

УДК 616.34-006.6-039.73

С. А. Кошкин¹, М. А. Иванова¹, Г. В. Тимин³,
И. В. Рыков², И. А. Чистякова¹, Е. Н. Толкунова¹

ПОВЫШЕННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

¹Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
г. Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Преодоление проблем лекарственной устойчивости и отделенного метастазирования злокачественных опухолей остается одной из наиболее актуальных проблем онкологии. Согласно современной концепции канцерогенеза развитие опухолевого процесса вызвано функционированием небольшой, резистентной к внешним воздействиям популяции раковых стволовых клеток (РСК). Одним из факторов, неотъемлемо сопровождающих рост и развитие опухоли, явля-

© Кошкин С. А., Иванова М. А., Тимин Г. В., Рыков И. В., Чистякова И. А., Толкунова Е. Н., 2016

Кошкин Сергей Анатольевич – аспирант лаборатории молекулярных основ дифференцировки клеток Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: Koshkin31@mail.ru

Иванова Маргарита Алексеевна – студентка биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: ima-9811329780@mail.ru

Тимин Григорий Владимирович – студент Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: grifonsky@rambler.ru

Рыков Иван Владимирович – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры онкологии медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: rykov.ivan@gmail.com

Чистякова Ирина Александровна – научный сотрудник отдела клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: ichi_spb@yahoo.com

Толкунова Елена Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ дифференцировки клеток Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: Entolk62@mail.ru

Статья поступила в редакцию 05.09.2016

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

ется тканевая и клеточная гипоксия. Представленное в данной статье исследование было направлено на изучение резистентности РСК к проводимой химиотерапии в условиях гипоксии. Раковые стволовые клетки были выделены путем вирусной трансдукции двух первичных линий рака толстой кишки, полученных из операционного материала. Для селекции клеток, экспрессирующих стволовые маркеры, использовалась репортерная конструкция SORE6x. Проводилась оценка экспрессии стволовых маркеров методом ОТ-ПЦР. Выделенные клетки культивировались в условиях гипоксии, моделированной внесением $CoCl_2$ в культуральную среду. В качестве цитостатического агента использовался широко применяемый при лечении рака толстой кишки препарат 5-фторурацил (5-ФУ). Оценка количества клеток и их жизнеспособности производилась при помощи МТТ-метода. Показано, что использование данной репортерной конструкции позволяет получать клетки, экспрессирующие стволовые маркеры. Эти клетки характеризуются повышенной резистентностью к 5-ФУ. Воздействие на них гипоксии существенно повышает уровень резистентности.

Ключевые слова: рак толстой кишки, стволовые раковые клетки, $CoCl_2$, гипоксия, лекарственная устойчивость.

Актуальность исследуемой проблемы. Рак толстой кишки (РТК) занимает в структуре мировой онкологической заболеваемости третье место у мужчин и второе у женщин [1]. Ежегодно в мире диагностируется более 600 тысяч первичных случаев данного заболевания. Несмотря на проводимые профилактические мероприятия, уровень заболеваемости и смертности продолжает постепенно расти [2].

Основным методом лечения ранних стадий рака толстой кишки является хирургическое удаление опухоли. В более чем половине случаев при обследовании пациентов определяется наличие метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (III стадия) либо отдаленных органов (IV стадия), что является показанием к проведению адъювантной (послеоперационной) или лечебной полихимиотерапии [14]. Гетерогенность опухолевых клеток является причиной первичной либо формирующейся резистентности к цитостатическим агентам [3]. Наиболее рациональным объяснением данного явления на сегодняшний день является теория о существовании раковых стволовых клеток.

Согласно современным представлениям опухоль представляет собой патологический орган, состоящий из клеточных популяций различной степени дифференцировки, что формирует внутриопухольную гетерогенность [5]. В соответствии с концепцией РСК небольшая группа клеток обладает свойствами формировать опухоль и поддерживать ее рост. Важнейшими свойствами РСК, объединяющими их с нормальными стволовыми клетками, являются самоподдержание и пролиферация. Под самоподдержанием подразумевается способность клеток к асимметричному делению, что обеспечивает сохранение пула стволовых клеток. При пролиферации формируются гетерогенные субклоны опухолевых клеток. РСК, обладающие столь важными свойствами, привлекают внимание исследователей с позиции разработки инновационных противоопухолевых препаратов [22]. После открытия РСК в 1994 году группой Джона Дика у пациентов с острым миелоидным лейкозом [8] они были обнаружены в различных солидных новообразованиях, включая опухоли головного мозга [32], легких [15], молочной железы [4], меланомы [31], толстой кишки [27], предстательной железы [28], яичников [18]. Согласно данным различных исследований количество данных клеток в опухолях варьирует от 0,01 до 1 % [25]. Важным этапом на пути к пониманию молекулярных и клеточных механизмов функционирования РСК является получение достаточно моногенной популяции клеток в культуре *in vitro*.

На настоящий момент выявлен ряд поверхностных маркеров, позволяющих обогащать субпопуляцию РСК. В частности, для выделения РСК рака толстой кишки предлагаются следующие маркеры: CD133+, CD44+, CD166+, EpCAM+, CD24+ [23], [40], [27]; CD133, CD44 или CD166 [35], [21], [30], [37], [11]. Также были предложены и другие маркеры, например CD24 [13], ALDH1 [20], MSI1 [29], CD 29 [36]. Общеизвестным является одновременное использование нескольких маркеров для выделения РСК [36]. Применение предложенных поверхностных маркеров для селекции имеет несколько значимых недостатков. Например, полученные таким образом клетки достаточно часто формируют опухоли у иммуносупрессивных (Nude/SCID) мышей, то есть в процессе обогащения могут изменяться свойства клеток. Таким образом, несмотря на большое разнообразие данных об антигенной структуре РСК, на сегодняшний день не найден универсальный маркер, позволяющий получать моногенную популяцию РСК.

Материал и методика исследований. Объектами исследования являлись две первичные клеточные культуры аденокарциномы толстой кишки человека БСК1 и БСК6, полученные из двух операционных образцов пациентов. Получение первичной культуры проводили на основе рекомендаций Yu и соавторов [41].

Клетки культивировали в среде DMEM-F12 («Gibco», США), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки в клеточном инкубаторе в стандартных условиях.

Обогащение первичных культур аденокарциномы по стволовому компоненту проводилось по методике, разработанной В. Tang с коллегами [34]. Получение и концентрирование лентивирусов проводили по стандартной методике (<http://tcf.epfl.ch/page-6766-en.html>).

Выделение РНК и синтез к ДНК осуществляли по фирменным протоколам (Gen-JET RNA purification kit, Revertaid reverse transcriptase Thermo Scientific, Литва). Проводили полимеразную цепную реакцию с геноспецифическими праймерами. Oct4: F-GGGTTGAGTAGTCCCTTCGC, R-AGCCAGGTCCGAGGATCAA; Sox2: F-GAGAGTGTGCAAAAGGGGG, R-CGCCGCCGATGATTGTTATT; Nanog: F-AAATTGGTGATGAAGATGTATTCG, R-GCAAAACAGAGCCAAAAACG.

Имитация условий гипоксии проводилась в соответствии с рекомендациями L. M. Lopez-Sánchez и соавторов [24]. Клетки выдерживали в течение 48 часов в культуральной среде, содержащей 200 мкмоль CoCl₂.

Чувствительность к воздействию 5-фторурацила определяли следующим образом. Клетки культивировались в среде, содержащей 0,1 мкг/мл 5-фторурацила, в течение 2 суток. Далее измеряли количество жизнеспособных клеток методом МТТ-анализа.

Оценку жизнеспособности клеток производили колориметрическим методом с использованием метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромид МТТ («Sigma», США). Метод основан на том, что митохондриальные оксидоредуктазы живых клеток восстанавливают желтый МТТ до пурпурного формазана. Количество формазана коррелирует с численностью жизнеспособных клеток в популяции. Оптическую плотность раствора формазана в DMSO измеряли при длине волны 570 нм на спектрофотометре Multiskan EX («Thermo Electron», США). Для каждой экспериментальной точки проводили по 6 повторений.

Результаты исследований и их обсуждение. Способность раковых стволовых клеток к пролиферации и самоподдержанию делает их схожими с нормальными стволовыми клетками. Одним из ключевых факторов, обеспечивающих уникальные свойства данных клеток, является гомеодомный транскрипционный фактор из семейства Pit-Oct-Unt (POU) – октамер-связывающий транскрипционный фактор 4 (Oct4) [26]. Не менее важную

роль в поддержании плюрипотентного состояния играют также такие факторы, как SOX2 и NANOG. Согласно данным Wang и др., опубликованным в журнале Cell, эти транскрипционные факторы выступают в роли ингибиторов дифференцировки клеток [38].

Общепризнанным является участие стволовых белков в опухолевой трансформации, канцерогенезе, метастазировании [7], прогрессировании на фоне системной химио- и / или лучевой терапии [17]. Экспрессия этих маркеров описана при опухолях головы и шеи [12], саркоме [16], опухолях мочевого пузыря [6], предстательной железы [19], молочной железы [7], толстой кишки [33], желудка [10], глиобластоме [9]. Наибольшее количество эмбриональных транскрипционных факторов определяется в низкодифференцированных опухолях [7]. Это наблюдение отражает понижение уровня экспрессии эмбриональных транскрипционных факторов при дифференцировке клеток.

Одним из наиболее важных факторов микроокружения, вовлеченных в формирование ниши РСК в солидных опухолях, выступает гипоксия [39].

Известно, что РСК являются наиболее резистентными к химиотерапии и радиотерапии клетками в опухоли [39].

Для изучения влияния гипоксии на резистентность стволового компонента к терапевтическим воздействиям нами была создана модельная система, представляющая собой первичную клеточную культуру ткани опухоли после резекции. Гипоксические условия моделировались путем введения хлорида кобальта в культуральную среду. Для обогащения стволового компонента клеточной культуры мы применяли отбор клеток, экспрессирующих стволовые маркеры. Отбор проводили после трансдукции лентивирусной репортерной конструкции SOREX6x, схема которой представлена на рисунке 1. В качестве цитостатического агента применялся 5-фторурацил. Сравнивали жизнеспособность клеток исходной культуры и обогащенной по стволовости фракции в условиях нормального культивирования и при гипоксии.

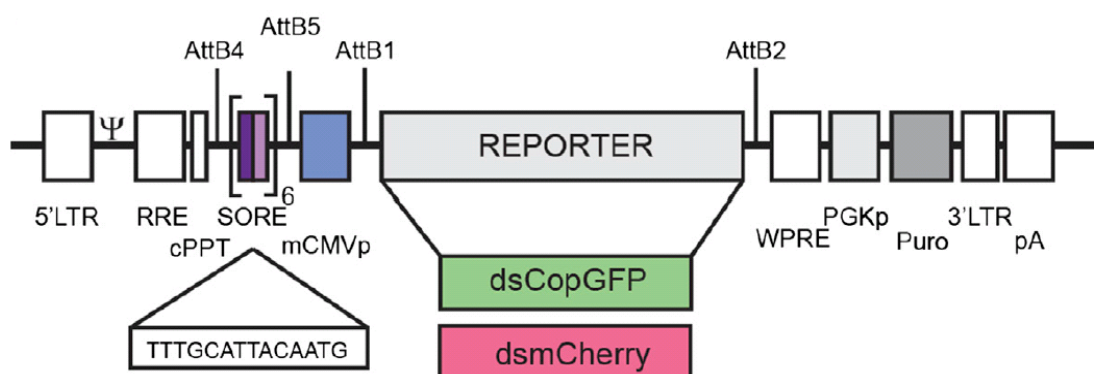


Рис. 1. Схема репортерной конструкции SOREX6x

Эта система была разработана в Национальном институте онкологических заболеваний США (National Cancer Institute, USA) [6].

Плаزمид SOREX6x (Sox2/Oct4 Response Element) содержит шестикратно повторенный сайт для связывания стволовых маркеров Oct4 и SOX2, взятый из промотора гена NANOG. В результате интеграции конструкции в геном клетки, экспрессирующие Oct4 и SOX2, приобретают устойчивость к пуромицину. После селекции на среде с пуромици-

ном получали культуру, обогащенную по стволовому компоненту. Полученную культуру сравнивали с исходной с позиции устойчивости к воздействию цитостатическим агентом (5-фторурацилом).

Из клинического материала, полученного в ходе хирургического лечения рака толстой кишки двух пациентов, выделены первичные клеточные культуры БСК 1 и БСК 6. На рисунке 2 представлена морфология клеток БСК 1 в культуре. На левой панели фенотипически гетерогенные клетки первого пассажа. Справа определяется рост активно делящихся клеток, формирующих колонию.

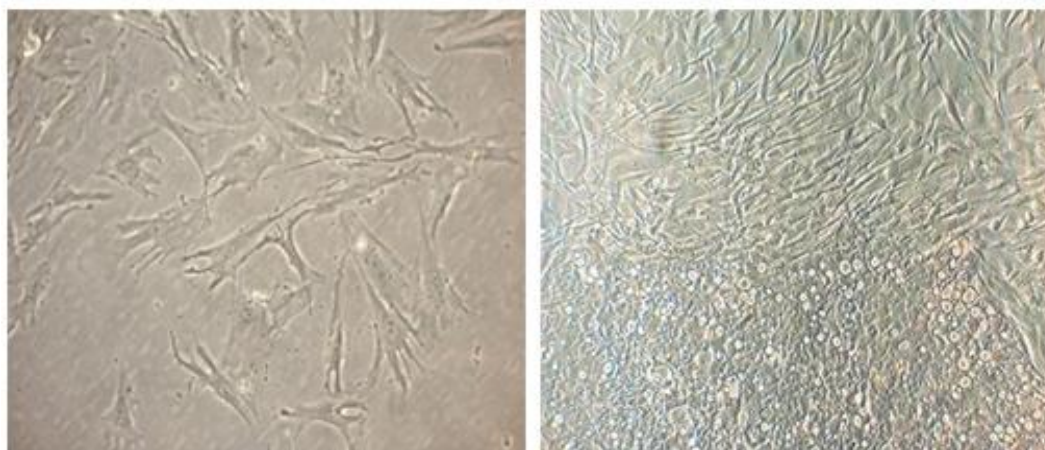


Рис. 2. Морфология клеток линии БСК 1 в культуре

После заражения лентивирусной репортерной конструкцией SORE6x на селективной среде производился отбор устойчивых к пуromицину клонов. Выделили два клона из культуры БСК 1 – БСК 114 и БСК 133 – и девять клонов из культуры БСК 6 – БСК 612, БСК 613, БСК 621, БСК 622, БСК 632, БСК 633, БСК 641, БСК 642 и БСК 644.

Далее была проанализирована экспрессия стволовых маркеров Oct4, Sox2 и Nanog методом ОТ-ПЦР. Результаты анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1

Экспрессия стволовых маркеров Oct4, Sox2 и Nanog в клонах

№	Клон	Nanog	Sox2	Oct4
1	БСК 114*	+	+	+
2	БСК 133*	+	+	+
3	БСК 612	–	–	+
4	БСК 613*	+	+	+
5	БСК 621	+	+	–
6	БСК 622	+	+	+
7	БСК 632*	–	+	+
8	БСК 633*	+	+	–
9	БСК 641	+	+	–
10	БСК 642*	–	+	+
11	БСК 644	+	–	–

Примечание: * – отобранные для последующего анализа клоны.

Репрезентированные клоны отличаются по набору экспрессируемых маркеров и по скорости роста (данные не представлены). Наиболее активно пролиферирующие клоны отобраны для сравнительного анализа устойчивости к цитостатику в условиях нормоксии и гипоксии. Оценку жизнеспособности шести клонов после имитации условий гипоксии и обработки 5-фторурацилом провели методом МТТ на спектрофотометре Multiskan EX («Thermo Electron», США). Анализ данных проводили по следующему принципу. Считали процент выживших клеток относительно контрольных цифр. Как при нормоксии, так и при гипоксии обработанные 5-фторурацилом клетки сравнивались с культивируемыми в среде без цитостатика. На рисунке 3 представлены средние данные шести независимых измерений.

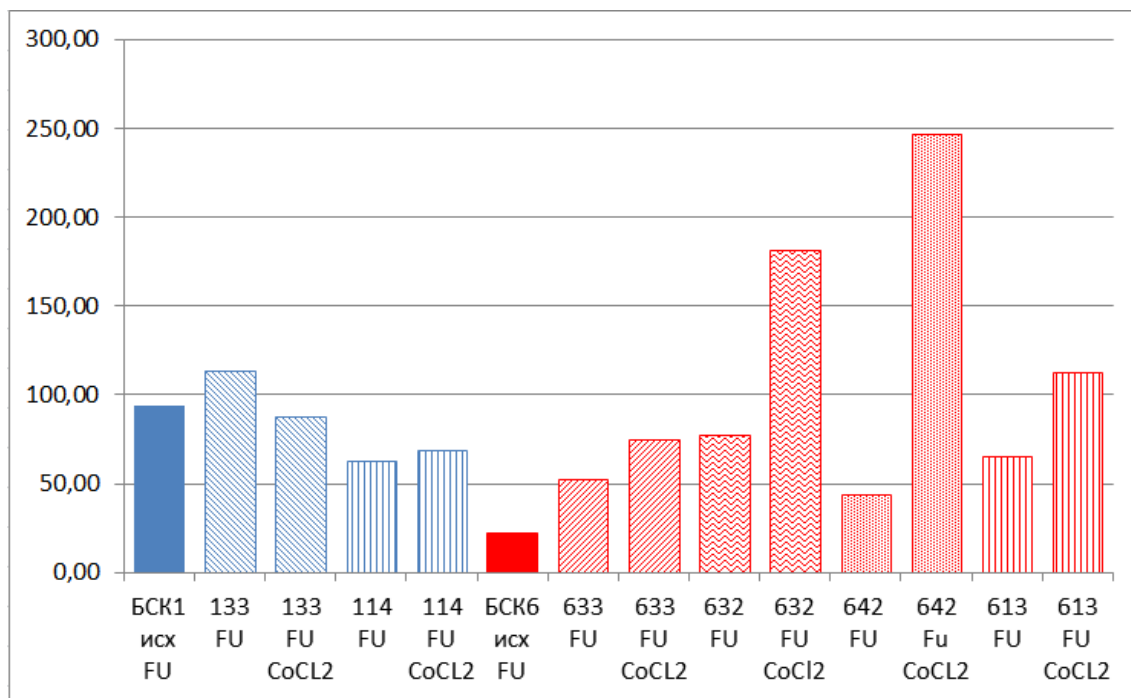


Рис. 3. График выживаемости клеток под действием 5-фторурацила

Исследование показало, что в условиях гипоксии резистентность к 5-фторурацилу клонов линии БСК в основном возрастает (на графике столбики FU + CoCl₂ выше столбиков FU для всех клонов, полученных из линии БСК 6, – 633, 632, 642 и 613 клонов). Проанализированные клоны проявляют существенную гетерогенность устойчивости к воздействию цитостатического агента.

Резюме. Таким образом, использованная репортерная конструкция позволяет отбирать клетки, экспрессирующие стволовые маркеры. Однако набор маркеров у разных клонов может отличаться. Независимо от маркерного профиля полученные клоны имеют более высокую по сравнению с исходной культурой резистентность к 5-фторурацилу. Отсутствие связи между степенью резистентности и паттерна экспрессии стволовых факторов дает основание предполагать, что в обеспечение резистентности вовлечены дополнительные непроанализированные факторы.

Полученных нами данных недостаточно для решения вопроса о ключевой роли того или иного из выбранных для анализа факторов в обеспечении лекарственной устойчивости.

Что касается воздействия гипоксии, мы отмечаем значительное увеличение устойчивости к лекарственному препарату у всех отобранных клонов линии БСК 6 (633, 632, 642, 613). Данное наблюдение согласуется с данными, представленными в литературе [39]. Мы предполагаем, что раковые стволовые клетки солидной опухоли, находящиеся в условиях гипоксии, наиболее устойчивы к терапевтическим воздействиям и служат источником последующего прогрессирования опухолевого роста.

Получаемые указанным методом клоны характеризуются экспрессией стволовых маркеров (SOX2, NANOG, Oct4) и могут использоваться в качестве модели для изучения их вовлеченности в процессы канцерогенеза и обеспечения лекарственной устойчивости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чиссов В. И., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2008 году (заболеваемость и смертность). – М. : МНИОИ им. П. А. Герцена Росмедтехнологий, 2010. – 242 с.
2. Чиссов В. И., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 1998 году (заболеваемость и смертность). – М. : МНИОИ им. П. А. Герцена Росмедтехнологий, 1999. – 284 с.
3. Abdalla E. K., Adam R., Bilchik A. J., Jaeck D., Vauthey J. N. and Mahvi D. Improving resectability of hepatic colorectal metastases: Expert consensus statement // *Ann Surg Oncol.* – 2006. – № 13. – P. 1271–1280.
4. Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – № 100. – P. 3983–3988.
5. Atena M., Reza A., Mehran G. A Review on the Biology of Cancer Stem Cells // *Stem Cell Discovery.* – 2014. – № 4. – P. 83–89.
6. Atlasi Y., Mowla S. J., Ziaee S. A., Bahrami A. R. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer // *Int J Cancer.* – 2007. – № 120(7). – P. 1598–1602.
7. Ben-Porath I., Thomson M. W., Carey V. J., et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors // *Nat Genet.* – 2008. – № 40. – P. 499–507.
8. Bonnet D., Dick J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // *Nat Med.* – 1997. – № 3. – P. 730–737.
9. Bradshaw A., Wickremsekera A., Tan S. T., Peng L., Davis P. F., Itinteang T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme // *Front Surg.* – 2016. – № 99. – P. 3–21.
10. Chen Z., Xu W. R., Qian H., et al. OCT4, a novel marker for human gastric cancer // *J Surg Oncol.* – 2009. – № 99. – P. 414–419.
11. Cherciu I., Bărbălan A., Pirici D., Mărgăritescu C., Săftoiu A. Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations // *Curr Health Sci J.* – 2014. – № 40(3). – P. 153–161.
12. Chiou S. H., Yu C. C., Huang C. Y., et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma // *Clin Cancer Res.* – 2008. – № 14. – P. 4085–4095.
13. Choi D., Lee H. W., Hur K. Y., Kim J. J., Park G. S., Jang S. H., Song Y. S., Jang K. S., Paik S. S. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma // *World J Gastroenterol.* – 2009. – № 15(18). – P. 2258–2264.
14. Engstrom P., et al. Colon cancer, version 2 // *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.* – 2011.
15. Eramo A., Lotti F., Sette G. et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population // *Cell Death and Differentiation.* – 2008. – № 15. – P. 504–514.
16. Ezech U. I., Turek P. J., Reijo R. A., et al. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma // *Cancer.* – 2005. – № 104. – P. 2255–2265.
17. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease // *Nat Rev Immunol.* – 2007. – № 7. – P. 690–702.
18. Foster R., Buckanovich R. J., Rueda B. R. Ovarian cancer stem cells: working towards the root of stemness // *Cancer letters.* – 2013. – № 338. – P. 147–157.

19. Gu G., Yuan J., Wills M., Kasper S. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo // *Cancer Res.* – 2007. – № 67(10) – P. 4807–4815.
20. Huang E. H., Hynes M. J., Zhang T., Ginestier C., Dontu G., Appelman H., Wicha M. S., Boman B. M. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis // *Cancer Res.* – 2009. – № 69(8). – P. 3382–3389.
21. Huang E. H., Wicha M. S. Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy // *Trends Mol Med.* – 2008. – № 14(11). – P. 503–509.
22. Khan I. N., Al-Karim S., Bora R. S., Chaudhary A. G., Saini K. S. Cancer stem cells: a challenging paradigm for designing targeted drug therapies // *Drug Discov Today.* – 2015. – № 20(10). – P. 1205–1216.
23. Li C., Heidt D. G., Dalerba P., Burant C. F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M. F., Simeone D. M. Identification of pancreatic cancer stem cells // *Cancer Res.* – 2007. – № 67(3). – P. 1030–1037.
24. Lopez-Sánchez L. M. CoCl₂, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer // *PloS one.* – 2014. – № 6. – P. 99–103.
25. Meacham C. E., Morrison S. J. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity // *Nature.* – 2013. – № 501. – P. 328–337.
26. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 // *Cell.* – 1998. – № 95. – P. 379–391.
27. O'Brien C. A., Pollett A., Gallinger S., et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // *Nature.* – 2007. – № 445. – P. 106–110.
28. Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R., Li H., Bhatia B., Tang S., Reilly J. G., Chandra D., Zhou J., Claypool K., et al. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells // *Oncogene.* – 2006. – № 25 – P. 1696–1708.
29. Potten C. S., Booth C., Tudor G. L., Booth D., Brady G., Hurley P., Ashton G., Clarke R., Sakakibara S., Okano H. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1 // *Differentiation.* – 2003. – № 71(1). – P. 28–41.
30. Ricci-Vitiani L., Pagliuca A., Palio E., Zeuner A., De Maria R. Colon cancer stem cells // *Gut.* – 2008. – № 57(4). – P. 538–548.
31. Schatton T., Murphy G. F., Frank N. Y., et al. Identification of cells initiating human melanomas // *Nature.* – 2008. – № 451. – P. 345–349.
32. Singh S. K., Clarke I. D., Terasaki M., et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // *Cancer Res.* – 2003. – № 63. – P. 5821–5828.
33. Tai M. H., Chang C. C., Kiupel M., Webster J. D., Olson L. K., Trosko J. E. OCT4 expression in adult human stem cells: Evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis // *Carcinogenesis.* – 2005. – № 26. – P. 495–502.
34. Tang B. A flexible reporter system for direct observation and isolation of cancer stem cells // *Stem cell reports.* – 2015. – № 1. – P. 155–169.
35. Todaro M., Francipane M. G., Medema J. P., Stassi G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy // *Gastroenterology.* – 2010. – № 138(6). – P. 2151–2162.
36. Vermeulen L., Todaro M., de Sousa Mello F., Sprick M. R., Kemper K., Perez Alea M., Richel D. J., Stassi G., Medema J. P. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – № 105(36). – P. 13427–13432.
37. Visvader J. E., Lindeman G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions // *Nat Rev Cancer.* – 2008. – № 8(10). – P. 755–768.
38. Wang Z., Oron E., Nelson B., Razis S., Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells // *Cell Stem Cell.* – 2012. – № 10(4). – P. 440–454.
39. Yang G., Xu S., Peng L., Li H., Zhao Y., Hu Y. The hypoxia-mimetic agent CoCl₂ induces chemotherapy resistance in LOVO colorectal cancer cells // *Mol Med Rep.* – 2016. – № 13(3). – P. 2583–2589.
40. Yeung T. M., Gandhi S. C., Wilding J. L., Muschel R., Bodmer W. F. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – № 107(8). – P. 3722–3727.
41. Yu C. S. Diallyl trisulfide induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells // *Oncology reports.* – 2012. – № 3. – P. 949–954.

INCREASED DRUG RESISTANCE IN CANCER STEM CELLS UNDER THE CONDITIONS OF HYPOXIA

¹*Institute of Cytology of RAS, Saint Petersburg, Russia*

²*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

³*Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia*

Abstract. Overcoming the problems of drug resistance and metastasis of separate malignant tumors remains one of the most pressing problems of oncology. According to the modern concepts of carcinogenesis, the development of tumor process is caused by the operation of a small population of cancer stem cells (CSCs) resistant to external influences. One of the factors that inherently accompany the growth and development of tumors are tissue and cellular hypoxia. The study presented in this article was aimed at studying the resistance of CSC to chemotherapy under hypoxic conditions. Cancer stem cells have been isolated by two viral transduction of primary colon cancer lines obtained from surgical specimens. For the selection of cells, that are expressing markers, stem SORE6x reporter construct were used. The expression of stem markers was evaluated by RT-PCR. The isolated cells were cultured under hypox-

© Koshkin S. A., Ivanova M. A., Timin G. V., Rykov I. V., Chistyakov I. A., Tolkunova E. N., 2016

Koshkin, Sergey Anatolyevich – Post-graduate Student, Laboratory of the Molecular Mechanism of Cell Differentiation, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia; e-mail: Koshkin31@mail.ru

Ivanova, Margarita Alekseevna – Student, Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: ima-9811329780@mail.ru

Timin, Grigory Vladimirovich – Student, Institute of Physics, Nanotechnology and Telecommunications, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: grifonsky@rambler.ru

Rykov, Ivan Vladimirovich – Candidate of Medicine, Assistant of the Department of Oncology, Faculty of Medicine, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: rykov.ivan@gmail.com

Chistyakova, Irina Aleksandrovna – Research Associate, Department of Cell Cultures, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia; e-mail: ichi_spb@yahoo.com

Tolkunova, Elena Nikolaevna – Candidate of Biology, Senior Research Associate of the Laboratory of the Molecular Mechanism of Cell Differentiation, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia; e-mail: Entolk62@mail.ru

The article was contributed on September 05, 2016

ic conditions simulated with CoCl₂ introduction into the culture medium. As the cytostatic agent is widely used in the treatment of colon cancer drug – 5-Fluorouracil. Evaluation of the number of cells and their viability was made using MTT method. It is shown that the use of this reporter construct allows to obtain stem cells expressing markers. These cells are characterized by increased resistance to 5-FU. Impact of hypoxia on their substantially increases resistance.

Keywords: *colon cancer, cancer stem cells, CoCl₂, hypoxia, drug resistance.*

REFERENCES

1. Chissov V. I., Starinskij V. V., Petrova G. V. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2008 godu (zabolevaemost' i smertnost'). – M. : MNIOI im. P. A. Gercena Rosmedtehnologij, 2010. – 242 s.
2. Chissov V. I., Starinskij V. V., Petrova G. V. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 1998 godu (zabolevaemost' i smertnost'). – M. : MNIOI im. P. A. Gercena Rosmedtehnologij, 1999. – 284 s.
3. Abdalla E. K., Adam R., Bilchik A. J., Jaeck D., Vauthey J. N. and Mahvi D. Improving resectability of hepatic colorectal metastases: Expert consensus statement // *Ann Surg Oncol.* – 2006. – № 13. – P. 1271–1280.
4. Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – № 100. – P. 3983–3988.
5. Atena M., Reza A., Mehran G. A Review on the Biology of Cancer Stem Cells // *Stem Cell Discovery.* – 2014. – № 4. – P. 83–89.
6. Atlasi Y., Mowla S. J., Ziaee S. A., Bahrami A. R. Oct-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer // *Int J Cancer.* – 2007. – № 120(7). – P. 1598–602.
7. Ben-Porath I., Thomson M. W., Carey V. J., et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors // *Nat Genet.* – 2008. – № 40. – P. 499–507.
8. Bonnet D., Dick J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // *Nat Med.* – 1997. – № 3. – P. 730–737.
9. Bradshaw A., Wickremsekera A., Tan S. T., Peng L., Davis P. F., Itinteang T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme // *Front Surg.* – 2016. – № 99. – P. 3–21.
10. Chen Z., Xu W. R., Qian H., et al. OCT4, a novel marker for human gastric cancer // *J Surg Oncol.* – 2009. – № 99. – P. 414–419.
11. Cherciu I., Bărbălan A., Pirici D., Mărgăritescu C., Săftoiu A. Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations // *Curr Health Sci J.* – 2014. – № 40(3). – P. 153–161.
12. Chiou S. H., Yu C. C., Huang C. Y., et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma // *Clin Cancer Res.* – 2008. – № 14. – P. 4085–4095.
13. Choi D., Lee H.W., Hur K. Y., Kim J. J., Park G. S., Jang S. H., Song Y. S., Jang K. S., Paik S. S. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma // *World J Gastroenterol.* – 2009. – № 15(18). – P. 2258–2264.
14. Engstrom P. et al. Colon cancer, version 2 // *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.* – 2011.
15. Eramo A., Lotti F., Sette G. et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population // *Cell Death and Differentiation.* – 2008. – № 15. – P. 504–514.
16. Ezech U. I., Turek P. J., Reijo R. A., et al. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma // *Cancer.* – 2005. – № 104. – P. 2255–2265.
17. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease // *Nat Rev Immunol.* – 2007. – № 7. – P. 690–702.
18. Foster R., Buckanovich R. J., Rueda B. R. Ovarian cancer stem cells: working towards the root of stemness // *Cancer letters.* – 2013. – № 338. – P. 147–157.
19. Gu G., Yuan J., Wills M., Kasper S. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo // *Cancer Res.* – 2007. – № 67(10) – P. 4807–4815.
20. Huang E. H., Hynes M. J., Zhang T., Ginestier C., Dontu G., Appelman H., Wicha M. S., Boman B. M. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis // *Cancer Res.* – 2009. – № 69(8). – P. 3382–3389.
21. Huang E. H., Wicha M. S. Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy // *Trends Mol Med.* – 2008. – № 14(11). – P. 503–509.
22. Khan I. N., Al-Karim S., Bora R. S., Chaudhary A. G., Saini K. S. Cancer stem cells: a challenging paradigm for designing targeted drug therapies // *Drug Discov Today.* – 2015. – № 20(10). – P. 1205–1216.

23. Li C., Heidt D. G., Dalerba P., Burant C. F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M. F., Simeone D. M. Identification of pancreatic cancer stem cells // *Cancer Res.* – 2007. – № 67(3). – P. 1030–1037.
24. Lopez-Sánchez L. M. CoCl₂, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer // *PloS one.* – 2014. – № 6. – P. 99–103.
25. Meacham C. E., Morrison S. J. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity // *Nature.* – 2013. – № 501. – P. 328–337.
26. Nichols J., Zevnik B., Anastasiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 // *Cell.* – 1998. – № 95. – P. 379–391.
27. O'Brien C. A., Pollett A., Gallinger S., et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // *Nature.* – 2007. – № 445. – P. 106–110.
28. Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R., Li H., Bhatia B., Tang S., Reilly J. G., Chandra D., Zhou J., Claypool K., et al. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells // *Oncogene.* – 2006. – № 25 – P. 1696–1708.
29. Potten C. S., Booth C., Tudor G. L., Booth D., Brady G., Hurley P., Ashton G., Clarke R., Sakakibara S., Okano H. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1 // *Differentiation.* – 2003. – № 71(1). – P. 28–41.
30. Ricci-Vitiani L., Pagliuca A., Palio E., Zeuner A., De Maria R. Colon cancer stem cells // *Gut.* – 2008. – № 57(4). – P. 538–548.
31. Schatton T., Murphy G. F., Frank N. Y., et al. Identification of cells initiating human melanomas // *Nature.* – 2008. – № 451. – P. 345–349.
32. Singh S. K., Clarke I. D., Terasaki M., et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // *Cancer Res.* – 2003. – № 63. – P. 5821–5828.
33. Tai M. H., Chang C. C., Kiupel M., Webster J. D., Olson L. K., Trosko J. E. OCT4 expression in adult human stem cells: Evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis // *Carcinogenesis.* – 2005. – № 26. – P. 495–502.
34. Tang B. A flexible reporter system for direct observation and isolation of cancer stem cells // *Stem cell reports.* – 2015. – № 1. – P. 155–169.
35. Todaro M., Francipane M. G., Medema J. P., Stassi G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy // *Gastroenterology.* – 2010. – № 138(6). – P. 2151–2162.
36. Vermeulen L., Todaro M., de Sousa Mello F., Sprick M.R., Kemper K., Perez Alea M., Richel D. J., Stassi G., Medema J. P. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – № 105(36). – P. 13427–13432.
37. Visvader J. E., Lindeman G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions // *Nat Rev Cancer.* – 2008. – № 8(10). – P. 755–768.
38. Wang Z., Oron E., Nelson B., Razis S., Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells // *Cell Stem Cell.* – 2012. – № 10(4). – P. 440–454.
39. Yang G., Xu S., Peng L., Li H., Zhao Y., Hu Y. The hypoxia-mimetic agent CoCl₂ induces chemotherapy resistance in LOVO colorectal cancer cells // *Mol Med Rep.* – 2016. – № 13(3). – P. 2583–2589.
40. Yeung T. M., Gandhi S. C., Wilding J. L., Muschel R., Bodmer W. F. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – № 107(8). – P. 3722–3727.
41. Yu C. S. Diallyl trisulfide induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells // *Oncology reports.* – 2012. – № 3. – P. 949–954.