

## МЕХАНИЗМЫ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК SP КУЛЬТУРЫ МЫШИНОЙ МЕЛАНОМЫ B16

© О. Н. Матчук,<sup>1</sup> И. А. Замулаева, О. А. Ковалев, А. С. Саенко

Медицинский радиологический научный центр  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск;  
<sup>1</sup> электронный адрес: matchyk@mail.ru

Ранее нами показано, что клетки SP культуры мышинной меланомы B16 более резистентны к действию редкоизионизирующего излучения, чем остальная масса опухолевых клеток (Матчук и др., 2012). В настоящей работе исследовали некоторые механизмы этой резистентности, а именно распределение клеток SP по фазам цикла, количество спонтанных и радиационно-индуцированных двухнитевых повреждений ДНК (фокусов  $\gamma$ H2AX) и внутриклеточную концентрацию NO. Результаты свидетельствуют о том, что в клетках SP после облучения в дозе 3 Гр возникает меньше двухнитевых повреждений ДНК, чем в других клетках культуры (не SP) (24.4 против 40.3 соответственно,  $P < 0.05$  по критерию Манна—Уитни). Клетки SP находятся в состоянии относительного пролиферативного покоя по сравнению с не SP-клетками (фракция  $G_1/G_0$  составляет 85 % против 39 соответственно,  $P < 0.01$ ). Большинство клеток не SP находится в радиочувствительных фазах S,  $G_2$  и M (61 %). Таким образом, различие в радиочувствительности клеток SP и не SP частично может объясняться разным распределением клеток изучаемых популяций по фазам цикла. Концентрация NO в 1.5 раза выше в клетках SP, чем в не SP ( $P < 0.05$ ). Поскольку известно, что NO ингибирует апоптоз, который является одним из механизмов сохранения генетической стабильности клеток, неудивительно, что спонтанное количество двухнитевых повреждений в клетках SP также больше по сравнению с клетками не SP ( $P < 0.05$ ). Полученные результаты в значительной степени объясняют более высокую резистентность клеток SP к действию редкоизионизирующего излучения по сравнению с остальными клетками. Дальнейшее изучение этого вопроса является основой для разработки средств направленного воздействия на SP и в конечном итоге повышения эффективности лечения онкологических заболеваний.

Ключевые слова: side population, меланома B16, клеточный цикл, фокусы  $\gamma$ H2AX, оксид азота.

Принятые сокращения: ОСК — опухолевые стволовые клетки, BSA — бычий сывороточный альбумин, Ho342 — Хёхст 33342 (Hoechst 33342), PI — иодистый пропилий, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор, SP — боковая популяция (side population).

Меланома относится к наиболее агрессивным злокачественным новообразованиям, трудно поддающимся радио- и химиотерапии, и ежегодно является причиной смерти приблизительно 50 тыс. человек в мире (Dean, Lorigan, 2012). На клеточном уровне одной из причин высокой устойчивости к терапии является существование опухолевых стволовых клеток (ОСК), обнаруженных как в опухолевой ткани, так и в стабильных клеточных культурах меланомы, несмотря на известные сложности идентификации таких клеток. Фактически из-за отсутствия специфических маркеров ОСК в настоящее время имеется возможность выявления только популяций, обогащенных этими клетками, по различным иммуноморфологическим признакам и функциональным особенностям. При изучении таких популяций в первичных опухолях и стабильных клеточных линиях показано, что ОСК обладают более высокой резистентностью к различным противоопухолевым воздействиям, чем остальная основная масса клеток, и имеют ряд структурно-функциональных и молекулярных особенностей, характерных для стволовых клеток нормальных тканей (Clarke et al., 2006; Hadnagy

et al., 2006; Fábíán et al., 2013). Дальнейшее изучение свойств ОСК представляет особый интерес, поскольку именно с неполной ликвидацией этих клеток связывают неудачи при лечении онкологических больных. Понимание механизмов радиорезистентности ОСК является основой для разработки средств направленного воздействия на эту популяцию и в конечном итоге для повышения эффективности лечения онкологических заболеваний (Проскураков и др., 2011).

Одним из способов идентификации популяций, обогащенных ОСК, является проточно-цитометрическое выявление клеток, обладающих способностью активно исключать флуоресцентный краситель Хёхст 33342 (Ho342) с помощью АТФ-связывающих транспортеров. Эти клетки слабо окрашиваются Ho342 и формируют так называемую боковую популяцию (side population — SP) (Goodell et al., 1996). Учитывая широкое распространение этого термина в мировой литературе, в настоящей работе использовали его английскую аббревиатуру, а для обозначения остальных клеток в культуре — словосочетание «не SP». При блокировке активности комплекса

АТФ-связывающих транспортеров с помощью ряда веществ, например, верапамила, клетки SP теряют способность исключать Но342 и не отличаются по флуоресценции от основной массы клеток, что используется в качестве контроля при поиске SP в разных клеточных культурах.

В стабильной клеточной культуре меланомы B16 нами и другими исследователями (Dou et al., 2009) было показано наличие клеток SP, составляющих около 1 % от всей популяции, и установлено, что они обладают более высокой резистентностью к редкоизионизирующему излучению по сравнению с основной массой клеток (Матчук и др., 2012). Однако остается открытым вопрос о тех характеристиках SP клеточной культуры меланомы B16, которые могли бы оказывать существенное влияние на чувствительность клеток к повреждающему действию химио- или радиотерапии (пролиферативной активности, количестве радиационно-индуцированных двухнитевых разрывов ДНК, внутриклеточной концентрации оксида азота (NO)). Поэтому целью данной работы является сравнительное исследование перечисленных характеристик клеток SP и не SP меланомы линии B16.

### Материал и методика

Клетки мышинной меланомы линии B16 культивировали в питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США), пенициллин (50 ед./мл), стрептомицин (50 мкг/мл) и глютамин (292 мкг/мл), в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (NuAire, США) при 37 °C с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub> в пластиковых флаконах (SPL, Китай).

Выделение SP проводили по стандартной методике (Goodell et al., 1996). По достижении 80 % конfluence клетки снимали с подложки с помощью раствора Версена (Пан-Эко, Россия) в среду DMEM (ПанЭко, Россия), содержащую пенициллин (50 ед./мл), стрептоми-

цин (50 мкг/мл) и глютамин (292 мкг/мл). Затем в камере Горяева считали количество клеток и готовили суспензию с концентрацией  $1 \cdot 10^6$  кл./мл в той же среде. К суспензии клеток добавляли флуоресцентный краситель Но342 (BD, Pharmingen, США) до конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали 60 мин при 37 °C и периодическом перемешивании. К части проб за 15 мин до внесения Но342 добавляли верапамил (ABBOTT GmbH & Co. KG, Германия) до конечной концентрации 25 мкг/мл. После окончания инкубации клетки центрифугировали 5 мин при 200 g и добавляли к получившемуся осадку 1 мл холодного раствора Хэнкса (Пан-Эко, Россия), содержащего 2 % эмбриональной сыворотки (Gibco, США) и 10 mM Heps (Sigma-Aldrich, США). Затем осадок ресуспендировали, к суспензии клеток добавляли иодид пропидия (PI) до конечной концентрации 2 мкг/мл и фильтровали с помощью нейлонового фильтра (с диаметром пор 40 мкм). Полученные образцы немедленно анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Vantage (BDIS, США), юстированного и калиброванного по стандартным микросферам (Polyscience, США) в соответствии с методикой, рекомендованной фирмой-изготовителем. Флуоресценцию Но342 измеряли в синей ( $424 \pm 20$  нм) и красной ( $675 \pm 20$  нм) областях спектра, PI — при длине волны  $585 \pm 20$  нм.

Данные обрабатывали с помощью программы Cell-QuestPro (BDIS, США). На первом этапе из анализа исключали мертвые и погибающие клетки с помощью данных о флуоресценции PI, отбирая группу PI- клеток. Для выявления клеток SP строили графики распределения PI-клеток по интенсивности флуоресценции Но342 в указанных областях спектра (рис. 1). На графиках выделяли область SP, основываясь на сравнении образцов с использованием верапамила и без него таким образом, чтобы разница между долей SP в этих образцах была максимальной. Это связано с тем, что верапамил является одним из блокаторов комплекса АТФ-связывающих транспортеров и препятствует обратному транспорту Но342 и ряда других веществ из клетки.

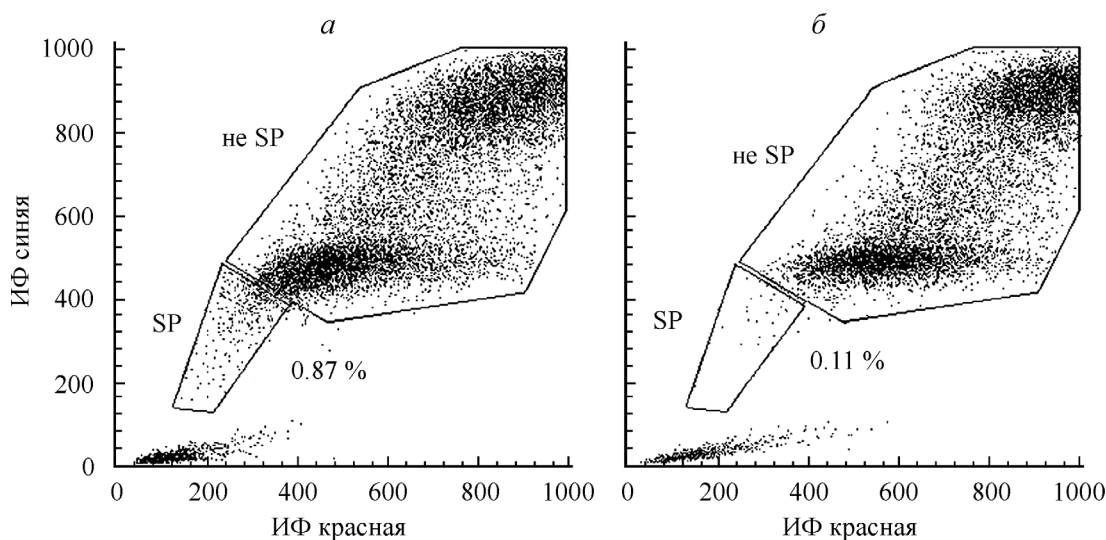


Рис. 1. Гистограмма распределения клеток меланомы B16 в логарифмической фазе роста по интенсивности флуоресценции (ИФ) в синей и красной областях спектра с выделением клеток SP и не SP.

Использовали стандартное окрашивание с помощью Но342 в отсутствие (а) и в присутствии (б) верапамила. Доля клеток SP составляет около 0.9 и 0.1 % от общего числа клеток в отсутствие и присутствии верапамила соответственно; общее количество клеток 100 тыс., на рисунке показано 30 тыс. клеток.

Клетки SP и не SP сортировали с помощью проточного цитофлуориметра после контроля качества сортировки по стандартным микросферам CaliBRITE, меченным разными флуорохромами (BDIS, США). Чистота сортируемых событий составляла не менее 95 % в каждом из экспериментов. Сортировку клеток производили в 5-миллилитровые пробирки (для последующего анализа фаз клеточного цикла), или на предметные стекла (для определения размера клеток с помощью световой микроскопии), или на покровные стекла в чашках Петри (для последующего культивирования и определения количества фокусов  $\gamma$ H2AX). В последнем случае выполняли сортировку в стерильных условиях.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла. К отсортированным образцам (количество клеток в каждом не менее  $1 \cdot 10^5$ ) добавляли холодный (4 °C) PBS до концентрации  $(1-2) \cdot 10^6$  кл./мл. Затем медленно, при постоянном помешивании, вливали холодный этанол в соотношении 2 : 1. Зафиксированные клетки хранили при 4 °C и анализировали в течение 2 мес.

Фиксированные клетки собирали центрифугированием при 200 g в течение 15 мин. К осадку добавляли 150 мкл окрашивающего раствора (PBS с добавлением PI в конечной концентрации 0.1 мг/мл, 0.1 % Тритона X-100 и 3.9 % ЭДТА) и 150 мкл раствора РНКазы (2 мг/мл) в PBS (все от Sigma-Aldrich, США), перемешивали и инкубировали в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре.

Для анализа использовали проточный цитофлуориметр FACS Calibur (BDIS, США), определяя светорассеяние и интенсивность флуоресценции PI, отражающей содержание ДНК. С помощью программы ModFit 3.1 (BDIS, США) строили гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции и определяли распределение клеток по фазам клеточного цикла.

Оценка двухнитевых повреждений ДНК по количеству фокусов фосфорилированных гистонов  $\gamma$ H2AX. Клетки SP и не SP стерильно сортировали в количестве 2000 с помощью проточного цитофлуориметра на покровные стекла в чашки Петри (3.5 см, Corning, США), заливали полным раствором DMEM (3 мл на 1 чашку) и равномерно распределяли по стеклу. Чашки помещали на 24 ч в  $\text{CO}_2$ -инкубатор при 37 °C с 5%-ным содержанием  $\text{CO}_2$ . После этого, убедившись в том, что не менее 90 % клеток в обеих группах прикрепилось к стеклу, их подвергали воздействию  $\gamma$ -излучения ( $^{60}\text{Co}$ ) на установке «Луч-1» (Россия) в дозе 3.0 Гр (мощность дозы 3.1 Гр/мин). Через 1 ч клетки фиксировали в свежеприготовленном растворе формальдегида (3.7 % в PBS) в течение 10 мин при комнатной температуре и затем отмывали в PBS трижды по 5 мин. Пермеабиллизацию осуществляли с помощью 0.5%-ного Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 10 мин при -20 °C с последующей отмывкой в PBS трижды по 5 мин.

Далее клетки инкубировали с мышинными антителами к  $\gamma$ H2AX (Millipore, США) в разведении 1 : 1000 в смеси PBS, Tween-20 (0.1 %) и бычьего сывороточного альбумина (BSA) (0.5 %) в течение 2 ч при 37 °C. Затем клетки отмывали в этом же растворе трижды по 5 мин и инкубировали с антителами, меченными Alexa 488, к иммуноглобулинам мыши (Sigma, США) в разведении 1 : 1000 и красителем Ho258 (Calbiochem, США) в конечной концентрации 2 мкг/мл. После 3-кратной отмывки в смеси

PBS, Tween-20 и BSA клетки быстро промывали в дистиллированной воде и помещали в среду MOUNT-QUICK (Daido Sangyo CO., LTD, Япония) для последующего микроскопирования. Использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Leica 4000 TCS SPE (Leica Microsystems, Германия) со спектральной детекцией на многоканальном анализаторе. Источником возбуждения служили твердотельные лазеры высокой мощности с длиной волны возбуждения 488 нм (для анализа  $\gamma$ H2AX-фокусов) и 405 нм (для анализа ДНК). Диапазон регистрации флуоресценции был задан в пределах 520—580 нм для лазера 488 нм и 410—505 нм для лазера 405 нм. Обработку полученных изображений проводили в программе Imaris 7.2.3 (Bitplane AG, Швейцария). Считали количество  $\gamma$ H2AX-фокусов, окрашенных антителами в области ядер.

Определение размера клеток. Исследовали клетки меланомы B16 (SP и не SP), предварительно отсортированные с помощью проточного цитофлуориметра на предметные стекла и зафиксированные в метаноле по стандартному протоколу. Фотографии получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE DMI 4000B в режиме светового поля (TL-BF). С помощью компьютерной программы Leica LAS AF Lite 2.1.1 измеряли площадь максимального среза клеток. Условно приняв срезы клеток за окружности, по формуле для площади круга ( $\pi R^2$ ) рассчитывали радиусы клеток. С помощью полученных значений по формуле объема шара ( $4/3 \cdot \pi R^3$ ) определяли объемы исследуемых клеток.

Определение концентрации NO. Использовали зонд DAF-2DA (4,5-diaminofluorescein-2diacetate) (Sigma-Aldrich, США), который реагирует с NO с образованием флуоресцирующего продукта ДАФ-триазола (DAF-2T). Показано, что в широком диапазоне концентраций интенсивность флуоресценции ДАФ-триазола положительно коррелирует с внутриклеточным содержанием NO (Nagano, Yoshimura, 2001). Клетки меланомы снимали с подложки, считали их концентрацию в камере Горяева и готовили аликвоты по  $5 \cdot 10^5$  клеток. Клетки центрифугировали 5 мин при 200 g, к осадку добавляли 0.5 мл среды DMEM без сыворотки, 1 мкл DAF-2DA (5 мМ в DMSO, Sigma-Aldrich, США) и краситель Ho342 в конечной концентрации 5 мкг/мл. К части клеток добавляли нитропруссид натрия в конечной концентрации 10 мМ, являющийся донором NO, для контроля флуоресценции DAF-2T. К части проб за 15 мин до внесения DAF-2DA и Ho342 добавляли верапамил до конечной концентрации 25 мкг/мл для контроля определения SP. Все указанные препараты инкубировали 60 мин при 37 °C и периодическом перемешивании. Для исключения из анализа мертвых и погибающих клеток добавляли PI в конечной концентрации 2 мкг/мл. Каждый образец фильтровали с помощью нейлонового фильтра с диаметром пор 40 мкм. Клетки хранили при 4 °C не более 30 мин и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра. Флуоресценцию Ho342 измеряли в красной ( $675 \pm 20$  нм) и синей ( $424 \pm 20$  нм) областях спектра, возбуждая светом 364 нм, как описано выше. Флуоресценцию DAF-2T регистрировали при длине волны  $525 \pm 30$  нм (возбуждали при 488 нм). В каждой пробе анализировали не менее 200 тыс. клеток. Полученные данные обрабатывали с помощью программы CellQuestPro: выделяли регионы клеток SP и не SP, как описано выше, и анализировали интенсивность флуоресценции DAF-2T, по которой суди-

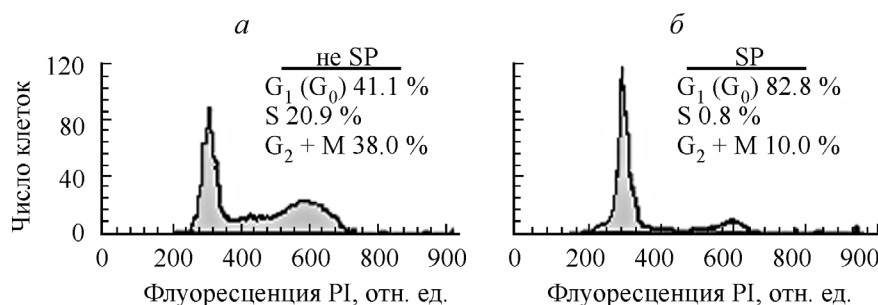


Рис. 2. Типичные гистограммы распределения отсортированных клеток двух популяций меланомы В16 по интенсивности флуоресценции иодистого пропидия (PI).

а — не SP; б — SP.

ли о внутриклеточном содержании NO в выделенных клетках.

По результатам 3 независимых экспериментов рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции DAF-2T в клетках SP и не SP. Для сравнительной оценки концентрации NO среднюю интенсивность флуоресценции DAF-2T в каждой популяции относили к среднему объему клетки и выражали в отн. ед. на 1  $\mu\text{м}^3$ . Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программ Origin 6.0 (MicroCal Software, США) и Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США), используя непараметрический критерий Манна—Уитни. Результаты представлены в виде средних значений и их среднестатистической ошибки.

## Результаты

Доля клеток SP в культуре клеток меланомы В16 в условиях 80 % конfluence составила  $0.9 \pm 0.2$  %, что согласуется с имеющимися в зарубежной литературе данными (Dou et al., 2009).

Распределение клеток по фазам клеточного цикла. Пролиферативную активность отсортированных клеток SP и не SP в логарифмической стадии роста оценивали с помощью проточной цитометрии по суммарной доле клеток в фазах S,  $G_2$  и M (рис. 2). Неоднократные эксперименты показали, что большинство клеток не SP находится в фазе S или  $G_2/M$  (суммарная доля таких клеток составляла  $61 \pm 6$  %), в то время как для клеток SP этот показатель составлял только  $15 \pm 4$  % ( $P < 0.01$ ). Таким образом, большинство ( $85 \pm 4$  %) клеток SP находилось в фазах  $G_1$  и  $G_0$ . И хотя использованный метод не позволяет точно разделить фракции

пролиферирующих и покоящихся клеток изучаемых популяций, полученные результаты свидетельствуют о существенных различиях в распределении клеток SP и не SP по фазам клеточного цикла, а также о состоянии относительного пролиферативного покоя клеток SP.

Двухнитевые повреждения ДНК до и после облучения клеток. Полученные результаты представлены в табл. 1 и на рис. 3. Анализ количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , произведенный с помощью программы Statistica 6.0 по критерию Манна—Уитни, выявил различия ( $P < 0.05$ ) между следующими группами клеток: контрольные клетки SP и не SP ( $P = 0.047$ ); SP и не SP после облучения в дозе 3 Гр ( $P = 0.004$ ); SP контрольные и после облучения в той же дозе ( $P = 0.0004$ ); не SP контрольные и после облучения ( $P < 0.0001$ ).

Таким образом, можно сделать несколько выводов: во-первых, в отсутствие облучения для клеток SP характерно значимо большее количество двухнитевых повреждений ДНК, чем для не SP-клеток; во-вторых, облучение изменяет, а именно увеличивает, количество  $\gamma\text{H2AX}$ -фокусов в обеих группах; в-третьих, действие облучения проявляется значительно сильнее в группе клеток не SP: количество  $\gamma\text{H2AX}$ -фокусов увеличивается в 10 раз и составляет 40.3 в среднем на клетку. В клетках SP количество  $\gamma\text{H2AX}$ -фокусов после облучения всего в 3 раза больше контрольного значения и составляет 24.4 в среднем на клетку.

Концентрация NO в клетках. Средние значения интенсивности флуоресценции DAF-2T в клетках SP и не SP меланомы, полученные из многократных измерений, составили 1464 и 1892 отн. ед. соответственно ( $P < 0.05$ ) (табл. 2). Поскольку интенсивность флуоресценции зависит от размера клеток, полученные данные проанализировали с учетом объема клеток каждой популяции. Средний объем клеток SP и не SP меланомы В16 составлял 972 и 1845  $\mu\text{м}^3$  соответственно ( $P = 0.001$ ). Таким образом, средняя концентрация NO в 1  $\mu\text{м}^3$  клетки составила 1.51 отн. ед. для SP и 1.03 для не SP ( $P < 0.05$ ).

Таблица 1

Количество фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  в клетках до и через 1 ч после облучения в дозе 3 Гр

Популяция клеток	Среднее количество фокусов $\gamma\text{H2AX}$	
	до облучения	после облучения
SP	$7.2 \pm 1.6$	$24.4 \pm 3.7$
Не SP	$4.0 \pm 1.3$	$40.3 \pm 3.4$

Примечание. В каждой группе проанализировано 20—35 клеток; здесь и в табл. 2 даны средние значения и их среднестатистическая ошибка. Различия статистически значимы между всеми группами при  $P < 0.05$  по критерию Манна—Уитни.

## Обсуждение

Как показывают многочисленные исследования, ОСК в различных модельных системах обладают более высокой резистентностью к действию редкоизионизирующего излучения по сравнению с остальной массой клеток (Baumann et al., 2008; Woodward, Bristow, 2009). Недавно это свойство было продемонстрировано нами в отношении SP меланомы В16 с помощью традиционного метода оценки выживаемости клеток (Матчук и др., 2012), одна-

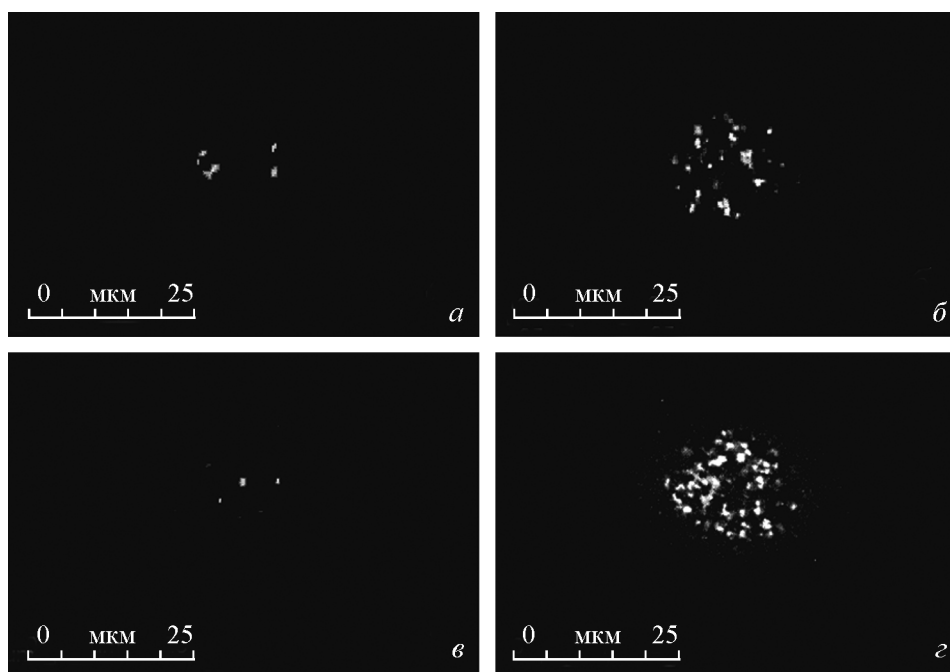


Рис. 3. Фотографии клеток SP (а, б) и не SP (в, з) меланомы B16 до облучения (а, в) и после облучения в дозе 3 Гр (б, з). Лазерная конфокальная микроскопия.

Клетки мечены антителами к фосфорилированным гистонам  $\gamma$ H2AX.

ко механизмы высокой радиорезистентности этой популяции оставались неясными. Поэтому в данной работе изучен ряд факторов, которые, по общепринятым представлениям, оказывают существенное влияние на радиочувствительность различных клеток и могут обуславливать более высокую радиорезистентность клеток SP, чем не SP.

В частности известно, что радиочувствительность клеток зависит от пролиферативной активности и различается в разных фазах клеточного цикла. В связи с этим в данной работе сравнивали распределение клеток SP и не SP по фазам цикла. Согласно полученным данным, клетки SP в основном находятся в фазах  $G_0$  и  $G_1$  (85 %), в то время как клетки не SP — в фазах S,  $G_2$  и M (61 %), причем около 20 % из них — в S-фазе клеточного цикла, в то время как у клеток SP доля S-фазы едва достигает 1 %. Хотя использованный нами подход не позволяет точно определить фракцию пролиферирующих клеток, полученные результаты свидетельствуют о состоянии относительно пролиферативного покоя клеток SP меланомы. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что для ОСК характерно состояние пролиферативного покоя, как и для стволовых клеток нормальных тканей (Yi et al., 2012).

При этом следует отметить немногочисленность данных литературы о пролиферативной активности ОСК в цельной культуре опухолевых клеток (несмотря на обилие данных о высоком пролиферативном потенциале этих клеток, установленном по критериям колониеобразования *in vitro* и формирования опухолевого очага *in vivo* после сортировки ОСК). Результаты большинства исследований других авторов свидетельствуют о низкой пролиферативной активности ОСК (Buczacki et al., 2011; Li, Bhatia, 2011). То же показано и в настоящей работе в отношении клеток SP.

Принято считать, что клетки наиболее радиочувствительны во время нахождения в фазах M и  $G_2$  клеточного цикла. Фазы  $G_0$  и  $G_1$  являются относительно радиорезистентными, а радиочувствительность клеток в S-фазе достаточно сильно изменяется, достигая максимума в ранней S-фазе и минимума — в поздней (Ярмоненко, Вайнсон, 2004; Kim et al., 2012). Большинство клеток SP (в отличие от не SP) находится в относительно радиорезистентных фазах ( $G_0/G_1$ ). В то же время в не SP значительно больше клеток в радиочувствительных фазах  $G_2$  и M. Таким образом, различие в радиочувствительности клеток SP и не SP, по крайней мере частично, может

Таблица 2

**Сравнительная характеристика клеток SP и не SP по общему содержанию и концентрации NO**

Популяция клеток	Объем клеток, мкм <sup>3</sup>	Содержание NO, отн. ед.	[NO] в 1 мкм <sup>3</sup> , отн. ед.
SP	972 ± 84	1464 ± 59	1.51 ± 0.06
Не SP	1845 ± 228	1892 ± 18	1.03 ± 0.1

Примечание. Различия между SP и не SP статистически значимы при  $P < 0.05$  по всем указанным в таблице параметрам.

объясняться разным распределением клеток изучаемых популяций по фазам цикла.

Указанные различия в структуре изучаемых популяций согласуются также и с разным количеством фокусов  $\gamma$ H2AX, формирующихся в клетках SP и не SP в ответ на двухнитевые повреждения ДНК после облучения в дозе 3 Гр. Так, количество фосфогистоновых фокусов в клетках не SP возрастает в 10 раз по сравнению с контрольным и значительно превышает таковое в популяции SP после облучения. В то же время известно, что количество радиационно-индуцированных фокусов  $\gamma$ H2AX в 2—3 раза выше при облучении клеток, находящихся в фазе G<sub>2</sub>, чем в G<sub>1</sub> (Kato et al., 2009). Поэтому неудивительно, что в популяции SP, содержащей в основном клетки в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, возникает меньшее количество таких фокусов, чем в не SP. Частично эти различия могут быть также обусловлены состоянием покоя клеток SP, при котором размеры клеток и ядер меньше, конденсация хроматина и доля гетерохроматина выше, что также снижает эффективность образования фокусов. Известно, что фосфорилирование гистонов H2AX гораздо активнее происходит в участках эухроматина по причине его большей доступности для соответствующих ферментов по сравнению с гетерохроматином (Kinner et al., 2008). Кроме того, следует учитывать также данные о защитном действии гистоновых белков в составе гетерохроматина как перехватчиков радикалов, возникающих при радиационном воздействии и повреждающих ДНК (Falk et al., 2010).

Однако независимо от причин, объясняющих разную эффективность индукции фокусов  $\gamma$ H2AX в SP и не SP, полученные данные свидетельствуют о том, что количество радиационно-индуцированных повреждений ДНК меньше в клетках SP по сравнению с не SP, и этот факт может частично объяснять более высокую радиорезистентность SP по критерию выживаемости.

Одним из важнейших факторов, определяющих радиочувствительность клеток, является их окислительно-восстановительное состояние, которое можно оценивать по различным показателям, в том числе по количеству реактивных форм кислорода и азота. При этом важно не столько их общее содержание в клетке, сколько концентрация, поскольку именно последняя определяет скорость протекания биохимических процессов. Однако, судя по имеющейся литературе, ОСК практически не исследованы в этом отношении. По нашим данным, концентрация NO значимо выше в SP, чем в не SP. Учитывая то, что NO и продукты его окисления повреждают ДНК, ингибируют ферменты репарации повреждений ДНК (Marnett, 2000) и их количество коррелирует с генетической нестабильностью клеток (Замулаева и др., 2007), неудивительно, что количество повреждений ДНК до облучения выше именно в клетках SP. Полученные результаты показывают перспективность дальнейшего изучения роли NO как фактора радиочувствительности клеток SP и не SP. В частности, представляет интерес сравнительная оценка радиационно-индуцированных изменений концентрации NO в этих клетках, поскольку известно, что NO активно участвует в регуляции процессов клеточной гибели и при определенных обстоятельствах способен подавлять апоптоз разных клеток (Beltran et al., 2002; Mahidhara et al., 2003).

Таким образом, показаны различия клеток популяций меланомы линии В16 по пролиферативной активности, количеству спонтанных и радиационно-индуцированных фокусов  $\gamma$ H2AX и концентрации NO. Обнаружен-

ные особенности клеток SP (относительно низкая пролиферативная активность, небольшое количество радиационно-индуцированных фокусов  $\gamma$ H2AX и высокая концентрация NO) объясняют их более высокую радиорезистентность по сравнению с остальными клетками.

#### Список литературы

- Замулаева И. А., Орлова Н. В., Смирнова С. Г., Проскураков С. Я., Саенко А. С. 2007. Корреляция между внутриклеточным содержанием оксида азота и частотой мутантных лимфоцитов после радиационного воздействия в малых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология. 47 (1) : 86—92.
- Матчук О. Н., Замулаева И. А., Селиванова Е. И., Липунов Н. М., Прониюшкина К. А., Ульяненко С. Е., Лычагин А. А., Смирнова С. Г., Орлова Н. В., Саенко А. С. 2012. Чувствительность клеток SP линии меланомы В16 к действию редко- и плотноионизирующего излучений. Радиационная биология. Радиоэкология. 52 (3) : 261—267.
- Проскураков С. Я., Матчук О. Н., Замулаева И. А. 2011. Современное состояние и перспективы разработки новых подходов к лечению меланом. Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 22 (2) : 31—40.
- Ярмоненко С. П., Вайнсон А. А. 2004. Радиобиология человека и животных. Учебное пособие. М.: Высшая школа. 549 с.
- Baumann M., Krause M., Hill R. 2008. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. Nat. Rev. Cancer. 8 : 545—554.
- Beltran B., Quintero M., Garcia-Zaragoza E., O'Connor E., Esplugues J. V., Moncada S. 2002. Inhibition of mitochondrial respiration by endogenous nitric oxide: a critical step in Fas signaling. PNAS. 99 : 8892—8897.
- Buczacki S., Davies R. J., Winton D. J. 2011. Stem cells, quiescence and rectal carcinoma: an unexplored relationship and potential therapeutic target. Br. J. Cancer. 105 : 1253—1259.
- Clarke M. F., Dick J. E., Dirks P. B., Eaves C. J., Jamieson C. H., Jones D. L., Visvader J., Weissman I. L., Wahl G. M. 2006. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res. 66 : 9339—9344.
- Dean E., Lorigan P. 2012. Advances in the management of melanoma: targeted therapy, immunotherapy and future directions. Exp. Rev. Anticancer Ther. 12 : 1437—1448.
- Dou J., Wen P., Hu W., Li Y., Wu Y., Liu C., Zhao F., Hu K., Wang J., Jiang C., He X., Gu N. 2009. Identifying tumor stem-like cells in mouse melanoma cell lines by analyzing the characteristics of side population cells. Cell Biol. Int. 33 : 807—815.
- Fabián A., Vereb G., Szollosi J. 2013. The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: markers, pathways and therapy. Cytometry A. 83 : 62—71.
- Falk M., Lukasova E., Kozubek S. 2010. Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. Mutat. Res. 704 : 88—100.
- Goodell M. A., Brose K., Paradis G., Conner A. S., Mulligan R. C. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. J. Exp. Med. 183 : 1797—1806.
- Hadnagy A., Gaboury L., Beaulieu R., Balicki D. 2006. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. Exp. Cell Res. 312 : 3701—3710.
- Kato T. A., Okayasu R., Bedford J. S. 2009. Signatures of DNA double strand breaks produced in irradiated G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> cells persist into mitosis. J. Cell. Physiol. 219 : 760—765.
- Kim S. Y., Rhee J. G., Song X., Prochownik E. V., Spitz D. R., Lee Y. J. 2012. Breast cancer stem cell-like cells are more sensitive to ionizing radiation than non-stem cells: role of ATM. PLoS ONE. 7 : e50423. doi : 10.1371/journal.pone.0050423.
- Kinner A., Wu W., Staudt C., Iliakis G. 2008.  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Nucl. Acids Res. 36 : 5678—5694.

Li L., Bhatia R. 2011. Stem cell quiescence. Clin. Cancer Res. 17 : 4936—4941.

Mahidhara R. S., Hoffman R. A., Huang S., Wolf-Johnston A., Vodovotz Y., Simmons R. L., Billiar T. R. 2003. Nitric oxide-mediated inhibition of caspase-dependent T lymphocyte proliferation. J. Leukocyte Biol. 74 : 403—411.

Marnett L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. 21: 361—370.

Nagano T., Yoshimura T. 2001. Bioimaging of nitric oxide. Chem. Rev. 102 : 235—269.

Woodward W. A., Bristow R. G. 2009. Radiosensitivity of cancer-initiating cells and normal stem cells (or what the Heisenberg uncertainly principle has to do with biology). Semin. Radiat. Oncol. 19 : 87—95.

Yi S. Y., Hao Y. B., Nan K. J., Fan T. L. 2012. Cancer stem cells niche: a target for novel cancer therapeutics. Cancer Treat. Rev. pii: S0305—7372 (12) 00211—3. doi : 10.1016/j.ctrv.2012.10.004.

Поступила 7 III 2013

#### RADIORESISTANCE MECHANISMS OF SIDE POPULATION CELLS IN MOUSE MELANOMA CELL LINE B16

O. N. Matchuk,<sup>1</sup> I. A. Zamulaeva, O. A. Kovalev, A. S. Saenko

Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk;

<sup>1</sup> e-mail: matchyk@mail.ru

As it was shown by us earlier, side population (SP) cells are more resistant to the low-LET radiation than the other part of mouse melanoma B16 cells (Matchuk et al., 2012). The aim of our research was finding some mechanisms of radioresistance, therefore we analyzed SP and nonSP cell cycle distribution, spontaneous and radiation induced DNA double-strand breaks (number of  $\gamma$ H2AX foci) and intracellular NO concentration. The results indicate that SP cells have significantly less DNA double-strand breaks after irradiation at dose of 3 Gy than nonSP cells (24.4 vs 40.3, accordingly,  $P < 0.05$  Mann—Whitney  $U$  criterion). SP cells are more quiescent compared to nonSP  $G_1/G_0$ -fraction is 85 vs 39 %, accordingly,  $P < 0.01$  Mann—Whitney  $U$  criterion). Most nonSP cells reside in S,  $G_2/M$  phases (61 %), believed to be rather radiosensitive. Thus, the difference of SP and nonSP cells radiosensitivity can be partly explained by peculiarities of cell cycle distribution. NO concentration is 1.5 times higher in SP than nonSP cells ( $P < 0.05$  Mann—Whitney  $U$  criterion); since it is known that NO inhibits apoptosis, being one of the mechanisms of genetic stability maintenance, greater number of spontaneous DNA double-strand breaks in SP cells is unsurprising ( $P < 0.05$  Mann—Whitney  $U$  criterion). The above-listed results explain considerably the higher resistance of SP cells to the action of low-LET radiation in comparison with other melanoma B16 cells. Further study of this question can become the basis for development of tools to target SP cells and, ultimately, more effective cancer treatment.

Key words: side population, melanoma B16, cell cycle, H2AX foci, nitric oxide.