

Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2021
УДК 618.19
doi: 10.37469/0507-3758-2021-67-2-293-299

Вопросы онкологии, 2021. Том 67, № 2

*И.А. Замулаева, М.Р. Абрамова, О.Н. Матчук, Н.М. Луионов,
Л.С. Мкртчян, Л.И. Крикунова*

Влияние высокомолекулярной гиалуроновой кислоты на размер популяции стволовых клеток рака молочной железы линии MCF-7

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск

В последние годы накапливается всё больше данных о высокой радио- и химиорезистентности опухолевых стволовых клеток (ОСК), подтверждающих предположение о важной роли этих клеток в рецидивировании опухолевого процесса у части онкологических больных. Поэтому значительный интерес представляет выяснение закономерностей и механизмов формирования пула ОСК при воздействии различных факторов, включая один из основных компонентов внеклеточного матрикса — гиалуроновую кислоту (ГК).

Цель исследования — выяснение эффектов действия ГК с молекулярной массой $(1-3) \times 10^6$ Да на количество ОСК в стабильной культуре рака молочной железы линии MCF-7.

Материал и методы. С помощью МТТ-теста определяли жизнеспособность опухолевых клеток после инкубации с ГК в концентрации 0,3-5,0 мг/мл *in vitro*. С помощью проточной цитометрии оценивали изменение относительного и абсолютного количества ОСК под влиянием ГК (0,6 мг/мл). ОСК выявляли по иммунофенотипу CD44⁺CD24^{-low}, а также по способности эффективно откачивать из клеток флуоресцентный краситель Хёхст33342 и формировать так называемую боковую популяцию (side population — SP).

Результаты. Жизнеспособность опухолевых клеток в общей популяции снижалась с повышением концентрации ГК ($R=-0,94$, $p=0,006$). При этом инкубация клеток с ГК приводила к повышению как относительного, так и абсолютного количества ОСК, идентифицированных с помощью обоих методов, по сравнению с контролем. Так, относительное количество клеток SP увеличивалось в 2,0 раза ($p=0,002$), CD44⁺CD24^{-low} клеток — в 6,1 раза ($p=0,005$). Абсолютное количество указанных клеток изменялось в меньшей степени по сравнению с контролем: увеличение составило 1,6 ($p=0,004$) и 2,9 раз ($p=0,02$) соответственно.

Заключение. Воздействие высокомолекулярной ГК на клетки рака молочной железы линии MCF-7 приводит к повышению количества ОСК, в то время как жизнеспособность не стволовых опухолевых клеток, составляющих подавляющее большинство в общей популяции, снижается.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, рак молочной железы; MCF-7; опухолевые стволовые клетки; МТТ-тест; проточная цитометрия; иммунофенотипирование

Введение

В последние годы активно развивается представление о существовании опухолевых стволовых клеток (ОСК) в злокачественных новообразованиях различной локализации и стабильных линиях опухолевых клеток человека и животных [1, 2]. Возрастающий интерес к исследованию ОСК обусловлен, прежде всего, более высокой резистентностью этих клеток к традиционным противоопухолевым воздействиям по сравнению с остальной массой не стволовых опухолевых клеток, как показывают многочисленные данные литературы и результаты собственных исследований [3-6]. Многие исследователи полагают, что именно сохранение ОСК после радио- или химиотерапии приводит к рецидивированию опухолевого процесса у части онкологических больных [7-8]. Кроме того, с высокой миграционной способностью этих клеток связывают процесс метастазирования злокачественных новообразований, включая наиболее часто встречающийся у женщин рак молочной железы (РМЖ). В этой связи значительный интерес представляет выяснение молекулярных механизмов образования ОСК, составляющих небольшую по размеру, но очень важную фракцию опухолевых клеток.

Как стало понятно в последние годы, существенную роль в процессе формирования пула ОСК и регуляции биологических свойств этих

клеток играют различные факторы микроокружения, включая один из основных компонентов внеклеточного матрикса — гиалуроновую кислоту (ГК), которая в организме обычно находится в форме полианиона (гиалуронана).

Молекулярная масса ГК сильно варьирует у разных видов животных от 10^3 до 10^7 Да в зависимости от тканевой принадлежности, физиологических условий и патологического состояния. Накапливается все больше данных о важном значении ГК на всех стадиях опухолевого процесса, начиная от его инициации до развития резистентности к противоопухолевой терапии и образования метастазов [9]. ГК влияет на пролиферацию, адгезию и миграцию опухолевых клеток, а также на их гибель под влиянием повреждающих факторов. Однако направленность этих изменений зависит от молекулярного веса ГК [10-12]. Например, низкомолекулярные фрагменты ГК или олигосахаридные остатки снижают опухолевый рост и миграцию опухолевых клеток, а средне- и высокомолекулярная ГК (более 10^6 Да), напротив, способна усиливать эти процессы.

Принято считать, что ГК оказывает свое действие через связывание с поверхностными рецепторами, главным образом, CD44 и RHAMM, первый из которых высоко экспрессируется в ОСК многих (хотя и не всех) локализаций. Проведенные исследования, в основном, касались влияния ГК с молекулярным весом 200-500 кДа [9]. Как выяснилось, такая ГК значительно усиливала стволовые свойства опухолевых клеток, увеличивала размер пула и резистентность ОСК разного происхождения, включая РМЖ. Однако влияние ГК с более высоким молекулярным весом на размер пула ОСК молочной железы исследовано недостаточно. Поэтому целью данной работы является выяснение эффектов действия ГК с молекулярным весом 10^6 Да и более на количество ОСК в стабильной культуре РМЖ линии MCF-7, выбранной в качестве объекта исследования из-за доказанной многими авторами экспрессии CD44 на плазматической мембране ОСК этой клеточной линии (при отсутствии этого рецептора ГК на поверхности остальных клеток).

Материал и методы

В работе использован препарат ГК с молекулярным весом $(1-3) \times 10^6$ Да. С помощью МТТ-теста на первом этапе работы определяли жизнеспособность клеток линии MCF-7 после инкубации с ГК в различных концентрациях (0,3; 0,6; 1,25; 2,5 и 5,0 мг/мл); на втором этапе с помощью проточной цитометрии оценивали изменение относительного и абсолютного количества ОСК под влиянием ГК в выбранной концентрации (0,6 мг/мл), которая примерно соответствует физиологической концентрации этого соединения в дерме [13].

Идентификацию и количественную оценку ОСК выполняли с помощью двух методов, хорошо известных в литературе: иммунофенотипирование по поверхностным маркерам и оценка эффективности исключения из клеток флуоресцентного красителя Хёхст 33342.

Выбор иммунофенотипических маркеров для идентификации ОСК РМЖ в нашей работе был сделан на основе данных литературы. Как известно, РМЖ был первой солидной опухолью, в которой установлено наличие ОСК [14]. Авторы этого исследования идентифицировали ОСК по экспрессии CD44 при отсутствии или низкой экспрессии CD24 на поверхности этих клеток с помощью соответствующих антител. По настоящее время этот иммунофенотип (CD44⁺CD24^{-low}) наиболее часто используется в различных исследованиях для выявления ОСК РМЖ, в том числе в стабильной культуре линии MCF-7. Учитывая многочисленные доказательства принадлежности CD44⁺CD24^{-low} клеток к популяции ОСК РМЖ, этот иммунофенотип был выбран нами для выявления ОСК.

Второй метод идентификации ОСК, использованный в работе, основан на способности этих клеток откачивать флуоресцентный краситель Хёхст 33342 во внеклеточную среду вследствие высокой экспрессии на плазматической мембране различных АТФ-связывающих транспортёров (в отличие от остальных клеток). Благодаря этой способности ОСК могут быть выявлены с помощью проточной цитометрии как т. н. боковая популяция (side population — SP) слабо окрашенных клеток в ряде стабильных линий опухолевых клеток, включая использованную в данной работе линию MCF-7 [15, 16].

Культивирование клеток и инкубация с ГК

Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), культивировали в стандартных условиях в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Biosera, Франция), пенициллин (50 ед/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) и глютамин (292 мг/л).

Для МТТ-теста клетки рассеивали в 96-луночные планшеты (Corning Costar, США). Через 24 ч в среду культивирования добавляли ГК в конечной концентрации 0,3-5,0 мг/мл и инкубировали в течение 72 ч в стандартных условиях в CO₂ инкубаторе (Shellab, США). Контролем служили клетки, не инкубированные с ГК.

Для определения количества ОСК клетки рассеивали в пластиковые флаконы, в которые через 24 ч добавляли ГК в конечной концентрации 0,6 мг/мл и инкубировали ещё в течение 72 ч в стандартных условиях. Затем клетки снимали со дна флаконов и определяли их концентрацию в полученной суспензии с помощью камеры Горяева, после чего рассчитывали общее количество клеток в каждом флаконе и выявляли ОСК с помощью двух методов, как описано ниже.

Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста

МТТ-тест выполняли по стандартной методике. Оптическую плотность (ОП) конечного продукта реакции (формазана) определяли на микропланшетном фотометре STAT FAX 2100 (Awareness Tech. Inc., США) при длине волны более 545 нм. Среднюю ОП в контрольных лунках принимали за 100%. ОП в опытных лунках (после инкубации с ГК в различных концентрациях) представляли в процентах от контроля.

Определение количества CD44⁺CD24^{-low}ОСК

Из каждого флакона отбирали аликвоты по 100 тыс. клеток, центрифугировали при 250g в течение 5 мин, к осадку добавляли холодный раствор Хенкса (ПанЭко, Россия) и ресуспендировали. Далее клетки инкубировали со смесью моноклональных антител к CD44, меченных флу-

оресцеинотиоцианатом (ФИТЦ) (Vecton Dickinson — BD, США), и к CD24, меченных фикоэритрином (ФЭ) (BD, США), в течение 30 минут в темноте. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела соответствующих изотипов к гемоцианину улитки, конъюгированные с теми же флуорохромами, что и антитела к указанным поверхностным маркерам (BD, США).

После отмывки от не связавшихся антител пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Vantage (BD, США). Данные об интенсивности прямого и бокового светорассеяния, флуоресценции ФИТЦа и ФЭ записывали в файл, который обрабатывали с помощью программы CellQuestPro (BD, США). В каждом образце анализировали не менее 50 тыс. клеток. Определяли относительное количество (%) ОСК с иммунофенотипом CD44⁺CD24^{low} среди неповрежденных клеток, выделенных по параметрам прямого и бокового светорассеяния по общепринятой методике. Абсолютное количество CD44⁺CD24^{low} ОСК определяли путем умножения доли этих клеток на общее количество клеток во флаконе, определенное с помощью камеры Горяева.

Определение количества клеток SP

Из каждого флакона отбирали аликвоты по 1 млн клеток. Далее следовали стандартной методике идентификации клеток SP, как подробно описано в работе [4]. Кратко, клетки инкубировали с Хёхстом 33342 (Calbiochem — Behring CoGr., Германия) в концентрации 5мкг/мл в течение 90 минут при +37°С. Для контроля окрашивания часть проб перед добавлением Хёхста инкубировали в течение 15 мин с верапамилом в концентрации 12,5 мг/мл (ЭбевеФарма, Австрия) — блокатором АТФ-связывающих транспортеров, который препятствует обратному транспорту из клеток ряда веществ, в том числе Хёхста 33342. Перед анализом в образцы добавляли йодистый пропидий (2 мкг/мл). Относительное количество (%) клеток SP определяли среди клеток с неповрежденной плазматической мембраной, которые не окрашивались йодистым пропидием. Абсолютное

количество клеток SP вычисляли путем умножения доли этих клеток на общее количество клеток во флаконе.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Origin 6.0 (Microcal Software, Inc.) и Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Для описательной статистики количественных признаков использовали средние значения и стандартную ошибку. Для оценки взаимосвязи двух количественных признаков выполняли корреляционный анализ по Спирмену. Сравнение групп проводили по критериям Стьюдента (в случае нормального распределения) или Манна-Уитни (при отсутствии нормального распределения сравниваемых величин по тесту Шапиро-Уилка). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На рис. 1 показаны результаты исследования жизнеспособности клеток РМЖ линии MCF-7 с помощью МТТ-теста после их инкубации с ГК в различной концентрации. Наблюдалось статистически значимое снижение этого показателя с увеличением концентрации ГК. И только при использовании ГК в концентрации 0,3 мг/мл отличий по сравнению с контролем не отмечено.

Для экспериментов по оценке влияния высокомолекулярной ГК на ОСК была выбрана концентрация 0,6 мг/мл, поскольку она примерно соответствует физиологической концентрации [17]. Добавление ГК в этой концентрации в среду культивирования клеток не вызывало существенного изменения рН. Как показали результаты наших экспериментов, при использовании

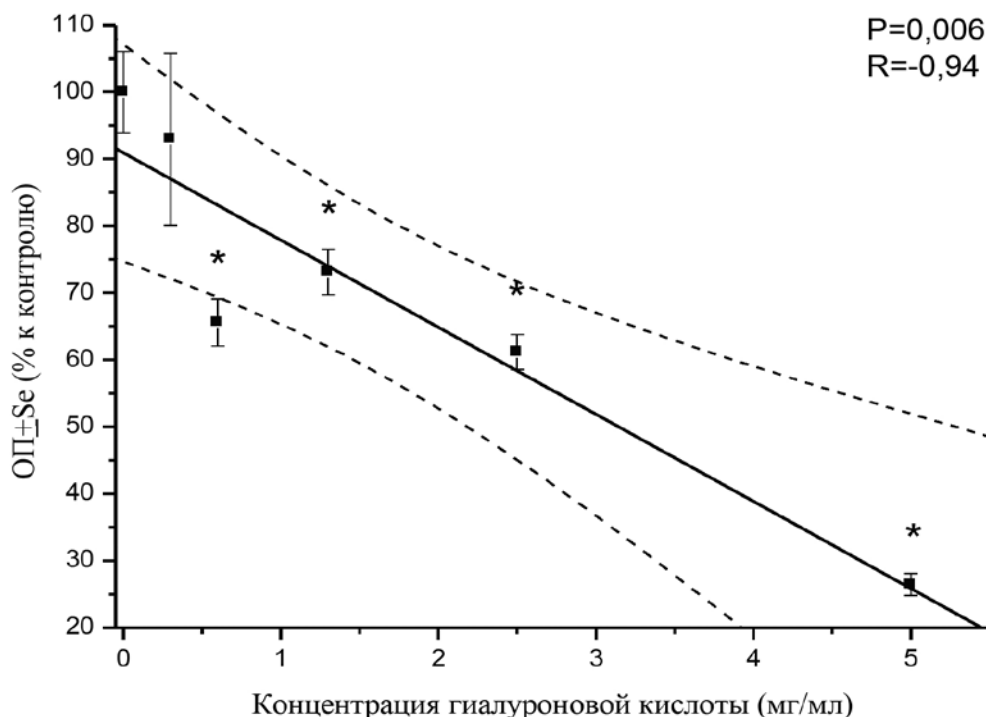


Рис. 1. Жизнеспособность опухолевых клеток рака молочной железы линии MCF-7 в зависимости от концентрации ГК по данным МТТ-теста. Пунктирные линии показывают 95% доверительный интервал для линейной регрессии. * $p < 0,05$ при сравнении с интактным контролем по критерию Манна-Уитни

ГК в этой концентрации жизнеспособность опухолевых клеток снижается на 34,4% (по данным МТТ-теста), общее количество — на 38,6% (по данным подсчета клеток в камере Горяева) по сравнению с интактным контролем ($p=0,0004$ и $0,025$ соответственно). Большая часть опухолевых клеток сохраняла жизнеспособность и можно было изучать эффекты действия ГК, опосредованные взаимодействием этого соединения с рецептором CD44 на плазматической мембране ОСК, и, возможно, с другими рецепторами ГК на поверхности опухолевых стволовых и не стволовых клеток.

Относительное количество ОСК, выявленных нами с помощью разных методов, значительно различалось, составляя в контрольных образцах $1,90\pm 0,19\%$ для SP и $0,29\pm 0,04\%$ для CD44⁺CD24^{-low} клеток, что соответствует известным данным литературы. Влияние ГК на эти клеточные субпопуляции изучалось в двух отдельных сериях экспериментов.

Как показано на рис. 2, инкубация с ГК приводила к повышению как относительного, так и абсолютного количества ОСК, выявленных методом SP, в 2,0 и 1,6 раз по сравнению с контролем ($p=0,002$ и $p=0,004$ соответственно). Важно, что этот эффект был продемонстрирован также с помощью другого метода идентификации ОСК — по иммунофенотипу CD44⁺CD24^{-low} (рис. 3). Так, относительное количество CD44⁺CD24^{-low} ОСК в контрольных образцах составляло в среднем $0,29\pm 0,04\%$, а в образцах, обработанных ГК, — $1,78\pm 0,32\%$ ($p=0,005$). Абсолютное количество ОСК во флаконе увеличивалось в 2,9 раза по сравнению с контролем ($p=0,02$).

Следует отметить, что интенсивность флуоресценции общей популяции клеток с антителами к CD44 практически не различалась в контрольных и опытных образцах ($6,2\pm 0,3$ и $6,4\pm 0,2$ отн. ед.), соответствуя контролю неспецифического связывания, т.е. не стволовые клетки линии MCF-7, составляющие подавляющее большинство в общей популяции, не экспрессировали CD44 вне зависимости от инкубации с ГК.

Обсуждение

Влияние ГК на общую популяцию опухолевых клеток линии MCF-7 исследовано нами с помощью МТТ-теста. Показано, что жизнеспособность опухолевых клеток снижается с увеличением концентрации ГК. Полученные данные согласуются с результатами исследования жизнеспособности фибробластов, которую оценивали по исключению красителя трипановый синий после инкубации клеточной культуры с ГК в течение 24-48ч *in vitro* [13]. Несмотря на суще-

ственные различия экспериментальных условий и метода детекции эффектов по сравнению с нашей работой, авторы также обнаружили дозозависимое уменьшение жизнеспособности клеток, инкубированных с ГК (молекулярная масса не указана). Авторы отмечают, что макромолекулы гиалуронана даже при сравнительно небольших концентрациях (0,5-1,0 мг/мл) образуют в водных растворах вязкие гелевые структуры. Молекула ГК с молекулярным весом 1-1,5 млн Да способна сорбировать в 100 раз больше воды, чем весит сама. Поэтому можно полагать, что при добавлении высокомолекулярной ГК в культуральную среду происходит локальное изменение концентрации солей, питательных веществ и, возможно, газового состава внеклеточной среды, что и является причиной гибели части клеток.

Интересно, что инкубация опухолевых клеток с ГК (0,6 мг/мл) не только не уменьшала количество ОСК, но, напротив, приводила к повышению относительного и абсолютного количества этих клеток. И если повышение относительного количества ОСК можно объяснить преимущественным сохранением именно этих клеток в условиях стрессового воздействия измененной среды культивирования, то для понимания причин повышения абсолютного количества ОСК этого объяснения недостаточно. Учитывая данные литературы, можно полагать, что под влиянием ГК происходит дедифференцировка части остальных (не стволовых) клеток и их переход в пул ОСК вследствие усиления процесса эпителиально-мезенхимальной трансформации опухолевых клеток [9]. Нельзя исключить также возможность пролиферации ОСК, сохранивших жизнеспособность при контакте с ГК (в отличие от остальных опухолевых клеток).

Данные, полученные нами в условиях *in vitro*, согласуются с результатами ряда исследований о роли экзо- и эндогенной ГК в формировании и поддержании пула стволовых клеток рака молочной железы, яичников, головы и шеи, глиобластомы и др. с помощью различных молекулярных механизмов [9, 18, 19]. Следует также отметить, что регуляция пула ОСК в условиях *in vivo* — значительно более сложный процесс, чем в клеточных культурах *in vitro*, поскольку включает влияние множества сигнальных молекул (например, TGF- β 1, FGF, IL-6, HIF, Wnt лиганды и т.д.), секретируемых не только опухолевыми, но и различными стромальными клетками [20, 21]. Поэтому выяснение закономерностей действия высокомолекулярной ГК на ОСК в злокачественных новообразованиях *in vivo* представляет особый интерес и требует дальнейших исследований.

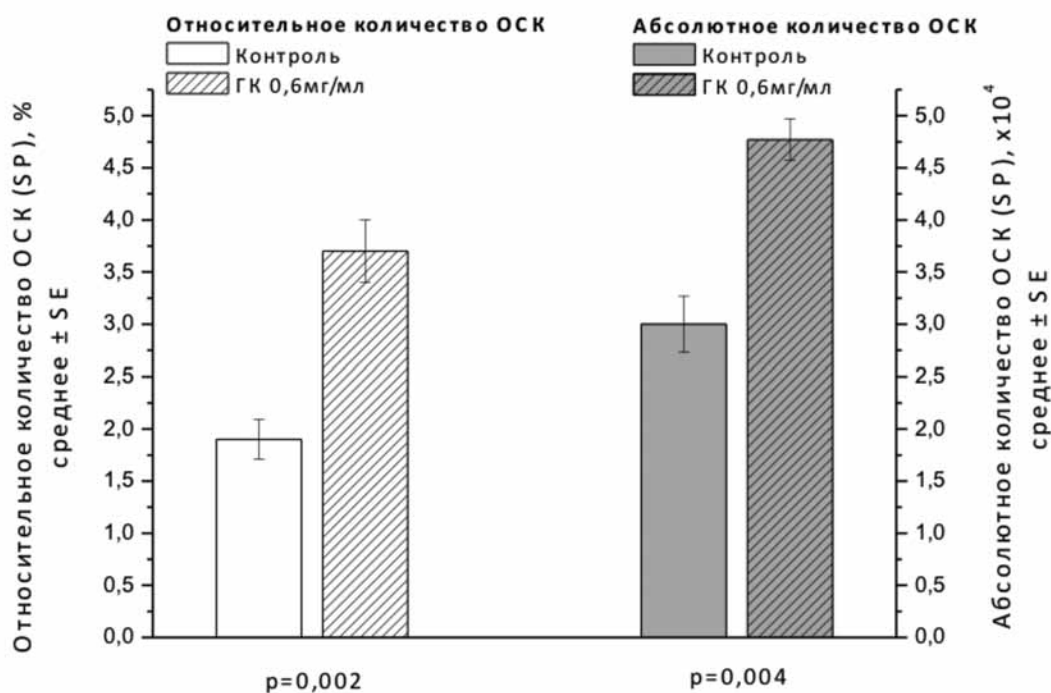
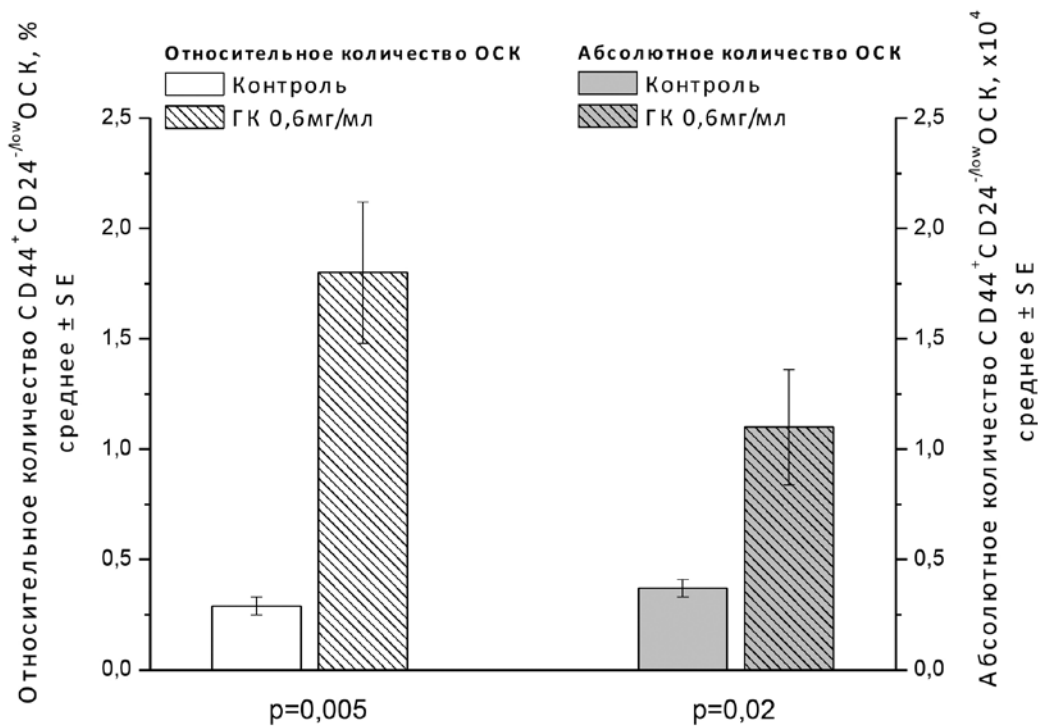


Рис. 2. Относительное (колонки слева) и абсолютное (колонки справа) количество ОСК (SP) в контроле и после инкубации с ГК в течение 72 ч. Приведены значения p, установленные при сравнении указанных групп по критерию Стьюдента



Ри. 3. Относительное (колонки слева) и абсолютное (колонки справа) количество CD44⁺CD24^{-low} ОСК в контроле и после инкубации с ГК в течение 72 ч. Приведены значения p, установленные при сравнении указанных групп по критерию Стьюдента

Заключение

Таким образом, воздействие высокомолекулярной ГК с массой $(1-3) \times 10^6$ Да на клетки РМЖ линии MCF-7 *in vitro* приводит к повышению относительного и абсолютного количества ОСК, в то время как жизнеспособность общей популяции опухолевых клеток в тех же условиях снижается. Полученные результаты проясняют некоторые закономерности влияния одного из основных компонентов внеклеточного матрикса (ГК) на ОСК — фракцию опухолевых клеток, резистентную к традиционным методам радио- и химиотерапии.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

- Olmeda F., Ben Amar M. Clonal pattern dynamics in tumor: the concept of cancer stem cells. *Sci Rep.* 2019; 9(1):15607. doi:10.1038/s41598-019-51575-1.
- Desai A., Yan Y., Gerson L.S. Concise reviews: cancer stem cell targeted therapies: toward clinical success. *Stem cells Translational Medicine.* 2019;8:75-81. doi: 10.1002/sctm.18-0123.
- Матчук О.Н., Замулаева И.А. Количественные изменения популяции стволовых клеток рака шейки матки линии HeLa под влиянием фракционированного γ -облучения *in vitro*. *Радиация и риск.* 2019;28(2):112-123. doi: 10.21870/0131-3878-2019-28-2-112-123 [Matchuk O.N., Zamulaeva I.A. Quantitative changes in the stem cell population of cervical cancer cell line HeLa under the influence of fractionated γ -irradiation *in vitro*. *Radiation and risk.* 2019;28(2):112-123. doi: 10.21870/0131-3878-2019-28-2-112-123 (In Russ.)].
- Замулаева И.А., Матчук О.Н., Селиванова Е.И. и др. Увеличение количества опухолевых стволовых клеток под воздействием редкоионизирующего излучения. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2014;54(3):256-64. doi: 10.7868/S0869803114030187 [Zamulaeva I.A., Matchuk O.N., Selivanova E.I. et al. Increase in the number of cancer stem cells after exposure to low-LET radiation. *Radiats Biol Radioecol.* 2014;54(3):256-64. doi: 10.7868/S0869803114030187 (In Russ.)].
- Peitzch C., Kurth I., Ebert N. et al. Cancer stem cells in radiation response: current views and future perspectives in radiation oncology. *Int J Radiat Biol.* 2019;95(7):900-911. doi: 10.1080/09553002.2019.1589023.
- Nunes T., Hamdan D., Leboeuf C. et al. Targeting cancer stem cells to overcome chemoresistance. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):4036. doi: 10.3390/ijms19124036.
- Lytle N.K., Barber A.G., Reya T. Stem cells fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nature Reviews.* 2018;18(11):669-680. doi: 10.1038/s41568-018-0056-x.
- Palomeras S., Ruiz-Martínez S., Puig T. Targeting Breast Cancer Stem Cells to Overcome Treatment Resistance. *Molecules.* 2018;23(9):2193. doi: 10.3390/molecules23092193.
- Price Z.K., Lokman N.A., Ricciardelli C. Differing Roles of Hyaluronan Molecular Weight on Cancer Cell Behavior and Chemotherapy Resistance. *Cancers (Basel).* 2018;10(12):482 doi: 10.3390/cancers10120482.
- Karousou E., Misra S., Ghatak S. et al. Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer. *Matrix Biol.* 2017;59:3-22. doi: 10.1016/j.matbio.2016.10.001.
- Tavianatou A.G., Caon I., Franchi M. et al. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS J.* 2019;286(15.):2883-2908. doi: 10.1111/febs.14777.
- Liu M., Tolg C., Turley E. Dissecting the Dual Nature of Hyaluronan in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2019;10:974. doi: 10.3389/fimmu.2019.00947.
- Хабаров В.Н. К вопросу о концентрации гиалуроновой кислоты в препаратах для биоревитализации. *Эстетическая медицина.* 2015;14(1):3-6 [Khabarov V.N. To the question of the concentration of hyaluronic acid in preparations for biorevitalization. *Esteticheskaya medicina.* 2015;14(1):3-6 (In Russ.)].
- Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:3983-3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100.
- Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R. et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res.* 2005; 65:6207-6219. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0592.
- Zhou J., Wulfkuhle J., Zhang H. et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(41):16158-16163. doi: 10.1073/pnas.0702596104.
- Kuo J.W. Practical aspects of hyaluronan based medical products. NY: CRC Press Taylor; 2005:107.
- Vaidyanath A., Mahmud H.B., Khayrani A.C. et al. Hyaluronic Acid Mediated Enrichment of CD44 Expressing Glioblastoma Stem Cells in U251MG Xenograft Mouse Model. *J Stem Cell Res Ther.* 2017;7:4. doi: 10.4172/2157-7633.1000384.
- Shiina M., Bourguignon L.Y. Selective activation of cancer stem cells by size-specific hyaluronan in head and neck cancer. *Int J Cell Biol.* 2015;2015:989070. doi: 10.1155/2015/989070.
- Skvortsov S., Skvortsova I.I., Tang D.G., Dubrovskaya A. Prostate Cancer Stem Cells: Current Understanding. *Stem Cells.* 2018;6(10):1457-1474. doi: 10.1002/stem.2859.
- Battle E., Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 2017; 23(10):1124-1134. doi: 10.1038/nm.4409.

Поступила в редакцию 10.09.2020 г.

*I.A. Zamulaeva, M.R. Abramova, O.N. Matchuk,
N.M. Lipunov, L.S. Mkrtychyan, L.I. Krikunova*

**Influence of high-molecular hyaluronic acid
on size of breast cancer stem cell population
of MCF-7 line**

A. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch
of the National Medical Research Radiological Center of
the Ministry of Health of the Russian Federation (A. Tsyb
MRRRC), Obninsk

In recent years, more and more data have been accumulating on the high radio- and chemo-resistance of tumor stem cells (CSCs), confirming the assumption that these cells play an important role in the recurrence of the tumor process in some cancer patients. Therefore it is of considerable interest to elucidate the patterns and mechanisms of the formation of the CSC pool under the influence of various factors, including one of the main components of the extracellular matrix, hyaluronic acid (HA).

The purpose of the study was to elucidate the effects of HA with a molecular weight of $(1-3) \times 10^6$ Da on the amount of CSCs in MCF-7 breast cancer cell culture in vitro.

Material and methods. Using the MTT test, the viability of MCF-7 cancer cells was determined after incubation with HA at a concentration of 0.3-5.0 mg/ml. Using flow cytometry, we evaluated the change in the relative and absolute amount of CSCs under the influence of HA (0.6 mg/ml). CSCs were detected by CD44+CD24-/low immunophenotype, as well as by their ability to efficiently efflux Hoechst 33342 fluorescent dye from cells and form so-called side population (SP).

Results. Viability of cancer cells in the general population decreased with increasing concentration of HA ($R=-0.94$, $p=0.006$). At the same time the incubation of cells with HA led to an increase in both the relative and absolute amounts of CSCs (SP) compared with the control. Thus, the relative number of SP cells increased by 2.0 times ($p = 0.002$), CD44 + CD24- / low cells — by 6.1 times ($p = 0.005$). The absolute number of these cells changed to a lesser extent compared to the control: the increase was 1.6 ($p = 0.004$) and 2.9 times ($p = 0.02$), respectively.

Conclusion. Thus, the effect of high-molecular weight HA on breast cancer cells of MCF-7 line leads to an increase in amount of CSCs, while the viability of non-stem cancer cells decreases under the same conditions.

Key words: hyaluronic acid, breast cancer, MCF-7, cancer stem cells, MTT test, flow cytometry, immunophenotyping