

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

А.С. Гончарова, Г.Ю. Егоров, Е.Н. Колесников,
А.Ю. Максимов, М.В. Романова, А.Б. Сагакянц,
Е.С. Бондаренко

DOI 10.25789/YMJ.2023.83.01

УДК 57.084.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ XAV-939 НА ОПУХОЛЕВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА НА ГЕТЕРОТОПИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ *IN VIVO*

Исследовано содержание клеток, имеющих маркеры опухолевых стволовых клеток (ОСК) в образцах ксенотрансплантатов колоректального рака (КРР) человека, выделенных у животных-опухоносителей после воздействия малой молекулой XAV-939, 5-фторурацилом, а также комбинацией XAV-939 с 5-фторурацилом. На момент окончания эксперимента в группе, которой вводили комбинацию препаратов, опухолевые узлы были значительно меньше, чем в контроле. Наиболее высокие уровни клеток с фенотипическими признаками ОСК были характерны для образцов контрольной группы и образцов, полученных в группе с воздействием 5-фторурацилом в режиме монотерапии, а в группах с воздействием XAV-939, а также комбинацией XAV-939 и 5-фторурацила отмечалось снижение количества данных клеток. Полученные данные характеризуют XAV-939 как перспективное вещество для дальнейшего изучения его эффективности в отношении ОСК при КРР при комбинации данного препарата со стандартной терапией.

Ключевые слова: колоректальный рак, опухолевые стволовые клетки, CD44, CD133.

The purpose of this study was to investigate the numbers of cells with CSC markers in samples of human colorectal cancer (CRC) xenografts isolated in animals with tumors after exposure to the small molecule XAV-939, 5-fluorouracil, and to the combination of XAV-939 with 5-fluorouracil. By the end of the experiment, tumor nodules in the group of animals receiving the combination of drugs were significantly smaller than in the control group. The highest levels of cells with phenotypic signs of CSCs were characteristic of samples from the control group, and for samples obtained from the group receiving 5-fluorouracil as monotherapy. Decreased numbers of these cells were observed in groups receiving XAV-939 and the combination of XAV-939 and 5-fluorouracil. The obtained data characterize XAV-939 as a promising substance for further study of its effectiveness against CSC in CRC when this drug is combined with standard therapy.

Keywords: colorectal cancer, CRC, cancer stem cells, CD44, CD133.

Введение. На сегодняшний день колоректальный рак (КРР) занимает одну из лидирующих позиций по заболеваемости и смертности среди злокачественных опухолей. Считается, что неудовлетворительные результаты лечения связаны с существованием популяции, отличающихся низкой скоростью пролиферации и способностью к мультипотентной дифференцировке, а также устойчивостью к разным видам противоопухолевого воздействия [1]. Данная популяция клеток характеризуется наличием различных специфических маркеров, биологические функции которых способствуют формированию

признаков, свойственных ОСК [2]. Такие белки, как CD44, CD133, часто используются для идентификации ОСК, а также в качестве прогностических маркеров течения заболевания при КРР [6].

Немаловажным является резистентность долгоживущих, низкопролиферативных ОСК к цитотоксическим воздействиям, что указывает на необходимость разработки и применения целевых препаратов, направленных на ОСК и нарушение их сигналинга, например пути Wnt, имеющего важное значение в поддержании пула ОСК, кроме того, в ряде исследований была показана связь его активации с прогрессированием ряда злокачественных опухолей, включая КРР, в связи с чем ингибирование Wnt сигнального пути рассматривается как перспективное терапевтическое направление при КРР [5, 11]

В последние годы активно обсуждается возможность применения специфической терапии, направленной на связанный с ОСК сигналинг в сочетании с традиционными химиотерапевтическими режимами для элиминации как дифференцированных раковых клеток, так и популяции ОСК с целью предотвращения возможного рециди-

ва [8]. На данный момент несколько десятков различных соединений, в том числе и малых молекул, проходят различные стадии доклинических и клинических исследований [2]. Как один из возможных вариантов ингибирования Wnt сигналинга рассматривается применение малой молекулы XAV-939 [7]. В работах по изучению возможных механизмов действия этого кандидата было показано, что в клетках КРР SW480, обработанных XAV-939, происходила стабилизация уровня белкового комплекса, включающего белки Axin, APC, GSK-3b, Ck1a, тем самым обеспечивая блокировку аномально активированного сигнального пути Wnt [3]. Помимо этого, на клеточной линии H446 было показано, что в сравнении с другими ингибиторами пути Wnt XAV-939 проявляет сильную специфичность в отношении этого сигналинга, не влияя на другие молекулярные пути [4]. Однако упомянутые работы были выполнены с использованием клеточных линий, поэтому немаловажной задачей является проведение работ по исследованию влияния ингибитора сигнального пути Wnt XAV-939 на ОС на моделях *in vivo*, полученных путем ксенотрансплантации клинических образцов, которые в значительной

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону: **ГОНЧАРОВА Анна Сергеевна** – к.б.н., зав. испытательного лабораторного центра, fateyeva_a_s@list.ru, **ЕГОРОВ Георгий Юрьевич** – аспирант, **КОЛЕСНИКОВ Евгений Николаевич** – д.м.н., зав. отд., mloi@list.ru, **МАКСИМОВ Алексей Юрьевич** – д.м.н., зам. генерального директора по перспективным научным разработкам, mloi@list.ru, **РОМАНОВА Мария Вадимовна** – м.н.с., m.v.mindar@gmail.com, **САГАКЯНЦ Александр Борисович** – к.б.н., доцент, зав. лаб., asagak@rambler.ru, **БОНДАРЕНКО Елена Сергеевна** – м.н.с., mloi@list.ru.

степени способны отражать сложную биологию и поведение человеческих опухолей в ответ на ту или иную терапевтическую стратегию.

В связи с вышеперечисленными фактами **целью** данной работы являлось исследовать содержание клеток, имеющих маркеры ОСК в образцах ксенотрансплантатов КРР человека, выделенных у животных-опухоносителей после воздействия малой молекулой XAV-939, 5-фторурацилом, а также комбинацией XAV-939 с 5-фторурацилом.

Материалы и методы исследования. Для генерации подкожных опухолей был использован полученный ранее в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России перевиваемый ксенотрансплантат КРР человека. Первичная опухоль была взята от пациента с диагностированным раком селезеночного угла ободочной кишки T₄N₁M₀ при выполнении хирургического этапа лечения, а именно резекции поперечно-ободочной кишки. У пациента было получено письменное согласие на передачу биологического материала.

Эксперимент выполняли на 20 мышах женского пола линии Balb/c Nude, полученных из «SPF-вивария» ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Возраст мышей составлял 5-6 недель, вес колебался в диапазоне 20-24 г. Содержание животных осуществляли в SPF виварии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Все манипуляции в ходе эксперимента были выполнены в соответствии с этическими принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETSN 123, Страсбург, 18 марта 1986 г). Протокол исследования прошел одобрение локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

Для данного исследования использовался подкожный ксенотрансплантат четвертой генерации, для создания которого была выполнена имплантация фрагментов опухолевого ксенотрансплантата третьей генерации под кожу бедра мышам Balb/c Nude. При этом применяли инъекционную анестезию с использованием ветеринарных препаратов «Ксила» в дозе 20 мг/кг для премедикации и «Золелл-100» в дозе 50 мг/кг для наркотизации.

Исследуемую молекулу XAV-939 (Sigma-Aldrich) вводили животным перорально в дозе 25 мг/кг, 5-фторурацил – внутривенно в дозе 25

мг/кг, 0,9% NaCl – внутривенно, стерильную воду – перорально. Режим введения 2 раза в неделю. Животные контрольной группы получали с той же кратностью вещества-носители: 0,9% раствор NaCl, стерильная вода.

Мышей-опухоносителей распределили на 4 группы, в каждой n=5: группа 1 – 5-фторурацил («5-Fu»), группа 2 – XAV-939, группа 3 – XAV-939+5-фторурацил («XAV-939+5-Fu») и группа 4 – контрольная.

Для распределения животных по группам в качестве критерия использовали объем опухолевого узла к моменту начала введения препарата, что составило 50±20% мм³. Распределение животных по группам выполнили таким образом, чтобы разброс значений объемов опухолевых узлов в группах был минимальный.

Замеры опухолевых узлов выполняли два раза в неделю, их объемы определяли с помощью формулы – $V = a \times b \times c \times \pi / 6$, где V – объем опухоли (мм³), а, b, c – линейные размеры эллипсоида (мм).

Определение количества клеток, имеющих маркеры ОСК CD45-44+, CD45-133+, CD45-44+133+, выполняли в образцах ксенотрансплантатов КРР человека, выделенных у животных-опухоносителей. Измерения осуществляли на проточном цитометре FacsCanto II (Becton Dickinson, США) с двумя лазерами, характеризующимися длинами волн возбуждения флуорофоров 488 нм и 633 нм с возможностью использовать до 6 моноклональных антител одновременно в одной пробирке. Данную работу выполнили с использованием набора моноклональных антител: CD44 FITC (BD Pharmingen, USA)/CD133 APC (BD, USA)/CD45 APC-Cy7 (BD, USA).

Полученные данные анализировали при помощи пакета программ STATISTICA и Excel. Для проверки гипотезы о нормальном распределении использовали тест Шапиро-Уилка, после чего оценивали различия между группами, применяя к полученным данным непараметрический U-критерий Манна – Уитни.

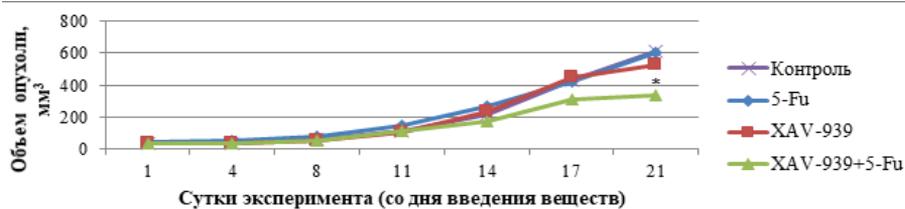


Рис. 1. Динамика роста опухоли в экспериментальных и контрольной группах. * Статистически значимые различия по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$)

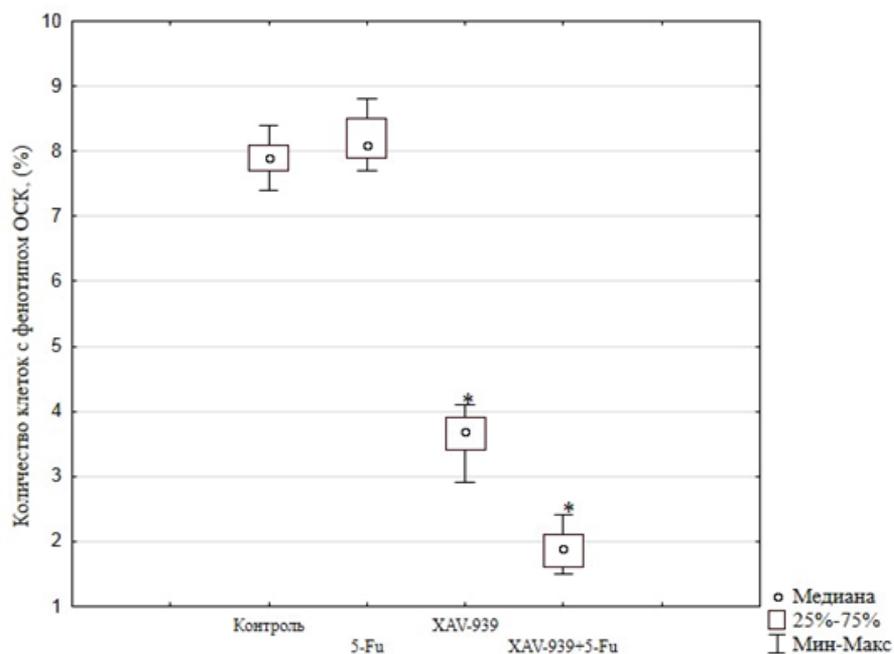


Рис. 2. Количество клеток с фенотипом CD45-44+ в экспериментальных и контрольной группах. *Статистически значимые различия по критерию Манна-Уитни ($p\text{-val} < 0,05$)

Результаты и обсуждение. В ходе эксперимента была выявлена динамика роста ксенотрансплантатов трех экспериментальных и одной контрольной групп. Объем опухоли в группе с введением 5-фторурацила и в группе, где животным вводили XAV-939, значительно не отличался от объемов опухолей контрольной группы. Объем опухолевых узлов в экспериментальной группе, с воздействием комбинацией малой молекулы XAV-939 с 5-фторурацилом составил 335,2 мм³, что было статистически значительно меньше объемов опухолей в контрольной группе – 609,3 мм³ ($p\text{-val}<0,05$). Данные, демонстрирующие динамику роста опухолевых узлов, представлены на рис. 1.

При определении количества клеток с фенотипом CD45-44+ было выявлено, что их уровень в контрольной группе составил 7,9 % [7,7 %; 8,1 %], в группе, принимавшей 5-фторурацил, содержание данных клеток составило 8,1 % [7,9 %; 8,5 %]. Процент клеток, несущих молекулу CD44 в группе, принимавшей исследуемое вещество XAV-939, составил 3,7 % [3,4 %; 3,9 %], что было статистически значительно меньше количества клеток с этим фенотипом в образцах группы контроля ($p\text{-val}<0,05$). В группе с комбинацией препаратов 5-фторурацил и XAV-939 содержание клеток с фенотипом CD45-44+ составило 1,9 % [1,6 %; 2,1%], что так же, как и в группе с монотерапией XAV-939, было статистически значительно меньше количества клеток CD45-44+ в образцах контрольной группы ($p\text{-val}<0,05$).

Экспериментальные данные, характеризующие количество клеток с фенотипом CD45-44+, отображены на рис. 2.

При анализе количества клеток с фенотипом CD45-133+ было выявлено, что в контрольной группе их содержание составило 8,1% [7,9%; 8,4%], а в группе с введением 5-фторурацила – 6,4% [6,3%; 7,7%]. В образцах группы, принимавшей препарат XAV-939, было выявлено 5,3% [4,9%; 5,5%] клеток с фенотипом CD45-133+, а у группы с комбинацией препаратов 5-фторурацил и XAV-939 содержание данных клеток составило 5,1% [4,4%; 5,3%]. Как в группе с монотерапией XAV-939, так и в группе с воздействием комбинацией XAV-939 и 5-фторурацилом количество клеток CD45-133+ было статистически значимо меньше, чем в контрольной группе ($p=0,0122$).

Распределение количества клеток с фенотипом CD45-133+ в экспериментальных группах отображено на рис. 3.

В ходе работы также было опреде-

лено количество клеток с фенотипом CD45-44+133+: в контрольной группе их количество составило 7,4% [6,6%; 8%], в группе с введением 5-фторурацила процентное содержание клеток составило 6,8% [6,7%; 6,9%]. В образцах ксенотрансплантатов животных, принимавших XAV-939, количество клеток с фенотипом CD45-44+133+ составило 2,8% [2,7%; 2,9%], а у животных, принимавших комбинацию препаратов – 1,7% [1,3%; 2,4%] клеток, что было

статистически значимо меньше, чем в образцах группы контроля ($p\text{-val}<0,05$).

Данные, характеризующие количество клеток с фенотипом CD45-44+133+, отображены на рис. 4.

Анализ массива литературных данных последних лет демонстрирует значительный рост интереса к изучению ОСК, их биологических функций и роли в онкогенезе [7,10,11]. В ряде работ по изучению прогностического потенциала маркеров ОСК CD44 и CD133 при

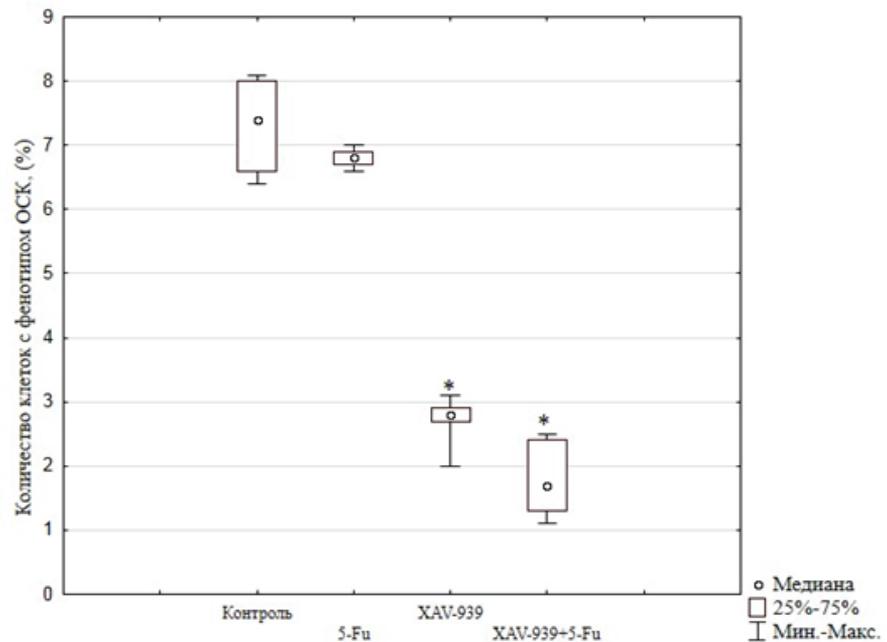


Рис. 3. Количество клеток с фенотипом CD45-133+ в экспериментальных и контрольной группах. *Статистически значимые различия по критерию Манна-Уитни ($p<0,05$)

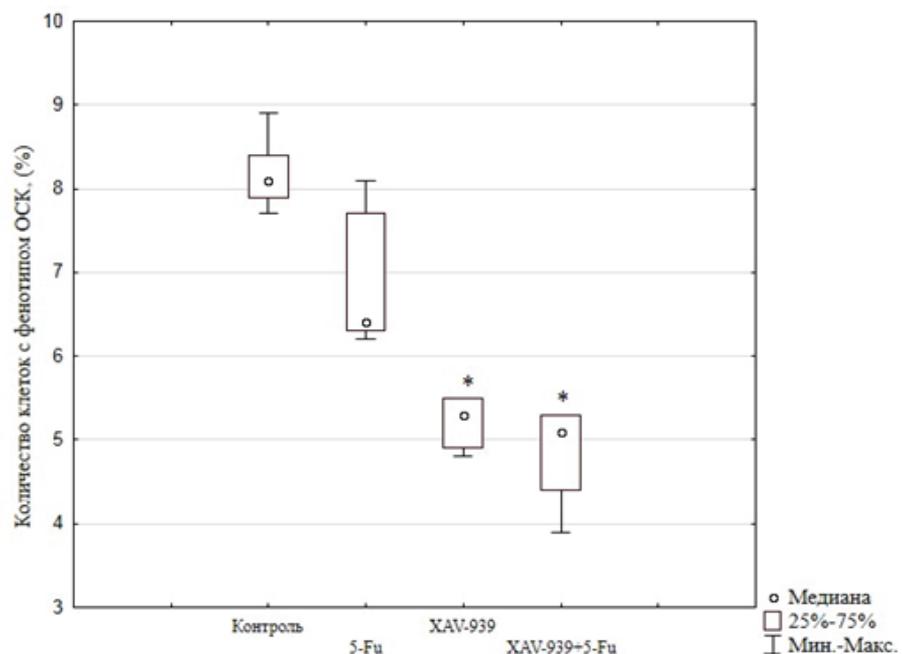


Рис. 4. Количество клеток с фенотипом CD45-44+133+ в экспериментальных и контрольной группах. *Статистически значимые различия по критерию Манна-Уитни ($p<0,05$)

KPP было показано, что высокие уровни экспрессии этих белков ассоциированы с высоким риском рецидивирования и метастазирования опухоли [9, 10]. Согласно исследованиям L. Spelt и соавт. (2018) пациенты, опухоли которых характеризовались высоким содержанием клеток с фенотипом CD45-133+, имели худшую выживаемость, чем пациенты без данного исследуемого маркера [9]. Напротив, при нокдауне *CD44* было продемонстрировано подавление инвазии, пролиферации и миграции опухолевых клеток. Кроме того, на клеточной линии KPP человека SW620 было показано, что экспрессия маркеров OCK CD44+ и CD133+ связана с феноменом лекарственной устойчивости к цитостатикам [3].

В ходе нашего исследования было показано, что наиболее высокие уровни клеток с фенотипическими признаками OCK были характерны для образцов контрольной группы и образцов, полученных в группе с воздействием 5-фторурацилом в режиме монотерапии, что в сочетании с отсутствием значимого снижения объема опухолевых узлов в этой группе можно рассматривать как признак резистентности к этому препарату, что согласуется с описанными в литературе тенденциями, характеризующими OCK и их динамику. Статистически значимое снижение объемов опухолевых узлов в группе с воздействием комбинацией

препаратов указывает на более выраженную эффективность сочетанного действия этих препаратов, чем воздействие ими в режиме монотерапии.

Вывод. В ходе данной работы было показано снижение количества клеток с фенотипом OCK CD45-44+, CD45-133+, CD45-44+133+ в образцах ксенотрансплантатов в группах животных с воздействием с тестируемым веществом XAV-939, а также комбинацией XAV-939 и 5-фторурацилом, что можно рассматривать как признак подавления сигнального пути Wnt. Полученные данные характеризуют XAV-939 как перспективное вещество для дальнейшего изучения его эффективности в отношении OCK при KPP при комбинации данного препарата со стандартной терапией.

Литература

1. Молекулярно-генетическая классификация подтипов колоректального рака: современное состояние проблемы / О.И. Кит, Е.А. Дженкова, Э.А. Мирзоян [и др.] // Южно-российский онкологический журнал. 2021. Т. 2, № 2. С. 50–56.
Molecular genetic classification of colorectal cancer subtypes: current state of the problem / O.I. Kit, E. A. Dzhenkova, Je. A. Mirzozan [et al.] // South Russian Journal of Cancer. 2021; 2(2):50–56
2. Annett S., Robson T. Targeting cancer stem cells in the clinic: Current status and perspectives // *Pharmacology & Therapeutics*. 2018; 187: 13–30. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.001
3. Wnt/ β -catenin signaling induces the transcription of cystathionine- γ -lyase, a stimulator of tumor in colon cancer / K. Fan, N. Li, J. Qi [et al.] // *Cellular Signalling*. 2014; 26(12):2801–2808. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.08.023.
4. Wnt inhibitor XAV939 suppresses the viability of small cell lung cancer NCI-H446 cells and induces apoptosis / W. Guo, F. Shen, W. Xiao [et al.] // *Oncology Letters*. 2017; 14(6):6585–6591. DOI: 10.3892/ol.2017.7100.
5. Wnt/ β -Catenin Signaling Contributes to Paclitaxel Resistance in Bladder Cancer Cells with Cancer Stem Cell-Like Properties / R. Jiménez-Guerrero, A. Belmonte-Fernández, M. L. Flores [et al.] // *Int J Mol Sci*. 2021; 23(1):450. DOI: 10.3390/ijms23010450.
6. β -carotene regulates cancer stemness in colon cancer in vivo and in vitro / K. E. Lee, M. Kwon, Y. S. Kim [et al.] // *Nutr Res Pract*. 2022; 16(2):161–172. DOI: 10.4162/nrp.2022.16.2.161.
7. XAV-939 inhibits epithelial-mesenchymal transformation in pulmonary fibrosis induced by crystalline silica via the Wnt signaling pathway / Z. Lv, H. Xu, X. Si [et al.] // *Environ Toxicol*. 2022. DOI: 10.1002/tox.23693.
8. MicroRNA-148a/152 cluster restrains tumor stem cell phenotype of colon cancer via modulating CCT6A / X. Peng, G. Chen, B. Lv [et al.] // *Anti-Cancer Drugs*. 2022; 33(1):e610. DOI: 10.1097/CAD.0000000000001198.
9. The Prognostic Role of Cancer Stem Cell Markers for Long-term Outcome After Resection of Colonic Liver Metastases / L. Spelt, A. Sasor, D. Ansari // *Anticancer Res*. 2018; 38(1):313–320.
10. P. Xia, X.-Y. Xu Prognostic significance of CD44 in human colon cancer and gastric cancer: Evidence from bioinformatic analyses // *Oncotarget*. 2016; 7(29):45538–45546. DOI: 10.18632/oncotarget.9998.
11. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target / H. Zhao, T. Ming, S. Tang // *Mol Cancer*. 2022; 21(1):144. DOI: 10.1186/s12943-022-01616-7.

