БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 11, с. 1759 – 1768

УДК 576.385.5

ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ЭКСПРЕССИЮ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА И РЕТИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

© 2019 О. Исаев[1], Ю. Джу[2], Е. Гасимов[1], Дж. Вернер[3], А.В. Бажин[3]*,**

[1] *Department of Histology, Embryology and Cytology, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan; E-Mail: isayev.orkhan@yahoo.com, geldar1949@gmail.com*

[2] *International Joint Laboratory for Cell Medical Engineering of Henan Province, Department of Oncology, Henan University Huaihe Hospital, Kaifeng, Henan 475000, People's Republic of China; E-mail: celltransplant@163.com*

[3] *Department of General, Visceral, and Transplantation Surgery, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich 81377, Germany; E-mail: alexandr.bazhin@med.uni-muenchen.de*

Поступила в редакцию 14.05.2019
После доработки 14.05.2019
Принята к публикации 14.05.2019

Есть много данных, свидетельствующих о том, что опухолевые стволовые клетки (CSC – cancer stem cells), процесс эпителиально-мезенхимального перехода (EMT – epithelial-mesenchymal transition), а также экспрессия и функционирование ретиноидных рецепторов являются ключевыми признаками возникновения опухоли, ее прогрессирования и развития устойчивости к действию химиотерапевтических агентов. Это положение также верно для аденокарциномы протоков поджелудочной железы (PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma), которая является клинической проблемой в связи с ухудшающейся ситуацией с распространенностью этого заболевания. Поэтому понимание вышеупомянутых особенностей может открыть новые возможности для разработки будущих стратегий лечения PDAC. Главной целью настоящей работы было изучение взаимосвязей между опухолевыми стволовыми клетками, эпителиально-мезенхимальным переходом и ретиноидными рецепторами в клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы после их обработки химиотерапевтическими препаратами: гемцитабином и 5-фторурацилом. Нами были выявлены различия в уровне экспрессии маркеров CSC и EMT, а также ретиноидных рецепторов в нативных клетках линий MiaPaca и Panc1 аденокарциномы протоков поджелудочной железы. Кроме того, было показано, что эти линии клеток также различаются по степени развития спонтанного апоптоза и их распределению по различным фазам клеточного цикла. Также нами было показано, что химиотерапия вызывает снижение количества опухолевых клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. Более того, было обнаружено, что гемцитабин и 5-фторурацил модулируют экспрессию маркеров CSC, а именно e-кадгерина и RXRβ в клетках Panc1, но не в клетках линии MiaPaca. Мы предположили, что эти эффекты можно объяснить различием в базальном уровне экспрессии исследуемых генов. Полученные результаты могут представлять интерес в плане проведения дальнейших доклинических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аденокарцинома протоков поджелудочной железы, опухолевые стволовые клетки, эпителиально-мезенхимальный переход, ретиноидные рецепторы.

DOI: 10.1134/S0320972519110162

Аденокарцинома желчных протоков поджелудочной железы (PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma) является одной из наиболее опасных форм рака во всем мире. Она характеризуется высокой смертностью и общей 5-летней выживаемостью <5% [1]. Из-за отсутствия ранних клинических симптомов, а также наличия метастазов на момент постановки диагноза, только ~20% больных могли быть подвергнуты хирургическому лечению [2]. Частично такая ситуация обусловлена недостаточным пониманием патофизиологии этого заболевания. В случае невозможности оперировать больных PDAC, их лечат химиотерапевтическими средствами, в том числе гемцитабином (gemcitabine или gem) и/или 5-фторурацилом (5-FU – 5-fluorouracil), а также смесью этих веществ [1]. Аналог пиримидина – gem в настоящее время является стандартным химиотерапевтическим средством, которое применяется для лечения больных с метастазами или неоперабельными опухо-

Принятые сокращения: CSC – опухолевые стволовые клетки, EMT – эпителиально-мезенхимальный переход, PDAC – аденокарцинома протоков поджелудочной железы, gem – гемцитабин, 5-FU – 5-фторурацил, RAR – рецепторы ретиноевой кислоты, RXR – рецепторы ретиноида X.

* Адресат для корреспонденции.

** Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

лями поджелудочной железы. Его применяют как в отдельности, так и в сочетании с другими лекарствами. 5-FU принадлежит к группе фторпиримидинов. Его также используют при паллиативной терапии PDAC в отдельности [3] или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами, например, в рамках лечения в режиме ФОЛФЕРИНОКС (FOLFIRINOX) [4]. Однако результаты лечения больных с использованием этих препаратов весьма скромны. Ранее нами были продемонстрированы иммуномодулирующие свойства химиотерапевтических препаратов, которые могли бы быть использованы для разработки новых иммунотерапевтических подходов [5–7].

Все больше данных говорит в пользу того, что опухолевые стволовые клетки (CSC – cancer stem cells) участвуют в возникновении опухолей, способствуют их развитию и ответственны за возникновение метастазов [8]. В целом, основными поверхностными маркерами CSC для солидных опухолей являются CD24, CD44 и CD133 [9]. *In vitro*, в клеточных линиях PDAC, все эти маркеры были установлены для того, чтобы обнаружить PDAC CSC в культуре клеток [10]. Эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) важен для развития многих органов, в том числе поджелудочной железы. EMT является стержневым механизмом метастазирования PDAC и отвечает за преобразование клеток PDAC от низкой до высокой степени злокачественности [11]. Рецепторы ретиноидов, которые относятся к лиганд-зависимому транскрипционному фактору суперсемейства рецепторов ядерных гормонов, служат рецепторами для всех транс-ретиноевых кислот. Существует две группы рецепторов: (i) рецепторы ретиноевой кислоты (RAR) и (ii) рецепторы ретиноида X (RXR). Было идентифицировано несколько изотипов RAR и RXR: RARα, RARβ, RARγ, RXRα, RXRβ и RXRγ [12]. Ранее нами было показано, что при аденокарциноме протоков поджелудочной железы существует связь между опухолевыми стволовыми клетками, эпителиально-мезенхимальным переходом и ретиноидными рецепторами и их лигандами [13, 14].

Получены доказательства накопления CSC в солидных опухолях человека, в том числе при PDAC, при терапевтическом использовании gem и 5-FU [15]. На мышах, в условиях *in vivo*, было показано, что при обработке ксенографтов PDAC, полученных от пациентов после лечения gem, наблюдается индукция EMT [16]. В случае 5-FU также показана активация EMT в условиях *in vitro* в опухолевых клетках при колоректальном раке [17], что указывает на влияние химиотерапевтических препаратов на индукцию эпителиально-мезенхимального перехода. В то же время влияние гемцитабина и 5-фторурацила на рецепторы ретиноидов до сих пор изучено не было.

Поэтому целью настоящей работы было изучение взаимосвязей между опухолевыми стволовыми клетками, эпителиально-мезенхимальным переходом и ретиноидными рецепторами в линиях клеток аденокарциномы протоков поджелудочной железы в нативных условиях и после обработки клеток химиотерапевтическими препаратами, гемцитабином и 5-фторурацилом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: линии клеток MiaPaca и Panc1 аденокарциномы протоков поджелудочной железы человека были получены от ATCC, США; среда RPMI 1640 («Gibco», Германия); фетальная бычья сыворотка («PAN Biotech», Германия); антибиотики («Sigma», Германия); вода, не содержащая примесей РНКаз, наборы RNeasy Mini Kit, QuantiNova Reverse Transcription Kit, QuantiTect Primer Assays, QuantiNova SYBR Green PCR Kit («Qiagen», Германия), конъюгированный с красителем APC CD24, FITC-конъюгированные CD44 антитела и 7AAD («Biolegend», Германия) и конъюгированные с красителем PE CD133 антитела («eBioscience», Германия). Набор реактивов для проточной цитометрии BD Pharmingen BrdU Flow Kit (APC BrdU Flow Kit) («BD Pharmingen», Германия).

Линии клеток. Клетки аденокарциномы протоков поджелудочной железы поддерживали в виде монослоя. Перед проведением пассирования раствор трипсина и культуральную среду нагревали в водяной бане до 37 °C. Клетки культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой, в присутствии 1% пенициллина и стрептомицина, и инкубировали при 37 °C в увлажненной атмосфере из 5% CO_2 и 95% воздуха. Клетки пассировали дважды в неделю до достижения состояния 70–80%-ной конфлуентности. Культуральную среду меняли каждые 2–3 дня. Все клетки проверяли на наличие микоплазм в кондиционируемой клеточной среде с использованием ПЦР, согласно внутренним стандартам проведения процедуры (SOPs).

Обработка опухолевых клеток химиотерапевтическими препаратами. Линии клеток PDAC высевали в 12-луночные планшеты, плотность клеток составляла 2×10^5 клеток на 1 мл и оставляли на 24 ч. После этого клетки обрабатывали в течение 24 ч в присутствии 5-FU (450 мкМ) или gem (15 мкМ).

Получение препарата суммарной мРНК из культивированных клеток. Препарат суммарной мРНК из культивированных клеток получали с использованием набора RNeasy Mini Kit в соответствии с инструкциями производителя и как было описано во многих источниках [18]. Количество РНК определяли с помощью NanoDrop One («Thermo Fisher», Германия). Качество полученных препаратов мРНК оценивали по значению A260/A280 (A260/A280 value).

Количественный ПЦР-анализ с использованием SYBR Green. Геномную ДНК удаляли из образцов РНК перед началом обратной транскрипции с помощью набора QuantiNova Reverse Transcription Kit, используя 1000 нг РНК из каждого образца. Реакционные смеси для удаления геномной ДНК (общий объем составлял 15 мкл) включали 2 мкл смеси gDNA Removal Mix и различные объемы РНК-матрицы (Template RNA) и воды, свободной от примесей РНКаз. После инкубации в течение 2 мин при 45 °С пробирки сразу помещали в лед. После этого для каждой пробирки во льду готовили 5 мкл смеси для проведения обратной транскрипции (1 мкл раствора обратной транскриптазы и 4 мкл смеси для проведения обратной транскрипции). Затем в каждую пробирку, содержащую 15 мкл РНК-матрицы (после удаления ДНК), добавляли по 5 мкл раствора обратной транскриптазы. Реакцию обратной транскрипции проводили в термоблоке Thermomixer comfort («Eppendorf», Германия) в течение 3 мин при 25 °С и 10 мин при 45 °С, затем обратную транскриптазу инактивировали инкубацией в течение 5 мин при 85 °С. Образцы разводили 10× водой, не содержащей примесей РНКаз.

Экспрессию генов определяли с помощью набора QuantiNova SYBR Green PCR Kit согласно инструкциям производителя и как описано в литературе [13]. Вкратце, в каждую лунку с реакционной смесью в 96-луночном планшете добавляли 2 мкл раствора предварительно синтезированной кДНК. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 10 мкл смеси 2× QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix, 2 мкл смеси праймеров 10× QuantiTect Primers, 2 мкл красителя QuantiNova ROX Reference Dye и 4 мкл воды, свободной от РНКаз. Затем 96-луночный планшет центрифугировали в течение 1 мин, чтобы удалить пузырьки воздуха. Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR System («Thermo Fisher», Германия). Были выставлены следующие параметры: 2 мин начальной активации ПЦР при 95 °С, затем 40 двухэтапных циклов, состоящих из денатурации при 95 °С в течение 5 с и комбинированного отжига и удлинения в течение 10 с при 60 °С. Для нормализации полученных данных в качестве конститутивного гена использовали мРНК глицероальдегидфосфатдегидрогеназы (GAPDH). Для расчетов изменений уровня экспрессии генов использовали ранее описанный метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [19].

Определение маркеров CSC с помощью метода проточной цитометрии (FACS). FACS осуществляли, как описано ранее [10]. Вкратце: после обработки клетки PDAC собирали, переносили в полистирольные пробирки объемом 5 мл и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин с флуоресцентно мечеными APC-конъюгированными CD24, FITC-конъюгированными CD44 антителами, а также с конъюгированными с красителем PE антителами к CD133 и 7AAD. После проведения инкубации клетки дважды промывали, ресуспендировали в 300 мкл буфера для окрашивания и анализировали на проточном цитометре BD LSRFortess («BD Biosciences», США). Оценку полученных результатов проводили с использованием программы FlowJo V10.1.

Анализ клеточного цикла и апоптоза клеток. Обработанные клетки PDAC тщательно маркировали 1 мМ BrdU и инкубировали в течение 1 ч в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37 °С. Затем клетки обрабатывали набором BD Pharmingn BrdU Flow Kit (APC BrdU Flow Kit) и анализировали с помощью прибора BD LSRFortessa в соответствии с инструкциями производителя.

Статистическая обработка полученных результатов. Для статистического анализа полученных данных была использована программа GraphPad Prism Version 7.01. Распределения непрерывных переменных описывались средним значением, SD, медианой, 25% и 75% процентилями и представлялись в виде столбчатых гистограмм или в виде диаграмм размаха. Нулевая гипотеза (средние значения были равны) по сравнению с альтернативной гипотезой (средние значения не были равны) проверялась с использованием непарного двустороннего критерия Стьюдента (для двух групп) и однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Бонферрони (для более чем двух групп). Значимым считалось значение $p < 0{,}05$. Корреляционный анализ непараметрических данных проводили с использованием корреляции Спирмена. Все статистические тесты были двухсторонними. Уровень значимости α был равен 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные линии MiaPaca и Panc1 различаются по уровню экспрессию маркеров CSC и EMT,

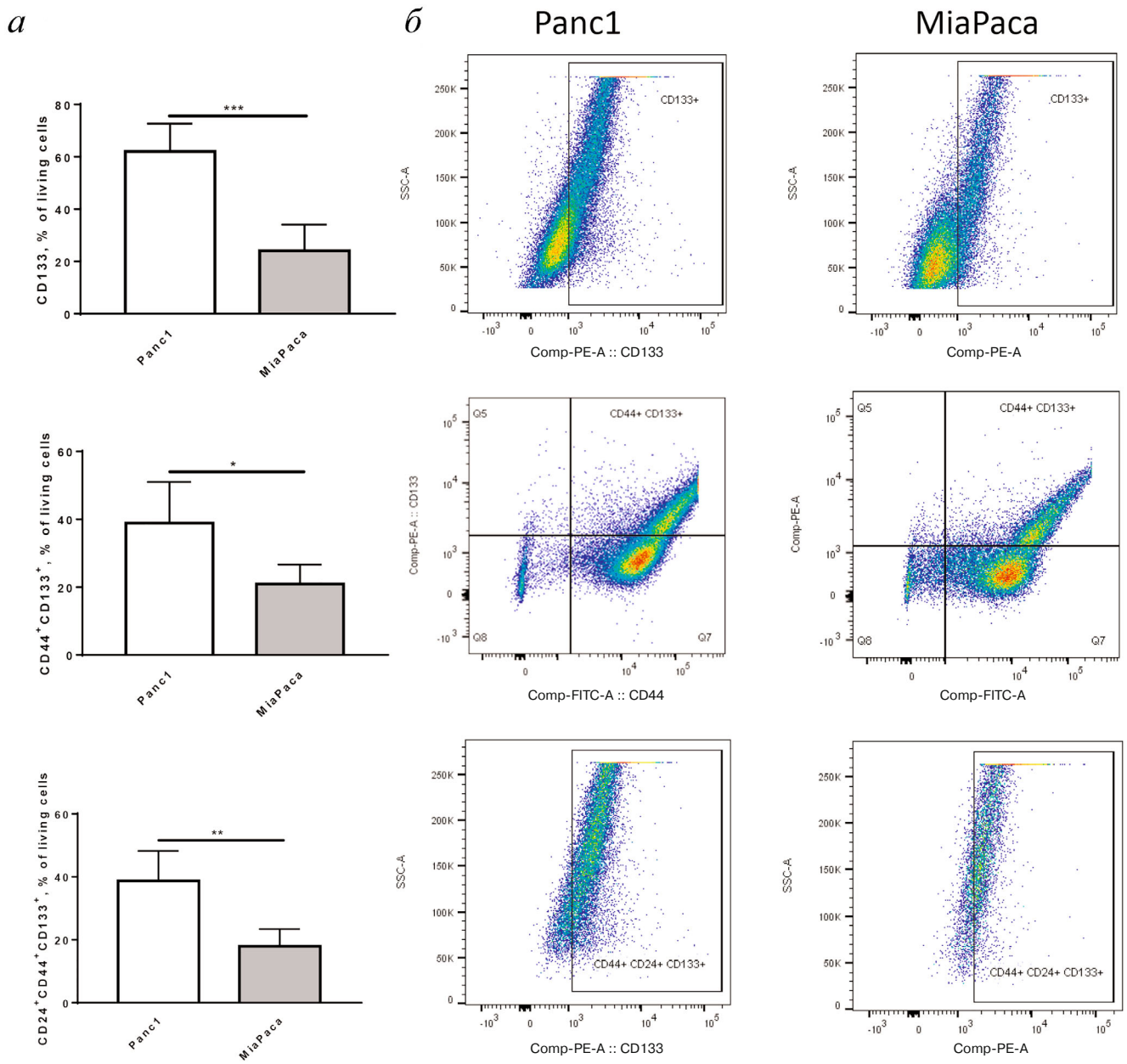

Рис. 1. Экспрессия маркеров опухолевых стволовых клеток (CSC) на поверхности клеток линии Panc1 и MiaPaca. *а* – Экспрессия CD133, CD44/CD133 и CD24/CD44/CD133 человека была измерена с помощью метода проточной цитометрии (FACS). Данные представлены в виде столбчатых гистограмм (среднее значение ± SD) (n = 5–6), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$. *б* – Представлены репрезентативные картины результатов проточной цитометрии.
С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

ретиноидных рецепторов, а также по уровню спонтанного апоптоза и фазам клеточного цикла. Была продемонстрирована экспрессия CD24, CD44 и CD133 на поверхности клеток MiaPaCa и Panc1 (не показано). Значительные различия между этими клеточными линиями были обнаружены в случае экспрессии CD133, двойной экспрессии CD44/CD133 и тройной экспрессии CD24/CD44/CD133 (рис. 1), что указывает на возможное накопление CSC в клетках Panc1. В связи с тем, что EMT-маркеры e-кадгерин и виментин, а также рецепторы ретиноидов локализуются внутри клеток, мы решили измерить их экспрессию на уровне мРНК с помощью метода ПЦР в реальном времени. Было показано, что клетки Panc1 обладают более высокой экспрессией e-кадгерина и RXRβ по сравнению с клетками MiaPaca (рис. 2). В то же время мы не смогли обнаружить существенных различий в уровне экспрессии виментина и других рецепторов ре-

тиноидов между изучаемыми нами клеточными линиями (не показано).

Поскольку мы планировали исследовать влияние химиотерапии на экспрессию вышеупомянутых белков и генов, нам было интересно узнать разницу между этими двумя клеточными линиями в плане развития у них процесса спонтанного апоптоза и протекания клеточного цикла. Поэтому сначала мы провели анализ клеток, находящихся в нативном состоянии, т.е. без добавления химиотерапевтических препаратов, с помощью BrdU/7AAD. В результате проведения анализа было выяснено, что клетки MiaPaca характеризуются более высоким уровнем спонтанного апоптоза по сравнению с клетками Panc1 (рис. 3). В то же время наблюдалось снижение уровня пролиферации клеток MiaPaca, находящихся в состоянии митоза (рис. 3). На этом основании можно предположить, что клетки MiaPaca обладают меньшей способностью к пролиферации, предположительно из-за возникновения спонтанного апоптоза.

В завершение необходимо подчеркнуть, что клетки MiaPaca показывали отрицательную корреляцию между $CD133^+$ и клетками, находящимися в состоянии апоптоза ($r = -0{,}9$, $p = 0{,}08$). В то же время в случае клеток Panc1 нами была обнаружена положительная корреляция между экспрессией RXRα и CD24 ($r = 1$, $p = 0{,}07$).

Гемцитабин и 5-фторурацил снижают количество опухолевых клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. На следующем этапе мы обработали клетки из обеих линий препаратами gem или 5-FU и затем проанализировали их клеточный цикл. Необходимо отметить, что нам не удалось обнаружить какие-либо существенные различия между этими клетками, находящимися в фазе M или G0/G1. Также не было выявлено различий в количестве клеток, находящихся в стадии апоптоза (рис. 4). Однако оба химиотерапевтических препарата вызвали снижение количества клеток, находящихся в S-фазе (рис. 4), что отражает нарушение процесса репликации ДНК в результате действия этих лекарств.

Химиотерапевтические препараты модулируют экспрессию маркеров CSC (e-кадгерин) и RXRβ в клетках Panc1, но не в клетках MiaPaca. На заключительном этапе нами было проведено измерение уровня экспрессии поверхностных маркеров CSC и мРНК e-кадгерина и рецепторов ретиноидов в клетках MiaPaca и Panc1 после обработки gem и 5-FU. Было выявлено увеличение тройных положительных по CD24/CD44/CD133 клеток в культуре Panc1, но не наблюдалось в культуре клеток MiaPaca (рис. 5). Что касается экспрессии маркеров EMT, то экспрессия мРНК e-кадгерина снижалась после обработки gem и 5-FU клеток Panc1. В случае клеток MiaPaca такой эффект действия лекарств выявлен не был (рис. 6). Эти результаты свидетельствуют о переходе клеток линии Panc1 в состояние мезенхимы. Химиотерапевтические препараты не оказывали влияния на экспрессию виментина в обеих линиях клеток (не показано). Уровень экспрессии RXRβ также снижался в результате обработки клеток Panc1 и оставался без видимых изменений в клетках линии MiaPaca (рис. 6). Необходимо подчеркнуть, что в случае обработки клеток 5-фторурацилом наблюдалась строгая положительная корреляция между экспрессией виментина и RXRα ($r = 1$, $p = 0{,}08$). В то же время в клетках, не подвергавшихся обработке химиотерапевтическими препаратами, корреляции обнаружено не было ($r = 0{,}6$, $p = 0{,}42$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение количества CSC в результате применения химиотерапевтических препаратов является одной из наиболее часто обсуждаемых сторон побочных эффектов, возникающих при проведении химиотерапии рака. Кроме того, устойчивость различных опухолей к действию

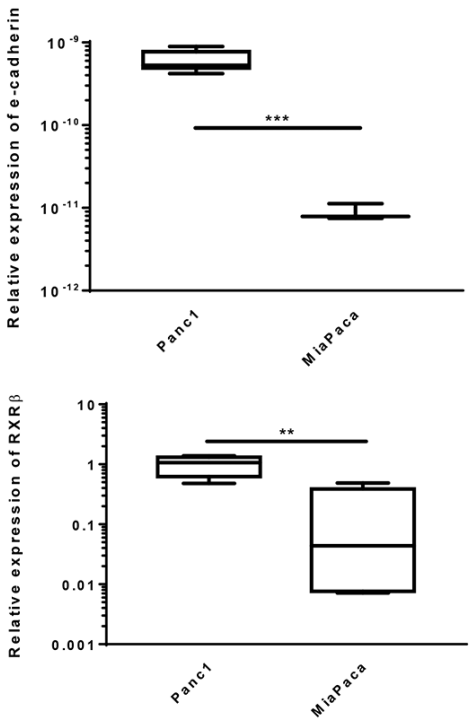

Рис. 2. Экспрессия e-кадгерина и рецептора RXRβ на клетках Panc1 и MiaPaca. Экспрессию генов определяли с помощью метода ПРЦ в реальном времени. Полученные данные представлены в виде диаграмм размаха ($n = 6$–7), ** $p < 0{,}01$ и *** $p < 0{,}001$

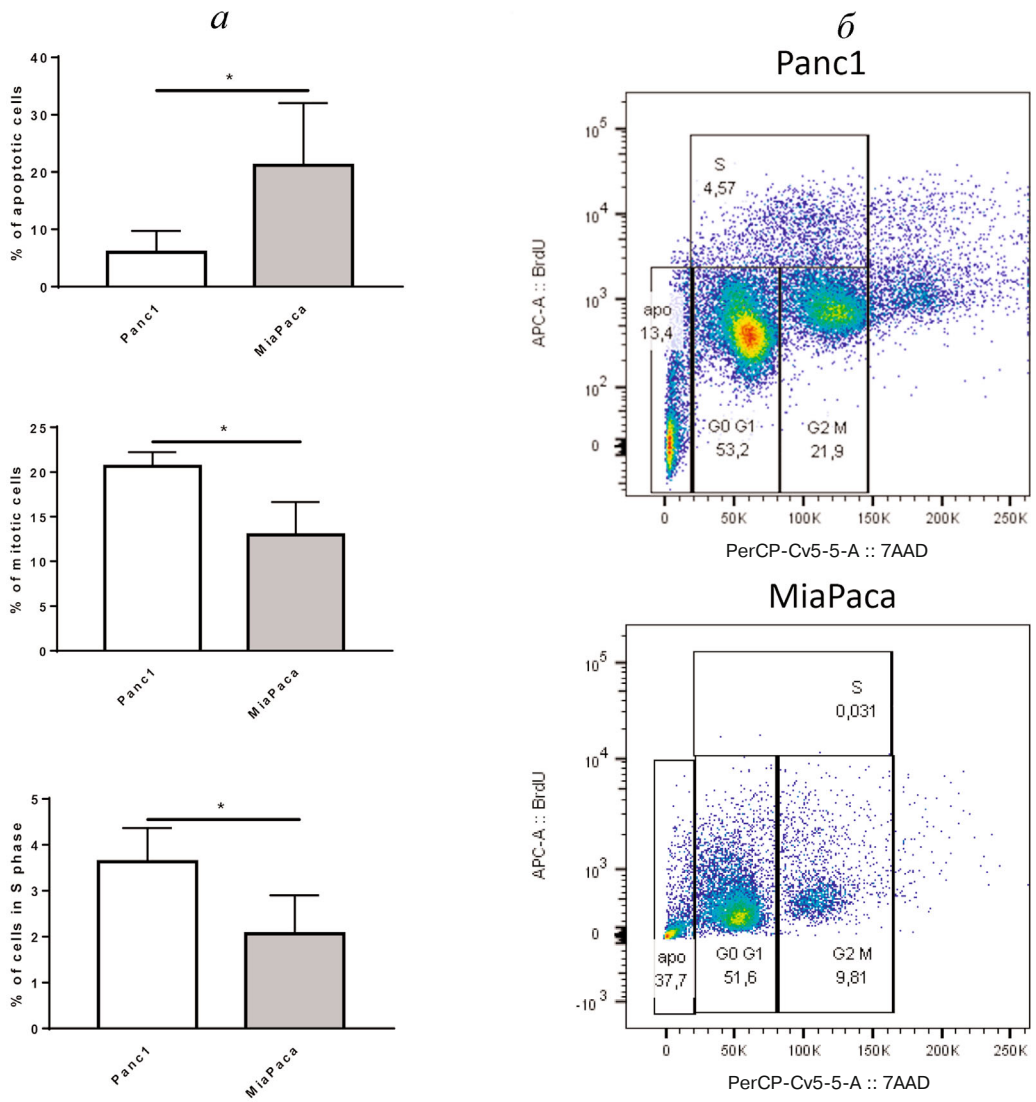

Рис. 3. Анализ протекания клеточного цикла у клеток Panc1 и MiaPaca. *а* – Обобщенные данные представлены в виде столбчатых гистограмм (среднее значение ± SD) (n = 4–6), * $p < 0,05$. *б* – Представлены репрезентативные картины результатов определения клеточного цикла FACS.
С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

противораковых препаратов также может быть связана с накоплением CSC [15]. Поэтому необходимо более глубокое понимание роли опухолевых столовых клеток при проведении химиотерапии, в особенности в случае аденокарциномы протоков поджелудочной железы, которая является одной из наиболее устойчивых к химиотерапии форм рака. Для решения этой проблемы необходимо разработать доклинические модели *in vitro* с использованием линий опухолевых клеток. Чтобы изучить влияние химиотерапевтических препаратов, таких как гемцитабин и 5-фторурацил, на линии опухолевых клеток, нами был проведен анализ уровня экспрессии широко известных CSC-маркеров, таких как CD24, CD44 и CD133. В настоящей работе с использованием другого набора линий клеток: аденокарциномы протоков поджелудочной железы и другой системы измерения, нами были получены результаты, которые подтвердили полученные ранее данные и продемонстрировали повышенные количества этих белков в клетках PDAC линии Panc1 в сравнении с клетками линии MiaPaca [10]. Также была показана стабильность этих маркеров при проведении пассажей клеток. В связи с тем, что клетки линии MiaPaca показали меньшую скорость пролиферации, и они в меньшей степени были подвержены спонтанному апоптозу по сравнению с клетками линии Panc1, нами были сделаны выводы о том,

что эти различия связаны с присутствием CSC, что соответствует общей теории этих клеток [8], а также укладывается в контекст биологии PDAC [20].

Признавая CSC в качестве возможной причины возникновения хеморезистентности, мы обработали клеточные линии с различным количеством CSC стандартными химиотерапевтическими препаратами – gem и 5-FU. В соответствии с некоторыми ранее опубликованными данными [21, 22] обе линии клеток, протестированные в настоящей работе, обладают выраженной устойчивостью к действию гемцитабина и 5-фторурацила. Однако было обнаружено снижение продолжительности S-фазы клеточного цикла, что показывает проявление начальной стадии цитотоксичности из-за действия этих лекарств. Обработка клеток обоими химиотерапевтическими препаратами, исследованными в нашей работе, вызывало накопление CSC в клетках линии Panc1, что также согласуется с ранее опубликованными данными [23, 24]. Удивительно, что этот эффект наблюдался только в клетках линии Panc1 и не был выявлен в клетках MiaPaca. Пока неясно, в чем заключается причина этого несоответствия. Может быть это свя-

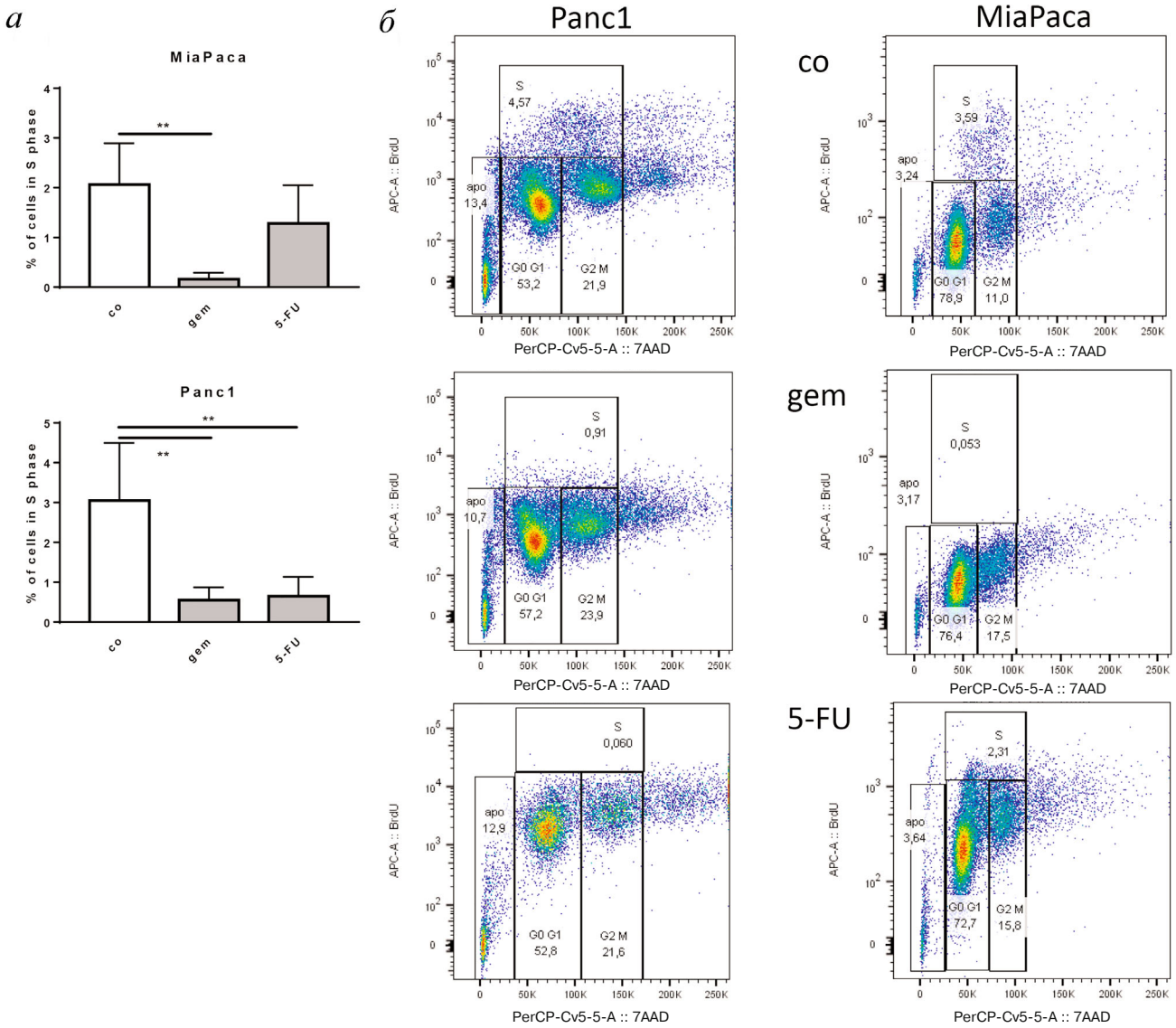

Рис. 4. Анализ клеточного цикла в клетках линии Panc1 и MiaPaca после их обработки гемцитабином и 5-фторурацилом. *а* – Обобщенные данные представлены в виде столбчатых гистограмм (среднее значение ± SD) (n = 5–6), ** $p < 0{,}01$. *б* – Представлены репрезентативные картины результатов определения клеточного цикла FACS.
С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

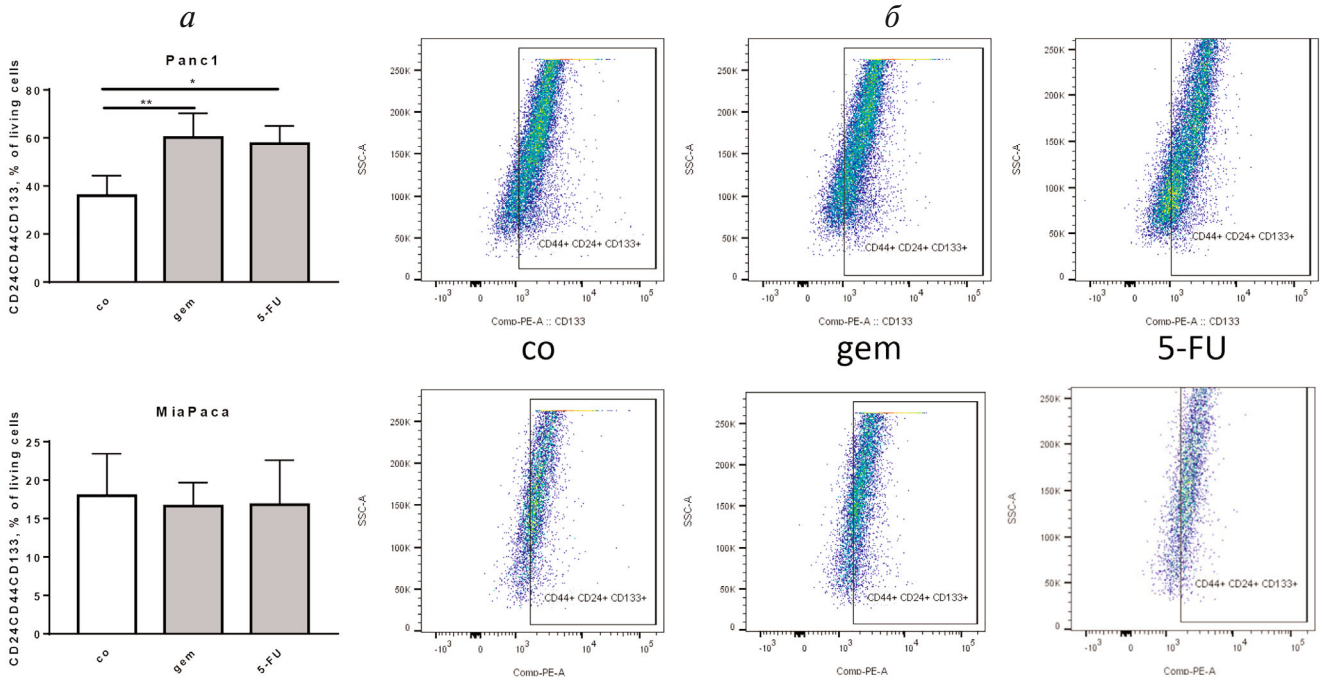

Рис. 5. Экспрессия маркеров опухолевых стволовых клеток на поверхности клеток линии Panc1 и MiaPaca после их обработки gem и 5-FU. *а* – Экспрессия CD133, CD44/CD133 и CD24/CD44/CD133 человека, определенная с помощью FACS. Данные представлены в виде столбчатых гистограмм (среднее значение ± SD) (n = 5–6), * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$. *б* – Представлены репрезентативные картины результатов FACS.
С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

зано с исходными различиями в количестве CSC и/или различном катаболизме этих лекарств в анализируемых линиях клеток. Однако в нашей предыдущей работе по изучению влияния интерферона α на опухолевые стволовые клетки в линиях клеток Panc1 и MiaPaca также было продемонстрировано различие в накоплении CSC в этих клеточных линиях [10]. Поэтому мы думаем, что существование таких различий может действительно быть объяснено исходным количеством опухолевых стволовых клеток.

Между CSC и процессом эпителиально-мезенхимального перехода есть много общего. Особенно это касается их роли в развитии устойчивости клеток к действию химиотерапевтических агентов [8]. Кроме того, недавно было показано, что экспрессия маркеров EMT коррелирует с присутствием CSC в клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы у человека и мыши [13]. В настоящей работе на основе экспрессии e-кадгерина показано, что клетки Panc1 обладают более выраженным эпителиальным фенотипом по сравнению с клетками Mia-Paca, что также согласуется с результатами других исследований [25, 26]. Влияние химиотерапевтических препаратов на процесс EMT был показан в случае различных солидных опу-

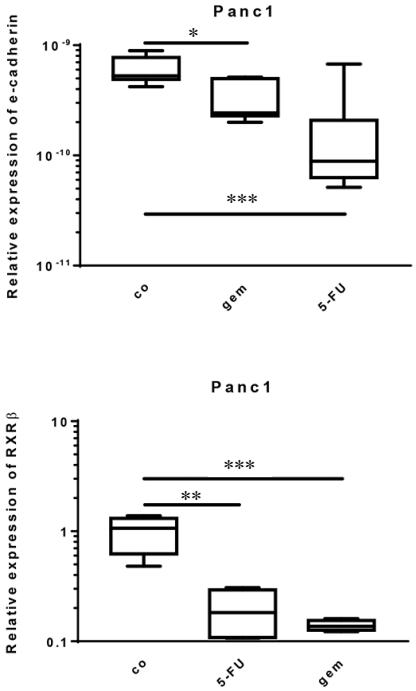

Рис. 6. Экспрессия e-кадгерина и RXRβ в клетках Panc1 и MiaPaca, обработанных gem и 5-FU. Экспрессия генов определялась с помощью метода ПЦР в реальном времени. Полученные данные представлены в виде диаграмм размаха (n = 4–7), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$

холей [17, 27–29], включая PDAC [16, 25, 30]. Также в нашей работе было выявлено снижение экспрессии e-кадгерина в клетках линии Panc1 в отличие от клеток линии MiaPaca.

До сих пор нет данных о связи химиотерапии с ретиноидными рецепторами. Однако не вызывает сомнений значение этих рецепторов, т.е. снижение уровня их экспрессии в клетках PDAC по сравнению с нормальными клетками, корреляция с маркерами дифференцировки клеток, а также их значение для предсказания выживаемости больных аденокарциномой протоков поджелудочной железы [13]. Кроме того, базовый уровень RXRβ, исследованный в настоящей работе, оказался ниже в клетках линии MiaPaca по сравнению с клетками Panc1. Следует отметить, что в клетках Panc1 химиотерапевтические препараты индуцировали пониженную регуляцию RXRβ и корреляцию с EMT. В этом плане есть только одно сообщение, описывающее предотвращение возникновения резистентности к действию гемцитабина в клетках немелкоклеточного рака легких в результате действия селективного агониста [31], что делает наши результаты интересными с точки зрения будущих доклинических исследований.

В целом, нами косвенно было продемонстрировано существование взаимосвязей между опухолевыми стволовыми клетками, эпителиально-мезенхимальным переходом и ретиноидными рецепторами. Экспрессия маркеров CSC и процесса EMT, а также вышеупомянутых ретиноидных рецепторов модулируется химиотерапевтическими препаратами, такими как гемцитабин и 5-фторурацил. Эти эффекты зависят от уровня экспрессии их генов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Микаэле Свихла и Томми Бауэру за оказанную замечательную техническую помощь и Маре Таверне за административную поддержку.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Werner, J., Combs, S. E., Springfeld, C., Hartwig, W., Hackert, T., and Buchler, M.W. (2013) Advanced-stage pancreatic cancer: therapy options, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **10**, 323–333.
2. Hartwig, W., Werner, J., Jager, D., Debus, J., and Buchler, M.W. (2013) Improvement of surgical results for pancreatic cancer, *Lancet Oncol.*, **14**, e476–e485.
3. Burris, H.A. 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F.A., Stephens, C.D., and Von Hoff, D.D. (1997) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial, *J. Clin. Oncol.*, **15**, 2403–2413.
4. Pusceddu, S., Ghidini, M., Torchio, M., Corti, F., Tomasello, G., Niger, M., Prinzi, N., Nichetti, F., Coinu, A., Di Bartolomeo, M., Cabiddu, M., Passalacqua, R., de Braud, F., and Petrelli, F. (2019) Comparative effectiveness of gemcitabine plus Nab-Paclitaxel and FOLFIRINOX in the first-line setting of metastatic pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis, *Cancers (Basel)*, **11**, E484, doi: 10.3390/cancers11040484.
5. Shevchenko, I., Karakhanova, S., Soltek, S., Link, J., Bayry, J., Werner, J., Umansky, V., and Bazhin, A.V. (2013) Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer, *Int. J. Cancer*, **133**, 98–107.
6. Karakhanova, S., Mosl, B., Harig, S., von Ahn, K., Fritz, J., Schmidt, J., Jager, D., Werner, J., and Bazhin, A.V. (2014) Influence of interferon-alpha combined with chemo (radio) therapy on immunological parameters in pancreatic adenocarcinoma, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 4104–4125.
7. Fritz, J., Karakhanova, S., Brecht, R., Nachtigall, I., Werner, J., and Bazhin, A.V. (2015) *In vitro* immunomodulatory properties of gemcitabine alone and in combination with interferon-alpha, *Immunol. Lett.*, **168**, 111–119.
8. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646–674.
9. Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., La Noce, M., Laino, L., De Francesco, F., and Papaccio, G. (2013) Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization, *FASEB J.*, **27**, 13–24.
10. Zhu, Y., Karakhanova, S., Huang, X., Deng, S.P., Werner, J., and Bazhin, A.V. (2014) Influence of interferon-alpha on the expression of the cancer stem cell markers in pancreatic carcinoma cells, *Exp. Cell Res.*, **324**, 146–156.
11. Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., Leach, S.D., and Stanger, B.Z. (2012) EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation, *Cell*, **148**, 349–361.
12. Amann, P.M., Eichmuller, S.B., Schmidt, J., and Bazhin, A.V. (2011) Regulation of gene expression by retinoids, *Curr. Med. Chem.*, **18**, 1405–1412.
13. Bleul, T., Ruhl, R., Bulashevska, S., Karakhanova, S., Werner, J., and Bazhin, A.V. (2015) Reduced retinoids and retinoid receptors' expression in pancreatic cancer: a link to patient survival, *Mol. Carcinog.*, **54**, 870–879.
14. Bazhin, A.V., Bleul, T., de Lera, A.R., Werner, J., and Ruhl, R. (2016) Relationship between all-trans-13,14-dihydro retinoic acid and pancreatic adenocarcinoma, *Pancreas*, **45**, e29–e31.
15. Martins-Neves, S.R., Cleton-Jansen, A.M., and Gomes, C.M.F. (2018) Therapy-induced enrichment of cancer stem-like cells in solid human tumors: where do we stand? *Pharmacol. Res.*, **137**, 193–204.
16. Bulle, A., Dekervel, J., Libbrecht, L., Nittner, D., Deschuttere, L., Lambrecht, D., Van Cutsem, E., Verslype, C., and van Pelt, J. (2019) Gemcitabine induces epithelial-to-mesenchymal transition in patient-derived pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts, *Am. J. Transl. Res.*, **11**, 765–779.

17. Quan, Q., Zhong, F., Wang, X., Guo, L., and Chen, K. (2019) PAR2 inhibition enhanced the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-FU and reduced EMT signaling, *Oncol. Res.*, doi: 10.3727/096504018X15442985680348.
18. Bazhin, A.V., Tambor, V., Dikov, B., Philippov, P.P., Schadendorf, D., and Eichmuller, S. B. (2010) cGMP-phosphodiesterase 6, transducin and Wnt5a/Frizzled-2-signaling control cGMP and Ca(2+) homeostasis in melanoma cells, *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**, 817–828.
19. Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101–1108.
20. Diab, M., Azmi, A., Mohammad, R., and Philip, P.A. (2019) Pharmacotherapeutic strategies for treating pancreatic cancer: advances and challenges, *Expert. Opin. Pharmacother.*, **20**, 535–546.
21. Chen, W.H., Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Shimano, T., Penetrante, R., Sanders, W.H., Berjian, R., Douglass, H.O., Martin, E.W., and Chu, T.M. (1982) Human pancreatic adenocarcinoma: *in vitro* and *in vivo* morphology of a new tumor line established from ascites, *In Vitro*, **18**, 24–34.
22. Sipos, B., Moser, S., Kalthoff, H., Torok, V., Lohr, M., and Kloppel, G. (2003) A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform, *Virchows Arch.*, **442**, 444–452.
23. Kim, S.K., Kim, H., Lee, D.H., Kim, T.S., Kim, T., Chung, C., Koh, G.Y., Kim, H., and Lim, D.S. (2013) Reversing the intractable nature of pancreatic cancer by selectively targeting ALDH-high, therapy-resistant cancer cells, *PLoS One*, **8**, e78130.
24. Was, H., Czarnecka, J., Kominek, A., Barszcz, K., Bernas, T., Piwocka, K., and Kaminska, B. (2018) Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features, *Cancer Biol. Ther.*, **19**, 63–75.
25. Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K.F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J. L., Gallick, G.E., Logsdon, C.D., McConkey, D.J., and Choi, W. (2009) Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer, *Cancer Res.*, **69**, 5820–5828.
26. Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer, *Nature*, **527**, 525–530.
27. Zhang, W., Feng, M., Zheng, G., Chen, Y., Wang, X., Pen, B., Yin, J., Yu, Y., and He, Z. (2012) Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 679–685.
28. Wu, Q., Wang, R., Yang, Q., Hou, X., Chen, S., Hou, Y., Chen, C., Yang, Y., Miele, L., Sarkar, F. H., Chen, Y., and Wang, Z. (2013) Chemoresistance to gemcitabine in hepatoma cells induces epithelial-mesenchymal transition and involves activation of PDGF-D pathway, *Oncotarget*, **4**, 1999–2009.
29. Druzhkova, I., Ignatova, N., Prodanets, N., Kiselev, N., Zhukov, I., Shirmanova, M., Zagainov, V., and Zagaynova, E. (2019) E-Cadherin in colorectal cancer: relation to chemosensitivity, *Clin. Colorectal Cancer*, **18**, e74–e86.
30. Wang, R., Cheng, L., Xia, J., Wang, Z., Wu, Q., and Wang, Z. (2014) Gemcitabine resistance is associated with epithelial-mesenchymal transition and induction of HIF-1alpha in pancreatic cancer cells, *Curr. Cancer Drug Targets*, **14**, 407–417.
31. Tooker, P., Yen, W. C., Ng, S. C., Negro-Vilar, A., and Hermann, T. W. (2007) Bexarotene (LGD1069, Targretin), a selective retinoid X receptor agonist, prevents and reverses gemcitabine resistance in NSCLC cells by modulating gene amplification, *Cancer Res.*, 67, 4425–4433.

INFLUENCE OF CHEMOTHERAPEUTICS ON EXPRESSION OF THE CANCER STEM CELL AND EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION MARKERS, AND RETINOID RECEPTORS

O. Isayev[1], Y. Zhu[2], E. Gasimov[1], J. Werner[3], and A. V. Bazhin[3]*,**

[1] *Department of Histology, Embryology and Cytology, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan; E-mail: isayev.orkhan@yahoo.com, geldar1949@gmail.com*

[2] *International Joint Laboratory for Cell Medical Engineering of Henan Province, Department of Oncology, Henan University Huaihe Hospital, Kaifeng, Henan 475000, People's Republic of China; E-mail: celltransplant@163.com*

[3] *Department of General, Visceral, and Transplantation Surgery, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich 81377, Germany; E-mail: alexandr.bazhin@med.uni-muenchen.de*

Received May 14, 2019
Revised May 14, 2019
Accepted May 14, 2019

The accumulated evidence suggests that cancer stem cells (CSC) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) as well as expression and function of retinoid receptors are pivotal features of tumor initiation, progression and chemoresistance. This is true also for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) which is still a clinical challenge due to a deteriorated prognosis. Therefore, understanding of the above-mentioned features could open new avenues for future treatment strategies of PDAC. The main aim of this study was to investigate an interrelation between CSC, EMT and retinoid receptors in PDAC after treatment with chemotherapeutics gemcitabine and 5-fluorouracil. We demonstrated a differentiated expression of CSC and EMT markers as well as of retinoid receptors in native MiaPaca and Panc1 PDAC cell lines. Besides, these cell lines are also different in spontaneous apoptosis and in distribution during phases of cell cycle. We showed that the chemotherapy reduces amount of cancer cells in the S phase of the cell cycle. Further, gemcitabine and 5-fluorouracil modulate expression of CSC markers, E-cadherin and RXRβ in Panc1 but not in MiaPaca cells. We supposed that these effects could be ascribed to the difference in the basal level of expression of the genes investigated. This evidence makes our data interesting in context of future preclinical research.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma, cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, retinoid receptors