

# ДОСЛІДЖЕННЯ СУБПОПУЛЯЦІЇ СТОВБУРОВИХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН НА МОДЕЛЯХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Т.С. ГЕРГЕЛЮК<sup>1,2</sup>, О.М. ПЕРЕПЕЛИЦІНА<sup>1</sup>, Ю.М. ХМЕЛЬНИЦЬКА<sup>1,2</sup>, Г.М. КУЗНЕЦОВА<sup>2</sup>,  
Н.В. ДЗЮБЕНКО<sup>2</sup>, Н.Г. РАКША<sup>2</sup>, О.І. ГОРБАЧ<sup>3</sup>, М.В. СИДОРЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Державна установа «Відділення біотехнічних проблем діагностики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України»

<sup>2</sup> ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

<sup>3</sup> Національний інститут раку МОЗ України

E-mail: olenaquail@gmail.com\*, vbpd-ipkk@ukr.net

Гетерогенна природа пухлинної популяції, наявність стовбурових пухлинних клітин, є однією з причин стійкості злоякісних новоутворень до протипухлинної терапії, виникнення рецидивів та метастазів а також складності лікування даної патології. Метою роботи було збагатити багатоклітинні пухлинні сфероїди клітин аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 стовбуровими пухлинними клітинами та дослідити триману субпопуляцію стовбурових пухлинних клітин за допомогою біохімічних, імунологічних та цитологічних методів. За результатами дослідження було з'ясовано, що в умовах збідненого поживного середовища, при додаванні певних факторів росту, відсоток стовбурових пухлинних клітин в популяції багатоклітинних пухлинних сфероїдів суттєво збільшується. Так, відсоток клітин, які експресують CD133 збільшується від 12,47 до 82,08 %, Nestin від 31,3 до 82,58 %. Підвищується також кількість клітин, що експресують маркери стовбурових пухлинних клітин: CD44, CD133, bтi1, згідно даних імуноцитохімічного забарвлення. Активність альдегід дегідрогенази в клітинах лінії MCF-7 за умов моношарового росту складала 0,07 моль/мг білка за хв та збільшувалася до 1,58 моль/мг білка за хв у збагачених на стовбурові пухлинні клітини багатоклітинних пухлинних сфероїдах. Активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази в пухлинних клітинах за умов моношарового росту становила  $934,6 \pm 148,3 \times 10^{-6}$  моль/мг білка за хв при збагаченні багатоклітинних пухлинних сфероїдів на стовбурові пухлинні клітини активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази зростала у більш ніж у 1,5 рази. Активність лактатдегідрогенази в клітинах MCF-7 за умов моношарового росту становила  $65,12 \pm 1,28$  мкмоль/мг білка за хв, а за умов росту в збагачених стовбуровими клітинами багатоклітинних пухлинних сфероїдах, зменшувалася у 5,5 разів. Таким чином, за результатами аналізу отриманих даних, ми можемо припустити, що за умов збагачення пухлинної популяції на стовбурові пухлинні клітини змінюється рецепторний

та енергетичний профіль клітин MCF-7, наближаючи збагачені стовбуровими пухлинними клітинами сфероїди до характеристик метастазуючого мікрочула, а пухлинні клітини до стовбурових пухлинних клітин

**Ключові слова:** багатоклітинні пухлинні сфероїди, стовбурові пухлинні клітини, глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа, альдегіддегідрогеназа, лактатдегідрогеназа, нестин, CD133.

**Вступ.** Як відомо, пухлини складаються із гетерогенної суміші трансформованих клітин, які функціонально відрізняються. Їхні відмінності характеризуються різними рівнями експресії рецепторів, стадіями диференціювання, а також різними метаболічним і епігенетичним статусом. За рахунок такої гетерогенності клітинні субпопуляції взаємодіють між собою і сприяють активному росту пухлини. Деякі клітини в пухлині відрізняються високою резистентністю до хіміо- і радіотерапії. До них належать стовбурові пухлинні клітини (СПК), які здатні формувати нову масу пухлини, а також сприяти рецидиву і метастазуванню пухлини (Baccelli et al, 2012).

Новітні дослідження свідчать про те, що метаболічний фенотип СПК відрізняється від фенотипу диференційованих пухлинних клітин. Так, у 2019 році Ghanbari M. було показано, що СПК мають відмінні від диференційованих ракових клітин метаболічні характеристики. Виявляється, що СПК характеризуються підвищеною активністю пентозофосфатного шляху (ПФШ), на відміну від пухлинних клітин, яким притаманний підвищений рівень гліколізу (Ghanbari-Movahed et al, 2019). За активністю ключових ферментів гліколізу і ПФШ, таких як лактатдегідрогенази (ЛДГ) та глюкозо-6-фосфат дегідрогенази (Г6ФДГ), відповідно, можна судити про енергетичний стан пухлинних клітин, а також про наявність СПК.

© Т.С. ГЕРГЕЛЮК, О.М. ПЕРЕПЕЛИЦІНА,  
Ю.М. ХМЕЛЬНИЦЬКА, Г.М. КУЗНЕЦОВА,  
Н.В. ДЗЮБЕНКО, Н.Г. РАКША, О.І. ГОРБАЧ,  
М.В. СИДОРЕНКО, 2022

Рак молочної залози (РМЗ) займає друге місце за смертністю у жінок в усьому світі. При лікуванні РМЗ частим явищем є рецидиви та метастазування. Однією із причин рецидивів та метастазування визнано наявність в пухлині СПК, які є резистентними до сучасних протипухлинних препаратів. Тому у світі продовжується пошук нових терапевтичних підходів до лікування РМЗ з урахуванням біологічних особливостей та клітинної гетерогенності пухлинної популяції. Наразі вчені розглядають багато речовин, що можуть впливати на СПК. Серед таких препаратів є саліноміцин, який являє собою іонофорний, поліефірний антибіотик. За даним літератури саліноміцин знищує СПК, гальмує ріст різних типів пухлинних клітин, які резистентні до хіміопрепаратів, сприяє зниженню проліферації та індукує апоптоз *in vitro*. В літературі повідомлялося про протипухлинну дію саліноміцину щодо злоякісних новоутворень молочної залози (Wang et al, 2021), передміхурової залози (Ketola et al, 2012), кісток (Tang Q et al, 2011), легенів (Hockmair et al, 2020), колоректального раку (Zhang C et al, 2015). Тому саліноміцин було обрано як підослідний препарат для вивчення впливу на популяцію СПК на моделях РМЗ.

Для реалізації цільових досліджень СПК було розроблено кілька методів виділення та експансії цієї субпопуляції. Одним з таких методів є культивування БПС в умовах, які призводять до підвищення вмісту СПК в популяції, тобто збагачення пухлинної популяції на СПК. Модель БПС дозволяє нарощувати відсоток СПК в пухлинній популяції та досліджувати вплив протипухлинної терапії на різні клітинні популяції, тому числі й на СПК. Принцип методу базується на здатності пухлинних клітин до субстрат-незалежного росту, міграції та метастазуванню. При утворенні БПС, модель мікрометастазів (Sant et al, 2017), відбувається «відбір» найбільш агресивних субпопуляцій пухлинних клітин які мають спільні характеристики зі стовбуровими клітинами (стовбурово-подібні клітини, stem-like cells). Серед базових характеристик СПК розглядається ріст в неадгезивних збіднених на поживні речовини умовах, підвищена експресія маркерів стовбурових клітин, зміни біохімічних процесів в клітині. Можливість виді-

лення та суттєвого нарощування субпопуляції СПК може сприяти вивченню природи стовбурових пухлинних клітин та механізмів відновлення пухлин після терапії. Також важливим є розроблення цільової імунотерапії спрямованої саме на стовбурові пухлинні клітини та скринінгове тестування протипухлинних препаратів на здатність впливати саме на СПК. Автори припускають, що культивування пухлинних клітин в системі БПС у специфічному збідненому середовищі призводить до збагачення пухлинної популяції на стовбурові клітини.

Тому, метою роботи було порівняти рівні експресії маркерів, характерних для СПК (CD133 та нестину), чутливість до саліноміцину, а також активність ферментів альдегідгидрогенази (АЛДГ), Г6ФДГ і ЛДГ в клітинах аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 після тривалого культивування у різних системах росту: в моношаровій культурі клітин, в БПС, а також зБПС.

**Методи.** *Культивування клітин лінії MCF-7.* Адгезивні клітини аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 культивували за стандартних умов при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % вологості в повному поживному середовищі DMEM («Sigma», США) в культуральних флаконах (25 см<sup>2</sup>, «Sarstedt», Німеччина). По досягненні клітинами предконфлюенту, їх знімали з використанням розчину версену (0,025 М ЕТДА, «Gibco», США) з додаванням 0,025%-вого розчину трипсину («Gibco», США). Після відмивання розчину трипсину ППС, що містило фетальну сироватку теляти (ФСТ), підраховували кількість клітин та розсівали їх для культивування у різних системах росту: моношарова культура або 2Д; БПС, або 3Д; зБПС, або з3Д.

Для отримання БПС, 3Д клітини культивували в середовищі DMEM, що містило 10 % ФСТ з додаванням 2%-вого розчину карбоксиметилцелюлози (КМЦ, «Bio-Rad», США) на планшетах, вкритих 2%-вою агарозою.

Для збагачення культури СПК (зБПС) пухлинні клітини культивували в поживному середовищі DMEM-F12 («Sigma», США) без додавання ФСТ, що містило додатково 2 % КМЦ («Bio-Rad», США), 4 % альбуміну людини («Біофарма», Україна), 20 нг/мл фактору росту фібробластів (FGF, «Sigma», США) та 20 нг/мл епідермального фактору росту (EGF, «Sigma»,

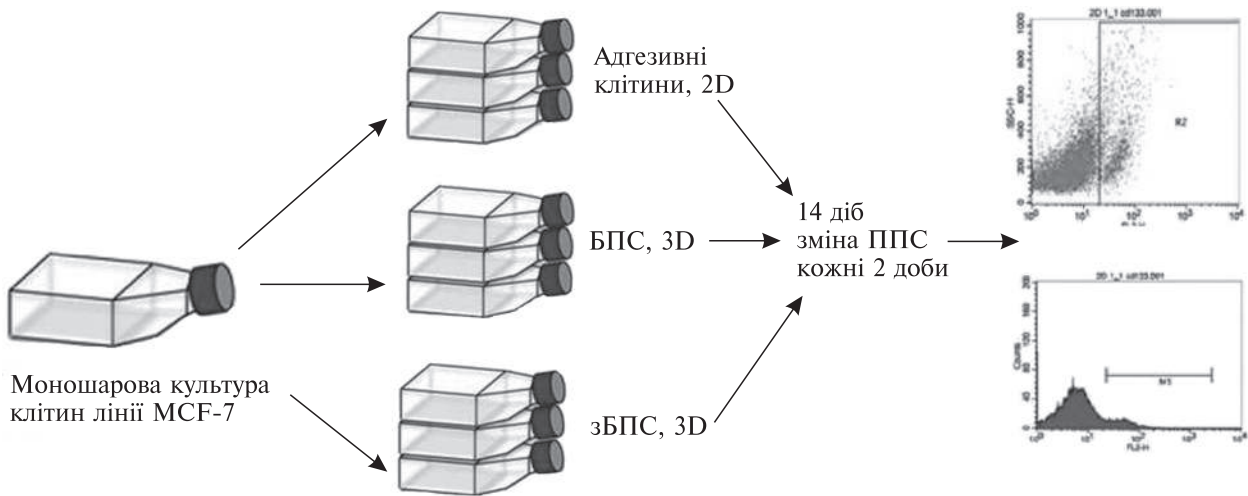


Рис. 1. Культивування клітин аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 у різних системах росту: моношаровій культурі клітин, БПС та зБПС для дослідження

США), а також 5 мкг/мл інсуліну (фармасулін, «Фармак», Україна) і 1 мкг/мл гідрокортизону (гідрокортизон ацетат, «Фармак», Україна).

Клітини моношарової культури, БПС та зБПС культивували впродовж 14 діб із зміною повного поживного середовища через кожні 2–3 доби та використовували для подальших досліджень (рис. 1).

**Проточна цитофлуориметрія.** Адгезивні клітини аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 культивували за стандартних умов у середовищі DMEM («Sigma», США) в культуральних флаконах (25 см<sup>2</sup>, «Sarstedt», Німеччина). По досягненні клітинами предконфлюенту, їх знімали з використанням розчину версену (0,025 М ЕДТА, «Gibco», США) з додаванням 0,025%-вого розчину трипсину («Gibco», США). Після відмивання розчину трипсину ППС, що містило ФСТ, підраховували кількість клітин та розсівали їх для культивування у різних системах росту (моношаровій культурі, БПС, зБПС). Клітини моношарової культури, БПС та зБПС культивували впродовж 14 діб із зміною повного поживного середовища через кожні 2–3 доби та використовували для подальших досліджень (рис. 1).

Аналіз клітинних субпопуляцій методом проточної цитофлуориметрії було проведено за люб'язної згоди завідувача НДЛ експериментальної онкології Національного інституту раку д.б.н. Храновської Н.М. Для визначення рівнів

експресії рецепторів CD133 та нестину методом проточної цитометрії готували суспензію дезагрегованих клітин. Так, для адгезивних клітин використовували розчин версену (0,025 М ЕДТА, «Gibco», США), а для сфероїдів – 0,025%-вий розчин трипсину («Gibco», США) на 0,025 М розчині версену. Клітини відмивали буфером, що містив 1 % ФСТ в фосфатному сольовому буфері (ФСБ), центрифугували 5 хв при 400 g та підраховували кількість живих клітин у камері Горяєва. Готували проби із суспензією живих клітин з однаковою концентрацією – 10<sup>6</sup> кл/мл. Для мічення мембранного маркера CD133 клітини інкубували з моноклональними антитілами Mouse Anti-Human CD133, clone W6B3C1 (BD Pharmingen, США), кон'югованими із флуорохромом фікоеритрин (PE) протягом 30 хв при +4 °С у темряві. Для виявлення внутрішньоклітинного маркера нестину клітини попередньо фіксували 4%-вим розчином параформальдегіду на ФСТ (20 хв при +4 °С) та пермабілізували мембрану за допомогою 0,1%-вого розчину сапоніну на ФСБ протягом 20 хв при +37 °С. Відмивали клітини ФСБ, що містив 1 % ФСТ, та інкубували з моноклональними антитілами Mouse Anti-Nestin, clone 25/nestin («BD Pharmingen», США), міченими PE. Незв'язані антитіла відмивали в ФСБ при 400 g впродовж 5 хв. Імунофенотипування проводили на приладі FACS Calibur («Becton Dickinson», США),

що оснащений двома лазерами (з довжиною хвилі 488 та 625 нм), з використанням програми CellQues Prot («Becton Dickinson», США) до комп'ютерів Macintosh для аналізу даних. Для вимірювання флюоресценції використовували фільтр 585/42 із довжиною хвилі емісії при 575 нм. Чим більшою був у клітин рівень експресії маркерів (CD133 або нестину), тим інтенсивнішою була флюоресценція проби і тим далі реєстрували зсув гістограми по осі абсцис. На осі абсцис реєструвалося число імпульсів (клітин) на канал з відповідним вмістом CD133+ або нестин + клітин.

**Імуноцитохімія.** Для дослідження рецепторного профілю, моношарову культуру висівали на покривні скельця у 6-лункові планшети за щільності  $2 \times 10^4$  клітин/см<sup>2</sup>. В контрольній групі експресію рецепторів аналізували після двох діб культивування у поживному середовищі. Для визначення впливу саліноміцину на популяцію СПК клітини, що адгезувалися інкубували 48 год з препаратом саліноміцином в концентрації 30 мкг/мл. Після цього скельця обох груп відмивалися від поживного середовища фізіологічним розчином. Клітини фіксували в 10%-вому нейтральному формаліні, після фіксації скельця промивали проточною водою. Імуноцитохімічне забарвлення проводили за протоколом рекомендованим для пероксидазної системи детекції PolyVue з використанням первинних моноклональних антитіл: CD44 (polyclone, кат. № HPA005785, «Sigma», США), CD133 (clone 17A6.1, кат. № MAB4393-1, «Sigma», США), bmi-1 (clone PRS3755 Anti-Prom1 кат. № SAB2107606, «Sigma», США). Препарати дозбарвлювали гематоксиліном та заключали канадським бальзамом. Імуноцитохімічні зразки клітин фотографували для порівняння морфологічних характеристик і підрахунку кількості клітин, що експресують рецептори в контрольній та експериментальній групах в моношаровій культурі. На препаратах культур підраховували загальну кількість клітин в довільних 10 полях зору за однакового збільшення і приймали це за 100 %. Потім визначали відсоток імунопозитивних (забарвлених клітин) і клітин, що не експресували досліджуваній рецептор (імунонегативних).

**Аналіз виживаності клітинної популяції (МТТ-тест).** МТТ-тест дозволяє з великою точ-

ністю і в короткі терміни визначати кількість життєздатних клітин. Клітини MCF-7 інкубували 48 год з антибіотиком саліноміцином в концентраціях 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875; 0,93; 0,46 мкг/мл. Вибір концентрацій спирався на найвищу дозу антибіотика, 30 мкг/мл – одна з найбільш розповсюджених максимальних концентрацій, що зустрічається в літературі (Borlle et al, 2010; Naujokat et al, 2010; Wang et al, 2011).

Для визначення цитотоксичної дії агента за 4 год до закінчення терміну інкубування до 100 мкл клітинної суспензії вносили 20 мкл розчину 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразоліум броміду (МТТ) в концентрації 5 мг/мл у ФСБ. 96-лунковий планшет з клітинами інкубували за тих самих умов впродовж 3-х год. Після планшет центрифугували при 1500 об/хв, 5 хв. Для розчинення кристалів формазану у кожен лунку додавали 100 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО, «Serva», Німеччина). Оптичне поглинання розчину вимірювали в одиницях абсорбції за допомогою мультилункового спектрофотометра при довжині хвилі 540 нм (максимум поглинання формазана). Отримані дані ми порівнювали з рівнем абсорбції у контрольних зразках та підраховували рівень життєздатності клітин.

**Морфометричне дослідження БПС, зБПС.** Для визначення впливу саліноміцину на популяцію пухлинних клітин в 3Д культурі визначався об'єм БПС. До культури БПС та зБПС на 7 день культивування додавався препарат в концентрації 3 мкг/мл, 15 мкг/мл та 30 мкг/мл на 48 год. По закінченню терміну інкубації БПС та зБПС було сфотографовано методом «темного поля». За допомогою спеціальної морфометричної програми AxioVision Release 4,7 (Zeiss) було виміряно геометричні розміри сфероїдів. Об'єм сфероїдів вираховувався за формулою Рольфа Б'єрквіга:  $V = 0,4 \times a \times b^2$ , де  $a$  і  $b$  – геометричні розміри сфероїдів, причому  $a$  – більший діаметр,  $b$  – менший діаметр, 0,4 – коефіцієнт, визначений спеціально для сфероїдів (Bjerkvig, 2018). Було проведено морфометричне дослідження 220 сфероїдів кожного із зразків.

**Дослідження активності ферментів.** Клітини аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 у концентрації  $10^6$  клітин в 1 мл, які

культивували на культуральних планшетах, двічі промивали холодним PBS і екстрагували додаванням лізуючого буфера, що містив: 10 мМ тріс, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1 %, v/v Triton-X100 (рН = 7,4). Клітинні лізати інкубували 15 хв на льоду та центрифугували при 10000 об/хв впродовж 15 хв за 4 °С для видалення нерозчинних клітинних компонентів. Надосад відділяли та використовували в подальших дослідженнях. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд.

Активність Г6ФДГ визначали за її здатністю окислювати глюкозо-6-фосфат до фосфоглюколактону з відновленням НАДФ до НАДФН. Утворення НАДФН супроводжується зростанням абсорбції при 340 нм, активність Г6ФДГ визначали за швидкістю утворення НАДФН. Використовували молярний коефіцієнт екстинкції НАДФН  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Karakaya et al, 2016).

Активність ЛДГ оцінювали за її здатністю окислювати НАДН з відновленням піривату до лактату. Зменшення кількості НАДН супроводжується зменшенням оптичної щільності розчину при 340 нм. Активність ЛДГ визначали за швидкістю розпаду НАДН. Використовували молярний коефіцієнт екстинкції НАДН  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Kumar et al, 2018).

Активність АЛДГ аналізували спектрофотометрично по збільшенню екстинкції при довжині хвилі 340 нм, як критерію перетворення НАД в НАДН за наявності ацетальдегіду. Утворення НАДН супроводжується зростанням абсорбції при 340 нм, активність АЛДГ визначали за швидкістю утворення НАДН. Використовували молярний коефіцієнт екстинкції НАДФН  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Karakaya et al, 2016).

**Статистична обробка результатів.** Статистична обробка результатів була здійснена за допомогою програм Excel (MS Office 2010) із використанням Т-тесту для незалежних вибірок даних, які відповідали нормальному розподілу. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартного відхилення ( $\pm \text{SD}$ ). Різницю між 2 вибірками перевіряли за допомогою t-критерія Стьюдента. За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали  $*p \leq 0,05$ . Кожен експеримент повторювався три рази.

**Результати та обговорення.** На сьогодні остаточно ще не встановлено, який із маркерів СПК для конкретної локалізації пухлини є основним, а який – другорядним. Важливо, що комбінація цих маркерів може дати більш точну інформацію під час визначення властивостей і функцій СПК. Визначення профілю експресії онкогенних або ембріональних білків в культурі пухлинних клітин дає можливість виділити популяції СПК серед інших популяцій клітин. Клітини, що одночасно експресують CD133 і нестин (ймовірний фенотип СПК), виявляють в різних типах епітеліальних пухлин. Більш того, наявність клітин з таким фенотипом призводить до утворення пухлин *in vivo*, (Barat et al, 2005; Ma et al, 2010; He et al, 2014). Тому, ми проаналізували експресію рецепторів CD133 та нестину в клітинах аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 після тривалого культивування в різних системах росту: моношаровій культурі клітин, БПС та сфероїдах, збагачених СПК. Після 14 днів культивування та постійної заміни поживного середовища культури БПС та зБПС містили значну кількість мертвих клітин. В системі БПС спостерігалось утворення некротичного ядра, а в зБПС було відмічено відмирання пухлинних клітин за рахунок несприятливих умов культивування. Кількість імунопозитивних клітин визначали як відсоток серед однакової кількості живих клітин в досліджуваних пробах.

Так, було визначено, що після 14 днів культивування моношарова культура клітин, БПС та сфероїди, збагачені СПК містять клітини, які є позитивними за маркерами CD133 і нестину.

У моношаровій культурі кількість клітин, в яких було виявлено експресію мембранного рецептору CD133, складала 12,47 %, в сфероїдах, які культивували за стандартних умов (БПС) – 23,43 % (рис.2). Найбільша експресія CD133 була виявлена в клітинах, які культивували в неадгезивних умовах за відсутності сироватки та додавання ростових факторів (в зБПС), і становила 82,08 %. Рівні експресії внутрішньоклітинного маркера нестину мали позитивну кореляцію з рівнями експресії CD133. В той час як в моношаровій культурі кількість клітин, позитивних за маркером нестину, становила 31,32 %, в культурі БПС цей показник збільшувався до 74,49 %, а в куль-

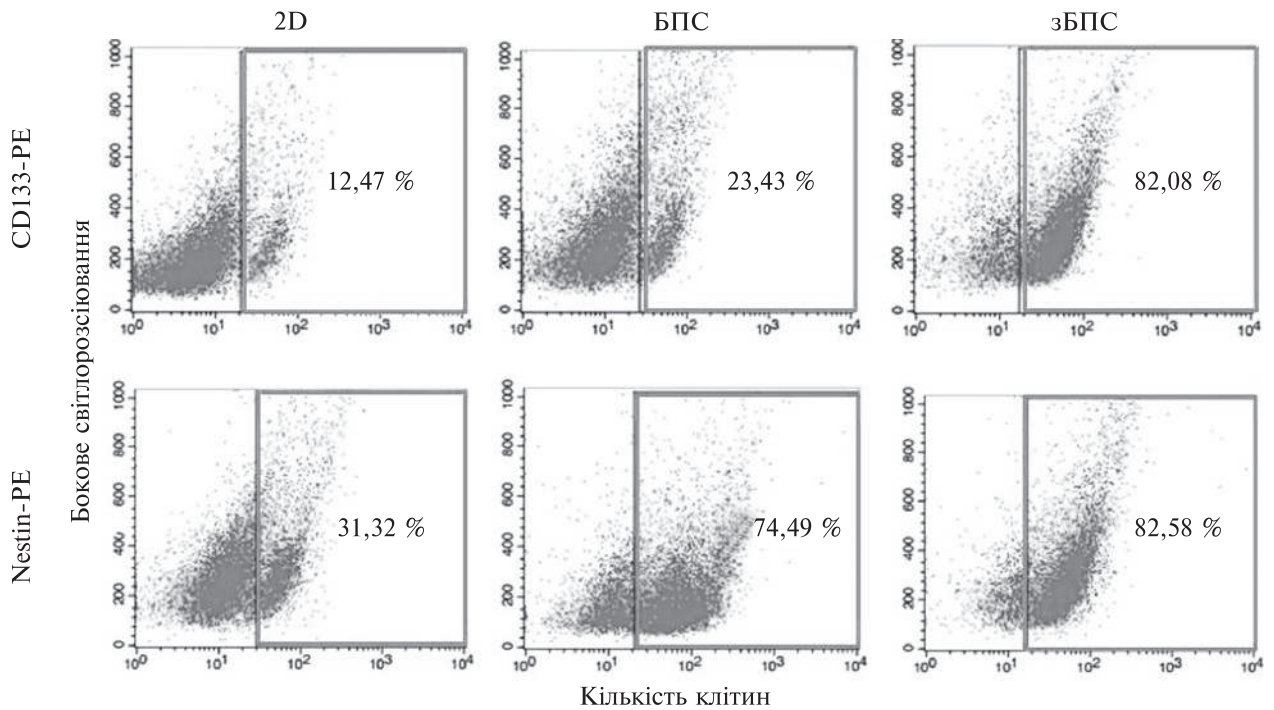


Рис. 2. Популяції стовбурових пухлинних клітин лінії MCF-7, що експресують CD133 та нестин, в моношаровій культурі клітин, БПС та зБПС, дані проточної цитометрії, фільтр 585/42 із довжиною хвилі емісії при 575 нм

турі БПС, збагачених СПК, досягав 82,58 % (рис. 3).

CD133 (промінін-1) був вперше описаний в якості маркера гемопоетичних стовбурових клітин (Yin et al, 1997). В подальшому CD133 було визначено на поверхні ініціюючих клітин багатьох злоякісних пухлин, у тому числі головного мозку (Singh et al, 2003), підшлункової залози (Hermann et al, 2007), шкіри (Rappa et al, 2008), простати (Collins et al, 2005) і товстої кишки (Schneider et al, 2012). Наразі CD133 визнаний маркер СПК (Brugnoli et al, 2019). Нестин – білок проміжних філаментів, який вперше був ідентифікований як маркер нейрональних стовбурових клітин (Трорере et al, 2009). Експресію нестину згодом виявляли в інших злоякісних пухлинах, таких як гліома (Strojnik et al, 2007), меланома (Piras et al, 2010), колоректальний рак (Ehrmannet et al, 2005), рак простати (Teranishi et al, 2007), і рак підшлункової залози (Kleeberger et al, 2007). Підвищення експресії нестину пов'язують із ангиогенезом і негативним прогнозом перебігу захворювання.

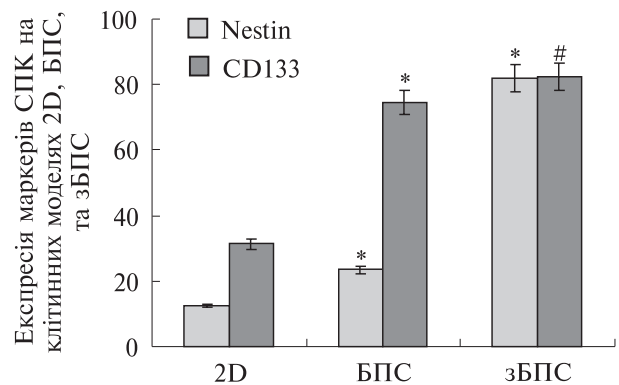
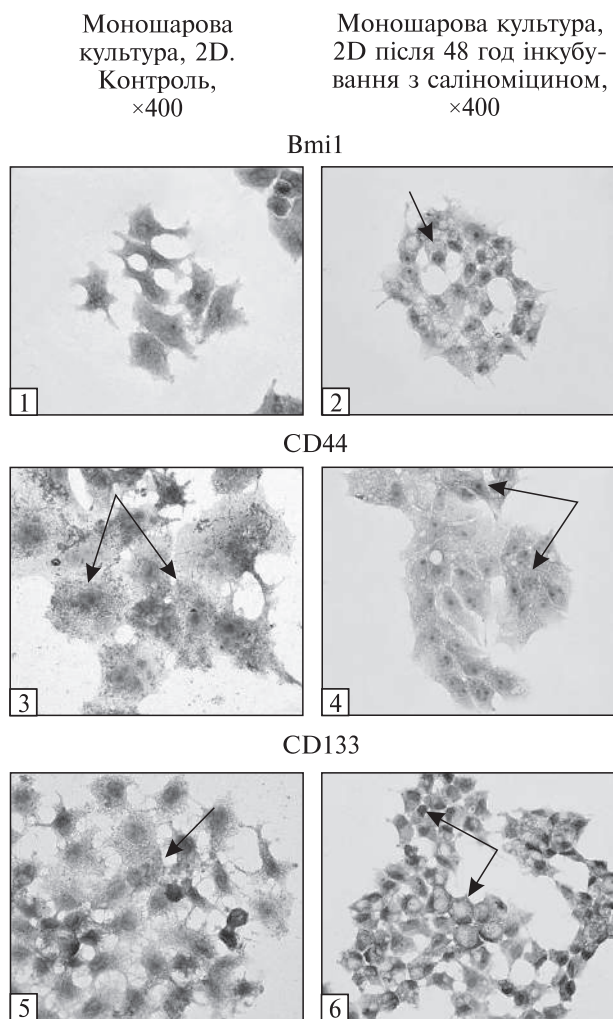


Рис. 3. Експресія маркерів СПК – CD133 та нестину клітинами лінії MCF-7 в моношаровій культурі клітин, БПС та зБПС, \* $p \leq 0,05$  для БПС та зБПС, в порівнянні з моношаровою культурою клітин, # $p \leq 0,05$  для зБПС, в порівнянні з БПС, культивованими за стандартних умов

З точки зору біології пухлин високі рівні нестину в СПК сприяють утворенню сфероїдів *in vitro* та солідних пухлин *in vivo*. Одночасно, пригнічення експресії нестину інгібує проліферацію, інвазію, процес епітеліально-мезенхімального



**Рис. 4.** Експресія маркерів СПК у клітинах лінії MCF-7, за умов моношарового росту після дії саліноміцину в концентрації 30 мкг/мл; стрілками позначено клітини, що експресують рецептори (3,3 діамінобензидин (ДАБ) – хромоген, коричневий колір) ×400, гематоксилін

переходу і сприяє активації Wnt/ $\beta$ -катенін сигнального шляху в СПК молочної залози (Zhao et al, 2014). Експресію нестину поряд із іншими маркерами, такими як CD133, bmi 1, CD44, CD24, oct3/4 і sox2, відносять до ознак стовбурового фенотипу і вважають маркером для виявлення СПК як нейрогенних пухлин, так і пухлин епітеліального і мезенхімального походження (Krupkova et al, 2010). Деякі результати експериментальних досліджень демонструють, що експресія нестину тісно

пов'язана із здатністю СПК до самооновлення, проте детальні механізми цього процесу ще досліджуються (Neradil et al, 2015). Отже, одночасне підвищення рівнів експресії CD133 та нестину в зБПС, в порівнянні з моношаровою культурою і БПС, може свідчити про збагачення цієї культури популяцією клітин з фенотипом СПК.

Результати проточної цитометрії підтвердили раніше опубліковані нами дані з імуногістохімічного дослідження рецепторного профілю на маркери стовбуровоподібних пухлинних клітин bmi-1, CD24, CD44, CD133 (Hegheliuk et al, 2019). В цій роботі ми показали, що сфероїди, які культивувалися в умовах збідненого середовища із додаванням факторів росту мали більш виражену експресію маркерів СПК в порівнянні з моношаровою культурою та БПС. Клітини, які експресують маркери СПК в БПС та зБПС розташовувалися на периферії сфероїда, в поверхневих шарах клітинних агрегатів. Прикметно, що отримані дані ілюстрували структуру багатоклітинного пухлинного сфероїда та гетерогенність пухлинної популяції на аваскулярній стадії мікрометастазу.

Як відомо із численних досліджень існує прямий зв'язок між кількістю стовбуровоподібних пухлинних клітин і прогнозом перебігу захворювання при РМЗ (Colak et al, 2014). Отримані дані дозволяють припустити, що стовбурові клітини РМЗ відіграють ключову роль в біології даного захворювання. Можливість впливу на СПК шляхом зміни складу і функцій клітинного мікросередовища може знизити метастатичний потенціал, підвищити строк та якість життя пацієнтів з РМЗ. На підтвердження цієї гіпотези було проведено імуноцитохімічне забарвлення моношарової культури пухлинних клітин на маркери стовбурових клітин, а саме: bmi-1, CD44, CD133 після 48-годинного інкубування клітин MCF7 з препаратом саліноміцином. Саліноміцин – це іонофорний антибіотик, який пригнічує ріст субпопуляції СПК, чинить цитотоксичну дію на пухлинні клітини та на клітини, які резистентні до хіміо- та радіотерапії. Відома протипухлинна активність цього препарату щодо стовбурових пухлинних клітин молочної залози (Versini et al, 2020), передміхурової

залози (Ketola et al, 2012), кісток (Tang et al, 2011), шлунка (Zhi et al, 2011), легенів (Wang 2011), колоректального раку (Resham et al, 2015). В результаті було продемонстровано, що під впливом саліноміцину при максимальній концентрації 30 мкг/мл кількість клітин, що експресують вказанні білки на поверхні пухлинних клітин в популяціях, що культивувалися в умовах моношарової культури зменшується (рис. 4).

Так в моношаровій культурі експресія білка bmi-1 (фото 1–2, рис. 4) залишається на рівні з контролем, що потребує більш ретельного вивчення отриманих результатів. Кількість клітин, що експресують маркери CD133 та CD44 (фото 3–6, рис. 4) знижується на 31 та 28 % відповідно в порівнянні з контролем (рис. 5). Зниження експресії саме цих вище згаданих білків свідчить про збільшення ступеню диференціювання клітин та підвищення чутливості до протипухлинних препаратів. Саліноміцин продемонстрував не лише цитотоксичну активність, але й те, що він здатен елімінувати СПК. За результатами імуноцитохімії показано, що популяція пухлинних клітин гетерогенна. Прикметно, що отриманні дані ілюструють, що моношарова культура збідніла на СПК. Лише невеликий відсоток пухлинних клітин, експресують на своїй поверхні маркери стовбурових клітин.

Саліноміцин викликає значне зниження виживаності пухлинних клітин аденокарциноми молочної залози (рис. 6). За результатами МТТ-тесту було показано, що саліноміцин чинить цитотоксичну дію не лише на СПК, а й на активно проліферуючі пухлинні клітини. Так при інкубуванні клітин при концентрації – 30 мкг/мл відсоток живих клітин не перевищував 40 %. За мінімальної концентрації препарату виживаність клітин MCF-7 складала 82 %.

Було оцінено саліноміцин, як препарат, що впливає на СПК в БПС та зБПС.

У культурі БПС, які були збагачені СПК після культивування з саліноміцином навіть за мінімальної концентрації 3 мкг/мл спостерігалось значне зменшення середнього об'єму сфероїдів та зниження кількості життєздатних клітин. Максимальна концентрація саліноміцину за якою медіана середніх об'ємів зБПС

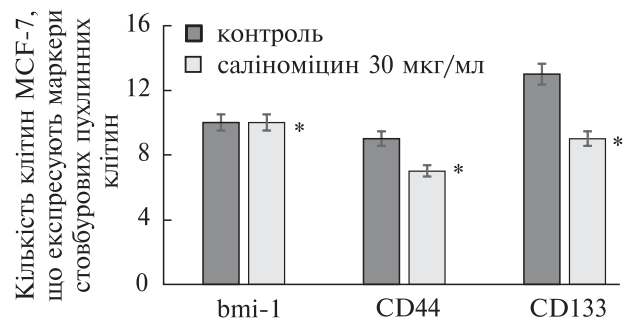


Рис. 5. Кількість клітин MCF-7, що експресують маркери стовбурових пухлинних клітин (bmi-1, CD44, CD133) при дії саліноміцину 30 мкг/мл, \* $p \leq 0,05$  відносно контролю

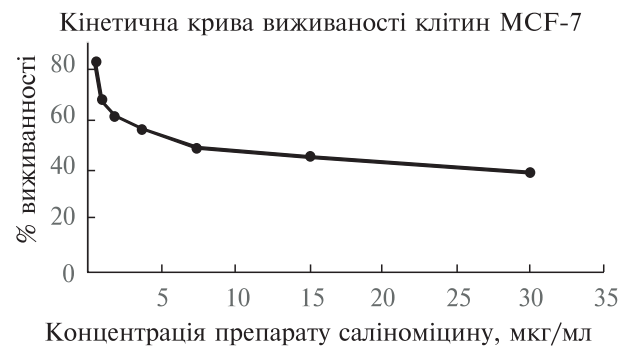


Рис. 6. Кінетична крива аналізу виживаності популяції пухлинних клітин MCF-7 при інкубуванні з саліноміцином,  $p \leq 0,05$

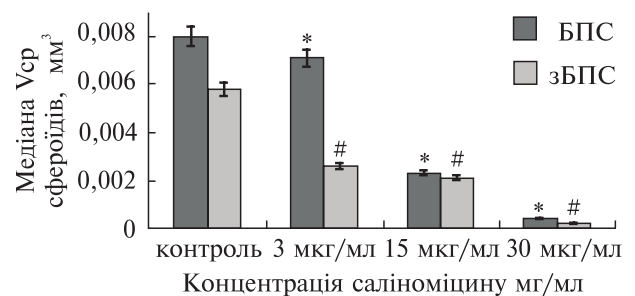
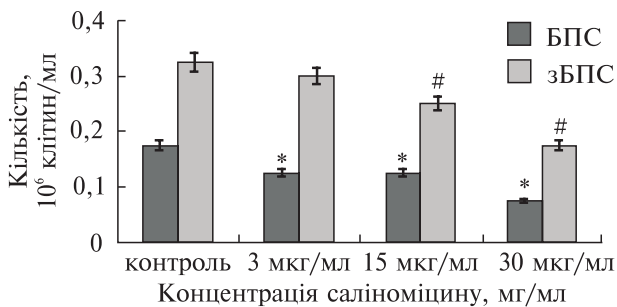


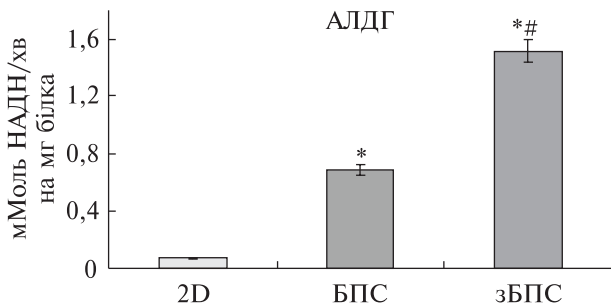
Рис. 7. Медіана об'ємів пухлинних сфероїдів в культурах БПС та зБПС після 48 год інкубування з саліноміцином у різних концентраціях. \* $p \leq 0,05$  – для медіани середнього об'єму клітинних агрегатів в культурі БПС, в порівнянні з контролем, # $p \leq 0,05$  – для медіани середнього об'єму клітинних агрегатів в культурі зБПС, в порівнянні з контролем

знизилася на 93 % (рис. 7), а кількість живих клітин зменшилася на 47 % в порівнянні з контролем дорівнювала 30 мкг/мл (рис. 8).





**Рис. 8.** Кількість живих клітин в культурах БПС та зБПС після 48 год інкубування з саліноміцином у різних концентраціях. \* $p \leq 0,05$  – для медіани середнього об’єму клітинних агрегатів в культурі БПС, в порівнянні з контролем, # $p \leq 0,05$  – для медіани середнього об’єму клітинних агрегатів в культурі зБПС, в порівнянні з контролем



**Рис. 9.** Активність альдегіддегідрогенази в клітинах аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 *in vitro* в умовах моношарового (2D), сфероїдного росту (БПС) і в БПС, збагачених СПК (зБПС), ммоль/мг білка за хв, спектрофотометрія, \* $p \leq 0,05$  для БПС та зБПС, в порівнянні з моношаровою культурою клітин, # $p \leq 0,05$  для зБПС, в порівнянні з БПС, культивованими за стандартних умов

У БПС, що росли за стандартних умов, спостерігалася схожа тенденція до цитотоксичного ефекту на пухлинні клітини за рахунок впливу саліноміцину. Середній об’єм сфероїдів після 48 год інкубування за концентрації 30 мкг/мл був нижчим на 87 % ніж в контрольних зразках (рис. 7). В той же час кількість живих клітин в БПС за максимальної концентрації препарату була нижчою за контрольні показники на 57 % (рис. 8). Отримані дані свідчать про нижчу чутливість клітин зБПС до протипухлинного засобу порівняно з клітинами сфероїдів, що культивувалася за стандартних умов. СПК, які за теорією є в мікросфероїдах зберігають високу стійкість завдяки активній експресії

білків транспортерів родини ABC, що забезпечують евакуацію токсичних речовин з клітини. Оскільки культура БПС має подібність до первинної пухлини або мікрометастазу, цитотоксичний ефект що спостерігався при культивуванні сфероїдів з саліноміцином представляє, на нашу думку, практичний інтерес. Одним із основних механізмів дії саліноміцину є блокування АТФ-залежних білків транспортерів родини ABC, через які клітини стають резистентними до протипухлинних препаратів, а отже тим самим спостерігається пригнічення саліноміцином СПК в 3Д культурі.

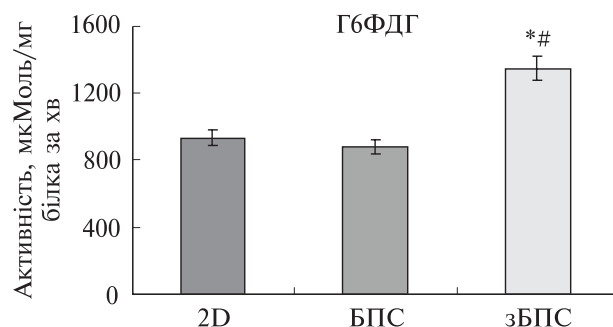
Додатковим показником для ідентифікації клітин з фенотипом СПК у клітинній культурі було використано визначення активності ферменту АЛДГ. Альдегіддегідрогеназа – це родина ферментів, що здійснюють функцію детоксикації в клітинах та захищають їх від окислювального стресу. АЛДГ окислюють широкий ряд ендogenous і екзогенних альдегідів до відповідних карбонових кислот. В останнє десятиліття високу активність АЛДГ розглядають як маркер для популяцій нормальних стовбурових клітин, а також СПК. Раніше продемонстровано, що АЛДГ може регулювати клітинні функції, пов’язані з самовідновленням, диференціюванням та стійкістю до протипухлинної терапії (Vassalli, 2019). Тому, ми порівняли активність АЛДГ за різних умов культивування: у моношаровій культурі клітин, у БПС та зБПС. В результаті було виявлено, що найбільша активність АЛДГ спостерігалася в клітинах сфероїдів, які культивували за відсутності сироватки та додаванні факторів росту (зБПС),  $1,58 \pm 0,08$  ммоль/мг білка за хв. За стандартних умов сфероїдного росту (у БПС) активність АЛДГ становила  $0,69 \pm 0,05$  ммоль/мг білка за хв. (рис. 9), що вище більш ніж в 2 рази нижче, ніж в моделі зБПС та на порядок вище, ніж за умов моношарового росту ( $0,07 \pm 0,01$  ммоль/мг білка за хв. Ми припускаємо, що підвищений рівень активності АЛДГ в культурах БПС і зБПС, в порівнянні з моношаровою культурою клітин, також пов’язаний із збільшенням відносної чисельності популяції СПК.

Новітні біохімічні дослідження свідчать про те, що СПК, в порівнянні з диференційованими пухлинними клітинами, мають відмін-

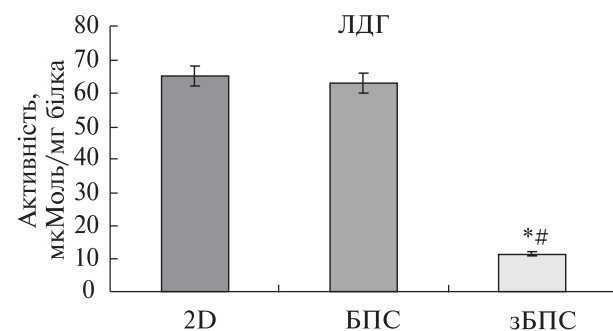
ний спектр активних метаболічних шляхів. Так СПК проявляють підвищену активність до гліколізу, володіють іншими метаболічними характеристиками, ніж диференційовані пухлинні клітини, в тому числі підвищеною активністю ПФШ (Wong et al, 2017). Для порівняння енергетичного стану клітин за різних умов росту, ми вимірювали активність Г6ФДГ – цитозольного ферменту, що входить до ПФШ. Г6ФДГ забезпечує утворення клітинного НАДФН із НАДФ+ Також було досліджено активність ЛДГ – ферменту, що використовує НАД для окиснення лактату до пірувату, або каталізує зворотню реакцію. В результаті, було встановлено, що активність Г6ФДГ пухлинних клітин за умов моношарового росту становить  $934,6 \pm 148,3 \times 10^{-6}$  моль/мг білка за хв (рис. 10), що на 3,5 порядки перевищує активність цього ферменту у нормальних, тобто не трансформованих тканинах (Taniguchi et al, 2016 ).

НАДН, що утворюється як продукт реакції, використовується клітиною у тому числі для нейтралізації вільних радикалів. Тобто Г6ФДГ за умов окисного стресу можна розглядати як фермент антиоксидантного захисту (Mukherjee et al, 2015). Отримані дані підтверджують відомості про інтенсифікацію реакцій ПФШ в пухлинних клітинах, за умов окисативного стресу і його значної ролі у антиоксидантному захисті клітин.

За умов сфероїдного росту (у БПС) активність Г6ФДГ становила  $882,4 \pm 228,9$  мкмоль/мг білка за хв (рис. 10), тобто достовірно не відрізнялася від активності Г6ФДГ в умовах моношарового росту. Ми вважаємо, що це свідчить про те, що енергетичний стан пухлинних клітин, принаймні активність Г6ФДГ як НАД(Ф) залежного ферменту, за умов росту у БПС принципово не змінюється, порівняно з умовами моношарового росту. Однак, при збагаченні БПС СПК (рис. 10) має місце зростання активності Г6ФДГ у 1,5 рази, що свідчить про інтенсифікацію реакцій ПФШ за несприятливих умов культивування. Ми можемо припустити, що зменшення проявів окисного стресу у БПС, збагачених СПК, за умов пригнічення ферментів антиоксидантного захисту, може бути наслідком саме підвищеної активності Г6ФДГ.



**Рис. 10.** Активність глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази в клітинах аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 *in vitro* в умовах в умовах моношарового (2D), сфероїдного росту (БПС) і в БПС, збагачених СПК (зБПС), мкмоль/мг білка за хв, спектрофотометрія, \* $p \leq 0,05$  для БПС та зБПС, в порівнянні з моношаровою культурою клітин, # $p \leq 0,05$  для зБПС, в порівнянні з БПС, культивованими за стандартних умов



**Рис. 11.** Активність ЛДГ в клітинах аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 *in vitro* в умовах моношарового (2D), сфероїдного росту (БПС) і в БПС, збагачених СПК (зБПС), мкмоль/мг білка, спектрофотометрія, \* $p \leq 0,05$  для БПС та зБПС, в порівнянні з моношаровою культурою клітин, # $p \leq 0,05$  для зБПС, в порівнянні з БПС, культивованими за стандартних умов

Результати роботи знаходять підтвердження в роботі Р. Jiang та колег (Jiang et al, 2015), які показали, що під час окисативного стресу клітини раку здатні змінювати гліколітичний метаболічний шлях і збільшувати потік глюкози за рахунок ПФШ, а також генерувати більше НАДФН для антиоксидантного захисту. Інші автори приводять дані про підвищення активності ПФШ як адаптивної реакції клітин у відповідь на іонізуюче випромінювання, хіміотерапію чи окисний стрес, та інші умови

які підвищують рівень активних форм кисню (АФК) (Patra et al, 2014). Так само субпопуляція СПК збільшується у відповідь на іонізуюче випромінювання, радіацію, хіміотерапію чи оксидативний стрес на фоні загибелі диференційованих пухлинних клітин (Kim et al, 2016). Також було продемонстровано, що стійкість СПК до протипухлинної терапії супроводжувалась посиленням окислювальної активності ПФШ (Ramos-Martinez, 2017)

На наступному етапі роботи було порівняно активність ЛДГ в умовах моношарового (2D), сфероїдного росту (БПС) і в зБПС (рис. 11). Так було встановлено, що активність ЛДГ у клітинах MCF-7 за умов моношарового росту становить  $65,12 \pm 1,28$  мкмоль/мг білка за хв, що на 3 порядки більше за активність даного ферменту у нормальних тканинах (Talaiezhadeh et al, 2015). Це може свідчити про високу інтенсивність гліколізу у цих клітинах. За умов сфероїдного росту (у БПС) активність ЛДГ складала  $63,06 \pm 0,32$  мкмоль/мг білка за хв, тобто достовірно не відрізнялися від активності за умов моношарового росту. Як і у випадку з Г6ФДГ ці дані свідчать про те, що енергетичний стан пухлинних клітин за умов росту у БПС (рис. 10) принципово не змінюється порівняно з умовами моношарового росту.

Активність ЛДГ в пухлинних клітинах, за умов росту в БПС, збагачених СПК (рис. 11), зменшується у 5,5 разів порівняно із незбагаченими БПС. Це може свідчити про пригнічення процесів гліколізу в пухлинних клітинах. Тому ми можемо припустити, що за умов збагачення пухлинної популяції СПК енергетичний профіль клітин в БПС змінюється, тобто гліколіз перестає відігравати ключову роль у енергетичному забезпеченні клітин (Zdravcic et al, 2017).

За достатньої кількості кисню піруват, що утворився в процесі гліколізу, окиснюється далі в циклі Кребса в мітохондріях (основне джерело енергії аеробних організмів). За умов гіпоксії, що має місце в солідних пухлинах, основним джерелом енергії для пухлинної клітини стає саме гліколіз (ефект Варбурга), а піруват, за наявності кисню, перетворюється в лактат за участю ЛДГ, що призводить до закиснення середовища. Тому, очевидно, що активність ЛДГ у пухлинних клітинах значно підвищена

порівняно з нормальними (Feng et al, 2018). Багато робіт свідчать про нерегульовані рівні активності ЛДГ в злоякісних новоутвореннях, в тому числі при РМЗ (Kurginska et al, 2019), підшлункової залози (Cui et al, 2014), носоглотки (Su et al, 2017), шлунку (Jiang et al, 2015), сечового міхура (Koukourakis et al, 2016) і ендометрію (Giatromanolaki et al, 2006).

СПК демонструють стійкість до протипухлинної терапії, забезпечують виникнення та прогресію злоякісних новоутворень. Так, показано, що клітини раку здатні переходити на ПФШ за несприятливих умов культивування, нестачі поживних речовин, можливо, за умов дії надлишкової кількості АФК. За даними літератури, окисний стрес виявляється сильним індуктором СПК, кількість цих клітин збільшується в пухлині після впливу АФК. Відповідно, збільшення надходження АФК може опосередковано вказувати на збільшення популяції СПК, для якої характерна висока активність ПФШ. Тому, можна розглядати збільшення активності ПФШ і його метаболітів та зв'язаних білків як маркери для виявлення збагачених СПК популяцій (Ghanbari et al, 2019). З іншого боку, метаболічні відхилення від гліколізу в сторону ПФШ у злоякісно трансформованих клітинах, можливо, може призводити до виникнення фенотипу стовбуровоподібних клітин. На відміну від диференційованих пухлинних клітин, які проявляють підвищений гліколіз, СПК мають здатність перелаштовувати метаболічні шляхи в залежності від умов мікрооточення, в тому числі посилювати активність ПФШ.

Таким чином, можна зробити висновки про інтенсифікацію реакцій ПФШ у БПС, збагачених СПК, що, імовірно, може бути адаптивною реакцією пухлинної популяції для захисту від надмірного окисного стресу, та пригнічення гліколізу. В результаті, гліколіз перестає відігравати життєво необхідну роль у цих клітинах, одночасно з нормалізацією реакцій окисного фосфорилування в мітохондріях, .

В нашому дослідженні виявлення маркерів СПК (CD133 і нестину, bmi1, CD44, CD133) та визначення активності АЛДГ та Г6ФДГ продемонстрували, що БПС, культивовані за звичайних суспензійних умов без додавання яких-небудь стимулюючих факторів самі по

собі мають популяції клітин із характеристиками стовбурових клітин. Проте, цілеспрямоване культивування БПС в безсироваткових умовах з додаванням ростових факторів дозволяє суттєво збільшити відсоток СПК та досліджувати СПК в культурі *in vitro*. З практичної точки зору, модель БПС утворена з пухлинних клітин людини, дає можливість для пошуку препаратів, направлених саме на СПК людини, тоді як на тваринних моделях такої можливості досі не існує. Метод культивування зБПС є способом підтримання популяції СПК в культурі в умовах максимально наближених до умов пухлинного мікроузла, у тісній взаємодії з пухлинними клітинами різного ступеня диференціювання, в умовах нестачі поживних речовин та кисню, багат шаровій структурі. Очікується, що популяція СПК в умовах субстрат-незалежного росту буде зберігати здатність до самооновлення, експресії специфічних маркерів та підтримки росту популяції пухлинних клітин. Ми вважаємо, що гетерогенна модель зБПС, що складається з різних субпопуляцій клітин, має переваги над культурами ізольованих за допомогою клітинних сепараторів СПК оскільки клітини мають можливість взаємного впливу за рахунок формування міжклітинних контактів, обміну цитокінами та факторами росту. Культивування БПС, збагачених СПК на прикладі лінії аденокарциноми молочної залози є ефективним, економічним і надійним підходом для дослідження характеристик цих клітин. Запропоновану методику можна використовувати для вивчення терапевтичної відповіді СПК на таргетну терапію, для дослідження механізмів інвазії і міграції СПК, які є важливими процесами, пов'язаними із виникненням пухлини і наступним рецидивом. Основні труднощі, пов'язані із використанням таких сфероїдів у дослідженнях СПК пов'язані із необхідністю використання сучасного обладнання для візуалізації та підрахунку результатів, а також із тим, що не всі клітинні лінії або первинні пухлини здатні формувати сфероїди в культурі. Крім того, технічно важко оцінити ступінь збагачення СПК в клітинних агрегатах або ізолювати СПК із них для подальших дослідів і аналізу різноманітних факторів, таких як висока загибель клітин всередині сфероїда і часткове диференціювання клі-

тин-нащадків. Незважаючи на існуючі обмеження у використанні, виявлення високої експресії маркерів СПК в зБПС дає надію на застосування цієї моделі в дослідженнях клітин із стовбуровим фенотипом, створення та тестування системної протипухлинної терапії, направленої на ці клітини.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

#### RESEARCH OF STEM TUMOR CELLS SUBPOPULATION ON MODELS OF BREAST CANCER

*T. Herheliuk, O. Perepelytsina, Y. Chmelnytskaia, G. Kuznetsova, N. Dzjubenko, N. Raksha, O. Gorbach, M. Sydorenko*

Department of Biotechnical Problems of Diagnostics, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Science of Ukraine, 03028, Kyiv, Ukraine  
Educational and Scientific Centre «Institute of Biology and Medicine», 03187, Kyiv, Ukraine;  
National Cancer Institute of Ukraine, 03022, Kyiv, Ukraine

E-mail: olenaquil@gmail.com\*, vbpd-ipkk@ukr.net

Heterogeneity of the tumor population, the presence of tumor stem cells in it, is one of the reasons for the resistance of tumors to antitumor therapy, recurrence and metastasis, as well as the complexity of treatment of the cancer. The aim of the study was to enrich of the breast adenocarcinoma cells, MCF-7, multicellular tumor spheroids (MTS) with cancer stem cells, enriched MTS (eMTS). Other aim was to investigate the resulting subpopulation of CSC in MTS by biochemical, immunological and cytological methods. According to the results of the study, it was found that in the conditions of lack of nutrient medium, with the addition of certain growth factors, the percentage of CSC in the cell population of MTS increased significantly. The obtained results demonstrated increasing of the CSC subpopulation. It was indicated according to biochemical, cytological and immunological methods simultaneously. Thus, the percentage of CD133+ cells increased from 12.47 to 82.08 %, Nestin+ from 31.3 to 82.58 %. According to immunohistochemical staining data the expression of

other markers of CSC: CD44, CD133, bmi1, also increased. The activity of aldehyde dehydrogenase in MCF-7 cells in monolayer culture was 0.07 mol/mg protein per minute and increased to 1.58 mol/mg of protein per minute in eMTS. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6FDG) in MCF-7 under conditions of monolayer growth was  $934.6 \pm 148.3 \times 10^{-6}$  mol/mg of protein per minute. At the same time in the enriched by CSC MTS the activity of G6FDG increased more than in 1.5 times. The activity of the lactate dehydrogenase (LDH) in MCF-7 cells in monolayer culture was  $65.12 \pm 1.28$   $\mu$ mol/mg of protein per minute, and in eMTS, decreased in 5.5 times. Thus, based on the analysis of the obtained data, we can assume that under conditions of enrichment of the tumor population by CSC the receptor and energy profile of MCF-7 cells changed. So, MTS are approaching to characteristics of metastatic micronode, and tumor cells are approaching to cancer stem cells.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Baccelli I, Trumpp A. (2012) The evolving concept of cancer and metastasis stem cells *The J of Cell Biol* 198:281–293. doi: 10.1083/jcb.201202014
- Bapat S, Mali A, Koppikar C et al. (2005) Stem and Progenitor-Like Cells Contribute to the Aggressive Behavior of Human Epithelial Ovarian Cancer *Cancer Res* 65:3025–3029. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-3931
- Bjerkvig R. (1992) Spheroid culture in cancer research. CRC Press
- Borille L, Dergham A, Wund Z et al. (2019) Salinomycin decreases feline sarcoma and carcinoma cell viability when combined with doxorubicin. *BMC Veterinary Res* 15(1). doi: 10.1186/s12917-019-1780-5
- Brugnoli, F, Grassilli S, Al-Qassab Y et al. (2019) CD133 in Breast Cancer Cells: More than a Stem Cell Marker *J Oncol* doi: 10.1155/2019/7512632
- Colac S, Medema J. (2014) Cancer stem cells—important players in tumor therapy resistance *FEBS J* 281(21):4779–4791. doi: 10.1111/febs.13023
- Collins A, Berry P, Hyde C et al. (2005) Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells *Cancer Res* 65:10946–10951. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-2018
- Cui J, Shi M, Xie D et al. (2014) FOXM1 Promotes the Warburg Effect and Pancreatic Cancer Progression via Transactivation of LDHA Expression. *Clin Cancer Res* 20(10):2595–2606. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-2407
- Ehrmann J, Kolar Z, Mokry J. (2005) Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours *J Clin Pathol* 58:222–223. doi: 10.1136/jcp.2004.021238
- Feng Y, Xiong Y, Qiao T. (2018) Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy *Cancer Med* doi: 10.1002/cam4.1820
- Ghanbari Movahed Z, Rastegari-Pouyani M, Mohammadi M et al. (2019) Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? *Biomed Pharmacotherapy*. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108690
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter K et al. (2006). Lactate dehydrogenase 5 (LDH-5) expression in endometrial cancer relates to the activated VEGF/VEGFR2(KDR) pathway and prognosis *Gynecol Oncol* 103(3):912–918. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.05.043
- He Q, Luo X, Wang K et al. (2014) Isolation and Characterization of Cancer Stem Cells from High-Grade Serous Ovarian Carcinomas. *Cellular Physiol and Biochem* 33:173–184. doi: 10.1159/000356660
- Herheliuk T, Perepelytsina O, Ugnivenko A et al. (2019) Investigation of multicellular tumor spheroids enriched for a cancer stem cell phenotype *Stem Cell Invest.* 6:21. doi: 10.21037/sci.2019.06.07
- Hermann P, Huber S, Herrler T et al. (2007) Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer Cell Stem Cell 1:313–323. doi: 10.1016/j.stem.2007.06.002
- Hockmair M, Rath B, Klameth L et al. (2020) Effects of salinomycin and niclosamide on small cell lung cancer and small cell lung cancer circulating tumor cell lines. *Invest new DRUGS*. DOI: 10.1007/S10637-019-00847-8
- Jiang P, Du W, Wu M. (2014) Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer *Protein & Cell* 5:592–602. doi: 10.1007/s13238-014-0082-8
- Jiang W, Zhou F, Li N et al. (2015) FOXM1-LDHA signaling promoted gastric cancer glycolytic phenotype and progression. *Int J Clin Exp Pathol* 6:6756–6763
- Karakaya H, Ozkul K (2016) Measurement of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in bacterial cell-free extracts *Bio-protocol* 6(19): e1949. doi: 10.21769/BioProtoc.1949
- Ketola K, Hilvo M, Hyutyläinen T, Vuoristo A et al. (2012) Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress. *Brit J Cancer* 106:99–106. doi: 10.1038/bjc.2011.530
- Kim Y, Siegler E, Siriwon N, Wang P. (2016) Therapeutic strategies for targeting cancer stem cells *J Cancer Metastasis Treat* doi: 10.20517/2394-4722.2016.26
- Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME. (2007) Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis *Cancer*

- Res 67:9199–9206. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0806
- Koukourakis M, Kakouratos C, Kalamida D. (2016) Hypoxia-inducible proteins HIF1 $\alpha$  and lactate dehydrogenase LDH5, key markers of anaerobic metabolism, relate with stem cell markers and poor post-radiotherapy outcome in bladder cancer *Int J Radiat Biol* 92(7):353–363. doi: 10.3109/09553002.2016.1162921
- Krupkova Jr, Loja T, Zambo I, Veselska R. (2010) Nestin expression in human tumors and tumor cell lines *Neoplasma* 4:291–298. doi: 10.4149/neo\_2010\_04\_291
- Kumar V, Gill KD. (2018) Determination of total lactate dehydrogenase activity in serum sample. in: *Basic concepts in clinical biochemistry: a practical guide* Springer 129–130. doi: 10.1007/978-981-10-8186-6\_32
- Kurpiska A, Suraj J, Bonar E et al. (2019) Proteomic characterization of early lung response to breast cancer metastasis in mice *Exp Mol Pathol* doi: 10.1016/j.yexmp.2019.02.001
- Ma L, Lai D, Liu T et al. (2010) Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3 *Acta Biochim Biophys Sin* 42:593–602. doi: 10.1093/abbs/gmq067
- Mukherjee D, Ahmad R. (2015) Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity During N'-nitrosodiethylamine-induced Hepatic Damage *Achievements in the Life Sciences* 9:51–56. doi: 10.1016/j.als.2015.05.007
- Naujokat C. (2015) Salinomycin in cancer: A new mission for an old agent *Molecular Medicine Reports* 3:555–559. doi: 10.1155/2012/950658
- Neradil J, Veselska R. (2015) Nestin as a marker of cancer stem cells *Cancer Sci* 106:803–811. doi: 10.1111/cas.12691
- Patra K, Hay N. (2014) The phosphate pathway and cancer *Trends Biochem* 39:347–354. doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.005
- Piras F, Perra MT, Murtas D et al. (2010) The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma *Oncol Rep* 23:17–24. doi.org/10.3892/or\_00000601
- Ramos-Martinez J. (2017) The regulation of the pentose phosphate pathway: Remember Krebs *Arch Biochem Biophys* 614:50–52. doi: 10.1016/j.abb.2016.12.012
- Rappa G, Fodstad O, Lorico A. (2008) The Stem Cell-Associated Antigen CD133 (Prominin-1) Is a Molecular Therapeutic Target for Metastatic Melanoma Stem cells 26:3008–3017. doi: 10.1634/stemcells.2008-0601
- Resham K, Patel P, Thummuri D et al. (2015) Preclinical drug metabolism and pharmacokinetics of salinomycin, a potential candidate for targeting human cancer stem cells *Chemico-Biological Interactions* 240:146–152. doi: 10.1016/j.cbi.2015.08.007
- Sant S, Johnston P et al. (2017) The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery *Drug Discov Today Technol* 23:27–36. doi: 10.1016/j.ddtec.2017.03.002
- Schneider M, Huber J, Hadaschik B et al. (2012) Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker *BMC Cancer*. doi: 10.1186/1471-2407-12-96
- Singh Sh, Clarke I, Terasaki M et al. (2003) Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors *Cell and Tumor Biology* 63(18):5821–5828
- Strojnik T, Rosland GV, Sakariassen PO et al. (2007) Neural stem cell markers nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival *Surg Neurol* 68:133–143. doi: 10.1089/scd.2008.0359
- Su Y, Yu Q, Wang X et al. (2017) JMJD2A promotes the Warburg effect and nasopharyngeal carcinoma progression by transactivating LDHA expression *BMC Cancer* 17. doi: 10.1186/s12885-017-3473-4
- Talaiezhadeh A, Shahriari A, Tabandeh M et al. (2015) Kinetic characterization of lactate dehydrogenase in normal and malignant human breast tissues *Cancer Cell Int*. doi: 10.1186/s12935-015-0171-7
- Tang Q, Zhao Z-Q, Li J-C, Liang Y et al. (2011). Salinomycin inhibits osteosarcoma by targeting its tumor stem cells *Cancer let.* 311:113–121. doi: 10.1016/j.canlet.2011.07.016
- Taniguchi M, Mori N, Iramina C. (2016) Elevation of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Activity Induced by Amplified Insulin Response in Low Glutathione Levels in Rat Liver *Sci World J*. doi: 10.1155/2016/6382467
- Teranishi N, Naito Z, Ishiwata T et al. (2007) Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer *Int J Oncol* 30:593–603. doi: 10.3892/ijo.30.3.593
- Tropepe V, Alton K, Sachewsky N et al. (2009) Neurogenic Potential of Isolated Precursor Cells from Early Post-Gastrula Somitic Tissue Stem Cells *Dev* 18:1533–1542. doi: 10.1089/scd.2008.0359
- Vassalli G. (2019) Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells *Stem Cells Int*. doi: 10.1155/2019/3904645
- Versini A, Colombeau L, Hienzsch A. (2020) Salinomycin Derivatives Kill Breast Cancer Stem Cells by Lysosomal Iron Targeting. *Chemistry a European Journal*. doi: 10.1002/chem.202000335
- Wang H, Zhang H, Zhu Y et al. (2021) Anticancer Mechanisms of Salinomycin in Breast Cancer and

- Its Clinical Applications Front Oncol doi: 10.3389/fonc.2021.654428
- Wang Y. (2011) Effects of salinomycin on cancer stem cell in human lung adenocarcinoma A549 cells, Medicinal Chemistry. doi: 10.2174/157340611794859307
- Wong T, Che N, Ma S. (2017) Reprogramming of central carbon metabolism in cancer stem cells Biochim et Biophys Acta (BBA) – Mol Basis of Dis 1863:1728–1738. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.05.012
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED et al. (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells Blood 90:5002–5012
- Zdravlevic M, Marchiq I, Cunhade P et al. (2017) Metabolic Plasticity in Cancers — Distinct Role of Glycolytic Enzymes GPI, LDHs or Membrane Transporters MCTs Front Oncol. doi: 10.3389/fonc.2017.00313
- Zhang C, Tian Y, Song F et al. (2015) Salinomycin inhibits the growth of colorectal carcinoma by targeting tumor stem cells Oncology reports. doi: doi.org/10.3892/or.2015.4253
- Zhao Z, Lu P, Zhang H. (2014) Nestin positively regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells Breast Cancer Res. doi: 10.1186/s13058-014-0408-8
- Zhi Q, Chen X, Ji J, Zhang J et al. (2011) Salinomycin can effectively kill ALDH<sup>+</sup> high stem-like cells on gastric cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy 65:509–515. doi: 10.1016/j.biopha.2011.06.006

Надійшла в редакцію 19.11.21  
Після доопрацювання 13.01.22  
Прийнята до друку 18.07.22