в течение 7 сут представлена на рис. 4 А, Б.

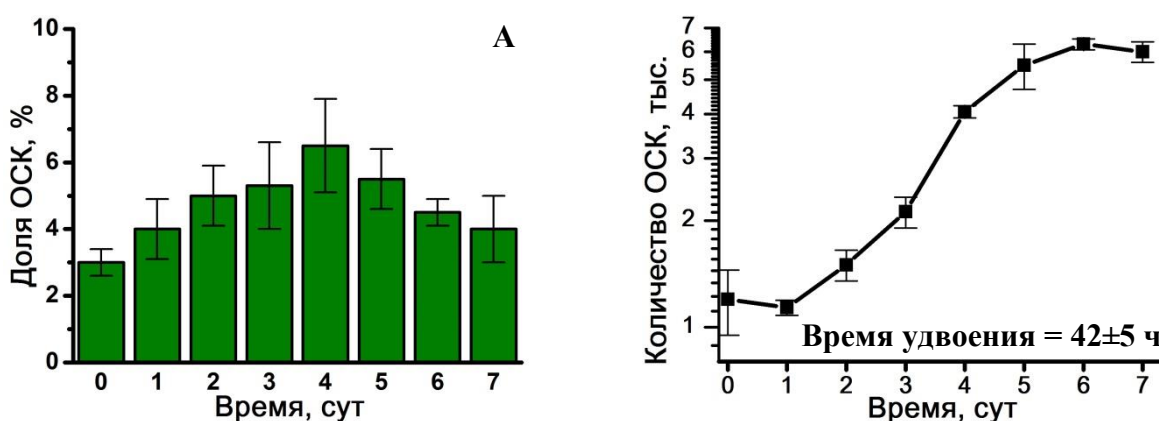


Рисунок 4 – Динамика изменения относительного (А) и абсолютного (Б) содержания ОСК в 3D-культуре

Анализ доли ОСК в культуре маммосфер показал, что относительное содержание ОСК имеет тенденцию к увеличению с 1-х суток культивирования, достигая максимального значения к 4-м суткам, а затем начинается постепенное уменьшение доли

ОСК в культуре (рис. 3А). Время удвоения ОСК в логарифмической фазе роста (1–5 сут) составило 42 ± 5 ч (рис. 3Б), что значимо не отличается от времени удвоения клеток в культуре маммосфер. Таким образом, наиболее подходящая продолжительность культивирования клеток линии MCF-7 в виде 3D-культуры составляет 5–6 сут.

Анализ клеточного цикла клеток, культивируемых в разных условиях, проводили при использовании йодистого пропидия через 5 сут от начала культивирования, то есть при нахождении обеих культур в поздней логарифмической фазе роста. Полученные результаты представлены на рис. 5 и в табл. 8.

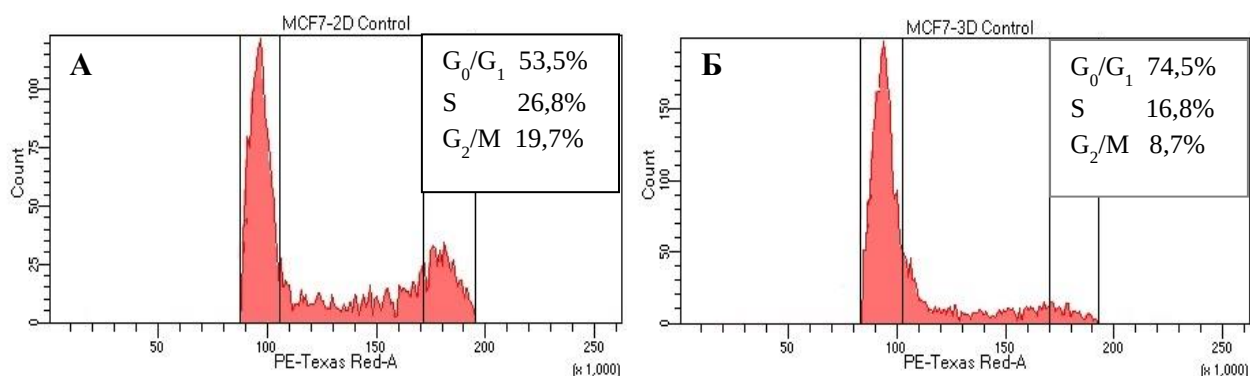


Рисунок 5 – Идентификация параметров клеточного цикла культивируемых в виде прикрепляющейся культуры (А) и культуры маммосфер (Б) клеток линии MCF-7 при использовании проточной цитометрии. По оси абсцисс показана интенсивность флуоресценции, усл. ед., по оси ординат – количество клеток, отн. ед.

Таблица 8 – Характеристика показателей клеточного цикла клеток линии MCF-7 при культивировании в разных условиях

Фаза цикла	Доля клеток в фазе цикла, %	
	2D-культура	3D-культура
G_0/G_1	$57,8 \pm 6,3$	$73,2 \pm 2,3^*$
S	$25,5 \pm 1,9$	$16,6 \pm 3,4^*$
G_2/M	$16,7 \pm 5,8$	$10,2 \pm 2,7$

Примечание: * – отличия от 2D-культуры статистически значимы, $p < 0,05$.

Из представленных в табл.8 данных следует, что пролиферативная активность клеток 3D-культуры значительно ниже, чем клеток 2D-культуры, о чем свидетельствует более высокая доля клеток в фазе G_0/G_1 при более низкой доле в фазах S и G_2/M .

Поскольку это исследование не позволяет определить долю клеток в пролиферативно неактивной G_0 -фазе, следующим этапом была оценка содержания в 2D-культуре и культуре маммосфер клеток, экспрессирующих маркер пролиферации – белок Ki67, с помощью проточной цитометрии (рис. 6).

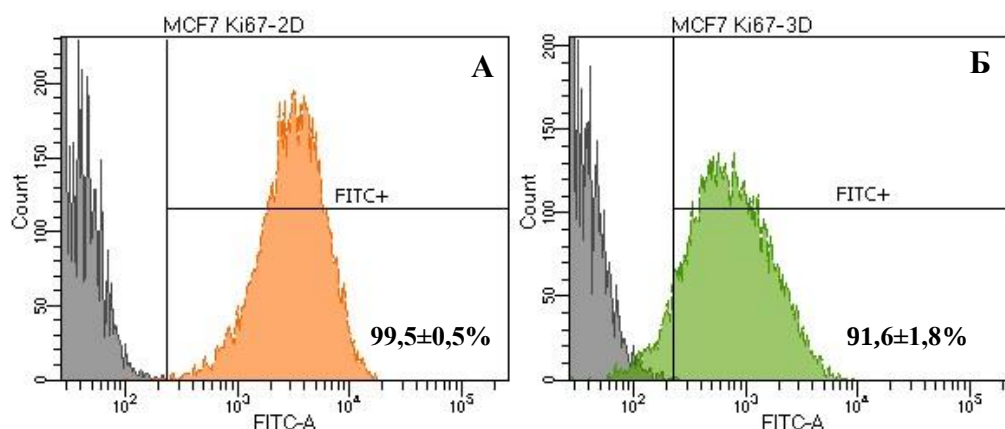


Рисунок 6 – Типичные гистограммы, полученные при оценке доли клеток 2D- (А) и 3D-культуры (Б), экспрессирующих белок Ki67. Цифрами обозначена доля Ki67-положительных клеток, полученная в 4 независимых экспериментах. Обозначения осей см. на рис. 5.

Обнаружено, что в 2D-культуре $99,5 \pm 0,5\%$ клеток экспрессируют Ki67, то есть находятся в состоянии пролиферации. В культуре маммосфер доля пролиферирующих клеток составляет $91,6 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$). Таким образом, в отличие от 2D-культуры, все клетки которой являются пролиферирующими, около 8% клеток в составе маммосфер не экспрессируют Ki67, то есть находятся в покоем состоянии (G_0 -фаза). Представленные результаты позволяют заключить, что в сформировавшихся маммосферах часть клеток находится в состоянии пролиферативного покоя, что характерно для ОСК.

Определение содержания ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер

Одной из методологических сложностей исследования ОСК является отсутствие универсального маркера, позволяющего однозначно идентифицировать клетки этой субпопуляции. Долю ОСК в 2D- и 3D-культурах линии MCF-7 определяли путем идентификации этих клеток по фенотипу $CD44^+/CD24^{low}$, по способности формировать субпопуляцию SP при анализе с использованием красителя Хехст 33342, и по высокой активности фермента альдегиддегидрогеназы с помощью проточной цитометрии.

На рис. 7 показаны примеры гистограмм, полученных при определении содержания ОСК линии MCF-7 по фенотипу $CD44^+/CD24^{low}$ в 2D-культуре и культуре маммосфер.

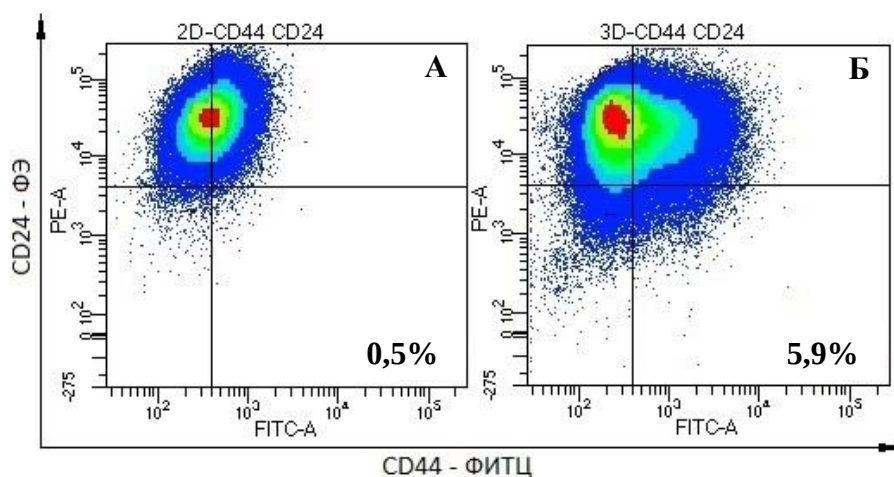


Рисунок 7 – Типичные гистограммы, полученные при определении доли ОСК, как клеток с фенотипом $CD44^{+}/CD24^{-low}$, в 2D- (А) и 3D-культуре (Б) клеток линии MCF-7

Как видно на рис. 7, субпопуляция клеток с фенотипом ОСК не выделяется в отдельный кластер, оказываясь слитой с общей популяцией. Для выделения на гистограмме области, отображающей пул ОСК, отдельно оценивали содержание каждого из указанных фенотипических маркеров ОСК (рис. 8). Курсоры по оси X на рис. 8 А, Б выставляли по пику аутофлуоресценции.

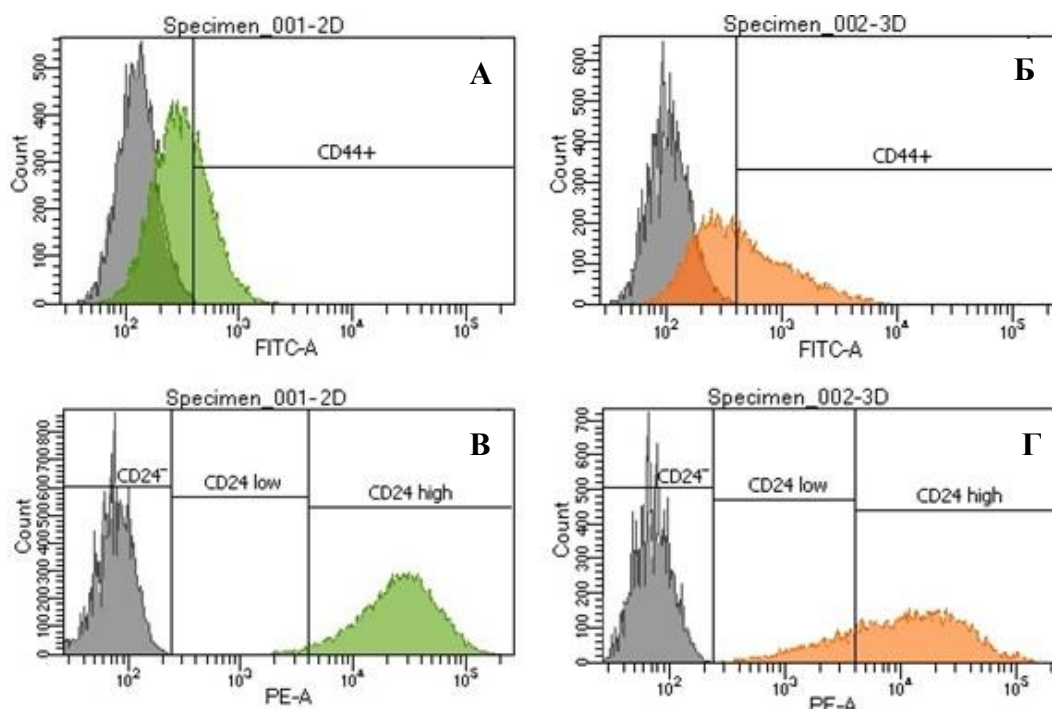


Рисунок 8 – Распределение клеток по содержанию антигена CD44 в 2D- (А) и 3D-культуре (Б) и по содержанию антигена CD24 в 2D- (В) и 3D-культуре (Г).

Серый пик слева соответствует аутофлуоресценции клеток, цветной пик справа – флуоресценция клеток, окрашенных соответствующими антителами.

Обозначения осей см. на рис. 5.

Положение левого курсора по оси X на рис. 8 В, Г (CD24-ФЭ) выставляли по пику аутофлуоресценции, а правый курсор устанавливали по клеткам 2D-культуры с низким содержанием антигена CD24. Такая стратегия позволяет выделить на гистограммах культуры маммосфер область клеток с низким уровнем антигена CD24^{low}. Аутофлуоресценция клеток 2D-культуры и культуры маммосфер была одинакова. При этом следует отметить, что как для клеток 2D-культуры, так и для клеток маммосфер при анализе связывания клеток с соответствующими изотипическими антителами неспецифическое связывание обнаружено не было.

Найденное таким образом относительное содержание ОСК в 2D-культуре составило $0,5 \pm 0,1\%$, а в культуре маммосфер – $5,5 \pm 0,9\%$ ($p < 0,05$). Следовательно, культивирование клеток линии MCF-7 в виде маммосфер приводит к увеличению доли клеток с фенотипом ОСК в культуре примерно в 11 раз.

Помимо идентификации ОСК по фенотипу, содержание этой субпопуляции клеток в 2D-культуре и культуре маммосфер оценивали, как фракцию SP. Известно, что ОСК РМЖ имеют высокое содержание АВС-транспортера ABCG2 [270], способного выкачивать из клеток краситель Хёхст 33342, в результате чего ОСК выделяются в отдельную неокрашенную субпопуляцию SP. Область SP верифицировали после обработки образцов неселективным ингибитором АТФ-зависимых транспортеров верапамилом, как показано на рис. 9.

Содержание ОСК, определенное как размер фракции SP, в 2D-культуре составило $1,3 \pm 0,5\%$, а в культуре маммосфер – $12,1 \pm 1,9\%$. Таким образом, культивирование клеток MCF-7 в виде маммосфер приводит к увеличению фракции клеток SP в культуре примерно в 9 раз.

Большой интерес представляет оценка содержания во фракции клеток маммосфер, способных исключать краситель Хёхст 33342 (т. е. SP), доли клеток с фенотипом ОСК CD44⁺/CD24^{-low}. Для этого анализа проводили последовательное окрашивание клеток маммосфер красителем Хёхст 33342, а затем мечеными флуорофорами антителами к CD44 и CD24. После выделения области, соответствующей SP, как показано на рис. 9В, отображали распределение этой фракции клеток по содержанию антигенов CD44/CD24. Также распределение по содержанию указанных антигенов определяли для клеток, не входящих в выделенную область SP (NSP клетки). Типичные гистограммы представлены на рис. 10 А, Б.

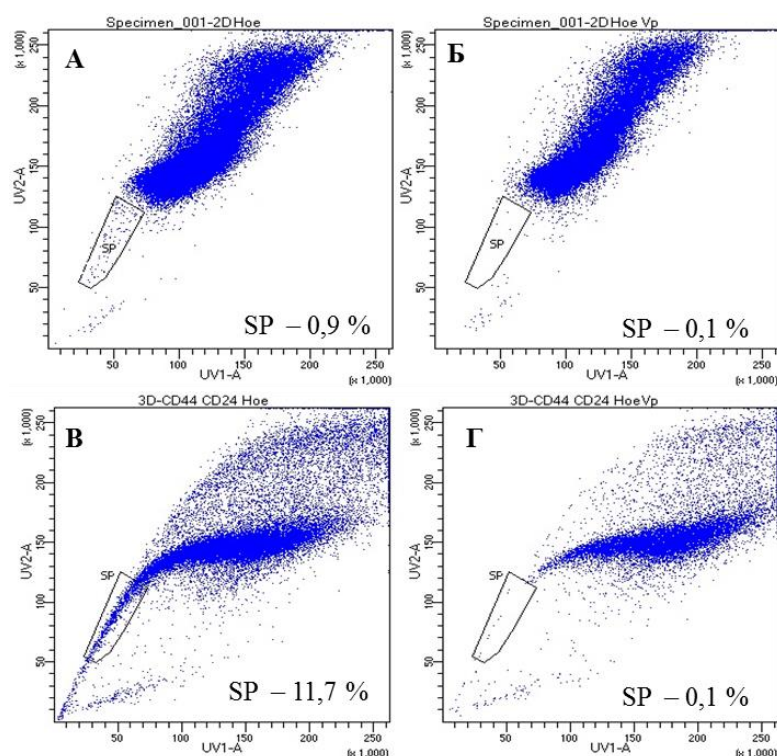


Рисунок 9 – Типичные гистограммы распределения клеток 2D- (А, Б) и 3D-культуры (В, Г) линии MCF-7 по интенсивности флуоресценции красителя Хёхст 33342 без (А, В) и после инкубации с верапамилом (Б, Г). По оси X – интенсивность флуоресценции красителя Хёхст 33342 при $\lambda = 650$ нм, усл. ед., по оси Y – интенсивность флуоресценции красителя Хёхст 33342 при $\lambda = 450$ нм, усл. ед.

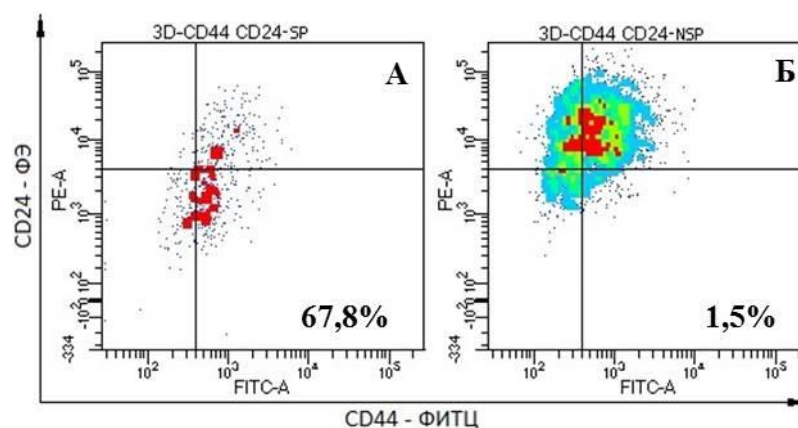


Рисунок 10 – Типичные гистограммы, полученные при определении доли клеток с фенотипом ОСК ($CD44^{+}/CD24^{-low}$) в субпопуляции SP (А) и NSP (Б)

В субпопуляции SP доля клеток с фенотипом $CD44^{+}/CD24^{-low}$, характерным для ОСК линии MCF-7, составляет $65 \pm 12\%$, а в субпопуляции NSP – всего $3 \pm 1\%$. Таким образом, показано, что способность клеток маммосфер исключать краситель Хёхст 33342, в значительной степени ассоциирована с клетками с фенотипом ОСК.

Для ОСК также характерна более высокая активность ALDH, которую используют в качестве маркера для идентификации этой субпопуляции клеток [272]. Содержание ОСК по этому маркеру определяли в 2D-культуре и культуре маммосфер с помощью проточной

цитометрии, верифицируя область клеток с высокой активностью альдегиддегидрогеназы (ALDH⁺) после обработки образцов конкурентным ингибитором фермента N,N-диэтиламинобензальдегидом, как показано на рис. 11.

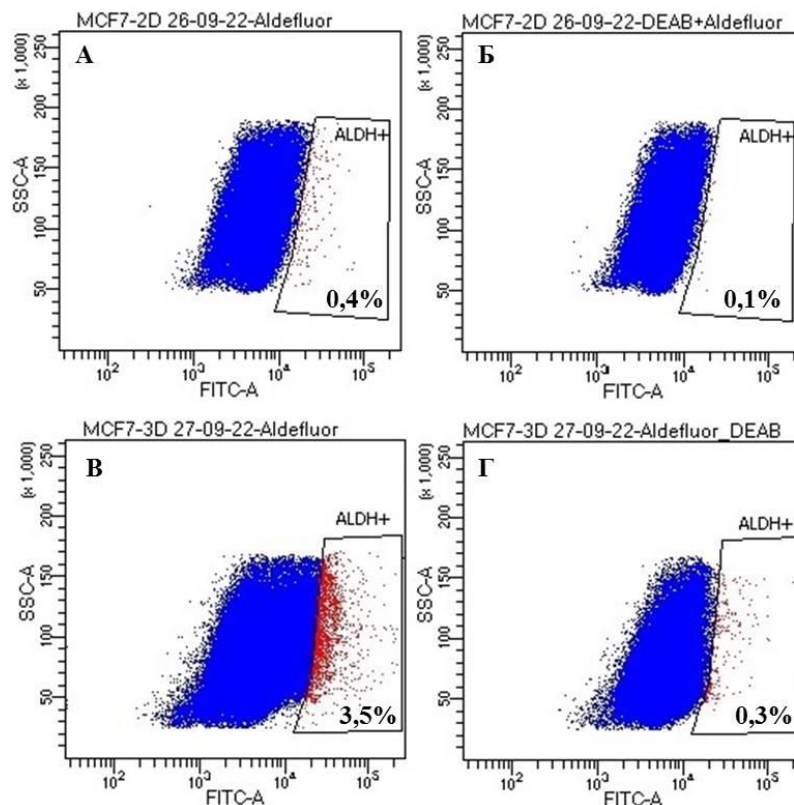


Рисунок 11 – Типичные гистограммы распределения клеток 2D- (А, Б) и 3D-культуры (В, Г) линии MCF-7 по активности фермента альдегиддегидрогеназы без (А, В) и после инкубации с его ингибитором N,N-диэтиламинобензальдегидом (Б, Г). По оси X – интенсивность флуоресценции, усл. ед., по оси Y – интенсивность бокового светорассеяния, усл. ед.

Содержание ОСК, определенное как процент клеток с высокой активностью фермента ALDH в 2D-культуре составило $0,3 \pm 0,1\%$, а в культуре маммосфер – $3,1 \pm 0,5\%$. Таким образом, культивирование клеток MCF-7 в виде маммосфер приводит к увеличению доли клеток ALDH⁺ в культуре примерно в 10 раз.

Еще одним методом определения количества ОСК в культуре маммосфер является анализ эффективности клонирования, оцениваемой по количеству образовавшихся маммосфер диаметром не менее 50 мкм, что соответствует не менее чем 50 клеткам. Считается, что только ОСК способны образовывать маммосферы, при этом каждая маммосфера представляет собой колонию, образованную одной ОСК. Поэтому количество маммосфер соответствует количеству ОСК, внесенных в культуру. Эффективность клонирования, отражающая содержание ОСК, для клеток маммосфер составляет $12 \pm 3\%$. Эффективность клонирования клеток 2D-культуры была значительно

ниже и составляла $2,9 \pm 0,5\%$ при подсчете колоний размером не менее 50 клеток через 14 суток после посева 500 клеток в лунку 6-луночного планшета.

В табл. 9 приведены данные о содержании ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер при разных способах идентификации ОСК.

Таблица 9 – Относительное содержание ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер

Способ идентификации ОСК	Доля ОСК, %	
	2D-культура	3D-культура
По фенотипу $CD44^+/CD24^{-/low}$	$0,5 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,9^*$
Анализ SP	$1,3 \pm 0,5$	$12,1 \pm 1,9^*$
По активности ALDH	$0,3 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,5^*$
По эффективности клонирования	$2,9 \pm 0,5$	$12,0 \pm 3,0^*$

Примечание: * – отличия от 2D-культуры статистически значимы, $p < 0,05$.

Необходимо отметить, что количество ОСК, определяемое при использовании разных маркеров, существенно различается, что соответствует имеющимся литературным данным [117]. При этом независимо от используемого маркера кратность увеличения доли ОСК в культуре маммосфер по сравнению с 2D-культурой была десятикратной, за исключением эффективности клонирования, где она была четырехкратной. При культивировании клеток в виде маммосфер более дифференцированные опухолевые клетки погибают по пути апоптоза, и только ОСК способны образовывать колонии-маммосферы, при этом каждая маммосфера представляет собой колонию, образованную одной ОСК, поэтому эффективность клонирования клеток маммосфер близко отражает долю ОСК в популяции. При культивировании клеток в виде прикрепляющейся культуры на формирование колоний влияет ряд факторов, таких как: появление «новых» ОСК благодаря ЭМП, и формирование части колоний мало дифференцированными, но уже коммитированными клетками благодаря их более высокой выживаемости из-за наличия подложки. Эти факторы могут приводить к определению «завышенного» количества ОСК в 2D-культуре при оценке по эффективности клонирования.

Таким образом, результаты приведенных выше исследований свидетельствуют о том, что культивирование клеток линии MCF-7 в специально разработанных условиях [7, 8], приведенных в разделе 2.1, обеспечивает получение 3D-культуры, в которой содержание ОСК более чем в 10 раз превышает содержание ОСК в прикрепляющейся культуре. Поэтому использование культуры маммосфер позволяет более продуктивно исследовать эффективность действия разных повреждающих факторов, включая ИИ, на ОСК РМЖ *in vitro*.

3.2. Сравнение радиочувствительности клеток линии MCF-7, культивируемых в виде 2D-культуры и культуры маммосфер, и ОСК в этих культурах при действии γ -излучения

3.2.1. Радиочувствительность клеток 2D-культуры и культуры маммосфер при действии γ -излучения

Для оценки радиочувствительности клеток 2D-культуры и культуры маммосфер определяли показатель D_0 , являющийся мерой радиочувствительности клеток, и значение D_q , характеризующее способность клеток к репарации радиационно-индуцированных сублетальных повреждений. Для оценки чувствительности клеток к действию ИИ анализировали два показателя: общее количество клеток и клоногенную выживаемость как указано в разделе «Материалы и методы». По полученным результатам строили дозовые кривые, которые позволяют оценить значения D_0 и D_q . Полученные дозовые зависимости представлены на рис. 12, а значения D_0 и D_q приведены в табл. 10.

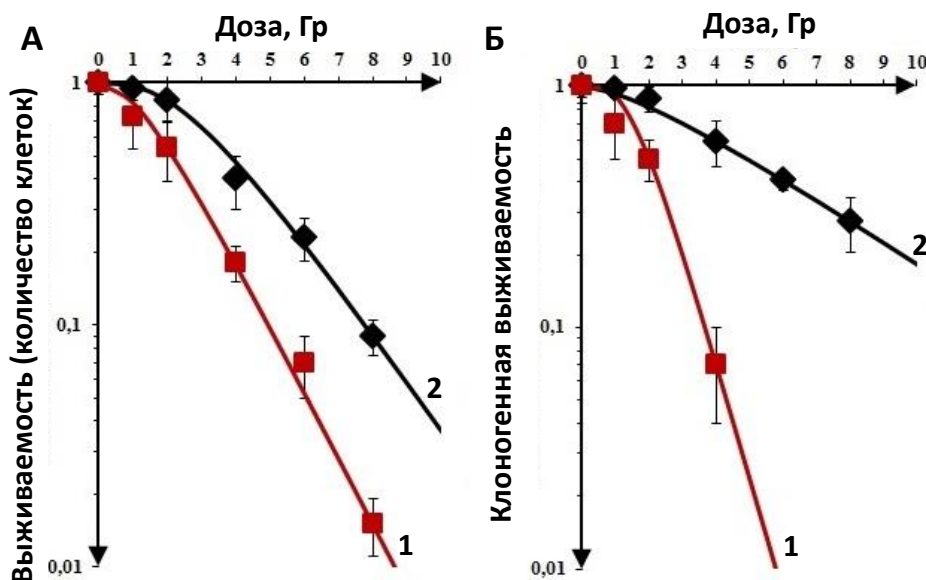


Рисунок 12 – Дозовая зависимость выживаемости клеток линии MCF-7 при разных способах культивирования. А – оценка по количеству клеток; Б – оценка по клоногенной выживаемости. 1 – 2D-культура; 2 – 3D-культура.

Таблица 10 – Радиочувствительность клеток линии MCF-7 при действии γ -излучения в зависимости от условий культивирования

Метод анализа выживаемости	Радиочувствительность клеток			
	2D-культура		3D-культура	
	D_0 , Гр	D_q , Гр	D_0 , Гр	D_q , Гр
- по количеству клеток	$1,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,3^*$	$2,8 \pm 0,6$
- по клоногенной выживаемости	$0,9 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,4$	$4,6 \pm 1,1^*$	$2,2 \pm 0,8$

Примечание: * – различия между значениями D_0 для клеток 2D-культуры и культуры маммосфер статистически значимы, $p < 0,05$.

При сравнении радиочувствительности клеток, культивируемых в виде прикрепляющейся культуры и в виде 3D-культуры, показано, что при действии γ -излучения, как по данным о количестве клеток, так и по данным о клоногенной выживаемости, показатель D_0 для клеток, культивируемых в виде сфероидов, значительно превышает аналогичный показатель для прикрепляющихся клеток. Представленные результаты позволяют сделать вывод о более высокой радиоустойчивости клеток маммосфер к действию γ -излучения, по сравнению с клетками, культивируемыми в виде прикрепляющейся культуры.

3.2.2. Сравнение радиочувствительности ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер при действии γ -излучения

Дозовую зависимость изменения относительного и абсолютного содержания ОСК анализировали в прикрепляющихся культурах и в 3D-культурах клеток линии MCF-7 как указано в разделе «Материалы и методы». Полученные количественные данные анализа можно видеть на рис. 13.

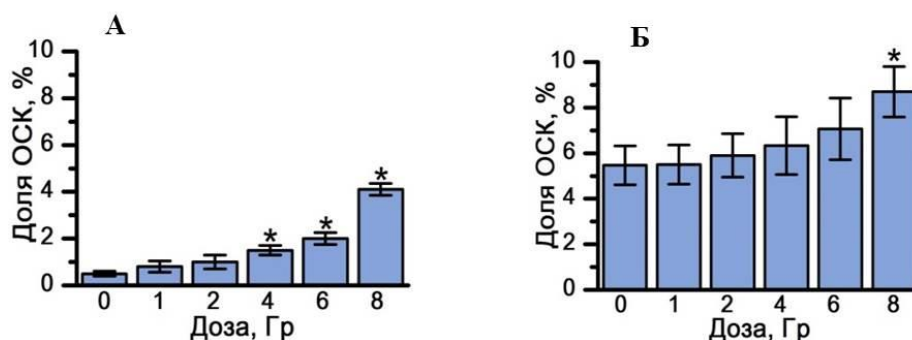


Рисунок 13 – Дозовая зависимость изменения относительного содержания ОСК в прикрепляющихся культурах (А) и в 3D-культурах (Б) клеток линии MCF-7 после γ -облучения. При анализе относительного содержания субпопуляции ОСК в культурах определяли долю клеток с высоким уровнем экспрессии на поверхности клеток белка CD44 при низком уровне белка CD24 с помощью проточной цитометрии.

Показано, что с увеличением дозы γ -излучения доля ОСК в обоих типах культур имела тенденцию к увеличению. Для 2D-культуры, начиная с дозы 4 Гр, это увеличение было статистически значимым. После γ -облучения в дозе 8 Гр обнаружено 8-кратное увеличение доли ОСК по сравнению с контрольным значением. Для культуры маммосфер увеличение относительного количества ОСК было менее выраженным по сравнению с необлученным контролем. Значимое повышение доли ОСК в культуре маммосфер – в 1,6 раз относительно контроля – наблюдали только при дозе 8 Гр. Полученные данные свидетельствуют о более высокой устойчивости ОСК к действию γ -излучения, чем остальных клеток как 2D-культуры, так и культуры маммосфер. Для 2D-культуры эта

разница в радиоустойчивости ОСК и клеток всей культуры была более выраженной, чем для культуры маммосфер.

На основании результатов оценки общего количества клеток в 2D- и 3D-культурах и относительного содержания ОСК в них определяли абсолютное количество ОСК в образцах. Результаты анализа дозовой зависимости изменения абсолютного содержания ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер после γ -облучения представлены на рис. 14, а параметры, характеризующие радиочувствительность ОСК в составе двух типов культур – в табл. 11.

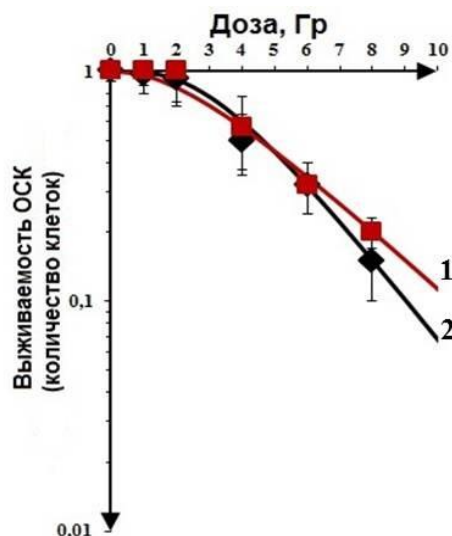


Рисунок 14 – Зависимость абсолютного количества ОСК в 2D-культуре (1) и культуре маммосфер (2) от дозы γ -облучения

Таблица 11 – Радиочувствительность ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер линии MCF-7 при действии γ -излучения

ОСК линии MCF-7	Радиочувствительность ОСК			
	2D-культура		Культура маммосфер	
	D_0 , Гр	D_q , Гр	D_0 , Гр	D_q , Гр
Оценка выживаемости по абсолютному количеству клеток	$3,0 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,9$

Результаты, представленные на рис. 14 и в табл. 11, позволяют заключить, что радиочувствительность ОСК 2D-культуры и ОСК маммосфер, оцениваемая по величине D_0 , и способность к репарации, оцениваемая по величине D_q , одинакова. Различия между значениями D_0 для всех клеток 2D-культуры и ОСК 2D-культуры, составляющие $1,5 \pm 0,2$ Гр и $3,0 \pm 0,5$ Гр соответственно (табл. 10 и 11), статистически значимы ($p < 0,05$).

Таким образом, при культивировании клеток линии MCF-7 в виде прикрепляющейся культуры радиоустойчивость ОСК по показателю D_0 в два раза превышает радиоустойчивость клеток всей культуры. При культивировании клеток в условиях 3D-культуры такие различия обнаружены не были, что позволяет сделать вывод

о равной чувствительности клеток 3D-культуры и ОСК в её составе: значение D_0 для клеток всей 3D-культуры составило $2,2 \pm 0,3$ Гр, а для ОСК в этой культуре – $2,5 \pm 0,3$ Гр.

3.2.3. Влияние γ -излучения на пролиферативную активность и уровень апоптоза в клетках 2D-культуры и культуры маммосфер

Для оценки влияния γ -облучения в дозах 2 и 4 Гр на пролиферативную активность и механизм гибели клеток 2D-культуры и культуры маммосфер анализировали параметры клеточного цикла и уровень апоптоза. Полученные данные, приведенные в табл. 12 и 13, позволяют заключить следующее.

Таблица 12 – Блок клеточного цикла и уровень апоптоза через сутки после γ -облучения клеток, культивируемых в виде 2D-культуры

Фаза клеточного цикла	Доля клеток в фазе клеточного цикла, %		
	0 Гр	2 Гр	4 Гр
G_0/G_1	$52,2 \pm 2,2$	$64,2 \pm 1,9^*$	$67,2 \pm 3,1^*$
S	$36,6 \pm 2,2$	$27,4 \pm 5,3$	$21,5 \pm 1,2^*$
G_2/M	$11,2 \pm 2,6$	$8,4 \pm 3,2$	$11,3 \pm 2,3$
Гибель клеток, %			
Уровень апоптоза	100 ± 25	$217 \pm 31^*$	$267 \pm 75^*$

Примечание: уровень апоптоза в контроле составил $3,6 \pm 0,9\%$.

Таблица 13 – Блок клеточного цикла и уровень апоптоза через сутки после γ -облучения клеток, культивируемых в виде 3D-культуры

Фаза клеточного цикла	Доля клеток в фазе клеточного цикла, %		
	0 Гр	2 Гр	4 Гр
G_0/G_1	$68,0 \pm 2,9$	$70,5 \pm 4,9$	$76,9 \pm 2,0^*$
S	$21,9 \pm 3,6$	$18,4 \pm 3,8$	$12,9 \pm 0,8^*$
G_2/M	$10,1 \pm 1,0$	$11,1 \pm 1,2$	$10,2 \pm 1,7$
Гибель клеток, %			
Уровень апоптоза	100 ± 16	135 ± 23	$170 \pm 11^*$

Примечание: уровень апоптоза в контроле составил $5,7 \pm 0,9\%$.

Гамма-облучение приводит к более глубокому ингибированию пролиферации клеток 2D-культуры, чем 3D-культуры. Об этом свидетельствует повышение доли клеток в фазе G_0/G_1 уже после облучения клеток 2D-культуры в дозе 2 Гр, в то время как при облучении клеток 3D-культуры такие изменения обнаружены только при дозе 4 Гр.

Аналогичные данные получены при анализе гибели клеток по механизму апоптоза, уровень которого при дозах 2 и 4 Гр в клетках 2D-культуры возрастал до 217 и 267% (табл. 12). После γ -облучения клеток маммосфер в дозе 2 Гр наблюдали статистически незначимое увеличение уровня апоптоза, а при повышении дозы облучения до 4 Гр обнаружено значимое увеличение доли клеток в состоянии апоптоза по сравнению с контрольным значением только на 70% (табл. 13).

Таким образом, γ -облучение в указанных дозах приводило к более глубокому изменению по сравнению с контролем распределения клеток прикрепляющейся культуры

по фазам клеточного цикла, отражающему ингибирование пролиферации клеток, и к более высокому уровню гибели по пути апоптоза, чем в случае клеток 3D-культуры.

Ранее (табл. 8) мы показали, что клетки 3D-культуры характеризуются более медленной пролиферацией, чем прикрепляющиеся клетки, а, как известно, эта особенность может определять более высокую радиорезистентность клеток [273], в том числе клеток 3D-культуры.

3.3. Радиочувствительность клеток культуры маммосфер и ОСК линии MCF-7 при действии γ ,n-излучения

3.3.1. Чувствительность клеток культуры маммосфер к действию γ ,n-излучения

Для оценки радиочувствительности клеток маммосфер линии MCF-7 при действии γ ,n-излучения анализировали количество клеток маммосфер и клоногенную выживаемость клеток маммосфер в зависимости от дозы облучения. По полученным результатам строили дозовые кривые, которые позволяют оценить значение D_0 и значение D_q . Полученные данные использовали для расчета значения ОБЭ γ ,n-излучения.

На рис. 15 А, Б представлена дозовая зависимость выживаемости клеток маммосфер после γ - и γ ,n-облучения, а также зависимость значений ОБЭ γ ,n-излучения, оцененных по зависимости выживаемости клеток маммосфер, от дозы. Найденные параметры радиочувствительности клеток культуры маммосфер при действии γ ,n-излучения обобщены в табл. 14.

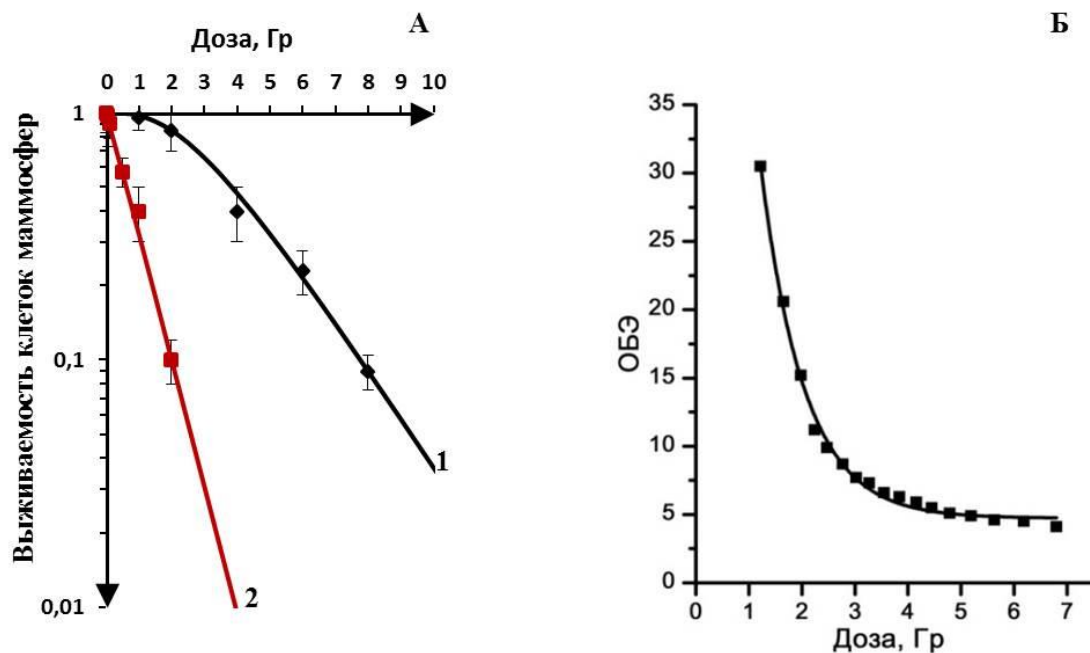


Рисунок 15 – Влияние γ - (1) и γ ,n-излучения (2) на выживаемость клеток маммосфер линии MCF-7 в зависимости от дозы (А) и коэффициент ОБЭ γ ,n-излучения в зависимости от дозы (Б). Кривая 1 повторяет кривую 2 на рис. 12А.

Полученные результаты свидетельствуют о значительно более высокой чувствительности клеток культуры маммосфер к γ ,n-облучению, чем к γ -облучению. Так, значение D_0 , найденное по графикам дозовой зависимости выживаемости клеток маммосфер, для γ - и γ ,n-облучения составляло $2,2 \pm 0,3$ Гр и $0,85 \pm 0,04$ Гр ($p < 0,05$) соответственно, а значение D_q для γ -облучения было равно $2,8 \pm 0,6$ Гр, а для облучения нейтронами – $0,05 \pm 0,01$ Гр ($p < 0,05$). Наиболее высокие значения ОБЭ были обнаружены для интервала низких доз. Так при оценке выживаемости клеток по их количеству увеличение дозы облучения клеток с 1 Гр до 5 Гр приводило к снижению ОБЭ с 31 до 5.

Влияние двух типов излучения на клоногенную выживаемость клеток маммосфер оценивали при определении зависимости числа образовавшихся через 7 суток после γ - или γ ,n-облучения маммосфер от дозы (рис. 16).

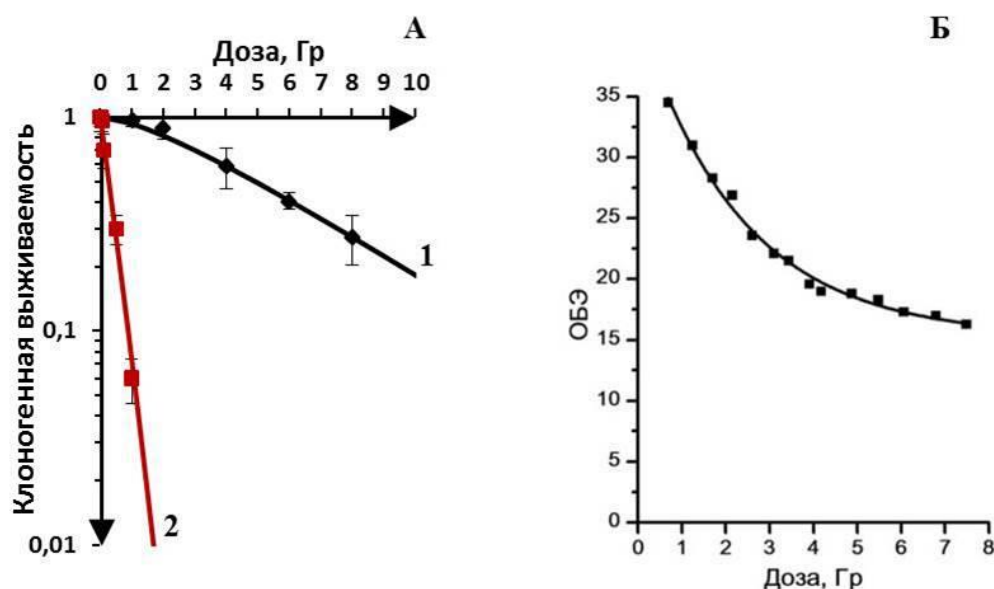


Рисунок 16 – Дозовая зависимость клоногенной выживаемости клеток 3D-культуры линии MCF-7 (А) и ОБЭ γ ,n-излучения (Б). 1 – γ -облучение, 2 – γ ,n-облучение. Кривая 1 повторяет кривую 2 на рис. 12Б.

Таблица 14 – Характеристика чувствительности клеток культуры маммосфер линии MCF-7 к действию γ ,n-излучения при анализе выживаемости по количеству клеток и их клоногенной выживаемости

Способ оценки выживаемости клеток	Показатели радиочувствительности	
	D_0 , Гр	D_q , Гр
Оценка по количеству клеток	$0,85 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,01$
Оценка по клоногенной выживаемости	$0,35 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,02$

Как показано выше, значение D_0 , найденное по графику зависимости клоногенной выживаемости клеток маммосфер от дозы γ -облучения, составляло $4,6 \pm 1,1$ Гр, а значение D_q – $2,2 \pm 0,8$ Гр (табл. 10). Нужно отметить, что при оценке чувствительности клеток маммосфер к γ -облучению по их клоногенной выживаемости была получена самая большая величина D_0 , что свидетельствует о сохранении высокого потенциала этих клеток

к пролиферации даже после воздействия высоких доз редкоионизирующего излучения (до 8 Гр). Найденное по соответствующему графику значение D_0 для γ ,n-излучения составляло $0,35 \pm 0,01$ Гр, а значение $D_q - 0,09 \pm 0,02$ Гр (рис. 16, табл. 14). Таким образом, γ ,n-облучение клеток маммосфер приводило к дозозависимому глубокому снижению их клоногенной выживаемости, что свидетельствует о высокой чувствительности ОСК к действию плотноионизирующего излучения.

Наиболее высокие значения ОБЭ γ ,n-излучения при оценке гибели клеток по изменению клоногенной выживаемости также регистрировали в диапазоне низких доз. Как показано на рис. 16, в этом случае ОБЭ γ ,n-излучения снижалась с 35 до 17 при увеличении дозы облучения от 1 Гр до 5 Гр.

Как видно на представленных выше графиках все дозовые кривые, полученные для γ -облучения, имеют плечо, что указывает на способность клеток маммосфер частично репарировать сублетальные повреждения, индуцированные γ -излучением в дозе не более величины D_q . В то же время, все полученные дозовые зависимости для γ ,n-облучения имеют практически линейную форму без плеча (обнаружены лишь очень низкие значения D_q), что свидетельствует об очень низкой способности клеток маммосфер к репарации индуцированных γ ,n-излучением повреждений.

Наиболее высокие значения ОБЭ нейтронов для клеток маммосфер, как при оценке по количеству клеток, так и при оценке по клоногенной выживаемости, обнаружены при низких дозах. Снижение величины ОБЭ с повышением дозы облучения характерно для действия плотноионизирующего излучения, в т. ч. нейтронов [274]. Нужно отметить, что в области терапевтических доз нейтронов, составляющих 1,2–2,4 Гр, ОБЭ при облучении нейтронами для клеток 3D-культуры была высокой и составляла не менее 20 (рис. 15Б, 16Б). Сравнение радиобиологических параметров, обнаруженных при γ - и γ ,n-облучении клеток маммосфер линии MCF-7, представленных в табл. 10 и 14 позволяет заключить, что клетки маммосфер обладают значительно более высокой чувствительностью к облучению нейтронами.

3.3.2. Радиочувствительность ОСК в 3D-культуре при γ ,n-облучении

Для характеристики последствий облучения ОСК линии MCF-7 нейтронами оценивали долю и абсолютное содержание ОСК в культуре маммосфер в зависимости от дозы. Определение относительного содержания этих клеток в культуре проводили, как описано выше. Полученные результаты представлены на рис. 17.

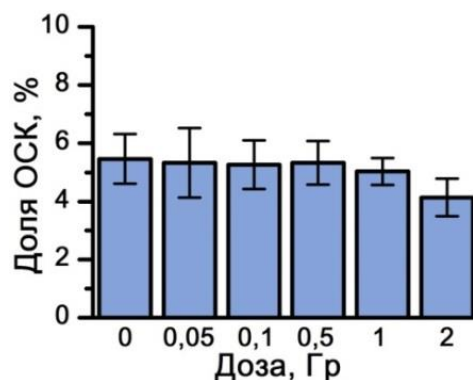


Рисунок 17 – Зависимость относительного размера фракции ОСК с фенотипом $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ от дозы через 5 сут после γ ,n-облучения культуры маммосфер

В отличие от γ -облучения (рис. 13Б) с увеличением дозы γ ,n-излучения относительное содержание ОСК не менялось по сравнению с долей ОСК в контрольной культуре. И только при дозе 2 Гр наблюдали незначительное снижение доли ОСК, что указывает на более высокую чувствительность ОСК линии MCF-7 к облучению нейтронами.

Анализ абсолютного содержания ОСК в составе контрольных и облученных в разных дозах культур проводили, как описано в разделе «Материалы и методы», исходя из полученных данных об общем количестве клеток и доле ОСК в соответствующих образцах клеток. На рис. 18 А, Б и в табл. 15 представлен итог анализа зависимости изменения абсолютного количества ОСК в составе маммосфер от дозы γ ,n-облучения через 5 сут после воздействия (А) и соответствующая зависимость ОБЭ γ ,n-излучения от дозы (Б).

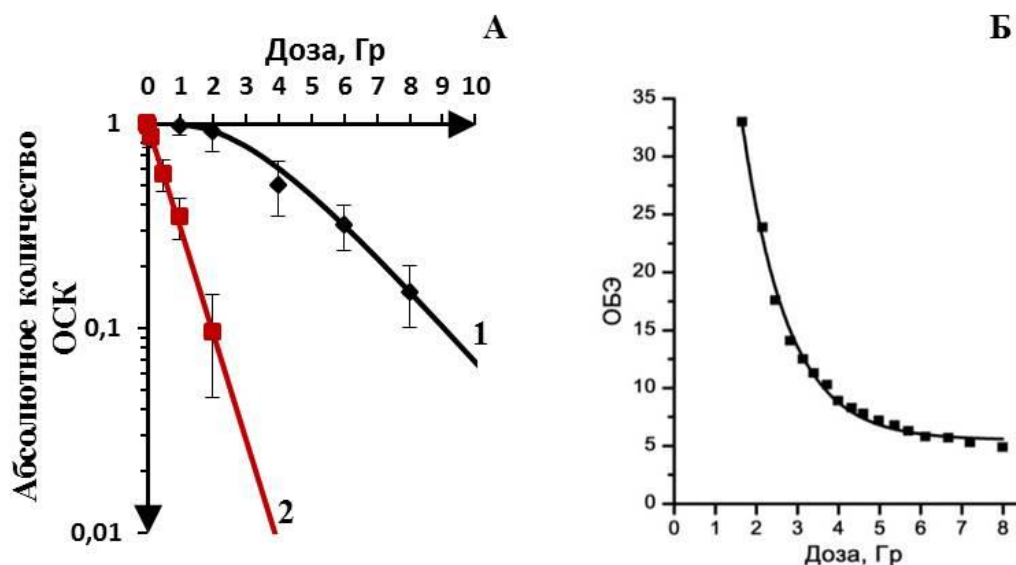


Рисунок 18 – Дозовая зависимость количества ОСК в культуре маммосфер при γ - (1) и γ ,n- (2) облучении клеток (А) и значения ОБЭ γ ,n-излучения, определенные по представленным на рис. А данным (Б). Кривая 1 повторяет кривую 2 на рис. 14.

Таблица 15 – Характеристика чувствительности ОСК культуры маммосфер линии MCF-7 к действию γ ,n-излучения

Выживаемость	Показатели радиочувствительности	
	D_0 , Гр	D_q , Гр
Оценка по абсолютному количеству клеток	$0,84 \pm 0,12$	$0,04 \pm 0,01$

Значение D_0 , найденное по кривой зависимости выживаемости ОСК от дозы γ -излучения, составляло $2,5 \pm 0,3$ Гр, а значение D_q – $3,6 \pm 0,9$ Гр (табл. 11). Найденные значения D_0 и D_q для γ ,n-излучения были значимо ниже (табл. 15). Более высокие значения ОБЭ γ ,n-излучения для ОСК также наблюдали при низких дозах: ОБЭ γ ,n-излучения, оцениваемая по абсолютному количеству ОСК, снижалась с 33 до 6 при увеличении дозы облучения от 1,5 до 6 Гр.

Как было упомянуто выше, количество образовавшихся маммосфер отражает долю ОСК в культуре. В связи с тем, что данные, полученные при анализе абсолютного количества ОСК и клоногенной выживаемости клеток культуры маммосфер, несколько различались, был проведен анализ корреляции этих данных. На рис. 19 показаны графики корреляционной зависимости выживаемости ОСК, регистрируемой по их количеству и по уровню клоногенной выживаемости клеток 3D-культуры после γ - и γ ,n-облучения.

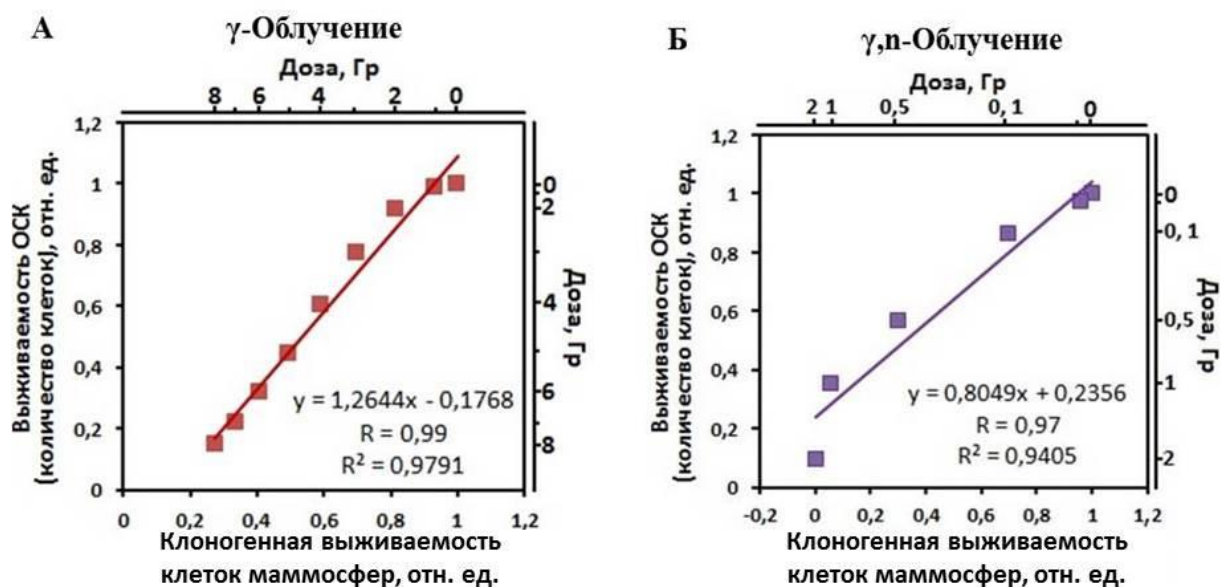


Рисунок 19 – Анализ корреляции показателей выживаемости ОСК, оцениваемой по абсолютному количеству ОСК и по уровню клоногенной выживаемости клеток 3D-культуры после γ -облучения (А) и γ ,n-облучения (Б). На дополнительной верхней шкале и правой шкале показаны дозы облучения, соответствующие найденным значениям клоногенной выживаемости (по горизонтали) и количеству ОСК (по вертикали).

Представленные результаты, свидетельствуют о высокой степени корреляции данных, полученных при оценке дозовой зависимости абсолютного количества ОСК и клоногенной выживаемости клеток маммосфер после γ -облучения в диапазоне доз 1–8 Гр

($R = 0,99$) и облучения нейтронами в диапазоне доз 0,05–2 Гр, вызывающих аналогичный уровень гибели клеток ($R = 0,97$).

3.3.3. Влияние γ ,n-излучения на пролиферативную активность и уровень апоптоза в клетках культуры маммосфер

Для оценки влияния γ ,n-облучения в дозах 1 и 2 Гр на пролиферативную активность и механизм гибели клеток маммосфер проводили анализ параметров клеточного цикла и доли клеток в состоянии апоптоза в культурах через сутки после воздействия. Результаты этого исследования обобщены в табл. 16.

Таблица 16 – Распределение клеток культуры маммосфер линии MCF-7 по фазам клеточного цикла и уровень апоптоза через 24 ч после γ ,n-облучения

Фаза клеточного цикла	Доля клеток в фазе клеточного цикла, %		
	0 Гр	1 Гр	2 Гр
G ₀ /G ₁	68,0±2,9	72,9±3,1	77,5±2,1*
S	21,9±3,6	18,3±3,0	16,8±1,6*
G ₂ /M	10,1±1,0	8,8±3,7	5,7±1,0*
Гибель клеток, %			
Уровень апоптоза	100±16	214±26*	274±46*

Примечание: уровень апоптоза в контроле 5,7±0,9%.

Как следует из представленных данных через сутки после γ ,n-облучения перераспределение клеток по фазам клеточного цикла имело место только после воздействия в дозе 2 Гр. Однако повышение уровня апоптоза наблюдали при воздействии в обеих дозах: до 214% при дозе 1 Гр и до 274% при дозе 2 Гр. Напомним, что γ -облучение (табл. 13) даже в дозе 2 Гр приводило только к статистически мало значимому повышению уровня апоптоза до 135% и только при дозе 4 Гр – до 170%.

Таким образом, плотноионизирующее излучение приводило к значимому изменению распределения клеток по фазам клеточного цикла и более выраженной гибели клеток маммосфер по пути апоптоза (табл. 16), чем редкоионизирующее излучение (табл. 13) через 24 ч после воздействия.

3.3.4. Репарация двунитевых разрывов ДНК в клетках маммосфер при действии γ ,n-излучения

Для сравнения уровня повреждения ДНК после действия γ - и γ ,n-излучения анализировали образование ДР ДНК по количеству фокусов γ H2AX в ядрах клеток маммосфер с помощью конфокальной микроскопии. Количество фокусов гистона γ H2AX определяли через 1 час (время появления максимального количества фокусов) после облучения клеток 3D-культуры нейтронами и γ -квантами в дозе 1 Гр и 2 Гр соответственно (рис. 20).

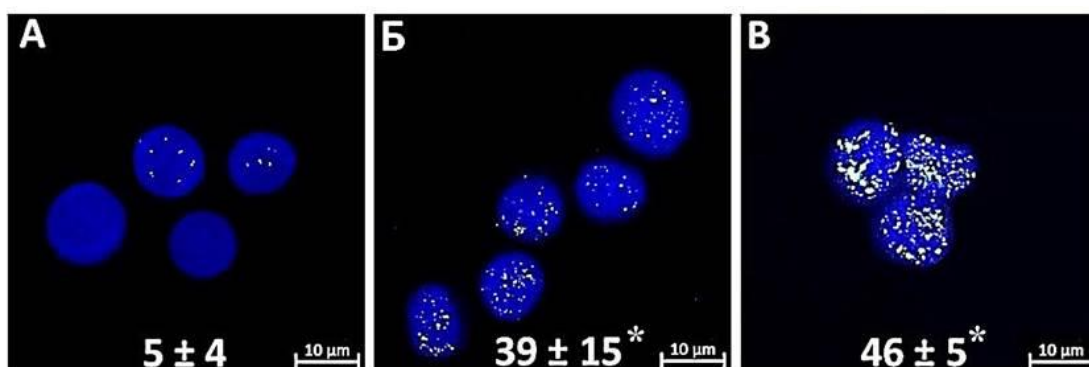


Рисунок 20 – Анализ фокусов гистона γ H2AX с помощью конфокальной микроскопии в ядрах контрольных клеток культуры маммосфер (А), через 1 ч после γ -облучения в дозе 2 Гр (Б) и γ ,n-облучения в дозе 1 Гр (В). Цифрами указано среднее число фокусов на ядро.

При анализе фокусов γ H2AX следует отметить более крупный размер большей части фокусов, образующихся после γ ,n-облучения клеток маммосфер по сравнению с действием γ -облучения. Таким образом, показанная в предыдущем разделе высокая степень гибели клеток, наблюдаемая при γ ,n-облучении, полностью коррелирует с более глубоким повреждением ДНК.

Уровень образования ДР ДНК и динамики репарации этих повреждений в клетках маммосфер при действии γ - и γ ,n-излучения анализировали по количеству образования и элиминации гистона γ H2AX, содержание которого определяли с помощью проточной цитометрии (рис. 21).

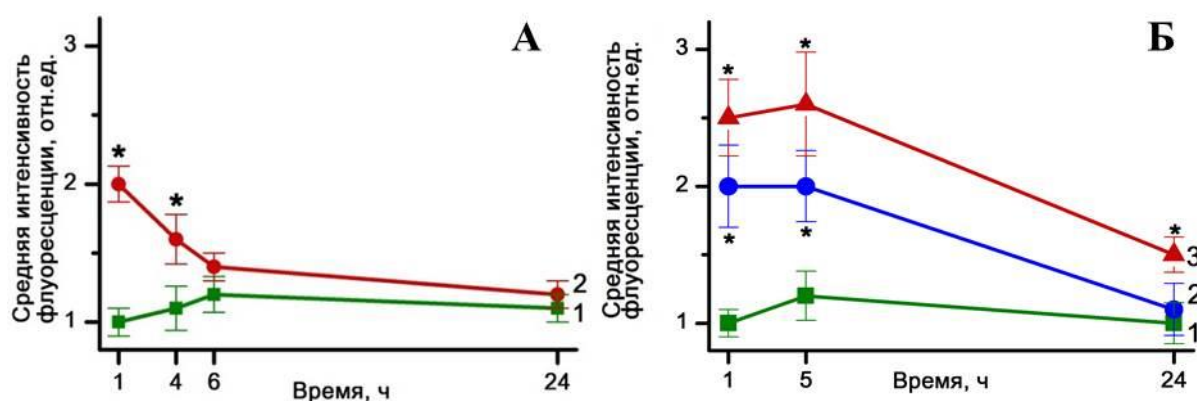


Рисунок 21 – Динамика репарации ДР ДНК в клетках 3D-культуры линии MCF-7 после γ -облучения (А) и облучения нейтронами (Б). Дозы облучения: А: 1 – 0 Гр, 2 – 2 Гр; Б: 1 – 0 Гр, 2 – 1 Гр, 3 – 2 Гр. Для оценки ДР ДНК в качестве суррогатного маркера использовали анализ образования и элиминации гистона γ H2AX. За единицу принята средняя интенсивность флуоресценции клеток контрольной культуры через 1ч культивирования.

Показано, что через 1 ч после γ -облучения клеток в дозе 2 Гр количество ДР ДНК возрастало до $204 \pm 7\%$ относительно необлученного контроля (рис. 21А). В последующие часы этот показатель снижался со временем и уже к 6 ч возвращался к уровню контроля, что свидетельствует о завершении репарации ДР, индуцированных в клетках действием γ -

излучения к этому времени. Через 24 ч после облучения содержание гистона γ H2AX практически соответствовало его содержанию в необлученной культуре. Резкий начальный наклон кривой 2 (рис. 21А) свидетельствует о том, что клетки 3D-культуры способны быстро репарировать ДР ДНК, индуцированные γ -облучением в дозе 2 Гр, уже в первые 6 ч после воздействия. Отсутствие изменений параметров клеточного цикла спустя сутки после такого воздействия также указывает на то, что к этому времени в клетках 3D-культуры заканчивается репарация радиационных повреждений. Полученные в этой серии исследований результаты позволяют считать, что именно относительно высокая скорость репарации радиационных повреждений ДНК является одним из важных факторов, определяющих радиорезистентность клеток 3D-культуры линии MCF-7.

При облучении клеток 3D-культуры нейтронами, прежде всего, следует отметить более высокий уровень образования ДР ДНК на единицу дозы, чем при действии γ -излучения. Так уровень ДР ДНК через 1 ч после облучения нейтронами в дозе 1 Гр возрастал уже до 200%, а при увеличении дозы до 2 Гр – до 252%, что в 1,3 раза превышало количество ДР ДНК при γ -облучении клеток в этой дозе. Помимо этого, важно отметить различия в динамике репарации: если при гамма-облучении эффективное снижение уровня γ H2AX регистрируется фактически в первые минуты и часы после воздействия, то при γ ,n-облучении клеток его снижение при обеих исследованных дозах наблюдается только после 5 часов (рис. 21Б, кривые 2 и 3). К уровню контроля через 24 ч после γ ,n-облучения уровень ДР ДНК возвращался только после облучения в дозе 1 Гр, в то время как после γ ,n-облучения в дозе 2 Гр уровень экспрессии белка γ H2AX составлял 143% и значимо превосходил уровень контроля в отличие от возвращения этого показателя к уровню контроля после γ -облучения клеток в дозе 2 Гр.

Завершая анализ особенностей ответа клеток на действие γ ,n-излучения по сравнению с действием редкоионизирующего γ -излучения, нужно подчеркнуть, что γ ,n-облучение клеток приводит к образованию более высокого уровня ДР ДНК на единицу дозы и к более медленной репарации таких ДР ДНК, чем те, которые образуются при γ -облучении клеток в равной дозе. Причина таких различий определяется известной способностью плотноионизирующего излучения вызывать образование повреждений ДНК более сложной структуры и кластерных повреждений ДНК. К таким повреждениям относят ДР ДНК с модифицированными концами, что затрудняет их репарацию [275]. Известно, что репарация кластерных повреждений ДНК, как правило, протекает особенно сложно.

Для оценки влияния γ - и γ ,n-излучения в отдаленный период после воздействия на способность клеток маммосфер к дальнейшей пролиферации анализировали клоногенную

выживаемость клеток, выживших к 5-м суткам после облучения. Для этого контрольные и облученные клетки маммосфер культивировали в стандартных условиях, через 5 суток после облучения маммосферы собирали, диссоциировали, клетки высаживали в низкой концентрации (1 клетка/мкл) и через 7 сут подсчитывали количество образовавшихся маммосфер. Полученные дозовые зависимости представлены на рис. 22.

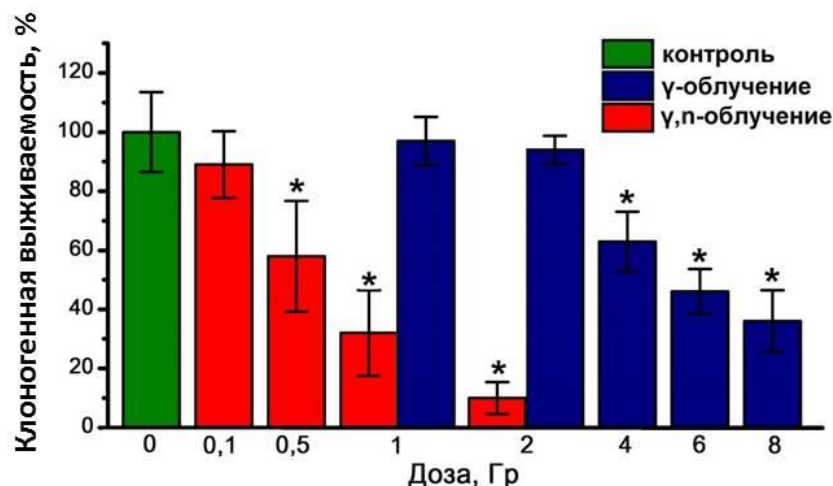


Рисунок 22 – Дозовая зависимость изменения клоногенной выживаемости клеток маммосфер, переживших действие γ- или γ,п-излучения. Клетки анализировали через 5 сут после облучения. Эффективность клонирования контрольных клеток составила 12±1%.

Из представленных данных следует, что γ-облучение клеток в дозе 2 Гр и менее не приводило к снижению способности выживших клеток к пролиферации и формированию маммосфер, но увеличение дозы облучения родительских клеток свыше 4 Гр приводило к значимому снижению способности выживших клеток формировать колонии. При γ,п-облучении клоногенная выживаемость клеток, выживших к 5-м суткам, значимо снижалась уже после облучения в дозе 0,5 Гр, что свидетельствует о присутствии нерепарированных повреждений, которые приводят к подавлению пролиферации ОСК и гибели клеток в отдаленный период после облучения.

Совокупность полученных данных свидетельствует о высокой устойчивости клеток маммосфер линии MCF-7 к действию γ-излучения, которая обусловлена их низкой пролиферативной активностью и высокой активностью репарации ДР ДНК, что требует разработки способов повышения их радиочувствительности.

3.4. Исследование возможности снижения радиоустойчивости клеток маммосфер и ОСК линии MCF-7 при использовании лекарственных средств, обладающих активностью ингибиторов сигнальных путей

3.4.1. Противоопухолевый препарат доцетаксел

Известно, что цитотоксический эффект доцетаксела наиболее быстро проявляется в отношении быстропролиферирующих опухолевых клеток [276]. Для культуры маммосфер, как было показано выше, характерна низкая скорость пролиферации (табл. 8). Поэтому предварительно анализировали зависимость уровня цитотоксического действия доцетаксела от длительности его контакта с клетками маммосфер (рис. 23).

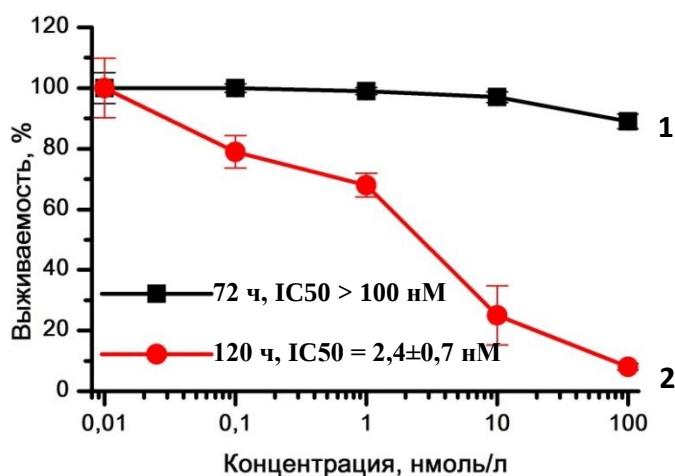


Рисунок 23 – Зависимость выживаемости клеток культуры маммосфер линии MCF-7 от концентрации доцетаксела и времени культивирования с препаратом. 1 – анализ выживаемости клеток через 72 ч, 2 – через 120 ч.

Как следует из данных, представленных на рис. 23, увеличение продолжительности культивирования клеток 3D-культуры с препаратом с 72 до 120 ч сопровождается уменьшением их выживаемости, пропорциональному его концентрации. Через 120 ч IC_{50} составляет $2,4 \pm 0,7$ нМ.

Механизм действия таксанов, к которым относится доцетаксел, определяется их способностью останавливать пролиферацию клеток в результате нарушения образования микротрубочек веретена деления, что приводит к остановке митоза и последующей гибели клеток [233].

Оценку влияния препарата на клеточный цикл клеток маммосфер линии MCF-7 проводили через 24 ч после добавления доцетаксела в концентрациях 10 нмоль/л и 100 нмоль/л. Полученные результаты приведены на рис. 24.

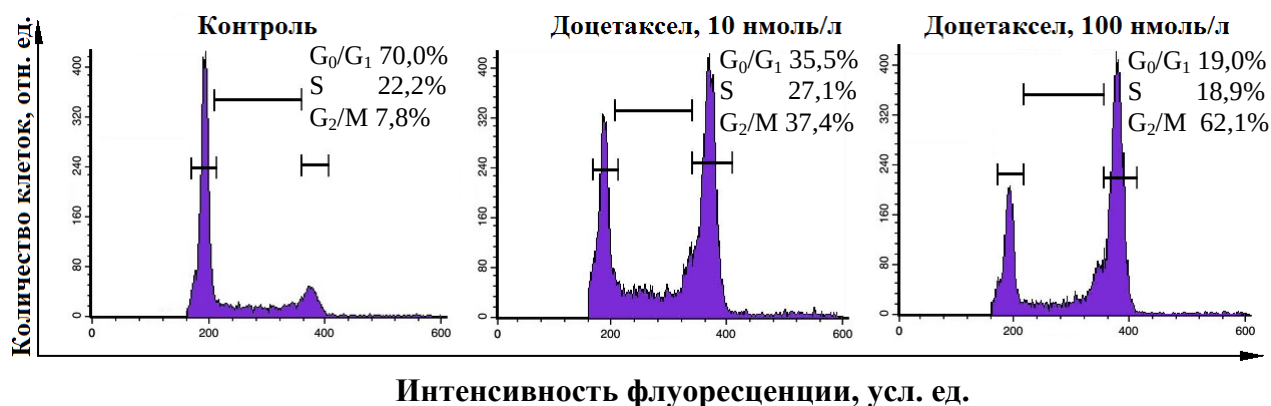


Рисунок 24 – Пример анализа клеточного цикла с помощью проточной цитометрии после культивирования клеток маммосфер в присутствии доцетаксела

Результаты определения показателей, характеризующих состояние клеточного цикла при действии доцетаксела в концентрации 10 нмоль/л и 100 нмоль/л, представлены в табл. 17.

Таблица 17 – Характеристика показателей клеточного цикла клеток линии MCF-7 через 24 ч культивирования с доцетакселом

Фаза клеточного цикла	Относительное содержание клеток, %		
	Контроль	10 нмоль/л	100 нмоль/л
G ₀ /G ₁	68,5±2,5	42,8±8,1*	19,7±1,1*
S	22,2±1,0	26,1±3,1	19,2±1,1
G ₂ /M	9,4±1,7	31,1±6,3*	61,2±0,9*

Примечание: * – отличия от контроля статистически значимы, $p < 0,05$.

Через 24 ч культивирования клеток маммосфер с доцетакселом регистрировали блок клеточного цикла, характеризующийся накоплением клеток в G₂/M-фазе при их снижении в G₀/G₁-фазе, который становился более выраженным при увеличении концентрации препарата. Так, в контрольных культурах маммосфер доля клеток в G₀/G₁-фазе составила 68,5±2,5%, а в G₂/M-фазе – 9,4±1,7%. После культивирования в присутствии доцетаксела в концентрации 10 нмоль/л доля клеток в G₀/G₁-фазе снизилась, а в G₂/M-фазе возросла и составила 42,8±8,1% и 31,1±6,3%, а после культивирования в присутствии препарата в концентрации 100 нмоль/л – 19,7±1,1% и 61,2±0,9% соответственно.

Появление клеток в разных фазах апоптоза и в состоянии некроза в культуре маммосфер исследовали через 24 ч инкубации с доцетакселом с помощью проточной цитометрии при анализе аннексин V-положительных клеток и клеток, окрашенных йодистым пропидием. На рис. 25 представлены примеры гистограмм, полученных в этом исследовании, а на рис. 26 – количественные данные, касающиеся доли клеток в разных фазах апоптоза.

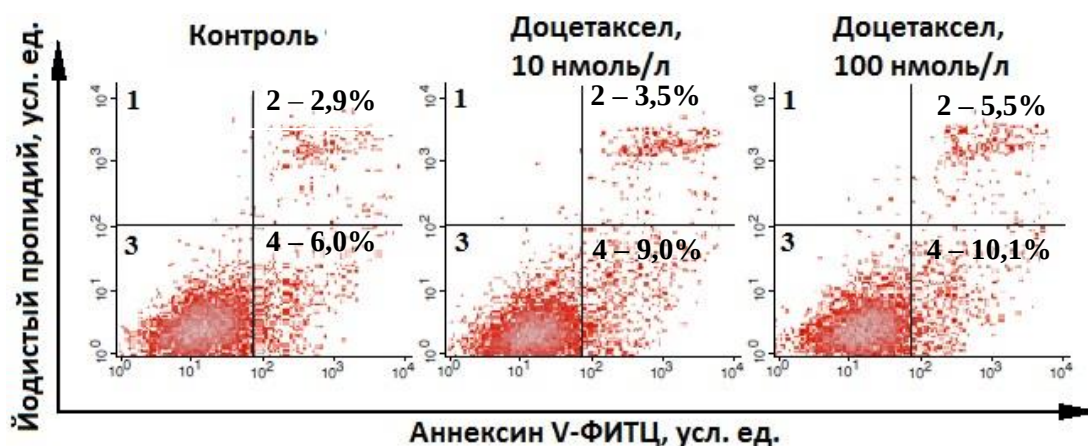


Рисунок 25 – Типичные гистограммы, полученные при исследовании уровня апоптоза, индуцированного при культивировании клеток в течение 24 ч в присутствии доцетаксела.

На гистограммах приведено распределение клеток по интенсивности флуоресценции аннексина V-ФИТЦ и йодистого пропидия. 1-й квадрант – клетки в состоянии некроза, 2-й квадрант – клетки в состоянии позднего апоптоза, 3-й квадрант – живые клетки, 4-й квадрант – клетки в состоянии раннего апоптоза.

Через 24 ч после добавления клеткам 3D-культуры доцетаксела в концентрациях 10 и 100 нмоль/л обнаружено статистически значимое повышение уровня апоптоза, преимущественно за счет индукции раннего апоптоза, при этом обнаруженный эффект доцетаксела не зависел от концентрации препарата (рис. 26).

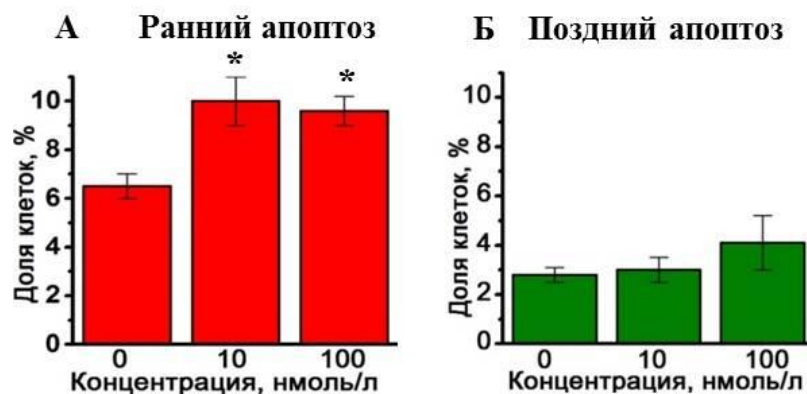


Рисунок 26 – Уровень раннего (А) и позднего (Б) апоптоза в контрольной культуре и культуре маммосфер, культивируемых с доцетакселом в течение 24 ч.

Обнаружено, что в контрольной культуре доля клеток в состоянии раннего апоптоза составляла $6,5 \pm 0,6\%$. Через 24 ч инкубации с доцетакселом в концентрации 10 нмоль/л и 100 нмоль/л доля клеток в состоянии раннего апоптоза значимо увеличивалась до $10,0 \pm 1,0\%$ и $9,6 \pm 0,6\%$ соответственно, но препарат не влиял на долю клеток в состоянии позднего апоптоза.

Показано также, что доцетаксел может влиять на количество ОСК. Размер фракции ОСК в 3D-культуре определяли по фенотипу $CD44^+/CD24^{low}$ через 72 и 120 ч

культивирования с препаратом. Типичные гистограммы, полученные при определении доли ОСК с помощью проточной цитометрии, представлены на рис. 27.

Культивирование клеток 3D-культуры с доцетакселом в течение 72 ч не приводило к значимому изменению доли ОСК по сравнению с контролем (рис. 28А), при этом через 120 ч наблюдали уменьшение ($p<0,05$) доли ОСК, при этом увеличение содержания препарата в среде приводило к более глубокому истощению пула ОСК (рис. 28Б).

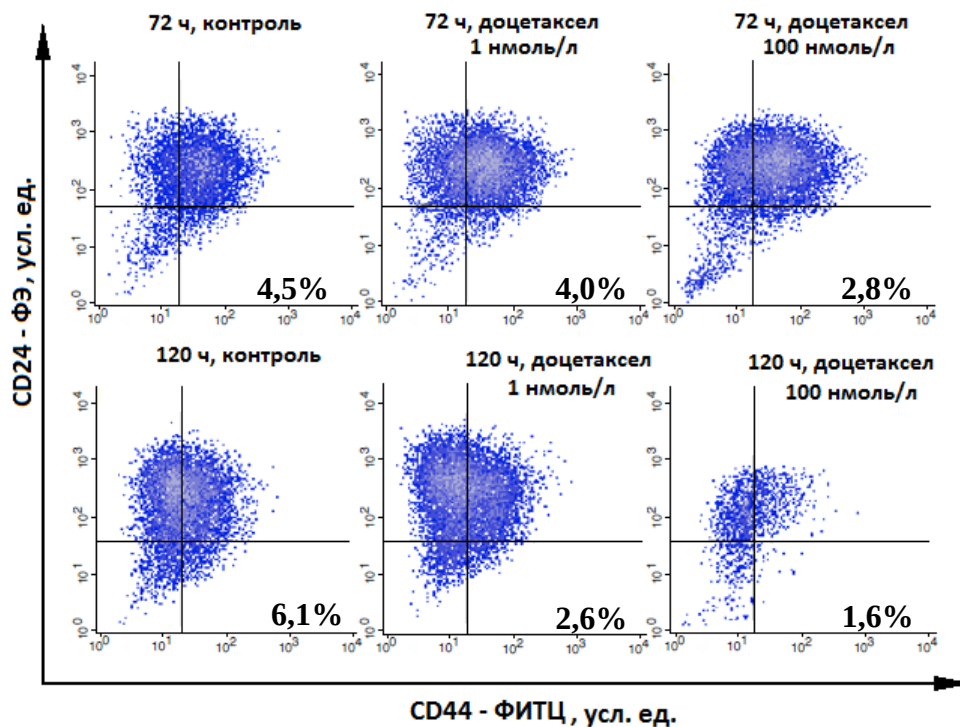


Рисунок 27 – Гистограммы, иллюстрирующие идентификацию популяции ОСК в 3D-культуре линии MCF-7 после воздействия доцетаксела.

Цифры – обнаруженная доля ОСК.

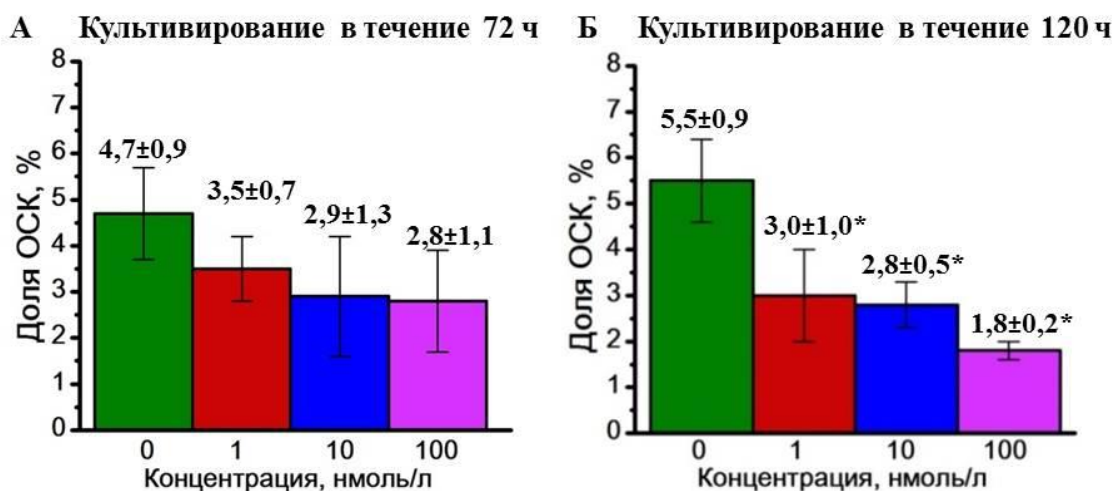


Рисунок 28 – Влияние доцетаксела на относительное содержание ОСК в 3D-культуре через 3 сут (А) и 5 сут (Б) культивирования в зависимости от концентрации препарата.

Цифрами обозначена доля ОСК в культуре.

На рис. 29 А, Б представлено изменение количества клеток 3D-культуры и ОСК в этой культуре во времени при культивировании с доцетакселом в разных концентрациях.

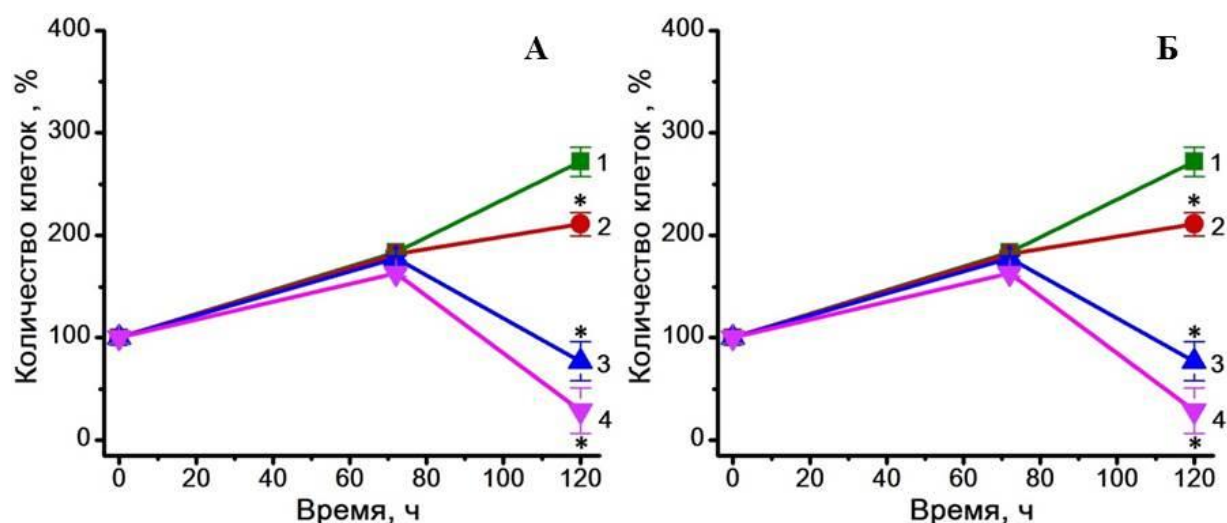


Рисунок 29 – Динамика изменения количества клеток 3D-культуры (А) и ОСК в 3D-культуре (Б) при культивировании с доцетакселом в разных концентрациях: 1 – контроль; 2, 3 и 4 – концентрации 1, 10 и 100 нмоль/л соответственно. За 100% принимали исходное количество клеток 3D-культуры, составляющее 100 ± 10 тыс. клеток, исходное количество ОСК было равно 4 ± 2 тыс. клеток.

Сравнение динамики изменения размера общей популяции клеток 3D-культуры и размера популяции ОСК при оценке по количеству клеток показало, что популяция ОСК увеличивается с большей скоростью, чем общая популяция клеток 3D-культуры: через 120 ч культивирования количество ОСК составило 374% (рис. 29 А), а общее количество только 272% (рис. 29 Б).

При культивировании клеток 3D-культуры с доцетакселом в течение 72 ч их общее количество (рис. 29А, кривые 2–4) существенно не отличалось от необработанного контроля (рис. 29 А, кривая 1). При этом через 120 ч культивирования происходило дозозависимое снижение ($p < 0,05$) общего количества клеток 3D-культуры (рис. 29А, кривые 2–4). При культивировании клеток маммосфер в присутствии доцетаксела уже через 72 ч обнаружено значимое уменьшение количества ОСК по сравнению с контролем (рис. 29 Б, сравнивать кривые 2–4 с кривой 1), и через 120 ч оно было значительно более глубоким.

На рис. 29Б показано, что уже через 72 ч культивирования доцетаксел приводил к дозозависимому снижению количества ОСК в культуре, но статистически значимо не влиял на общее количество клеток 3D-культуры относительно контроля. С увеличением продолжительности воздействия препарата на клетки эта закономерность становилась более явной. Так через 5 сут культивирования клеток в присутствии даже минимальной из

используемых концентраций обнаружено уменьшение выживаемости ОСК более чем вдвое, хотя общее количество клеток культуры было снижено только на 30%

Уменьшение ($p < 0,05$) количества ОСК, происходящее на фоне менее выраженного убывания общего количества клеток в культурах маммосфер, обработанных доцетакселом, может быть связано с перераспределением субпопуляции ОСК и опухолевых клеток других типов.

Была также проведена оценка влияния доцетаксела на клоногенную способность клеток 3D-культуры, выживших после культивирования с препаратом в разных концентрациях в течение 120 ч. Клоногенную способность выживших клеток, определяли по числу маммосфер, образовавшихся через 7 сут после удаления препарата (рис. 30).

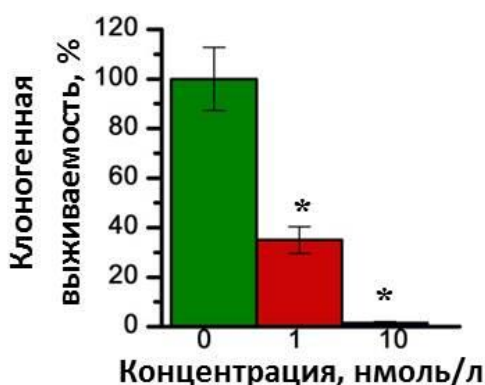


Рисунок 30 – Анализ клоногенной выживаемости клеток 3D-культуры линии MCF-7, переживших длительное воздействие доцетаксела в течение 120 ч. Эффективность клонирования контрольных клеток равна $13 \pm 5\%$.

Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что клетки 3D-культуры, выжившие после 5-дневного воздействия доцетаксела даже в минимальной из исследуемых концентраций, характеризовались глубоким снижением клоногенной выживаемости. Повышение концентрации препарата сопровождалось более глубоким снижением клоногенной выживаемости, что коррелирует со снижением доли ОСК в культуре (рис. 28 Б). Совокупность полученных результатов позволила предположить, что доцетаксел может повышать чувствительность ОСК к облучению.

Для оценки влияния доцетаксела в концентрации 3 нмоль/л и 10 нмоль/л на чувствительность клеток 3D-культуры к действию γ -излучения в дозе 2 Гр анализировали выживаемость клеток через 5 сут после облучения (рис. 31). Клетки 3D-культуры культивировали в присутствии препарата в течение 24 ч до облучения, а затем после облучения препарат отмывали и продолжали культивировать клетки в стандартных для 3D-культуры условиях.

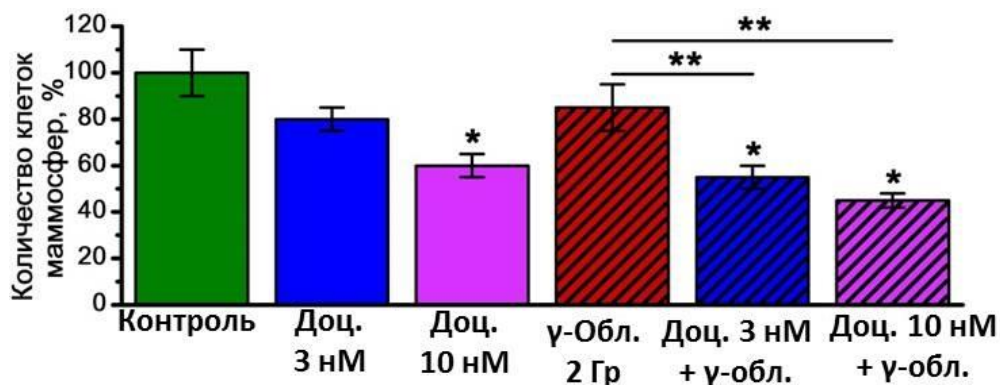


Рисунок 31 – Модификация чувствительности клеток 3D-культуры линии MCF-7 к действию γ -излучения, оцениваемая по их количеству через 5 сут после воздействия, при использовании доцетаксела. За 100% принимали количество клеток в контрольной 3D-культуре, равное 130 ± 10 тыс. клеток.

Показано, что в выбранных экспериментальных условиях только доза 10 нмоль/л приводила к значимому снижению выживаемости клеток 3D-культуры линии MCF-7 до $63,2 \pm 4,9\%$. Действие γ -излучения практически не влияло на количество клеток в культуре по сравнению с контрольной культурой. Добавление препарата в концентрациях 3 и 10 нмоль/л до γ -облучения приводило к уменьшению выживаемости клеток до $55,0 \pm 4,8\%$ и $45,2 \pm 3,3\%$ соответственно относительно контроля. Следует подчеркнуть, что указанная выживаемость клеток была значимо ниже выживаемости, найденной при использовании только облучения.

В качестве еще одного критерия для оценки эффективности модификации чувствительности клеток маммосфер к облучению с помощью доцетаксела использовали анализ клоногенной выживаемости клеток при описанной выше схеме эксперимента. После облучения и отмывания клеток от препарата клетки высаживали в концентрации 1 клетка/мкл, культивировали и анализировали количество маммосфер, как указано в разделе «Материалы и методы». Полученные результаты определения клоногенной выживаемости представлены на рис. 32.

Показано, что в условиях эксперимента доцетаксел в концентрации 3 нмоль/л практически не снижал клоногенную выживаемость клеток, в то время как при более высокой концентрации 10 нмоль/л она снижалась до $45,1 \pm 5,3\%$ ($p < 0,05$) от контроля. После γ -облучения в дозе 2 Гр количество маммосфер снижалось незначительно (до $80,7 \pm 8,4\%$), а при совместном действии доцетаксела в концентрации 3 нмоль/л и 10 нмоль/л и облучения количество образующихся маммосфер было значительно снижено и составило только $34,4 \pm 5,2\%$ и $23,7 \pm 5,4\%$ от контрольного уровня.

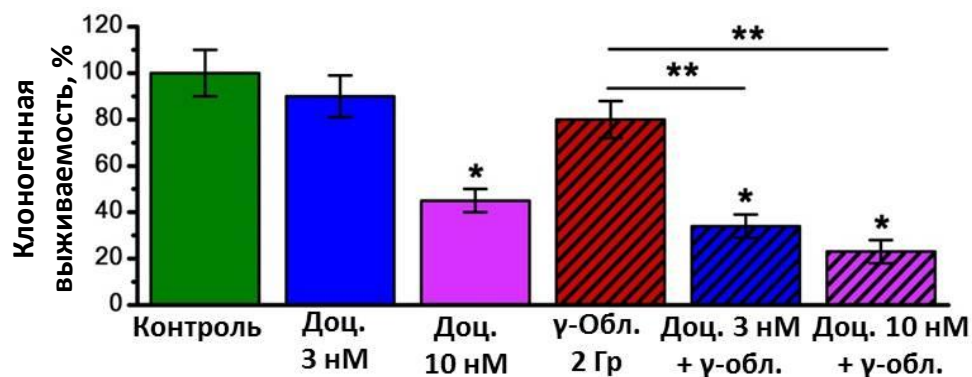


Рисунок 32 – Модификация чувствительности клеток 3D-культуры линии MCF-7 к действию γ -излучения, оцениваемая по их клоногенной выживаемости, при использовании доцетаксела. Эффективность клонирования контрольных клеток равна $10 \pm 2\%$.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что культивирование клеток в течение 24 ч в присутствии доцетаксела перед их облучением позволяет существенно снизить их клоногенную выживаемость, что отражает возможность снижения устойчивости ОСК к радиационному воздействию с помощью этого препарата.

Ниже приведены данные для сопоставления использованных нами концентраций доцетаксела с теми, которые регистрируются в плазме крови пациентов при различных режимах дозирования. Так, при введении доцетаксела в дозе 20 мг/кг его концентрация в плазме через 1,5 ч достигала уровня 100 нмоль/л, через 24 ч снижалась до 20 нмоль/л, а через 72 ч регистрировалась на уровне 3 нмоль/л [277]. При введении препарата в более высокой дозе 35 мг/кг спустя 8 сут его концентрация в крови составляла 1 нмоль/л, а при дозе доцетаксела 75 мг/кг он обнаруживался в крови через 8, 15 и 22 сут в концентрациях 1,8, 0,8 и 0,6 нмоль/л [278].

Приведенные результаты клинических исследований позволяют заключить, что использованные нами концентрации доцетаксела формируются и длительно сохраняются как в опухолевой ткани, так и в плазме крови, что свидетельствует о достижении эффективных для повышения радиочувствительности клеток РМЖ концентраций этого препарата при его использовании в терапевтических дозах. Представленные данные свидетельствуют, кроме того, о том, что при РМЖ доцетаксел может быть эффективным препаратом для снижения радиоустойчивости ОСК и повышения эффективности ЛТ при его назначении в уже известных терапевтических дозах перед облучением опухоли.

3.4.2. Противоопухолевый препарат дазатиниб

Влияние дазатиниба на выживаемость клеток маммосфер оценивали по изменению их количества через 5 сут культивирования в присутствии разных концентраций препарата (рис. 33).

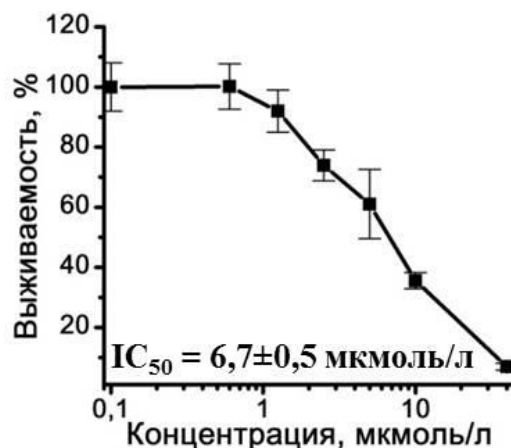


Рисунок 33 – Выживаемость клеток культуры маммосфер линии MCF-7 при культивировании с дазатинибом в течение 5 сут

Значение IC_{50} дазатиниба для клеток маммосфер составило $6,7 \pm 0,5$ мкмоль/л. Через 5 сут после добавления к клеткам 3D-культуры разных концентраций дазатиниба оценивали долю ОСК в них с помощью анализа SP (рис. 34).

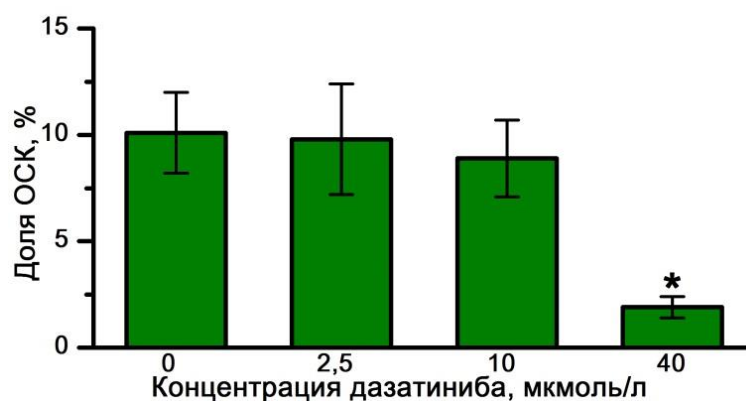


Рисунок 34 – Анализ относительного содержания ОСК в 3D-культуре клеток линии MCF-7 при действии дазатиниба. Доля ОСК в контрольной культуре составляет $10,1 \pm 1,9\%$

Относительное содержание ОСК в 3D-культурах через 5 сут культивирования с дазатинибом практически не менялось по сравнению с контрольным уровнем, за исключением максимальной из исследованных концентраций препарата (40 мкмоль/л), которая приводила к уменьшению доли ОСК до $1,9 \pm 0,5\%$.

Для последующих исследований совместного действия дазатиниба и γ -излучения в отношении клеток культуры маммосфер была выбрана нетоксичная концентрация препарата, равная 2,5 мкмоль/л. Клетки 3D-культуры преинкубировали в присутствии этой концентрации препарата в течение 60 мин до облучения. После облучения клетки

культивировали без отмывания от препарата в стандартных для 3D-культуры условиях. Для оценки влияния дазатиниба на радиочувствительность клеток 3D-культуры анализировали изменение количества клеток и их клоногенную выживаемость через 5 сут после облучения (рис. 35 и 36 соответственно).

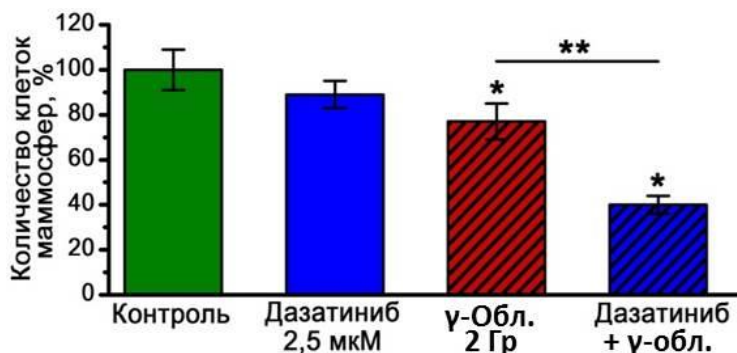


Рисунок 35 – Модификация радиочувствительности клеток 3D-культуры линии MCF-7 при действии γ -излучения в условиях предварительной обработки дазатинибом, оцениваемая по их количеству через 5 сут после воздействия. За 100% принимали количество клеток в контрольной 3D-культуре, равное 100 ± 10 тыс. клеток.

Как показано на рис. 35, культивирование клеток в присутствии дазатиниба не приводило к изменению общего количества клеток 3D-культуры, γ -облучение в дозе 2 Гр значительно снижало их количество почти до 80%, а их сочетанное влияние – до $40,9 \pm 4,3\%$ относительно контроля. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование дазатиниба перед облучением в субтоксической концентрации позволяет существенно снизить выживаемость клеток, что отражает повышение радиочувствительности клеток 3D-культуры при действии γ -излучения.

Близкие результаты получены при анализе эффекта дазатиниба на чувствительность клеток к облучению при анализе по изменению их клоногенной выживаемости (рис. 36).

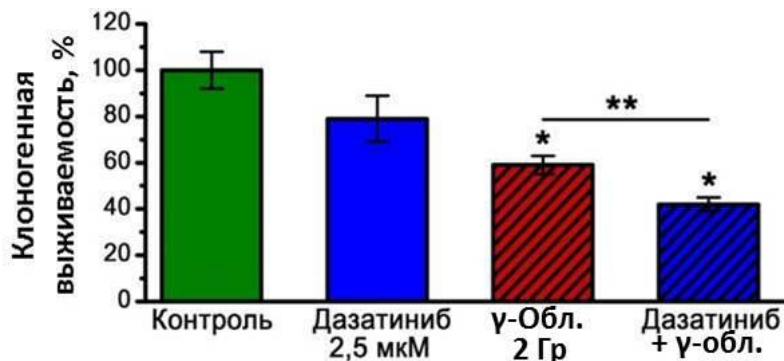


Рисунок 36 – Повышение чувствительности клеток маммосфер к действию γ -излучения, оцениваемой по их клоногенной выживаемости, при использовании дазатиниба. За 100% принимали эффективность клонирования в контрольной 3D-культуре, равную $9 \pm 3\%$.

В выбранных условиях дазатиниб не влиял на клоногенную выживаемость клеток маммосфер. После γ -облучения в дозе 2 Гр уровень клоногенной выживаемости значительно уменьшился и составил $59,3 \pm 4,1\%$. Совместное действие дазатиниба и облучения приводило к еще более выраженному уменьшению клоногенной выживаемости клеток – до $42,5 \pm 3,9\%$.

Таким образом, добавление дазатиниба в субтоксической концентрации к клеткам 3D-культуры за 1 ч до облучения увеличивало их радиочувствительность при действии γ -излучения, что может быть опосредовано влиянием препарата на клоногенную выживаемость клеток, отражающую способность ОСК к пролиферации.

Нужно отметить, что использованная в этом исследовании концентрация дазатиниба 2,5 мкмоль/л, эквивалентная 1220 нг/л, превышает максимальную концентрацию в плазме, обнаруживаемую после приема препарата в зарегистрированной терапевтической дозе 100 мг. Однако результаты исследования, касающегося применения более высоких доз дазатиниба для лечения солидных опухолей, показали их удовлетворительную переносимость [280].

3.4.3. Никлозамид – противогельминтный препарат, ингибитор сигнальных путей Wnt, NF-kB, Stat3, Notch и mTORC1

Первый этап работы касался выбора субтоксической концентрации никлозамида для последующего исследования его модифицирующего действия на чувствительность клеток 3D-культуры линии MCF-7 к действию ИИ. Для этого к клеткам 3D-культуры добавляли никлозамид в диапазоне концентраций от 0,1 мкмоль/л до 10 мкмоль/л, через 24 ч клетки отмывали от препарата и продолжали культивировать в течение еще 6 сут.

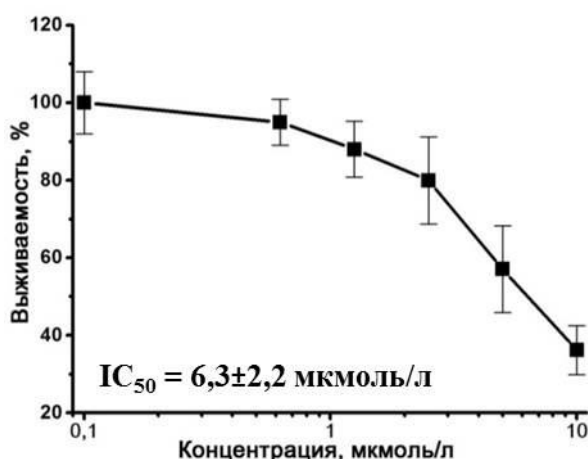


Рисунок 37 – Анализ чувствительности клеток 3D-культуры к никлозамиду в зависимости от его концентрации

Как видно из графика дозовой зависимости на рис. 37, величина IC_{50} никлозамида при культивировании клеток в указанных выше условиях составила $6,3 \pm 2,2$ мкмоль/л. Для дальнейших экспериментов была выбрана субтоксическая концентрация никлозамида, равная 2 мкмоль/л, которая приводила к снижению выживаемости клеток не более чем на 17% (рис. 37).

При анализе влияния никлозамида на радиочувствительность клеток линии MCF-7 были выбраны 2 дозы облучения: 2 Гр и 4 Гр. За 1 час до облучения клетки культивировали в присутствии препарата в концентрации 2 мкмоль/л при его последующем удалении через 1 сут после радиационного воздействия. Количество клеток анализировали спустя 6 сут культивирования (рис. 38).

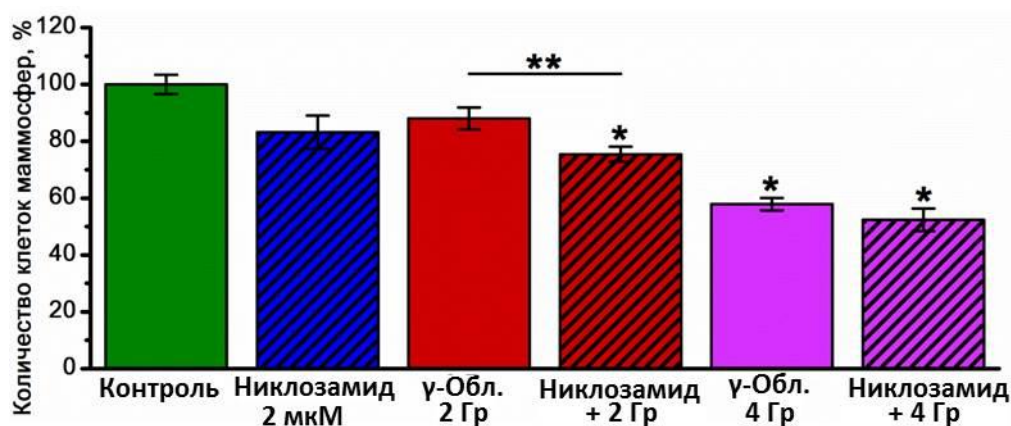


Рисунок 38 – Анализ радиомодифицирующего действия никлозамида на культивируемые в виде 3D-культуры клетки линии MCF-7. За 100% принимали количество клеток в контрольной культуре, которое составило 124 ± 8 тыс. клеток.

При добавлении никлозамида в культуральную среду общее количество клеток маммосфер незначимо снижалось и составило $83,2 \pm 5,9\%$. Действие γ -излучения в дозе 2 Гр значимо не влияло на количество клеток в культуре, но облучение в дозе 4 Гр приводило к существенному уменьшению выживаемости до $57,9 \pm 1,0\%$ по сравнению с контролем. При одновременном применении препарата и облучения в дозах 2 Гр и 4 Гр выживаемость клеток 3D-культуры составила $75,4 \pm 2,7\%$ и $52,3 \pm 4,0\%$ соответственно относительно контрольной культуры. Таким образом, никлозамид значимо увеличивал чувствительность клеток маммосфер линии MCF-7 к действию γ -излучения в дозе 2 Гр.

Анализ влияния никлозамида на радиочувствительность ОСК при действии γ -излучения в дозах 2 Гр и 4 Гр проводили при идентификации ОСК как клеток с фенотипом $CD44^+/CD24^{-low}$ и оценивали их относительное содержание при использовании цитометрии, как показано на рис. 39.

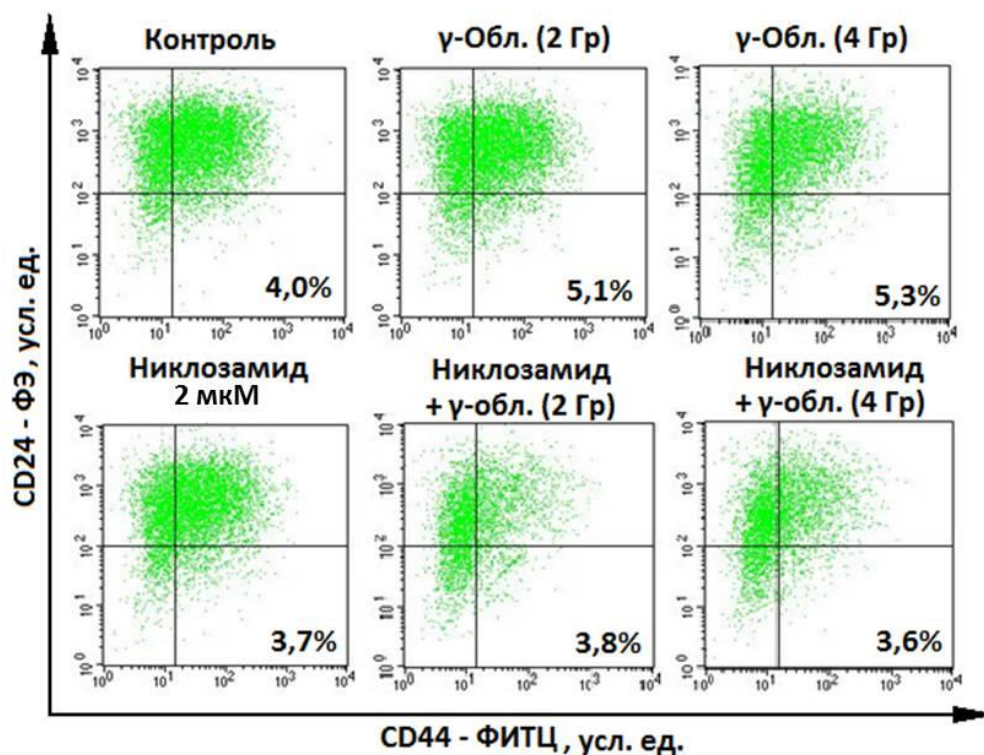


Рисунок 39 – Примеры гистограмм, демонстрирующих идентификацию популяции ОСК в 3D-культуре линии MCF-7 после воздействия никлозамида, γ -излучения и γ -излучения совместно с никлозамидом через 7 сут после облучения. Цифрами показана доля ОСК в культуре.

Доля ОСК в контроле составила $4,1 \pm 0,7\%$, а в присутствии никлозамида – $3,6 \pm 0,1\%$. γ -Облучение в дозах 2 Гр и 4 Гр не влияло на относительное количество ОСК, которое составило $4,5 \pm 0,7\%$ и $4,9 \pm 0,6\%$ соответственно, а после γ -облучения в дозах 2 Гр и 4 Гр в присутствии никлозамида – $2,8 \pm 1,0\%$ и $4,4 \pm 0,8\%$ соответственно (рис. 40).

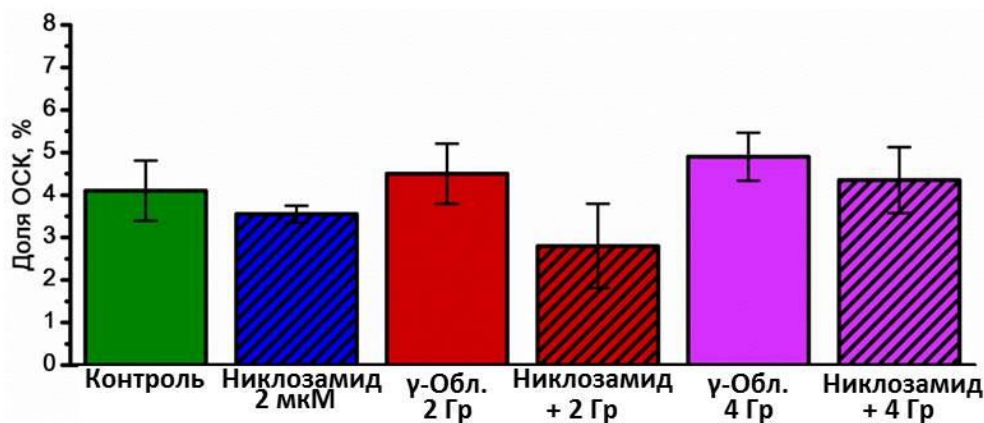


Рисунок 40 – Анализ радиомодифицирующего действия никлозамида по его влиянию на относительное содержание ОСК в 3D-культуре линии MCF-7

Исходя из данных, приведенных на рис. 40, и сведений об общем количестве клеток в этих культурах было рассчитано содержание ОСК в культурах после

соответствующих воздействий. Полученные результаты о влиянии никлозамида и γ -облучения на абсолютное количество ОСК в 3D-культурах приведены на рис. 41.

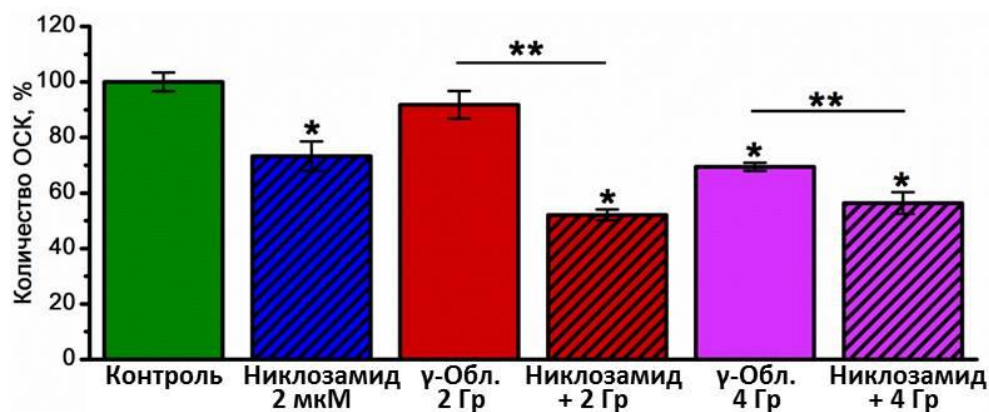


Рисунок 41 – Абсолютное количество ОСК в 3D-культурах при действии никлозамида и γ -излучения. В интактной культуре количество ОСК нашли равным $5,1 \pm 0,4$ тыс.

В выбранных условиях действие никлозамида приводило к значимому снижению количества ОСК – до $73,3 \pm 5,3\%$ ($p < 0,05$) – по сравнению с контрольной культурой маммосфер. Абсолютное количество ОСК в культурах, облученных в дозе 2 Гр, составило $93,7 \pm 7,3\%$ по сравнению с контролем. Облучение в дозе 4 Гр привело к снижению ($p < 0,05$) содержания ОСК до $69,4 \pm 1,4\%$ относительно контроля. В случае облучения культур после преинкубации с никлозамидом абсолютное количество ОСК было снижено более значительно, и составляло $52,1 \pm 2,0\%$ и $56,4 \pm 3,9\%$ по сравнению с контролем.

Показано, что никлозамид приводил к более выраженному снижению абсолютного количества ОСК (рис. 41), чем общего количества клеток 3D-культуры (рис. 38). Следовательно, можно заключить, что никлозамид обладает избирательным действием в отношении ОСК линии MCF-7. γ -Облучение в дозе 2 Гр не приводило к значимому изменению общего количества клеток маммосфер и количества ОСК по сравнению с контрольной культурой, что подтверждает высокую устойчивость клеток 3D-культуры и ОСК в них к указанному радиационному воздействию. Преинкубация клеток с никлозамидом перед γ -облучением привела к существенному увеличению радиочувствительности ОСК. Цитотоксический эффект сочетанного действия препарата и γ -излучения в отношении ОСК был более выражен при облучении в меньшей из двух исследованных доз. Так, при сравнении с действием только облучения в дозах 2 Гр или 4 Гр степень снижения выживаемости ОСК была больше при действии препарата и облучения в дозе 2 Гр, чем 4 Гр. γ -Облучение в дозе 2 Гр, которую используют для одного сеанса облучения при режиме ФО в рамках ЛТ, активирует в ОСК такие сигнальные каскады, как Wnt, NF-kB, Stat3, Notch и др., что приводит к увеличению способности к репарации сублетальных повреждений между сеансами облучения [172]. Поэтому

обнаруженное повышение чувствительности ОСК линии MCF-7 к действию γ -излучения с использованием никлозамида может быть опосредовано способностью этого препарата ингибировать важные для жизнедеятельности ОСК сигнальные пути.

Возможность повышения радиочувствительности ОСК изученной линии клеток оценивали, кроме того, по изменению их клоногенной выживаемости при той же схеме эксперимента. Результаты определения клоногенной выживаемости представлены на рис. 42.

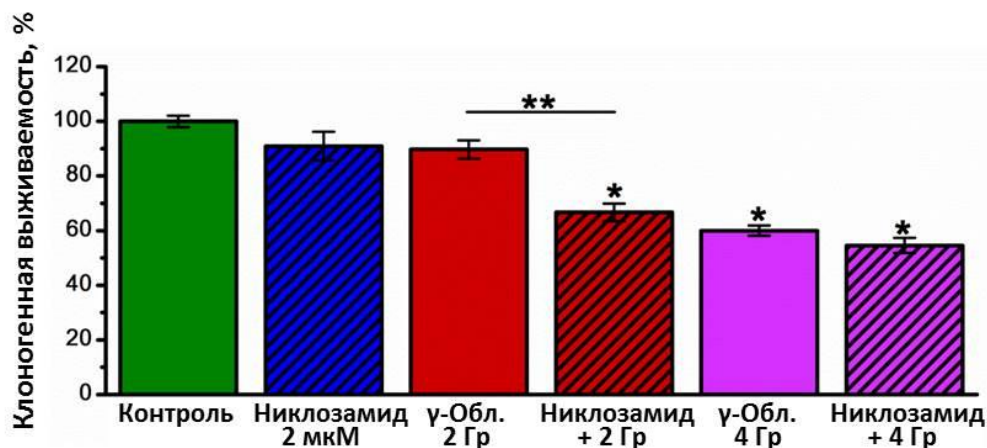


Рисунок 42 – Повышение радиочувствительности ОСК линии MCF-7 при действии никлозамида, оцениваемой по изменению уровня клоногенной выживаемости клеток 3D-культуры линии MCF-7. Для контрольных клеток эффективность клонирования составила $5,5 \pm 0,2\%$.

В выбранных экспериментальных условиях действие никлозамида и γ -излучения в дозе 2 Гр по отдельности не влияло на клоногенную выживаемость клеток 3D-культуры, но через 7 сут после облучения в дозе 4 Гр обнаружено значимое снижение этого показателя до $60,0 \pm 1,8\%$ относительно контроля. Одновременное действие препарата и гамма-квантов в дозе 2 Гр приводило к уменьшению клоногенной выживаемости клеток до $66,7 \pm 3,2\%$ относительно контроля. Указанное значение было ниже ($p < 0,05$) результата определения клоногенной выживаемости, найденного при использовании только облучения в дозе 2 Гр. При одновременном действии препарата и облучения в дозе 4 Гр клоногенная выживаемость клеток снижалась до $54,5 \pm 2,8\%$ относительно контроля, но не отличалась от клоногенной выживаемости клеток после действия только облучения в этой дозе, когда эффект самого облучения был высоким. Эффективность цитотоксического действия γ -облучения в высокой дозе 4 Гр объясняет отсутствие радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении ОСК в этих условиях. Таким образом, никлозамид в выбранных условиях повышает чувствительность ОСК линии MCF-7 к действию γ -облучения в дозе 2 Гр, оцениваемую по клоногенной

выживаемости клеток 3D-культуры, что соответствует представленным выше данным о его влиянии на содержание ОСК после облучения при их идентификации по фенотипу.

Для ОСК, по сравнению с остальными опухолевыми клетками, характерна более высокая активность сигнальных систем, поддерживающих их пролиферацию и выживаемость, таких как Notch, STAT3, Hedgehog и Wnt. Обнаружено, что никлозамид является ингибитором этих сигнальных путей в опухолевых клетках разных типов рака. В частности показано, что никлозамид снижает активность пути Wnt в клетках трижды негативного РМЖ и рака яичника [281, 282].

Состояние сигнального каскада Wnt в клетках 3D-культуры после культивирования клеток в присутствии никлозамида и при действии ИИ исследовали по анализу содержания белков β -катенин и Dishevelled-2 (Dvl-2), которые участвуют во внутриклеточной передаче сигнала при связывании лиганда Wnt с мембранным рецептором. Никлозамид в описанных выше условиях вносили в культуральную среду за 1 ч до облучения, а через 24 ч после облучения анализировали содержание белков пути Wnt в клетках, как описано в разделе «Материалы и методы». Примеры гистограмм, полученных при этом исследовании, и результаты анализа влияния никлозамида и облучения на уровень белков системы Wnt показаны на рис. 43 А и Б соответственно.

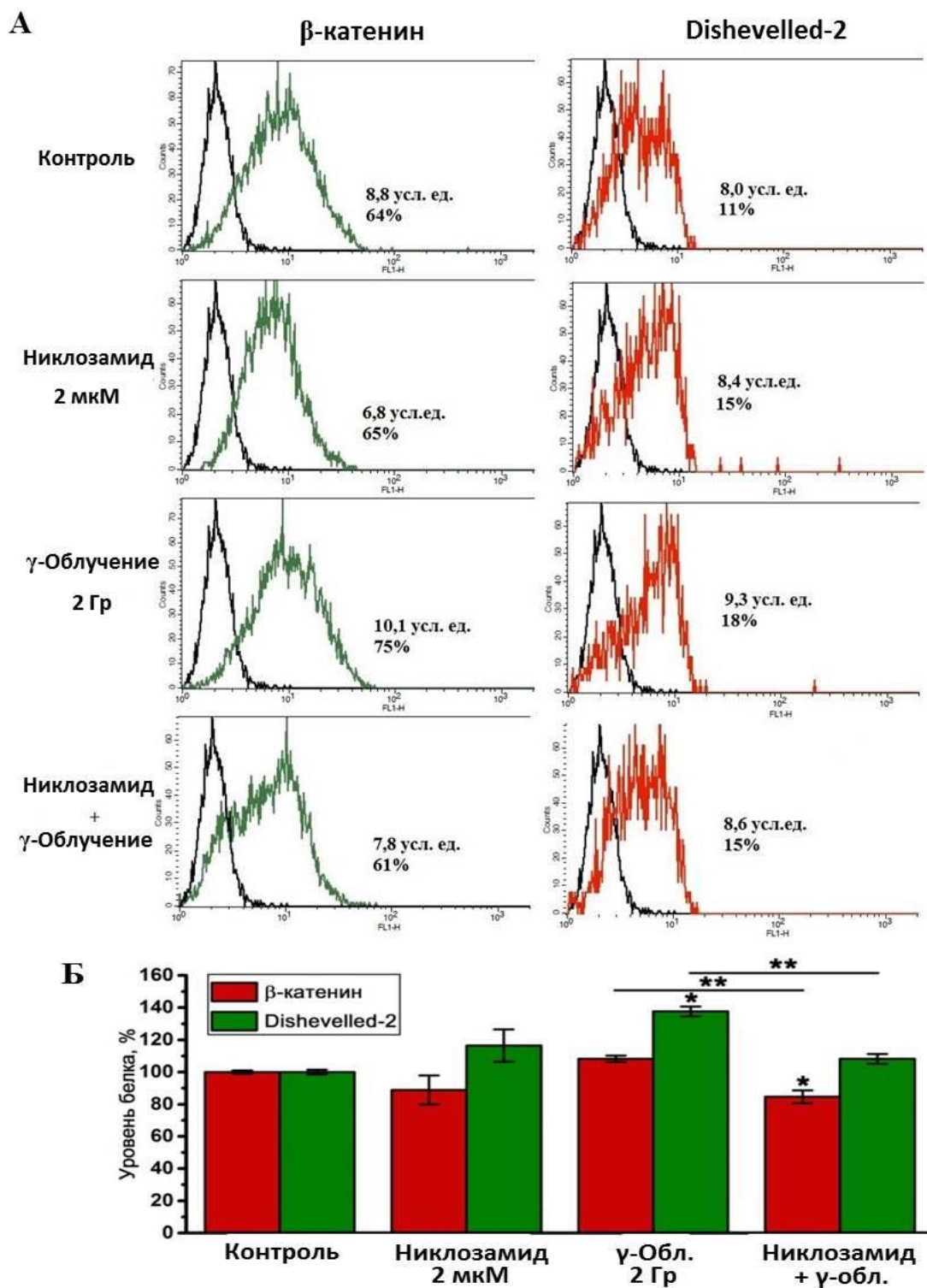


Рисунок 43 – Экспрессия белков системы Wnt β-катенина и Dishevelled-2 в клетках 3D-культуры линии MCF-7 при действии γ-излучения и никлозамида по данным анализа с помощью проточной цитометрии. А – примеры гистограмм, Б – количественные данные. Цифрами на поле рис. А указаны значения средней интенсивности флуоресценции (в контроле – $8,6 \pm 0,3$ усл. ед. для β-катенина и $7,8 \pm 0,2$ усл. ед. для Dishevelled-2) и доля окрашенных соответствующими антителами клеток в процентах.

Добавление указанной концентрации никлозамида к клеткам приводило лишь к незначительному уменьшению уровня β -катенина (до $89 \pm 9\%$) и увеличению уровня белка Dvl-2 (до $116 \pm 10\%$) относительно контроля. После γ -облучения в дозе 2 Гр обнаружено увеличение уровня β -катенина и Dvl-2 до 108 ± 2 и $138 \pm 3\%$ относительно контроля соответственно, что свидетельствует о повышении активности сигнального пути Wnt в клетках 3D-культуры под действием облучения. В случае действия излучения тогда, когда в культуральной среде присутствовал никлозамид, было обнаружено снижение содержания как β -катенина, так и белка Dvl-2 до $85 \pm 4\%$ и $108 \pm 3\%$ соответственно. Эти результаты позволяют заключить, что никлозамид ингибирует активированный действием γ -излучения в клетках маммосфер путь Wnt.

Ранее было установлено, что никлозамид, действуя как разобщитель тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, индуцирует образование АФК [256], которые могут модифицировать радиационно-индуцированные повреждения ДНК. Механизм действия никлозамида также связан с ингибированием АТФ-зависимых процессов из-за повреждения митохондрий, в том числе процессов, вовлеченных в репарацию повреждений ДНК. Например, показано, что радиосенсибилизирующее действие никлозамида при γ -облучении опухолевых клеток человека обусловлено, помимо прочего, ингибированием репарации ДР ДНК [283].

Поэтому далее мы исследовали влияние никлозамида на уровень образования и полноту репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК в клетках 3D-культуры. Схема обработки клеток препаратом и последующего облучения была такая же, как в предыдущих экспериментах. В качестве маркера ДР ДНК анализировали уровень гистона γ H2AX, который определяли через 1 ч и 24 ч после радиационного воздействия с помощью проточной цитометрии. Примеры гистограмм, демонстрирующих распределение клеток по содержанию γ H2AX через 1 ч после облучения, и обобщенные результаты этого анализа представлены на рис. 44 А и Б соответственно.

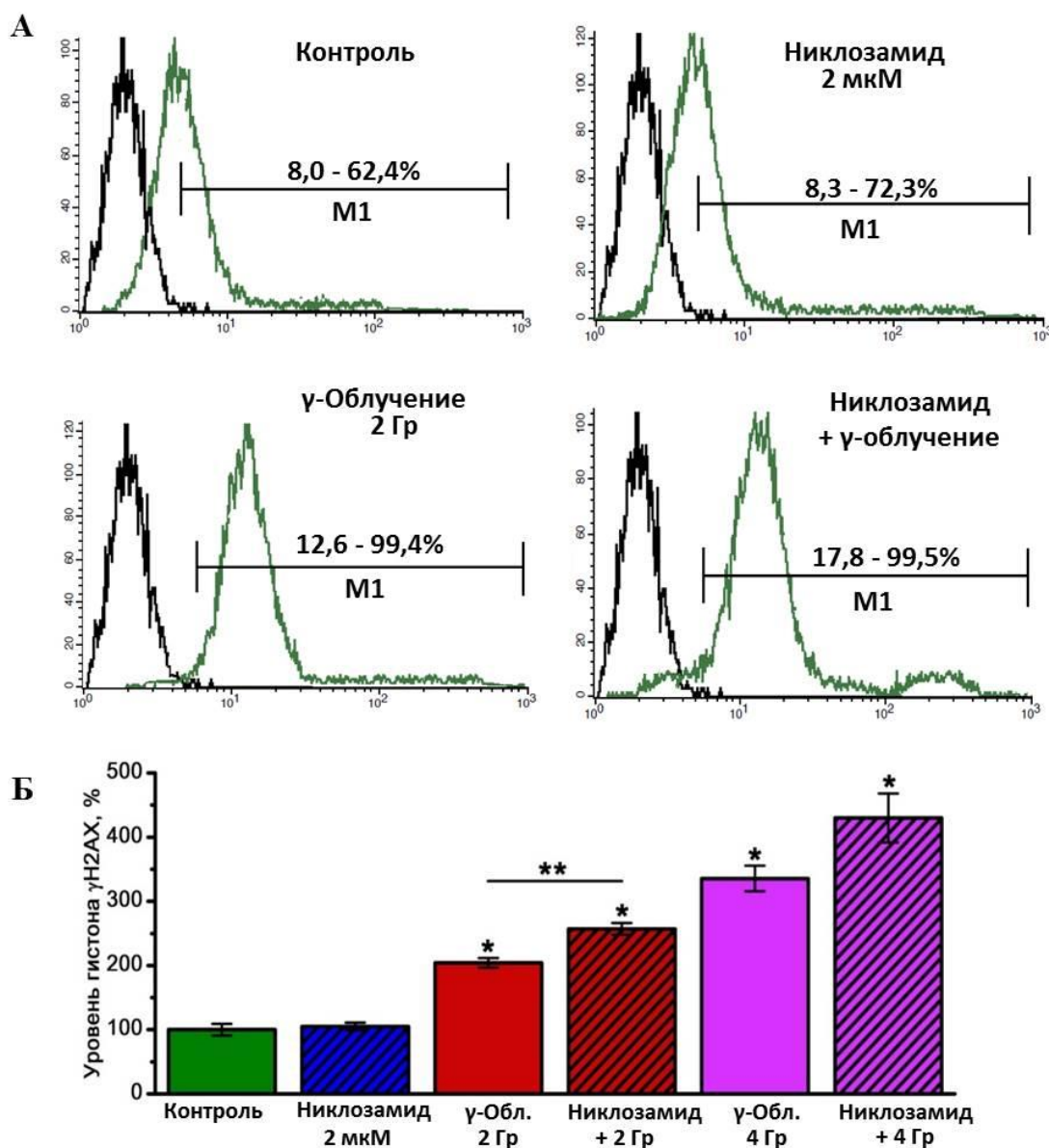


Рисунок 44 – Гистограммы, демонстрирующие определение ДР ДНК по содержанию гистона γ H2AX с помощью проточной цитометрии через 1 ч после γ -облучения в дозе 2Гр (А) и влияние излучения и никлозамида на уровень ДР ДНК (Б) в клетках 3D-культуры.

Цифрами на поле рис. А здесь и на рис.45 указаны значения средней интенсивности флуоресценции (в контроле – $7,9 \pm 0,4$ усл. ед.), и доля окрашенных антителами к белку γ H2AX клеток в процентах.

Как показано на рис. 44, культивирование клеток маммосфер линии MCF-7 с никлозамидом в течение 1 ч не изменяло уровень экспрессии белка γ H2AX в этих клетках. Действие γ -излучения в дозах 2 и 4 Гр приводило к его возрастанию до 200 и 340% по сравнению с контролем, а действие излучения в этих дозах после предварительного культивирования клеток с никлозамидом повышало уровень белка γ H2AX до 250 и 440% соответственно.

Представленные результаты позволяют заключить, что никлозамид значительно повышал уровень радиационно-индуцированных ДР ДНК, образующихся через 1 ч после облучения. Как правило, восстановление повреждений ДНК, вызванных редкоионизирующим излучением в исследуемых нами дозах, завершается через 24 ч после воздействия. В связи с этим было изучено действие никлозамида не только на образование ДР ДНК, но и на уровень остаточных повреждений, регистрируемых через 24 ч после облучения. Полученные результаты представлены на рис. 45 А и Б.

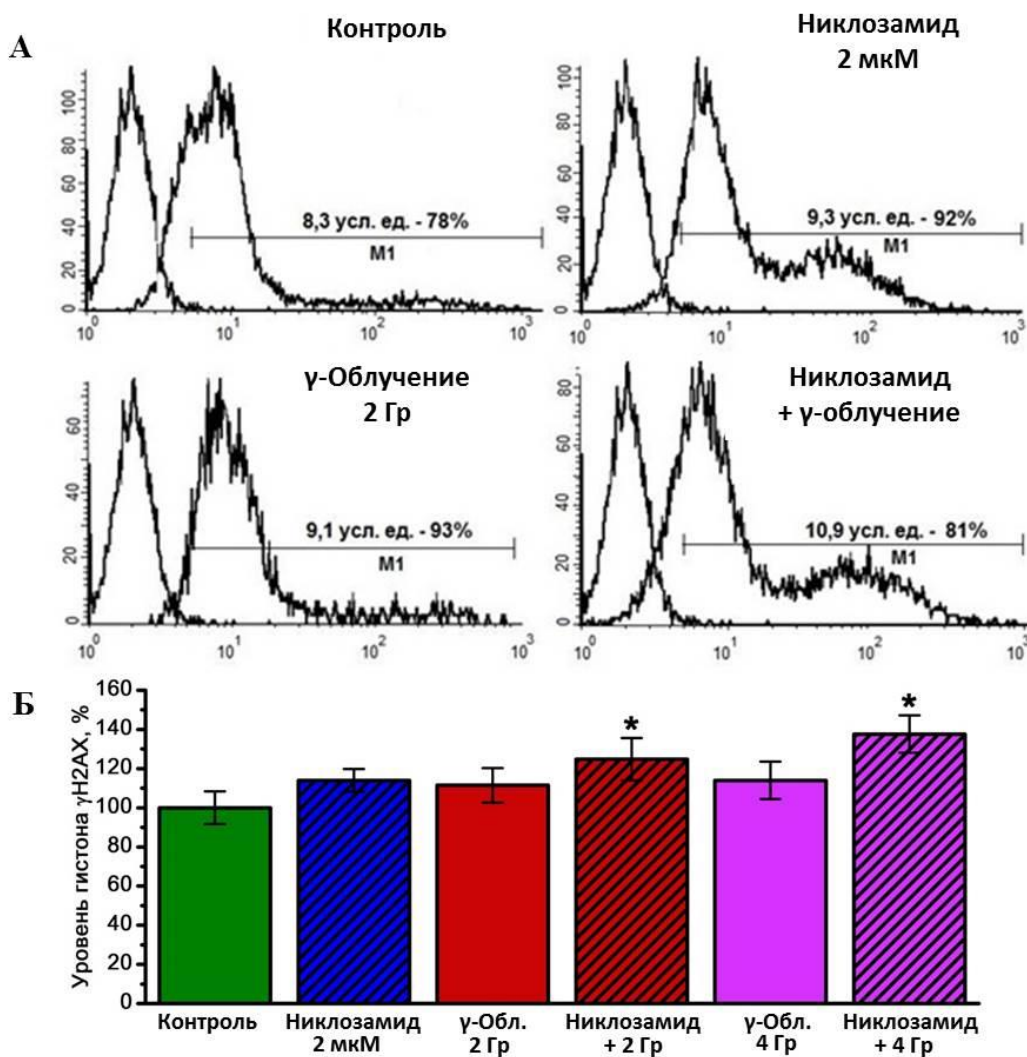


Рисунок 45 – Гистограммы, демонстрирующие определение уровня ДР ДНК через 24 ч после радиационного воздействия (А) и влияние никлозамида на уровень остаточных радиационно-индуцированных ДР ДНК (Б) в клетках 3D-культуры. Значения цифр на поле рис. А приведены в подписи к рис. 44. За 100% принята средняя интенсивность флуоресценции контрольных клеток, окрашенных антителами к белку γH2AX, равная $7,9 \pm 0,4$ усл. ед.

Ни препарат, ни облучение в обеих исследованных дозах не влияли на содержание остаточных ДР ДНК, определяемых по уровню γH2AX через 24 ч после радиационного воздействия относительно значения этого показателя в контроле, что свидетельствует о

способности клеток 3D-культуры полностью репарировать повреждения ДНК, индуцированные этими повреждающими факторами к указанному времени. Тогда как после γ -облучения в присутствии никлозамида уровень ДР ДНК значительно превышал контрольные значения, что позволяет констатировать неполное восстановление повреждений этом случае.

Представленные выше данные (рис. 44 и 45) хорошо согласуются с результатами работы [259], свидетельствующими об увеличении под влиянием никлозамида ДР ДНК в опухолевых клетках через 1 и 12 ч после γ -облучения в дозе 6 Гр, по сравнению с действием препарата и облучения по отдельности. Выше мы уже отмечали, что радиосенсибилизирующий эффект никлозамида может быть связан с нарушением функций митохондрий и, как следствие, со снижением содержания АТФ в клетках.

Кроме того показано (рис. 45А), что при культивировании необлученных клеток маммосфер с никлозамидом в указанной концентрации в течение 24 ч регистрируется появление субпопуляции клеток с повышенным уровнем гистона γ H2АХ, что может быть следствием совместного длительного действия сниженной концентрации АТФ и повышенного уровня АФК, индуцированных никлозамидом.

Резюмируя полученные результаты можно заключить, что способность никлозамида повышать чувствительность клеток 3D-культуры линии MCF-7 с высоким содержанием ОСК, основана на снижении уровня самообновления ОСК, ингибировании активированного после облучения пути Wnt, увеличении образования ДР ДНК и ингибированием их репарации при совместном действии этого препарата и облучения. Учитывая хорошую переносимость высоких доз никлозамида как при пероральном, так и при внутривенном введении препарата крысам [284], можно полагать возможность его использования в дозах, достаточных для противоопухолевой терапии.

3.4.4. Противодиабетический препарат метформин

Для изучения возможности использования метформина в целях повышения чувствительности ОСК РМЖ к действию ИИ на первом этапе работы был определен диапазон субтоксических концентраций этого препарата для выбора концентрации метформина при проведении дальнейших исследований. Действие препарата оценивали по изменению количества выживших клеток 3D-культуры линии MCF-7 при их культивировании в присутствии этого препарата в разных концентрациях в течение 24 ч, последующем его удалении, промывании клеток культуральной средой и дальнейшем культивировании в течение 5 сут.

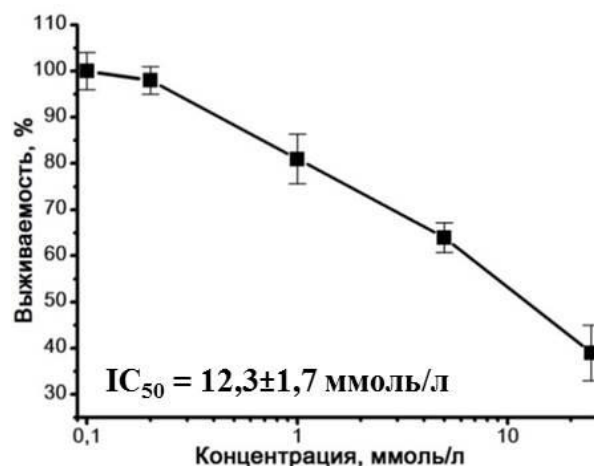


Рисунок 46 – Зависимость выживаемости клеток 3D-культуры линии MCF-7 от концентрации метформина

Как показано на рис. 46, в выбранных условиях эксперимента препарат проявлял низкую токсичность – значение IC_{50} было равно $12,3 \pm 1,7$ ммоль/л. Для дальнейшего исследования радиосенсибилизирующего действия метформина была выбрана концентрация 0,25 ммоль/л, при которой уменьшение количества клеток 3D-культуры не превышало 5%.

Радиосенсибилизирующий эффект метформина оценивали по выживаемости клеток 3D-культуры через 6 суток после воздействия в выбранных условиях как при действии гамма-квантов, так и при облучении нейтронами (рис. 47). Препарат вносили к клеткам за 1 ч до облучения, а через сутки клетки отмывали от препарата и продолжали культивирование еще 5 сут.

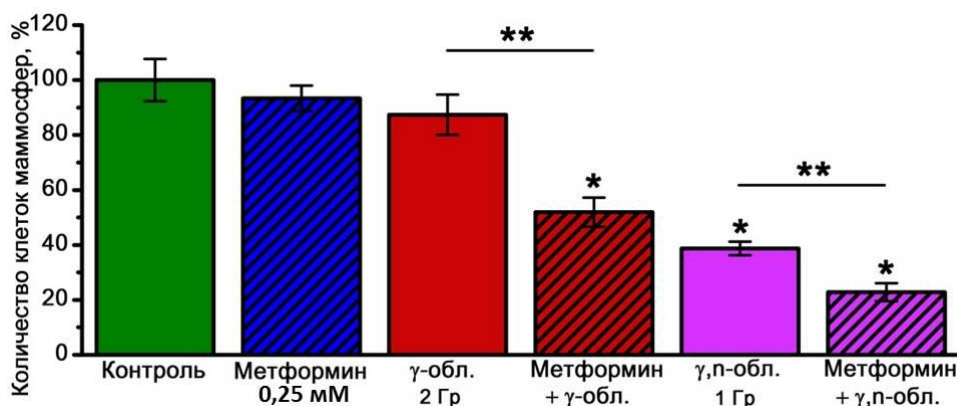


Рисунок 47 – Сравнение эффективности радиосенсибилизирующего действия метформина при γ -облучении и облучении клеток 3D-культуры линии MCF-7 нейтронами при оценке выживаемости клеток по их количеству. В контрольных культурах, количество клеток, принятое за 100%, составило 110 ± 9 тыс. клеток.

В результате анализа влияния метформина в выбранной концентрации при его сохранении в культуральной среде в течение 24 ч не обнаружено изменения количества клеток 3D-культуры через 6 суток культивирования (рис. 47). Действие γ -излучения

вызывало лишь статистически мало значимое снижение количества клеток до $87,4 \pm 7,3\%$, в то время как облучение нейтронами снижало этот показатель до $38,7 \pm 2,5\%$. Использование метформина способствовало более глубокому снижению выживаемости клеток после действия обоих типов ИИ: до $51,9 \pm 5,3\%$ при гамма-облучении и до $22,8 \pm 3,3\%$ при облучении нейтронами.

Влияние метформина на чувствительность ОСК линии MCF-7 к действию γ -излучения анализировали при определении относительного и абсолютного содержания ОСК. Примеры гистограмм, полученных при количественном анализе относительного содержания ОСК в экспериментах по исследованию влияния метформина на чувствительность клеток к облучению, представлены на рис. 48, а количественные данные об уровне изменения относительного содержания ОСК в облученных культурах, можно видеть на рис. 49.

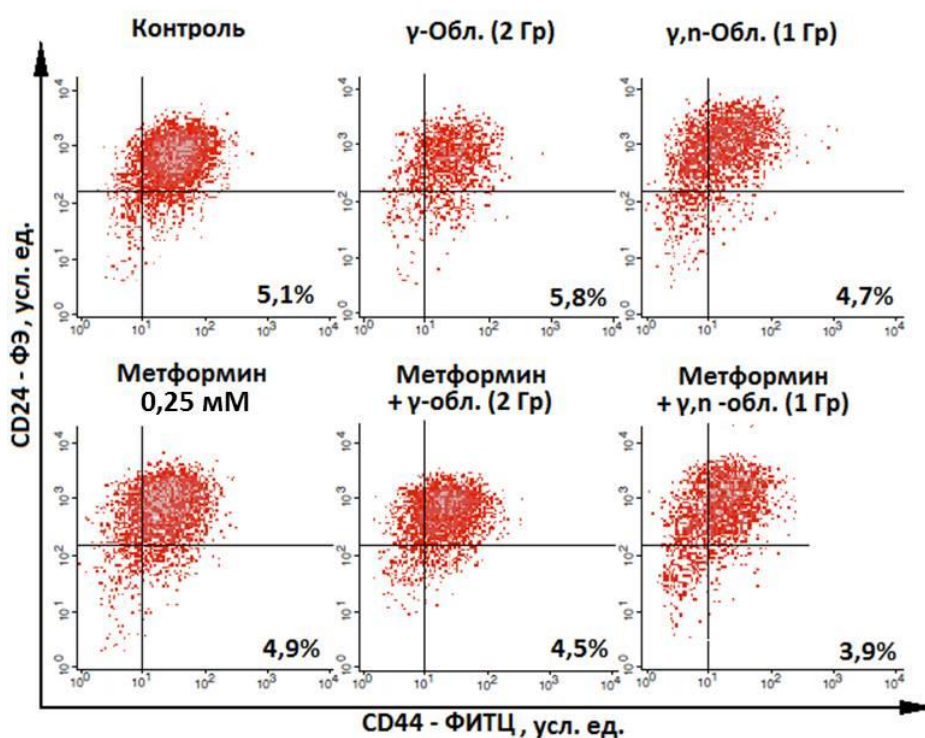


Рисунок 48 – Примеры гистограмм при анализе относительного содержания ОСК, которые идентифицировали как $CD44^+/CD24^{-/low}$ клетки, в 3D-культурах линии MCF-7 при анализе одновременного действия метформина и γ - или γ,n -излучения. Уровень относительного содержания ОСК в использованных препаратах клеток указан цифрами.

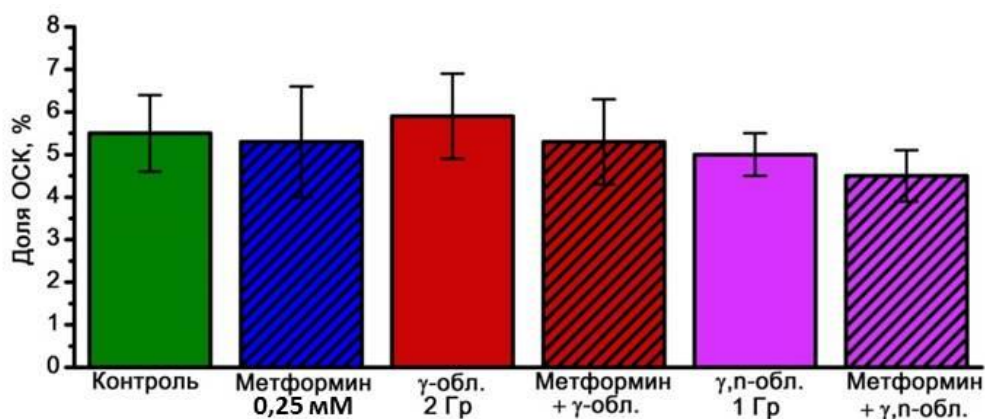


Рисунок 49 – Анализ влияния метформина на относительное содержание ОСК в 3D-культурах линии MCF-7 при действии γ - или γ ,п-излучения

Из представленных на рис. 49 данных следует, что при действии как редко-, так и плотноионизирующего излучения на фоне метформина относительное содержание ОСК в 3D-культурах линии MCF-7 не изменялось по сравнению с контрольными культурами.

Абсолютное количество ОСК в 3D-культурах рассчитывали исходя из сведений об общем количестве клеток и относительном содержании ОСК в исследованных культурах. Полученные результаты представлены на рис. 50.

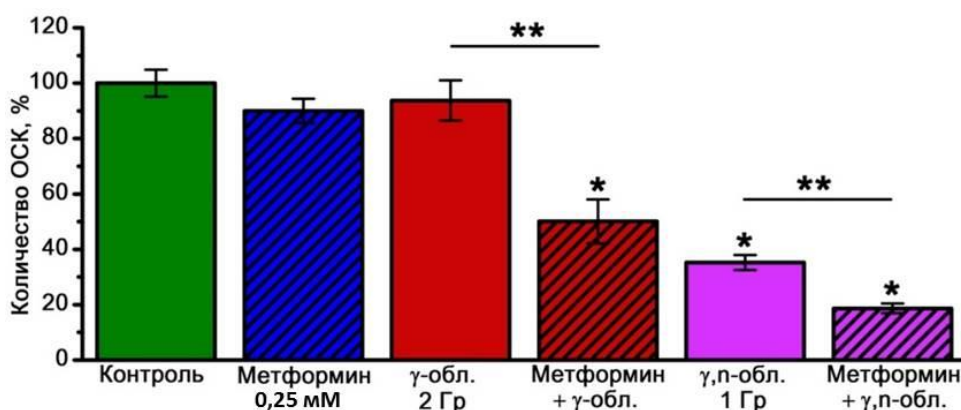


Рисунок 50 – Анализ абсолютного содержания ОСК в культуре маммосфер линии MCF-7 после совместного действия метформина и γ -облучения или облучения нейтронами. В контрольных культурах содержание ОСК было равно 6 ± 1 тыс. клеток.

Полученные результаты (рис. 50) позволяют констатировать, что абсолютное количество ОСК оставалось неизменным и при действии метформина, и при γ -облучении в дозе 2 Гр. Однако после облучения клеток нейтронами в дозе 1 Гр было обнаружено трехкратное снижение абсолютного количества ОСК – до $35,2 \pm 2,7\%$, что еще раз подтверждает высокую чувствительность ОСК к действию плотноионизирующего излучения (рис. 14 и 15). Важно подчеркнуть, что использование метформина позволяло существенно снизить не только выживаемость клеток, оцениваемую по их общему количеству в культуре (данные представлены на рис. 47), но и выживаемость ОСК (данные представлены на рис. 50), что следует из снижения абсолютного количества ОСК

– в 2 раза – и при его использовании в сочетании с γ -излучением (до $50,1 \pm 7,9\%$ от контроля), и при использовании с γ ,n-излучением (до $18,7 \pm 1,8\%$ от контроля). Представленные результаты позволяют заключить, что метформин в нетоксичной концентрации повышает чувствительность как опухолевых клеток РМЖ, так и высоко радиоустойчивых ОСК и к редко-, и к плотноионизирующему излучению.

Для подтверждения способности метформина повышать чувствительность ОСК линии MCF-7 к действию γ -излучения было проведено исследование влияния этого препарата на уровень клоногенной выживаемости клеток 3D-культуры линии MCF-7 в сочетании с действием γ -излучения при использовании описанной выше схемы эксперимента. Результаты определения клоногенной выживаемости представлены на рис. 51.

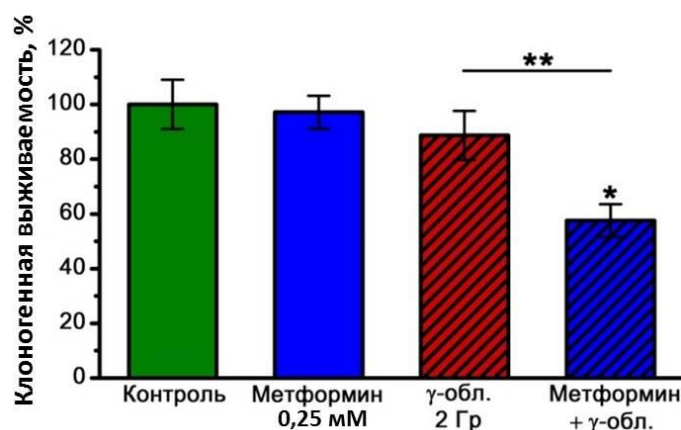


Рисунок 51 – Анализ уровня клоногенной выживаемости клеток 3D-культуры линии MCF-7 при одновременном действии метформина и γ -излучения. Для контрольных клеток эффективность клонирования была равна $12 \pm 3\%$.

Как следует из представленных на рис. 51 данных, клоногенная выживаемость клеток 3D-культуры линии MCF-7 значимо не изменялась ни при действии метформина, ни при действии γ -излучения в дозе 2 Гр. Однако совместное воздействие этих факторов приводило к значимому уменьшению количества образующихся колоний-сфероидов до $57,5\%$ по сравнению с контрольной культурой, что было на 33% ниже, чем при действии только γ -облучения. Следовательно, при облучении клеток культуры маммосфер в присутствии метформина происходило снижение клоногенной выживаемости, что свидетельствует о снижении способности ОСК к пролиферации.

Одним из механизмов радиосенсибилизирующего действия метформина может быть увеличение уровня индуцированных ИИ повреждений ДНК. Как мы уже отмечали выше, ингибируя ЦПЭ, метформин увеличивает продукцию АФК [264] и, кроме того, приводит к дефициту АТФ и угнетению многих энергозависимых процессов, к которым относятся и процессы репарации повреждений в молекуле ДНК.

Влияние метформина и γ -излучения на уровень ДР ДНК в клетках маммосфер анализировали с помощью проточной цитометрии по изменению количества белка γ H2AX спустя 1 ч после воздействия исследуемых факторов в соответствии с уже использовавшейся выше схемой добавления препарата.

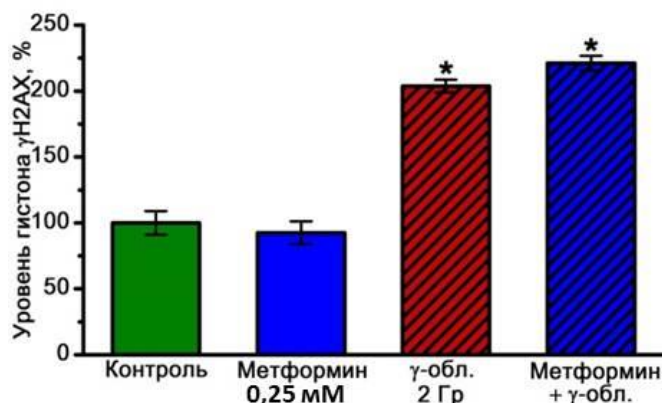


Рисунок 52 – Уровень ДР ДНК в клетках маммосфер линии MCF-7, анализируемый по содержанию гистона γ H2AX, при действии γ -излучения и метформина. Анализ проводили через 1 ч после облучения клеток в дозе 2 Гр. Среднюю интенсивность флуоресценции клеток контрольной культуры, окрашенных соответствующими антителами, равную $6,2 \pm 0,7$ усл. ед., принимали за 100%.

Из результатов, демонстрируемых на рис. 52, следует, что γ -облучение приводило к двукратному повышению уровня ДР ДНК – до $204 \pm 7\%$, совместное действие излучения и препарата – до $221 \pm 6\%$, в то время как сам метформин в использованной концентрации не изменял этот показатель.

Известно, что важный вклад в повреждающее действие ИИ вносят образующиеся при облучении клеток АФК. Устойчивость ОСК к радиационному воздействию, наряду с другими механизмами, в значительной степени определяется повышенной активностью антиоксидантных систем [158], которая может изменяться под действием метформина. Использование витального красителя С400 позволяет с помощью проточной цитометрии анализировать уровень образования АФК в клетках при разных воздействиях. С помощью этого красителя было исследовано влияние метформина, γ -облучения в дозе 2 Гр и совместного действия этих факторов на уровень АФК в клетках маммосфер через 1 ч после воздействия (рис. 53).

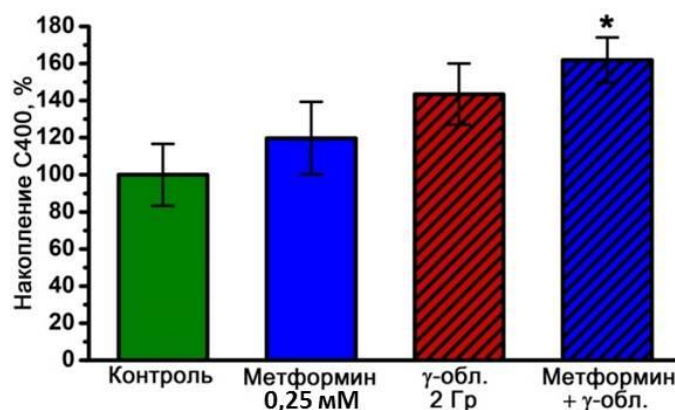


Рисунок 53 – Накопление красителя C400, отражающее уровень АФК, в клетках маммосфер линии MCF-7 через 1 ч после раздельного и совместного действия метформина и γ -излучения. За 100% принята средняя интенсивность флуоресценции контрольных клеток, окрашенных C400, равная $17,3 \pm 6,5$ усл. ед.

Как следует из рис. 53, метформин или γ -облучение значимо не влияли на уровень АФК в клетках, в то время как совместное действие этих факторов приводило к значимому увеличению содержания внутриклеточных АФК в среднем на 62% по сравнению с контролем. Совокупность представленных результатов свидетельствует о том, что одним из механизмов, лежащих в основе сенситизации ОСК к влиянию γ -излучения при использовании метформина, можно считать повышение уровня АФК именно при совместном действии этих факторов.

Согласно данным клинических исследований при длительном приеме метформина в терапевтических дозах он обнаруживается в крови на уровне около 2 мг/л (эквивалентно 0,012 ммоль/л) [285]. В наших экспериментах концентрация метформина в культуральной среде составляла 0,25 ммоль/л, то есть в 20 раз больше указанной концентрации в крови. При этом имеющиеся токсикологические данные свидетельствуют о хорошей переносимости гораздо более высоких доз метформина: даже когда его концентрация в плазме достигала 50 мг/мл, случаи, сопровождающиеся развитием тяжелых нежелательных реакций, зарегистрированы не были [285]. Результаты другого клинического исследования позволяют констатировать, что терапевтические концентрации метформина приводят к ингибированию ЦПЭ и сигнального каскада mTOR в клетках РМЖ [286]. Таким образом, изложенные выше данные цитируемых исследований дают основание считать, что кратковременное использование метформина в высоких терапевтических дозах будет обеспечивать повышение чувствительности ОСК к действию разных типов ИИ при ЛТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные представления о существовании ОСК, их свойствах и роли в развитии опухолей стимулировали проведение радиобиологических исследований, направленных на изучение чувствительности этих клеток к действию ИИ. Широкое исследование свойств ОСК сдерживалось их низким содержанием в культивируемых линиях опухолевых клеток, и стало возможным после того, как G. Dontu и соавт. был разработан метод культивирования нормальных СК молочной железы человека в виде сфероидов-маммосфер в бессывороточной среде, содержащей факторы роста EGF и FGF [7], а D. Ponti и соавт. [8] адаптировали его для выделения и культивирования ОСК из фрагментов опухолей молочной железы. Они показали, что клетки маммосфер, способные инициировать опухоли при трансплантации мышам, имеют фенотип $CD44^{+}/CD24^{-/low}$, соответствующий, как было показано ранее M. Al-Hajj и соавт. [6], ОСК молочной железы, а их содержание в культуре при культивировании в виде маммосфер возрастает в 10 раз по сравнению с исходной 2D-культурой [8]. Полученные нами данные (см. табл. 9), полностью согласуются с результатами, представленными в цитируемых работах.

Показано, что клетки линии MCF-7, культивируемые в виде 2D- и 3D-культуры имеют различную радиочувствительность при действии редкоионизирующего излучения. Сравнительный анализ данных, полученных при оценке выживаемости по количеству клеток и клоногенной выживаемости, свидетельствует о существенно более высокой устойчивости клеток маммосфер в 3D-культуре к действию γ -излучения (рис. 12 и табл. 10). Эти результаты полностью соответствуют данным, полученным T. M. Phillips и соавт., при анализе выживаемости клеток линии MCF-7, культивируемых в виде 2D-культуры и культуры маммосфер. Эти авторы показали, что клетки маммосфер обладают более высокой радиоустойчивостью, чем клетки 2D-культуры, и что ОСК характеризуются более высокой устойчивостью к действию ИИ. Повышение радиоустойчивости клеток, культивируемых в виде маммосфер, авторы объясняли действием добавляемого в культуральную среду EGF [9]. Однако радиобиологические параметры D_0 и D_q для клеток 2D- и 3D-культур авторы не определяли.

В нашей работе для оценки уровня пострadiaционной выживаемости клеток при оценке показателей D_0 и D_q использованы 2 метода: анализ клоногенной выживаемости и подсчет количества клеток. Мы показали, что величина D_0 для клеток маммосфер, равная $4,6 \pm 1,1$ Гр при оценке по клоногенной выживаемости, превышает этот параметр для клеток 2D-культуры в 5 раз.

Значение D_0 для клеток маммосфер, оцениваемое по количеству клеток, равное $2,2 \pm 0,3$ Гр, превышало значение D_0 для клеток 2D-культуры в 1,5 раза (рис. 12, табл. 10).

Значение D_q для клеток маммосфер также превышало этот показатель для клеток 2D-культуры при анализе по клоногенной выживаемости и количеству клеток в 1,4 и 2,2 раза соответственно, хотя разница не была статистически значимой (табл. 10).

Более высокая устойчивость клеток маммосфер, оцениваемая по этим показателям, чем клеток 2D-культуры, коррелировала с их более высокой устойчивостью к ингибированию прохождения клеточного цикла и более высокой устойчивостью к апоптозу при γ -облучении (табл. 12 и 13).

Аналогичные данные были получены при сравнении значений D_0 и D_q для клеток сфероидов и клеток 2D-культур двух линий клеток рака пищевода человека [287]. Значение D_0 для клеток линии KYSE150, культивируемых в виде сфероидов, и исходной 2D-культуры, составило $3,09 \pm 0,14$ и $1,98 \pm 0,2$ ($p < 0,05$) соответственно, а для клеток линии TE1 – $3,03 \pm 0,12$ и $1,84 \pm 0,10$ ($p < 0,05$) соответственно. Значение D_q для клеток линии KYSE150, культивируемых в виде сфероидов и исходной 2D-культуры, составило $2,52 \pm 0,26$ и $1,89 \pm 0,17$ соответственно, а для клеток линии TE1 и исходных клеток D_q составило $3,11 \pm 0,15$ и $2,54 \pm 0,17$ соответственно ($p < 0,05$). Таким образом, радиоустойчивость клеток рака пищевода, оцениваемая по величине D_0 , при культивировании в виде сфероидов в 1,6 раз превышает радиоустойчивость исходных 2D-клеток. Доля ОСК с фенотипом CD44/CD271 в этих линиях возрастала в 37 (линия KYSE150) и 15 (линия TE1) раз при культивировании в виде сфероидов и увеличивалась после облучения в дозах 4 и 8 Гр.

Следует отметить, что культивирование клеток в виде маммосфер сопровождается также повышением устойчивости к действию химиотерапевтических препаратов [288].

Таким образом, культивирование опухолевых клеток различных линий в виде сфероидов приводит к повышению радиоустойчивости клеток и позволяет увеличить содержание клеток с фенотипом ОСК в культуре, что широко используется в настоящее время для исследования ОСК разных типов рака.

Относительное количество ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер, которое определяли как долю клеток с фенотипом $CD44^+/CD24^{-/low}$, после γ -облучения возрастало с увеличением дозы и для 2D-культуры было статистически значимым, начиная с дозы 4 Гр, а после облучения в дозе 8 Гр доля ОСК в 8 раз превышала долю ОСК в контрольных клетках (рис. 13А). Пострадиационное увеличение относительного содержания ОСК в 3D-культуре было статистически значимым только после облучения в дозе 8 Гр. Регистрируемое увеличение составило 160% относительно контроля (рис. 13Б). Эти результаты свидетельствуют о более высокой устойчивости ОСК к действию γ -

излучения, чем всех клеток 2D-культуры, в то время как для культуры маммосфер эта закономерность была значительно менее выражена (рис. 13 А и Б).

Аналогичные данные описаны для культур разных линий опухолевых клеток, включая цитированные выше работы Т. М. Phillips и соавт. для клеток РМЖ линии MCF-7 и J. L. Wang и соавт. для клеток рака пищевода линии KYSE150 и TE1, а также для клеток рака шейки матки линии HeLa и РМЖ линии MCF-7, представленные в работе [289]. Близкие по смыслу результаты были получены О. Н. Мачук и соавт. [14] при сравнении радиочувствительности ОСК меланомы мыши линии B16, которые выделяли при сортировке клеток с помощью проточной цитофлуориметрии как популяцию SP. При анализе дозовой зависимости выживаемости клеток после γ -облучения (^{60}Co) авторами были обнаружены значимые различия величины D_0 , которая составила $2,3 \pm 0,3$ Гр для ОСК (клеток SP) и $1,4 \pm 0,2$ Гр для остальных клеток культуры ($p=0,047$). Таким образом, авторы также показали, что устойчивость ОСК меланомы мыши к действию γ -излучения в 2D-культуре выше, чем устойчивость неОСК [14].

Используя данные о доле ОСК в контрольных и облученных 2D-культурах и культурах маммосфер и об общем количестве клеток в культурах, рассчитывали абсолютное количество ОСК, которое представляли в относительных единицах по отношению к контролю. Полученные результаты зависимости абсолютного количества ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер от дозы γ -облучения, представленные на рис. 14 и в табл. 11, позволили заключить, что радиочувствительность ОСК в 2D-культуре и в культуре маммосфер, оцениваемая по величине D_0 , и их способность к репарации сублетальных повреждений, оцениваемая по величине D_q , одинакова и не зависит от способа культивирования клеток.

В этих экспериментах для оценки выживаемости ОСК и суммарной популяции клеток 2D- и 3D-культуры был выбран метод прямого подсчета количества клеток с использованием их фенотипирования, вместо определения клоногенной выживаемости ОСК и неОСК после их физического разделения с помощью сортировки с использованием проточной цитометрии или других методов. Этот выбор обусловлен тем, что сразу после внесения отсортированных ОСК в культуру начинается дифференцировка части ОСК в неОСК с быстрым восстановлением исходного состава субпопуляций культуры, что может привести к временному изменению их радиочувствительности.

Вторым использованным методом оценки изменения выживаемости клеток после различных воздействий был метод анализа клоногенной выживаемости, который отражает радиочувствительность ОСК в культуре. В специальной серии экспериментов мы предварительно показали высокую степень корреляции результатов, получаемых при

использовании обоих методов при облучении клеток в широком диапазоне доз и γ -, и γ ,п-излучения (рис. 19).

Необходимо отметить, что при культивировании клеток в виде 2D-культуры при оценке выживаемости по количеству клеток величина D_0 для ОСК составила $3,0 \pm 0,5$ Гр (табл. 11) и была значимо выше, чем значение D_0 для клеток всей 2D-культуры, равное $1,5 \pm 0,2$ Гр (табл. 10). В тоже время для ОСК культуры маммосфер величина D_0 составила $2,5 \pm 0,3$ Гр (табл. 11), и она не отличалась от величины D_0 , равной $2,2 \pm 0,3$ (табл. 10), для клеток всей культуры и от величины D_0 для ОСК 2D-культуры, равной $3,0 \pm 0,5$ Гр (табл. 11). Таким образом, радиоустойчивость ОСК в 2D-культуре и культуре маммосфер линии MCF-7 одинакова. Можно полагать, что более высокая радиоустойчивость клеток культуры маммосфер определяется более высоким содержанием радиорезистентных ОСК в этой культуре, а высокое содержание ОСК в опухолях может свидетельствовать не только о высокой радиоустойчивости таких опухолей [290, 291, 292], но и их устойчивости к химиотерапии [11].

Неизвестно, как долго после начала дифференцировки и пролиферации коммитированных клеток после асимметричного деления ОСК сохраняется высокая радиоустойчивость у клеток-потомков радиорезистентных ОСК. Возможно, что в культуре маммосфер при асимметричном делении первые потомки ОСК, коммитированные к дифференцировке, уже теряют фенотип $CD44^+/CD24^{low}$, но еще сохраняют высокую радиоустойчивость. Количество таких радиоустойчивых потомков в культуре будет тем выше, чем выше исходное содержание ОСК. Это предположение позволяет объяснить более высокую радиоустойчивость опухолевых клеток разных линий, культивируемых в виде сфероидов, по сравнению с клетками 2D-культуры при одинаковой генетически обусловленной радиоустойчивости ОСК в этих культурах. На рис. 54 приведена схема образования культуры клеток, высокая радиоустойчивость которой формируется в результате накопления резистентных ранних клеток-потомков ОСК благодаря исходно высокому содержанию ОСК в культуре.

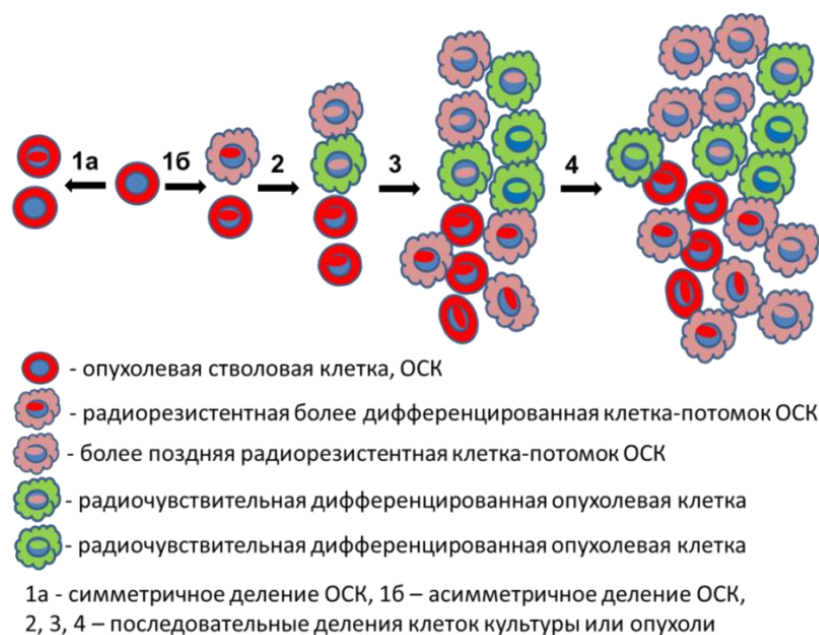


Рисунок 54 – Схема формирования культуры опухолевых клеток, радиоустойчивость которой обусловлена накоплением радиорезистентных ранних клеток-потомков ОСК благодаря исходно высокому содержанию ОСК в культуре. Цвет метки в ядре клетки-потомка соответствует цвету цитоплазмы его клетки-предшественника.

Изучение перспективности элиминации ОСК при использовании нейтронного излучения показало его высокую эффективность – значение D_0 для реакторного γ, n -излучения составило $0,84 \pm 0,12$ Гр (табл. 15) и было в 3 раза меньше, чем D_0 при γ -облучении клеток. Показано также, что облучение нейтронами практически полностью исключало способность клеток к репарации сублетальных повреждений: значение D_q для ОСК в культуре маммосфер составило $0,04 \pm 0,01$ Гр (табл. 15). Одновременно в этих условиях показан более низкий уровень репарации ДР ДНК (рис. 21) и возрастание уровня гибели клеток по механизму апоптоза в первые сутки после облучения нейтронами (табл. 16), а также снижение пролиферативной активности клеток маммосфер в отдаленный период после облучения нейтронами (рис. 22).

Величина ОБЭ γ, n -излучения для ОСК, снижалась с 33 до 6 при увеличении дозы облучения от 1,5 до 6 Гр (рис. 18Б). Полученные результаты соответствуют данным ряда опубликованных исследований, свидетельствующих о более высокой эффективности элиминации ОСК при действии нейтронов и других типов плотноионизирующего излучения [14, 16, 293, 294]. Однако в настоящее время более доступно и наиболее широко используется в ЛТ редкоионизирующее излучение. В связи с этим актуальной проблемой является поиск эффективных и малотоксичных радиосенсибилизаторов, которые были бы способны повышать радиочувствительность ОСК.

В этой области идут активные исследования, касающиеся синтеза и изучения биологической активности новых препаратов, обладающих активностью ингибиторов сигнальных путей, стимулирующих пролиферацию и повышение выживаемости ОСК. Для изучения эффективности некоторых из таких препаратов для лечения рака в настоящее время начаты клинические исследования [97, 100]. В тоже время, как показано в обзоре литературы, у нескольких широко используемых в клинической практике лекарственных препаратов, наряду с известной фармакологической активностью, обнаружена способность ингибировать сигнальные пути ОСК, что может привести к повышению радиочувствительности ОСК. В качестве таких препаратов мы выбрали два противоопухолевых препарата – доцетаксел и дазатиниб, противогельминтный препарат никлозамид и противодиабетический препарат метформин.

Механизм противоопухолевой активности доцетаксела хорошо изучен и связан в первую очередь с нарушением образования веретена деления в результате повреждения процесса формирования микротрубочек, что приводит к накоплению клеток в наиболее чувствительной к облучению фазе клеточного цикла G_2 . Такое дозозависимое накопление клеток 3D-культуры линии MCF-7 в фазе G_2 при действии доцетаксела показано в выбранных нами условиях (рис. 24, табл. 17) и может быть непосредственной причиной повышения радиочувствительности клеток маммосфер при использовании этого препарата. Кроме того, в результате нарушения реорганизации микротрубочек под действием доцетаксела также происходит дефосфорилирование рецептора EGF и ингибирование пролиферации ОСК.

Известно также, что доцетаксел снижает активность сигнального каскада PI3K/AKT, который участвует в поддержании свойств ОСК. Мы показали, что длительное культивирование клеток маммосфер в присутствии доцетаксела приводит к значимому уменьшению доли ОСК в культуре (рис. 28Б), выраженность которого возрастала с увеличением дозы препарата, что соответствовало наблюдаемому снижению клоногенной выживаемости клеток маммосфер (рис. 30).

В рамках исследования радиосенсибилизирующего действия доцетаксела в субтоксической концентрации 3 нмоль/л и в концентрации 10 нмоль/л, приводящей к снижению выживаемости клеток на 40%, анализировали выживаемость клеток маммосфер по изменению их общего количества (рис. 31) и клоногенной выживаемости клеток (рис. 32). Действие γ -излучения в дозе 2 Гр существенно не влияло на эти показатели, тогда как при совместном действии облучения и доцетаксела в указанных приводило к снижению выживаемости клеток до 50% и 40% при оценке по количеству клеток (рис. 31), и до 30% и 20% при оценке по клоногенной выживаемости (рис. 32) соответственно.

Представленные данные свидетельствуют о высокой активности доцетаксела в отношении ОСК и о его высокой эффективности в качестве радиосенсибилизатора радиорезистентных клеток маммосфер в достаточно низких концентрациях, соответствующих тем, которые при фармакокинетических исследованиях регистрируются в крови пациентов, получающих этот препарат при терапии опухолей.

При исследовании влияния дазатиниба на чувствительность клеток маммосфер к действию ИИ также обнаружено его радиосенсибилизирующее действие. Так, внесение этого препарата в культуру маммосфер перед облучением позволяло в 2 раза повысить чувствительность этих клеток к действию γ -излучения (рис. 35). Близкие результаты получены и при анализе действия дазатиниба на чувствительность клеток маммосфер, оцениваемую по их клоногенной выживаемости (рис. 36). Используемая в этом исследовании концентрация дазатиниба 2,5 мкмоль/л превышает максимальную концентрацию в плазме, обнаруживаемую после приема препарата в терапевтической дозе 100 мг. Однако следует отметить, что изучение возможности применения более высоких доз дазатиниба для лечения солидных опухолей, показало хорошую переносимость этого препарата в более высоких дозах, что позволяет ожидать перспективность использования этого препарата при комбинированной химиолучевой терапии для повышения эффективности облучения в отношении опухолевых клеток.

Исследование противоопухолевой активности противогельминтного препарата никлозамида продолжает привлекать внимание исследователей в связи с его низкой токсичностью и эффективностью в отношении широкого спектра не только опухолевых клеток, но и ОСК [295]. Более того, показано его радиосенсибилизирующее действие в отношении опухолевых клеток рака легкого, основанное на способности снижать экспрессию факторов HIF-1 α и VEGF [296]. В нашем исследовании показана радиосенсибилизирующая активность никлозамида в отношении клеток маммосфер при оценке их выживаемости как по количеству клеток (рис. 38), так и по клоногенной выживаемости (рис. 42). Действие только никлозамида на клетки маммосфер в этих условиях не приводило к статистически значимым изменениям в их выживаемости (рис. 38 и 42). При облучении клеток маммосфер в дозе 4 Гр выживаемость клеток снижалась на 40% и предварительное воздействие никлозамида уже не усиливало эффект облучения.

При изучении влияния никлозамида на ОСК 3D-культуры клеток линии MCF-7 мы показали, что использование этого препарата позволяло снизить содержание ОСК в культуре на 15%, а его использование перед облучением в дозах 2 Гр и 4 Гр снижало содержание этой популяции клеток на 40% и 25% соответственно (рис. 41). Полученные

результаты позволяют сделать заключение о том, что никлозамид избирательно действует на ОСК. Для подтверждения этого предположения было изучено влияние облучения и никлозамида на уровень экспрессии белков, определяющих передачу сигнала в системе Wnt. В этой системе такими посредниками являются белки β -катенин и Dvl-2. Мы обнаружили активацию сигнальной системы Wnt при действии ИИ, о чем свидетельствовало повышение уровня белка Dvl-2 в ответ на облучение. Культивирование клеток перед γ -облучением в присутствии никлозамида приводило к снижению уровня обоих анализируемых белков пути Wnt: β -катенина – на 23%, Dvl-2 – на 30% относительно уровней, обнаруженных в клетках, облученных без препарата (рис. 43). Представленные результаты свидетельствуют о возможности подавления радиационно-индуцируемой активации пути Wnt в клетках маммосфер с помощью никлозамида.

В результате анализа уровня ДР ДНК при действии никлозамида и облучения было обнаружено, что обработка клеток маммосфер перед облучением никлозамидом приводит к повышению уровня образования ДР ДНК через 1 час после действия ИИ (рис. 44) и ингибированию репарации этих повреждений (рис. 45), о чем свидетельствует присутствие «остаточных» ДР ДНК спустя 24 ч после γ -облучения клеток.

Ранее установлено, что действие никлозамида сопровождается увеличением уровня АФК, в том числе супероксидного аниона, в опухолевых клетках [297]. Известно, что АФК модифицируют радиационно-индуцированные ДР ДНК, приводя к образованию более трудно репарируемых повреждений. Как показано нами (рис. 45А) через 24 ч никлозамид приводил к появлению чрезвычайно высокого уровня γ H2AX в небольшой части клеток маммосфер (при этом общий уровень γ H2AX в клетках маммосфер значимо не отличается от контроля). Вместе с тем в клетках, обработанных никлозамидом, через 24 ч после радиационного воздействия выделяется субпопуляция клеток с более высоким содержанием повреждений ДНК, о чем свидетельствует значимо более высокое, чем в контроле, содержание гистона γ H2AX. В случае облучения без препарата общий уровень γ H2AX не отличается от контроля. При действии никлозамида в течение 1 ч на клетки маммосфер такого повреждения («второго» пика) не наблюдали. Эти данные позволяют считать, что увеличение ДР ДНК (средняя интенсивность флуоресценции γ H2AX⁺-клеток) при совместном действии облучения и никлозамида спустя 24 ч может быть обусловлено действием АФК, образующихся под влиянием никлозамида. Возможно, никлозамид в этой ситуации модифицирует ДР ДНК, образующиеся в процессе репликации.

Хорошая переносимость высоких доз никлозамида и широкие границы безопасного диапазона концентраций этого препарата свидетельствует о возможности его использования и в более высоких дозах. Ограничением в применении никлозамида в

качестве радиосенсибилизатора при ЛТ может быть его низкая биодоступность [298]. В то же время разные авторы отмечают появление новых данных о создании производных никлозамида с более высокой биодоступностью и противоопухолевой активностью [299, 300, 301, 302], что позволяет надеяться на создание на основе никлозамида нового противоопухолевого препарата и нетоксичного радиосенсибилизатора, эффективного в отношении ОСК.

Противодиабетический препарат метформин привлекает внимание специалистов в области противоопухолевых препаратов и радиобиологов, занимающихся экспериментальной лучевой терапией, начиная с 2000-х годов, когда в ретроспективных исследованиях было обнаружено, что у принимающих этот препарат пациентов с диабетом 2 типа снижается риск развития рака [303]. Противоопухолевая (в концентрациях 2,5–50 мкмоль/л на клеточных линиях) и радиосенсибилизирующая (2,5–25 мкмоль/л) активность метформина была показана в отношении клеток мелкоклеточного рака легкого в экспериментах *in vitro* с использованием клеточных линий и *in vivo* в экспериментах на мышах с использованием модели перевиваемых опухолей при потреблении метформина с водой в дозе 300 мг/кг и облучении опухоли в дозе 10 Гр [261]. Близкие данные представлены в работе [304]. Авторы показали, что эта активность метформина обусловлена активацией АМР-киназы под действием метформина и ингибированием mTOR. Более того, в этой работе также показано снижение содержания ОСК через 48 ч культивирования в присутствии метформина в культуре клеток РМЖ человека линии MCF-7 (при концентрации метформина 0,5–10 ммоль/л) и линии FSaII (при концентрации метформина 0,1–10 ммоль/л). Однако эти концентрации превышают те, которые обнаруживаются в крови при использовании этого препарата в терапии.

Мы показали, что предварительное культивирование клеток маммосфер в присутствии значительно более низкой концентрации метформина – 0,25 ммоль/л – снижает выживаемость клеток маммосфер линии MCF-7 и ОСК маммосфер при действии γ -излучения в дозе 2 Гр на 35–40% при определении клоногенной выживаемости и количества клеток соответственно (рис. 47 и 51). Более того, в этих условиях при облучении в дозе 2 Гр после предварительного культивирования в присутствии метформина обнаружено значительное снижение содержания ОСК в культуре на (рис. 50).

Важно было также оценить возможность повышения чувствительности клеток маммосфер и ОСК в их составе при облучении нейтронами. В соответствующих экспериментах мы показали, что при облучении клеток маммосфер нейтронами в дозе 1 Гр их выживаемость составляет 40% и снижается до 20% при облучении клеток после культивирования с метформином (рис. 47). Выживаемость ОСК снижалась до 32% при

облучении нейтронами и до 18% при облучении клеток после культивирования с метформином (рис. 50). Эти данные свидетельствуют о возможности повышения эффективности нейтронной терапии при использовании метформина в качестве нетоксичного радиосенсибилизатора.

Таким образом, исследованные противоопухолевые препараты доцетаксел и дазатиниб и противодиабетический препарат метформин, способные, наряду со своей терапевтической активностью, ингибировать сигнальные пути опухолевых клеток и ОСК, могут быть использованы в комбинированной ЛТ для повышения чувствительности резистентных опухолевых клеток, и, в первую очередь, резистентных ОСК, к действию ИИ. Использование для этих целей никлозамида, для которого в экспериментах *in vitro* показана высокая эффективность в качестве радиосенсибилизатора опухолевых и ОСК, ограничено его низкой биодоступностью при введении экспериментальным животным и человеку. Поэтому применение препаратов с такой активностью в отношении ОСК для животных и человека станет возможным при успешной разработке малотоксичных производных никлозамида с высокой биодоступностью.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что радиочувствительность ОСК аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 одинакова при культивировании клеток в виде маммосфер и в виде 2D-культуры, несмотря на более высокую радиоустойчивость клеток маммосфер.

2. Установлены значения параметров D_0 и D_q для клеток маммосфер и ОСК линии MCF-7, которые свидетельствуют о высокой устойчивости этих клеток к действию γ -излучения и высокой чувствительности к действию γ, n -излучения.

3. Обнаружено, что высокая чувствительность клеток маммосфер к действию γ, n -излучения, в отличие от γ -излучения, определяется низкой скоростью репарации индуцированных нейтронами ДР ДНК, глубоким ингибированием пролиферации и высоким уровнем апоптоза клеток.

4. Показано, что действие γ, n -излучения на клетки маммосфер линии MCF-7 характеризуется высокой величиной ОБЭ, которая при увеличении дозы от 1 Гр до 6 Гр снижается с 31 до 5 при анализе выживаемости по количеству клеток и с 35 до 17 при анализе клоногенной выживаемости.

5. При использовании противоопухолевых препаратов доцетаксел и дазатиниб перед γ -облучением в субтоксических концентрациях обнаружено повышение радиочувствительности клеток маммосфер линии MCF-7.

6. Использование противогельминтного препарата никлозамида перед облучением позволяет повысить чувствительность клеток маммосфер и ОСК линии MCF-7 к действию γ -излучения.

7. Установлено, что противодиабетический препарат метформин эффективно повышает чувствительность ОСК и клеток маммосфер линии MCF-7 к действию как γ -, так и γ, n -излучения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода
ДР ДНК – двунитевые разрывы ДНК
ИИ – ионизирующее излучение
ЛТ – лучевая терапия
ОБЭ – относительная биологическая эффективность
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
ОМО – опухолевое микроокружение
ОСК – опухолевые стволовые клетки
РМЖ – рак молочной железы
СК – стволовые клетки
ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоцианат
ФО – фракционированное облучение
ФТ – фактор транскрипции
ФЭ – фикоэритрин
ЦПЭ – цепь переноса электронов
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
ALDH (от англ. aldehyde dehydrogenase) – альдегиддегидрогеназа
АКТ – серин-треониновая протеинкиназа, протеинкиназа В
с-KIT – трансмембранный белок из группы рецепторных тирозинкиназ
EGF (от англ. epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста
FGF (от англ. fibroblast growth factor) – фактор роста фибробластов
IC₅₀ – концентрация вещества, приводящая к снижению выживаемости клеток на 50%
ERK – киназа, индуцируемая внеклеточными сигналами
MEK – киназа митоген-активируемой протеинкиназы
mTOR – мишень рапамицина млекопитающих
NSP – клетки, не относящиеся к боковой популяции (SP)
PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа
SP (от англ. side population) – боковая популяция клеток, способных исключать витальные флуоресцентные красители
Wnt – гликопротеины семейства белков wingless-type MMTV integration site family

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стандарты лучевой терапии: научное издание / под ред. А. Д. Каприна, А. А. Костина, Е. В. Хмелевского. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 384 с.
2. Korzets Y., Levitas D., Grubstein A., Corn B. W., Amir E., Goldvaser H. Efficacy and Safety of the Addition of Internal Mammary Irradiation to Standard Adjuvant Radiation in Early-Stage Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Curr Oncol.* – 2022. – Т. 29, № 9. – С. 6657-6673.
3. Шахзадова А. О., Старинский В. В., Лисичникова И. В. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году // *Сибирский онкологический журнал.* – 2023. – Т. 22, № 5. – С. 5-13.
4. Bonnet D., Dick J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // *Nat Med.* – 1997. – Т. 3, № 7. – С. 730-7.
5. Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature.* – 2001. – Т. 414, № 6859. – С. 105-11.
6. Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J., Clarke M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – Т. 100, № 7. – С. 3983-8.
7. Dontu G., Abdallah W. M., Foley J. M., Jackson K. W., Clarke M. F., Kawamura M. J., Wicha M. S. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells // *Genes Dev.* – 2003. – Т. 17, № 10. – С. 1253-70.
8. Ponti D., Costa A., Zaffaroni N., Pratesi G., Petrangolini G., Coradini D., Pilotti S., Pierotti M. A., Daidone M. G. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties // *Cancer Res.* – 2005. – Т. 65, № 13. – С. 5506-11.
9. 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. – Т. 98, № 24. – С. 1777-85.
10. Chuthapisith S., Eremin J., El-Sheemey M., Eremin O. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells // *Surg Oncol.* – 2010. – Т. 19, № 1. – С. 27-32.
11. He L., Wick N., Germans S. K., Peng Y. The Role of Breast Cancer Stem Cells in Chemoresistance and Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer // *Cancers (Basel).* – 2021. – Т. 13, № 24.
12. Rycaj K., Tang D. G. Cancer stem cells and radioresistance // *Int J Radiat Biol.* – 2014. – Т. 90, № 8. – С. 615-21.
13. Olivares-Urbano M. A., Grinan-Lison C., Marchal J. A., Nunez M. I. CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer // *Cells.* – 2020. – Т. 9, № 7.
14. Матчук О. Н. Замулаева И. А., Селиванова Е. И., Липунов Н. М., Пронюшкина К. А., Ульяненко С. Е., Лычагин А. А., Смирнова С. Г., Орлова Н. В., Саенко А. С. Чувствительность клеток SP линии меланомы B16 к действию редко- и

плотноионизирующего излучений // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2012. – Т. 52, № 3. – С. 261-267.

15. Матчук О. Н. Якимова А. О., Сабуров В. О., Корякин С. Н., Иванов С. А., Замулаева И. А. Влияние сочетанного действия нейтронного и протонного излучений на пул стволовых клеток рака молочной железы и экспрессию генов стволовости *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 173, № 6. – С. 736-740.

16. Матчук О. Н. Селиванова Е. И., Якимова А. О., Сабуров В. О., Соловьев А. Н., Трошина М. В., Литун Е. В., Корякин С. Н., Пикалов В. А., Абрамова М. Р., Иванов С. А., Замулаева И. А. Влияние сочетанного действия ионов углерода и протонов на пул стволовых клеток рака молочной железы линии MCF-7 *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 176, № 7. – С. 95-100.

17. Zhang X., Lin S. H., Fang B., Gillin M., Mohan R., Chang J. Y. Therapy-resistant cancer stem cells have differing sensitivity to photon versus proton beam radiation // J Thorac Oncol. – 2013. – Т. 8, № 12. – С. 1484-91.

18. Li J., Goh E. L. K., He J., Li Y., Fan Z., Yu Z., Yuan P., Liu D. X. Emerging Intrinsic Therapeutic Targets for Metastatic Breast Cancer // Biology (Basel). – 2023. – Т. 12, № 5.

19. Мусабаева Л. И., Лисин В. А., Старцева Ж.А., Грибова О. В., Великая В. В., Мельников А. А. Нейтронная терапия на циклотроне U-120. К 30-летию применения нейтронной терапии – обзор результатов научных исследований // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2013. – Т. 58, № 2. – С. 53-61.

20. Лычагин А. А. Портативные нейтронные генераторы в медицине // Медицинская техника. – 2014. – Т. 1. – С. 7-10.

21. Juerß D., Zwar, M., Giesen, U. et al. Comparative study of the effects of different radiation qualities on normal human breast cells // Radiat Oncol. – 2017. – Т. 12, № 159.

22. Posypanova G. A., Ratushnyak M. G., Semochkina Y. P., Strepetov A. N. Response of murine neural stem/progenitor cells to gamma-neutron radiation // Int J Radiat Biol. – 2022. – Т. 98, № 10. – С. 1559-1570.

23. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer // Cell. – 2000. – Т. 100, № 1. – С. 57-70.

24. Michor F., Polyak K. The origins and implications of intratumor heterogeneity // Cancer Prev Res (Phila). – 2010. – Т. 3, № 11. – С. 1361-4.

25. Nowell P. C. The clonal evolution of tumor cell populations // Science. – 1976. – Т. 194, № 4260. – С. 23-8.

26. Геращенко Т. С., Денисов Е. В., Литвяков Н. В., Завьялова М. В., Вторушин С. В., Цыганов М. М., Перельмутер В. М., Чердынцева Н. В. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение // Биохимия. – 2013. – Т. 78, № 11. – С. 1531 – 1549.

27. Бросалов В. М., Судапина А. Р., Микуляк Н. И. Клональная эволюция рака молочной железы: современные перспективы давней теории // Патологическая физиология. – 2020. – Т. 2, № 84. – С. 109–119.

28. Barabe F., Kennedy J. A., Hope K. J., Dick J. E. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice // *Science*. – 2007. – T. 316, № 5824. – C. 600-4.
29. Takebe N., Ivy S. P. Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways // *Clin Cancer Res*. – 2010. – T. 16, № 12. – C. 3106-12.
30. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M. A., Dick J. E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice // *Nature*. – 1994. – T. 367, № 6464. – C. 645-8.
31. Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., Hide T., Henkelman R. M., Cusimano M. D., Dirks P. B. Identification of human brain tumour initiating cells // *Nature*. – 2004. – T. 432, № 7015. – C. 396-401.
32. Visvader J. E., Lindeman G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions // *Nat Rev Cancer*. – 2008. – T. 8, № 10. – C. 755-68.
33. Gupta P. B., Fillmore C. M., Jiang G., Shapira S. D., Tao K., Kuperwasser C., Lander E. S. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells // *Cell*. – 2011. – T. 146, № 4. – C. 633-44.
34. Vermeulen L., de Sousa e Melo F., Richel D. J., Medema J. P. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities // *Lancet Oncol*. – 2012. – T. 13, № 2. – C. e83-9.
35. Li F., Tiede B., Massague J., Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis // *Cell Res*. – 2007. – T. 17, № 1. – C. 3-14.
36. Zhang F., Chen X. P., Zhang W., Dong H. H., Xiang S., Zhang W. G., Zhang B. X. Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence // *Histopathology*. – 2008. – T. 52, № 2. – C. 224-32.
37. Calle A. S., Nair N., Oo A. K., Prieto-Vila M., Koga M., Khayrani A. C., Hussein M., Hurley L., Vaidyanath A., Seno A., Iwasaki Y., Calle M., Kasai T., Seno M. A new PDAC mouse model originated from iPSCs-converted pancreatic cancer stem cells (CSCcm) // *Am J Cancer Res*. – 2016. – T. 6, № 12. – C. 2799-2815.
38. Afify S. M., Sanchez Calle A., Hassan G., Kumon K., Nawara H. M., Zahra M. H., Mansour H. M., Khayrani A. C., Alam M. J., Du J., Seno A., Iwasaki Y., Seno M. A novel model of liver cancer stem cells developed from induced pluripotent stem cells // *Br J Cancer*. – 2020. – T. 122, № 9. – C. 1378-1390.
39. Xu N., Li X., Watanabe M., Ueki H., Hu H., Li N., Araki M., Wada K., Xu A., Liu C., Nasu Y., Huang P. Induction of cells with prostate cancer stem-like properties from mouse induced pluripotent stem cells via conditioned medium // *Am J Cancer Res*. – 2018. – T. 8, № 8. – C. 1624-1632.
40. Yan T., Mizutani A., Chen L., Takaki M., Hiramoto Y., Matsuda S., Shigehiro T., Kasai T., Kudoh T., Murakami H., Masuda J., Hendrix M. J., Strizzi L., Salomon D. S., Fu L., Seno M. Characterization of cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells transformed by tumor-derived extracellular vesicles // *J Cancer*. – 2014. – T. 5, № 7. – C. 572-84.

41. Kohler C., Nittner D., Rambow F., Radaelli E., Stanchi F., Vandamme N., Baggiolini A., Sommer L., Berx G., van den Oord J. J., Gerhardt H., Blanpain C., Marine J. C. Mouse Cutaneous Melanoma Induced by Mutant BRAF Arises from Expansion and Dedifferentiation of Mature Pigmented Melanocytes // *Cell Stem Cell*. – 2017. – T. 21, № 5. – C. 679-693 e6.
42. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2014. – T. 15, № 3. – C. 178-96.
43. Nakano M., Kikushige Y., Miyawaki K., Kunisaki Y., Mizuno S., Takenaka K., Tamura S., Okumura Y., Ito M., Ariyama H., Kusaba H., Nakamura M., Maeda T., Baba E., Akashi K. Dedifferentiation process driven by TGF-beta signaling enhances stem cell properties in human colorectal cancer // *Oncogene*. – 2019. – T. 38, № 6. – C. 780-793.
44. Mu R., Zou Y. K., Tu K., Wang D. B., Tang D., Yu Z., Zhao L. Hypoxia Promotes Pancreatic Cancer Cell Dedifferentiation to Stem-Like Cell Phenotypes With High Tumorigenic Potential by the HIF-1alpha/Notch Signaling Pathway // *Pancreas*. – 2021. – T. 50, № 5. – C. 756-765.
45. Rodrigues C. F. D., Serrano E., Patricio M. I., Val M. M., Albuquerque P., Fonseca J., Gomes C. M. F., Abrunhosa A. J., Paiva A., Carvalho L., Botelho M. F., Almeida L., Carreira I. M., Alpoim M. C. Stroma-derived IL-6, G-CSF and Activin-A mediated dedifferentiation of lung carcinoma cells into cancer stem cells // *Sci Rep*. – 2018. – T. 8, № 1. – C. 11573.
46. Sun Z., Wang L., Zhou Y., Dong L., Ma W., Lv L., Zhang J., Wang X. Glioblastoma Stem Cell-Derived Exosomes Enhance Stemness and Tumorigenicity of Glioma Cells by Transferring Notch1 Protein // *Cell Mol Neurobiol*. – 2020. – T. 40, № 5. – C. 767-784.
47. Sandiford O. A., Donnelly R. J., El-Far M. H., Burgmeyer L. M., Sinha G., Pamarthi S. H., Sherman L. S., Ferrer A. I., DeVore D. E., Patel S. A., Naaldijk Y., Alonso S., Barak P., Bryan M., Ponzio N. M., Narayanan R., Etchegaray J. P., Kumar R., Rameshwar P. Mesenchymal Stem Cell-Secreted Extracellular Vesicles Instruct Stepwise Dedifferentiation of Breast Cancer Cells into Dormancy at the Bone Marrow Perivascular Region // *Cancer Res*. – 2021. – T. 81, № 6. – C. 1567-1582.
48. Maiuthed A., Bhummaphan N., Luanpitpong S., Mutirangura A., Apornthewan C., Meeprasert A., Rungrotmongkol T., Rojanasakul Y., Chanvorachote P. Nitric oxide promotes cancer cell dedifferentiation by disrupting an Oct4: caveolin-1 complex: A new regulatory mechanism for cancer stem cell formation // *J Biol Chem*. – 2018. – T. 293, № 35. – C. 13534-13552.
49. Xu M. H., Gao X., Luo D., Zhou X. D., Xiong W., Liu G. X. EMT and acquisition of stem cell-like properties are involved in spontaneous formation of tumorigenic hybrids between lung cancer and bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *PLoS One*. – 2014. – T. 9, № 2. – C. e87893.
50. Zeng C., Zhang Y., Park S. C., Eun J. R., Nguyen N. T., Tschudy-Seney B., Jung Y. J., Theise N. D., Zern M. A., Duan Y. CD34(+) Liver Cancer Stem Cells Were Formed by Fusion of Hepatobiliary Stem/Progenitor Cells with Hematopoietic Precursor-Derived Myeloid Intermediates // *Stem Cells Dev*. – 2015. – T. 24, № 21. – C. 2467-78.
51. Gauck D., Keil S., Niggemann B., Zanker K. S., Dittmar T. Hybrid clone cells derived from human breast epithelial cells and human breast cancer cells exhibit properties of cancer stem/initiating cells // *BMC Cancer*. – 2017. – T. 17, № 1. – C. 515.

52. Ding J., Jin W., Chen C., Shao Z., Wu J. Tumor associated macrophage x cancer cell hybrids may acquire cancer stem cell properties in breast cancer // PLoS One. – 2012. – T. 7, № 7. – C. e41942.
53. Merle C., Lagarde P., Lartigue L., Chibon F. Acquisition of cancer stem cell capacities after spontaneous cell fusion // BMC Cancer. – 2021. – T. 21, № 1. – C. 241.
54. Bao S., Wu Q., McLendon R. E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A. B., Dewhirst M. W., Bigner D. D., Rich J. N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // Nature. – 2006. – T. 444, № 7120. – C. 756-60.
55. Prince M. E., Sivanandan R., Kaczorowski A., Wolf G. T., Kaplan M. J., Dalerba P., Weissman I. L., Clarke M. F., Ailles L. E. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – T. 104, № 3. – C. 973-8.
56. Hermann P. C., Huber S. L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J. W., Guba M., Bruns C. J., Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer // Cell Stem Cell. – 2007. – T. 1, № 3. – C. 313-23.
57. Eramo A., Lotti F., Sette G., Piloizzi E., Biffoni M., Di Virgilio A., Conticello C., Ruco L., Peschle C., De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population // Cell Death Differ. – 2008. – T. 15, № 3. – C. 504-14.
58. Yang Z. F., Ho D. W., Ng M. N., Lau C. K., Yu W. C., Ngai P., Chu P. W., Lam C. T., Poon R. T., Fan S. T. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer // Cancer Cell. – 2008. – T. 13, № 2. – C. 153-66.
59. Ricci-Vitiani L., Lombardi D. G., Piloizzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells // Nature. – 2007. – T. 445, № 7123. – C. 111-5.
60. Gao M. Q., Choi Y. P., Kang S., Youn J. H., Cho N. H. CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells // Oncogene. – 2010. – T. 29, № 18. – C. 2672-80.
61. Collins A. T., Berry P. A., Hyde C., Stower M. J., Maitland N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells // Cancer Res. – 2005. – T. 65, № 23. – C. 10946-51.
62. Schatton T., Murphy G. F., Frank N. Y., Yamaura K., Waaga-Gasser A. M., Gasser M., Zhan Q., Jordan S., Duncan L. M., Weishaupt C., Fuhlbrigge R. C., Kupper T. S., Sayegh M. H., Frank M. H. Identification of cells initiating human melanomas // Nature. – 2008. – T. 451, № 7176. – C. 345-9.
63. O'Brien C. A., Kreso A., Jamieson C. H. Cancer stem cells and self-renewal // Clin Cancer Res. – 2010. – T. 16, № 12. – C. 3113-20.
64. Najafi M., Mortezaee K., Ahadi R. Cancer stem cell (a)symmetry & plasticity: Tumorigenesis and therapy relevance // Life Sci. – 2019. – T. 231. – C. 116520.
65. Marjanovic N. D., Weinberg R. A., Chaffer C. L. Cell plasticity and heterogeneity in cancer // Clin Chem. – 2013. – T. 59, № 1. – C. 168-79.

66. Chen W., Dong J., Haiech J., Kilhoffer M. C., Zeniou M. Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy // *Stem Cells Int.* – 2016. – T. 2016. – C. 1740936.
67. Liberti M. V., Locasale J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? // *Trends Biochem Sci.* – 2016. – T. 41, № 3. – C. 211-218.
68. Chen C. L., Uthaya Kumar D. B., Punj V., Xu J., Sher L., Tahara S. M., Hess S., Machida K. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism // *Cell Metab.* – 2016. – T. 23, № 1. – C. 206-19.
69. Ciavardelli D., Rossi C., Barcaroli D., Volpe S., Consalvo A., Zucchelli M., De Cola A., Scavo E., Carollo R., D'Agostino D., Forli F., D'Aguanno S., Todaro M., Stassi G., Di Ilio C., De Laurenzi V., Urbani A. Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment // *Cell Death Dis.* – 2014. – T. 5, № 7. – C. e1336.
70. Zhou Y., Zhou Y., Shingu T., Feng L., Chen Z., Ogasawara M., Keating M. J., Kondo S., Huang P. Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells: preference for hypoxia and high dependency on glycolysis // *J Biol Chem.* – 2011. – T. 286, № 37. – C. 32843-53.
71. Liao J., Qian F., Tchabo N., Mhawech-Fauceglia P., Beck A., Qian Z., Wang X., Huss W. J., Lele S. B., Morrison C. D., Odunsi K. Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism // *PLoS One.* – 2014. – T. 9, № 1. – C. e84941.
72. Shen Y. A., Wang C. Y., Hsieh Y. T., Chen Y. J., Wei Y. H. Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma // *Cell Cycle.* – 2015. – T. 14, № 1. – C. 86-98.
73. Mizushima E., Tsukahara T., Emori M., Murata K., Akamatsu A., Shibayama Y., Hamada S., Watanabe Y., Kaya M., Hirohashi Y., Kanaseki T., Nakatsugawa M., Kubo T., Yamashita T., Sato N., Torigoe T. Osteosarcoma-initiating cells show high aerobic glycolysis and attenuation of oxidative phosphorylation mediated by LIN28B // *Cancer Sci.* – 2020. – T. 111, № 1. – C. 36-46.
74. Dong C., Yuan T., Wu Y., Wang Y., Fan T. W., Miriyala S., Lin Y., Yao J., Shi J., Kang T., Lorkiewicz P., St Clair D., Hung M. C., Evers B. M., Zhou B. P. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer // *Cancer Cell.* – 2013. – T. 23, № 3. – C. 316-31.
75. Janiszewska M., Suva M. L., Riggi N., Houtkooper R. H., Auwerx J., Clement-Schatlo V., Radovanovic I., Rheinbay E., Provero P., Stamenkovic I. Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells // *Genes Dev.* – 2012. – T. 26, № 17. – C. 1926-44.
76. Vlashi E., Lagadec C., Vergnes L., Matsutani T., Masui K., Poulou M., Popescu R., Della Donna L., Evers P., Dekmezian C., Reue K., Christofk H., Mischel P. S., Pajonk F. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – T. 108, № 38. – C. 16062-7.

77. Roesch A., Vultur A., Bogeski I., Wang H., Zimmermann K. M., Speicher D., Korbel C., Laschke M. W., Gimotty P. A., Philipp S. E., Krause E., Patzold S., Villanueva J., Krepler C., Fukunaga-Kalabis M., Hoth M., Bastian B. C., Vogt T., Herlyn M. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells // *Cancer Cell*. – 2013. – T. 23, № 6. – C. 811-25.
78. Pasto A., Bellio C., Pilotto G., Ciminale V., Silic-Benussi M., Guzzo G., Rasola A., Frasson C., Nardo G., Zulato E., Nicoletto M. O., Manicone M., Indraccolo S., Amadori A. Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation // *Oncotarget*. – 2014. – T. 5, № 12. – C. 4305-19.
79. Farnie G., Sotgia F., Lisanti M. P. High mitochondrial mass identifies a sub-population of stem-like cancer cells that are chemo-resistant // *Oncotarget*. – 2015. – T. 6, № 31. – C. 30472-86.
80. Lee K. M., Giltane J. M., Balko J. M., Schwarz L. J., Guerrero-Zotano A. L., Hutchinson K. E., Nixon M. J., Estrada M. V., Sanchez V., Sanders M. E., Lee T., Gomez H., Lluch A., Perez-Fidalgo J. A., Wolf M. M., Andrejeva G., Rathmell J. C., Fesik S. W., Arteaga C. L. MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation // *Cell Metab*. – 2017. – T. 26, № 4. – C. 633-647 e7.
81. Flavahan W. A., Wu Q., Hitomi M., Rahim N., Kim Y., Sloan A. E., Weil R. J., Nakano I., Sarkaria J. N., Stringer B. W., Day B. W., Li M., Lathia J. D., Rich J. N., Hjelmeland A. B. Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake // *Nat Neurosci*. – 2013. – T. 16, № 10. – C. 1373-82.
82. Dupuy F., Tabaries S., Andrzejewski S., Dong Z., Blagih J., Annis M. G., Omeroglu A., Gao D., Leung S., Amir E., Clemons M., Aguilar-Mahecha A., Basik M., Vincent E. E., St-Pierre J., Jones R. G., Siegel P. M. PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer // *Cell Metab*. – 2015. – T. 22, № 4. – C. 577-89.
83. Anderson A. S., Roberts P. C., Frisard M. I., Hulver M. W., Schmelz E. M. Ovarian tumor-initiating cells display a flexible metabolism // *Exp Cell Res*. – 2014. – T. 328, № 1. – C. 44-57.
84. Ye H., Adane B., Khan N., Sullivan T., Minhajuddin M., Gasparetto M., Stevens B., Pei S., Balys M., Ashton J. M., Klemm D. J., Woolthuis C. M., Stranahan A. W., Park C. Y., Jordan C. T. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche // *Cell Stem Cell*. – 2016. – T. 19, № 1. – C. 23-37.
85. Pascual G., Avgustinova A., Mejetta S., Martin M., Castellanos A., Attolini C. S., Berenguer A., Prats N., Toll A., Hueto J. A., Bescos C., Di Croce L., Benitah S. A. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36 // *Nature*. – 2017. – T. 541, № 7635. – C. 41-45.
86. Hale J. S., Otvos B., Sinyuk M., Alvarado A. G., Hitomi M., Stoltz K., Wu Q., Flavahan W., Levison B., Johansen M. L., Schmitt D., Neltner J. M., Huang P., Ren B., Sloan A. E., Silverstein R. L., Gladson C. L., DiDonato J. A., Brown J. M., McIntyre T., Hazen S. L., Horbinski C., Rich J. N., Lathia J. D. Cancer stem cell-specific scavenger receptor CD36 drives glioblastoma progression // *Stem Cells*. – 2014. – T. 32, № 7. – C. 1746-58.

87. Li J., Condello S., Thomes-Pepin J., Ma X., Xia Y., Hurley T. D., Matei D., Cheng J. X. Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells // *Cell Stem Cell*. – 2017. – T. 20, № 3. – C. 303-314 e5.
88. Hirata N., Yamada S., Shoda T., Kurihara M., Sekino Y., Kanda Y. Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation // *Nat Commun*. – 2014. – T. 5. – C. 4806.
89. Brandi J., Dando I., Pozza E. D., Biondani G., Jenkins R., Elliott V., Park K., Fanelli G., Zolla L., Costello E., Scarpa A., Cecconi D., Palmieri M. Proteomic analysis of pancreatic cancer stem cells: Functional role of fatty acid synthesis and mevalonate pathways // *J Proteomics*. – 2017. – T. 150. – C. 310-322.
90. Wang T., Fahrman J. F., Lee H., Li Y. J., Tripathi S. C., Yue C., Zhang C., Lifshitz V., Song J., Yuan Y., Somlo G., Jandial R., Ann D., Hanash S., Jove R., Yu H. JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid beta-Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance // *Cell Metab*. – 2018. – T. 27, № 1. – C. 136-150 e5.
91. Okazaki S., Umene K., Yamasaki J., Suina K., Otsuki Y., Yoshikawa M., Minami Y., Masuko T., Kawaguchi S., Nakayama H., Banno K., Aoki D., Saya H., Nagano O. Glutaminolysis-related genes determine sensitivity to xCT-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma // *Cancer Sci*. – 2019. – T. 110, № 11. – C. 3453-3463.
92. Tran T. Q., Hanse E. A., Habowski A. N., Li H., Ishak Gabra M. B., Yang Y., Lowman X. H., Ooi A. M., Liao S. Y., Edwards R. A., Waterman M. L., Kong M. alpha-Ketoglutarate attenuates Wnt signaling and drives differentiation in colorectal cancer // *Nat Cancer*. – 2020. – T. 1, № 3. – C. 345-358.
93. Jones C. L., Stevens B. M., D'Alessandro A., Reisz J. A., Culp-Hill R., Nemkov T., Pei S., Khan N., Adane B., Ye H., Krug A., Reinhold D., Smith C., DeGregori J., Pollyea D. A., Jordan C. T. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells // *Cancer Cell*. – 2018. – T. 34, № 5. – C. 724-740 e4.
94. Li D., Fu Z., Chen R., Zhao X., Zhou Y., Zeng B., Yu M., Zhou Q., Lin Q., Gao W., Ye H., Zhou J., Li Z., Liu Y., Chen R. Inhibition of glutamine metabolism counteracts pancreatic cancer stem cell features and sensitizes cells to radiotherapy // *Oncotarget*. – 2015. – T. 6, № 31. – C. 31151-63.
95. Wu Z., Wei D., Gao W., Xu Y., Hu Z., Ma Z., Gao C., Zhu X., Li Q. TPO-Induced Metabolic Reprogramming Drives Liver Metastasis of Colorectal Cancer CD110+ Tumor-Initiating Cells // *Cell Stem Cell*. – 2015. – T. 17, № 1. – C. 47-59.
96. Semenza G. L. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype // *EMBO J*. – 2017. – T. 36, № 3. – C. 252-259.
97. Zeng Z., Fu M., Hu Y., Wei Y., Wei X., Luo M. Regulation and signaling pathways in cancer stem cells: implications for targeted therapy for cancer // *Mol Cancer*. – 2023. – T. 22, № 1. – C. 172.
98. Liu A., Yu X., Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference // *Chin J Cancer*. – 2013. – T. 32, № 9. – C. 483-7.

99. Haruehanroengra P., Zheng Y. Y., Zhou Y., Huang Y., Sheng J. RNA modifications and cancer // *RNA Biol.* – 2020. – T. 17, № 11. – C. 1560-1575.
100. Yang L., Shi P., Zhao G., Xu J., Peng W., Zhang J., Zhang G., Wang X., Dong Z., Chen F., Cui H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy // *Signal Transduct Target Ther.* – 2020. – T. 5, № 1. – C. 8.
101. Takebe N., Miele L., Harris P. J., Jeong W., Bando H., Kahn M., Yang S. X., Ivy S. P. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2015. – T. 12, № 8. – C. 445-64.
102. Madsen R. R., Erickson E. C., Rueda O. M., Robin X., Caldas C., Toker A., Semple R. K., Vanhaesebroeck B. Positive correlation between transcriptomic stemness and PI3K/AKT/mTOR signaling scores in breast cancer, and a counterintuitive relationship with PIK3CA genotype // *PLoS Genet.* – 2021. – T. 17, № 11. – C. e1009876.
103. Colak S., Ten Dijke P. Targeting TGF-beta Signaling in Cancer // *Trends Cancer.* – 2017. – T. 3, № 1. – C. 56-71.
104. Alnasser S. M. Advances and Challenges in Cancer Stem Cells for Onco-Therapeutics // *Stem Cells Int.* – 2023. – T. 2023. – C. 8722803.
105. Jin M. Z., Jin W. L. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing // *Signal Transduct Target Ther.* – 2020. – T. 5, № 1. – C. 166.
106. Plaks V., Kong N., Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? // *Cell Stem Cell.* – 2015. – T. 16, № 3. – C. 225-38.
107. Mercurio L., Cecchetti S., Ricci A., Pacella A., Cigliana G., Bozzuto G., Podo F., Iorio E., Carpinelli G. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibition down- regulates CXCR4 expression and interferes with proliferation, invasion and glycolysis in glioma cells // *PLoS One.* – 2017. – T. 12, № 4. – C. e0176108.
108. Oshimori N. Cancer stem cells and their niche in the progression of squamous cell carcinoma // *Cancer Sci.* – 2020. – T. 111, № 11. – C. 3985-3992.
109. Huang T., Song X., Xu D., Tiek D., Goenka A., Wu B., Sastry N., Hu B., Cheng S. Y. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance // *Theranostics.* – 2020. – T. 10, № 19. – C. 8721-8743.
110. Chu X., Tian W., Ning J., Xiao G., Zhou Y., Wang Z., Zhai Z., Tanzhu G., Yang J., Zhou R. Cancer stem cells: advances in knowledge and implications for cancer therapy // *Signal Transduct Target Ther.* – 2024. – T. 9, № 1. – C. 170.
111. Fultang N., Chakraborty M., Peethambaran B. Regulation of cancer stem cells in triple negative breast cancer // *Cancer Drug Resist.* – 2021. – T. 4, № 2. – C. 321-342.
112. Yang Y., Zhu G., Yang L., Yang Y. Targeting CD24 as a novel immunotherapy for solid cancers // *Cell Commun Signal.* – 2023. – T. 21, № 1. – C. 312.
113. Chen C., Zhao S., Karnad A., Freeman J. W. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications // *J Hematol Oncol.* – 2018. – T. 11, № 1. – C. 64.

114. Hadjimichael C., Chanoumidou K., Papadopoulou N., Arampatzi P., Papamatheakis J., Kretsovali A. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells // *World J Stem Cells*. – 2015. – T. 7, № 9. – C. 1150-84.
115. Pattabiraman D. R., Weinberg R. A. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? // *Nat Rev Drug Discov*. – 2014. – T. 13, № 7. – C. 497-512.
116. Kondo T., Setoguchi T., Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2004. – T. 101, № 3. – C. 781-6.
117. Tanaka H., Nakamura M., Kameda C., Kubo M., Sato N., Kuroki S., Tanaka M., Katano M. The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells // *Anticancer Res*. – 2009. – T. 29, № 6. – C. 2147-57.
118. Toledo-Guzman M. E., Hernandez M. I., Gomez-Gallegos A. A., Ortiz-Sanchez E. ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors // *Curr Stem Cell Res Ther*. – 2019. – T. 14, № 5. – C. 375-388.
119. Lopez de Andres J., Grinan-Lison C., Jimenez G., Marchal J. A. Cancer stem cell secretome in the tumor microenvironment: a key point for an effective personalized cancer treatment // *J Hematol Oncol*. – 2020. – T. 13, № 1. – C. 136.
120. Chen J., Guo T., Zhang L., Qin L. X., Singer S., Maki R. G., Taguchi T., Dematteo R., Besmer P., Antonescu C. R. CD133 and CD44 are universally overexpressed in GIST and do not represent cancer stem cell markers // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2012. – T. 51, № 2. – C. 186-95.
121. Kim W. T., Ryu C. J. Cancer stem cell surface markers on normal stem cells // *BMB Rep*. – 2017. – T. 50, № 6. – C. 285-298.
122. Bao B., Ahmad A., Azmi A. S., Ali S., Sarkar F. H. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy // *Curr Protoc Pharmacol*. – 2013. – T. Chapter 14. – C. Unit 14 25.
123. Walcher L., Kistenmacher A. K., Suo H., Kitte R., Dluczek S., Strauss A., Blaudszun A. R., Yeysa T., Fricke S., Kossatz-Boehlert U. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies // *Front Immunol*. – 2020. – T. 11. – C. 1280.
124. Chang J. C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – T. 95, № 1 Suppl 1. – C. S20-S25.
125. Abdullah L. N., Chow E. K. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells // *Clin Transl Med*. – 2013. – T. 2, № 1. – C. 3.
126. Szotek P. P., Pieretti-Vanmarcke R., Masiakos P. T., Dinulescu D. M., Connolly D., Foster R., Dombkowski D., Preffer F., Maclaughlin D. T., Donahoe P. K. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – T. 103, № 30. – C. 11154-9.
127. Kurtova A. V., Xiao J., Mo Q., Pazhanisamy S., Krasnow R., Lerner S. P., Chen F., Roh T. T., Lay E., Ho P. L., Chan K. S. Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance // *Nature*. – 2015. – T. 517, № 7533. – C. 209-13.

128. Zhang S., Yang R., Ouyang Y., Shen Y., Hu L., Xu C. Cancer stem cells: a target for overcoming therapeutic resistance and relapse // *Cancer Biol Med.* – 2024. – T. 20, № 12. – C. 985-1020.
129. Hou H., Sun H., Lu P., Ge C., Zhang L., Li H., Zhao F., Tian H., Zhang L., Chen T., Yao M., Li J. Tunicamycin potentiates cisplatin anticancer efficacy through the DPAGT1/Akt/ABCG2 pathway in mouse Xenograft models of human hepatocellular carcinoma // *Mol Cancer Ther.* – 2013. – T. 12, № 12. – C. 2874-84.
130. Hu L., Liang Y., Wu K., Wang C., Zhang T., Peng R., Zou F. Repressing PDCD4 activates JNK/ABCG2 pathway to induce chemoresistance to fluorouracil in colorectal cancer cells // *Ann Transl Med.* – 2021. – T. 9, № 2. – C. 114.
131. Choi C. H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal // *Cancer Cell Int.* – 2005. – T. 5. – C. 30.
132. Lomonaco S. L., Finniss S., Xiang C., Decarvalho A., Umansky F., Kalkanis S. N., Mikkelsen T., Brodie C. The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells // *Int J Cancer.* – 2009. – T. 125, № 3. – C. 717-22.
133. Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Mackey J. R., Weinfeld M. Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells // *Breast Cancer Res.* – 2010. – T. 12, № 3. – C. R31.
134. Morgan M. A., Lawrence T. S. Molecular Pathways: Overcoming Radiation Resistance by Targeting DNA Damage Response Pathways // *Clin Cancer Res.* – 2015. – T. 21, № 13. – C. 2898-904.
135. Desai A., Webb B., Gerson S. L. CD133+ cells contribute to radioresistance via altered regulation of DNA repair genes in human lung cancer cells // *Radiother Oncol.* – 2014. – T. 110, № 3. – C. 538-45.
136. Wang W. J., Wu S. P., Liu J. B., Shi Y. S., Huang X., Zhang Q. B., Yao K. T. MYC regulation of CHK1 and CHK2 promotes radioresistance in a stem cell-like population of nasopharyngeal carcinoma cells // *Cancer Res.* – 2013. – T. 73, № 3. – C. 1219-31.
137. Yin H., Glass J. The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24(-or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling // *PLoS One.* – 2011. – T. 6, № 9. – C. e24080.
138. Al-Assar O., Mantoni T., Lunardi S., Kingham G., Helleday T., Brunner T. B. Breast cancer stem-like cells show dominant homologous recombination due to a larger S-G2 fraction // *Cancer Biol Ther.* – 2011. – T. 11, № 12. – C. 1028-35.
139. Szumiel I. Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: the pivotal role of mitochondria // *Int J Radiat Biol.* – 2015. – T. 91, № 1. – C. 1-12.
140. Chang L., Graham P., Hao J., Ni J., Deng J., Bucci J., Malouf D., Gillatt D., Li Y. Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance // *Oncotarget.* – 2016. – T. 7, № 10. – C. 11002-17.
141. Diehn M., Cho R. W., Lobo N. A., Kalisky T., Dorie M. J., Kulp A. N., Qian D., Lam J. S., Ailles L. E., Wong M., Joshua B., Kaplan M. J., Wapnir I., Dirbas F. M., Somlo G., Garberoglio C., Paz B., Shen J., Lau S. K., Quake S. R., Brown J. M., Weissman I. L., Clarke M. F.

Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells // *Nature*. – 2009. – T. 458, № 7239. – C. 780-3.

142. Mizuno T., Suzuki N., Makino H., Furui T., Morii E., Aoki H., Kunisada T., Yano M., Kuji S., Hirashima Y., Arakawa A., Nishio S., Ushijima K., Ito K., Itani Y., Morishige K. Cancer stem-like cells of ovarian clear cell carcinoma are enriched in the ALDH-high population associated with an accelerated scavenging system in reactive oxygen species // *Gynecol Oncol*. – 2015. – T. 137, № 2. – C. 299-305.

143. Tomita H., Tanaka K., Tanaka T., Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer // *Oncotarget*. – 2016. – T. 7, № 10. – C. 11018-32.

144. Voulgaridou G. P., Kiziridou M., Mantso T., Chlichlia K., Galanis A., Koukourakis M. I., Franco R., Panayiotidis M. I., Pappa A. Aldehyde dehydrogenase 3A1 promotes multi-modality resistance and alters gene expression profile in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2016. – T. 77, № Pt A. – C. 120-128.

145. Pawlik T. M., Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. – 2004. – T. 59, № 4. – C. 928-42.

146. Wu X., Tang W., Marquez R. T., Li K., Highfill C. A., He F., Lian J., Lin J., Fuchs J. R., Ji M., Li L., Xu L. Overcoming chemo/radio-resistance of pancreatic cancer by inhibiting STAT3 signaling // *Oncotarget*. – 2016. – T. 7, № 10. – C. 11708-23.

147. Lagadec C., Vlashi E., Della Donna L., Dekmezian C., Pajonk F. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells // *Stem Cells*. – 2012. – T. 30, № 5. – C. 833-44.

148. Hong S. W., Hur W., Choi J. E., Kim J. H., Hwang D., Yoon S. K. Role of ADAM17 in invasion and migration of CD133-expressing liver cancer stem cells after irradiation // *Oncotarget*. – 2016. – T. 7, № 17. – C. 23482-97.

149. Piao L. S., Hur W., Kim T. K., Hong S. W., Kim S. W., Choi J. E., Sung P. S., Song M. J., Lee B. C., Hwang D., Yoon S. K. CD133+ liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma // *Cancer Lett*. – 2012. – T. 315, № 2. – C. 129-37.

150. Yang L., Yang G., Ding Y., Dai Y., Xu S., Guo Q., Xie A., Hu G. Inhibition of PI3K/AKT Signaling Pathway Radiosensitizes Pancreatic Cancer Cells with ARID1A Deficiency in Vitro // *J Cancer*. – 2018. – T. 9, № 5. – C. 890-900.

151. Sun X., He Z., Guo L., Wang C., Lin C., Ye L., Wang X., Li Y., Yang M., Liu S., Hua X., Wen W., Lin C., Long Z., Zhang W., Li H., Jian Y., Zhu Z., Wu X., Lin H. ALG3 contributes to stemness and radioresistance through regulating glycosylation of TGF-beta receptor II in breast cancer // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2021. – T. 40, № 1. – C. 149.

152. Tanaka H., Kawaguchi M., Shoda S., Miyoshi T., Iwasaki R., Hyodo F., Mori T., Hara A., Tomita H., Matsuo M. Nuclear Accumulation of beta-Catenin in Cancer Stem Cell Radioresistance and Stemness in Human Colon Cancer // *Anticancer Res*. – 2019. – T. 39, № 12. – C. 6575-6583.

153. Wang C., Liu L., Cheng Y., Shi H. Combined GSK-3beta and MEK inhibitors modulate the stemness and radiotherapy sensitivity of cervical cancer stem cells through the Wnt signaling pathway // *Chem Biol Interact*. – 2023. – T. 380. – C. 110515.

154. Zhao Y., Tao L., Yi J., Song H., Chen L. The Role of Canonical Wnt Signaling in Regulating Radioresistance // *Cell Physiol Biochem.* – 2018. – T. 48, № 2. – C. 419-432.
155. Zhao X., Liu X., Hu S., Pan Y., Zhang J., Tai G., Shao C. GDF15 Contributes to Radioresistance by Mediating the EMT and Stemness of Breast Cancer Cells // *Int J Mol Sci.* – 2022. – T. 23, № 18.
156. Ghisolfi L., Keates A. C., Hu X., Lee D. K., Li C. J. Ionizing radiation induces stemness in cancer cells // *PLoS One.* – 2012. – T. 7, № 8. – C. e43628.
157. Cho Y. M., Kim Y. S., Kang M. J., Farrar W. L., Hurt E. M. Long-term recovery of irradiated prostate cancer increases cancer stem cells // *Prostate.* – 2012. – T. 72, № 16. – C. 1746-56.
158. Lee S. Y., Jeong E. K., Ju M. K., Jeon H. M., Kim M. Y., Kim C. H., Park H. G., Han S. I., Kang H. S. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation // *Mol Cancer.* – 2017. – T. 16, № 1. – C. 10.
159. Gomez-Casal R., Bhattacharya C., Ganesh N., Bailey L., Basse P., Gibson M., Epperly M., Levina V. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes // *Mol Cancer.* – 2013. – T. 12, № 1. – C. 94.
160. Pustovalova M., Alhaddad L., Blokhina T., Smetanina N., Chigasova A., Chuprov-Netochin R., Eremin P., Gilmutdinova I., Osipov A. N., Leonov S. The CD44^{high} Subpopulation of Multifraction Irradiation-Surviving NSCLC Cells Exhibits Partial EMT-Program Activation and DNA Damage Response Depending on Their p53 Status // *Int J Mol Sci.* – 2021. – T. 22, № 5.
161. Wang H., Wang Z., Li Y., Lu T., Hu G. Silencing Snail Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition and Increases Radiosensitivity in Hypopharyngeal Carcinoma // *Onco Targets Ther.* – 2020. – T. 13. – C. 497-511.
162. Wild-Bode C., Weller M., Rimner A., Dichgans J., Wick W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma // *Cancer Res.* – 2001. – T. 61, № 6. – C. 2744-50.
163. Nordsmark M., Bentzen S. M., Rudat V., Brizel D., Lartigau E., Stadler P., Becker A., Adam M., Molls M., Dunst J., Terris D. J., Overgaard J. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study // *Radiother Oncol.* – 2005. – T. 77, № 1. – C. 18-24.
164. Junttila M. R., de Sauvage F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response // *Nature.* – 2013. – T. 501, № 7467. – C. 346-54.
165. Leroi N., Lallemand F., Coucke P., Noel A., Martinive P. Impacts of Ionizing Radiation on the Different Compartments of the Tumor Microenvironment // *Front Pharmacol.* – 2016. – T. 7. – C. 78.
166. Neuzillet C., Tijeras-Raballand A., Cohen R., Cros J., Faivre S., Raymond E., de Gramont A. Targeting the TGFβ pathway for cancer therapy // *Pharmacol Ther.* – 2015. – T. 147. – C. 22-31.
167. Hardee M. E., Marciscano A. E., Medina-Ramirez C. M., Zagzag D., Narayana A., Lonning S. M., Barcellos-Hoff M. H. Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by

- the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta // *Cancer Res.* – 2012. – T. 72, № 16. – C. 4119-29.
168. Kim M. R., Lee J., An Y. S., Jin Y. B., Park I. C., Chung E., Shin I., Barcellos-Hoff M. H., Yi J. Y. TGFbeta1 protects cells from gamma-IR by enhancing the activity of the NHEJ repair pathway // *Mol Cancer Res.* – 2015. – T. 13, № 2. – C. 319-29.
169. Bouquet F., Pal A., Pilonis K. A., Demaria S., Hann B., Akhurst R. J., Babb J. S., Lonning S. M., DeWyngaert J. K., Formenti S. C., Barcellos-Hoff M. H. TGFbeta1 inhibition increases the radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and promotes tumor control by radiation in vivo // *Clin Cancer Res.* – 2011. – T. 17, № 21. – C. 6754-65.
170. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression // *Nat Rev Cancer.* – 2002. – T. 2, № 3. – C. 161-74.
171. Moeller B. J., Cao Y., Li C. Y., Dewhirst M. W. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules // *Cancer Cell.* – 2004. – T. 5, № 5. – C. 429-41.
172. Krause M., Yaromina A., Eicheler W., Koch U., Baumann M. Cancer stem cells: targets and potential biomarkers for radiotherapy // *Clin Cancer Res.* – 2011. – T. 17, № 23. – C. 7224-9.
173. Lagadec C., Vlashi E., Della Donna L., Meng Y., Dekmezian C., Kim K., Pajonk F. Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment // *Breast Cancer Res.* – 2010. – T. 12, № 1. – C. R13.
174. Konopliannikov A. G., Lepekhina L. A., Kolesnikova A. I., Ermakov V. I. [Survival of clonogenic cells of Lewis lung carcinoma cells forming colonies in agar cultures in diffusion chambers during gamma-irradiation and exposure to gamma-neutron californium-252 irradiation] // *Radiobiologiya.* – 1986. – T. 26, № 4. – C. 473-6.
175. Hirota Y., Masunaga S., Kondo N., Kawabata S., Hirakawa H., Yajima H., Fujimori A., Ono K., Kuroiwa T., Miyatake S. High linear-energy-transfer radiation can overcome radioresistance of glioma stem-like cells to low linear-energy-transfer radiation // *J Radiat Res.* – 2014. – T. 55, № 1. – C. 75-83.
176. Бекетов Е.Е. Исаев Е. В., Корякин С. Н., Лычагин А. А., Ульяненко С. Е. Зависимость эффективности одновременного воздействия гамма-квантов и нейтронов с энергией 14 МэВ от вклада плотноионизирующего компонента // *Радиация и риск.* – 2012. – Т. 21, № 3. – С. 82–90.
177. Specht H. M., Neff T., Reuschel W., Wagner F. M., Kampfer S., Wilkens J. J., Petry W., Combs S. E. Paving the Road for Modern Particle Therapy - What Can We Learn from the Experience Gained with Fast Neutron Therapy in Munich? // *Front Oncol.* – 2015. – T. 5. – C. 262.
178. Cui X., Oonishi K., Tsujii H., Yasuda T., Matsumoto Y., Furusawa Y., Akashi M., Kamada T., Okayasu R. Effects of carbon ion beam on putative colon cancer stem cells and its comparison with X-rays // *Cancer Res.* – 2011. – T. 71, № 10. – C. 3676-87.

179. Zhang Q., Kong Y., Yang Z., Liu Y., Liu R., Geng Y., Luo H., Zhang H., Li H., Feng S., Wang X. Preliminary study on radiosensitivity to carbon ions in human breast cancer // *J Radiat Res.* – 2020. – Т. 61, № 3. – С. 399-409.
180. Jones B. Clinical Radiobiology of Fast Neutron Therapy: What Was Learnt? // *Front Oncol.* – 2020. – Т. 10. – С. 1537.
181. Anderson J. A., Harper J. V., Cucinotta F. A., O'Neill P. Participation of DNA-PKcs in DSB repair after exposure to high- and low-LET radiation // *Radiat Res.* – 2010. – Т. 174, № 2. – С. 195-205.
182. Daguene E., Khalifa J., Toledano A., Borchellini D., Pointreau Y., Rodriguez-Lafrasse C., Chargari C., Magne N. To exploit the 5 'R' of radiobiology and unleash the 3 'E' of immunoediting: 'RE'-inventing the radiotherapy-immunotherapy combination // *Ther Adv Med Oncol.* – 2020. – Т. 12. – С. 1758835920913445.
183. Spisz P., Zdrowowicz M., Makurat S., Kozak W., Skotnicki K., Bobrowski K., Rak J. Why Does the Type of Halogen Atom Matter for the Radiosensitizing Properties of 5-Halogen Substituted 4-Thio-2'-Deoxyuridines? // *Molecules.* – 2019. – Т. 24, № 15.
184. Wardman P. Nitroimidazoles as hypoxic cell radiosensitizers and hypoxia probes: misonidazole, myths and mistakes // *Br J Radiol.* – 2019. – Т. 92, № 1093. – С. 20170915.
185. Плотникова О. С., Апанасевич В. И., Князенко П.А., Шестакова А.А., Карлина В.П., Коренков П.Г. Эволюция методов радиосенсибилизации в лучевой терапии злокачественных новообразований // *ТМЖ.* – 2021. – Т. 2, № 84. – С. 14-18.
186. Lomax M. E., Folkes L. K., O'Neill P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy // *Clin Oncol (R Coll Radiol).* – 2013. – Т. 25, № 10. – С. 578-85.
187. Brown J. S., O'Carrigan B., Jackson S. P., Yap T. A. Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors // *Cancer Discov.* – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 20-37.
188. Park S., Choi C., Kim H., Shin Y. J., Oh Y., Park W., Cho W. K., Kim N. Olaparib enhances sensitization of BRCA-proficient breast cancer cells to x-rays and protons // *Breast Cancer Res Treat.* – 2024. – Т. 203, № 3. – С. 449-461.
189. Zamulaeva I. Churyukina K., Matchuk O., Ivanov A., Saburov V. и Zhuze A. Dimeric bisbenzimidazoles DB(n) in combination with ionizing radiation decrease number and clonogenic activity of MCF-7 breast cancer stem cells // *AIMS Biophysics.* – 2020. – Т. 7, № 4. – С. 339-361.
190. Blackford A. N., Jackson S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response // *Mol Cell.* – 2017. – Т. 66, № 6. – С. 801-817.
191. Zhang T., Shen Y., Chen Y., Hsieh J. T., Kong Z. The ATM inhibitor KU55933 sensitizes radioresistant bladder cancer cells with DAB2IP gene defect // *Int J Radiat Biol.* – 2015. – Т. 91, № 4. – С. 368-78.
192. Carruthers R., Ahmed S. U., Strathdee K., Gomez-Roman N., Amoah-Buahin E., Watts C., Chalmers A. J. Abrogation of radioresistance in glioblastoma stem-like cells by inhibition of ATM kinase // *Mol Oncol.* – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 192-203.

193. Pires I. M., Olcina M. M., Anbalagan S., Pollard J. R., Reaper P. M., Charlton P. A., McKenna W. G., Hammond E. M. Targeting radiation-resistant hypoxic tumour cells through ATR inhibition // *Br J Cancer*. – 2012. – T. 107, № 2. – C. 291-9.
194. Davidson D., Amrein L., Panasci L., Aloyz R. Small Molecules, Inhibitors of DNA-PK, Targeting DNA Repair, and Beyond // *Front Pharmacol*. – 2013. – T. 4. – C. 5.
195. Ismail I. H., Martensson S., Moshinsky D., Rice A., Tang C., Howlett A., McMahon G., Hammarsten O. SU11752 inhibits the DNA-dependent protein kinase and DNA double-strand break repair resulting in ionizing radiation sensitization // *Oncogene*. – 2004. – T. 23, № 4. – C. 873-82.
196. Fang X., Huang Z., Zhai K., Huang Q., Tao W., Kim L., Wu Q., Almasan A., Yu J. S., Li X., Stark G. R., Rich J. N., Bao S. Inhibiting DNA-PK induces glioma stem cell differentiation and sensitizes glioblastoma to radiation in mice // *Sci Transl Med*. – 2021. – T. 13, № 600.
197. Yang Z. X., Sun Y. H., He J. G., Cao H., Jiang G. Q. Increased activity of CHK enhances the radioresistance of MCF-7 breast cancer stem cells // *Oncol Lett*. – 2015. – T. 10, № 6. – C. 3443-3449.
198. Balbous A., Cortes U., Guilloteau K., Rivet P., Pinel B., Duchesne M., Godet J., Boissonnade O., Wager M., Bensadoun R. J., Chomel J. C., Karayan-Tapon L. A radiosensitizing effect of RAD51 inhibition in glioblastoma stem-like cells // *BMC Cancer*. – 2016. – T. 16. – C. 604.
199. Zamulaeva I. A., Matchuk, O. N., Selivanova, E. I., Yakimova A. O., Mosina V. A., Koryakin S. N., Kaprin A. D., Boreyko A. V., Bugay A. N., Chausov V. N., Krasavin E. A. Radiobiological Effects of the Combined Action of 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine and Proton Radiation on B16 Melanoma in vivo. // *Phys. Part. Nuclei Lett*. – 2023. – T. 20, № 1. – C. 70-71.
200. Boivin A., Hanot M., Malesys C., Maalouf M., Rousson R., Rodriguez-Lafrasse C., Ardail D. Transient alteration of cellular redox buffering before irradiation triggers apoptosis in head and neck carcinoma stem and non-stem cells // *PLoS One*. – 2011. – T. 6, № 1. – C. e14558.
201. Rodman S. N., Spence J. M., Ronnfeldt T. J., Zhu Y., Solst S. R., O'Neill R. A., Allen B. G., Guan X., Spitz D. R., Fath M. A. Enhancement of Radiation Response in Breast Cancer Stem Cells by Inhibition of Thioredoxin- and Glutathione-Dependent Metabolism // *Radiat Res*. – 2016. – T. 186, № 4. – C. 385-395.
202. Salah M., Akasaka H., Shimizu Y., Morita K., Nishimura Y., Kubota H., Kawaguchi H., Sogawa T., Mukumoto N., Ogino C., Sasaki R. Reactive oxygen species-inducing titanium peroxide nanoparticles as promising radiosensitizers for eliminating pancreatic cancer stem cells // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2022. – T. 41, № 1. – C. 146.
203. Gong L., Zhang Y., Liu C., Zhang M., Han S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy // *Int J Nanomedicine*. – 2021. – T. 16. – C. 1083-1102.
204. Tyagi A., Vishnoi K., Kaur H., Srivastava Y., Roy B. G., Das B. C., Bharti A. C. Cervical cancer stem cells manifest radioresistance: Association with upregulated AP-1 activity // *Sci Rep*. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 4781.

205. Yang K., Liao Z., Wu Y., Li M., Guo T., Lin J., Li Y., Hu C. Curcumin and Glu-GNPs Induce Radiosensitivity against Breast Cancer Stem-Like Cells // *Biomed Res Int.* – 2020. – T. 2020. – C. 3189217.
206. Zhao F., Ming J., Zhou Y., Fan L. Inhibition of Glut1 by WZB117 sensitizes radioresistant breast cancer cells to irradiation // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2016. – T. 77, № 5. – C. 963-72.
207. Daniele S., Giacomelli C., Zappelli E., Granchi C., Trincavelli M. L., Minutolo F., Martini C. Lactate dehydrogenase-A inhibition induces human glioblastoma multiforme stem cell differentiation and death // *Sci Rep.* – 2015. – T. 5. – C. 15556.
208. Zhang L., Bailleul J., Yazal T., Dong K., Sung D., Dao A., Gosa L., Nathanson D., Bhat K., Duhachek-Muggy S., Alli C., Dratver M. B., Pajonk F., Vlashi E. PK-M2-mediated metabolic changes in breast cancer cells induced by ionizing radiation // *Breast Cancer Res Treat.* – 2019. – T. 178, № 1. – C. 75-86.
209. Michelakis E. D., Sutendra G., Dromparis P., Webster L., Haromy A., Niven E., Maguire C., Gammer T. L., Mackey J. R., Fulton D., Abdulkarim B., McMurtry M. S., Petruk K. C. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate // *Sci Transl Med.* – 2010. – T. 2, № 31. – C. 31ra34.
210. Rae C., Haberkorn U., Babich J. W., Mairs R. J. Inhibition of Fatty Acid Synthase Sensitizes Prostate Cancer Cells to Radiotherapy // *Radiat Res.* – 2015. – T. 184, № 5. – C. 482-93.
211. Han S., Wei R., Zhang X., Jiang N., Fan M., Huang J. H., Xie B., Zhang L., Miao W., Butler A. C., Coleman M. A., Vaughan A. T., Wang Y., Chen H. W., Liu J., Li J. J. CPT1A/2-Mediated FAO Enhancement-A Metabolic Target in Radioresistant Breast Cancer // *Front Oncol.* – 2019. – T. 9. – C. 1201.
212. Cruz A. L. S., Barreto E. A., Fazolini N. P. B., Viola J. P. B., Bozza P. T. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks // *Cell Death Dis.* – 2020. – T. 11, № 2. – C. 105.
213. Nistico C., Pagliari F., Chiarella E., Fernandes Guerreiro J., Marafioti M. G., Aversa I., Genard G., Hanley R., Garcia-Calderon D., Bond H. M., Mesuraca M., Tirinato L., Spadea M. F., Seco J. C. Lipid Droplet Biosynthesis Impairment through DGAT2 Inhibition Sensitizes MCF7 Breast Cancer Cells to Radiation // *Int J Mol Sci.* – 2021. – T. 22, № 18.
214. Mukha A., Kahya U., Linge A., Chen O., Lock S., Lukiyanchuk V., Richter S., Alves T. C., Peitzsch M., Telychko V., Skvortsov S., Negro G., Aschenbrenner B., Skvortsova, II, Mirtschink P., Lohaus F., Holscher T., Neubauer H., Rivandi M., Labitzky V., Lange T., Franken A., Behrens B., Stoecklein N. H., Toma M., Sommer U., Zschaek S., Rehm M., Eisenhofer G., Schwager C., Abdollahi A., Groeben C., Kunz-Schughart L. A., Baretton G. B., Baumann M., Krause M., Peitzsch C., Dubrovskaya A. GLS-driven glutamine catabolism contributes to prostate cancer radiosensitivity by regulating the redox state, stemness and ATG5-mediated autophagy // *Theranostics.* – 2021. – T. 11, № 16. – C. 7844-7868.
215. Li J. Y., Li Y. Y., Jin W., Yang Q., Shao Z. M., Tian X. S. ABT-737 reverses the acquired radioresistance of breast cancer cells by targeting Bcl-2 and Bcl-xL // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2012. – T. 31, № 1. – C. 102.

216. Andrade N. P., Warner K. A., Zhang Z., Pearson A. T., Mantesso A., Guimaraes D. M., Altemani A., Mariano F. V., Nunes F. D., Nor J. E. Survival of salivary gland cancer stem cells requires mTOR signaling // *Cell Death Dis.* – 2021. – T. 12, № 1. – C. 108.
217. Gupta A. K., Cerniglia G. J., Mick R., Ahmed M. S., Bakanauskas V. J., Muschel R. J., McKenna W. G. Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002 // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2003. – T. 56, № 3. – C. 846-53.
218. Zhang M., Atkinson R. L., Rosen J. M. Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – T. 107, № 8. – C. 3522-7.
219. Chang L., Graham P. H., Hao J., Ni J., Bucci J., Cozzi P. J., Kearsley J. H., Li Y. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance // *Cell Death Dis.* – 2013. – T. 4, № 10. – C. e875.
220. Kantapan J., Paksee S., Duangya A., Sangthong P., Roytrakul S., Krobthong S., Suttana W., Dechsupa N. A radiosensitizer, gallotannin-rich extract from *Bouea macrophylla* seeds, inhibits radiation-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells // *BMC Complement Med Ther.* – 2021. – T. 21, № 1. – C. 189.
221. Gasimli R., Kayabasi C., Ozmen Yelken B., Asik A., Sogutlu F., Celebi C., Yilmaz Susluer S., Kamer S., Biray Avci C., Haydaroglu A., Gunduz C. The effects of PKI-402 on breast tumor models' radiosensitivity via dual inhibition of PI3K/mTOR // *Int J Radiat Biol.* – 2023. – T. 99, № 12. – C. 1961-1970.
222. Miyazaki Y., Matsubara S., Ding Q., Tsukasa K., Yoshimitsu M., Kosai K., Takao S. Efficient elimination of pancreatic cancer stem cells by hedgehog/GLI inhibitor GANT61 in combination with mTOR inhibition // *Mol Cancer.* – 2016. – T. 15, № 1. – C. 49.
223. Gonnissen A., Isebaert S., McKee C. M., Dok R., Haustermans K., Muschel R. J. The hedgehog inhibitor GANT61 sensitizes prostate cancer cells to ionizing radiation both in vitro and in vivo // *Oncotarget.* – 2016. – T. 7, № 51. – C. 84286-84298.
224. Singh B. N., Fu J., Srivastava R. K., Shankar S. Hedgehog signaling antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics: molecular mechanisms // *PLoS One.* – 2011. – T. 6, № 11. – C. e27306.
225. Barker C. A., Dufault S., Arron S. T., Ho A. L., Algazi A. P., Dunn L. A., Humphries A. A., Hultman C., Lian M., Knott P. D., Yom S. S. Phase II, Single-Arm Trial of Induction and Concurrent Vismodegib With Curative-Intent Radiation Therapy for Locally Advanced, Unresectable Basal Cell Carcinoma // *J Clin Oncol.* – 2024. – T. 42, № 19. – C. 2327-2335.
226. Moustafa E. M., Abdel Salam H. S., Mansour S. Z. *Withania somnifera* Modulates Radiation-Induced Generation of Lung Cancer Stem Cells via Restraining the Hedgehog Signaling Factors // *Dose Response.* – 2022. – T. 20, № 1. – C. 15593258221076711.
227. Cojoc M., Peitzsch C., Kurth I., Trautmann F., Kunz-Schughart L. A., Telegeev G. D., Stakhovsky E. A., Walker J. R., Simin K., Lyle S., Fuessel S., Erdmann K., Wirth M. P., Krause M., Baumann M., Dubrovskaya A. Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by beta-Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells // *Cancer Res.* – 2015. – T. 75, № 7. – C. 1482-94.

228. Su H., Jin X., Zhang X., Zhao L., Lin B., Li L., Fei Z., Shen L., Fang Y., Pan H., Xie C. FH535 increases the radiosensitivity and reverses epithelial-to-mesenchymal transition of radioresistant esophageal cancer cell line KYSE-150R // *J Transl Med.* – 2015. – T. 13. – C. 104.
229. Kim J. S., Kim H. A., Seong M. K., Seol H., Oh J. S., Kim E. K., Chang J. W., Hwang S. G., Noh W. C. STAT3-survivin signaling mediates a poor response to radiotherapy in HER2-positive breast cancers // *Oncotarget.* – 2016. – T. 7, № 6. – C. 7055-65.
230. Eum D. Y., Jeong M., Park S. Y., Kim J., Jin Y., Jo J., Shim J. W., Lee S. R., Park S. J., Heo K., Yun H., Choi Y. J. AM-18002, a derivative of natural anmindenol A, enhances radiosensitivity in mouse breast cancer cells // *PLoS One.* – 2024. – T. 19, № 4. – C. e0296989.
231. Choi J., Park J., Cho I., Sheen Y. Co-treatment with vactosertib, a novel, orally bioavailable activin receptor-like kinase 5 inhibitor, suppresses radiotherapy-induced epithelial-to-mesenchymal transition, cancer cell stemness, and lung metastasis of breast cancer // *Radiol Oncol.* – 2022. – T. 56, № 2. – C. 185-197.
232. Macha M. A., Rachagani S., Qazi A. K., Jahan R., Gupta S., Patel A., Seshacharyulu P., Lin C., Li S., Wang S., Verma V., Kishida S., Kishida M., Nakamura N., Kibe T., Lydiatt W. M., Smith R. B., Ganti A. K., Jones D. T., Batra S. K., Jain M. Afatinib radiosensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting cancer stem cells // *Oncotarget.* – 2017. – T. 8, № 13. – C. 20961-20973.
233. Hernandez-Vargas H., Palacios J., Moreno-Bueno G. Telling cells how to die: docetaxel therapy in cancer cell lines // *Cell Cycle.* – 2007. – T. 6, № 7. – C. 780-3.
234. Zasadil L. M., Andersen K. A., Yeum D., Rocque G. B., Wilke L. G., Tevaarwerk A. J., Raines R. T., Burkard M. E., Weaver B. A. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles // *Sci Transl Med.* – 2014. – T. 6, № 229. – C. 229ra43.
235. Wu X., Sooman L., Lennartsson J., Bergstrom S., Bergqvist M., Gullbo J., Ekman S. Microtubule inhibition causes epidermal growth factor receptor inactivation in oesophageal cancer cells // *Int J Oncol.* – 2013. – T. 42, № 1. – C. 297-304.
236. Zhang X., Shao J., Li X., Cui L., Tan Z. Docetaxel promotes cell apoptosis and decreases SOX2 expression in CD133-expressing hepatocellular carcinoma stem cells by suppressing the PI3K/AKT signaling pathway // *Oncol Rep.* – 2019. – T. 41, № 2. – C. 1067-1074.
237. O'Hare T., Walters D. K., Stoffregen E. P., Jia T., Manley P. W., Mestan J., Cowan-Jacob S. W., Lee F. Y., Heinrich M. C., Deininger M. W., Druker B. J. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants // *Cancer Res.* – 2005. – T. 65, № 11. – C. 4500-5.
238. Lee F. Y., Lombardo L., Borzilleri R., Camuso A., Castaneda S., Donato N., Fager K., Flefleh C., Gray H., Inigo I., Kan D., Luo R., Pang S., Wen M. L., Wild R., Wong T. W., Talpaz M., Kramer R. BMS-354825 - A potent dual SRC/ABL kinase inhibitor possessing curative efficacy against imatinib sensitive and resistant human CML models in vivo. // *Cancer Res.* – 2004. – T. 64, № (7_Supplement): 921.
239. Shupnik M. A. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation // *Oncogene.* – 2004. – T. 23, № 48. – C. 7979-89.

240. Finn R. S., Dering J., Ginther C., Wilson C. A., Glaspy P., Tchekmedyian N., Slamon D. J. Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro // *Breast Cancer Res Treat.* – 2007. – T. 105, № 3. – C. 319-26.
241. Kheraldine H., Gupta I., Cyprian F. S., Vranic S., Al-Farsi H. F., Merhi M., Dermime S., Al Moustafa A. E. Targeting HER2-positive breast cancer cells by a combination of dasatinib and BMS-202: Insight into the molecular pathways // *Cancer Cell Int.* – 2024. – T. 24, № 1. – C. 94.
242. Frangou C., Li Y. W., Shen H., Yang N., Wilson K. E., Blijlevens M., Guo J., Nowak N. J., Zhang J. Molecular profiling and computational network analysis of TAZ-mediated mammary tumorigenesis identifies actionable therapeutic targets // *Oncotarget.* – 2014. – T. 5, № 23. – C. 12166-76.
243. Heo S. K., Noh E. K., Kim J. Y., Jeong Y. K., Jo J. C., Choi Y., Koh S., Baek J. H., Min Y. J., Kim H. Targeting c-KIT (CD117) by dasatinib and radotinib promotes acute myeloid leukemia cell death // *Sci Rep.* – 2017. – T. 7, № 1. – C. 15278.
244. Park S. Y., Kim J. Y., Jun Y., Nam J. S. Strategies to Tackle Radiation Resistance by Penetrating Cancer Stem Cell Line of Scrimmage // *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* – 2018. – T. 13, № 1. – C. 18-39.
245. Jia C., Zhao Y., Huang H., Fan K., Xie T., Xie M. Apigenin sensitizes radiotherapy of mouse subcutaneous glioma through attenuations of cell stemness and DNA damage repair by inhibiting NF-kappaB/HIF-1alpha-mediated glycolysis // *J Nutr Biochem.* – 2022. – T. 107. – C. 109038.
246. Wu S. L., Li Y. J., Liao K., Shi L., Zhang N., Liu S., Hu Y. Y., Li S. L., Wang Y. 2-Methoxyestradiol inhibits the proliferation and migration and reduces the radioresistance of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 stem cells via NF-kappaB/HIF-1 signaling pathway inactivation and EMT reversal // *Oncol Rep.* – 2017. – T. 37, № 2. – C. 793-802.
247. Diaz R., Nguewa P. A., Redrado M., Manrique I., Calvo A. Sunitinib reduces tumor hypoxia and angiogenesis, and radiosensitizes prostate cancer stem-like cells // *Prostate.* – 2015. – T. 75, № 11. – C. 1137-49.
248. Guttler A., Theuerkorn K., Riemann A., Wichmann H., Kessler J., Thews O., Bache M., Vordermark D. Cellular and radiobiological effects of carbonic anhydrase IX in human breast cancer cells // *Oncol Rep.* – 2019. – T. 41, № 4. – C. 2585-2594.
249. Yoshikawa M., Tsuchihashi K., Ishimoto T., Yae T., Motohara T., Sugihara E., Onishi N., Masuko T., Yoshizawa K., Kawashiri S., Mukai M., Asoda S., Kawana H., Nakagawa T., Saya H., Nagano O. xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma // *Cancer Res.* – 2013. – T. 73, № 6. – C. 1855-66.
250. Maggiorella L., Wen B., Frascogna V., Opolon P., Bourhis J., Deutsch E. Combined radiation sensitizing and anti-angiogenic effects of ionizing radiation and the protease inhibitor ritonavir in a head and neck carcinoma model // *Anticancer Res.* – 2005. – T. 25, № 6B. – C. 4357-62.

251. Yang T., Qiao S., Zhu X. High-dose radiation-resistant lung cancer cells stored many functional lipid drops through JAK2/p-STAT3/FASN pathway // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2023. – T. 149, № 15. – C. 14169-14183.
252. You Y., Liu J., Wang Z., Zhang Y., Ran Y., Guo X., Liu H., Wang H. The enhancement of radiosensitivity in human esophageal squamous cell carcinoma cells by zoledronic acid and its potential mechanism // *Cytotechnology.* – 2014. – T. 66, № 1. – C. 17-25.
253. Lacerda L., Reddy J. P., Liu D., Larson R., Li L., Masuda H., Brewer T., Debeb B. G., Xu W., Hortobagyi G. N., Buchholz T. A., Ueno N. T., Woodward W. A. Simvastatin radiosensitizes differentiated and stem-like breast cancer cell lines and is associated with improved local control in inflammatory breast cancer patients treated with postmastectomy radiation // *Stem Cells Transl Med.* – 2014. – T. 3, № 7. – C. 849-56.
254. Kang H., Lee S., Kim K., Jeon J., Kang S. G., Youn H., Kim H. Y., Youn B. Downregulated CLIP3 induces radioresistance by enhancing stemness and glycolytic flux in glioblastoma // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2021. – T. 40, № 1. – C. 282.
255. Wang Y. C., Chao T. K., Chang C. C., Yo Y. T., Yu M. H., Lai H. C. Drug screening identifies niclosamide as an inhibitor of breast cancer stem-like cells // *PLoS One.* – 2013. – T. 8, № 9. – C. e74538.
256. Khanim F. L., Merrick B. A., Giles H. V., Jankute M., Jackson J. B., Giles L. J., Birtwistle J., Bunce C. M., Drayson M. T. Redeployment-based drug screening identifies the anti-helminthic niclosamide as anti-myeloma therapy that also reduces free light chain production // *Blood Cancer J.* – 2011. – T. 1, № 10. – C. e39.
257. Pan J. X., Ding K., Wang C. Y. Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells // *Chin J Cancer.* – 2012. – T. 31, № 4. – C. 178-84.
258. You S., Li R., Park D., Xie M., Sica G. L., Cao Y., Xiao Z. Q., Deng X. Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer // *Mol Cancer Ther.* – 2014. – T. 13, № 3. – C. 606-16.
259. Li J., Li H., Zhan D., Xiang M., Yang J., Zuo Y., Yu Y., Zhou H., Jiang D., Luo H., Chen Z., Yu Z., Xu Z. Niclosamide sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation by downregulating Ku70/80 expression // *J Cancer.* – 2018. – T. 9, № 4. – C. 736-744.
260. Hirsch H. A., Iliopoulos D., Tsiachlis P. N., Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission // *Cancer Res.* – 2009. – T. 69, № 19. – C. 7507-11.
261. Storozhuk Y., Hopmans S. N., Sanli T., Barron C., Tsiani E., Cutz J. C., Pond G., Wright J., Singh G., Tsakiridis T. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK // *Br J Cancer.* – 2013. – T. 108, № 10. – C. 2021-32.
262. Adeberg S., Bernhardt D., Harrabi S. B., Nicolay N. H., Horner-Rieber J., König L., Repka M., Mohr A., Abdollahi A., Weber K. J., Debus J., Rieken S. Metformin Enhanced in Vitro Radiosensitivity Associates with G2/M Cell Cycle Arrest and Elevated Adenosine-5'-

- monophosphate-activated Protein Kinase Levels in Glioblastoma // *Radiol Oncol.* – 2017. – Т. 51, № 4. – С. 431-437.
263. Liu J., Hou M., Yuan T., Yi G., Zhang S., Shao X., Chen J., Jia X., He Z. 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. – Т. 28, № 4. – С. 1406-12.
264. Kim E. H., Kim M. S., Cho C. K., Jung W. G., Jeong Y. K., Jeong J. H. Low and high linear energy transfer radiation sensitization of HCC cells by metformin // *J Radiat Res.* – 2014. – Т. 55, № 3. – С. 432-42.
265. Zhang T., Zhang L., Zhang T., Fan J., Wu K., Guan Z., Wang X., Li L., Hsieh J. T., He D., Guo P. Metformin sensitizes prostate cancer cells to radiation through EGFR/p-DNA-PKCS in vitro and in vivo // *Radiat Res.* – 2014. – Т. 181, № 6. – С. 641-9.
266. Kalender A., Selvaraj A., Kim S. Y., Gulati P., Brule S., Viollet B., Kemp B. E., Bardeesy N., Dennis P., Schlager J. J., Marette A., Kozma S. C., Thomas G. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner // *Cell Metab.* – 2010. – Т. 11, № 5. – С. 390-401.
267. Pollack M. N. Insulin, insulin-like growth factors, insulin resistance, and neoplasia // *Am J Clin Nutr.* – 2007. – Т. 86, № 3. – С. s820-2.
268. Jung J. W., Park S. B., Lee S. J., Seo M. S., Trosko J. E., Kang K. S. Metformin represses self-renewal of the human breast carcinoma stem cells via inhibition of estrogen receptor-mediated OCT4 expression // *PLoS One.* – 2011. – Т. 6, № 11. – С. e28068.
269. Zannella V. E., Dal Pra A., Muaddi H., McKee T. D., Stapleton S., Sykes J., Glicksman R., Chaib S., Zamiara P., Milosevic M., Wouters B. G., Bristow R. G., Koritzinsky M. Reprogramming metabolism with metformin improves tumor oxygenation and radiotherapy response // *Clin Cancer Res.* – 2013. – Т. 19, № 24. – С. 6741-50.
270. Hirschmann-Jax C., Foster A. E., Wulf G. G., Goodell M. A., Brenner M. K. A distinct "side population" of cells in human tumor cells: implications for tumor biology and therapy // *Cell Cycle.* – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 203-5.
271. Арзуманов С. С., Сафронов В. В., Стрепетов А. Н. Определение поглощенной в биологическом образце дозы при смешанном гамма-нейтронном облучении // *ЖТФ* – 2018. – Т. 88, № 10. – С. 1581–1584;
272. Lee H. E., Kim J. H., Kim Y. J., Choi S. Y., Kim S. W., Kang E., Chung I. Y., Kim I. A., Kim E. J., Choi Y., Ryu H. S., Park S. Y. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer // *Br J Cancer.* – 2011. – Т. 104, № 11. – С. 1730-8.
273. Коггл Дж. Биологические эффекты радиации. Пер. с англ. – Москва: Энергоатомиздат. – 1986. – 184 с.
274. Goodhead D. T. Neutrons are forever! Historical perspectives // *Int J Radiat Biol.* – 2019. – Т. 95, № 7. – С. 957-984.
275. Nickoloff J. A., Sharma N., Taylor L. Clustered DNA Double-Strand Breaks: Biological Effects and Relevance to Cancer Radiotherapy // *Genes (Basel).* – 2020. – Т. 11, № 1.

276. Kraus L. A., Samuel S. K., Schmid S. M., Dykes D. J., Waud W. R., Bissery M. C. The mechanism of action of docetaxel (Taxotere) in xenograft models is not limited to bcl-2 phosphorylation // *Invest New Drugs*. – 2003. – T. 21, № 3. – C. 259-68.
277. Brunsvig P. F., Andersen A., Aamdal S., Kristensen V., Olsen H. Pharmacokinetic analysis of two different docetaxel dose levels in patients with non-small cell lung cancer treated with docetaxel as monotherapy or with concurrent radiotherapy // *BMC Cancer*. – 2007. – T. 7. – C. 197.
278. Baker S. D., Zhao M., Lee C. K., Verweij J., Zabelina Y., Brahmer J. R., Wolff A. C., Sparreboom A., Carducci M. A. Comparative pharmacokinetics of weekly and every-three-weeks docetaxel // *Clin Cancer Res*. – 2004. – T. 10, № 6. – C. 1976-83.
279. Mori T., Kinoshita Y., Watanabe A., Yamaguchi T., Hosokawa K., Honjo H. Retention of paclitaxel in cancer cells for 1 week in vivo and in vitro // *Cancer Chemother Pharmacol*. – 2006. – T. 58, № 5. – C. 665-72.
280. Demetri G. D., Lo Russo P., MacPherson I. R., Wang D., Morgan J. A., Brunton V. G., Paliwal P., Agrawal S., Voi M., Evans T. R. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of dasatinib in patients with advanced solid tumors // *Clin Cancer Res*. – 2009. – T. 15, № 19. – C. 6232-40.
281. Yin L., Gao Y., Zhang X., Wang J., Ding D., Zhang Y., Zhang J., Chen H. Niclosamide sensitizes triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation in association with the inhibition of Wnt/beta-catenin signaling // *Oncotarget*. – 2016. – T. 7, № 27. – C. 42126-42138.
282. Arend R. C., Londono-Joshi A. I., Gangrade A., Katre A. A., Kurpad C., Li Y., Samant R. S., Li P. K., Landen C. N., Yang E. S., Hidalgo B., Alvarez R. D., Straughn J. M., Forero A., Buchsbaum D. J. Niclosamide and its analogs are potent inhibitors of Wnt/beta-catenin, mTOR and STAT3 signaling in ovarian cancer // *Oncotarget*. – 2016. – T. 7, № 52. – C. 86803-86815.
283. Жирник А. С. Сёмочкина Ю. П., Москалёва Е. Ю. Ингибирование репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках колоректального рака человека с помощью никлозамида // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2019. – Т. 59, № 2. – С. 214–221.
284. Chang Y. W. и Yeh T. K. и Lin K. T. и Chen W. C. и Yao H. T. и Lan S. J. и Wu Y. S. и Hsieh H. P. и Chen C. M. и Chen C. T. Pharmacokinetics of anti-SARS-CoV agent niclosamide and its analogs in rats // *J. Food Drug Anal*. – 2006. – Т. 14, № 4. – С. 329 – 333.
285. Dell'Aglia D. M., Perino L. J., Kazzi Z., Abramson J., Schwartz M. D., Morgan B. W. Acute metformin overdose: examining serum pH, lactate level, and metformin concentrations in survivors versus nonsurvivors: a systematic review of the literature // *Ann Emerg Med*. – 2009. – Т. 54, № 6. – С. 818-23.
286. Lord S. R., Cheng W. C., Liu D., Gaude E., Haider S., Metcalf T., Patel N., Teoh E. J., Gleeson F., Bradley K., Wigfield S., Zois C., McGowan D. R., Ah-See M. L., Thompson A. M., Sharma A., Bidaut L., Pollak M., Roy P. G., Karpe F., James T., English R., Adams R. F., Campo L., Ayers L., Snell C., Roxanis I., Frezza C., Fenwick J. D., Buffa F. M., Harris A. L. Integrated Pharmacodynamic Analysis Identifies Two Metabolic Adaption Pathways to Metformin in Breast Cancer // *Cell Metab*. – 2018. – Т. 28, № 5. – C. 679-688 e4.

287. Wang J. L., Yu J. P., Sun Z. Q., Sun S. P. Radiobiological characteristics of cancer stem cells from esophageal cancer cell lines // *World J Gastroenterol.* – 2014. – T. 20, № 48. – С. 18296-305.
288. Yousefnia S., Ghaedi K., Seyed Forootan F., Nasr Esfahani M. H. Characterization of the stemness potency of mammospheres isolated from the breast cancer cell lines // *Tumour Biol.* – 2019. – T. 41, № 8. – С. 1010428319869101.
289. Valencia-Gonzalez H. A., Ruiz G., Ortiz-Sanchez E., Garcia-Carranca A. Cancer Stem Cells from Tumor Cell Lines Activate the DNA Damage Response Pathway after Ionizing Radiation More Efficiently Than Noncancer Stem Cells // *Stem Cells Int.* – 2019. – T. 2019. – С. 7038953.
290. Krause M., Dubrovskaya A., Linge A., Baumann M. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2017. – T. 109. – С. 63-73.
291. Zamulaeva I. A., Selivanova E. I., Kiseleva V. I., Matchuk O. N., Krikunova L. I., Mkrtchyan L. S., Kaprin A. D. Correlation of Radiation Response of Cervical Cancer Stem Cells with Their Initial Number before Treatment and Molecular Genetic Features of Papillomavirus Infection // *Bull Exp Biol Med.* – 2020. – T. 170, № 2. – С. 241-245.
292. Zamulaeva I. A., Selivanova E. I., Matchuk O. N., Kiseleva V. I., Mkrtchyan L. S., Krikunova L. I. Radiation Response of Cervical Cancer Stem Cells Is Associated with Pretreatment Proportion of These Cells and Physical Status of HPV DNA // *Int J Mol Sci.* – 2021. – T. 22, № 3.
293. Kowalchuk R. O., Corbin K. S., Jimenez R. B. Particle Therapy for Breast Cancer // *Cancers (Basel).* – 2022. – T. 14, № 4.
294. Ruan H., Okamoto M., Ohno T., Li Y., Zhou Y. Particle radiotherapy for breast cancer // *Front Oncol.* – 2023. – T. 13. – С. 1107703.
295. Москалёва Е. Ю., Перевозчикова В. Г., Жирник А. С., Северин С. Е. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности никлозамида // *Биомедицинская химия.* – 2015. – Т. 61, № 6. – С. 680–693.
296. Xiang M., Chen Z., Yang D., Li H., Zuo Y., Li J., Zhang W., Zhou H., Jiang D., Xu Z., Yu Z. Niclosamide enhances the antitumor effects of radiation by inhibiting the hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor signaling pathway in human lung cancer cells // *Oncol Lett.* – 2017. – T. 14, № 2. – С. 1933-1938.
297. Жирник А. С., Семочкина Ю. П., Москалева Е. Ю., Крылов Н. И., Тубашева И. А., Кузнецов С. Л., Воронцов Е. А. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида в отношении клеток колоректального рака // *Биомедицинская химия.* – 2017. – Т. 63, № 2. – С. 132–138.
298. Jiang H., Li A. M., Ye J. The magic bullet: Niclosamide // *Front Oncol.* – 2022. – T. 12. – С. 1004978.
299. Wu C. L., Chen C. L., Huang H. S., Yu D. S. A new niclosamide derivatives-B17 can inhibit urological cancers growth through apoptosis-related pathway // *Cancer Med.* – 2018. – T. 7, № 8. – С. 3945-3954.

300. Mokgautsi N., Wen Y. T., Lawal B., Khedkar H., Sumitra M. R., Wu A. T. H., Huang H. S. An Integrated Bioinformatics Study of a Novel Niclosamide Derivative, NSC765689, a Potential GSK3 β /beta-Catenin/STAT3/CD44 Suppressor with Anti-Glioblastoma Properties // *Int J Mol Sci.* – 2021. – T. 22, № 5.
301. Mook R. A., Jr., Wang J., Ren X. R., Chen M., Spasojevic I., Barak L. S., Lysterly H. K., Chen W. Structure-activity studies of Wnt/beta-catenin inhibition in the Niclosamide chemotype: Identification of derivatives with improved drug exposure // *Bioorg Med Chem.* – 2015. – T. 23, № 17. – C. 5829-38.
302. Li Z., Xu J., Lang Y., Fan X., Kuo L., D'Brant L., Hu S., Samrat S. K., Trudeau N., Tharappel A. M., Rugenstein N., Koetzner C. A., Zhang J., Chen H., Kramer L. D., Butler D., Zhang Q. Y., Zhou J., Li H. JMX0207, a Niclosamide Derivative with Improved Pharmacokinetics, Suppresses Zika Virus Infection Both In Vitro and In Vivo // *ACS Infect Dis.* – 2020. – T. 6, № 10. – C. 2616-2628.
303. Evans J. M., Donnelly L. A., Emslie-Smith A. M., Alessi D. R., Morris A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients // *BMJ.* – 2005. – T. 330, № 7503. – C. 1304-5.
304. Song C. W., Lee H., Dings R. P., Williams B., Powers J., Santos T. D., Choi B. H., Park H. J. Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells // *Sci Rep.* – 2012. – T. 2. – C. 362.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит научного руководителя доктора биологических наук, профессора Елизавету Юрьевну Москалеву за разработку концепции исследования, помощь в планировании экспериментов, интерпритации данных, а также за внимательное отношение и постоянную поддержку. Автор также выражает признательность доктору биологических наук Галине Аровне Посыпановой за помощь в работе с клетками, кандидату биологических наук Алле Валерьевне Родиной за ценные советы, кандидату биологических наук Александру Сергеевичу Жирнику за решение организационных вопросов и всем коллегам за доброжелательную рабочую атмосферу и готовность помочь.

ПРИЛОЖЕНИЕ

УТВЕРЖДАЮ

И.о. руководителя
Курчатовского комплекса
НБИКС-природоподобных технологий

С.А. Мирошніченко

025 г.



AKT

о внедрении результатов диссертационного исследования
Шуватовой Валентины Георгиевны в научно-исследовательскую
деятельность федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Комиссия в составе:

председатель – первый заместитель руководителя Комплекса
по научной работе Демин В.А.

Члены комиссии:

- начальник лаборатории сверхсильных световых полей
КК НБИКС-ПТ Назаров М.М.
- научный сотрудник лаборатории сверхсильных световых полей
КК НБИКС-ПТ Семенов Т.А.
- начальник лаборатории клеточной биологии, молекулярной
медицины и иммунологии КК НБИКС-ПТ Жирник А.С.
- старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии,
молекулярной медицины и иммунологии КК НБИКС-ПТ
Родина А.В.
- заместитель руководителя Комплекса – ученый секретарь
Тимаева О.И.

настоящим актом подтверждает, что научные подходы и результаты, полученные Шуватовой Валентиной Георгиевной при проведении диссертационного исследования на тему «Характеристика радиоустойчивости опухолевых стволовых клеток рака молочной железы линии MCF-7 и её снижение с помощью препаратов, обладающих активностью ингибиторов сигнальных путей», были использованы при планировании, обеспечении дозиметрии и проведении экспериментов,

выполненных в НИЦ «Курчатовский институт», по изучению биологического действия пучков ультракороткой длительности и высокого заряда, обеспечивающих экстремальную скорость ввода ионизирующей дозы, что актуально для исследования «FLASH-эффекта».

Комиссией установлено, что В.Г.Шуватова во время проведения диссертационного исследования в период с 2017 по 2025 гг. разработала следующие научно-технические решения:

1. Оптимизировала процессы количественной обработки данных радиобиологических экспериментов.
2. Экспериментально обосновала выбор эффективных доз и панель наиболее чувствительных маркеров для количественного анализа биологических эффектов ионизирующих излучений разных типов в опухолевых клетках разных линий.

Эффективность использования научных результатов, полученных В.Г. Шуватовой, отмечена в научно-техническом отчете по подтеме «Фундаментальные исследования в области сверхсильных световых полей» (Рег. № НИОКТР 123061500009-7) за 2025 г.

Председатель комиссии:

Первый заместитель руководителя
Комплекса по научной работе, д.ф.-м.н.



Демин В.А.

Члены комиссии:

Начальник лаборатории сверхсильных
световых полей КК НБИКС-ПТ, к.ф.-м.н.



Назаров М.М.

Научный сотрудник лаборатории
сверхсильных световых полей
КК НБИКС-ПТ, к.ф.-м.н.



Семенов Т.А.

Начальник лаборатории клеточной
биологии, молекулярной медицины и
иммунологии КК НБИКС-ПТ, к.б.н.



Жирник А.С.

Старший научный сотрудник
лаборатории клеточной биологии,
молекулярной медицины и иммунологии
КК НБИКС-ПТ, к.б.н.



Родина А.В.

Заместитель руководителя Комплекса –
ученый секретарь, к.х.н.



Тимаева О.И.