
РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

УДК 616-006.04:577.112:57.085.23:612.591:539.1.047:615.849

УСИЛЕННАЯ ТЕРМО-РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК ЧЕРЕЗ ПОДАВЛЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО
СТРЕСС-ОТВЕТА ИНГИБИРОВАНИЕМ АКТИВНОСТИ
ИЛИ ЭКСПРЕССИИ HSF1

© 2024 г. А. Е. Кабаков*, В. А. Мосина, А. В. Хохлова,
С. А. Иванов, А. Д. Каприн

*Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал “НМИЦ радиологии”
Минздрава России, Обнинск, Россия*

**E-mail: aekabakov@hotmail.com*

Поступила в редакцию 05.10.2023 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 24.07.2024 г

Гипертермия применяется в комбинации с лучевой терапией для усиления радиационного ответа опухоли-мишени. Однако прогревание раковых клеток активирует в них транскрипционный фактор HSF1 и стимулирует HSF1-зависимую индукцию белков теплового шока (БТШ), которые могут существенно ослаблять противоопухолевые эффекты гипертермии и облучения. Целью данного исследования было проверить возможность усиления радиосенсибилизирующего действия гипертермии на раковые клетки путем подавления в них HSF1-опосредованной индукции БТШ. Объектом исследования были клетки HeLa, происходящие из злокачественной опухоли шейки матки человека. Перед облучением (2–7 Гр) клетки подвергали тепловому стрессу (42–44°C в течение 20–60 мин) без или в присутствии ингибиторов транскрипционной активности HSF1 (кверцетин, триптолид, KRIBB11). В отдельных образцах клеток предварительно вызывали нокдаун экспрессии HSF1 с использованием малых интерферирующих РНК. Гибель и выживание клеток оценивали по уровню апоптоза/некроза и по клоногенной способности. Экспрессию HSF1 и БТШ анализировали с помощью иммуноблоттинга. Было обнаружено, что по сравнению с радиосенсибилизирующими эффектами одной гипертермии, сочетанное воздействие (ингибирование активности HSF1 или нокдаун HSF1 + прогрев) значительно усиливало термо-радиосенсибилизацию раковых клеток; это проявлялось в интенсификации их пострadiационной гибели (апоптоз + некроз), а также в снижении клоногенности. Это усиление термо-радиосенсибилизации наблюдалось на фоне блокады индукции БТШ. Таким образом, комбинация гипертермии с ингибиторами активности или экспрессии HSF1 может эффективно сенсибилизировать терморезистентные и радиорезистентные опухоли к лучевой терапии.

Ключевые слова: цервикальный рак, транскрипционный фактор, белок теплового шока, гипертермия, малые интерферирующие РНК, радиорезистентность

DOI: 10.31857/S0869803124060042, **EDN:** NDIKVN

Рак шейки матки (РШМ или цервикальный рак) является одним из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований и занимает четвертое место по заболеваемости и смертности среди женщин [1]. Лучевая терапия (ЛТ) считается ведущим методом лечения местнораспространенного РШМ, и более чем 80% пациенток с таким заболеванием проходят курс ЛТ (в ряде случаев ЛТ применяется как часть комбинированной или комплексной терапии) [1, 2].

Несмотря на признанную эффективность ЛТ против РШМ, ее результат не всегда бывает успешным из-за изначальной или приобретаемой радиорезистентности цервикальных опухолей [1, 2]; поэтому актуальной задачей представляется радиосенсибилизация злокачественных клеток. Радиочувствительность опухолей-мишеней можно повысить, если комбинировать ЛТ с химиотерапией или гипертермией. Действительно, комбинирование ЛТ и химиотерапии улучшало результативность лечения РШМ [1]. Следует от-

метить, что химиотерапевтические препараты, как правило, токсичны для нормальных тканей и негативно влияют на весь организм пациентки. В отличие от химиотерапии, локальная гипертермия является гораздо более ограниченным и щадящим воздействием, не угнетающим кроветворение и иммунитет. В качестве сенсibiliзирующей (адьювантной) обработки солидных опухолей гипертермия применяется довольно редко из-за нестабильности позитивных эффектов, а также из-за терморезистентности многих злокачественных новообразований [3, 4]. Однако, можно добиться усиления противоопухолевых эффектов гипертермии с помощью специальных дополнительных воздействий.

Предположительно, одной из главных причин относительно невысокой эффективности гипертермии при комбинированной терапии опухолей является активация транскрипционного фактора HSF1, которая происходит в раковых клетках в ответ на их прогрев, после чего запускается HSF1-зависимый механизм индукции белков теплового шока (БТШ) [5–7]. Накапливаясь в прогретых раковых клетках, индуцибельные БТШ (особенно БТШ70 и БТШ27) могут действовать как эндогенные цитопротекторы и блокаторы апоптоза, тем самым защищая опухоль-мишень от цитотоксического действия химиотерапии или ЛТ и, следовательно, ослабляя (или даже нивелируя) сенсibiliзирующие эффекты гипертермии. Если так, то искусственное предотвращение активации HSF1 в прогретых раковых клетках должно сенсibiliзировать их к действию гипертермии и облучения (т.е. усилить термо-радиосенсибилизацию).

Целью этой работы было проверить возможность усиления радиосенсибилирующих эффектов гипертермии на опухолевые клетки путем подавления в них HSF1-зависимой индукции БТШ. В качестве объекта исследований были взяты клетки линии HeLa, происходящей из РШМ человека; клетки этой линии отличаются терморезистентностью [5, 8]. Для подавления HSF1-зависимого стресс-ответа применялись известные ингибиторы активности HSF1: кверцетин [9], триптолид [10] и KRIBB11 [11], а также малые интерферирующие РНК для нокдауна экспрессии HSF1 [12]. Похожие подходы применялись ранее для сенсibiliзации опухолевых клеток HeLa к гипертермии [5] и сочетанному воздействию гипертермия + цисплатина [8]. Результаты, полученные в данном *in vitro* исследовании, показывают возможный способ усиления термо-радиосенсибилизации клеток РШМ человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были клетки линии HeLa, происходящей из карциномы шейки матки человека (получены из банка клеточных культур МРНЦ, Обнинск). Клеточные культуры выращивались в среде DMEM, содержащей 10% телячьей фетальной сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамина и 10000 IU/мл пенициллин/стрептомицина (все Hyclone, США), в инкубаторе с влажной атмосферой и 5% CO₂ при 37°C.

Коммерчески доступные ингибиторы активности HSF1: кверцетин, триптолид и KRIBB11 (все от Calbiochem) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавляли в среду роста к клеточным культурам в различных концентрациях за 2 ч до гипертермического воздействия. Аликвоты ДМСО вносились в контрольные образцы.

Клеточные культуры HeLa с нокдауном экспрессии HSF1 получали согласно описанной методике [12] с помощью вирусных векторов pSIREN-RetroQ (RQ), экспрессирующих ген устойчивости к пуромицину (BD Bioscience, Сан-Хосе, США) и малые интерферирующие РНК (siRNA), которые таргетируют мРНК-HSF1 (получены от проф. В.Л. Габая, Университет Бостона, Бостон, США). Селекцию инфицированных клеток проводили в среде роста с пуромицином. Контролем служили клетки, прошедшие аналогичную селекцию после инфекции базовым RQ вектором [12].

Нокдаун экспрессии HSF1 подтверждали иммуноблоттингом с антителами к HSF1 (SPA-901, Stressgen, Канада). Индукцию БТШ в прогретых клетках, а также ее подавление показывали иммуноблоттингом с антителами, специфичными к индуцибельной форме БТШ70 (SPA-810, Stressgen, Канада) [12, 13]. Равная нагрузка клеточной материи при электрофорезе контролировалась с помощью иммуноблоттинга с антителами к актину [13]. Блоты проявляли методом усиленной хемилюминесценции.

Гипертермию проводили перед облучением, помещая герметично закрытые чашки Петри с клетками в термостатированную водяную баню (RC6 LAUDA, Германия) с температурой 42°–44°C на 20–60 мин. Контролируемые отклонения от заданной температуры не превышали 0,2°C.

Пластиковые чашки Петри с распластанными клетками подвергали прямому воздействию

γ -фотонов на радиотерапевтической установке с γ -источником ^{60}Co .

Пострадиационное выживание культивируемых клеток оценивали по выживанию клеточных колоний (тест на клоногенность), как описано ранее [13, 14]. Величины “факторов изменения дозы” (ФИД) рассчитывали для 10%-ного выживания [13]. Фракции апоптотических и некротических клеток определяли на флуоресцентном микроскопе (Leika, Германия) после двойного окрашивания Хехст 33342 и йодистым пропидием, учитывая такие признаки как характерные изменения в морфологии ядер (апоптоз) и проницаемость плазматической мембраны для йодистого пропидия (некроз) [5, 7, 14].

Количественные результаты представлены как усредненные данные (\pm стандартное отклонение *S.D.*) 3–5 независимых экспериментов с четырьмя параллелями для каждой точки. Статистическую обработку проводили по критерию Манна–Уитни с помощью программы “Statistica 6.0” (“Microcal Softcare, Inc.”).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рис. 1 показывает, как с помощью специальных предобработок можно заблокировать индукцию БТШ в прогретых раковых клетках.

Действительно, иммуноблоттинг выявлял нокдаун экспрессии HSF1 в клетках HeLa, инфицированных вектором с siRNA (рис. 1, а), и в тех же образцах клеток не происходило накопления индуцибельной формы БТШ70 в ответ на гипертермию (рис. 1, б). Аналогичного результата удавалось достичь, обрабатывая культуры HeLa ингибиторами функциональной активности HSF1, такими как кверцетин (рис. 1, в), триптолид или KRIBB11 (данные не приводятся), которые также подавляли HSF1-зависимую индукцию БТШ70 в прогретых клетках HeLa.

Как следует из данных, представленных на рис. 2 и в табл. 1, сочетание гипертермии с обработкой ингибиторами активности или экспрессии HSF1 оказывало довольно мощное радиосенсибилизирующее действие, значительно понижая клоногенность клеток HeLa. Даже в условиях легко переносимого этими клетками прогрева (44°C, 30 мин или 43°C, 60 мин) ингибирование HSF1 существенно увеличивало значения ФИД (табл. 1). Такие выраженные радиосенсибилизирующие эффекты наблюдались только в тех образцах клеток, где индукция БТШ70 была

подавлена предварительным ингибированием HSF1 (см. рис. 1). Все это говорит об усилении термо-радиосенсибилизации в результате искусственного подавления HSF1-зависимого транскрипционного стресс-ответа в прогретых клетках HeLa. Примененные способы ингибирования HSF1 практически не влияли на жизнеспособность и радиорезистентность клеток HeLa при нормальных условиях (37°C), но повышали их термочувствительность (рис. 2, А), что совпадает с результатами более ранней публикации [5].

Основываясь на результатах предыдущих исследований [5–7], можно было ожидать, что предотвращение накопления БТШ в прогретых раковых клетках замедляет их восстановление после теплового стресса и облучения, таким образом стимулируя в них “суицидный” механизм апоптоза. Известно также, что часть клеток, уже погибших от апоптоза, позднее начинает окрашиваться йодистым пропидием из-за перфорации их плазматической мембраны (так называемый вторичный некроз [5, 7]). Проведенный анализ клеточной гибели показал доза-зависимое усиление пострадиационного апоптоза и вторичного некроза в образцах клеток, подвергнутых перед облучением комбинированной обработке, включающей ингибирование экспрессии или активности HSF1 и гипертермию (рис. 3). Результаты, представленные на рис. 3, вполне соответствуют данным по пострадиационному выживанию колоний (см. рис. 2, Б, табл. 1), поскольку интенсификация клеточной гибели (апоптоз + некроз) должна приводить к падению клоногенности, что и наблюдалось после тройного сочетанного воздействия (ингибирование HSF1 + гипертермия + облучение).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании установлено, что предобработки, ингибирующие HSF1-зависимую индукцию БТШ, позволяют значительно усилить термо-радиосенсибилизацию опухолевых клеток HeLa, которые, как было ранее показано, обладают повышенной терморезистентностью [5, 8].

На молекулярно-клеточном уровне радиосенсибилизирующие эффекты гипертермии обусловлены, главным образом, повреждением термолабильных клеточных белков, которые теряют функциональную активность и агрегируют [6, 7]. Дисфункция многих белков в ядре, цитоплазме и органеллах прогретой клетки приводит к временной остановке биосинтеза, нарушению сиг-

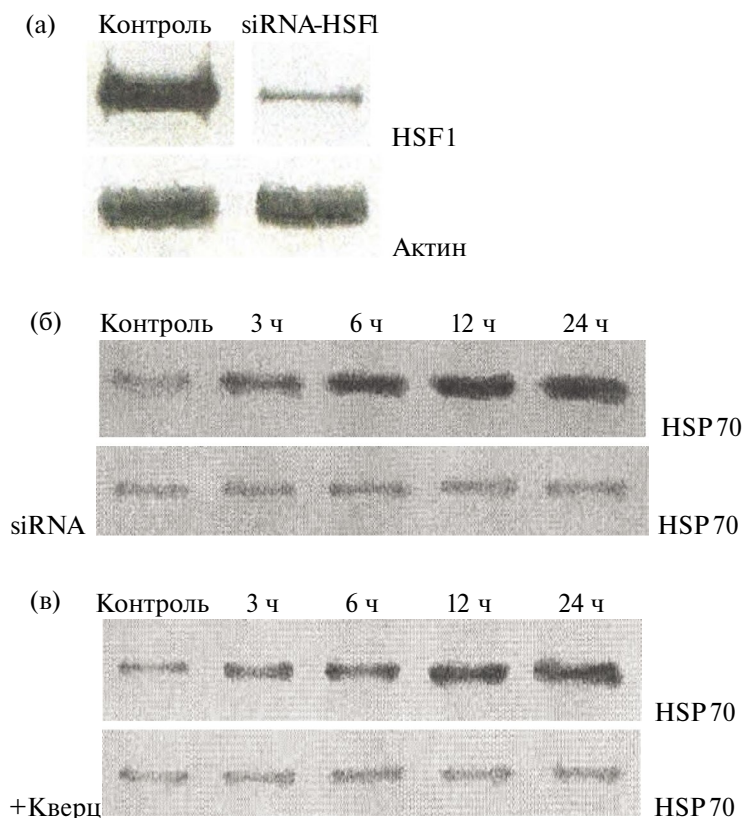


Рис. 1. Фрагменты блотов, показывающие как нокдаун HSF1 с помощью siRNA или ингибирование активности HSF1 кверцетином предотвращают накопление индуцибельной формы HSP70 в прогретых клетках HeLa: а – иммуноблоттинг с антителами к HSF1 для подтверждения подавления экспрессии HSF1 и с антителами к актину для контроля за равной нагрузкой; б – иммуноблоттинг с антителами к HSP70, детектирующий содержание HSP70 в клеточных лизатах, приготовленных на разных сроках после прогрева (43°C, 60 мин) клеток без нокдауна HSF1 (верхняя панель) или с нокдауном HSF1 (siRNA); в – иммуноблоттинг с антителами к HSP70, детектирующий содержание HSP70 в образцах клеток на разных сроках после прогрева (43°C, 60 мин) без ингибирования HSF1 (верхняя панель) или в присутствии 30 мкмоль/л кверцетина (+Кверц). Сроки после прогрева клеток указаны (в часах) по верхнему краю блотов.

Fig. 1. Segments of blots, showing how HSF1 knockdown with siRNA or inhibition of the HSF1 activity with quercetin prevents accumulation of the inducible form of HSP70 in heat-stressed HeLa cells: а – immunoblotting with anti-HSF1 antibodies to confirm the suppressed expression of HSF1 and anti-actin antibodies to ensure equal loading of cellular protein matter; б – immunoblotting with anti-HSP70 antibodies detecting the HSP70 level in cell lysates prepared at different time points after heating (43°C, 60 min) cells without HSF1 knockdown (upper panel) or with HSF1 knockdown (siRNA); в – immunoblotting with anti-HSP70 antibodies detecting the HSP70 level in cell lysates prepared at different time points after heating (43°C, 60 min) without the HSF1 inhibition (upper panel) or in the presence of 30 μmol/l quercetin (+querc). Time points following heating are indicated (in hours) at the upper edges of blots.

Таблица 1. Увеличение значений ФИД при комбинировании гипертермии с обработкой ингибиторами активности или экспрессии HSF1

Table 1. The increased values of dose enhancement factors (DEFs) under combination of hyperthermic treatments and treatments with inhibitors of activity or expression of HSF1

Воздействие	Без ингибиторов HSF1	HSF1-siRNA 85–90%-ное падение уровня HSF1	Кверцетин 30 мкмоль/л	Триптолид 10 нмоль/л	KRIBB11 15 мкмоль/л
Гипертермия: 42°C, 90 мин	ФИД = 1.25	ФИД = 1.54	ФИД = 1.6	ФИД = 1.56	ФИД = 1.62
Гипертермия: 43°C, 60 мин	ФИД = 1.34	ФИД = 1.69	ФИД = 1.75	ФИД = 1.83	ФИД = 1.78
Гипертермия: 44°C, 25 мин	ФИД = 1.4	ФИД = 1.9	ФИД = 1.96	ФИД = 2.0	ФИД = 2.13

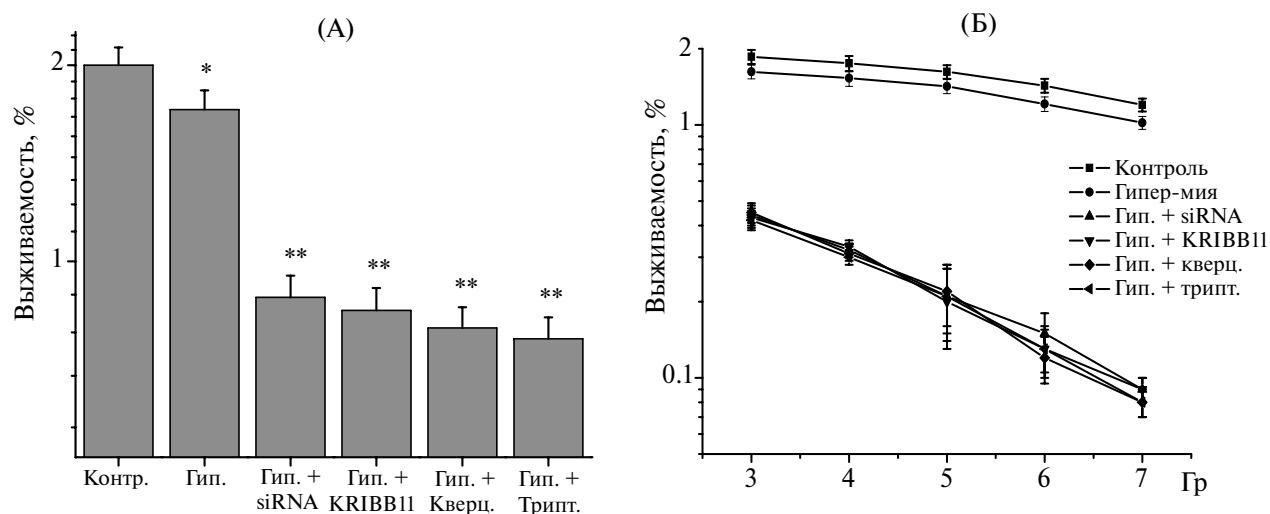


Рис. 2. Падение клоногенности клеток HeLa, подвергнутых гипертермии (А) или гипертермии с последующим облучением (Б), после подавления в них экспрессии или активности HSF1.

Выживаемость колоний необработанных клеток (Контр.) принималась за 100%. Перед облучением (3–7 Гр) клетки выдерживали в условиях гипертермии (Гип.: 43°C, 60 мин) без дополнительных обработок или после нокдауна HSF1 (siRNA), или в присутствии ингибиторов активности HSF1: 30 мкмоль/л кверцетина (Кверц), 10 нмоль/л триптолида (трипт) или 15 мкмоль/л KRIBB11.

А: * Статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$; ** – статистически значимое отличие от контроля и от величины, помеченной *, $p < 0,01$.

Б: Все величины, полученные для воздействий гипертермия + ингибитор HSF1 (четыре нижних кривых), статистически значимо отличаются от соответствующих величин в контроле и кривой, полученной для гипертермии, $p < 0,05$.

Fig. 2. The decrease in clonogenicity of HeLa cells subjected to hyperthermia alone (A) or hyperthermia followed by irradiation (B) after suppression in them of the expression or activity of HSF1.

Colony survival in the untreated cells (Contr.) was considered as 100%. Before irradiation (3–7 Gy), the cells were incubated under hyperthermic conditions (Hyp.: 43°C, 60 min) without additional treatments or after knockdown of HSF1 (siRNA), or in the presence of inhibitors of HSF1 activity: 30 $\mu\text{mol/l}$ quercetin (Querc), 10 n mol/l triptolide (Tript) or 15 $\mu\text{mol/l}$ KRIBB11.

А: * Significant difference from control, $p < 0.05$; ** – significant difference from the control and also from the effect of monotreatment with hyperthermia marked *, $p < 0.01$.

В: All values obtained for every dose of radiation after the combined treatments hyperthermia + HSF1 inhibitor (4 lower curves) are significantly different from the corresponding values in the control and also from the curve obtained for monotreatment with hyperthermia, $p < 0.05$.

нальных путей, ионному дисбалансу, коллапсу цитоскелета и т.д., что делает ее более чувствительной к цитотоксическому действию ионизирующего излучения [6, 7]. Как известно, в ответ на тепловой стресс в клетке активируется HSF1 и запускается HSF1-зависимая экспрессия индуцибельных БТШ (БТШ90, БТШ70, БТШ60, БТШ40 и др.), которые должны взаимодействовать с термо-денатурированными белками, чтобы способствовать их дезагрегации и ренатурации или деградации [6]. Таким образом, индукция БТШ является важнейшим защитно-адаптивным механизмом, позволяющим прогретой клетке восстановить нарушенный гомеостаз. Очевидно, что искусственное ингибирование такого HSF1-опосредованного механизма в опухолевых клетках замедлит их восстановление после теплового стресса и сделает их еще более уязвимыми к последующему облучению. Действительно, испы-

тавшим гипертермию клеткам, гомеостаз которых не успел восстановиться из-за вызванного в них дефицита БТШ, будет гораздо сложнее пережить радиационные повреждения, что должно проявиться в снижении их клоногенности, и мы это реально обнаружили (см. рис. 2 и табл. 1).

Ранее было показано, что HSF1 и индуцибельные БТШ могут действовать как эндогенные радиопротекторы в фибробластах [15, 16]. По-видимому, аналогичную (радиопротекторную) функцию HSF1 и БТШ выполняют и в злокачественных клетках. Некоторые БТШ (например, БТШ90 и БТШ70) необходимы для репарации радиационных повреждений ядерной ДНК [17]. Кроме того, известно, что в стрессированных клетках индуцированные БТШ90, БТШ70 и БТШ27 действуют как супрессоры апоптоза [15–17]. Если так, БТШ, накопленные

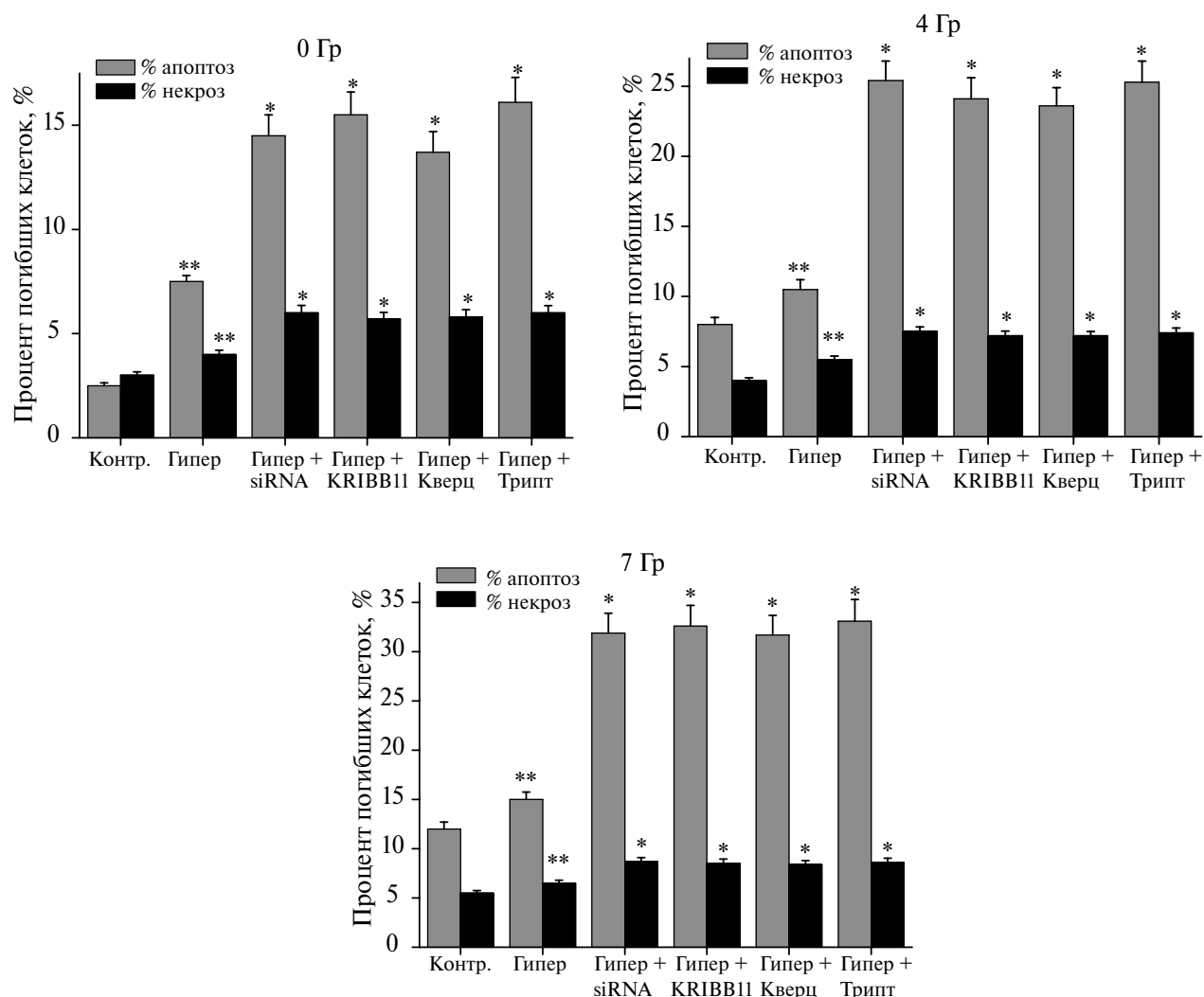


Рис. 3. Усиление клеточной гибели (апоптоза и некроза) в культурах HeLa, подвергнутых гипертермии или гипертермии с последующим облучением после подавления в них экспрессии или активности HSF1.

Клетки перед облучением (4 или 7 Гр) прогревали (43°C, 60 мин) без дополнительных обработок или после нокдауна HSF1 (siRNA), или в присутствии ингибиторов активности HSF1: 30 мкмоль/л кверцетина (Кверц), 10 нмоль/л триптолида (Трипт) или 15 мкмоль/л KRIBB11.

* Статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$; ** статистически значимое отличие от контроля и от величины, помеченной *, $p < 0,05$.

Fig. 3. The enhanced cell death (apoptosis and necrosis) in HeLa cells subjected to hyperthermia alone or hyperthermia followed by irradiation after suppression of HSF1 expression or activity in them.

Before irradiation (4 or 7 Gy), cells were heat-stressed (43°C, 60 min) without additional treatments or after knockdown of HSF1 (siRNA), or in the presence of inhibitors of HSF1 activity: 30 $\mu\text{mol/l}$ quercetin (Querc), 10 $\text{n}\mu\text{mol/l}$ M triptolide (Tript) or 15 $\mu\text{mol/l}$ KRIBB11.

* Significant difference from control, $p < 0.05$; ** significant difference from the control and from the value marked *, $p < 0.05$.

в клетках HeLa после гипертермии (в частности, БТШ70 — см. рис. 1, б, в), могут повышать их радиорезистентность, ускоряя репарацию разрывов ДНК и блокируя апоптотическую гибель. Соответственно, искусственное предотвращение индукции и накопления БТШ в прогретых опухолевых клетках должно снижать их радиорезистентность, способствуя пострadiационному

апоптозу, что и имело место в случае ингибирования активности или экспрессии HSF1 в культурах HeLa (см. рис. 3). Такое усиление апоптотической гибели после сочетанного воздействия может быть основной причиной обнаруженного падения клоногенности в образцах облученных клеток с заблокированной индукцией БТШ (см. рис. 2 и табл. 1).

Хотя использованные в данном исследовании ингибиторы (кверцетин, триптолид, KRIBB11) и siRNA-векторы пока нельзя применять в клинике, описанные нами результаты доказывают принципиальную возможность и потенциальную эффективность предложенного подхода. В будущем, когда будут разработаны фармакологические ингибиторы HSF1 или клинически допустимые методы подавления экспрессии БТШ с помощью генной терапии, предложенный нами способ усиленной термо-радиосенсибилизации злокачественных опухолей сможет найти практическое применение, в частности, при комбинированном лечении РШМ. Представленные в предыдущей публикации [17] результаты позволяют надеяться, что аналогичный способ будет эффективен и для опухолей молочной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Если сравнивать с эффектами одной гипертермии, сочетанное воздействие *гипертермия* + *ингибирование активности или экспрессии HSF1* значительно усиливало радиосенсибилизацию опухолевых клеток HeLa, что проявлялось в более выраженном подавлении их клоногенности и в интенсификации пострадиационного апоптоза. В перспективе, подобная комбинация локальной гипертермии с клинически применимыми ингибиторами HSF1-зависимой индукции БТШ может более эффективно сенсибилизировать терморезистентные и радиорезистентные опухоли к ЛТ.

Работа выполнена без целевого финансирования.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мкртчян Л.С., Замулаева И.А., Киселева В.И., Титова В.А., Крикунова Л.И. Рак шейки матки: химиолучевая терапия и прогностическая роль вируса папилломы человека. Под ред. С.А. Иванова и А.Д. Каприна. М.: ГЕОС, 2022. 190 с. [Mkrтчjan L.S., Zamuleva I.A., Kiseleva V.I., Titova V.A., Krikunova L.I. Rak shejki matki: himioluchevaja terapija i prognosticheskaja rol' virusa papillomy cheloveka. Pod red. S.A. Ivanova i A.D. Kaprina). Moskva: GEOS, 2022. 190 p. (In Russ)].
2. Bhatla N., Aoki D., Sharma D.N., Sankaranarayanan R. FIGO Cancer Report 2018 Cancer of the cervix uteri. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2018;143(2):22–36.
3. Datta N.R., Ordonez S.G., Gaipl U.S. et al. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future. *Cancer Treat. Rev.* 2015;41(9):742–753.
4. Kokura S., Yoshikawa T., Ohnishi T. Hyperthermic oncology from bench to bedside. Springer, 2016. 444 p.
5. Кудрявцев В.А., Макарова Ю.М., Кабаков А.Е. Термосенсибилизация опухолевых клеток ингибиторами активности и экспрессии шаперонов. *Биомед. химия.* 2012;58(6):662–672. [Kudryavtsev V.A., Makarova Yu.M., Kabakov A.E. Thermosensitization of tumor cells with inhibitors of chaperone activity and expression. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2012;6(1): 61–67. (In Russ)]
6. Кабаков А.Е., Анохин Ю.Н., Лебедева Т.В. Реакции нормальных и опухолевых клеток и тканей на гипертермию в сочетании с ионизирующей радиацией. Обзор. *Радиация и риск.* 2018;27(4):141–154. [Kabakov A.E., Anokhin Yu.N., Lebedeva T.V. Reactions of normal and tumor cells and tissues to hyperthermia in combination with ionizing radiation. review. *Radiation and risk.* 2018;27(4):141–154. (In Russ)]. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-4-141-154.
7. 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;27(2):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;27(2):62–75. (In Russ)]. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-2-62-75.
8. Rossi A., Ciafre 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;66(15):7678–7685. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4282.
9. Hosokawa N., Hirayoshi K., Kudo H. et al. Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol. Cell. Biol.* 1992;12(8):3490–3498.
10. Westerheide S.D., Kawahara T.L.A., Orton K. et al. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 2006;281(14):9616–9622.
11. Yoon Y.J., Kim J.A., Shin K.D. et al. KRIBB11 inhibits HSP70 synthesis through inhibition of heat shock factor 1 function by impairing the recruitment of positive transcription elongation factor b to the hsp70 promoter. *J. Biol. Chem.* 2011;286(3):1737–1747.
12. Zaarur N., Gabai V.L., Porco Jr. J.A. et al. Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. *Cancer Res.* 2006;66(3): 1783–1791. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3692.

13. Kudryavtsev V.A., Khokhlova A.V., Mosina V.A. et al. Induction of Hsp70 in tumor cells treated with inhibitors of the Hsp90 activity: A predictive marker and promising target for radiosensitization. *PLoS One*. 2017;2(3):e0173640. DOI: 10.1371/journal.pone.0173640. eCollection 2017.
14. Kabakov A.E., Gabai V.L. Cell death and survival assays. *Methods Mol. Biol.* 2018;1709:107–127.
15. Kabakov A.E., Malyutina Ya.V., Latchman D.S. Hsf1-mediated stress response can transiently enhance cellular radioresistance. *Radiat. Res.* 2006;165(4):410–423. DOI: 10.1667/rr3514.1.
16. Малиютина Я.В., Кабаков А.Е. Предрадиационная индукция белков теплового шока повышает клеточную радиорезистентность. *Радиаци. биология. Радиоэкология*. 2007;47(3): 273–279. [Malyutina Ja.V., Kabakov A.E. Predradiatsionnaja induktsija belkov teplovogo shoka povyshaet kletochnuju radiorezistentnost. *Radiats. Biol. Radioecol.* 2007;47(3): 273–279. (In Russ)].
17. Якимова А.О., Кабаков А.Е. Высокая термочувствительность клеток MDA-MB-231 как предпосылка для терморадисенсибилизации трижды негативного рака молочной железы в клинической практике. *Радиаци. биология. Радиоэкология*. 2023;63(1):273–279. [Yakimova A.O., Kabakov A.E. High thermosensitivity of MDA-MB-231 cells as a basis for thermoradiosensitization of triple negative breast cancer in clinical practice. *Radiats. Biol. Radioecol.* 2023;63(1):273–279. (In Russ)]. DOI: 10.31857/S0869803123010113

Enhanced Thermo-Radiosensitization of Tumor Cells Through Suppression of the Transcriptional Stress Response by Inhibiting HSF1 Activity or Expression

A. E. Kabakov*, V. A. Mosina, A. V. Khokhlova, S. A. Ivanov, A. D. Kaprin

*Medical Radiological Research Center of the Federal State Budgetary Institution
of National Medical Research Center for Radiology of the Ministry of Health
of the Russian Federation, Obninsk, Russia*

*E-mail: aekabakov@hotmail.com

Hyperthermia is used in combination with radiation therapy to enhance the radiation response of the target tumor. However, heating of cancer cells activates the HSF1 transcription factor in them and stimulates the HSF1-dependent induction of heat shock proteins (HSPs), which can significantly impair the antitumor effects of hyperthermia and radiation exposure. The aim of this study was to examine the possibility of enhancing the radiosensitizing effect of hyperthermia on cancer cells by suppressing the HSF1-mediated HSP induction in them. The object of the study were HeLa cells derived from a malignant tumor of the human cervix. Before irradiation (2–7 Gy), cells were subjected to heat stress (42°–44°C for 20–60 min) without or in the presence of HSF1 transcriptional activity inhibitors (quercetin, triptolide, KRIBB11). In certain cell samples, HSF1 expression was preliminarily knocked down using small interfering RNAs. Cell death and survival was assessed by the levels of apoptosis/necrosis and clonogenic ability. Expression of HSF1 and HSP was analyzed by immunoblotting. It was found that, compared with the radiosensitizing effects of hyperthermia alone, the combined treatment (HSF1 activity inhibition or HSF1 knockdown + heating) significantly increased the thermo-radiosensitization of cancer cells; this was manifested in the intensification of their post-radiation death (apoptosis + necrosis), as well as in a decrease in clonogenicity. This enhancement of thermo-radiosensitization was observed under the HSP induction blockade. Thus, the combination of hyperthermia with inhibitors of HSF1 activity or expression can effectively sensitize thermoresistant and radioresistant tumors to radiation therapy.

Keywords: cervical cancer, transcription factor, heat shock protein, hyperthermia, small interfering RNAs, radioresistance

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кабаков Александр Евгеньевич, ORCID 0000-0003-1041-1543 Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал “НМИЦ радиологии” Минздрава России, Обнинск, Россия; e-mail: aekabakov@hotmail.com

Мосина Вера Алексеевна, ORCID 009-0001-7667-6301, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал “НМИЦ радиологии” Минздрава России. Обнинск, Россия; e-mail: mva210@rambler.ru

Хохлова Анна Вячеславовна, ORCID 0000-0002-4391-6321, Медицинский радиологический научный

центр им. А.Ф. Цыба — филиал “НМИЦ радиологии” Минздрава России, Обнинск, Россия; e-mail: demidkina@yandex.ru

Иванов Сергей Анатольевич, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал “НМИЦ радиологии” Минздрава России, Обнинск, Россия.

Каприн Андрей Дмитриевич, ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России, Москва, Россия.

Kabakov Alexander E., ORCID 0000-0003-1041-1543, Medical Radiological Research Center of the Federal State Budgetary Institution of National Medical Research Center for Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia; e-mail: aekabakov@hotmail.com

Mosina Vera A., ORCID 009-0001-7667-6301, Medical Radiological Research Center of the Federal State Budgetary Institution of National Medical Research Center for Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia; e-mail: mva210@rambler.ru

Khokhlova Anna V. ORCID 0000-0002-4391-6321, Medical Radiological Research Center of the Federal State Budgetary Institution of National Medical Research Center for Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia; e-mail: demidkina@yandex.ru

Ivanov Sergey A., Medical Radiological Research Center of the Federal State Budgetary Institution

of National Medical Research Center for Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia.

Kaprin Andrey D., FSBI “National Medical Research Radiological Centre” (NMRRC) of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia.

ВКЛАД АВТОРОВ:

А.Е. Кабаков — планирование исследования, участие в экспериментах, написание статьи.

В.А. Мосина — участие в экспериментах, приготовление графических рисунков.

А.В. Хохлова — участие в экспериментах.

С.А. Иванов — административная функция, материальное и финансовое обеспечение.

А.Д. Каприн — административная функция, материальное и финансовое обеспечение.

А.Е. Kabakov — planning the study, participating in experiments, writing the article.

V.A. Mosina — participation in experiments, preparation of graphic drawings.

A.V. Khokhlova — participation in experiments.

S.A. Ivanov — administrative function, material and financial support.

A.D. Kaprin — administrative function, material and financial support.