

РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

УДК [57 + 61]::616-006.6:618.19:615.84:615.832:57.085.23:539.1.047

ВЫСОКАЯ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК MDA-MB-231 КАК ПРЕДПОСЫЛКА ДЛЯ ТЕРМОРАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

© 2023 г. А. О. Якимова^{1,*}, А. Е. Кабаков¹

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

*e-mail: anna.prosovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 01.02.2022 г.

После доработки 27.10.2022 г.

Принята к публикации 09.11.2022 г.

Работа посвящена анализу термочувствительности и эффективности термосенсибилизации к воздействию γ -излучения трех клеточных линий рака молочной железы различных молекулярных подтипов. Установлено, что клетки исследуемых линий отличаются по чувствительности к гипертермии и, как следствие, по эффективности терморадисенсибилизации, что поднимает вопрос о поиске критериев оценки целесообразности применения гипертермии в каждом конкретном случае. Показано, что такими критериями могут служить уровень индукции экспрессии гена *HSP70* в ответ на гипертермию и уровень геномной нестабильности клеток. Установлено, что эффективность терморадисенсибилизации существенно выше у клеток линии MDA-MB-231 по сравнению с клетками других исследованных линий. Полученные данные позволяют предполагать, что применение гипертермии в качестве сенсibiliзирующего к радиотерапии воздействия может быть особенно перспективно при лечении трижды негативного рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, гипертермия, γ -излучение, терморадисенсибилизация, экспрессия *HSP70*, белки теплового шока, геномная нестабильность

DOI: 10.31857/S0869803123010113, EDN: JYVZVE

Рак молочной железы (PMЖ) является социально значимой проблемой, занимая первое место среди онкологических заболеваний у женщин в России [1]. Согласно одной из существующих классификаций, актуальных в настоящее время, по экспрессии рецепторов к эстрогену (ER), прогестерону (PR) и одному из рецепторов к эпидермальному фактору роста (HER-2) выделяют различные молекулярные подтипы PMЖ, среди которых наиболее распространены: люминальный тип A (ER⁺/PR⁺/HER-2⁻), люминальный тип B (ER⁺/PR⁺ либо PR⁻/HER-2⁺), HER-2 обогащенный (ER⁻/PR⁻/HER-2⁺) и трижды-негативный PMЖ (ER⁻/PR⁻/HER-2⁻), причем именно трижды негативный рак молочной железы (ТН-PMЖ), названный так из-за отсутствия на поверхности клеток трех рецепторов – ER, PR и HER2 – является самым неблагоприятным вариантом для пациента [2, 3]. В связи с этим актуальной задачей является поиск подходов для сенсibiliзации клеток PMЖ к различным терапевтическим воздействиям, включая химио- и радиотерапию, что особенно важно в случае ТН-PMЖ, который ха-

рактеризуется высокой агрессивностью на фоне низкой чувствительности к различным вариантам терапии, включая таргетную иммунотерапию.

Одним из самых перспективных подходов для сенсibiliзации опухолевых клеток к химио- и радиотерапии считается гипертермия [4, 5]. Примечательно, что усиление эффектов химио- и радиотерапии в этом случае обусловлено действием нескольких механизмов, среди которых особое место занимает протеотоксический стресс и так называемый “Heat Shock Response” – индуцированный прогревом специфический стресс-ответ. Под действием повышенной температуры в клетке денатурирует и агрегирует множество термолabile белков (включая и те, что нужны для репарации ДНК), что приводит к потере функциональности соответствующих молекулярных процессов в клетке. Кроме того, протеотоксический стресс способствует запуску механизма апоптоза. Ситуацию усугубляют особенности протекания теплового стресс-ответа: в ответ на гипертермию происходит индукция экспрессии генов семейства *HSP* (*Heat Shock Proteins*), кодирующих

одноименные белки теплового шока (HSP), и одновременно угнетается экспрессия других генов, в том числе, отвечающих за репарацию поврежденного ДНК [6–8]. В результате формируется терапевтическое окно, в течение которого клетка оказывается сенсibilизирована к различным повреждающим воздействиям, включая химио- и радиотерапию, поскольку в этот период времени фактически не имеет ресурсов для репарации возникающих повреждений ДНК. Следует отметить, что наряду с сенсibilизирующим эффектом гипертермии, который во многом определяется уровнем вызванного прогревом протеотоксического стресса [9], применение этого подхода несет ряд существенных рисков. Синтезируемые в большом количестве в ходе реализации теплового стресс-ответа белки теплового шока играют важную роль в механизмах клеточной защиты и адаптации, и их накопление может способствовать повышению радио- и химиорезистентности опухолевых клеток. Известно также, что усиление экспрессии различных HSP в ткани опухоли зачастую ассоциировано с плохим прогнозом для пациента [10]. В связи с этим для принятия решения о целесообразности применения гипертермии в составе комбинированной терапии необходимо учитывать термочувствительность опухолевых клеток в каждом конкретном случае.

Ранее нами была показана возможность эффективной сенсibilизации при помощи гипертермии клеток РМЖ линии MCF-7/MDR1, являющейся моделью химиорезистентного РМЖ люминального типа А, к γ -излучению [11]. Поскольку линия MCF-7/MDR1 является более радиорезистентной по сравнению с материнской линией клеток MCF-7, эти данные позволили заключить, что радио- и химиорезистентный фенотип не всегда коррелирует с терморезистентностью. В связи с этим основной целью данной работы стало изучение возможности использования гипертермии в качестве радиосенсibilизирующего воздействия на клетки линии MDA-MB-231 (модель одного из самых агрессивных видов РМЖ — триждынегативного РМЖ базального подтипа). В ходе исследования были проанализированы особенности реакции клеток линии MDA-MB-231 на гипертермию на молекулярном и клеточном уровне, а также эффективность терморадисенсibilизации клеток линии MDA-MB-231 к γ -излучению по сравнению клетками линий MCF-7 и MCF-7/MDR1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Линии клеток и условия культивирования

В работу взяты клетки трех линий РМЖ различных молекулярных подтипов: MCF-7 и MCF-7/MDR1 — химиочувствительный и химио-

резистентный варианты РМЖ люминального типа А, MDA-MB-231 — ТН-РМЖ базального подтипа, полученный из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, cif), а также линия клеток рака шейки матки (РШМ) HeLa, которая считается термоустойчивой [12, 13]. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂, влажность 100%) на среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10%-ной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), пенициллина (50 ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл).

Условия гипертермии и облучения

Гипертермию проводили в водяной бане RC6 LAUDA (Германия). Клетки прогревали при 43°, 44° и 45°C в течение 30 мин: для проведения МТТ-теста — через 24 ч после посева клеток, для оценки клоногенной активности — через 3 сут после посева; для анализа экспрессии генов — прогрев осуществляли при 43°C в течение 1 ч через 3 сут после посева.

Клетки подвергали воздействию γ -излучения ⁶⁰Со на установке “Агат” через 1 либо 3 суток после посева клеток (сразу после проведения гипертермии в случае комбинированного воздействия) в дозе 5 Гр (при мощности дозы 1 Гр/мин).

Оценка термочувствительности и эффективности терморадисенсibilизации клеток

Термочувствительность и эффективность терморадисенсibilизации клеток оценивали косвенно при помощи теста на метаболическую активность клеток с использованием тетразолиевого красителя МТТ [14], а также путем прямого подсчета доли клеток с аномальными ядрами при помощи микроскопии.

МТТ-тест проводили через 3 сут после воздействия. Условную выживаемость клеток после гипертермии вычисляли по оптической плотности (ОП) в процентах от уровня в контроле. Принимая во внимание отличия в радиочувствительности сравниваемых линий клеток, эффективность терморадисенсibilизации для каждой клеточной линии оценивали по ОП в процентах от уровня в соответствующих группах, облученных в дозе 5 Гр.

Для прямого подсчета доли клеток с аномальными ядрами клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом, окрашивали ядра интеркалирующим флуоресцентным красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), фотографировали по пять полей зрения из каждой лунки на конфокальном микроскопе Leica DMI4000 (Leica Microsystems, Германия), затем подсчитывали общее количество ядер (что соответствует общему

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых в работе
Table 1. Nucleotide sequences of primers used in the work

№	Целевой ген	Последовательность 5'→3' и тип праймера (F – прямой, R – обратный)	Длина ампликона, п.н.
1	HSP70	F: CCTGCGAGAGGGCCAAGA	111
2		R: CGAACCTCGCCCTGGTGA	
3	ALAS1	F: TGCTGCAAAGATCTGACCCCTC	113
4		R: AAATCATGGGCCACATCACAC	

числу клеток) и долю среди них аномальных ядер (гигантских, лопастных и содержащих микроядра) при помощи программы ImageJ.

Анализ экспрессии генов после действия гипертермии

Сбор проб РНК проводили спустя 0 (сразу после воздействия), 2, 4, 6, 8 и 24 ч после гипертермии, а также в контрольных клетках, не подвергавшихся действию повышенной температуры. Клетки лизировали при помощи реагента RNeasy (Sigma, США). Дальнейшее выделение и очистку РНК проводили согласно инструкции производителя. Качество очищенной РНК проверяли при помощи электрофореза по соотношению 16S и 28S рибосомальной РНК в пробе, а также на спектрофотометре “NanoDrop” (NanoDrop Technologies, США). По 1 мкг РНК с каждой пробы брали для получения кДНК при помощи набора реагентов High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия). Анализ уровня экспрессии генов осуществляли при помощи ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе “Rotor Gene” (“Corbet Research”, Австралия) с использованием набора реагентов “SYBR® Premix Ex Taq™ II” (TaKaRa Bio Inc., Япония) согласно инструкции производителя. Программа амплификации: 94°C 4 мин, затем 40 циклов: {94°C 10 с, 61°C 20 с, 72°C 20 с}. Обработку данных проводили при помощи встроенного программного обеспечения амплификатора. Анализ динамики изменения уровня экспрессии генов, отражающей транскрипционный ответ на гипертермию, проводили методом $\Delta\Delta C_t$ с учетом существующих рекомендаций [15]. В качестве референсного был выбран ген “домашнего хозяйства” *ALAS1*, показавший высокую стабильность экспрессии независимо от применяемых воздействий, по результатам анализа стабильности экспрессии при помощи сервиса RefFinder [16]. Последовательности прямых и обратных праймеров, используемых в работе, приведены в табл. 1.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ “Origin 6.0” (Microcal Software, Inc.) и “Statistica 6.0” (StatSoft, Inc.). Для описательной статистики рассчитывали среднее значение $\pm SE$ (либо $\pm 95\%$ -ный доверительный интервал) в сравниваемых группах. Статистическую значимость отличий оценивали по *U*-критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Чувствительность клеток различных линий к гипертермии и γ -излучению и оценка эффективности их терморადиосенсибилизации

По результатам МТТ-теста установлено, что клетки исследуемых линий отличаются друг от друга по чувствительности к различным вариантам гипертермии и γ -излучению (рис. 1). Примечательно, что гипертермия в течение 30 мин при 43°C в водяной бане не оказала существенного влияния на условную выживаемость клеток относительно контрольных значений. Прогрев в течение 30 мин при 44°C оказал более выраженное воздействие на клетки исследуемых линий, однако статистически значимое снижение показателей наблюдалось только при сравнении клеток MCF-7 с клетками MCF-7/MDR1 ($p = 0.0001$) и HeLa ($p = 0.0006$), а также между MCF-7/MDR1 и MDA-MB-231 ($p = 0.01$). Большой разброс полученных значений не позволил считать статистически значимым отличие показателей клеток MDA-MB-231 от таковых у клеток HeLa, несмотря на то, что в среднем выживаемость клеток MDA-MB-231 была ниже, чем у клеток этой линии, и сопоставима с таковой клеток MCF-7. В случае же прогрева в течение 30 мин при 45°C становится очевидным, что самой термочувствительной является линия клеток MDA-MB-231 ($p < 0.00004$): условная выживаемость этих клеток относительно уровня в контроле не превышает 50% через 3 сут после воздействия, в то время как выживаемость второй по чувствительности к прогреву линии – MCF-7 – в среднем составляет 75%, а выживаемость клеток линий MCF-7/MDR1 и HeLa превышает 80%. Таким образом, среди

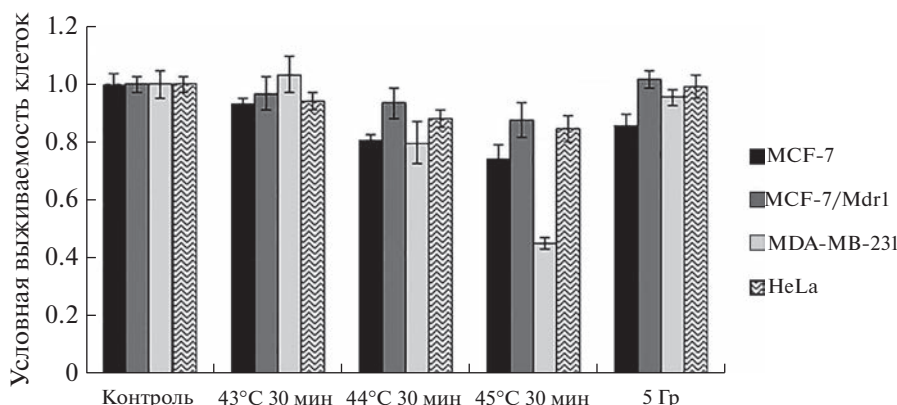


Рис. 1. Оценка чувствительности исследуемых линий опухолевых клеток к различным вариантам воздействий по результатам МТТ-теста.

По оси Y: условная выживаемость клеток относительно уровня контроля (принят за 1) в зависимости от воздействия (среднее $\pm$ 95%-ный доверительный интервал). Пояснения в тексте.

Fig. 1. Evaluation of the sensitivity of the studied tumor cell lines to various treatment options according to the results of the MTT test. On the Y-axis: conditional cell survival relative to the control level (taken as 1) depending on the exposure (mean $\pm$ 95% CI). Explanations are in the text.

сравняемых клеточных линий в условиях данного эксперимента наиболее термоустойчивыми оказались клетки линии MCF-7/MDR1 (химио-резистентный вариант рака молочной железы) и, как и ожидалось, линии HeLa. Следует отметить, что клетки этих двух линий статистически значимо не отличаются друг от друга по чувствительности к прогреву в данных условиях.

Согласно полученным данным, клетки линии MCF-7 более чувствительны к воздействию γ -излучения, чем клетки линий MCF-7/MDR1, MDA-MB-231 и HeLa ($p < 0.001$).

На рис. 2 представлены результаты МТТ-теста, отражающие эффективность терморадисенсибилизации клеток различных линий к γ -излучению в дозе 5 Гр при использовании различных режимов гипертермии. Согласно полученным данным, 30-минутная гипертермия при 44 и 45°C позволяет сенсибилизировать клетки всех исследуемых линий к γ -излучению дозе 5 Гр, что проявляется в снижении их условной выживаемости относительно таковой при применении облучения отдельно ($p < 0.03$ по сравнению с действием 5 Гр отдельно для клеток линии MCF-7/MDR1; $p < 0.0002$ — для остальных клеточных линий). При этом наибольшая эффективность терморадисенсибилизации показана для клеток линии MDA-MB-231. Полученные данные поднимают вопрос о механизмах, лежащих в основе.

Сравнительная характеристика динамики транскрипционного ответа на гипертермию клеток исследуемых линий

Одним из последствий протеотоксического стресса, вызванного гипертермией, является вы-

свобождение белков HSP70 и HSP90 из комплекса с транскрипционным фактором HSF1, поскольку их сродство к денатурированным белкам выше, чем к HSF1. В результате HSF1 активируется и направляется в ядро клетки, где запускает экспрессию генов семейства *HSP*, кодирующих различные белки теплового шока [6–8]. Мы предположили, уровень протеотоксического стресса, вызванного гипертермией, может отличаться в клетках исследуемых линий, и эти отличия будут определять параметры динамики экспрессии генов *HSP*. В ходе работы методом ПЦР “в реальном времени” в клетках исследуемых линий была проанализирована динамика экспрессии индуцибельного гена *HSP70* (синоним — *HSPA1A*), поскольку, с одной стороны, HSP70 играет важную роль в развитии и патогенезе РМЖ, включая ТН-РМЖ [17], а с другой стороны, это ген может служить индикатором активации транскрипционного ответа на гипертермию в целом.

Сравнение динамики изменения уровня экспрессии гена *HSP70* в ответ на гипертермию выявило особенности протекания стресс-индуцированного транскрипционного ответа у каждой из тестируемых линий клеток. В ходе работы установлено, что клетки исследуемых линий отличаются друг от друга не только по интенсивности и длительности транскрипционного ответа на гипертермию, но и по времени достижения максимума экспрессии гена *HSP70*. Результаты анализа динамики экспрессии гена *HSP70* в ответ на гипертермию в течение 1 ч при 43°C представлены на рис. 3.

Согласно полученным данным, наиболее мощная индукция экспрессии гена *HSP70* характерна для линии клеток триждынегативного рака

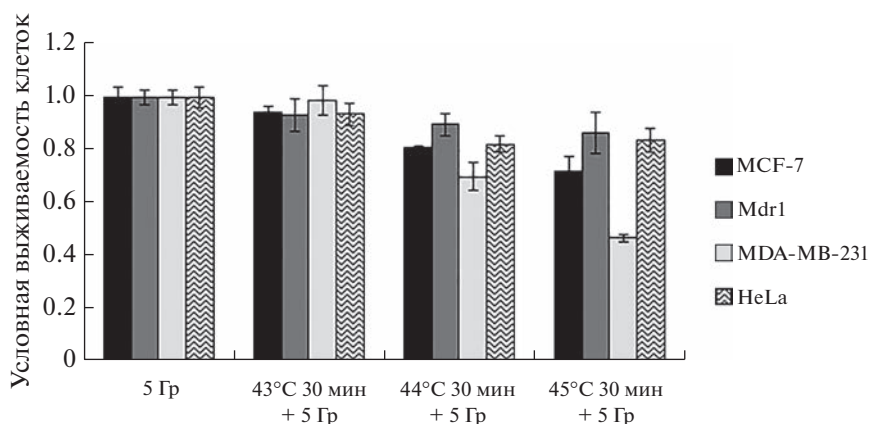


Рис. 2. Оценка эффективности терморадисенсибилизации различных линий опухолевых клеток по результатам МТТ-теста.

По оси Y: условная выживаемость клеток относительно уровня в группах, облученных в дозе 5 Гр (принят за 1) в зависимости от условий гипертермии (среднее $\pm 95\%$ -ный доверительный интервал). Пояснения в тексте.

Fig. 2. Evaluation of the effectiveness of thermoradiosensitization of various tumor cell lines based on the results of the MTT test. On the Y-axis: conditional cell survival relative to the level in groups irradiated at a dose of 5 Gy (taken as 1) depending on hyperthermia conditions (mean $\pm 95\%$ CI). Explanations are in the text.

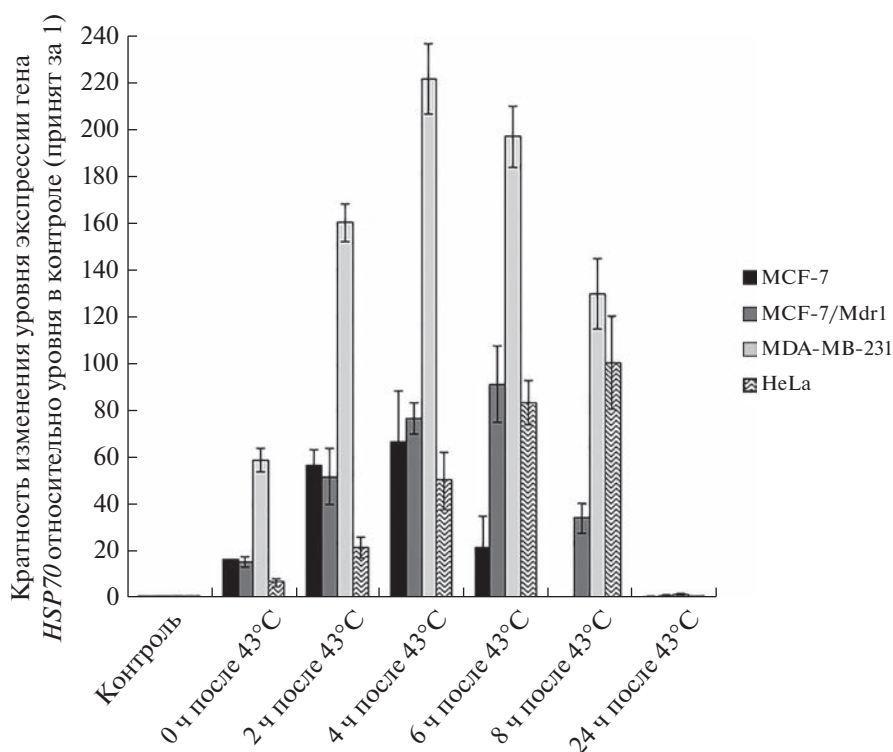


Рис. 3. Динамика транскрипционного ответа на гипертермию (1 ч при 43°C) по гену *HSP70* в опухолевых клетках различных линий.

По оси Y: кратность увеличения уровня экспрессии *HSP70*, нормированного на уровень экспрессии референсного гена *ALAS1*, относительно уровня в контроле (среднее $\pm 95\%$ -ный доверительный интервал). Нормированный уровень экспрессии гена *HSP70* в контроле принят за 1.

Fig. 3. Dynamics of the transcriptional response to hyperthermia (1 p at 43°C) for the *HSP70* gene in tumor cells of various lines. On the Y-axis: the fold increase in the expression level of *HSP70*, normalized to the level of expression of the reference gene *ALAS1*, relative to the level in the control (mean $\pm 95\%$ CI). The normalized expression level of the *HSP70* gene in the control was taken as 1.

молочной железы MDA-MB-231. Уровень экспрессии гена *HSP70* в клетках данной линии увеличивается, в среднем, в 58 раз уже после окончания гипертермического воздействия. Максимум экспрессии наблюдается через 4 ч после прогрева (увеличение уровня экспрессии в 220 раз относительно уровня в контроле). Примечательно, что даже спустя 8 ч после действия гипертермии уровень экспрессии гена *HSP70* в этих клетках оказывается повышен более, чем в 120 раз относительно уровня в контроле. Столь мощная индукция экспрессии гена *HSP70* в ответ на прогрев согласуется с крайне высокой чувствительностью клеток линии MDA-MB-231 к гипертермии.

Индукция экспрессии гена *HSP70* в клетках линий MCF-7 и MCF-7/MDR1 проявляется сходным образом в течение первых четырех часов после прогрева, но менее мощно по сравнению с клетками MDA-MB-231 (рис. 3). Затем в клетках линии MCF-7 наблюдается снижение уровня экспрессии гена *HSP70*, а в клетках линии MCF-7/MDR1 — еще большее увеличение. Таким образом, максимум экспрессии гена *HSP70* в клетках линии MCF-7 наблюдается через 4 ч после прогрева (в среднем, 70-кратное увеличение относительно уровня в контроле), а максимум экспрессии этого гена в клетках линии MCF-7/MDR1 наблюдается через 6 ч (в среднем, 90-кратное увеличение экспрессии). При этом, сразу после гипертермии, увеличение уровня экспрессии *HSP70* относительно уровня в контроле не превышает 20-кратного в обеих линиях клеток.

Самый медленный транскрипционный ответ по гену *HSP70* характерен для клеток рака шейки матки линии HeLa. Сразу после прогрева уровень экспрессии гена *HSP70* увеличивается в среднем в 6.7 раза относительно уровня в контроле, что является самым низким значением среди четырех протестированных линий клеток. В то же время прирост уровня экспрессии гена *HSP70* наблюдается вплоть до 8 ч после прогрева и является самым длительным среди протестированных линий клеток. Следует отметить, что линия опухолевых клеток HeLa считается терморезистентной [12, 13] и была включена в эксперимент в качестве эталона устойчивости к тепловому воздействию.

Исключительно мощная индукция гена *HSP70* в клетках линии MDA-MB-231 наряду с их высокой термочувствительностью свидетельствует о том, что инактивация определенных молекулярных процессов под действием гипертермии является критичной именно для данной линии клеток. Мы предположили, что таким процессом может являться репарация повреждений ДНК, а сами клетки MDA-MB-231 проявляют высокую нестабильность генома. Для проверки этого предположения был проведен анализ цитологических особенностей реакции клеток MDA-MB-231 на

действие гипертермии и γ -излучения при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Цитологические особенности реакции клеток линии MDA-MB-231 на гипертермию и действие γ -излучения

В ходе проведения экспериментов было обнаружено, что клетки линии MDA-MB-231, в отличие от клеток других проанализированных линий, специфически реагируют на прогрев и действие γ -излучения. Помимо снижения количества клеток, 30-минутный прогрев при 44°C, как и действие γ -излучения вне зависимости от наличия и режима предварительной гипертермии, приводит к появлению значительного количества клеток с различными нарушениями структуры и размеров ядра (рис. 4, а). Среди таких аномалий наиболее часто встречаются: гигантские ядра (более 30 мкм в диаметре), что указывает на произошедшую полиплоидизацию; формирование микроядер — один из вариантов проявления нарушения расхождения хромосом в митозе; а также появление “лопастных” ядер, мембрана которых формирует многочисленные инвагинации и выпячивания (рис. 4, б). Примечательно, что 30-минутный прогрев при 43°C не приводит к приросту количества структурных аномалий ядер клеток, в то время как эффект от аналогичного прогрева при 44°C сопоставим с эффектом действия γ -излучения в дозе 5 Гр (рис. 4, а, в).

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы установлено, что клетки исследуемых линий РМЖ отличаются друг от друга по термочувствительности и эффективности термосенсибилизации к γ -излучению и характеризуются различной динамикой транскрипционного ответа на гипертермию, что наглядно продемонстрировано на примере экспрессии гена *HSP70*. Среди проанализированных линий клеток особенно выделяется линия MDA-MB-231 — модель ТН-РМЖ: эффект действия на них 30-минутной гипертермии при 44°C сопоставим с эффектом, наблюдаемым после воздействия на эти клетки γ -квантами в дозе 5 Гр, что проявляется и на уровне снижения метаболической активности (рис. 1) и выживаемости (рис. 4, а) этих клеток, и на уровне индукции аномалий структуры ядра (рис. 4, в). Примечательно, что в условиях проведенных экспериментов не было обнаружено существенного прироста количества клеток с аномалиями ядра такого рода в других исследованных клеточных линиях. Известно, что изменение морфологии ядра может свидетельствовать об увеличении геномной нестабильности, вызывать изменение экспрессии генов и приводить к ядерной дис-

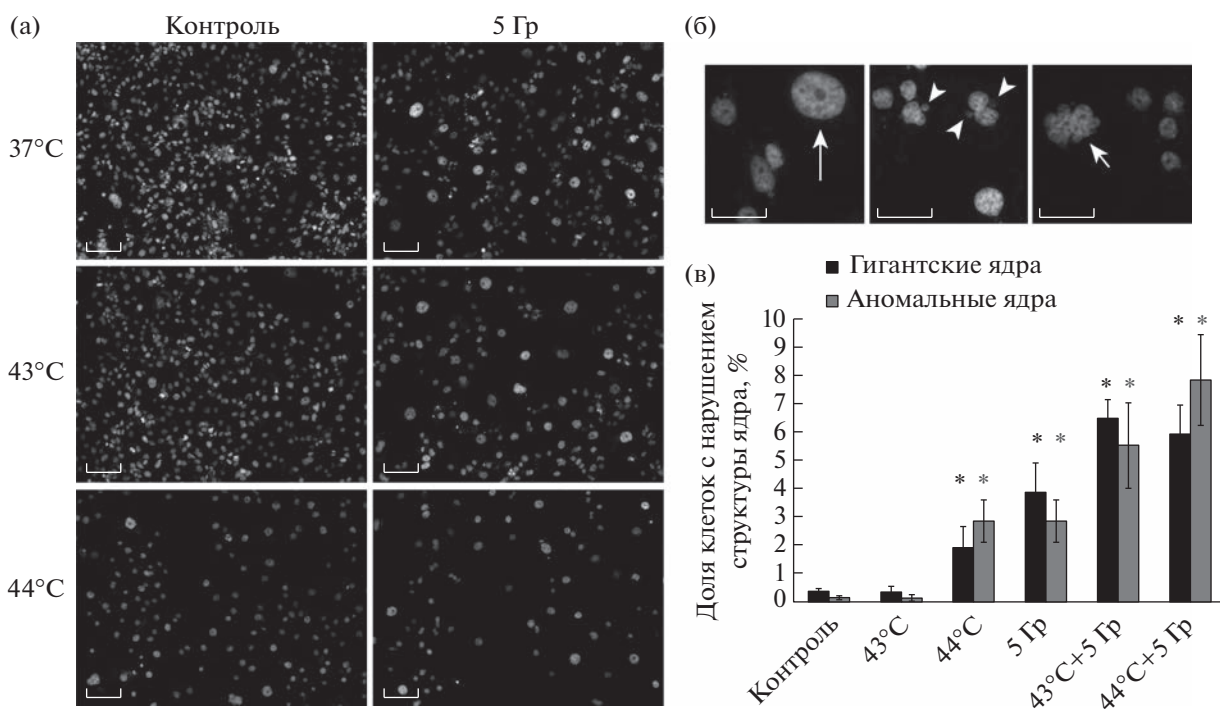


Рис. 4. Цитологические особенности реакции клеток линии MDA-MB-231 на гипертермию и действие γ -излучения. а – изменение количества клеток и морфологии клеточных ядер в ответ на действие облучения в зависимости от режима предварительной гипертермии по сравнению с контролем (необлученные клетки, культивируемые при 37°C). Масштабная линейка: 100 мкм. б – Типичные варианты наблюдаемых морфологических изменений ядер клеток. Длинной стрелкой отмечено гигантское ядро, головкой стрелки – микроядра, короткой стрелкой – многолопастное ядро. Масштабная линейка: 40 мкм. в – результаты анализа изменения доли клеток с нарушением структуры ядра в культуре MDA-MB-231 в зависимости от действия исследуемых факторов и их комбинаций. Отдельно учитывали гигантские ядра и ядра с нарушенной морфологией (лопастные ядра и содержащие микроядра). Приведены средние значения $\pm$ SE. Статистически значимые ($p = 0.00013$) отличия от контрольной группы и клеток, подверженных действию гипертермии при 43°C отмечены звездочками.

Fig. 4. Cytological features of the response of MDA-MB-231 cells to hyperthermia and the action of γ -radiation. а – Changes in the number of cells and morphology of cell nuclei in response to irradiation depending on the pre-hyperthermia regimen compared to the control (unirradiated cells cultured at 37°C). Scale bar: 100 μ m. б – Typical variants of the observed morphological changes in cell nuclei. The long arrow marks the giant nucleus, the arrowhead marks the micronucleus, and the short arrow marks the multilobed nucleus. Scale bar: 40 μ m. в – Results of the analysis of changes in the proportion of cells with disruption of the nuclear structure in the MDA-MB-231 culture, depending on the action of the studied factors and their combinations. Giant nuclei and nuclei with disturbed morphology (lobed nuclei and containing micronuclei) were taken into account separately. Mean $\pm$ SE values are given. Statistically significant ($p = 0.00013$) differences from the control group and cells exposed to hyperthermia at 43°C are marked with asterisks.

функции [18–20], в то время как конденсация хроматина является признаком активации апоптоза [13]. В связи с этим высокая чувствительность клеток MDA-MB-231 к гипертермии и, как следствие, высокая эффективность термосенсибилизации этих клеток к действию γ -излучения, может быть обусловлена повышенным уровнем геномной нестабильности в этих клетках. Совокупность этих данных позволяет предполагать, что в перспективе именно клетки ТН-РМЖ могут стать наиболее перспективной целью для применения гипертермии в качестве сенсibilизирующего воздействия к радиотерапии.

В последнее время интерес к использованию различных вариантов гипертермии в клинической практике все больше возрастает [5, 21]. Дей-

ствительно, применение гипертермии в клинической практике несет ряд существенных преимуществ. Использование локальной гипертермии позволяет воздействовать непосредственно на опухолевый очаг без серьезного повреждения окружающих нормальных тканей [22]. При этом запускаемые гипертермией механизмы, сенсibilизирующие опухоль, работают на молекулярном, клеточном и физиологическом уровнях. Вместе с тем гипертермия не обладает генотоксическим и мутагенным действием, что дает ей огромное преимущество при сравнении с различными химиотерапевтическими агентами. Наконец, химиорезистентные клетки, нечувствительные ко многим химиотерапевтическим агентам, могут быть сенсibilизированы к облучению при

помощи гипертермии, как было показано нами ранее [11]. Обсуждается возможное использование локальной гипертермии для радиосенсибилизации радиорезистентных опухолевых клеток, находящихся в гипоксических нишах [23].

Несмотря на неоспоримые преимущества, гипертермия имеет и ряд недостатков, среди которых: сложности с внутриопухолевой термометрией и риск повысить устойчивость опухоли из-за накопления большого количества белков HSP вследствие реализации теплового стресс-ответа клеток, поскольку эти белки, помимо своей основной функции клеточных шаперонов, играют важную роль в механизмах клеточной защиты и адаптации, а также во многом влияют на патогенез опухолевого процесса [10, 17].

Снизить риск индуцированного гипертермией повышения устойчивости опухолевых клеток можно несколькими способами. Во-первых, важно понимать, являются ли термочувствительными клетки опухоли у конкретного пациента и какой именно режим гипертермии (температура и длительность воздействия) оптимален в каждом конкретном случае. Это поднимает вопрос о необходимости поиска критериев и маркеров, позволяющих заблаговременно оценить термочувствительность опухолевых клеток и, как следствие, целесообразность использования гипертермии в каждом случае. Вторым подходом может служить использование ингибиторов активности транскрипционного фактора HSF1, который в ответ на действие гипертермии запускает экспрессию множества генов, включая гены семейства *HSP*, а также ингибиторов активности самих белков HSP.

Следует отметить, что применение ингибиторов активности и экспрессии шаперонов само по себе позволяет сенсибилизировать опухолевые клетки к прогреву и облучению [13, 24]. Таким образом, комбинация этих двух подходов — применение гипертермии на фоне использования ингибиторов индукции и функции HSP — может позволить не только усилить сенсибилизирующий эффект гипертермии, но и снизить риск повышения устойчивости клеток опухоли после прогрева.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные в ходе работы отличия в термочувствительности и эффективности термосенсибилизации к γ -излучению линий клеток, являющихся моделями РМЖ различных молекулярных подтипов, поднимают вопрос о поиске критериев, по которым можно было бы предсказать целесообразность использования гипертермии в каждом конкретном случае. Одними из таких критериев могут служить мощность индукции и *HSP70* в ответ на прогрев и уровень геномной нестабильности клеток — именно эти параметры оказались су-

щественно повышены в клетках линии MDA-MB-231 (модель трижды негативного РМЖ). Совокупность полученных данных позволяет предполагать, что применение гипертермии в качестве сенсибилизирующего воздействия к радиотерапии может быть особенно перспективно в случае лечения ТН-РМЖ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kaprin A.D.* Состояние онкологической помощи населению России в 2017 г. / Под ред.: А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. М., 2018. С. 18. [*Kaprin A.D.* Sostojanie onkologicheskoy pomoshhi naseleniju Rossii v 2017 g. / Eds A.D. Kaprin, V.V. Starinskij, G.V. Petrova. M., 2018. S. 18 (In Russ.)].
2. *Кулигина Е.Ш.* Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // *Практ. онкология*. 2010. Т. 11. № 4. С. 203–216. [*Kuligina E.Sh.* Jepidemiologicheskie i molekularnye aspekty raka molochnoj zhelezy // *Practical Oncology*. 2010. T. 11. № 4. S. 203–216 (In Russ.)].
3. *Lukasiewicz S., Czezelewski M., Forma A. et al.* Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies — An Updated Review // *Cancers*. 2021. V. 13. P. 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
4. *Денгина Н.В., Мозерова Е.Я.* Стереотаксическая лучевая терапия и локальная гипертермия в лечении опухолей различных локализаций // *Практ. онкология*. 2015. Т. 16. № 4. С. 162–173. [*Dengina N.V., Mozerova E.Ya.* Stereotactic body radiotherapy and local hyperthermia in the treatment of various malignant tumors // *Practical Oncology*. 2015. V. 16. № 4. P. 162–173 (In Russ.)].
5. *Datta N.R., Jain B.M., Mathi Z. et al.* Hyperthermia: A Potential Game-Changer in the Management of Cancers in Low-Middle-Income Group Countries // *Cancers*. 2022. V. 14. P. 315. <https://doi.org/10.3390/cancers14020315>
6. *Rao W., Deng Z.-Sh., Liu J.* A Review of Hyperthermia Combined With Radiotherapy/Chemotherapy on Malignant Tumors // *Critic. Rev. Biomed. Engineer*. 2010. V. 38. № 1. P. 101–116. <https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v38.i1.80>
7. *Datta N.R., Ordonez S.G., Gaipi U.S. et al.* Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future // *Cancer Treat. Rev*. 2015. V. 41. P. 742–753. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.05.009>
8. *van den Tempel N., Horsman M.R., Kanaar R.* Improving efficacy of hyperthermia in oncology by exploiting biological mechanisms // *Int. J. Hyperthermia*. 2016. V. 32. № 4. P. 446–454. <https://doi.org/10.3109/02656736.2016.1157216>
9. *Кабаков А.Е., Кудрявцев В.А., Хохлова А.В. и др.* Апоптоз в опухолевых клетках, подвергнутых сочетанному действию гипертермии и облучения: исследование молекулярных механизмов и мишеней // *Радиация и риск*. 2018. Т. 27. № 2. С. 62–75. [*Kabakov A.E., Kudryavtsev V.A., Khokhlova A.V. et al.* Apoptosis in tumor cells subjected to the combined action of hyperthermia and irradiation: a study of the molecular mechanisms and targets // *Radiation and Risk*.

2018. V. 27. № 2. P. 62–75 (In Russ.)).
<https://doi.org/10.21870/0131-3878-2018-27-2-62-75>
10. Chatterjee S. and Burns T.F. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. P. 1978.
<https://doi.org/10.3390/ijms18091978>
11. Хохлова А.В., Якимова А.О., Мосина В.А. и др. Гипертермия как способ повышения радиочувствительности опухолевых клеток, невосприимчивых к фармакологическим радиосенсибилизаторам // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2020. Т. 60. № 5. С. 516–523. [Khokhlova A.V., Yakimova A.O., Mosina V.A. et al. Hyperthermia as a Method of Radiosensitization of Tumor Cells Unsusceptible to Pharmacological Radiosensitizers // *Radiation Biology. Radioecology*. 2020. V. 60. № 5. P. 516–523. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.31857/S0869803120050057>
12. Rossi A., Ciafrè S., Balsamo M. et al. Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference: a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 7678–7685.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4282>
13. Кудрявцев В.А., Макарова Ю.М., Кабаков А.Е. Термосенсибилизация опухолевых клеток ингибиторами активности и экспрессии шаперонов // *Биомед. химия*. 2012. Т. 58. № 6. С. 662–672. [Kudryavtsev V.A., Makarova Y.M., Kabakov A.E. Thermosensitization of tumor cells with inhibitors of chaperone activity and expression // *Biomedical Chemistry*. 2012. V. 58. № 6. P. 662–672. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.18097/pbmc20125806662>
14. Kabakov A.E., Gabai V.L. Cell death and survival assays // *Meth. Mol. Biol.* 2018. V. 1709. P. 107–127.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9
15. Schmittgen T.D. and Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nature Prot.* 2008. V. 3. № 6. P. 1101–1108.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
16. RefFinder. Доступно по: <https://heartcure.com.au/reffinder> (ссылка активна на 31.01.2022).
17. Kabakov A.E., Gabai V.L. HSP70s in Breast Cancer: Promoters of Tumorigenesis and Potential Targets/Tools for Therapy // *Cells*. 2021. V. 10. № 12. P. 3446.
<https://doi.org/10.3390/cells10123446>
18. Takaki T., Montagner M., Serres M.P. et al. Actomyosin drives cancer cell nuclear dysmorphia and threatens genome stability // *Nature Commun.* 2017. V. 8. P. 16013.
<https://doi.org/10.1038/ncomms16013>
19. Jevtić P., Edens L.J., Vuković L.D., and Levy D.L. Sizing and shaping the nucleus: mechanisms and significance // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2014. June. V. 28. P. 16–27.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.01.003>
20. Stephens A.D., Banigan E.J., Marko J.F. Chromatin's physical properties shape the nucleus and its functions // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2019. V. 58. P. 76–84.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.02.006>
21. Lee S.-Y., Fiorentini G., Szasz A.M. et al. Quo Vadis Oncological Hyperthermia // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. P. 1690.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01690>
22. Курпешев О.К., van der Zee J. Локорегиональная гипертермия злокачественных опухолей: Методики, термометрия, аппаратура // *Мед. радиология и радиационная безопасность*. 2017. Т. 62. № 5. С. 52–63. [Kurpeshev O.K., van der Zee J. Locoregional Hyperthermia of Malignant Tumors: Methods, Thermometry, Machines // *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2017. V. 62. № 5. P. 52–63 (In Russ.)].
23. Kabakov A.E., Yakimova A.O. Hypoxia-induced cancer cell responses driving radioresistance of hypoxic tumors: approaches to targeting and radiosensitizing // *Cancers*. 2021. V. 13. № 5. P. 1–52.
<https://doi.org/10.3390/cancers13051102>
24. Кудрявцев В.А., Хохлова А.В., Селиванова Е.И. и др. Усиленная радиосенсибилизация опухолевых клеток с помощью комбинации ингибиторов активности и экспрессии шаперонов // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2018. Т. 58. № 1. С. 26–34. [Kudryavtsev V.A., Khokhlova A.V., Selivanova E.I. et al. Enhanced radiosensitization of tumor cells by means of combination of inhibitors of chaperone activity and chaperone expression // *Radiation Biology. Radioecology*. 2018. V. 58. № 1. P. 26–34. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.7868/S0869803118010034>

High Thermosensitivity of MDA-MB-231 Cells as a Prerequisite for Thermoradiosensitization of Triple-negative Breast Cancer in Clinical Practice

A. O. Yakimova^{a, #} and A. E. Kabakov^a

^aA. Tsyb MRRC – a branch of the National Medical Research Centre of Radiology of the Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia

[#]E-mail: anna.prosovskaia@gmail.com

The work is dedicated to the analysis of thermal sensitivity and efficiency of thermosensitization to γ -radiation of three cell lines of breast cancer of different molecular subtypes. It has been established that the cells of the studied lines differ in the sensitivity to hyperthermia and, as a result, in the effectiveness of thermoradiosensitization, which raises the question of finding criteria for assessing the rationale of using hyperthermia in each specific case. It has been shown that the level of heat-responsive expression of HSP70 gene and also the level of cell genomic instability can serve as such criteria. It was found that the efficiency of thermoradiosensitization is significantly higher in MDA-MB-231 cells compared to the cells of other studied lines. The data obtained suggest that the use of hyperthermia as a radiotherapy-sensitizing co-treatment may be particularly promising toward triple negative breast cancer.

Keywords: breast cancer, hyperthermia, γ -radiation, thermoradiosensitization, HSP70 expression, heat shock proteins, genomic instability