

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СОЧЕТАННОГО
ДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ И ИОНОВ УГЛЕРОДА НА ПУЛ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ IN VITRO**

*Замулаева И.А.^{1,2}, Матчук О.Н.^{1,2}, Якимова А.О.¹, Корякин С.Н.^{1,3}, Пикалов В.А.⁴,
Иванов С.А.^{1,5}*

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

²Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

³ Обнинский институт атомной энергетики – филиал «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия

⁴ Институт физики высоких энергий имени А.А. Логунова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Протвино, Россия

⁵Российский университет дружбы народов, Москва, Россия
e-mail: zamuraeva@mail.ru

Резюме. Эффекты сочетанного действия протонов и ионов $^{12}\text{C}^{6+}$ на пул опухолевых стволовых клеток (ОСК) зависят от молекулярного подтипа рака молочной железы. Наилучший результат в плане снижения абсолютного количества ОСК получен в случае последовательного облучения ионами углерода, затем протонами при их одинаковом вкладе в суммарную эквивалентную дозу. Для линии люминального подтипа показана зависимость пострадиационного количества ОСК от экспрессии генов *BCL2*, *PRKDC*, *CHOP*, *CDH2*, *BECLINI*, *SLUG*.

Ключевые слова: рак молочной железы, опухолевые стволовые клетки, экспрессия генов, протоны, ионы углерода

**MOLECULAR AND CELLULAR REGULARITIES OF COMBINED ACTION OF
PROTONS AND CARBON IONS ON BREAST CANCER STEM CELLS
IN CELL CULTURES IN VITRO**

*Zamuraeva I.A.^{1,2}, Matchuk O.N.^{1,2}, Yakimova A.O.¹, Koryakin S.N.^{1,3}, Pikalov V.A.⁴,
S.A. Ivanov^{1,5}*

¹ A. Tsyb Medical Radiological Research Center - Branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

² Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

³ Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering - Branch of the National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia

⁴ Institute of High Energy Physics Named by A.A. Logunov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Protvino, Russia

⁵ RUDN University, Moscow, Russia

Summary. The effects of combined action of protons and $^{12}\text{C}^{6+}$ ions on pool of cancer stem cells (CSCs) depend on molecular subtype of breast cancer. The best result in terms of reducing the CSC absolute number was obtained in case of successive irradiation with carbon ions, then with protons with their equal contribution to the total equieffective dose. For luminal subtype, the dependence of postradiation number of CSCs on the expression of genes *BCL2*, *PRKDC*, *CHOP*, *CDH2*, *BECLINI*, *SLUG* was shown.

Keywords: breast cancer, cancer stem cells, gene expression, protons, carbon ions

Одним из наиболее перспективных направлений развития лучевой терапии является использование ускоренных заряженных частиц (прежде всего протонов и ионов углерода) для лечения онкологических заболеваний. Благодаря особому

пространственному распределению дозы ионизирующего излучения с максимальной потерей энергии частиц в конце траектории их движения (т.н. пике Брэгга), потоки заряженных частиц обеспечивают облучение опухолевой ткани без превышения толерантных доз для нормальных тканей, даже если мишень вплотную прилегает к критическим структурам организма. Однако относительная биологическая эффективность (ОБЭ) протонного излучения в плане элиминации злокачественных новообразований невелика и, по мнению большинства специалистов, лишь в 1,1 раза превышает эффективность фотонного излучения [1], что не позволяет преодолеть радиорезистентность части опухолей и в ряде случаев приводит к неудовлетворительным клиническим результатам лечения. ОБЭ ионов углерода значительно выше, составляя обычно 2,5-3 и даже до 5 по данным разных авторов в зависимости от энергии частиц, дозы, типа клеток и др. [2]. Но в этом случае спектр вторичного излучения меняется на протяжении всего пробега первичных ионов, что создает неравномерное по биологической дозе поле облучения и приводит к необходимости использовать несколько направлений облучения.

Как правило, пучки протонов и ионов углерода используются в режиме монотерапии, в том числе для лечения рака молочной железы (РМЖ). Но в последнее время развивается идея об их совместном использовании для лечения, прежде всего радиорезистентных опухолей, близко расположенных к жизненно важным органам [3,4]. При этом следует отметить, что эффекты сочетанного действия протонов и ионов ^{12}C на молекулярном и клеточном уровнях практически не изучены. Особенно важно понимать закономерности и механизмы ответа на такое сочетанное радиационное воздействие опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые обладают более высокой резистентностью к традиционным противоопухолевым воздействиям (γ -, рентгеновскому излучению и многим химиопрепаратам) по сравнению с остальной массой опухолевых клеток. Полагают, что именно сохранение ОСК после противоопухолевой терапии приводит к рецидивированию опухолевого процесса у части больных и метастазированию [5].

Целью работы является оценка изменений пула ОСК молочной железы и экспрессии генов, потенциально связанных с пострадиационным формированием пула ОСК, после сочетанного воздействия протонов и ионов углерода (в обеих последовательностях) с одинаковым и разным вкладом излучений в суммарную дозу *in vitro*.

Материалы и методы. В работе изучен радиационный ответ ОСК двух клеточных линий РМЖ: MCF-7 люминального А подтипа (ER+PrR+ HER2neu-) и MDA-MB-231, представляющей т.н. тройной негативный подтип (ER-PrR- HER2neu-). Выбор указанных клеточных линий обусловлен тем, что люминальный подтип является наиболее часто встречающимся среди случаев РМЖ, а тройной негативный – наиболее агрессивным.

Клетки линии MCF-7, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), и MDA-MB-231 из Американской типовой коллекции клеточных культур (Вирджиния, США) культивировали в стандартных условиях *in vitro*. Клетки в логарифмической стадии роста подвергали воздействию пучка протонов в активно-модулированном пике Брэгга (энергии протонов 67-83 МэВ) на комплексе протонной терапии «Прометеус» (АО «Протом», Россия). Облучение ионами углерода $^{12}\text{C}^{6+}$ с начальной энергией 400 МэВ/нуклон, проводили в пике Брэгга, модифицированном посредством гребенчатого фильтра, на установке Института физики высоких энергий имени А.А. Логунова НИЦ «Курчатовский институт». Указанные излучения использовали по отдельности или в сочетании друг с другом в последовательностях «Ионы углерода - протоны» и

«Протоны - ионы углерода» при одинаковом и разном вкладе ионизирующих излучений в суммарную эквивалентную дозу (ЭКД) 4Гр с интервалом 4-6 ч между сеансами облучения. Расчет вклада каждого излучения в ЭКД производился с учетом ОБЭ протонов и ионов углерода, принятых за 1,0 и 2,0, соответственно.

Идентификацию и количественную оценку ОСК выполняли через 48 ч после облучения с помощью проточной цитометрии по иммунофенотипу CD44⁺CD24^{-low}, который наиболее часто используется в различных исследованиях для выявления ОСК РМЖ.

С помощью метода ПЦР в режиме реального времени определяли относительный уровень экспрессии генов нескольких частично перекрывающихся функциональных групп, потенциально связанных с формированием пула ОСК после облучения: 1) Маркеры ОСК, регуляция стволового состояния (*NANOG*, *OCT4*, *SNAIL*, *SLUG*); 2) Маркеры и регуляция процесса эпителиально-мезенхимальной транзиции (*VIM*, *OCLN*, *CDH1*, *CDH2*, *SNAIL*, *SLUG*); 3) Гибель клеток (про- и антиапоптотические факторы, аутофагия) (*BCL2*, *BAX*, *CHOP*, *BECLIN1*); 4) Контроль клеточного цикла и репарация повреждений ДНК (*GADD45A*, *FEN1*, *PRKDC*). Через 24 ч после облучения клетки лизировали и выделяли РНК с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора «MMLV RT» (Евроген, Россия). Дизайн геноспецифических праймеров выполняли при помощи онлайн-сервиса Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>), синтез праймеров осуществляла компания «Бигль» (Россия). Анализ уровня экспрессии генов осуществляли на амплификаторе «Rotor Gene» («Corbet Research», Австралия) с использованием набора реагентов qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. В качестве референса была выбрана комбинация генов «домашнего хозяйства» *GAPDH* и *IPO8*. Обработку данных для оценки уровня экспрессии каждого из исследуемых генов проводили методом ΔΔCt.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программ «Origin 6.0» (Microcal Software, Inc.) и «Statistica 6.0» (StatSoft., Inc.).

Результаты и обсуждение. Среднее количество (\pm SE) ОСК линии MCF-7 в контроле составляло $0,29 \pm 0,04\%$ и статистически значимо не менялось при одиночном действии протонов и ионов ^{12}C в ЭКД 2,0Гр. Эффекты сочетанного облучения этой клеточной культуры зависели от последовательности воздействия ионизирующих излучений: относительное количество ОСК увеличивалось при облучении протонами, потом ионами углерода, и не изменялось в случае обратной последовательности. Наиболее благоприятный результат в плане элиминации ОСК (по критерию уменьшения их абсолютного количества) зарегистрирован в случае последовательного облучения ионами углерода - протонами и при их одинаковом вкладе в суммарную ЭКД: после сочетанного облучения в таком варианте абсолютное количество ОСК в среднем уменьшалось в 2,1 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Контрольный уровень относительного количества ОСК линии MDA-MB-231 был существенно выше, чем в культуре MCF-7 ($p < 0,0001$), составляя в среднем $76,3 \pm 2,0\%$. Установлено статистически значимое уменьшение как относительного, так и абсолютного количества ОСК этой линии при всех вариантах одиночных и сочетанных воздействий. Так, абсолютное количество ОСК этой линии уменьшалось под влиянием всех вариантов облучения в 1,7-2,8 раза по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

В целом, отмечена широкая вариабельность относительного количества ОСК после использованных вариантов радиационного воздействия: в культуре MCF-7 этот показатель варьировал от 0,25% до 0,93%, в культуре MDA-MB-231 - от 52,2% до

68,2%. Выполнен множественный регрессионный анализ зависимости относительного количества ОСК линии MCF-7 от уровня экспрессии 15 генов, исследованных в работе. В результате была построена статистически значимая модель, для которой коэффициент множественной корреляции R составил 0,99 при $p < 0,00013$. В модель вошли показатели экспрессии следующих генов: *BCL2* (стандартизированный угловой коэффициент регрессии $\beta = -3,48$, $p = 0,000076$), *PRKDC* ($\beta = 7,54$, $p = 0,000062$), *CHOP* ($\beta = 3,28$, $p = 0,000062$), *CDH2* ($\beta = -1,88$, $p = 0,000089$), *BECLINI* ($\beta = 0,59$, $p = 0,000184$), *SLUG* ($\beta = -0,23$, $p = 0,000469$). Таким образом, в результате множественного регрессионного анализа выявлено 6 генов, экспрессия которых влияет на пострадиационное количество ОСК. Отобранные программой гены относятся ко всем анализируемым функциональным группам, но больше всего генов, которые связаны с клеточной гибелью.

Для ОСК линии MDA-MB-231 статистически значимой модели множественной регрессии построить не удалось ($R = 0,81$, $p = 0,07$), хотя программа автоматически выделила 2 показателя (экспрессия генов *NANOG* и *FENI*), наиболее тесно (хотя и статистически незначимо) связанных с количеством ОСК.

Таким образом, можно заключить, что:

1. Эффекты сочетанного действия протонов и ионов ^{12}C на ОСК зависят от молекулярного подтипа РМЖ.
2. Наиболее негативный результат (увеличение абсолютного количества ОСК) получен в случае РМЖ люминального молекулярного подтипа (линия MCF-7) при последовательном облучении протонами, затем ионами ^{12}C при их вкладе в суммарную ЭКД 80:20%, соответственно.
3. Наиболее позитивный результат в плане снижения абсолютного количества ОСК (в 2,1-2,6 раз по сравнению с контролем) получен в обеих клеточных культурах РМЖ в случае последовательного облучения ионами ^{12}C , а затем протонами при их одинаковом вкладе в суммарную ЭКД.
4. Пострадиационное количество ОСК линии MCF-7 зависит от уровня экспрессии генов *BCL2*, *PRKDC*, *CHOP*, *CDH2*, *BECLINI*, *SLUG*, как показано с помощью множественного регрессионного анализа. В то же время, изменение количества ОСК линии MDA-MB-231 не связано с изменением активности проанализированных генов, что указывает на отличия в регуляции ответа клеток MCF-7 и MDA-MB-231 на радиационное воздействие на молекулярном уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2021-1347.

Литература:

1. Ebner D.K., Malouff T.D., Frank S.J., Koto M. The Role of Particle Therapy in Adenoid Cystic Carcinoma and Mucosal Melanoma of the Head and Neck//Int J Part Ther, 2021, V. 8, P. 273-284.
2. Loap P., De Marzi L., Almeida C.E., Barcellini A., Bradley J., de Santis M.C., Dendale R., Jimenez R., Orlandi E., Kirova Y. Hadrontherapy techniques for breast cancer//Crit Rev Oncol Hematol, 2022, V. 169: 103574.
3. Durante M., Debus J., Loeffler J.S. Physics and biomedical challenges of cancer therapy with accelerated heavy ions // Nat Rev Phys, 2021, V.3, P. 777-790.
4. Kopp B., Mein S., Dokic I., Harrabi S., Böhlen T. T., Haberer T., Debus J., Abdollahi A., Mairani A. Development and Validation of Single Field Multi-Ion Particle Therapy Treatments//Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2020, V.106, P. 194-205.
5. Olivares-Urbano M. A., Griñán-Lisón C., Marchal J. A., Núñez M. I. CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer//Cells, 2020, V.9: 1651.