

ВЛИЯНИЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ ЛИГАНДОВ ИЗ ГРУППЫ ДИМЕРНЫХ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ DBA(*n*) И DBPA(*n*) В КОМБИНАЦИИ С γ -ИЗЛУЧЕНИЕМ НА ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД И РАЗМЕР ПУЛА СТОЛОВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ MCF-7

© 2023 г. К.А. Чурюкина^{*,#}, О.Н. Матчук^{*,**}, А.Д. Каприн^{***,****,*****}, С.А. Иванов^{*,*****}, В.С. Коваль^{*****}, А.Ф. Арутюнян^{*****}, А.Л. Жузе^{*****}, И.А. Замулаева^{*,**}

^{*}Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии МЗ РФ, ул. Маршала Жукова, 10, Обнинск, Калужская область, 249031, Россия

[#]E-mail: churiukina@inbox.ru

^{**}Объединенный институт ядерных исследований, ул. Жолио-Кюри, 6, Дубна, Московская область, 141980, Россия

^{***}Национальный медицинский исследовательский центр радиологии МЗ РФ, ул. Королева, 4, Обнинск, Калужская область, 249036, Россия

^{****}Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии МЗ РФ, 2-й Боткинский проезд, 3, Москва, 125284, Россия

^{*****}Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198, Россия

^{*****}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Россия

Поступила в редакцию 05.12.2022 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Лучевая терапия является одним из основных методов лечения злокачественных новообразований, в том числе рака молочной железы. Однако известно, что она может приводить к увеличению количества опухолевых стволовых клеток, которые резистентны к традиционным противоопухолевым воздействиям и, как полагают, ответственны за развитие рецидивов и метастазов. Поэтому значительный интерес представляет разработка средств элиминации опухолевых стволовых клеток, особенно в комбинации с ионизирующими излучениями. В работе изучены эффекты одиночного и комбинированного действия новых серий узкобороздочных лигандов ДНК – димерных бисбензимидазолов DBA(*n*) и DBPA(*n*) (где *n* – число метиленовых групп между двумя бисбензимидазольными блоками) и γ -излучения на клетки рака молочной железы человека линии MCF-7 *in vitro*. В частности, выбраны соединения с максимальным цитотоксическим действием и связыванием с клетками, а затем изучено влияние последних на популяцию CD44⁺CD24^{low} опухолевых стволовых клеток и радиационно-индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход по критерию экспрессии виментина. Показано увеличение уровня экспрессии этого белка и одновременно относительного количества опухолевых стволовых клеток после одиночного действия γ -излучения в дозе 4 Гр. Соединения DBPA (1,4) в комбинации с облучением блокировали радиационно-индуцированную экспрессию виментина и снижали относительное количество опухолевых стволовых клеток в 1.7 и 4.1 раз по сравнению с облучением ($p = 0.041$ и $p = 0.005$) соответственно. При этом происходило уменьшение абсолютного количества опухолевых стволовых клеток в 2.8 и 12.0 раз по сравнению с облучением ($p = 0.029$ и $p = 0.004$) соответственно. Напротив, одиночное и комбинированное с γ -излучением действие DBA(5,7) увеличивало уровень экспрессии виментина и эти же соединения при комбинированном применении с облучением увеличивали относительное количество опухолевых стволовых клеток в 3.1 и 3.6 раза ($p = 0.006$ и $p = 0.005$) соответственно по сравнению с облучением. Абсолютное количество опухолевых стволовых клеток возрастало при этом в 2.2 и 1.5 раза ($p = 0.017$ и $p = 0.032$), соответственно. Полученные данные показывают тесную связь процесса эпителиально-мезенхимального перехода и формирования пула опухолевых стволовых клеток после радиационного воздействия, а также свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения DBPA(1,4) как средств элиминации опухолевых стволовых клеток в условиях *in vivo*.

Ключевые слова: димерные бисбензимидазолы, опухолевые стволовые клетки, эпителиально-мезенхимальный переход, ионизирующее излучение, комбинированное воздействие, проточная цитометрия, виментин.

DOI: 10.31857/S0006302923030158, EDN: FSECZO

По данным Всемирной организации здравоохранения рак молочной железы является наиболее часто встречающимся злокачественным новообразованием среди женщин. Так, в 2020 г. было зарегистрировано свыше 2.2 млн новых случаев [1]. Несмотря на прогресс в лечении злокачественных новообразований молочной железы, основанный на применении комбинированных методов, включающих радио-, химио-, гормоно- и таргетную терапию, существует высокий риск развития метастазов и рецидивов, в связи с устойчивостью некоторых клеток опухоли к терапии. Поэтому основная цель в борьбе со злокачественными новообразованиями заключается в преодолении терапевтической резистентности и предотвращении рецидива заболевания. В настоящее время имеются убедительные доказательства того, что опухоли, в том числе и рак молочной железы, имеют иерархическую организацию и управляются небольшой долей клеток, обладающей свойствами стволовых — опухолевыми стволовыми клетками (ОСК) или опухоль-иницирующими [2, 3]. Эти клетки не только отвечают за инициацию, рост и развитие опухолей, но также участвуют в метастазировании и формировании резистентности к лечению, включая лучевую терапию [4–7]. Поэтому многие исследователи полагают, что именно ОСК определяют эффективность лечения злокачественных новообразований.

Для идентификации и выделения ОСК в опухолях разных локализаций используется целый ряд иммунофенотипических и функциональных маркеров. Например, для ОСК молочной железы характерен иммунофенотип $CD44^{+}CD24^{-/low}$ [8, 9]. Показано, что клетки $CD44^{+}CD24^{-/low}$ иницируют развитие опухоли, являются более радио- и химиорезистентными по сравнению с остальными (не стволовыми) клетками рака молочной железы, способствуют метастазированию и, более того, воздействие редкоизионизирующего излучения может приводить к увеличению их количества [10–16]. Одними из основных механизмов, которые участвуют в формировании пула ОСК после облучения, являются процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), который усиливается под влиянием радиационного воздействия, и радиационная инициация программы дедифференцировки опухолевых клеток в ОСК [17–23].

Сокращения: ОСК — опухолевые стволовые клетки; ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход; DB(*n*), DBA(*n*), DBPA(*n*) — димерные бисбензимидазолы различных серий (dimeric bisbenzimidazoles, *n* — число метиленовых групп в линкере); ФИТЦ — флуоресцеинизотиоцианат; МТТ — 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолия бромид (methyl thiazolyl tetrazolium).

Как известно, тесно связанные друг с другом процессы ЭМП и дедифференцировки, опосредованы сложным комплексом эпигенетических механизмов, включая ремоделирование хроматина, модификации гистонов, метилирование ДНК и др. [24–27]. Поэтому стремительно растет количество публикаций, изучающих важную роль эпигенетических механизмов в изменениях критически важной популяции ОСК в ответ на противоопухолевые воздействия, в том числе на облучение. Подобные исследования способствуют разработке средств, направленных на элиминацию ОСК и/или повышение их чувствительности к известным противоопухолевым воздействиям. В этой связи значительный интерес представляют оригинальные низкомолекулярные ДНК-связывающие соединения из класса димерных бисбензимидазолов (dimeric bisbenzimidazoles — DB), которые связываются с АТ-парами двуцепочечной ДНК по узкой бороздке. В основной структуре DB находятся два бисбензимидазольных блока, соединенных между собой олигометиленовым линкером с разным числом (*n*) метиленовых групп (рис. 1). Оказалось, что DB являются ингибиторами ферментов, участвующих в ремоделировании хроматина, таких как ДНК-метилтрансфераза и эукариотическая ДНК-топоизомераза I [28–31]. Нами показано, что соединения, созданной ранее серии DB(*n*) (где *n* = 1–11), являются высокотоксичными для общей популяции опухолевых клеток рака молочной железы линии MCF-7 [32], а DB(5,7) эффективно снижают пул ОСК после комбинированного применения с ионизирующим излучением и, что важно, блокируют радиационно-индуцированный ЭМП [16, 33]. Однако соединения серии DB(*n*) труднорастворимы в водных растворах, что существенно влияет на проведение клеточных исследований *in vitro* и затрудняет их использование в условиях *in vivo*. Поэтому в данной работе мы впервые оценили и сравнили действие новых серий DB — водорастворимых соединений DBA(*n*), где *n* = 1,3,5,7,9,11, и DBPA(*n*), где *n* = 1–4 (рис. 1) — на опухолевые клетки линии MCF-7 после однократного действия и в комбинации с ионизирующим излучением. Серия DBA(*n*) отличается от серии DB(*n*) наличием на концах молекул N,N-диметилпропилкарбоксамидных групп вместо N-метилпиперазиновых, что повышает их гидрофильность. В свою очередь серия DBPA(*n*) отличается от серии DBA(*n*) наличием в олигометиленовом линкере, связывающем два бисбензимидазольных блока, 1,4-пиперазина, что превращает молекулы DBPA(*n*) при нейтральных pH в тетракаатионы, способствуя их лучшей растворимости в водной среде и повышает их аффинность к ДНК. Соединения DBA(5,7) и DBPA(1,4), которые продемонстрировали максимальные цитотоксические эффекты и связывание с клетка-

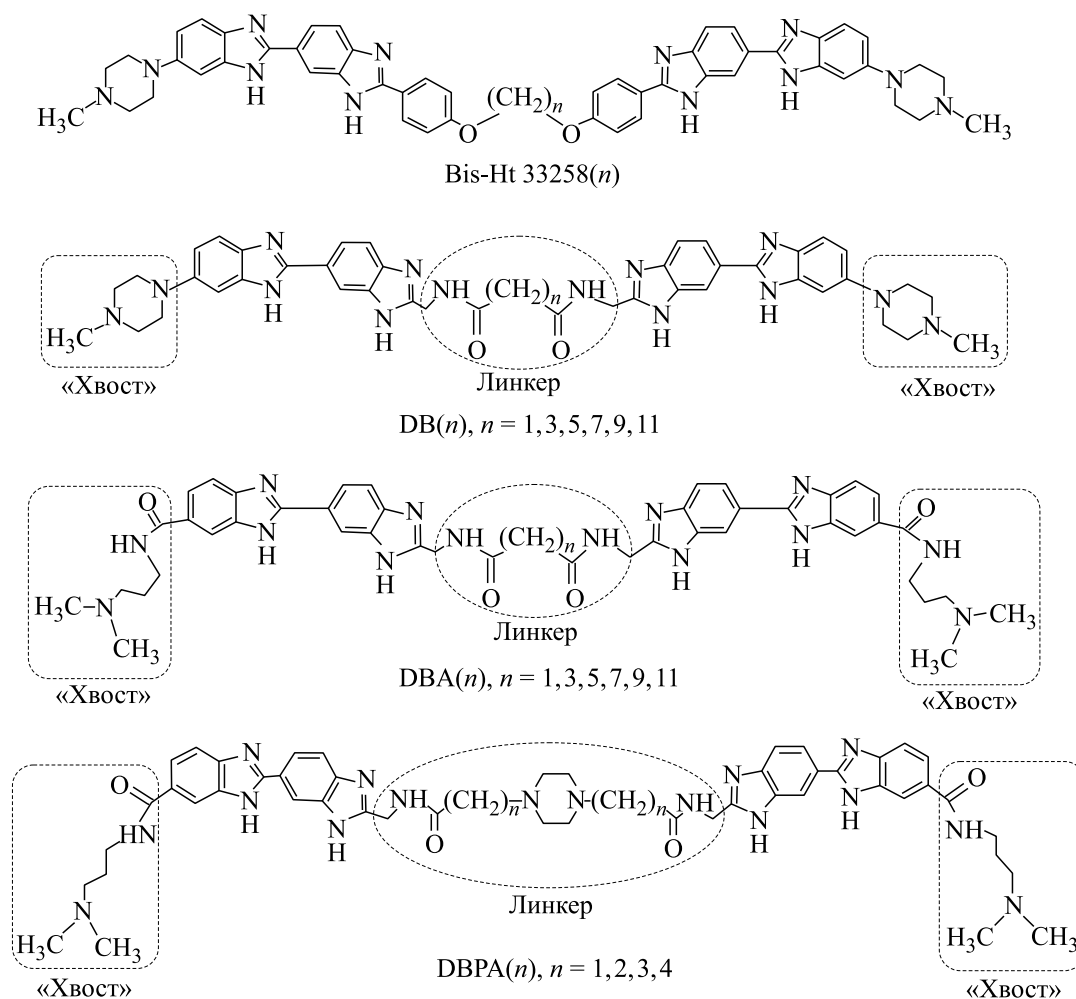


Рис. 1. Химические структуры Bis-Ht 33258 и димерных бисбензимидазолов DB(*n*), DBA(*n*), DBPA(*n*), где *n* — метиленовые группы, соединяющие два бисбензимидазольных блока.

ми, были изучены в плане их влияния на размер пула ОСК и радиационно-индуцированный ЭМП по критерию экспрессии виментина — одного из основных белковых маркеров ЭМП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в полной питательной среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота (Biosera, Франция), стрептомицин (50 мг/л, «ПанЭко», Россия), пенициллин (50000 ед/л, «ПанЭко», Россия), и L-глутамин (292 мг/л, «ПанЭко», Россия) в пластиковых культуральных флаконах (Corning, США). Инкубацию клеток проводили в CO₂-инкубаторе (Shellab, США) при 37°C в увлажненной

атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки рассевали два раза в неделю, снимая с флаконов с помощью растворов Версена и Трипсина («ПанЭко», Россия).

Исследуемые соединения. Изучаемые серии димерных бисбензимидазолов (DB) были синтезированы в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Исследуемые соединения являются низкомолекулярными флуоресцентными аналогами димеров красителя Хёхст 33258 (Bis-Ht 33258), которые способны нековалентно и сайт специфично связываться с АТ-парами малой бороздки ДНК, при этом занимая до одного ее витка. Соединения между сериями отличаются структурой линкера, а внутри серии отличаются между собой числом *n* — метиленовых групп, соединяющим два бисбензимидазольных блока (рис. 1).

Первая серия DB представлена флуоресцентными и хорошо растворимыми в воде соединени-

ями DBA(*n*), где *n* = 1, 3, 5, 7, 9, 11. Линкерами между двумя бисбензимидазольными блоками являются производные алифатических дикарбоновых кислот, олигометиленовые цепочки которых обладают конформационной подвижностью и низким сродством к сахаро-фосфатному остову и парам оснований ДНК. Для улучшения растворимости в водных растворах и увеличения аффинности к ДНК гидрофобные фенильные ядра в концевых группах Ht 33258 заменены на гидрофильные CONH-группы (рис. 1). Подробное описание метода синтеза DBA(*n*) приведено в работе [34].

Во второй серии соединений — DBPA(*n*) (*n* = 1, 2, 3, 4) — для увеличения растворимости в воде в структуру олигометиленового линкера введен остаток 1,4-пиперазина, увеличивающий положительный заряд молекулы, а концевые остатки N-метилпиперазина заменены на N-диметиламинопропилкарбоксамидные группы (рис. 1). Методика синтеза DBPA(*n*) описана в работе [35].

Оценка одиночного действия DBA(*n*) и DBPA(*n*) на общее количество и жизнеспособность клеток линии MCF-7. Клетки снимали со дна культуральных флаконов после 72-часовой инкубации с изучаемыми соединениями в концентрациях 5–100 мкМ/л в полной питательной среде и определяли их количество с помощью камеры Горяева.

Жизнеспособность клеток, обработанных DBA(*n*) и DBPA(*n*), оценивали с помощью стандартного метилтетразолиевого теста (МТТ-теста) через 72 ч после добавления соединений. Для этого клетки рассеивали в 96-луночные планшеты (Corning Costar, США) по 5000 клеток в лунку. Через сутки в лунки вносили исследуемые соединения в концентрациях 5–100 мкМ/л. После 72-часовой инкубации клеток с соединениями в полной питательной среде, среду с ДВ сливали и добавляли к клеткам реактив МТТ (Sigma, США) по 150 мкл в лунку в концентрации 0.25 мг/мл бессывороточной среды DMEM. Планшеты инкубировали в темноте при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 3 ч. После инкубации с реактивом МТТ, к клеткам добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида. Окраску регистрировали при длине волны более 545 нм на микропланшетном фотометре для иммуноферментного анализа STAT FAX 2100 (Awareness Tech. Inc., США). Полученные данные использовали для определения ингибирующих концентраций IC₅₀ и IC₃₀ по критериям снижения общего количества клеток и их жизнеспособности по сравнению с интактным контролем, если удавалось добиться ингибирующего эффекта.

Определение интенсивности связывания DBA(*n*) и DBPA(*n*) с клетками и субклеточного распределения. Проточная цитометрия с УФ-лазером и флуоресцентная микроскопия были использованы

для количественной оценки связывания исследуемых соединений с клетками и изучения их субклеточного распределения благодаря способности соединений образовывать флуоресцирующие комплексы с двуцепочечной ДНК и при этом иметь схожие друг с другом спектры поглощения в УФ-области и флуоресценции [28, 34, 35]. Для оценки количества димерных бисбензимидазолов, связавшихся с клетками через 24 ч после пересева к ним добавляли DBA(1,3,5,7,9,11), или DBPA(1,2,3,4) в концентрациях 5–100 мкМ/л. Через 72 ч после добавления соединений клетки извлекали из флаконов в фосфатно-солевом буфере и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Vantage (BD Biosciences, США), оснащенный двумя лазерами с длинами волн 488 нм и 364 нм. Первый лазер использовался для анализа светорассеяния клеток и выделения региона для последующего изучения флуоресценции. Флуоресценцию DBA(*n*) и DBPA(*n*) измеряли в синей области спектра (424/44 нм) при $\lambda_{\text{возб}} = 364$ нм.

Субклеточное распределение DBA(*n*) изучали с помощью лазерной сканирующей микроскопии через 72 ч инкубации этих соединений в концентрации 20 мкМ/л с клетками. Анализ проводили на лазерном конфокальном микроскопе TCS SPE 4000 (Leica Microsystems, Германия). Для возбуждения флуоресценции DBA(*n*) использовали твердотельный лазер с длиной волны 405 нм. Диапазон регистрации флуоресценции был задан в пределах 410–550 нм. Субклеточное распределение DBPA(*n*) изучали через 72 ч инкубации этих соединений в концентрации 20 мкМ/л с клетками с помощью флуоресцентной микроскопии (из-за отсутствия технической возможности работать на конфокальном микроскопе). Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе Optiphot-2 (Nicon, Япония) при увеличении объектива 40× с использованием блока флуоресцентных фильтров UV-2A (длина волны возбуждения флуоресценции составляла 330–380 нм, регистрации — более 420 нм).

Отдельно оценивали связывание DBA(5,7) и DBPA(1,4) с CD44⁺CD24^{−/low} ОСК и остальными клетками. Через 72 ч после инкубации с соединениями в концентрации 20 мкМ/л клетки извлекали из флаконов, затем окрашивали с помощью антител к CD44 и CD24, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) и фикоэритрином, как подробно описано ниже, и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Vantage. Для измерения флуоресценции ФИТЦа и фикоэритрина использовали стандартные светофильтры 530/30 и 585/42 нм соответственно (при $\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм). Интенсивность флуоресценции DBA(*n*) и DBPA(*n*) измеряли в синей области спектра (424/44 нм) при $\lambda_{\text{возбуждения}} = 364$ нм.

Данные о флуоресценции ФИТЦа, фикоэритрина и изучаемых соединений записывали в файл. При последующей обработке данных с помощью программы CellQuestPro (BD Biosciences, США) выделяли регион клеток $CD44^{+}CD24^{-/low}$, после чего анализировали интенсивность флуоресценции DBA (5,7) и DBPA(1,4) в этом регионе и в остальных клетках отдельно.

Определение количества опухолевых стволовых клеток $CD44^{+}CD24^{-/low}$ после одиночного и комбинированного действия DBA(5,7) или DBPA(1,4) и ионизирующего излучения. Через 24 ч после посева к клеткам добавляли указанные соединения в конечной концентрации 20 мкМ/л. Клетки инкубировали с соединениями 24 ч в стандартных условиях и подвергали воздействию γ -излучения на установке «Рокус-АМ» (Россия) в дозе 4 Гр при мощности дозы 1.5 Гр/мин. Часть образцов только облучали, часть — только инкубировали с исследуемыми соединениями в течение 72 ч. Контролем служили интактные клетки.

Через 48 ч после облучения клетки извлекали из флаконов в холодный раствор Хэнкса и инкубировали со смесью моноклональных антител к CD44, меченных ФИТЦем (BD Biosciences, США), и антител к CD24, меченных фикоэритрином (BD Biosciences, США), из расчета по 20 мкл антител на 1 млн клеток. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела соответствующих изотипов к гемоцианину улитки, конъюгированные с теми же флуорохромами, что и антитела к указанным поверхностным маркерам (BD Biosciences, США). Пробы инкубировали с антителами в течение 30 мин на льду в темноте, затем отмывали в фосфатно-солевом буфере и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Vantage. Для измерения флуоресценции ФИТЦа использовали узкополосные фильтры 530/30 нм, для фикоэритрина — 585/42 нм. Полученные данные об интенсивности прямого и бокового светорассеяния, флуоресценции ФИТЦа и фикоэритрина записывали в файл, который обрабатывали с помощью программы CellQuestPro (BD Biosciences, США). Определяли относительное количество (в %) ОСК с иммунофенотипом $CD44^{+}CD24^{-/low}$ среди неповрежденных клеток, выделенных по параметрам прямого и бокового светорассеяния по общепринятой методике. Абсолютное количество ОСК $CD44^{+}CD24^{-/low}$ определяли путем умножения доли этих клеток на общее количество клеток во флаконе, определенное с помощью камеры Горяева.

Определение экспрессии виментина после одиночного и комбинированного действия DBA(5,7) или DBPA(1,4) и ионизирующего излучения. Использовали те же условия комбинированного

воздействия, что при исследовании количественных изменений пула ОСК, т.е. концентрация соединений составляла 20 мкМ/л, доза облучения — 4 Гр, а время после облучения (48 ч) было выбрано по результатам проведенных ранее исследований [16, 33]. По окончании инкубации с исследуемыми соединениями клетки снимали со дна культуральных флаконов, из каждого флакона отбирали аликвоты по 250 тыс. клеток, которые фиксировали и до анализа хранили в ацетоне при -20°C . Перед окрашиванием клетки трехкратно отмывали в фосфатно-солевом буфере с 1%-м бычьим сывороточным альбумином, после чего инкубировали с моноклональными антителами к виментину, меченными фикоэритрином (BD Biosciences, США), в течение 1 ч при комнатной температуре в соотношении 5 мкл антител/250 тыс. клеток. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела того же изотипа к гемоцианину улитки, конъюгированные с фикоэритрином (BD Biosciences, США). После инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител в фосфатно-солевом буфере и немедленно анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD Biosciences, США) по показателям интенсивности прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции фикоэритрина. С помощью программы CellQuestPro определяли среднюю интенсивность флуоресценции фикоэритрина в клетках после исключения дребриса по показателям светорассеяния.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили по критерию Манна–Уитни, с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Для построения графиков и определения IC_{30} и IC_{50} использовали программу Origin 6.0 (Microcal Software Inc., США). Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторах. Полученные результаты объединяли. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическое действие DBA(n) и DBPA(n) на общую популяцию клеток MCF-7 при их одиночном применении. Как установлено с помощью МТТ-теста, инкубация клеток MCF-7 с DBA(1,3,5,7,9,11) не влияла на жизнеспособность общей массы опухолевых клеток (табл. 1). Но количество клеток, которые оставались на дне культуральных флаконов после обработки трипсином и версеном, снижалось после инкубации с DBA(n), причем этот эффект был выражен в наибольшей степени в случае DBA(5,7). Значения IC_{30} и IC_{50} для соединений серии DBA(n), которые соответствуют концентрациям, вызываю-

Таблица 1. Ингибирующие концентрации IC_{30} и IC_{50} (мкМ/л) соединений DBA(*n*) по двум критериям оценки эффектов после инкубации с клетками MCF-7 в течение 72 ч

Критерии оценки эффектов	DBA(1)		DBA(3)		DBA(5)		DBA(7)		DBA(9)		DBA(11)	
	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}
Количество клеток (подсчет клеток в камере Горяева)	24 1	43 6	27 7	55 0	21 0	40 2	19 7	36 3	24 4	44 0	30 2	45 7
Жизнеспособность (МТТ-тест)	Ингибирование жизнеспособности клеток не установлено, поэтому IC_{30} и IC_{50} не вычисляли											

Таблица 2. Ингибирующие концентрации (мкМ/л) IC_{30} и IC_{50} соединений DBPA(*n*) по двум критериям оценки эффектов после инкубации с клетками MCF-7 в течение 72 ч

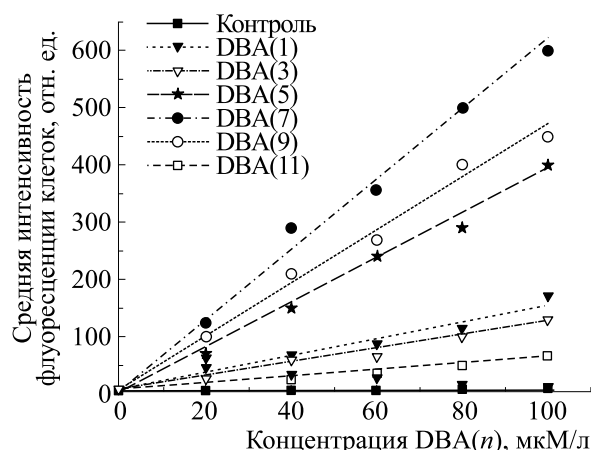
Критерии оценки эффектов	DBPA(1)		DBPA(2)		DBPA(3)		DBPA(4)	
	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}
Количество клеток (подсчет клеток в камере Горяева)	15 5	24 9	21 1	45 2	27 5	47 6	20 0	34 5
Жизнеспособность клеток (МТТ-тест)	32 5	55 4	52 3	87 5	60 1	100 0	37 4	61 3

щим снижение количества клеток во флаконе на 30 и 50% соответственно, приведены в табл. 1.

Соединения DBPA(1,2,3,4) оказались цитотоксичными для общей популяции клеток MCF-7. Все соединения этой серии DB значительно уменьшали как количество опухолевых клеток, так и их жизнеспособность по данным МТТ-теста. Как показано в табл. 2, соединения DBPA(1,4) продемонстрировали наиболее выраженное ингибирующее действие на клетки линии MCF-7 по обоим используемым критериям (жизнеспособности и количеству клеток).

Интенсивность связывания с клетками и субклеточное распределение DBA(*n*) и DBPA(*n*). При оценке интенсивности связывания с клетками первой серии изучаемых соединений – DBA(*n*) – результаты проточной цитофлуориметрии показали, что флуоресценция клеток возрастала после инкубации с любым из соединений DBA(1–11), а при использовании концентрации 40 мкМ/л и более была выше по сравнению с контрольной аутофлуоресценцией (рис. 2). Наблюдалась линейная зависимость интенсивности флуоресценции клеток от концентрации этих соединений в среде культивирования. При этом интенсивность флуоресценции клеток, инкубированных с DBA(5,7,9) была существенно выше, чем при ин-

кубации с DBA(1,3,11). Однако по данным лазерной сканирующей микроскопии изучаемые соединения практически не проникали в клетки и соответственно не накапливались в ядрах, но DBA(5,7,9) образовывали ярко светящиеся конгломераты с наружной стороны клеточной мембраны и в межклеточном пространстве (рис. 3).

**Рис. 2.** Зависимость средней интенсивности флуоресценции клеток линии MCF-7 от концентрации DBA(*n*), где *n* = 1, 3, 5, 7, 9, 11.

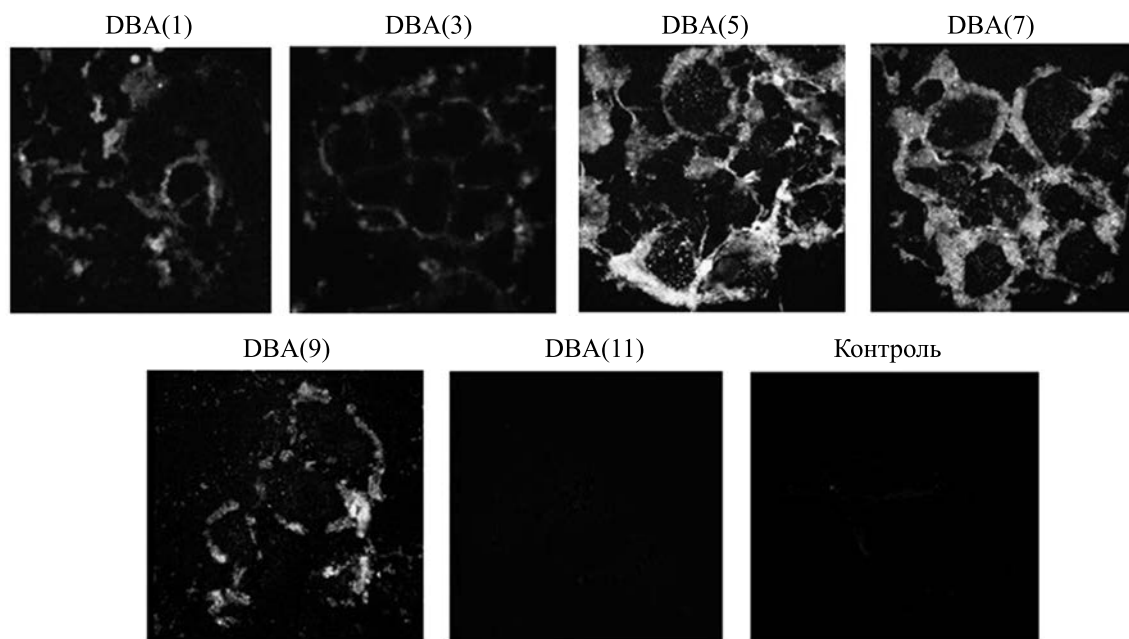


Рис. 3. Фотографии клеток линии MCF-7, инкубированных с DBA(n), где $n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$, в концентрации 20 мкМ/л в течение 72 ч, полученные с помощью лазерной сканирующей микроскопии (увеличение объектива $\times 63$, $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм, $\lambda_{\text{эмис}} = 410\text{--}550$ нм).

Следует отметить что, если до анализа на флуоресцентном микроскопе не отмывать клетки от среды культивирования, содержащей DBA(n), то визуализируются массивные скопления флуоресцирующего материала, который распределяется независимо от клеток, что является характерным признаком агрегации DBA(n) в культуральной среде.

По данным проточной цитометрии интенсивность флуоресценции клеток, инкубированных с

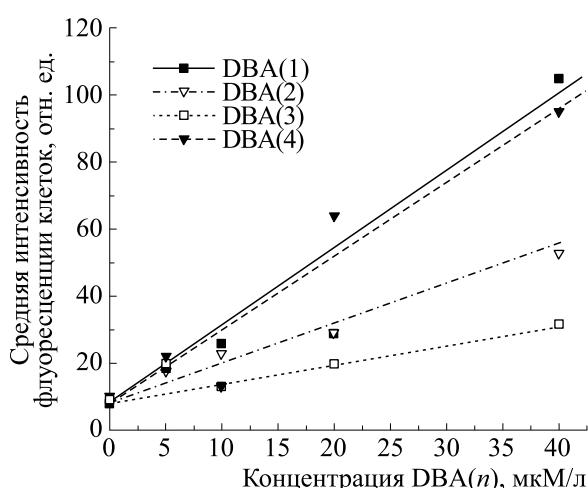


Рис. 4. Зависимость средней интенсивности флуоресценции клеток линии MCF-7 от концентрации DBPA(n), где $n = 1, 2, 3, 4$.

DBPA(1,2,3,4), была статистически значимо выше таковой в контроле при всех использованных концентрациях (рис. 4). Наблюдалась линейная зависимость интенсивности флуоресценции клеток от концентрации этих соединений в среде культивирования. Наибольшее связывание продемонстрировали два соединения — DBPA(1) и DBPA(4). При этом оба соединения проникали в клеточные ядра, где распределялись достаточно равномерно (рис. 5). Цитоплазма относительно слабо окрашивалась этими соединениями, которые распределялись там в виде небольших гранул. Интересно, что спектр флуоресценции цитоплазматических гранул смещался в более длинноволновую область по сравнению с ядерной флуоресценцией. DBPA(2,3) связывались с клетками значительно слабее, чем остальные соединения ($p < 0.01$ при концентрации 40 мкМ/л). При этом интенсивность флуоресценции ядер при применении DBPA(2,3) была значительно ниже по сравнению с таковой после инкубации с DBPA(1,4).

Таким образом, для дальнейшего исследования эффектов действия серии соединений DBA(n) на ОСК и ЭМП были выбраны DBA(5) и DBA(7) в концентрации 20 мкМ/л, которые в наибольшей степени снижали количество клеток, оставшихся на дне культуральных флаконов при высоком связывании с клеточной поверхностью. По совокупности свойств (высокое связывание с клетками, накопление в ядрах и наиболее выраженное ингибирующее действие) из серии

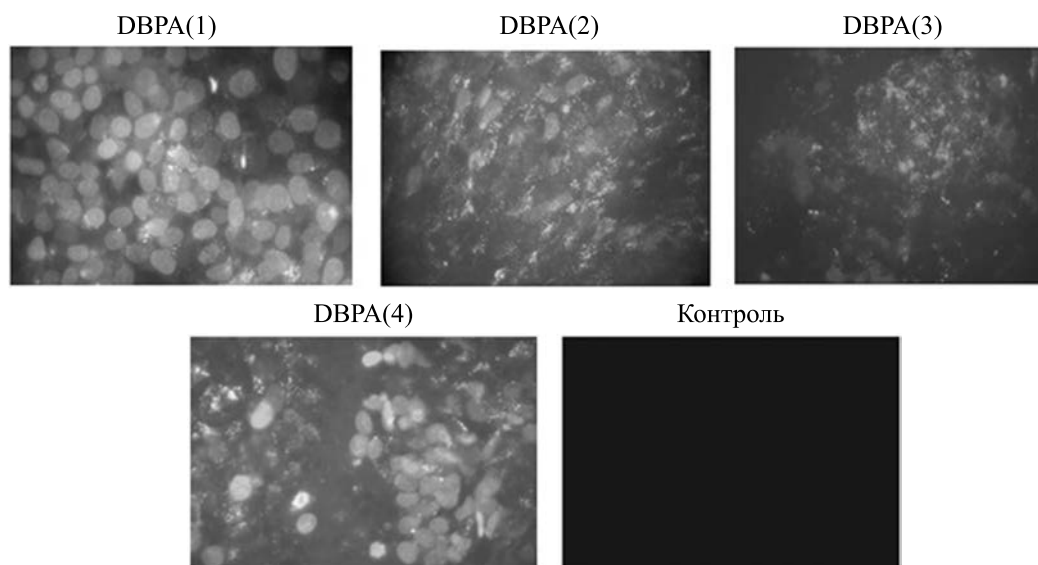


Рис. 5. Фотографии клеток линии MCF-7, инкубированных с DBPA(n), где $n = 1, 2, 3, 4$, в концентрации 20 мкМ/л в течение 72 ч, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии (увеличение объектива $\times 40$, $\lambda_{\text{возб}} = 330\text{--}380$ нм, $\lambda_{\text{эмис}} > 420$ нм).

DBPA(n) были выбраны два соединения — DBPA(1) и DBPA(4) в концентрации 20 мкМ/л.

Интенсивность связывания DBA(5,7) и DBPA(1,4) с опухолевыми стволовыми и остальными клетками. Результаты проточноцитометрического исследования интенсивности связывания соединений DBA(5,7) отдельно с ОСК и остальными клетками представлены на рис. 6. Показано, что инкубация как с DBA(5), так и с DBA(7) приводит к значительному увеличению флуоресценции ОСК и остальных клеток по сравнению с контролем ($p < 0.001$), что соответствует результатам исследования общей популяции клеток (рис. 2 и 3). При этом установлено, что ОСК связывают DBA(5) в 4.9 раза, а DBA(7) — в 4.2 раза интенсивнее, чем остальные клетки ($p < 0.005$ в обоих случаях).

Соединения DBPA(1,4), также как и первая серия DBA(n), более эффективно окрашивали ОСК, чем остальные клетки ($p < 0.001$). Важно, что, несмотря на высокую экспрессию в ОСК транспортеров откачки многих химических веществ, исследуемые DBPA(1) и DBPA(4) накапливались в ОСК интенсивнее в 3.8 и 4.0 раза, чем в остальных клетках соответственно ($p < 0.01$ в обоих случаях) (рис. 7).

Изменение относительного и абсолютного количества опухолевых стволовых клеток $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{low}}$ после одиночного и комбинированного действия DBA(5,7) или DBPA(1,4) и γ -излучения. Эффекты одиночного и комбинированного действия исследуемых DB и γ -излучения на ОСК оценивали через 48 ч после облучения по изменению относительного и абсолютного количества клеток с

иммунофенотипом $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{low}}$, который часто используется для выявления ОСК молочной железы, в том числе в культуре линии MCF-7.

Установлено, что однократное облучение в дозе 4 Гр приводит к увеличению относительного количества клеток $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{low}}$ в среднем в 2.0 раза по сравнению с контролем ($p = 0.04$) (рис. 8 и 9).

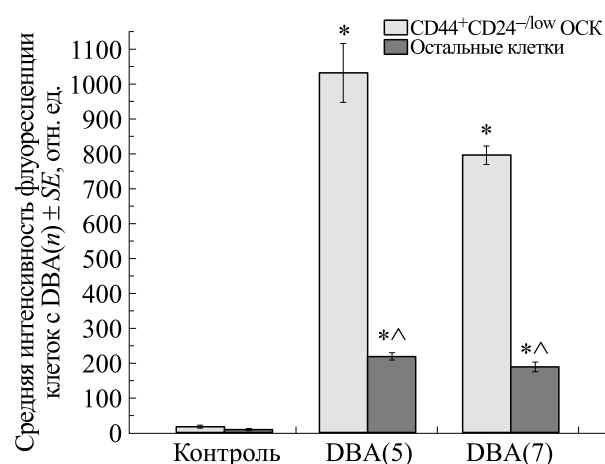


Рис. 6. Средняя интенсивность флуоресценции $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{low}}$ ОСК и остальных клеток линии MCF-7, инкубированных с DBA(5) или DBA(7) в концентрации 20 мкМ/л, по данным витального исследования с помощью проточной цитофлуориметрии: * — $p < 0.001$ при сравнении с интенсивностью контрольной аутофлуоресценции, ^ — $p < 0.005$ при сравнении с флуоресценцией соответствующего соединения в популяции ОСК.

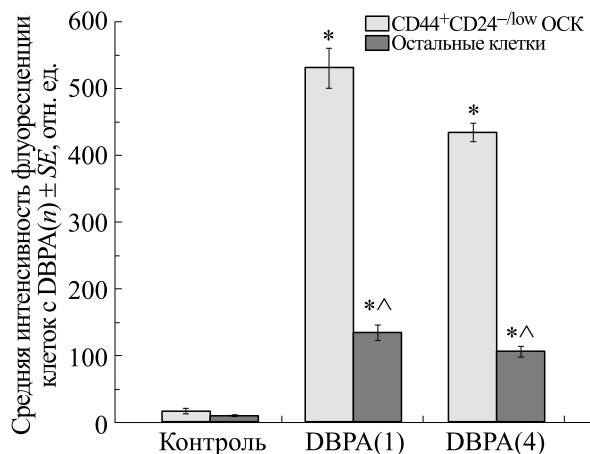


Рис. 7. Средняя интенсивность флуоресценции CD44⁺CD24^{-low} ОСК и остальных клеток линии MCF-7, инкубированных с DBPA(1) или DBPA(4) в концентрации 20 мкМ/л, по данным витального исследования с помощью проточной цитофлуориметрии: * – $p < 0.001$ при сравнении с интенсивностью контрольной аутофлуоресценции, ^ – $p < 0.01$ при сравнении с флуоресценцией соответствующего соединения в популяции ОСК.

Для соединений DBA(5) и DBA(7) показано, что, как после одиночного, так и после комбинированного действия с γ -излучением, относительное количество ОСК статистически значимо возрастает (рис. 8). Так, DBA(5) и DBA(7) в комбинации с ионизирующим излучением увеличивают относительное количество клеток CD44⁺CD24^{-low} в 3.1 и 3.6 раза по сравнению с облучением ($p = 0.006$ и $p = 0.005$ соответственно).

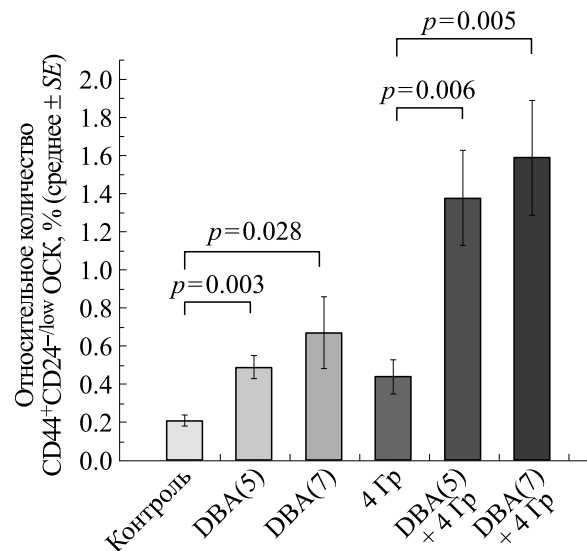


Рис. 8. Изменение относительного количества CD44⁺CD24^{-low} ОСК после одиночного и комбинированного действия DBA(5) или DBA(7) в концентрации 20 мкМ/л и γ -излучения в дозе 4 Гр. Указаны величины p при сравнении экспериментальных групп, продемонстрировавших статистически значимые различия.

По сравнению с интактным контролем эффект выражен еще сильнее: DBA(5) и DBA(7) в комбинации с облучением увеличивают относительное количество ОСК в 6.6 и 7.6 раза соответственно ($p < 0.001$ в обоих случаях). Одиночное действие DBA(5) и DBA(7) также приводит к значительному увеличению относительного количества ОСК

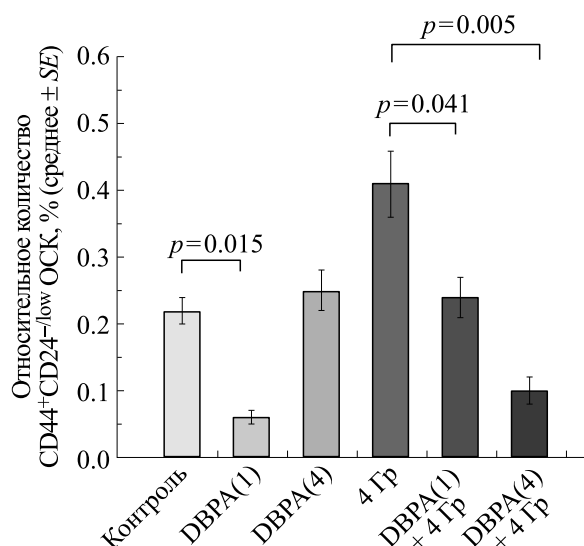


Рис. 9. Изменение относительного количества CD44⁺CD24^{-low} ОСК после одиночного и комбинированного действия DBPA(1) или DBPA(4) в концентрации 20 мкМ/л и γ -излучения в дозе 4 Гр. Указаны величины p при сравнении экспериментальных групп, продемонстрировавших статистически значимые различия.

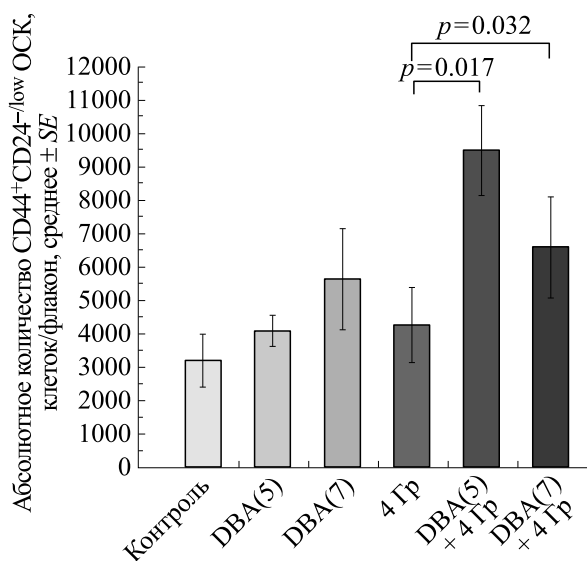


Рис. 10. Изменение абсолютного количества $CD44^+CD24^{-/low}$ ОСК после одиночного и комбинированного действия DBA(5) или DBA(7) в концентрации 20 мкМ/л и γ -излучения в дозе 4 Гр. Указаны величины p при сравнении экспериментальных групп, продемонстрировавших статистически значимые различия.

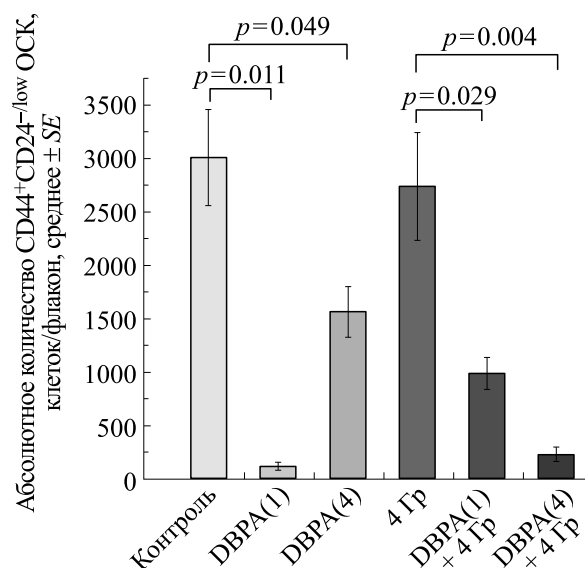


Рис. 11. Изменение абсолютного количества $CD44^+CD24^{-/low}$ ОСК после одиночного и комбинированного действия DBPA(1) или DBPA(4) в концентрации 20 мкМ/л и γ -излучения в дозе 4 Гр. Указаны величины p при сравнении экспериментальных групп, продемонстрировавших статистически значимые различия.

по сравнению с интактным контролем — в 2.3 и 3.2 раза ($p = 0.003$ и $p = 0.028$ соответственно).

Напротив, для соединений DBPA(1) и DBPA(4) из второй серии DB показана способность снижать относительное количество клеток $CD44^+CD24^{-/low}$ после облучения (рис. 9). Так, предварительная инкубация клеток с DBPA(1) перед облучением снижает долю ОСК в 1.7 раза по сравнению с одиночным действием облучения ($p = 0.041$), с DBPA(4) — в 4.1 раза ($p = 0.005$). Интересно, что и одиночное действие DBPA(1) приводит к значительному снижению относительного количества ОСК в 3.7 раза по сравнению с интактным контролем ($p = 0.015$).

На рис. 10 представлено изменение абсолютного количества клеток $CD44^+CD24^{-/low}$ после комбинированного действия DBA(5,7) и облучения. Показано, что комбинированное действие DBA(5) или DBA(7) и облучения в дозе 4 Гр значительно увеличивает абсолютное количество клеток $CD44^+CD24^{-/low}$ по сравнению с одиночным действием облучения в 2.2 и 1.5 раза соответственно ($p = 0.017$ и $p = 0.032$). Кроме того наблюдается тенденция к повышению абсолютного количества ОСК при одиночном применении как DBA(5), так и DBA(7) при сравнении с интактным контролем.

В отношении второй серии DB установлено, что в комбинации с ионизирующим излучением как DBPA(1), так и DBPA(4) значительно снижают

абсолютное количество клеток $CD44^+CD24^{-/low}$ по сравнению с одиночным облучением и контролем (рис. 11). Так, DBPA(1) в комбинации с облучением приводит к снижению абсолютного количества ОСК в 3.0 раза по сравнению с контролем и в 2.8 раза по сравнению с облучением ($p = 0.027$ и $p = 0.029$ соответственно). Использование DBPA(4) в комбинации с облучением приводит к еще более выраженному эффекту: различия по сравнению с одиночным облучением достигают 12 раз ($p = 0.004$).

Изменение белковой экспрессии виментина после одиночного и комбинированного действия DB(5) или DB(7) и γ -излучения. Результаты оценки белковой экспрессии виментина в общей культуре опухолевых клеток MCF-7 представлены на рис. 12 и 13. Из рисунков следует, что в интактном контроле связывание антител к виментину не отличалось от неспецифического связывания, что указывает на отсутствие экспрессии виментина в общей массе опухолевых клеток этой линии. При этом через 48 ч после облучения в дозе 4 Гр наблюдалось специфическое связывание антител с виментином — одним из основных маркеров ЭМП ($p = 0.03$), что свидетельствует об индукции ЭМП под влиянием γ -излучения.

Отмечалась тенденция к повышению экспрессии виментина по сравнению с интактным контролем после инкубации клеток с соединениями DBA(5) и DBA(7) в течение 72 ч, а также в течение 24 ч перед облучением и 48 ч после него (рис. 12).

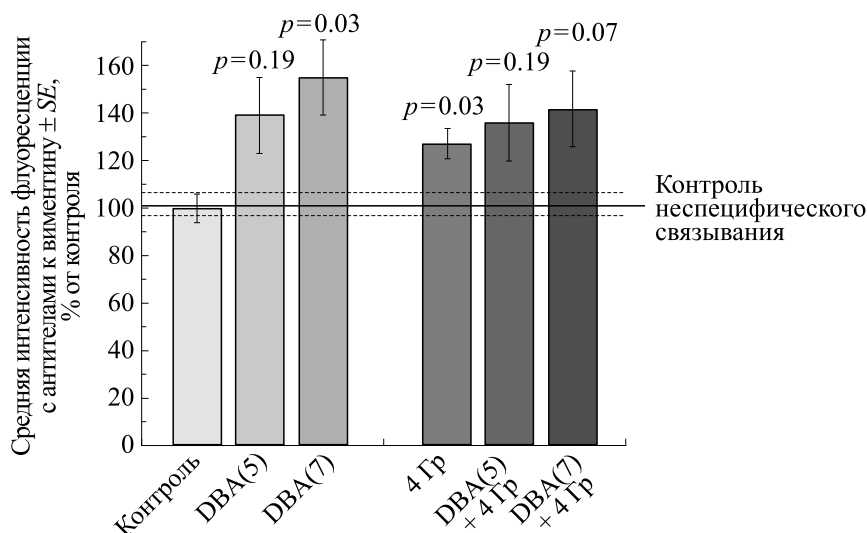


Рис. 12. Интенсивность связывания клеток линии MCF-7 с антителами к виментину после одиночного и комбинированного действия DBA(5) или DBA(7) и облучения в дозе 4 Гр по данным проточной цитометрии. Сплошная горизонтальная линия показывает среднюю интенсивность флуоресценции клеток после обработки контрольными иммуноглобулинами (изотипический контроль неспецифического связывания), пунктирные линии отмечают стандартную ошибку ($\pm SE$) средней интенсивности флуоресценции в контроле неспецифического связывания. Указаны величины p при сравнении с необлученным контролем (образцами после инкубации с антителами к виментину).

В случае DBA(7) различия достигали статистической значимости ($p = 0.03$). Как было показано выше, под влиянием этих же соединений происходило увеличение количества ОСК как при их одиночном действии, так и при комбинированном применении с ионизирующим излучением (рис. 8 и 9). Напротив, соединения из второй изу-

чаемой серии DBPA(1,4) блокировали радиационно-индуцированный ЭМП, снижая уровень связывания антител к виментину до контрольных значений неспецифического связывания (рис. 13). Интересно, что эти же соединения в комбинации с облучением снижали относительное и абсолютное количество ОСК по сравнению

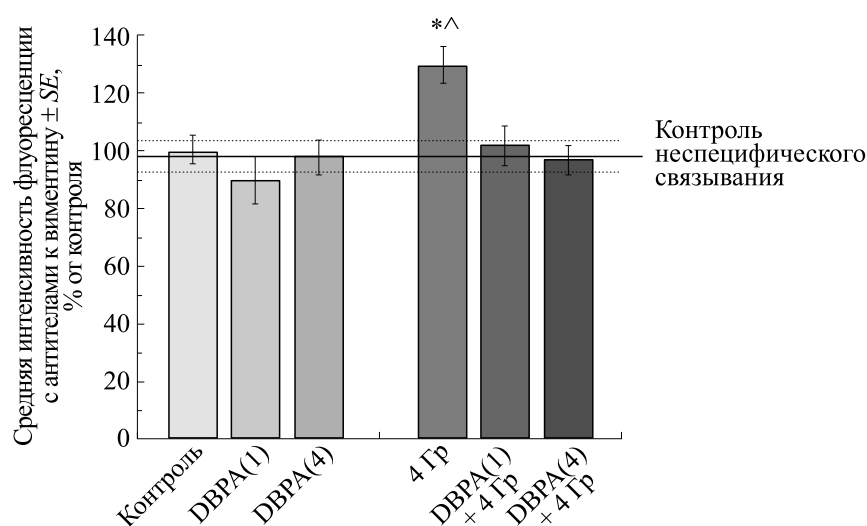


Рис. 13. Интенсивность связывания клеток линии MCF-7 с антителами к виментину после одиночного и комбинированного действия DBPA(1) или DBPA(4) и облучения в дозе 4 Гр по данным проточной цитометрии. Сплошная горизонтальная линия показывает среднюю интенсивность флуоресценции клеток после обработки контрольными иммуноглобулинами (изотипический контроль неспецифического связывания). Пунктирные линии отмечают стандартную ошибку ($\pm SE$) средней интенсивности флуоресценции в контроле неспецифического связывания; * — $p = 0.03$ при сравнении с интактным контролем, ^ — $p = 0.02$ при сравнении с контролем неспецифического связывания.

с одиночным действием ионизирующего излучения (рис. 9 и 11).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перспективным направлением развития противоопухолевой терапии является разработка соединений, связывающихся с узкой бороздкой двуцепочечной ДНК, которая важна для функционирования большого числа ДНК-зависимых ферментов и аллостерической регуляции транскрипционных факторов [36–39]. Известно, что узкобороздочные лиганды, нековалентно взаимодействующие с ДНК и занимающие специфические последовательности в промоторах генов, приводят к обратимому нарушению связывания с ДНК факторов транскрипции и ряда ферментов, участвующих в процессах репликации, репарации и компактизации ДНК (топоизомеразы I, метилтрансферазы и др.). В отличие от традиционных противоопухолевых препаратов на основе интеркаляторов, такие соединения не приводят к значительному искажению пространственной структуры ДНК и характеризуются низкой мутагенностью [40]. Поэтому узкобороздочные лиганды ДНК из класса димерных бисбензимидазолов, разрабатываемые российскими химиками на протяжении ряда последних лет, представляют значительный интерес в плане разработки на их основе противоопухолевых средств.

В данной работе нами были изучены две серии водорастворимых соединений из класса DB, отличающиеся между собой структурой линкера — DBA(1–11) и DBPA(1–4). Для этих серий DB нами показаны различия по цитотоксичности и способности связываться с опухолевыми клетками линии MCF-7 в адгезионной культуре *in vitro*. Соединения DBA(*n*), в отличие от DBPA(*n*), не проявили цитотоксическую активность по результатам МТТ-теста, но количество прикрепленных к подложке клеток после инкубации с первыми снижалось. Кроме того, DBA(*n*) не накапливались, в отличие от DBPA(*n*), ни в цитоплазме, ни в ядрах клеток, а связывались с клеточной поверхностью. Очевидно, что DBA(*n*) взаимодействуют с поверхностными рецепторами и способны влиять на адгезионные свойства клеток в зависимости от количества связавшихся молекул: так, DBA(5,7), которые интенсивнее всего связываются с клеточной поверхностью, в наибольшей степени снижают количество прикрепленных клеток. Соединения DBPA(*n*) проникают внутрь клеток, связываются с ядерной ДНК и, вероятнее всего, оказывают цитотоксическое дей-

ствие на клетки путем ингибирования активности ферментов, реализующих метаболизм ДНК.

Для дальнейшего изучения действия DB на ОСК были отобраны по два соединения из каждой изучаемой серии, характеризующиеся высоким связыванием с клетками и относительно высокой цитотоксичностью/способностью уменьшать количество опухолевых клеток — DBA(5,7) и DBPA(1,4). Показано, что ОСК, идентифицированные по иммунофенотипу CD44⁺CD24^{-/low}, связывают выбранные соединения из обеих серий значительно сильнее, чем остальные клетки. Эти данные следует признать весьма обнадеживающими в плане направленного воздействия изучаемых соединений именно на ОСК, тем более, что, как показывают многочисленные исследования, ОСК способны более эффективно откачивать во внеклеточную среду многие химические соединения, включая традиционные химиопрепараты [41].

Интересно, что высокое связывание DBA(5,7) с ОСК не приводило к снижению их относительного количества, как можно было ожидать. Напротив, относительное и абсолютное количество ОСК возрастало как после одиночного, так и после комбинированного действия этих соединений с γ -излучением. В то же время соединения DBPA(1,4) значимо нивелировали стимулирующее действие облучения на ОСК, снижая количество этих клеток. Можно было предположить, что причина разнонаправленного действия изученных соединений заключается не только в их разной способности проникать внутрь клеток и связываться с ядерной ДНК, но и в различной способности влиять на ЭМП, который в настоящее время считается одним из ключевых механизмов, объясняющих изменение пула ОСК после различных терапевтических воздействий, в том числе и ионизирующего излучения. В основе этого предположения, с одной стороны, лежат данные литературы и результаты собственных исследований об увеличении пула ОСК за счет индукции ЭМП [16, 20, 33, 42]. Известно, что этот процесс, приводящий к дедифференцировке и приобретению свойств ОСК, регулируется на разных уровнях, включая клеточную передачу сигналов (JAK2/STAT3 и др.), контроль транскрипции (SNAIL, Twist, Zeb и др.) и эпигенетические модификации (метилование ДНК, модификации гистонов и др.) [43, 44]. С другой стороны, установлено, что блокаторы ЭМП снижают количество ОСК и их использование считается очень перспективным в сочетании с традиционными противоопухолевыми воздействиями [45–47]. Более того, показана возможность ингибирования

ния ЭМП с помощью разнообразных модификаторов структуры хроматина [48–50], включая димерные бисбензимидазолы серии DB(*n*) [16, 33].

Полученные результаты подтвердили предположение о разнонаправленном влиянии изученных соединений DBA(5,7) и DBPA(1,4) на радиационно индуцируемый ЭМП как важный фактор, регулирующий формирование пула ОСК при комбинированных воздействиях. Так, в случае комбинации DBPA(1,4) и ионизирующего излучения показано отсутствие экспрессии виментина (одного из основных маркеров ЭМП), что свидетельствует о блокировании радиационно-индуцированного процесса ЭМП. Важно, что эти же соединения, как и ожидалось, снижали абсолютное и относительное количество ОСК после комбинированного действия с ионизирующим излучением. Вероятно, DBPA(1,4) как и соединения другой, изученной ранее серии DB(*n*), обладают способностью ремоделировать хроматин путем ингибирования ферментов, участвующих в компактизации/декомпактизации ДНК, таких как ДНК-метилтрансфераза и эукариотическая ДНК-топоизомераза I и/или регулировать факторы транскрипции. Так, недавно было показано [35], что DBPA(*n*) ингибируют гистон-подобный белок H-NS в клетках *E. Coli*, который, как известно, поддерживает компактизацию бактериальных хромосом и является супрессором большой группы бактериальных генов. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения механизмов действия DBPA(*n*) на эукариотические клетки и, в частности, опухолевые.

В то же время экспрессия виментина была зарегистрирована нами при раздельном и комбинированном действии DBA (5,7) и ионизирующего излучения, что свидетельствует о стимуляции ЭМП в культуре клеток MCF-7 под влиянием этих воздействий. Усиление ЭМП может объяснять, по крайней мере частично, обнаруженный нами эффект увеличения пула ОСК при воздействии этих соединений. Учитывая, что DBA(5,7) не проникают внутрь клеток (возможно, из-за агрегации в среде культивирования), они не взаимодействуют с ДНК-метилтрансферазой и другими ферментами клеточного ядра, следовательно, не оказывают прямого влияния на их активность. Вероятно, на мембране клеток находятся DBA-связывающие рецепторы, которые осуществляют передачу сигнала внутрь клетки и запускают процесс ЭМП. Для идентификации таких DBA-связывающих рецепторов необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, результаты данного исследования, во-первых, доказывают тесную связь

ЭМП и формирования пула ОСК и, во-вторых, в случае серии соединений DBPA(*n*) подтверждают данные ряда авторов о возможности применения ингибиторов ДНК-метилтрансфераз в противоопухолевой терапии, направленной на опухолевые стволовые клетки [51–53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено, что DBA(*n*) не проникают в опухолевые клетки линии MCF-7, но DBA(5,7) взаимодействуют с рецепторным аппаратом на плазматической мембране и индуцируют ЭМП, что приводит к увеличению пула ОСК. Напротив, DBPA(*n*) накапливаются в ядрах, что особенно хорошо выражено в случае DBPA(1,4), снижают радиационно-индуцированный ЭМП и нивелируют стимулирующее действие γ -облучения на пул ОСК, в результате чего количество ОСК снижается. Полученные данные показывают тесную связь процессов ЭМП и формирования пула ОСК: в случаях, когда удается снизить экспрессию маркеров ЭМП (под влиянием DBPA(1,4), количество ОСК снижается, и, наоборот, при индукции ЭМП (под влиянием DBA(5,7) количество ОСК увеличивается.

DBPA(1,4) представляются весьма перспективными соединениями в плане дальнейшего их изучения как средств элиминации и повышения радиочувствительности ОСК в условиях *in vivo*.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-75-10025).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Статистика по раку молочной железы (26.03.2021) [Электронный ресурс]: официальный сайт Всемирной организации здравоохранения. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/factsheets/detail/breast-cancer>.
2. M. Kakarala and M. S. Wicha, *J. Clin. Oncol.*, **26** (17), 2813 (2008).
3. S. Taurina and H. Alkhalif, *Neoplasia*, **22** (12), 663 (2020).

4. P. Zhu and Z. Fan, *Biophys. Rep.*, **4** (4), **178** (2018).
5. N. K. Lytle, A. G. Barber, and T. Reya, *Nat. Rev.*, **18**, 669 (2018).
6. T. Zhang, H. Zhou, K. Wang, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **147**, 112616 (2022).
7. X. Zeng, C. Liu, J. Yao, et al., *Pharmacol. Res.*, **136**, 105320 (2021).
8. M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (7), 3983 (2003).
9. F. F. de Beça, P. Caetano, R. Gerhard, et al., *J. Clin. Pathol.*, **66**, 187 (2013).
10. R. Camerlingo, G. A. Ferraro, F. D. Francesco, et al., *Oncol. Rep.*, **31**, 1127 (2014).
11. W. Li, H. Ma, J. Zhang, et al., *Sci. Rep.*, **7**, 13856 (2017).
12. C. Sheridan, H. Kishimoto, R. K. Fuchs, et al., *Breast Cancer Res.*, **8** (5), 1 (2006).
13. T. Phillips, W. H. McBride, and F. Pajonk, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, **98** (24), 1777 (2006).
14. C. Lagadec, E. Vlasi, L. D. Donna, et al., *Breast Cancer Res.*, **12** (13), 1 (2010).
15. И. А. Замулаева, О. Н. Матчук, Е. И. Селиванова и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **54** (3), 256 (2014).
16. K. A. Churyukina, A. L. Zhuze, A. A. Ivanov, et al., *Biophysics*, **65** (1), 87 (2020).
17. F. De Bacco, P. Luraghi, E. Medico, et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, **103** (8), 645 (2011).
18. A. Kawamoto, T. Yokoe, K. Tanaka, et al., *Oncol. Rep.*, **27** (1), 51 (2012).
19. X. Zhang, X. Li, N. Zhang, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412** (1), 188 (2011).
20. S. Y. Lee, E. K. Jeong, M. K. Ju, et al., *Mol. Cancer*, **16**, Art. ID 10 (2017). DOI: 10.1186/s12943-016-0577-4
21. C. Lagadec, E. Vlasi, L. D. Donna, et al., *Stem Cells*, **30**, 833 (2012).
22. X. Gao, B. J. Sishc, C. B. Nelson, et al., *Front. Oncol.*, **9** (138), Art. ID 00138 (2016). DOI: 10.3389/fonc.2016.00138
23. F. Li, K. Zhuo, L. Gao, et al., *Oncol. Lett.*, **12**, 3059 (2016).
24. L. Sun and J. Fang, *Cell Mol. Life Sci.*, **73** (23), 4493 (2016).
25. S. Keyvani-Ghamsari, K. Khorsandi, A. Rasul, et al., *Clin. Epigenet.*, **13**, Art. ID 120 (2021). DOI: 10.1186/s13148-021-01107-4
26. E. Nowak and I. Bednarek, *Cells*, **10**, 3435 (2021).
27. Y. Yamada, H. Haga, and Y. Yamada, *Stem Cells Transl.*, **3** (10), 1182 (2014).
28. A. Ivanov, V. Koval, O. Susova, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25** (13), 2634 (2015).
29. N. A. Cherepanova, A. A. Ivanov, D. V. Maltseva, et al., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **26**, 295 (2011).
30. O. Y. Susova, A. A. Ivanov, S. M. Ruiz, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **75** (6), 695 (2010).
31. M. Darii, A. R. Rakhimova, V. N. Tashlitskii, et al., *Mol. Biol. (Moscow)*, **47** (2), 292 (2013).
32. К. А. Чурюкина, И. А. Замулаева, А. А. Иванов и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **57** (2), 136 (2017).
33. I. A. Zamulaeva, K. A. Churyukina, O. N. Matchuk, et al., *AIMS Biophysics*, **7** (4), 339 (2020).
34. V. S. Koval, A. F. Arutyunyan, and A. L. Zhuze, *Bioorg. Med. Chem.*, **26** (9), 2302 (2018).
35. V. S. Koval, A. F. Arutyunyan, V. I. Salyanov, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **28**, 115378 (2020).
36. P. G. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo, et al., *Med. Res. Rev.*, **24** (4), 475 (2004).
37. K. Mišković, M. Bujak, M. Baus, et al., *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **64** (4), 593 (2013).
38. K. S. Sainia, H., Hamidullaha, R. Ashrafb, et al., *Mol. Carcinogenesis*, **54** (4), 1266 (2016).
39. M. S. Nafie, K. Arafa, N. K. Sedky, et al., *Chem.-Biol. Interact.*, **324**, 109087 (2020).
40. G. S. Khan, A. Shah., Zia-ur-Rehman, et al., *J. Photochem. Photobiol. B*, **115**, 105 (2012).
41. R.-R. Begicevic and M. Falasca, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1 (2017).
42. J. Konge, F. Leteurtre, M. Goislard, et al., *Oncotarget*, **9** (34), 23531 (2018).
43. H. Fazilaty, L. Rago., K. K. Youssef, et al., *Nature Commun.*, **5115**, Art. ID 5115 (2019). DOI: 10.1038/s41467-019-13091-8
44. B. Dong, Z. Qiu, Y. Wu, *Front. Pharmacol.*, **11**, Art. ID 596239 (2020). DOI: 10.3389/fphar.2020.596239
45. M. Garg, *World J. Stem Cells*, **9** (8), 118 (2017).
46. S. Kotiyal and S. Bhattacharya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **453**, 112 (2014).
47. S. Tanabe, S. Quader, H. Cabral, et al., *Front. Pharmacol.*, **11**, Art. ID 00904 (2020). DOI: 10.3389/fphar.2020.00904
48. A. Kanamoto, I. Ninomiya, S. Harada, et al., *Int. J. Oncol.*, **49** (5), 1859 (2016).
49. T. Boulding, R. D. McCuaig, A. Tan, et al., *Sci. Rep.*, **8**, Art. ID 73 (2018). DOI: 10.1038/s41598-017-17913-x
50. S. Ambrosio, C. D. Sacca, and B. Majello, *Biocyim. Biophys. Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, **1860**, 905 (2017).
51. S. Zhang, Y. Gong, C. Li, et al., *Cell Proliferation*, **54** (2), Art. ID e12963 (2021). DOI: 10.1111/cpr.12963
52. H. M. Kwon, E. J. Kang, K. Kang, et al., *Oncotarget*, **8**, 89005 (2017).
53. G. Xue, Z. Ren., Y. Chen, et al., *Cancer Lett.*, **361** (1), 121 (2015). DOI: 10.1016/j.canlet.2015.02.046

Effects of DNA-Binding Ligands from Dimeric Bisbenzimidazoles Series DBA(*n*) and DBPA(*n*) in Combination with γ -Radiation on Epithelial-Mesenchymal Transition and Pool Size of MCF-7 Breast Cancer Stem Cells

K.A. Churiukina*, O.N. Matchuk*, **, A.D. Kaprin***, ****, *****, S.A. Ivanov*, *****, V.S. Koval*****, A.F. Arutyunyan*****, A.L. Zhuze*****, and I.A. Zamulaeva*, **

*A. Tsyb Medical Radiological Research Center — Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Marshala Zhykova 10, Obninsk, Kaluga region, 249031 Russia

**Joint Institute for Nuclear Research, ul. Joliot-Curie 6, Dubna, Moscow Region, 141980 Russia

***National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Koroliova 4, Obninsk, Kaluga Region, 249036 Russia

****P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, 2d Botkinskiy proezd 3, Moscow, 125284 Russia

*****Peoples' Friendship University of Russia, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

*****Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

Radiation therapy is one of the main treatments for malignant neoplasms, including breast cancer. However, it is known, that radiation therapy can lead to an increase in the number of cancer stem cells, which are resistant to traditional antitumor effects, and are believed to be responsible for the development of recurrences and metastases. Therefore, the development of cancer stem cells elimination means is of considerable interest, especially in combination with ionizing radiation. The effects of single and combined exposure to new series of minor-groove DNA ligands — dimeric bisbenzimidazoles — DBA(*n*) and DBPA(*n*) (where *n* is the number of methylene groups between two bisbenzimidazole blocks) and γ -radiation on human Breast cancer cells were studied in our work for MCF-7 line in vitro. Compounds with maximum cytotoxic effect and cell binding were selected, and then the effects of the latter on the CD44⁺CD24^{−/low} cancer stem cells population and radiation-induced epithelial-mesenchymal transition were studied by the criterion of vimentin expression. An increase in the expression level of this protein and simultaneously in the relative number of cancer stem cells after a single exposure of γ -radiation at a dose of 4 Gy were shown. DBPA(1,4) in combination with irradiation blocked the radiation-induced vimentin expression and decreased the relative number of cancer stem cells by 1.7 and 4.1 times compared with irradiation ($p = 0.041$ and $p = 0.005$), respectively. At the same time, the absolute number of cancer stem cells decreased by 2.8 and 12.0 times compared to irradiation ($p = 0.029$ and $p = 0.004$), respectively. In contrast, DBA(5,7) by itself or in combination with γ -irradiation increased the level of vimentin expression and the same compounds when combined with irradiation increased the relative number of cancer stem cells by 3.1 and 3.6 times ($p = 0.006$ and $p = 0.005$), respectively, compared with irradiation. The absolute number of cancer stem cells increased by 2.2 and 1.5 times ($p = 0.017$ and $p = 0.032$), respectively. The data obtained show a close relationship between epithelial-mesenchymal transition and formation of the cancer stem cells pool after radiation exposure, and also indicate the prospects for further study of DBPA(1,4) as a means of cancer stem cells elimination under in vivo conditions.

Keywords: dimeric bisbenzimidazoles, cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, ionizing radiation, combined effect, flow cytometry, vimentin