

ВПЛИВ ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА-2b НА БАГАТОКЛІТИННІ ПУХЛИННІ СФЕРОЇДИ ЛІНІЇ MCF-7, ЗБАГАЧЕНІ СТОВБУРОВИМИ ПУХЛИННИМИ КЛІТИНАМИ

Т.С. Гергелюк^{1*}, О.М. Перепелиціна², Л.І. Остапченко¹, М.В. Сидоренко²

¹Навчально-науковий центр “Інститут біології та медицини”, Київ, Україна

²ДУ “Відділення біотехнічних проблем діагностики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України”, Київ, Україна

*Corresponding author: gergelyuk87@nas.gov.ua

Received 22 February 2019; Accepted 19 March 2019

Проблематика. Основна проблема лікування ракових захворювань полягає в тому, що прогноз перебігу захворювання залежить від субпопуляційного складу первинної пухлини та здатності пухлини відновлюватися й утворювати метастази. Згідно з останніми дослідженнями, агентами, які забезпечують самовідновлення пухлини після опромінення та хіміотерапії, є стовбурові пухлинні клітини (СПК). Одним зі способів виділення цих клітин є формування багатоклітинних пухлинних сфероїдів. Метод збагачення таких сфероїдів СПК може бути використаний для тестування комплексної протипухлинної терапії, спрямованої на популяцію СПК *in vitro*. Деякі дослідження продемонстрували тісний зв'язок СПК та інтерферонів під час проліферації та прогресії пухлини. Тому важливо оцінити чутливість популяції СПК до дії інтерферону на моделі багатоклітинних пухлинних сфероїдів.

Мета. Дослідити чутливість популяції клітин лінії MCF-7 до дії ІФН α -2b на моделі багатоклітинних пухлинних сфероїдів, збагачених СПК.

Методика реалізації. Для збагачення багатоклітинних сфероїдів стовбуровими пухлинними клітинами адгезивні клітини моношарової культури лінії MCF-7 (аденокарцинома молочної залози людини) трипсинізували і культивували на орбітальному шейкері у безсироваткових умовах із додаванням ростових факторів (фактора росту фібробластів, епідермального фактора росту, інсуліну і гідрокортизону) та 2 % карбоксиметилцелюлози. З метою дослідження прямої дії ІФН α -2b (фактора мікрооточення пухлини) на популяції клітин до планшетів з клітинними агрегатами додавали ІФН α -2b у концентрації 10^2 і 10^4 МО/мл та інкубували протягом 48 год. Підрахунок кількості клітин проводили за допомогою рутинного методу з використанням трипанового синього та гемоцитометра. Морфометричний аналіз проводили вимірюванням об'ємів сфероїдів, використовуючи програмне забезпечення Stemi2000 (Zeiss, Німеччина) і формулу Б'єрквіга. Експресію рецепторів аналізували після двох днів інкубації з використанням первинних моноклональних антитіл CD24 (Sigma, США), CD44 (Sigma, США), CD133 (Sigma, США), bmi-1 (Sigma, США). Для статистичної обробки даних застосовували однофакторний аналіз дисперсії та *t*-Student тестування з програмним пакетом Statistica 8. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$. Для кожного отриманого результату визначали показники середнього арифметичного (M) і стандартної похибки середнього арифметичного (m).

Результати. За допомогою імуногістохімічного аналізу було показано наявність клітин, які експресують рецептори, характерні для СПК молочної залози (CD24, CD44, CD133, bmi-1) у культурі багатоклітинних пухлинних сфероїдів, що культивували в безсироваткових умовах із додаванням ростових факторів. Оскільки клітини отримані з монокультури пухлинних клітин, то можна припустити, що саме СПК виявляються за відповідними маркерами, а не клітини строми, для яких також можлива експресія цих рецепторів. Отримано дані про вплив ІФН α -2b на гетерогенну популяцію пухлинних і стовбуровоподібних клітин. Так, виявилось, що цей цитокін впливає на зниження середнього об'єму клітинних агрегатів на 16 та 25 % за концентрації 10^2 та 10^4 МО/мл відповідно, а також пригнічує проліферацію клітин на 13 % за концентрації ІФН α -2b 10^4 МО/мл порівняно з контрольними зразками. Подальше інкубування сфероїдів з ІФН α -2b приводить до зниження середнього значення і медіани об'ємів сфероїдів на 48 та 74 % за концентрації цитокіну 10^2 та 10^4 МО/мл відповідно порівняно з контрольними зразками. ІФН α -2b дозозалежно сприяє розпаду багатоклітинних пухлинних сфероїдів, збагачених СПК, та формуванню великої кількості дрібних клітинних агрегатів і поодиноких клітин лінії MCF-7.

Висновки. ІФН α -2b можна розглядати як допоміжний агент для розробки і тестування комплексної протипухлинної терапії, що спрямована на активацію СПК, з одночасним впливом хіміотерапії на моделі багатоклітинних пухлинних сфероїдів лінії MCF-7, збагачених цими клітинами *in vitro*.

Ключові слова: багатоклітинні пухлинні сфероїди; стовбурові пухлинні клітини; інтерферон альфа; MCF-7.

Вступ

Основна проблема лікування ракових захворювань полягає в тому, що прогноз перебігу захворювання значною мірою залежить від субпопуляційного складу первинної пухлини та здатності пухлини відновлюватися й утворювати метастази. Згідно з даними [1], агентами, які забезпечують самовідновлення пухлини після опромінення та хіміотерапії, є стовбурові пухлинні клітини (СПК). Вони становлять менше 1 % усіх клітин новоутворення, проте здатні суттєво впливати на перебіг захворювання. Існують докази на користь існування СПК при лейкомії, мієломі, пухлинах мозку, раку молочної залози (РМЗ) [2]. У деяких працях підтверджується припущення про те, що канцерогенез у молочній залозі та інших органах може бути результатом трансформації нормальних стовбурових клітин (СК) і/або прогеніторних клітин, яка була викликана порушенням регуляції шляхів самооновлення [3]. Так, низка дослідників [4] показали, що лише невеликі субпопуляції CD133-позитивних клітин різних пухлин людини ведуть себе як пухлино-ініціюючі клітини. Ці клітини проліферують у культурі клітин у недиференційованому стані, підтримують ріст пухлин мишей NOD/SCID після ксенотрансплантації та викликають утворення пухлин, що фенотипово не відрізняються від первинних пухлин людини. Саме СПК розглядаються нині як причина стійкості пухлин до радіо- та хіміотерапії, виникнення рецидивів і метастазів [5]. Ці клітини також відрізняються від пухлинних клітин здатністю до саморегуляції протягом тривалого часу, можливістю диференціювання в прогеніторні, але не пухлинні клітини. Отже, наразі існує необхідність пошуку нових методів лікування, спрямованих на дестабілізацію СПК через вплив на мембранні маркери та сигнальні молекули, переривання внутрішньоклітинних сигнальних шляхів та зміну складу і функцій мікрооточення.

Відносно невелика кількість стовбурових клітин у пухлині створює проблему пошуку специфічних маркерів. Активне використання магнітних сепараторів і клітинних сортерів сприяло виявленню специфічних маркерів, характерних для СПК, таких як CD44, CD133, Oct4, Sox2, Nanog, ALDH-1, ABCG і CXCL12, bmi-1 [6], для ізоляції та виділення цих клітин. Паралельно з'явився метод культивування багатоклітинних пухлинних сфероїдів (БПС) *in vitro*. Деякими авторами пропонується використовувати такі

якості СПК, як незалежність від субстрату, стійкість до умов мікрооточення та морфометричні показники для селективного відбору цих клітин [7]. Сфероїдну культуру клітин використовують як метод збагачення стовбуровими клітинами, що заснований на їх властивостях рости без прикріплення до субстрату. Дослідники заявляють про використання культури багатоклітинних сфероїдів для виділення, збагачення, підтримки або розширення потенційних субпопуляцій СПК за різних видів раку [8]. Клітини, що утворюють сфероїди, мають стовбурові властивості та експресують маркери СПК [9]. Здатність до утворення неадгезивних сфероїдів продемонстрована для СПК різного походження і є важливою властивістю останніх [10]. Джерела і типи ракових клітин для утворення пухлинних сфероїдів можуть бути різними, проте загальні процедури збагачення їх СПК *in vitro* ідентичні й засновані на унікальній здатності СК виживати та рости у формі сферичних структур в умовах обмеженого надходження поживних речовин [11]. Суспензійне культивування у безсироваткових умовах із додаванням ростових факторів, необхідних для виживання і поділу стовбурових клітин, створює своєрідний добір клітин. Тобто пухлинні клітини не отримують у достатній кількості поживні речовини, і частина з них гине, а стовбуровоподібні клітини переживають несприятливі умови, розмножуються асиметричним поділом, і їх розвиток підтримується ростовими факторами. Іншим механізмом збагачення сфероїдів СПК, можливо, є здатність зрілих пухлинних клітин дедиференціюватися в СПК за умов обмеження в поживних речовинах та кисні. Механізми дедиференціювання досі залишаються не вивченими.

Сфероїди, отримані з пухлин (плаваючі сфери), відіграють роль сурогатних систем для оцінки характеристик СПК *in vitro*. Головна особливість таких сфероїдів – це збагачення пухлинної популяції клітинами, що мають характеристики СК [12]. Сфероїдні культури корисні для моделювання тканинної архітектури, дослідження особливостей сигнальних шляхів і мікрооточення, інвазії та імунної відповіді клітин при розвитку раку, а також для вивчення властивостей СПК. Сьогодні ці культури мають важливе прикладне значення, оскільки можуть слугувати як новий інструмент для раннього тестування ліків і потенційної терапії для лікування захворювань [13]. Використання 3D-культур,

збагачених СПК (зБПС), дає можливість підвищити передбачуваність ефективності та токсичності препаратів щодо пухлинної популяції ще до клінічних випробувань.

Відомо, що мікрооточення клітин у зоні запального процесу є невід'ємною складовою ніші СПК. Ці клітини мають тісний зв'язок із мікрооточенням пухлини, відіграють ключову роль у прогресії пухлини і метастазів [14]. Запальні реакції відіграють важливу роль на всіх стадіях розвитку пухлини, таких як ініціація раку, набуття злоякісних фенотипів, внутрішньосудинне розповсюдження і метастазування. Ці дані послужили підставою широкого використання в онкології терапевтичних агентів, які можуть впливати на відновлення функції імунної системи. До найбільш важливих регуляторів імунної системи людини належать інтерферони (ІФН). Вони відносяться до групи важливих з біологічної точки зору молекул – цитокінів, які здатні чинити пряму та опосередковану дію на пухлинні клітини. Так, інтерферони мають антипроліферативні, противірусні та імуномодулювальні властивості. Інтерферони I типу (ІФН α , ІФН β , ІФН ω) також беруть участь у процесах диференціювання клітин і протипухлинного захисту і, крім того, здатні підвищувати чутливість пухлинних клітин до хіміо- та променевої терапії [15]. Антипроліферативна активність здійснюється через активацію JAK STAT сигнальних шляхів, яка перешкоджає шляху MAPK, що контролює різноманітні процеси в клітині, такі як проліферація, диференціювання, виживаність і апоптоз. Під час проведення монотерапії або комбінованої терапії з іншими протипухлинними ліками як антипроліферативний агент використовується IFN α -2b [16]. Деякі дослідження продемонстрували тісний зв'язок СПК й інтерферонів під час проліферації та прогресії пухлини [17, 18]. Тому важливо оцінити чутливість популяції СПК до дії інтерферону в зБПС як моделі первинної пухлини, збагаченої цими клітинами.

Отже, метою дослідження було проаналізувати чутливість популяції клітин лінії MCF-7 до дії ІФН α -2b на моделі зБПС.

Матеріали і методи

Культивування моношарової (2D) культури клітин. Клітинна лінія MCF-7 (аденокарцинома молочної залози) була люб'язно надана банком клітинних ліній людини і тварин Інституту

експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Клітини цієї лінії культивували за стандартних умов (37 °C, 5 % CO₂, вологість 95 %) на стерильних культуральних флаконах для росту культур площею 25 см² з вентильованою кришкою (Nest, США) у повному живильному середовищі (ПЖС): DMEM (Sigma, США), з 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS, Sigma, США), 2 ммоль L-глутаміну (Sigma, USA), 40 мг/мл гентаміцину (Biopharma, Україна). Початкова щільність культури клітин становила 2 × 10⁴ клітин/см². Клітини використовували в експерименті після двох днів інкубації.

Культивування сферoidної (3D, зБПС) культури клітин, збагаченої СПК. У роботі використовували метод культивування БПС, який дає змогу збагачувати їх СПК [19]. Для початкового генерування зБПС клітини моношарової культури в кількості 3 × 10⁶ клітин були видалені із субстрату, із використанням 0,25 % трипсин-ЕДТА, і перенесені в ПЖС без додавання фетальної бичачої сироватки, що містило додатково 2 % карбоксиметилцелюлози (Bio-Rad, США), фактор росту фібробластів (FGF, Sigma, США) та епідермальний фактор росту (EGF, Sigma, США) у концентрації 20 нг/мл, а також 5 мкг/мл інсуліну (фармасулін, Фармак, Україна) і 1 мкг/мл гідрокортизону (гідрокортизон ацетат, Фармак, Україна). Потім клітини інкубували на орбітальному шейкері PSU-10i (Biosan, Латвія) за 80 об/хв протягом 3–5 год лише в перший день культивування, після чого клітини росли в інкубаторі без перемішування. Половину культурального середовища змінювали кожні 3 дні. За таких умов сферoidну культуру підтримували протягом 7 днів.

Дослідження чутливості популяції зБПС до дії ІФН α -2b. З метою дослідження дії ІФН α -2b на популяції клітин у зБПС до планшетів (24 лунки, вкриті 1 %-ним агаром, Sarstedt, США) з культурами клітин додавали ІФН α -2b у концентрації 10² і 10⁴ МО/мл та інкубували протягом 48 год. Як джерело інтерферону використовували лікарський препарат Лаферобіон (Біофарма): ліофілізат у вигляді порошку 3 млн МО, допоміжні речовини: хлорид натрію, декстрин-70, калій дигідрофосфат, динатрію фосфат додекагідрат. Сухий порошок розводили водою для ін'єкцій та отримували стоковий розчин 3 × 10⁶ МО в 1 мл. Перераховували концентрацію ІФН α -2b на 1 мл культурального середовища і додавали до культуральних планшетів із клітинами (в 1 мг ІФН α -2b – 2 × 10⁸ МО).

Підрахунок кількості клітин проводили за допомогою рутинного методу з використанням трипанового синього та гемоцитометра. У клітинну суспензію додавали розчин 0,1 %-ного трипанового синього у співвідношенні 1:1. Цей барвник забарвлює тільки мертві клітини. Кількість живих і мертвих клітин підраховували у клітинних агрегатах та суспензії клітин, які не формували сфероїдів.

Морфометричне дослідження пухлинних сфероїдів. Для аналізу впливу ІФН α -2b на розміри зБПС у 3D-культури оцінювали фотографуванням та вимірюванням розмірів агрегатів після 7 днів культивування. Програмне забезпечення Stemi2000 (Zeiss, Німеччина) використовували для обробки зображень, а об'єм агрегатів був розрахований за формулою Б'єрквіга:

$$V = 0,4 \times a \times b^2,$$

де a – більший діаметр, b – менший діаметр, 0,4 – коефіцієнт, визначений спеціально для сфероїдів [20].

Дослідження рецепторного профілю клітин MCF-7. Для оцінки експресії маркерів (CD24, CD44, CD133, bmi-1), характерних для СПК, зБПС заливали у гістологічні блоки і проводили стандартну процедуру виготовлення постійних препаратів. Далі проводилося імуногістохімічне забарвлення за протоколом, рекомендованим для пероксидазної системи детекції PolyVue (HRP/DAB Detection System, Diagnostic BioSystems, США). Експресію рецепторів аналізували після двох днів інкубації з використанням первинних моноклональних антитіл CD24 (Sigma, США), CD44 (Sigma, США), CD133 (Sigma, США), bmi-1 (Sigma, США). Зрізи товщиною 6 мкм дозбарвлювали гематоксиліном і заключали в канадський бальзам. Гістологічні зразки клітин фотографували для дослідження експресії рецепторів у сфероїдній культурі клітин (Мікроскоп Carl Zeiss Fluoval, Stem-2000C, Німеччина, камера Canon IXUS 210). У препаратах досліджуваних культур визначали кількість імунопозитивних (забарвлених клітин) у 10 довільно вибраних полях зору мікроскопа для кожного зразка з використанням виміральної шкали і за однакового збільшення. Підраховували не менше 200 клітин. Визначали відсоток імунопозитивних клітин, покладаючи загальну кількість клітин за 100 %.

Статистичні методи. Для статистичної обробки даних застосовували однофакторний

аналіз дисперсії та t -Student тестування з програмним пакетом Statistica 8. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$. Для кожного отриманого результату визначали показники середнього арифметичного (M) і стандартної похибки середнього арифметичного (m).

Результати

Виявлення експресії маркерів СПК у культурі зБПС. Створення сприятливих умов для росту клітин із характеристиками СПК дає змогу аналізувати ці клітини в тісному зв'язку з пухлинними клітинами. Так, існує метод збагачення БПС стовбуровоподібними клітинами за допомогою культивування їх у безсироваткових умовах та додавання ростових факторів (фактора росту фібробластів, епідермального фактора росту). Такі умови сприяють росту стовбуровоподібних клітин та обмежують активний ріст пухлинних клітин. Після переведення клітин з адгезивними характеристиками в умови субстратнезалежного росту клітини багатоклітинних сфероїдів починають генерувати клітини, позитивні за маркерами CD133, CD44, CD24 та bmi-1 (рис. 1), причому відносний вміст клітин, які експресують CD24 (<10 %), менший порівняно з іншими маркерами в моношаровій культурі клітин, БПС та зБПС. Кількість імунопозитивних клітин CD133, CD44, CD24 та bmi-1 становила <10 % у 2D-культурі клітин, у БПС – >10 %, а в зБПС – >20 % (рис. 1). Найбільш виражена експресія маркерів СПК спостерігається у зовнішніх шарах сфероїда. Проте внутрішні шари сфероїда також містять СПК-позитивні клітини, що зі свого боку свідчить про існування популяції клітин, які можуть переживати несприятливі умови, оскільки всередині сфероїда клітини отримують меншу кількість поживних речовин та кисню. Відомо, що гіпоксичні умови сприяють росту СПК, вони можуть перебувати у дормантному стані за таких умов і здатні до самооновлення [21].

Так, на рис. 1а показана експресія маркера самооновлення bmi-1 як у зовнішніх, так і у внутрішніх шарах сфероїда. Виявлено, що експресія CD44 (рис. 1б) більш виражена порівняно з CD24 (рис. 1г). Водночас імунопозитивні клітини за маркером CD133 також виявляються у всіх шарах сфероїда як у БПС, так і в зБПС (рис. 1в). Ці дані свідчать на користь існування популяції стовбуровоподібних клітин у зБПС, адже наявність високого рівня експресії CD44 і

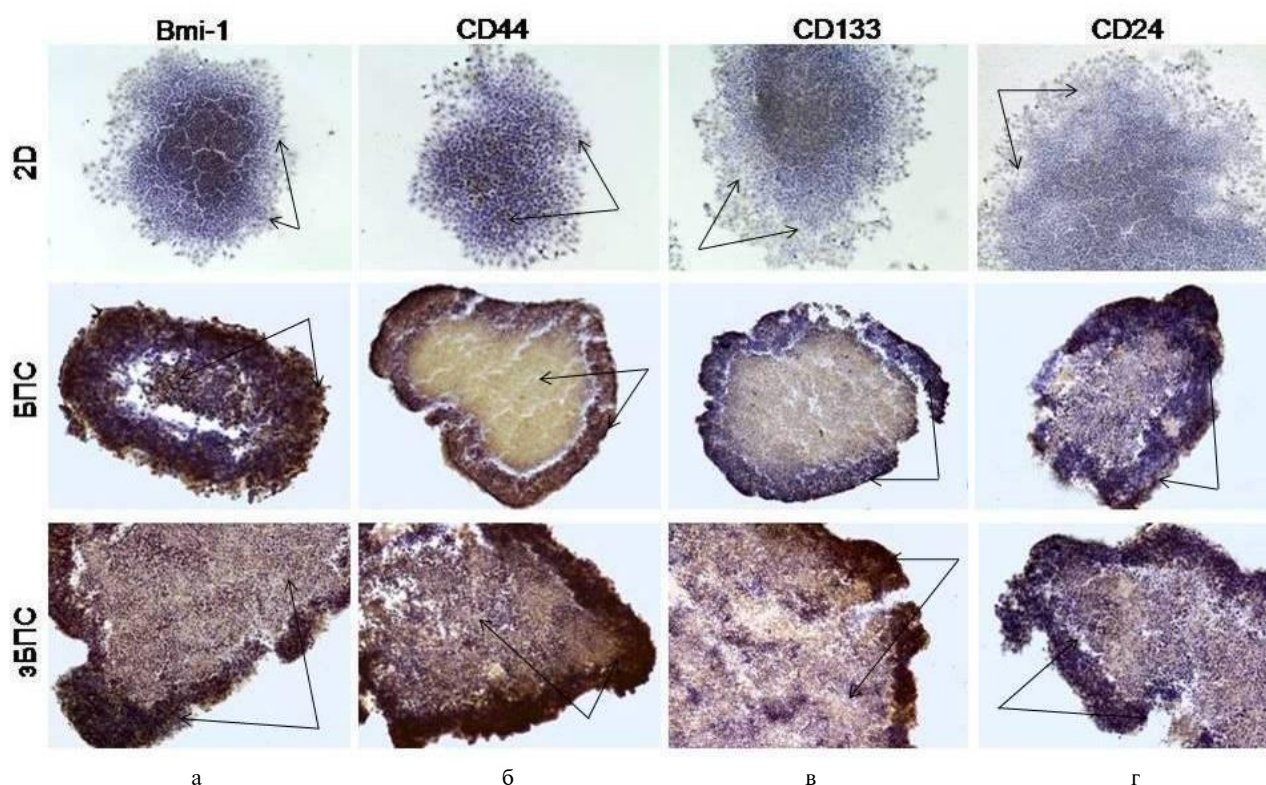


Рисунок 1: Експресія маркерів СПК (Bmi-1, CD44, CD133, CD24) клітинами лінії MCF-7 моношарової культури клітин, БПС та зБПС лінії MCF-7: (а) Bmi-1, (б) CD44, (в) CD133, (г) CD24; імуногістохімія: імунопозитивні клітини забарвлені в коричневий колір (система детекції PolyVueHRP/DAV Diagnostic BioSystems, США), моноклональні антитіла Bmi-1 (Sigma, США), CD44 (Sigma, США), CD133 (Sigma, США), CD24 (Sigma, США) гематоксилін, $\times 100$

одночасно низького рівня експресії CD24 характерна для СПК раку молочної залози [22]. Отже, виявлення експресії маркерів СПК у зБПС дає можливість використовувати цю модель у дослідженнях СПК і може бути використане для створення та тестування системної протипухлинної терапії, спрямованої на ці клітини.

Дослідження впливу ІФН α -2b на культуру зБПС. Сфероїдотвірна здатність пухлинних клітин корелює з фенотипом СПК, тому за допомогою визначення об'єму і кількості клітин у клітинних агрегатах можна визначити пухлинотвірну активність ракових клітин, які походять від визначеної кількості висіяних клітин [23].

У роботі було досліджено вплив ІФН α -2b на зБПС. Для цього проводили вимірювання об'ємів клітинних агрегатів (метод морфометрії), а також підрахунок кількості живих і мертвих клітин в усій суспензійній фракції. Так, на рис. 2 показано вплив ІФН α -2b на формування БПС у середовищі, сприятливому для росту СПК. На мікрофотографіях показана дозозалежна дезагрегація пухлинних агрегатів, при цьому контакти між клітинами руйнуються і

утворюється велика кількість дрібних сфероїдів та окремих клітин. Виявилось, що на 2-гу добу культивування середній об'єм зБПС зменшується на 16 та 25 % при інкубуванні з ІФН α -2b за концентрацій 10^2 і 10^4 МО/мл відповідно порівняно з контрольними зразками (рис. 3). У той же час кількість живих клітин знизилась на 13 % за концентрації ІФН α -2b 10^4 МО/мл порівняно з контрольними зразками. За концентрації 10^2 МО/мл кількість живих клітин у суспензійній фракції статистично не відрізнялась від контролю, спостерігалось лише незначне збільшення кількості загиблих клітин – на 9 % – від початкового стану (рис. 4).

Отже, після 48 год культивування культура зБПС чутлива до дії ІФН α -2b лише за концентрації 10^4 МО/мл. Збільшення кількості мертвих клітин на 10 % за цієї ж концентрації ІФН α -2b відбулося, можливо, за рахунок цитотоксичної дії цього цитокіну саме на пухлинні клітини. Можна помітити, що сумарна кількість живих і мертвих клітин за концентрації 10^4 МО/мл виявляється меншою, ніж за концентрації 10^2 МО/мл та в контрольній групі. Таке явище

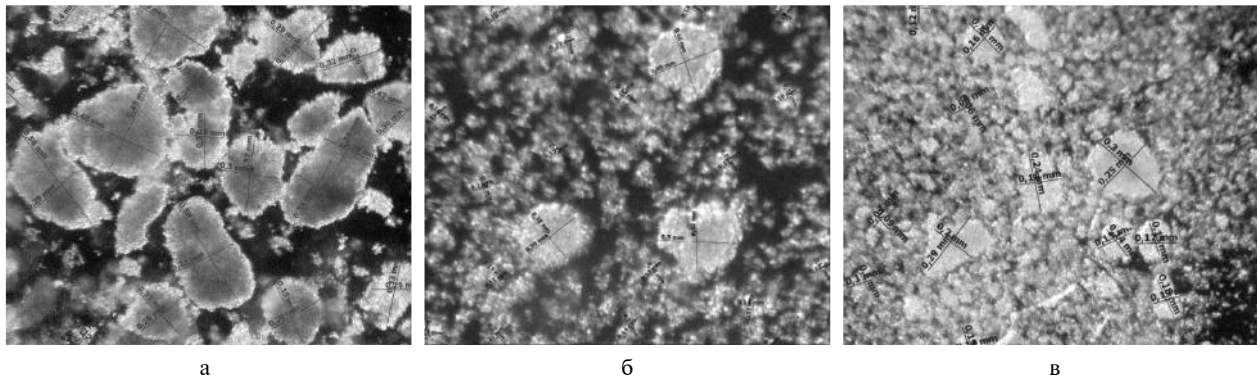
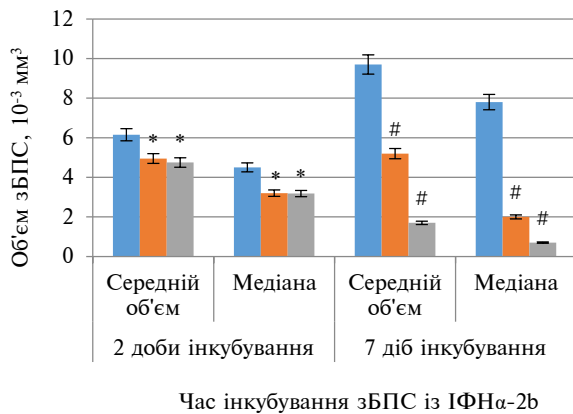


Рисунок 2: Мікрофотографія зБПС при дії ІФН α -2b: (а) контроль, (б) ІФН α -2b у концентрації 10^2 МО/мл, (в) ІФН α -2b у концентрації 10^4 МО/мл; 7 діб культивування, метод темного поля, $\times 16$



Час інкубування зБПС із ІФН α -2b

Рисунок 3: Середнє значення і медіана об'ємів зБПС лінії MCF-7 при дії ІФН α -2b за концентрацій 10^2 і 10^4 МО/мл на 2 і 7-му добу інкубування; * $p \leq 0,05$ – ІФН α -2b у концентрації 10^2 МО/мл порівняно із середнім об'ємом та медіаною об'ємів зБПС контрольної групи, # $p \leq 0,05$ – ІФН α -2b у концентрації 10^4 МО/мл порівняно із середнім об'ємом та медіаною об'ємів зБПС контрольної групи; ■ – контроль зБПС; ■ – ІФН α 10^2 МО; ■ – ІФН α 10^4 МО

може бути характерним для культури БПС, адже пухлинні сфероїди містять зону некротичних клітин [24], до яких не надходять поживні речовини і кисень. Як відомо, клітини, які йдуть шляхом некрозу, втрачають характерну структуру внутрішніх органел і можуть розпадатися на окремі частини [25]. Оскільки в роботі використовували рутинний метод підрахунку кількості клітин із використанням гемоцитометра, то враховувались лише цілісні мертві клітини, забарвлені барвником; пошкоджені фрагментовані клітини, які перейшли у клітинну суспензію при дезагрегації сфероїдів, не враховувалися. Подальше інкубування зБПС із ІФН α -2b призводить до зниження середнього значення і

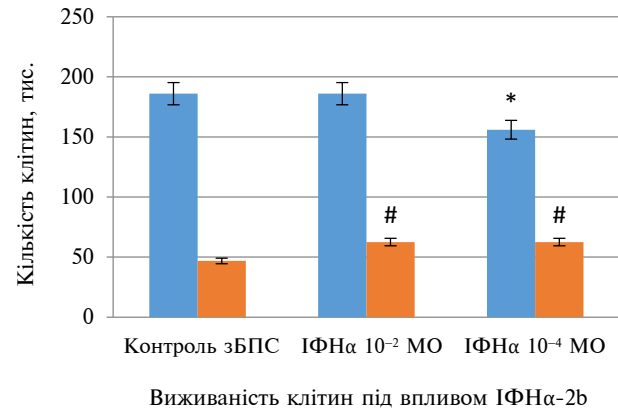


Рисунок 4: Кількість живих клітин і мертвих клітин у зБПС та суспензійній фракції клітин MCF-7 під впливом ІФН α -2b за концентрацій 10^2 і 10^4 МО/мл на 2-гу добу інкубування; * $p \leq 0,05$ – порівняно з кількістю живих клітин у контрольній групі, # $p \leq 0,05$ – порівняно з кількістю мертвих клітин у контрольній групі; ■ – живі клітини; ■ – мертві клітини

медіани об'ємів сфероїдів на 48 та 74 % за концентрації цитокіну 10^2 та 10^4 МО/мл відповідно порівняно з контрольними зразками (див. рис. 3). Такий ефект ІФН α -2b на зниження об'ємів клітинних агрегатів на 7-му добу інкубування можна пояснити його здатністю активувати сплячі стовбуровоподібні клітини, які збагачують пул пухлинних клітин [26]. Важливо змусити СПК переходити із режиму “сну” в режим “неспанья” і далі в активний стан. Саме тому виникає потреба в пошуку методів комплексної диференціальної терапії. Ідея полягає в тому, щоб змусити СПК перезавантажити клітинний цикл, тобто перевести їх в активний стан і одразу ж знищити протипухлинними агентами,

коли вони вже не “сплять”, проте ще “не захищені”. Наслідком активації СПК є асиметричний поділ і диференціація у власне пухлинні клітини та збільшення об'єму пухлини. Диференціація СПК у ракові клітини підтверджена для різних типів раку, в т.ч. раку підшлункової залози [27], простати [28], легень [29] і печінки [30]. СПК можуть диференціюватися в пухлинні клітини, і цей процес регулюється зовнішніми та внутрішніми факторами, зокрема запальним мікрооточенням [31]. Зважаючи на дані літератури щодо активації СПК інтерфероном- α [26], ми припускаємо, що ІФН α -2b проявляє подвійний вплив на популяцію зБПС, а саме виводить популяцію СПК зі стану спокою і одразу ж впливає на ці та пухлинні клітини в зБПС, тому об'єм клітинних агрегатів не збільшується за рахунок цитотоксичної дії цитокіну. Отже, ІФН α -2b можна розглядати як допоміжний агент для розробки і тестування комплексної протипухлинної терапії, що спрямована на активацію СПК з одночасним впливом хіміотерапії на моделі багатоклітинних пухлинних сфероїдів лінії MCF-7, збагачених цими клітинами *in vitro*.

Обговорення

Під час виявлення маркерів СПК основною проблемою є їх неспецифічність, тобто в різних пухлинах СПК експресують різні маркери та їх комбінації. У тканині *in vivo* ці маркери можна виявити не лише на СПК, а й на резидентних СК або клітинах-попередниках, на елементах строми пухлини або пухлинних клітинах, що не мають властивостей стовбурових. Тому лише частина клітин, відібраних за цим маркером, може бути віднесена до СПК [32]. Проте існує загально визнана комбінація маркерів СПК, характерних для клітин раку молочної залози (CD133, CD44, CD24, ALDH і т.д.). Методи магнітної сепарації та сортування клітин показали, що популяція клітин PM3 з високою CD44 і низькою CD24 має властивості, які характерні для СПК. Тому саме комбінацію цих маркерів використовують для виявлення популяції СПК у пухлинах молочної залози [33]. CD44 являє собою трансмембранний глікопротеїн, який відіграє важливу роль у поділі, міграції, адгезії та передачі сигналів [34]. Він також експресується як в ембріональних, так і в дорослих гематопоетичних СК. Висока експресія CD44 характерна для багатьох типів раку, зокрема для PM3 [35]. Іншим важливим маркером

СПК є CD133, який є трансмембранним глікопротеїном і експресується гематопоетичними СК, ендотеліальними клітинами-попередниками [36], клітинами гліобластоми, нейронними і гліальними СК [37], а також бере участь у рості та розвитку пухлинних клітин [38]. Пухлинні клітини з фенотипом CD133+ виявляють специфічні для СК характеристики, такі як самооновлення, диференціювання і утворення пухлин на моделях мишей NOD-SCID. Після ін'єкції CD133+ клітин імунодефіцитним мишам пухлини цих тварин проявляють хіміо- та радіорезистентність [39]. Існують також білки, пов'язані із самооновленням СПК. Так, bmi-1 – білок, необхідний для самооновлення кровотвірних і нервових СК [40]. Індукована експресія bmi-1 лікарськими препаратами збільшує популяцію СПК на моделях раку голови та шиї [41] і є маркером СПК [42] та несприятливого прогнозу PM3 [43]. bmi-1 відіграє важливу роль у проліферації, інвазії та метастазуванні ракових клітин і резистентності до дії протиракової терапії, а також у підтримці властивостей СПК [44]. У нашому дослідженні було виявлено популяції клітин, що експресують рецептори СПК (CD133, CD24, CD44, bmi-1) у багатоклітинних пухлинних сфероїдах, культивованих за відсутності сироватки та при додаванні ростових факторів.

Оскільки модель зБПС походить із монокультури пухлинних клітин лінії MCF-7, то можна вважати, що виявлені маркери вказують саме на стовбуровоподібні клітини, адже в ній відсутні клітини строми, які могли б також експресувати рецептори СПК. Культивування сфероїдів в умовах відсутності сироватки створює несприятливі умови для росту і проліферації пухлинних клітин, проте СПК за таких умов перебувають у дормантному стані. Додавання факторів росту, таких як фактор росту фібробластів і епідермальний фактор росту, підтримує ріст і асиметричний поділ цих клітин. Було також показано, що гіпоксичні ніші, які формуються під час 3D-культивування, можуть сприяти самооновленню вже існуючих СПК або дедиференціюванню зрілих пухлинних клітин [45]. Однак ці дані потребують подальших досліджень.

Як відомо, ІФН α -2b відіграє важливу роль не лише в протівірусній імунній відповіді, але й у природному і терапевтично індукованому імунологічному контролі, не пов'язаному з вірусними злоякісними новоутворень [46]. Цей цитокін проявляє пряму цитотоксичну дію на пухлинні

клітини в культурі клітин у доклінічних дослідженнях [47]. Застосування ІФН-терапії при солідних новоутвореннях, таких як меланома, карцинома нирок, саркома Капоши, рак молочної залози, дало позитивний результат [48]. ІФН α -2b має плейотропну дію: не лише стимулює протипухлинну імунну відповідь, але і напряду впливає на проліферацію та виживаність пухлинних клітин. Проте, як виявилось, це ще не всі позитивні ефекти, якими характеризується цей цитокін. У праці [26] показана також здатність ІФН α -2b посилювати експресію маркерів СПК. Автори виявили, що ІФН α -2b може збагачувати СПК пухлину, в той же час вбиваючи основну частину пухлинних клітин. Іншою групою вчених було показано, що в гематопоетичних клітинах гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор, триоксид миш'яку та ІФН α -2b ефективно активують "сплячі" стовбурові клітини і тим самим можуть послаблювати резистентність до протипухлинної терапії [49].

У нашій роботі також було показано, що ІФН α -2b знижує ріст пухлинної популяції, до якої входять як власне пухлинні клітини, так і

СПК. Ця здатність ІФН α -2b може посилювати вплив цільової протипухлинної терапії, спрямованої на СПК.

Висновки

ІФН α -2b дозозалежно сприяє розпаду зБПС та формуванню великої кількості дрібних клітинних агрегатів і поодиноких клітин лінії МСF-7. Цитотоксична дія ІФН α -2b виявляється після 48 год культивування за концентрації 10^4 МО/мл. Подальше інкубування зБПС із ІФН α -2b приводить до зниження середнього значення і медіани об'ємів сфероїдів на 48 та 74 % за концентрації цитокіну 10^2 та 10^4 МО/мл відповідно після 7-ми діб культивування порівняно з контрольними зразками. ІФН α -2b можна розглядати як допоміжний агент для розробки і тестування комплексної протипухлинної терапії, спрямованої на знищення популяції стовбурових пухлинних клітин на моделі багатоклітинних пухлинних сфероїдів лінії МСF-7, збагачених цими клітинами *in vitro*.

References

- [1] Russnes HG, Navin N, Hicks J, Borresen-Dale AL. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3810-8. DOI: 10.1172/JCI57088
- [2] Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*. 2011;17:313-9. DOI: 10.1038/nm.2304
- [3] Liu S, Dontu G, Wisha M. Mammary stem cells, self-renewal pathways and carcinogenesis. *Breast Cancer Res*. 2005;7(3):86-95. DOI: 10.1186/bcr1021
- [4] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111-5. DOI: 10.1038/nature05384
- [5] Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 2017;108(3):283-9. DOI: 10.1111/cas.13155
- [6] Prud'homme GJ. Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. *Curr Pharm Des*. 2012;18(19):2838-49. DOI: 10.2174/138161212800626120
- [7] Cao L, Zhou Y, Zhai B, Liao J, Xu W, Zhang R, et al. Sphere-forming cell subpopulation with cancer stem cell properties in human hepatoma cell line. *Gastroenterology*. 2011;11:71. DOI: 10.1186/1471-230X-11-71
- [8] Yilmazer A. Evaluation of cancer stemness in breast cancer and glioblastoma spheroids in vitro. *3 Biotech*. 2018;8(9):390. DOI: 10.1007/s13205-018-1412-y
- [9] Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res*. 2008;68(11):4311-20. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0364
- [10] Tang C, Ang B, Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anticancer therapy. *FASEBJ*. 2007;21(14):3777-85. DOI: 10.1096/fj.07-8560rev
- [11] Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8(5):486-98. DOI: 10.1016/j.stem.2011.04.007
- [12] Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015;17(1):1-15. DOI: 10.1016/j.neo.2014.12.004
- [13] Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):240-8. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.10.003
- [14] Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:759-71. DOI: 10.1038/nrc3611

- [15] Morak MJ, van Koetsveld PM, Kanaar R, Hofland LJ, van Eijck CH. Type I interferons as radiosensitisers for pancreatic cancer. *Eur J Cancer*. 2011;47(13):1938-45. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.03.009
- [16] Ningrum RA. Interferon alpha 2b: a therapeutic protein for cancer treatment. *Scientifica*. 2014;1:1-8. DOI: 10.1155/2014/970315
- [17] Zhu Y, Karakhanova S, Huang X, Deng SP, Werner J, Bazhin AV. Influence of interferon α on the expression of the cancer stem cell markers in pancreatic carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2014;324(2):146-56. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.03.020
- [18] Yamashina T, Baghdadi M, Yoneda A, Kinoshita I, Suzu S, Dosakaakita H, et al. Cancer stem like cells derived from chemoresistant tumors have a unique capacity to prime tumorigenic myeloid cells. *Cancer Res*. 2014;74(10):2698-709. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2169
- [19] Portillo-Lara R, Alvarez MM. Enrichment of the cancer stem phenotype in sphere cultures of prostate cancer cell lines occurs through activation of developmental pathways mediated by the transcriptional regulator $\Delta Np63\alpha$. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0130118. DOI: 10.1371/journal.pone.0130118
- [20] Bjerkvig R. Spheroid culture in cancer research. Boca Raton: CRC Press; 1992. 335 p.
- [21] Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pahlman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells – a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(4-5):554-63. DOI: 10.1016/j.semcdb.2005.03.007
- [22] Wang Z, Wang Q, Wang Q, Wang Y, Chen J. Prognostic significance of CD24 and CD44 in breast cancer: a meta-analysis. *Int J Biol Markers*. 2017;32(1):75-82. DOI: 10.5301/jbm.5000224
- [23] Wu J, Mu Q, Thiviyanathan V, Annapragada A, Vigneswaran N. Cancer stem cells are enriched in Fanconi anemia head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Oncol*. 2014;45(6):2365-72. DOI: 10.3892/ijo.2014.2677
- [24] Kemlin LC, Casagrande G, Virador VM. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol Carcinog*. 2013;52(3):167-82. DOI: 10.1002/mc.21844
- [25] Chen SC, Soares HD, Morgan JI. Novel molecular correlates of neuronal death and regeneration. *Adv Neurol*. 1996;71:433-49.
- [26] Ma H, Jin S, Yang W, Tian Z, Liu S, Wang Y, et al. Interferon- α promotes the expression of cancer stem cell markers in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer*. 2017;8(12):2384-93. DOI: 10.7150/jca.19486
- [27] Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007;67(3):1030-7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2030
- [28] Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):10946-51. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2018
- [29] Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 2008;15:504-14. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402283
- [30] Lee TK, Castilho A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO. CD24+ liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):50-63. DOI: 10.1016/j.stem.2011.06.005
- [31] Huang Z, Wu T, Liu AY, Ouyang G. Differentiation and transdifferentiation potentials of cancer stem cells. *Oncotarget*. 2015;6:39550-63. DOI: 10.18632/oncotarget.6098
- [32] Sneddon JB, Werb Z. Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):607-11. DOI: 10.1016/j.stem.2007.11.009
- [33] Idowu MO, Kmieciak M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, et al. CD44+/CD24-/low cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Hum Pathol*. 2012;43(3):364-73. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.05.005
- [34] Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J*. 2015;36(3):273-9. DOI: 10.15537/smj.2015.3.9622
- [35] Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, Pai R, Weissman IL, Prince ME, et al. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck*. 2012;34(1):42-9. DOI: 10.1002/hed.21699
- [36] Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhning HJ, Niethammer D, et al. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996(1):141-51. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03242.x
- [37] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821-8.
- [38] Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol*. 2013;2(1):17-8. DOI: 10.1186/2162-3619-2-17
- [39] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401. DOI: 10.1038/nature03128
- [40] Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*. 2003;425(6961):962-7. DOI: 10.1038/nature02060
- [41] Nör C, Zhang Z, Warner KA, Bernardi L, Visioli F, Helman JI, et al. Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer. *Neoplasia*. 2014;16(2):137-46. DOI: 10.1593/neo.131744

- [42] Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.* 2006;66(12):6063-71. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0054
- [43] Wang Y, Zhe H, Ding Z, Gao P, Zhang N, Li G. Cancer stem cell marker Bmi-1 expression is associated with basal-like phenotype and poor survival in breast cancer. *World J Surg.* 2012;36(5):1189-94. DOI: 10.1007/s00268-012-1514-3
- [44] Wang MC, Li CL, Cui J, Jiao M, Wu T, Jing LI, et al. BMI-1, a promising therapeutic target for human cancer. *Oncology Letters.* 2015;10(2):583-8. DOI: 10.3892/ol.2015.3361
- [45] Keith B, Simon MC. Hypoxia Inducible Factors, stem cells and cancer. *Cell.* 2007;129(3):465-72. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.019
- [46] Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:405-14. DOI: 10.1038/nri3845
- [47] Iacopino F, Ferrandina G, Scambia G, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Sica G. Interferons inhibit EGF-stimulated cell growth and reduce EGF binding in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 1996;16:1919-24.
- [48] Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16:131-44. DOI: 10.1038/nrc.2016.14
- [49] Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:201-9. DOI: 10.1038/nri2726

Т.С. Гергелюк, Е.М. Перепелицина, Л.И. Остапченко, М.В. Сидоренко

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2b НА МНОГОКЛЕТОЧНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ СФЕРОИДЫ ЛИНИИ MCF-7, ОБОГАЩЕННЫЕ СТВОЛОВЫМИ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

Проблематика. Основная проблема лечения раковых заболеваний заключается в том, что прогноз течения заболевания зависит от субпопуляционного состава первичной опухоли и способности опухоли восстанавливаться и образовывать метастазы. Согласно последним исследованиям, агентами, которые обеспечивают самовосстановление опухоли после облучения и химиотерапии, являются стволовые опухолевые клетки (СОК). Одним из способов выделения этих клеток является формирование многоклеточных опухолевых сфероидов. Метод обогащения таких сфероидов СОК может быть использован для тестирования комплексной противоопухолевой терапии, направленной на популяцию СОК *in vitro*. Некоторые исследования показали тесную связь СОК и интерферонов при пролиферации и прогрессии опухоли. Поэтому важно оценить чувствительность популяции СОК к действию интерферона на модели многоклеточных опухолевых сфероидов.

Цель. Исследовать чувствительность популяций клеток линии MCF-7 к действию IFN α -2b на модели многоклеточных опухолевых сфероидов, обогащенных СОК.

Методика реализации. Для обогащения многоклеточных сфероидов стволовыми опухолевыми клетками адгезивные клетки монослойной культуры линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) трипсинизировали и культивировали на орбитальном шейкере в бессывороточных условиях с добавлением ростовых факторов (фактора роста фибробластов, эпидермального фактора роста, инсулина и гидрокортизона) и 2 % карбоксиметилцеллюлозы. С целью исследования прямого действия IFN α -2b (фактора микроокружения опухоли) на популяцию клеток к планшетам с клеточными агрегатами добавляли IFN α -2b в концентрации 10^2 и 10^4 МО/мл и инкубировали в течение 48 ч. Подсчет количества клеток проводили с помощью рутинного метода с использованием трипанового синего и гемоцитометра. Морфометрический анализ проводили путем измерения объемов сфероидов, используя программное обеспечение Stemi2000 (Zeiss, Германия) и формулу Бьерквига. Экспрессию рецепторов анализировали после двух дней инкубации с использованием первичных моноклональных антител CD24 (Sigma, США), CD44 (Sigma, США), CD133 (Sigma, США), bmi-1 (Sigma, США). Для статистической обработки данных использовали однофакторный анализ дисперсии и *t*-Student тестирование с программным пакетом Statistica 8. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Для каждого полученного результата определяли показатели среднего арифметического (M) и стандартного отклонения среднего арифметического (m).

Результаты. С помощью метода иммуногистохимии было показано наличие клеток, экспрессирующих рецепторы, характерные для СОК молочной железы (CD24, CD44, CD133, bmi-1) в культуре многоклеточных опухолевых сфероидов, которые культивировали в бессывороточных условиях с добавлением ростовых факторов. Поскольку клетки получены из монокультуры опухолевых клеток, то можно предположить, что именно СОК выявляются по соответствующим маркерам, а не клетки стромы, для которых также возможна экспрессия данных рецепторов. Получены данные о влиянии IFN α -2b на гетерогенную популяцию опухолевых и стволовоподобных клеток. Оказалось, что этот цитокин влияет на снижение среднего объема клеточных агрегатов на 16 и 25 % при концентрации 10^2 и 10^4 МО/мл соответственно, а также подавляет пролиферацию клеток на 13 % при концентрации IFN α -2b 10^4 МО/мл по сравнению с контрольными образцами. Дальнейшее инкубирование сфероидов с IFN α -2b приводит к снижению среднего значения и медианы объемов сфероидов на 48 и 74 % при концентрации цитокина 10^2 и 10^4 МО/мл соответственно по сравнению с контрольными образцами. IFN α -2b дозозависимо способствует распаду многоклеточных опухолевых сфероидов, обогащенных СОК, и формированию большого количества мелких клеточных агрегатов и отдельных клеток линии MCF-7.

Выводы. IFN α -2b можно рассматривать как вспомогательный агент для разработки и тестирования комплексной противоопухолевой терапии, направленной на активацию СПК, с одновременным воздействием химиотерапии на модели многоклеточных опухолевых сфероидов линии MCF-7, обогащенных этими клетками *in vitro*.

Ключевые слова: многоклеточные опухолевые сфероиды; стволовые опухолевые клетки; интерферон альфа; MCF-7.

T.S. Herheliuk, O.M. Perepelytsina, L.I. Ostapchenko, M.V. Sydorenko

EFFECT OF INTERFERON α -2b ON MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS OF MCF-7 CELL LINE ENRICHED WITH CANCER STEM CELLS

Background. The main problem of cancer treatment is that the disease prediction depends on subpopulations of the primary tumor and the ability of the tumor to recover and form metastases. Cancer stem cells (CSCs) provide self-renewal of the tumor after irradiation and chemotherapy. One way to isolate these cells is to form multicellular tumor spheroids. The method of enrichment of such spheroids by CSCs can be used to test complex antitumor therapy aimed at the CSCs population *in vitro*. Some studies have shown a close relationship between CSCs and interferon in tumor proliferation and progression. Therefore, it is important to assess the sensitivity of the CSCs population to the action of interferon on a model of multicellular tumor spheroids.

Objective. The aim of the article is to study the sensitivity of MCF-7 cell populations to the effect of IFN α -2b on a model of multicellular tumor spheroids enriched with CSCs.

Methods. To enrich multicellular spheroids with CSCs, adherent cells of monolayer culture MCF-7 (human breast adenocarcinoma) were trypsinized and cultured on an orbital shaker under serum-free conditions with the addition of growth factors (fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and hydrocortisone). In order to study the direct effect of IFN α -2b on cell populations, this cytokine was added to plates with cell aggregates at a concentration of 10^2 U/mL and 10^4 U/mL and incubated for 48 h. Counting the number of cells was performed using the routine method with a trypan blue and hemocytometer. Morphometric analysis was performed by measuring the volumes of spheroids using the software Stemi2000 (Zeiss, Germany) and the Bjerkvig formula. Receptor expression was analyzed after two days of incubation using primary monoclonal antibodies CD24 (Sigma, USA), CD44 (Sigma, USA), CD133 (Sigma, USA), bmi-1 (Sigma, USA). For statistical data processing, one-factor analysis of the variance and *t*-Student testing with the Statistica 8 software package were used. The differences were considered significant at $p < 0.05$. For each result obtained, we determined the indices of the arithmetic mean (M) and the standard deviation of the arithmetic mean (m).

Results. The presence of CSCs expressing the receptors characteristic of mammary gland (CD24, CD44, CD133, bmi-1) in the culture of multicellular tumor spheroids, which were cultured under serum-free conditions with the addition of growth factors, was shown using immunohistochemistry method. Since cells are obtained from monoculture of tumor cells, it can be assumed that CSCs are detected by appropriate markers, but not stromal cells, for which expression of these receptors is also possible. The data on the effect of IFN α -2b on the heterogeneous population of tumor and stem-like cells were obtained. It turned out that this cytokine effects the reduction of the average volume of cell aggregates by 16% and 25% at a concentration of 10^2 and 10^4 U/mL, respectively. It also suppresses cell proliferation by 13% at a concentration of IFN α -2b 10^4 U/mL, compared with control samples. Further incubation of spheroids with IFN α -2b leads to a decrease in the average and median volumes of spheroids by 48% and 74% at a cytokine concentration of 10^4 U/mL and 10^4 U/mL, respectively, compared to control samples. IFN α -2b dose-dependently contributes to the disintegration of multicellular tumor spheroids enriched with CSCs and to the formation of a large number of small cell aggregates and individual cells of the MCF-7 cell line.

Conclusions. IFN α -2b can be considered as an auxiliary agent for the development and testing of complex antitumor therapy aimed at activating CSCs with simultaneous effects of chemotherapy on models of multicellular tumor spheroids of the MCF-7 line, enriched with this cells *in vitro*.

Keywords: multicellular tumor spheroids; cancer stem cells; interferon alpha; MCF-7.