

УДК 57.085.23

©Коллектив авторов

**ВЫЯВЛЕНИЕ “БОКОВОЙ ПОПУЛЯЦИИ”,  
АССОЦИИРОВАННОЙ С РАКОВЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ,  
ПРИ ЦИТОМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФИОЛЕТОВОГО ЛАЗЕРА**

*А.Ю. Лунатов<sup>1,2\*</sup>, А.М. Гусина<sup>1</sup>, П.А. Каралкин<sup>1</sup>, К.Н. Ярыгин<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии медицинских наук  
Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича РАМН. 119121 Москва, ул. Погодинская, 10;  
тел.: (499)246-86-22; факс: (499)245-08-57; эл. почта: bio\_cell@mail.ru

<sup>2</sup>Учреждение Российской академии медицинских наук  
Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН

Исследована возможность цитометрического выявления раковых стволовых клеток солидных опухолей методом анализа “боковой популяции” с использованием цитофлуориметра, оснащенного фиолетовым лазером с длиной волны испускаемого света 405 нм. Клеточные линии рака яичника Skov-3 и колоректального рака Colo 320 формировали “боковые популяции” после витального окрашивания Hoechst 33342. Анализ клеток, выделенных из опухолевой ткани злокачественной меланомы и колоректальной аденокарциномы, также показал наличие “боковых популяций”, отличающихся повышенной эксклюзивией флуоресцентного красителя. Процент раковых клеток, составляющих “боковую популяцию” меланомы, совпадал с процентом клеток, одновременно экспрессирующих маркеры, характерные для раковых стволовых клеток – CD34 и CD44. В то же время, объём “боковой популяции” клеток колоректальной аденокарциномы был значительно меньше по сравнению с минорными клеточными популяциями, выявленными с помощью маркера CD133, либо в результате окрашивания раковых клеток другим флуоресцентным красителем – Родамином 123.

**Ключевые слова:** раковые стволовые клетки, “боковая популяция”, проточная цитометрия, злокачественная меланома, колоректальная аденокарцинома.

**ВВЕДЕНИЕ.** Ещё совсем недавно казалось очевидным, что все различия между раковыми клетками, составляющими опухоль, являются следствием мутагенеза и естественного отбора. Представление об исходной гетерогенности популяции раковых клеток появилось при исследовании острого миелолейкоза, когда выяснилось, что только незначительная часть клеток способна формировать новые опухоли в иммунодефицитных животных [1]. Вскоре, это представление распространилось и на солидные опухоли [2, 3]. Согласно иерархической теории [4], опухоли построены по тому же принципу,

\* - адресат для переписки

## ВЫЯВЛЕНИЕ “БОКОВОЙ ПОПУЛЯЦИИ” С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФИОЛЕТОВОГО ЛАЗЕРА

что и нормальная ткань, и включают раковые клетки различной степени дифференцированности, в том числе раковые стволовые клетки (РСК). РСК возникают из региональных стволовых клеток и подобно другим стволовым клеткам обладают способностью к ассиметричному делению, то есть служат источником как новых РСК, так и дифференцированных раковых клеток. Именно РСК способны инициировать образование метастазов. Кроме того, свойство стволовых клеток противостоять вредным факторам окружающей среды характерно и для РСК. В результате, РСК оказываются резистентными к химио- и радиотерапии, являясь причиной рецидивов заболевания. Таким образом, очевидна необходимость разработки методов терапии, направленных именно против РСК. В связи с этим, идентификация и выделение РСК становится чрезвычайно важной задачей.

Обычно для идентификации и выделения РСК методом проточной цитометрии используют один из двух подходов. Первый подход предполагает выявление молекулярных маркеров характерных для стволовых клеток на поверхности РСК. При помощи такого подхода, мы идентифицировали ряд минорных клеточных субпопуляций колоректальной аденокарциномы, экспрессирующих на своей мембране маркеры стволовых клеток, включая CD133 [5]. Другой подход основан на использовании свойства стволовых клеток откачивать из цитоплазмы определенные липофильные флуоресцентные красители. В основе этого свойства лежит повышенная экспрессия клеточных транспортеров в нормальных стволовых клетках и РСК. Эти же транспортеры и, прежде всего, молекулы, относящиеся к семейству ABC-транспортеров, ответственны за удаление из клеток химиопрепаратов, используемых при лечении онкологических заболеваний, и как следствие, повышенной резистентности РСК к терапии [6]. Наибольшее распространение получил метод выявления так называемой “боковой популяции”, изначально применявшийся для идентификации гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге [7]. Название метода связано с тем, что на флуорограмме, представленной в виде двумерного точечного графика с линейной системой координат, слабо окрашиваемые красителем Hoechst 33342 стволовые клетки находятся сбоку от основной популяции. Детектирование флуоресценции осуществляется при двух длинах волн, соответствующих синему (Hoechst blue) и красному (Hoechst red) диапазонам. При использовании данного метода были выделены в составе “боковой популяции” и идентифицированы как РСК клетки из ткани нейробластомы, рака молочной железы, рака лёгкого, асцита больных раком яичников, широкого ряда мезенхимальных опухолей, линий клеток глиобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы и рака желудка [8].

Максимум возбуждения Hoechst 33342 достигается при его облучении лазерным лучом с длиной волны около 350 нм, поэтому в экспериментах по выявлению “боковой популяции” чаще всего используют проточные цитометры, оснащенные аргоновым ультрафиолетовым лазером, такие как EPICS ALTRA (“Beckman Coulter”, США) или MoFlo (“DACOCytomation”, США). В своей работе мы используем проточный цитофлуориметр-сортер FACSAria (“BD Bioscience”, США), оснащённый тремя лазерами с длинами волн 633 нм, 488 нм и 405 нм. В связи с этим мы решили исследовать возможность выявления “боковой популяции” при помощи наиболее коротковолнового из доступных нам лазеров – фиолетового лазера с длиной волны 405 нм.

**МЕТОДИКА.** Клеточные линии рака яичника Skov-3 и колоректального рака Colo 320 выращивали в среде DMEM/F12 (“Gibco”, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (“HyClone”, США).

Для проведения анализа клетки культур открепляли от подложки с помощью последовательной обработки растворами Версена (“ПанЭко”, Россия) и трипсина (“ПанЭко”) и отмывали 2 раза в растворе Хенкса (“ПанЭко”). Количество клеток определяли путем их подсчёта в камере Горяева, жизнеспособность оценивали по окрашиванию трипановым синим.

Для получения суспензий клеток меланомы и колоректального рака часть ткани (0,5 см<sup>3</sup>), полученной после хирургического удаления опухоли, помещали в чашку Петри, содержащую 15-20 мл раствора Хенкса, и при помощи ножниц и пинцета удаляли участки, содержащие жировую ткань, сосуды, некротизированную ткань. Очищенную ткань отмывали путём последовательного промывания в 3-х чашках Петри, содержащих тот же раствор, и измельчали ножницами на максимально возможное количество кусков. Затем измельченную опухолевую ткань переносили в питательную среду DMEM (“Gibco”), содержащую 10% ЭТС, коллагеназу в концентрации 0,1 мг/мл, гиалуронидазу 0,01% и диспазу 0,01% (“Sigma-Aldrich”, США). Фрагменты опухоли инкубировали при постоянном помешивании в течение 2-х ч при температуре 37°C. Полученную суспензию клеток пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм (“BD Biosciences”). Отмывали два раза путём центрифугирования 5 мин, 200 g в растворе Хенкса. Определяли количество и жизнеспособность клеток.

Для выявления “боковой популяции”  $1 \times 10^6$  клеток инкубировали с Hoechst 33342 (“Sigma-Aldrich”) в концентрации 10 мкг/мл в течение 70 мин на водяной бане при 37°C в среде DMEM с 10 mM HEPES и 2% ЭТС. Для исключения из анализа мёртвых клеток суспензию окрашивали 7-амино-актиномицином D (7-AAD) в концентрации 2 мкг/мл. Клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером на льду, и после фильтрации через 30 мкм фильтр проводили измерения. Окрашивание Родамином 123 проводили при концентрации 0,1 мкг/мл в той же среде в течение 30 минут при 37°C. После отмывания клетки инкубировали 40 минут без красителя при тех же условиях. В некоторые пробы перед инкубированием с флуоресцентным красителем добавляли 100 мкМ верапамила (“Sigma-Aldrich”) для блокирования АВС-транспортёров.

Для анализа поверхностных маркеров проводили иммуноцитохимическое окрашивание клеток, используя моноклональные антитела к поверхностным антигенам: CD34, CD44, CD24, CD133, конъюгированные с одним из флуорохромов: аллофикоцианином (APC), флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE) (“Becton Dickinson”, США).  $1 \times 10^6$  клеток помещали в 1,5-мл пробирку типа “Eppendorf” и инкубировали с антителами в течение 30 мин при температуре +4°C. По завершению инкубации клетки 2 раза отмывали в 1 мл буфера для окрашивания, состоящем из фосфатно-солевого буфера (“ПанЭко”), 2% ЭТС и 0,1% азид натрия. Окрашенные клетки фиксировали в 0,5 мл 4% раствора параформальдегида и фильтровали через 30 мкм фильтр.

Цитометрический анализ клеток проводили при помощи проточного цитофлуориметра-сортера клеток FACSAria (“BD Biosciences”). Для управления прибором и первичного анализа данных, включая статистическую обработку, применяли пакет программ FACSDiva Software. Выделение (гейтирование), необходимое для количественной оценки клеточных популяций, проводили исходя из результатов измерения распределения клеток в отрицательном контроле. В качестве отрицательного контроля использовали неокрашенные витальным красителем клетки или клетки, обработанные изотипическими

## ВЫЯВЛЕНИЕ “БОКОВОЙ ПОПУЛЯЦИИ” С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФИОЛЕТОВОГО ЛАЗЕРА

антителами, конъюгированными с теми же флуоресцентными красителями, что и антитела к поверхностным маркерам.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Проблема выявления “боковой популяции” при помощи цитофлуориметра, не оснащённого ультрафиолетовым лазером обусловлена тем, что флуоресцентный краситель Hoechst 33342, имея максимум возбуждения в районе 350 нм, довольно слабо возбуждается излучением в видимой части спектра. При облучении этого красителя фиолетовым лазером с длиной волны 405 нм возбуждение составляет около 5% от максимального. Для экспериментальной оценки возможности выявления “боковой популяции” мы исследовали флуоресценцию витально окрашенных Hoechst 33342 клеточных культур в цитометрических экспериментах с использованием лазера 405 нм. Для выявления флуоресценции в красном диапазоне (Hoechst red) мы произвели изменение стандартной конфигурации цитофлуориметра-сортера FACS Aria. В тригональной системе детекторов, обеспечивающей анализ флуоресценции от возбуждения фиолетовым лазером, перед фотоумножителем “А” вместо светофильтра 530/30 нм был установлен узкополосный светофильтр 660/20 нм, который в стандартной конфигурации прибора используется в другой тригональной системе детекторов для анализа флуоресценции от возбуждения красным лазером. Схема регистрации флуоресценции, использованная в наших экспериментах, изображена на рисунке 1.

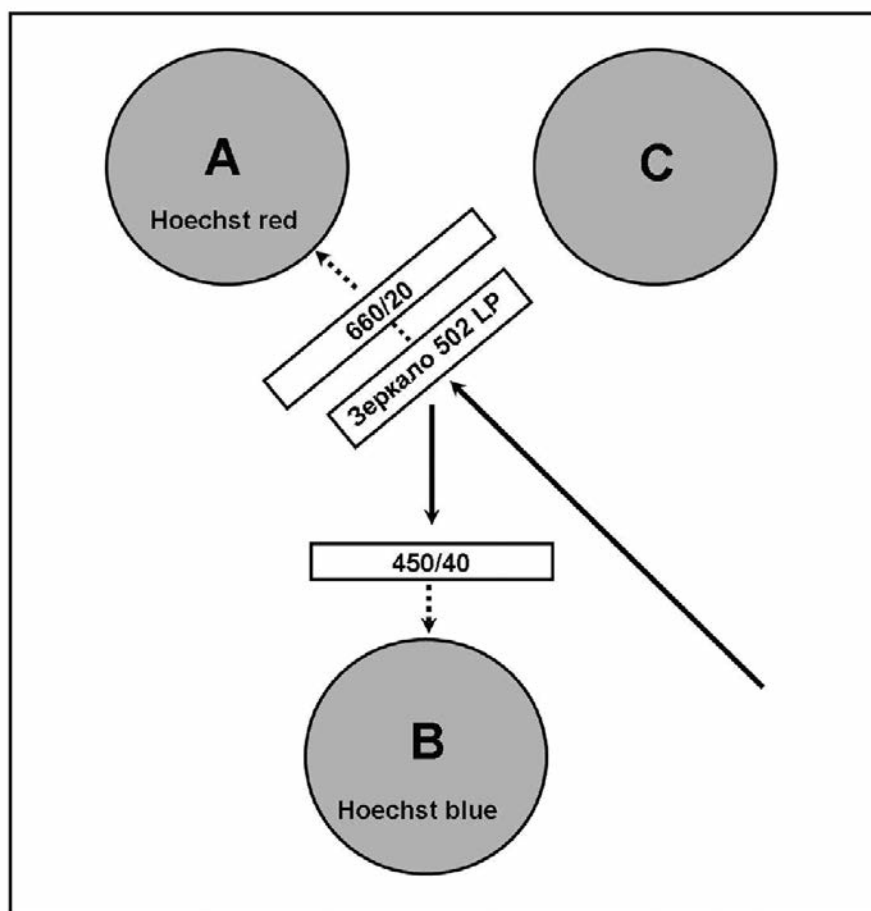


Рисунок 1.

Конфигурация детекторов проточного цитофлуориметра FACS Aria, использованная для выявления “боковой популяции” при помощи фиолетового лазера 405 нм.

Предварительно окрашенные Hoechst 33342 клетки линии рака яичника Skov-3 и колоректального рака Colo 320 анализировали в цитометрических экспериментах с описанной схемой детектирования флуоресценции. Нежизнеспособные клетки исключались из анализа по параметрам их прямого и бокового светорассеяния, а также по признаку окраски 7-AAD. При инкубации клеток с Hoechst 33342 в концентрации 10 мкг/мл в течение 70 мин, количество живых клеток в анализируемой популяции составляло не менее 75%. Цитометрический анализ показал, что интенсивность флуоресценции клеток возрастала на два-три порядка по сравнению с неокрашенным контролем, при использовании для возбуждения лазера с длиной волны 405 нм (рис. 2). Анализ клеточных культур на наличие “боковой популяции” выявил присутствие такой популяции как в культуре опухоли яичника Skov-3 (рис. 3а), так и в культуре колоректального рака Colo 320 (рис. 3б). Клетки, входящие в эту популяцию, составили соответственно 0,2% и 0,6% от общего количества клеток данной линии.

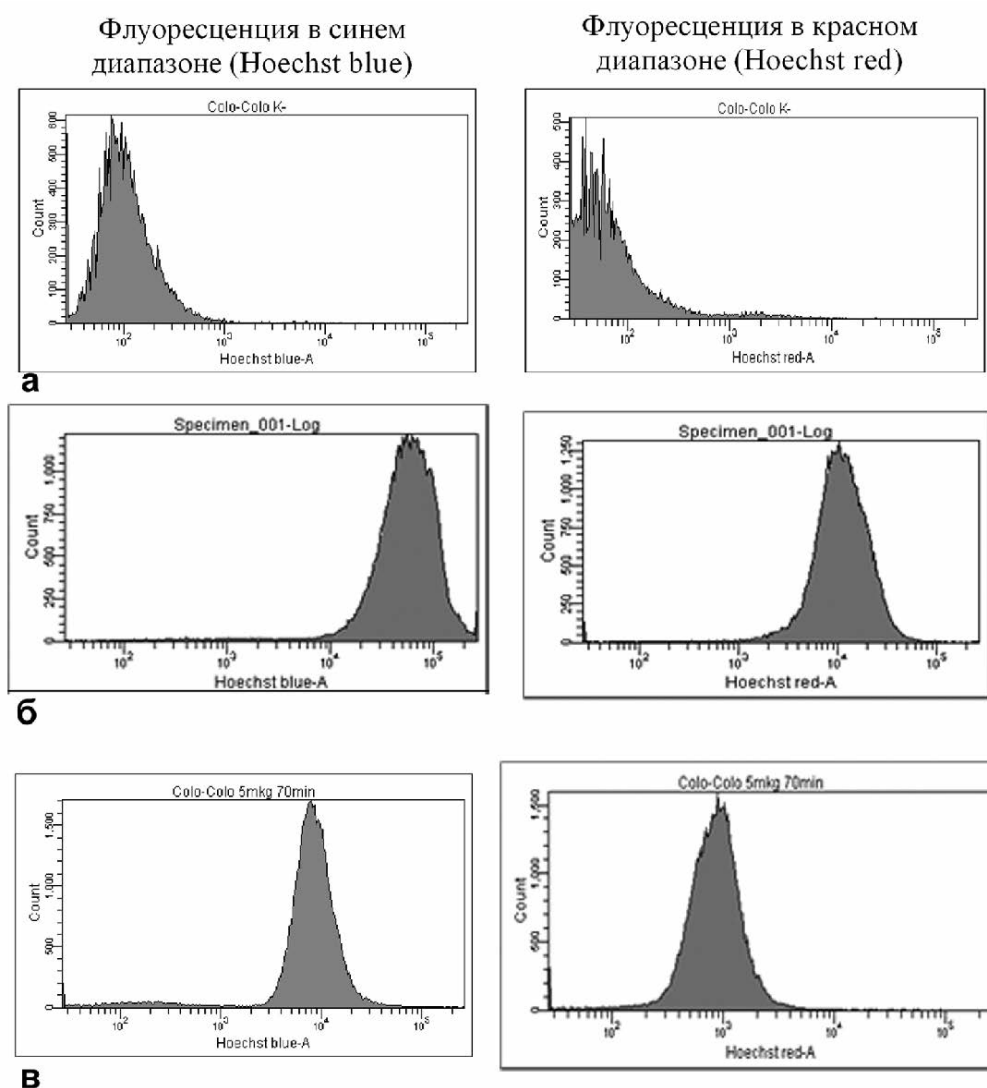


Рисунок 2.

Интенсивность флуоресценции клеток перевиваемых опухолевых линий, после их витального окрашивания Hoechst 33342 и возбуждения фиолетовым лазером 405 нм. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, выраженная в условных единицах. По оси ординат – количество проанализированных событий (клеток). а - неокрашенный контроль; б - клетки линии рака яичника Skov-3; в - клетки линии колоректального рака Colo 320.



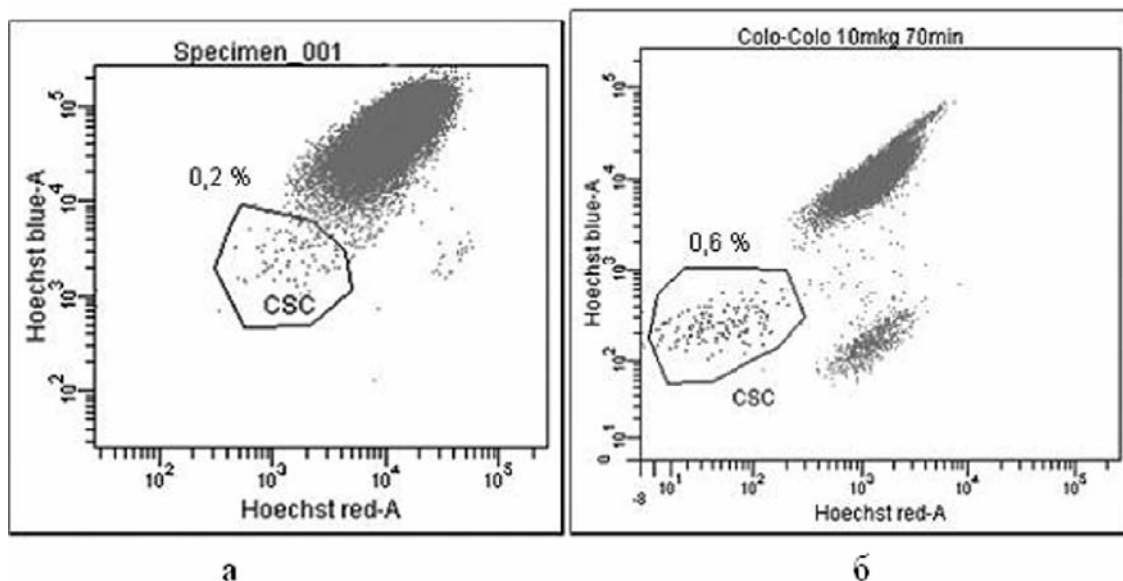


Рисунок 3.

“Боковые популяции”, выявленные в перевиваемых опухолевых линиях после их витального окрашивания Hoechst 33342. По осям абсцисс и ординат - интенсивность флуоресценции, выраженная в условных единицах.

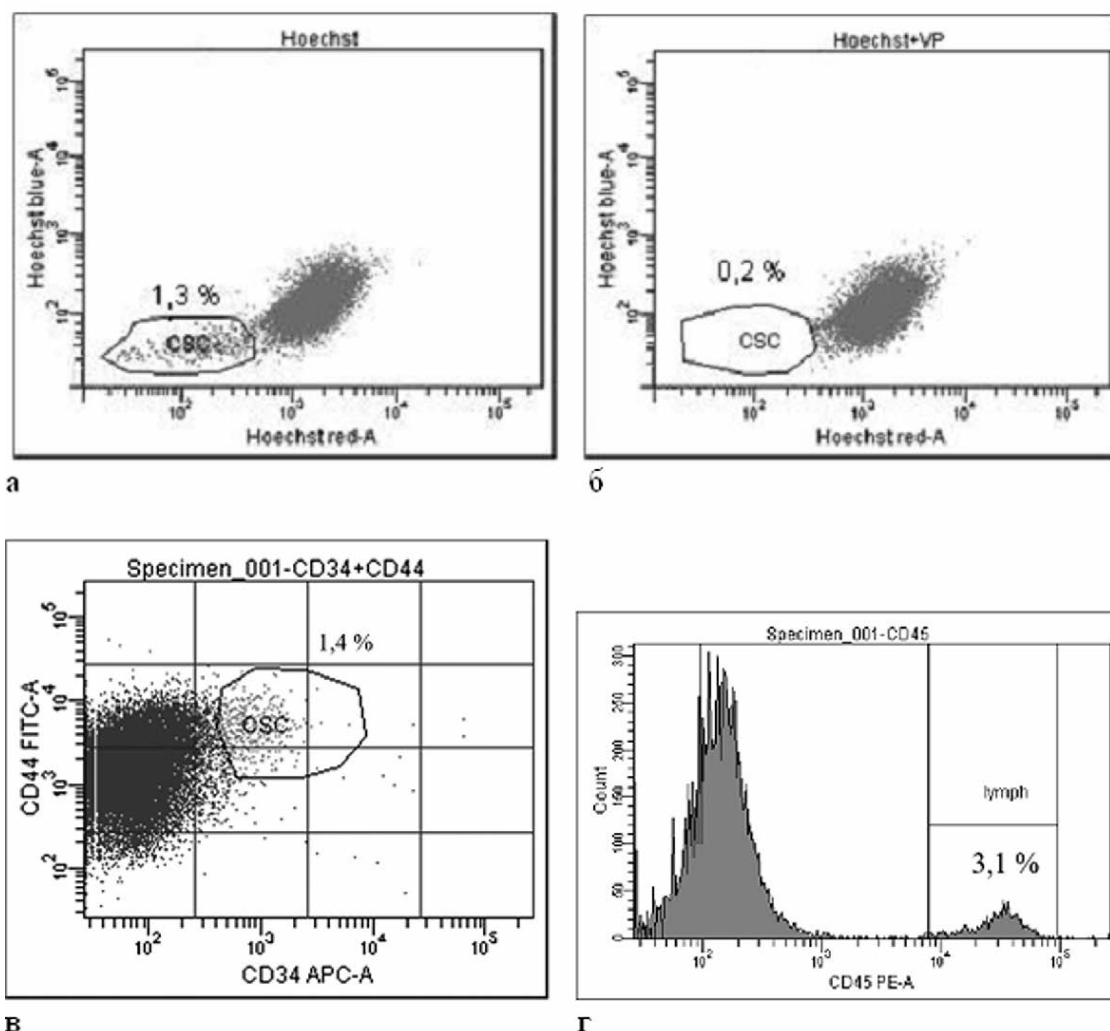
а - клетки линии рака яичника Skov-3; б - клетки линии колоректального рака Colo 320.

Следующей задачей явилось обнаружение “боковой популяции” в клеточном материале, полученном от больных злокачественными новообразованиями. Анализ клеточной суспензии раковых клеток от больной злокачественной меланомой выявил наличие “боковой популяции”, которая составляла 1,3% от общей популяции клеток (рис. 4а). Окрашивание клеток Hoechst 33342 в присутствии верапамила, блокирующего клеточные АВС-транспортеры, приводило к исчезновению “боковой популяции” (рис. 4б).

Суспензия клеток, полученная из того же опухолевого материала, была исследована на наличие поверхностных молекулярных маркеров CD34 и CD44, характерных для стволовых клеток, включая РСК [9-11]. Была выявлена минорная клеточная субпопуляция клеток меланомы, экспрессирующая на своей поверхности оба маркера (рис 4в). Интересно отметить, что размер этой субпопуляции составил 1,4% от общего количества раковых клеток, что совпадает с размером “боковой популяции”. Поскольку CD34 присутствует на гемопоэтических стволовых и прогениторных клетках, а CD44 может экспрессироваться на различных типах лейкоцитов, из анализа были исключены клетки с общим лейкоцитарным антигеном CD45 (рис. 4г).

Клетки колоректальной аденокарциномы также формировали “боковую популяцию” (рис. 5а), которая отсутствовала в случае предварительной инкубации клеток с верапамилом (рис. 5б). Размер этой популяции составил 0,8% от общего количества клеток.

В качестве одного из альтернативных методов выявления РСК колоректальной аденокарциномы мы использовали окрашивание клеток флуоресцентным красителем – Родамином 123 для возбуждения которого используется синий лазер 488 нм. Подобно Hoechst 33342, он также выводится из клеток одним из представителей семейства АВС-транспортеров [12]. В результате цитометрического анализа была выявлена клеточная популяция, слабо окрашенная Родамином 123 (рис. 5в). Она составляла 7,9% от общей клеточной популяции.



**Рисунок 4.**

Клеточные субпопуляции, выявленные в опухолевом материале от больных злокачественной меланомой.

а - после витального окрашивания Hoechst 33342;

б - после витального окрашивания Hoechst 33342 в присутствии верапамила;

в - после окрашивания моноклональными антителами к маркерам CD 34 и CD44;

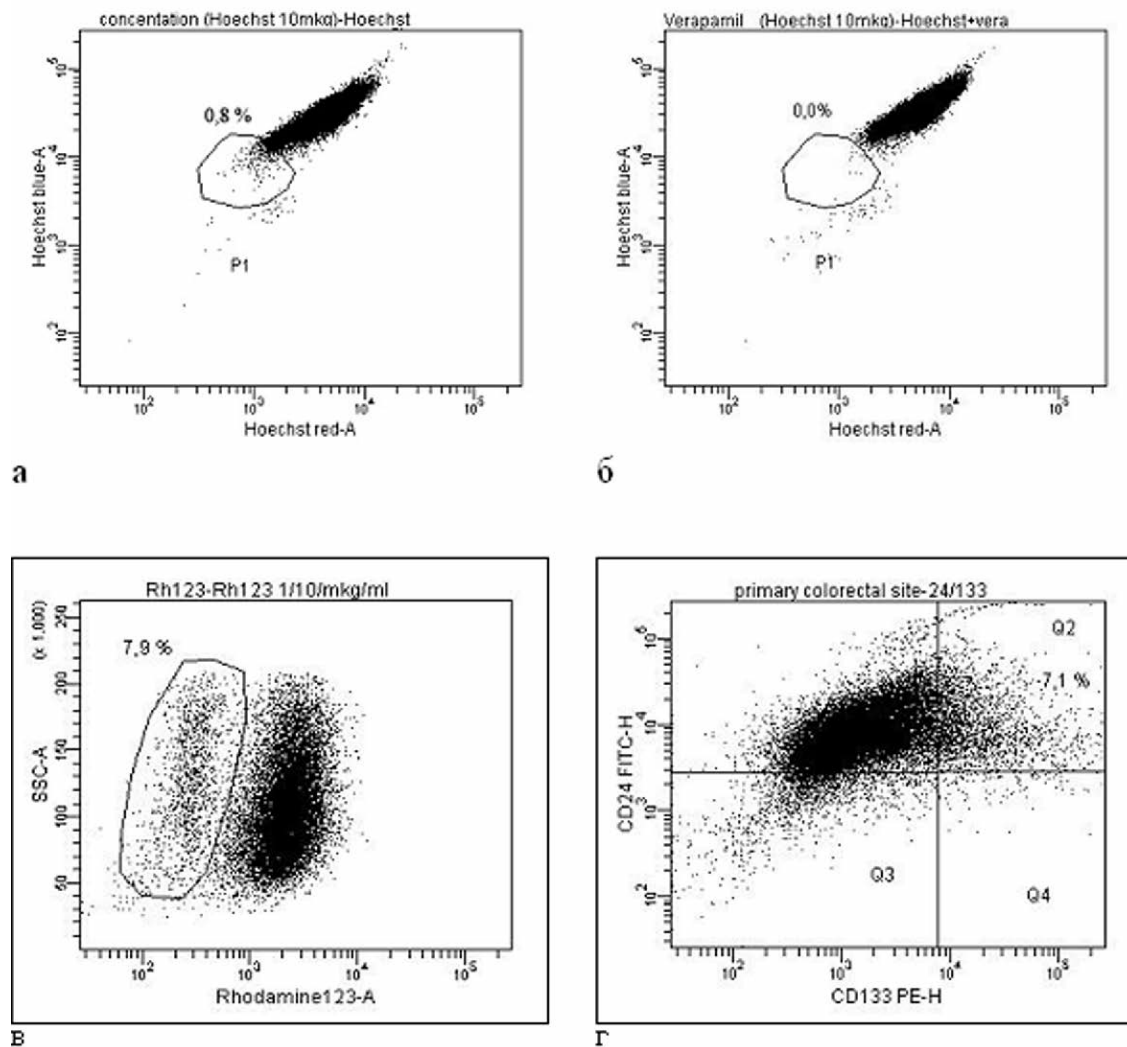
г - популяция клеток, экспрессирующая CD 45 и исключенная из анализа.

По осям абсцисс и ординат – интенсивность флуоресценции,

выраженная в условных единицах (а, б, в);

по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, выраженная в условных единицах;

по оси ординат – количество проанализированных событий (г).



**Рисунок 5.**

Клеточные субпопуляции, выявленные в опухолевом материале от больных колоректальной аденокарциномой.

а - после витального окрашивания Hoechst 33342;

б - после витального окрашивания Hoechst 33342 в присутствии верапамила;

в - после витального окрашивания Родамин 123;

г - после окрашивания моноклональными антителами к маркерам CD24 и CD 133.

По осям абсцисс и ординат – интенсивность флуоресценции,

выраженная в условных единицах (а, б, г);

по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, выраженная в условных единицах;

по оси ординат – боковое светорассеивание (в).



Ещё одним способом оценки количества РСК в клетках колоректальной аденокарциномы явился анализ экспрессии маркера CD133. По некоторым оценкам размеры популяции РСК в колоректальной аденокарциноме составляют от 1,8% до 24,5% клеток при использовании CD133 в качестве маркера [13]. Мы оценили наличие CD133 на клеточной мембране в контексте экспрессии эпителиального маркера CD24 и выявили совместное присутствие обеих молекул на 7,1% клеток колоректальной аденокарциномы (рис. 5г). Таким образом, объём “боковой популяции” клеток колоректальной аденокарциномы, выявленной при помощи фиолетового лазера, значительно отличался в меньшую сторону от популяций РСК, идентифицированных с использованием других методов анализа.

В результате проделанной работы при помощи проточной цитометрии с использованием фиолетового лазера были выявлены популяции клеток перевиваемых опухолевых линий, а также клеток, выделенных из опухолевого материала, которые слабо окрашивались Hoechst 33342. Эксперименты с верапамилом показали, что эти клеточные популяции, по-видимому, формируются в результате эксклюзии флуоресцентного красителя АВС-транспортерами и, следовательно, представляют собой “боковую популяцию”, ассоциированную с РСК. В то же время, интенсивность флуоресценции Hoechst 33342 при возбуждении фиолетовым лазером была явно недостаточна, для использования оптимальных настроек прибора. Измерения приходилось проводить при максимальной чувствительности фотоэлектронных умножителей, что приводило к ухудшению качества полученных результатов. Более того, чувствительности было недостаточно для представления результатов в линейной системе координат. Использование логарифмических координат для анализа привело к заметному отличию полученного нами изображения от стандартной картины, характерной для возбуждения ультрафиолетовым лазером. Значительное сжатие и смещение “боковой популяции”, а также ухудшение разрешения между основной и “боковой популяцией” явились неизбежным результатом анализа в логарифмической системе координат. Следствием этих проблем может явиться неполное представление РСК в “боковой популяции”, выявленное в наших экспериментах.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о возможности выявления “боковой популяции” в цитометрических экспериментах с использованием фиолетового лазера с длиной волны испускаемого света 405 нм. Однако качественные характеристики получаемых результатов существенно хуже, чем при использовании ультрафиолетового лазера. Таким образом, проточные цитофлуориметры, оснащённые фиолетовым лазером с длиной волны 405 нм могут иметь лишь ограниченное применение для выявления РСК методом анализа “боковой популяции”.

Работа выполнена в рамках государственного контракта П811 от 17.08.2009 с Министерством образования и науки Российской Федерации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M.A., Dick J.E.* (1994) *Nature*, **367**, 645-648.
2. *Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3983-3988.

3. *Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire J., Dirks P.B.* (2003) *Cancer Res.*, **63**, 5821-5828.
4. *Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.* (2001) *Nature*, **414**, 105-111.
5. *Гисина А.М., Лупатов А.Ю., Каралкин П.А., Майновская О.А., Петров Л.О., Сидоров Д.В., Ярыгин В.Н., Ярыгин К.Н.* (2011) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **151**(2), 198-203.
6. *Dean M., Fojo T., Bates S.* (2005) *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 275-284.
7. *Goodell M.A., Brose K., Paradis G., Conner A.S., Mulligan R.C.* (1996) *J. Exp. Med.*, **183**, 1797-1806.
8. *Wu C., Alman B.A.* (2008) *Cancer Lett.*, **268**, 1-9.
9. *Greaves M.F., Brown J., Molgaard H.V., Spurr N.K., Robertson D., Delia D., Sutherland D.R.* (1992) *Leukemia*, **6**, 31-36.
10. *Prince M.E., Sivanandan R., Kaczorowski A., Wolf G.T., Kaplan M.J., Dalerba P., Weissman I.L., Clarke M.F., Ailles L.E.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 973-978.
11. *Yu F., Yao H., Zhu P., Zhang X., Pan Q., Gong C., Huang Y., Hu X., Su F., Lieberman J., Song E.* (2007) *Cell*, **131**, 1109-1123.
12. *Raaijmakers M.H.* (2007) *Leukemia*, **21**(10), 2094-2102.
13. *Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., De Maria R.* (2007) *Nature*, **445**, 111-115.

Поступила: 07. 09. 2011.

# IDENTIFICATION OF "SIDE POPULATION" ASSOCIATED WITH CANCER STEM CELLS BY FLOW CYTOMETRY WITH VIOLET LASER

*A.Yu. Lupatov<sup>1,2</sup>, A.M. Gisina<sup>1</sup>, P.A. Karalkin<sup>1</sup>, K.N. Yarygin<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: +7 (499) 246-86-22; fax: +7 (499) 245-08-57; e-mail: bio\_cell@mail.ru

<sup>2</sup>The Institute of General Pathology and Pathophysiology of Russian Academy of Medical Sciences

The possibility of identification of cancer stem cells "side population" in solid tumors by using the flow cytometer equipped with 405 nm violet laser was investigated. Ovarian cancer (Skov-3) and colon cancer (Colo 320) cell lines formed the "side population" after vital staining with Hoechst 33342. Analysis of cells isolated from tumor tissue of malignant melanoma and colorectal cancer, also revealed "side population" that was a result of the fluorescent dye exclusion. The percentage of melanoma cells included in the "side population" was the same as that of cells co-expressing cancer stem cells markers - CD34 and CD44. In contrast, the colon cancer "side population" was significantly smaller than the minor populations of colon cancer cells identified by either CD133 expression or exclusion of Rhodamine 123.

**Key words:** cancer stem cells, "side population", flow cytometry, malignant melanoma, colon cancer.