

## **Ингибирующее действие гипертермии на опухолевые клетки *in vitro***

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии<sup>1</sup>,  
Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии<sup>2</sup>,  
III онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова<sup>3</sup>, г. Минск*

В экспериментах *in vitro* изучено влияние гипертермии на пролиферативную активность опухолевых клеток линии U-937, HL-60, KG-1 и K-562, а также их чувствительность к цитотоксическому действию мононуклеаров периферической крови (МПК) здоровых людей. Результаты *in vitro* экспериментов показали, что гипертермическая обработка (+42°C, 120 мин) приводит к снижению пролиферативной активности опухолевых клеток линии U-937, HL-60, KG-1, а также повышает чувствительность клеток линии K-562 к цитотоксичности МПК. Краткосрочная обработка опухолевых клеток линии K-562 при +42°C в течение 60 минут вызывает подавление роста опухолевых клеток *in vitro*.

**Ключевые слова:** опухолевые клеточные линии, гипертермия, цитотоксичность, лимфоциты человека.

Ismail-zade RS, Potapnev MP, Shman TV, Cherepovich VS, Zhavrid EA

Inhibitory effect of hyperthermia upon tumour cells *in vitro*

Effect of hyperthermia (42°C, 120 min) on proliferative activity of tumour cell lines U-937, HL-60, KG-1 and K-562 as well as sensitivity of tumour cells to cytotoxicity of mononuclear cells have been estimated in experiments *in vitro*. Experiments *in vitro* showed that exposure of tumour cells (lines U-937, HL-60, KG-1) in temperature 42°C, 120 min decreased their proliferative activity. At the same time hyperthermia increased the sensitivity of tumour cells line K-562 to cytotoxic effect of mononuclears. Short-time treating of K-562 cells with hyperthermia for 60 minutes decreased growth capacity *in vitro* of tumor cells for 72 hours of observation.

Key words: tumour cell lines, hyperthermia, cytotoxicity, human lymphocytes

В настоящее время гипертермия получает все большее признание в онкологической практике как метод повышения эффективности лечения злокачественных новообразований. Гипертермическая онкология представляет собой относительно новое, бурно развивающееся в последние 20–25 лет направление, связанное с применением высокой температуры (40–43° С при общем воздействии и/или 42–47° С при локальном) для повышения эффективности комбинированной или комплексной терапии больных [3]. Механизм действия гипертермии на биологические ткани многосторонен. В них происходят нарушение синтеза ДНК и РНК, а также активности лизосом и энзимных систем клеток, изменение уровня тканевого дыхания и рН, модификация митотического цикла клеток и выраженные изменения микроциркуляции, проницаемости мембран [2, 7]. Эти процессы приводят к повреждению различных клеточных структур, инаktivации ферментов репарации ДНК [1]. Такой широкий спектр действия гипертермии на клеточные структуры может вызвать антиангиогенный, апоптотический эффект [8, 11, 12, 13, 14, 15]. Имеются убедительные данные об усилении противоопухолевого действия интерферонов, фактора некроза опухоли, интерлейкина-2 и других биоагентов в

условиях гипертермии, что создает хорошую предпосылку для широкого использования цитокиноterapiи в гипертермической онкологии [5, 6, 10]. Нами проводилась серия экспериментов *in vitro* с целью изучения влияния гипертермии на опухолевые клетки.

#### Материалы и методы

Клеточные линии. Клетки линий K-562, U-937, KG-1, HL-60 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и смесь антибиотиков, при 37°C во влажной атмосфере и 5% – CO<sub>2</sub>. Для исследования влияния гипертермии на пролиферацию клеток и чувствительность к цитотоксическим клеткам периферической крови образцы клеток инкубировали на водяной бане при +37°C (контроль) и при +42°C (опыт) в течение 120 мин. Для исследования цитотоксической активности гипертермии подвергались как клетки-мишени, так и клетки-эффекторы. Результаты оценивали с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) метода.

Оценка пролиферации. Обработанные клетки (контроль и опыт) раскапывали в 96-луночные планшеты в концентрации 0,1x10<sup>6</sup> кл/мл и инкубировали в течение 96 часов. После культивирования в каждую лунку добавляли раствор МТТ (5 мкг/мл) и продолжали инкубирование еще 5 часов. Затем для растворения образовавшихся гранул

формаза в каждую лунку добавляли по 100 мкл растворителя (кислый изопропанол, 0,04N HCl) и тщательно ресуспендировали до растворения гранул. Определение оптической плотности проводили на спектрофотометре (Sanofi Diagnostics Pasteur PR2100) при A = 540.

Цитотоксический тест. В качестве клеток-эффекторов использовались свежесыводенные мононуклеарные клетки доноров, которые выделяли из гепаринизированной крови в градиенте плотности Histopaque 1077 ( $\rho = 1,077$  г/л). Клетки двукратно отмывали и ресуспендировали в полной среде RPMI-1640 до требуемого разведения. Мишенями служили клетки эритромиелоидной линии K-562, чувствительной к воздействию ЕК [4]. Клетки раскапывали в 96-луночные круглодонные планшеты в различных соотношениях эффекторов и мишеней, как указано ниже.

Соотношение эффектор/мишень	Эффекторные клетки, концентрация в лунке	Клетки-мишени, концентрация в лунке
2:1	25000	12500
5:1	25000	5000
10:1	25000	2500

В качестве контроля использовали лунки, содержащие только среду; лунки, содержащие только эффекторы и только мишени. Клетки инкубировали во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C 20 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора МТТ и продолжали инкубацию 4 ч. Образовавшиеся кристаллы формаза растворяли и определяли оптическую плотность при  $\rho = 540$ .

Расчет значения цитотоксической активности (ЦТА) мононуклеаров проводили по следующей формуле:

$$\text{ЦТА} = \left(1 - \frac{\text{ОП}_{\text{Э+М}} - \text{ОП}_{\text{Э}}}{\text{ОП}_{\text{М}}}\right) \times 100\%,$$

где ОПЭ+М – оптическая плотность в опытных лунках; ОПЭ и ОПМ – контроль эффекторов и мишеней соответственно.

Кинетика роста клеток линии К-562, подвергшихся гипертермии *in vitro*. Мы исследовали влияние непродолжительного культивирования при повышенной температуре на рост опухолевых клеток линии К-562. Для этого культуру в экспоненциальной фазе роста (2–3-й дни культивирования) подвергали нагреванию на водяной бане с термоэкспозиционным режимом  $42 \pm 0,1^\circ\text{C}$  и  $43 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , 60 мин, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После температурного воздействия клетки возвращали к нормальным условиям культивирования при 37°C. С периодичностью в 8 и 16 ч (точки 0, 8, 24, 32, 48, 56 и 72 ч. после гипертермии) производили подсчёт концентрации живых и мёртвых клеток в суспензии методом исключения с трипановым синим. Все точки ставились в триплетах.

#### Результаты и обсуждения

Оценка *in vitro* влияния гипертермии на пролиферативную активность опухолевых клеток (клеточных линий) и лимфоцитов здоровых клеток представлена в таблице 1. Как видно из таблицы, смоделированный режим прогревания клеток *in vitro* вызывал некоторое снижение выживаемости клеток линий U-937, HL-60 (монокитарные клеточные линии), KG-1 (миелоидная клеточная линия) (P=0,04, P=0,068; P=0,68 соответственно), но не К-562 (миелоидная клеточная линия) и клеток здоровых людей.

#### Таблица 1

Влияние гипертермии на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*

Исследуемые клетки	Коэффициент* изменения пролиферации	P**
К-562 (n=4)	1,057±0,02	0,27
U-937 (n=5)	0,9±0,01	0,04
KG-1 (n=4)	0,93±0,03	0,068
HL-60 (n=4)	0,75±0,08	0,068
МНК доноров (n=3)	0,96±0,03	0,96

Примечание: \* – коэффициент рассчитывался как соотношение значений оптической плотности контрольных клеток к оптической плотности клеток, подвергшихся гипертермии; \*\* – достоверность рассчитывалась с использованием парного теста Вилкоксона.

При изучении влияния гипертермии на чувствительность опухолевых клеток линии К-562 к цитотоксическому действию мононуклеаров периферической крови (рис. 1) установлено, что импульсная гипертермия (42°C, 120 мин) приводит к достоверному повышению чувствительности опухолевых клеток к цитотоксическому действию мононуклеаров периферической крови здоровых людей.

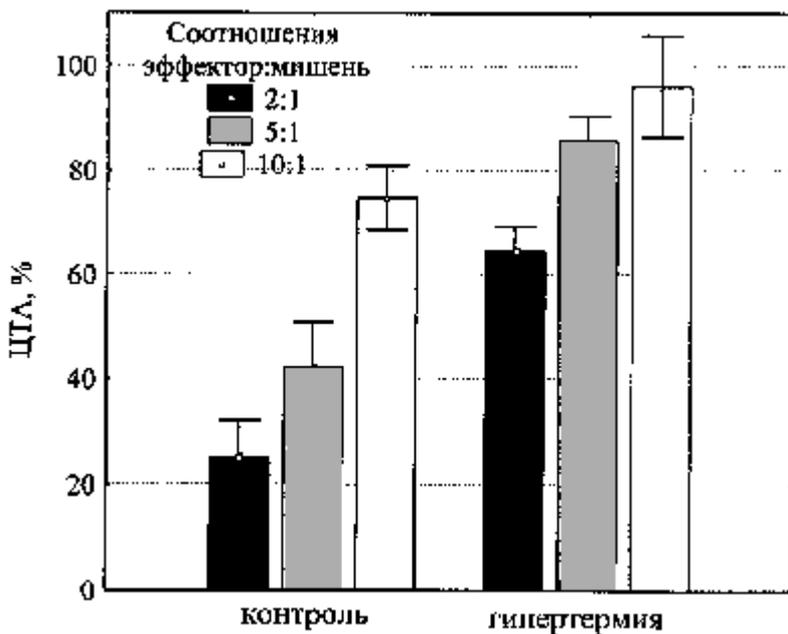


Рис. 1 Влияние гипертермической обработки клеток линии K562 на их чувствительность к цитотоксическому действию мононуклеаров крови здоровых людей *in vitro*

Наконец, мы оценили влияние гипертермической обработки мононуклеаров здоровых людей на их цитотоксическую активность в отношении линии K-562 *in vitro*. Как показано в рис. 2, гипертермическая обработка приводит к достоверному снижению цитотоксической активности мононуклеаров периферической крови против опухолевых клеток линии K-562.

Таким образом, гипертермическая обработка (42°C, 120 мин) приводит к снижению жизнеспособности опухолевых клеток линий U-937, HL-60, KG-1, но не K-562 и клеток здоровых людей при культивировании *in vitro* в течение 4 суток. Гипертермическое воздействие в указанном режиме повышает чувствительность клеток линии K-562 к ЕК-клеточной цитотоксичности мононуклеаров периферической крови. Следует отметить, что гипертермия также снижает и цитотоксическую активность самих ЕК клеток.

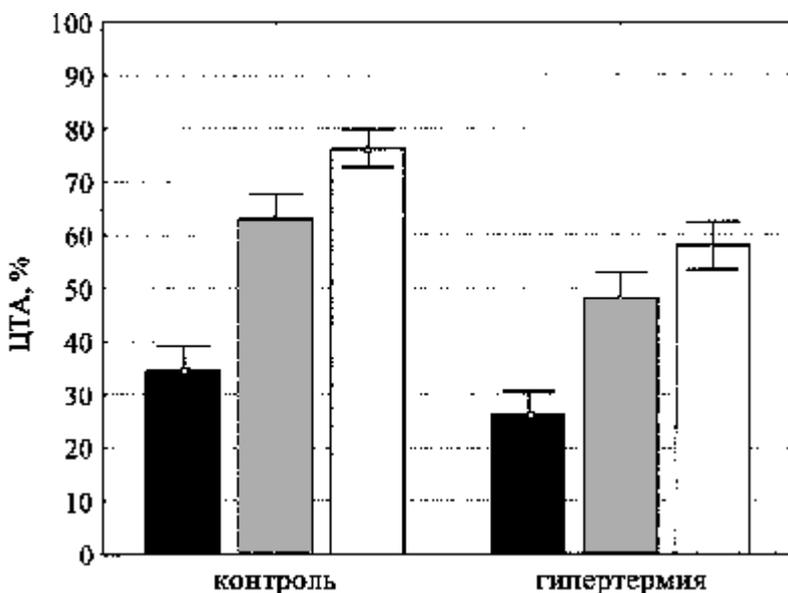


Рис. 2. Влияние гипертермической обработки мононуклеарных клеток крови здоровых людей на их цитотоксическую активность против клеток линии К-562 *in vitro*

Результаты экспериментов по кинетике роста клеток линии К-562 в условиях гипертермии приведены на рис. 3. Статистический анализ данных позволяет говорить о выраженной супрессии роста опухолевых клеток, подвергшихся жесткому гипертермическому воздействию ( $p=0,0003$ ). При этом жизнеспособность клеток в культуре практически не изменялась на протяжении всего периода культивирования после воздействия температуры и в среднем составила 93, 94 и 92 % для контроля и клеток, претерпевших нагревание до 42 и 43°C соответственно.

Математический расчет среднего времени удвоения культуры, коррелирующий с продолжительностью клеточного цикла, показал его увеличение после применения гипертермии (значения 37,5; 70,0 и 74,8 ч для контроля, 42 и 43°C соответственно).

Таким образом, ингибирующее опухолевый рост действие повышенной температуры (43°C, 60 мин) связано не с её прямым повреждающим действием, а с задержкой клеток на критических этапах клеточного цикла.

A – концентрация клеток, нормализованная к её исходному значению;  $n=8$ , 4 и 4 для кривых контроля, 42°C и 43°C соответственно

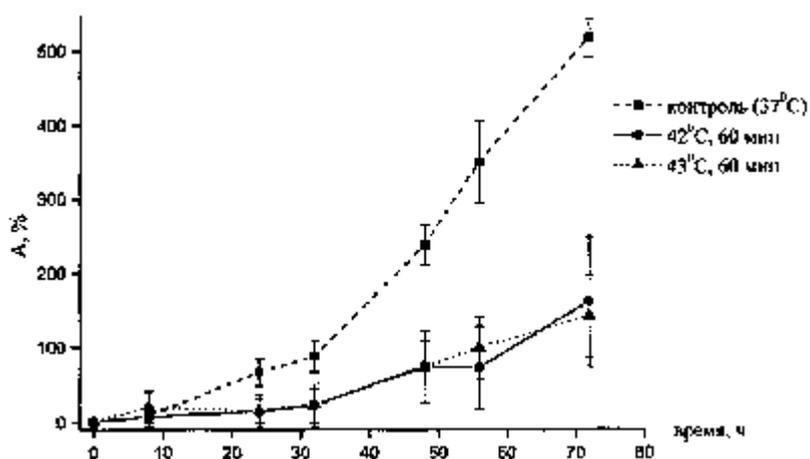


Рис. 3. Кинетика роста клеток линии К-562 после гипертермического воздействия

Выводы

1. Гипертермическая обработка (42°C, 120 мин) приводит к снижению жизнеспособности опухолевых клеток линий U-937, HL-60, KG-1.
2. Гипертермия в указанном режиме также повышает чувствительность клеток линии К-562 к цитотоксической активности мононуклеаров периферической крови.

### Литература

1. Жаврид Э.А., Осинский С.П., Фрадкин С.З. Гипертермия и гипергликемия в онкологии. Киев: Наук. думка, 1997. 256 с.
2. Курпешов О.К., Цыб А.Ф., Мардынский Ю.С., Бердов Б.А. Механизмы развития и пути преодоления химиорезистентности опухолей // Российский онкологический журнал. 2003. № 3. С. 50-53:
3. Фрадкин С.З. Современное состояние гипертермической онкологии и тенденции ее развития // Медицинские новости. 2004. № 3. С. 3-8.

4. Шпакова А.П., Павлова К.С., Булычева Т.И. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток // Иммунология. 2000. Т. 2. С. 20-23.
5. Anjum A., Fleischmann W.R. Effect of hyperthermia on the antitumor actions of Interferons // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 1992; 6(3); 75-86.
6. Fritz K.L., Koziol S., Fabian D.F., Lefor A.T. Tumor necrosis factor alpha mediate the antitumor effect of combined interleukin-2 and whole body hyperthermia // J. Surg. Res. 1996; 60: No 1: 55-60.
7. Hall E.J., Roizin-Towle L. Biological effects of heat // Cancer Research. 1984; 44:4708s-4713s.
8. Khong H.T., Restifo N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes // Nature Immunol. 2003; 3: 999-1005.
9. Nanni P., Forni G., Lollini P.L. Cytokine gene therapy:hopes and pitfalls // Ann. Oncol. 1999; 10; 261-266.
10. Sawaji Y., Sato T., Takeuchi A. et al. Anti-angiogenic action of hyperthermia by suppressing gene expression and production of tumour-derived vascular endothelial growth factor in vivo and in vitro // Br. J. Cancer. 2002; May 20:86(10):1597-15603.
11. Sakaguchi Y., Stephens L.C., Makino M. et al. Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia in rats // Cancer. Res. 1995 Nov 15; 55(22): 5459-5464.
12. Short J., Turner P. Physical Hyperthermia and cancer therapy // Proc. IEEE, 1980: 68: NI: 133-142.
13. Schueller G., Paolini P., Friedl J., Stift A., Dubsy P., Bachleitner-Hofmann T., Jakesz R., Grant M. Heat treatment ofhepatocellular carcinoma cells: increased levels of heat shocks proteins 70 and 90 correlete with cellular necrosis // Anticancer Res. 2001; 21:295-300.
14. Sreedhar A.S., Pardhasadhi B.V.V., Khar A., Srivinas U.K. Heat induced expression of CD95 and its correlation with the activation of apoptosis upon heat shock in rat histiocytic tumor cells // FEBS Letters. 2000; 472: 271-275.
15. Urano M., Kuroda M., Nishimura Y. For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures// Int. J. Hyperthermia. 1999; 15(2); 79-107.