DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-4-141-154

УДК 615.832.8.015.2:612.014.482].015.44

Реакции нормальных и опухолевых клеток и тканей на гипертермию в сочетании с ионизирующей радиацией. Обзор

Кабаков А.Е.¹, Анохин Ю.Н.², Лебедева Т.В.¹

¹ МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск;

² ИАТЭ – филиал ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск

В обзоре представлен анализ литературы о модифицирующем действии гипертермии (ГТ) на радиационный ответ нормальных и опухолевых клеток и тканей, а также об использовании ГТ для повышения радиочувствительности опухолей. Проанализированные данные свидетельствуют о том, что радиосенсибилизирующие эффекты ГТ проявляются в аддитивном или синергетическом усилении цитотоксичности в облучённых био-объектах. Степень такого усиления зависит от уровня нагрева, дозы радиации, последовательности применения и интервала между воздействиями, типа ткани и пр. Радиосенсибилизирующие эффекты ГТ проявляются не только на опухолевых, но и на нормальных клетках и тканях. Это обстоятельство требует определения фактора терапевтического выигрыша в разных случаях применения термолучевой терапии опухолей. В клеточных реакциях на ГТ и радиационное воздействие активно участвуют белки теплового шока (БТШ), которые являются одним из факторов устойчивости опухолей к термо-, химио- и радиотерапии. Показано, что функционирование БТШ90 необходимо для пострadiационной репарации разрывов ядерной ДНК. Кроме того, БТШ90, БТШ70 и БТШ27 являются мощными супрессорами апоптоза и помогают стрессированной клетке реактивировать или деградировать денатурированные стрессом белки. В случае комбинации ГТ и облучения эти БТШ образуют комплексы с денатурированными внутриклеточными белками и уже не могут действовать как радиопротекторы и блокаторы апоптоза. Таким образом, рекрутирование БТШ для защиты от протеотоксических эффектов ГТ происходит в ущерб БТШ-опосредованной радиорезистентности раковых клеток и, следовательно, способствует их радиосенсибилизации. Однако, индукция и временное повышение уровней БТШ90, БТШ70 и БТШ27 в переживших ГТ клетках может сделать их на какой-то период термотолерантными и более радиорезистентными, что следует учитывать в случае последовательного комбинирования ГТ и лучевой терапии.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, белки теплового шока, радиочувствительность, гипертермия, вне- и внутриклеточный pO_2 и pH, кровоток, термочувствительность, терапевтический выигрыш, терапия опухолей, термотолерантность.

Введение

Радиочувствительность опухоли зависит от множества факторов: гистологического типа, скорости репопуляции клеток, количества гипоксических клеток, их микроокружения, а также взаимоотношения паренхимы и стромы. Ведущим является число гипоксических и непролиферирующих клеток. При падении pO_2 ниже 15-20 мм рт. ст. опухоль становится более радиорезистентной. Причина хронической гипоксии вызвана быстрым неконтролируемым делением её клеток и медленным развитием капилляров в этих участках. По мере отдаления опухолевых клеток от капилляра концентрация кислорода падает и на расстоянии 150 мкм (10-15 рядов клеток) сводится к нулю, что приводит к возникновению гипоксических и аноксических зон, вплоть до развития некроза [1]. В этой связи для повышения эффективности лучевой терапии (ЛТ) опухолей перспективным является поиск путей управления радиочувствительностью тканей. По данным экспериментальных и клинических исследований гипертермия (ГТ) является сильнейшим модификатором радио- и химиочувствительности опухолевых клеток [2-4]. Использо-

Кабаков А.Е. – зав. лаб., к.б.н.; Лебедева Т.В. – вед. научн. сотр., к.б.н. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Анохин Ю.Н.* – зав. кафедрой, к.м.н. ИАТЭ НИЯУ МИФИ.

*Контакты: 249036, Калужская обл., Обнинск, Студгородок 1. Тел.: +7-910-542-97-30; e-mail: YNAnokhin@mephi.ru.

зование её в клинической онкологии позволило значительно повысить результаты лучевой и химиолучевой терапии опухолей [5-10].

Для дальнейшего улучшения эффективности ГТ в комбинированном лечении опухолей необходимо изучение различных сторон её биологического действия на нормальные и опухолевые ткани в экспериментальных и клинических исследованиях. Установлено, что биологическое действие ГТ проявляется ингибированием синтеза нуклеиновых кислот, белков, их агрегацией и денатурацией, нарушением репарации ДНК, трансмембранного переноса, ингибированием дыхания клеток, подавлением активности лизосом, ферментов репарации, модификацией митотического цикла и т.д. Интенсивность протекания этих процессов зависит от уровня температуры и продолжительности нагревания. Все эти изменения приводят к повреждению клеток или повышению их чувствительности к действию ионизирующей радиации и лекарственных препаратов [11-14]. Следует отметить, что разрывы ДНК происходят при жёстких условиях гипертермии [15], тогда как радиосенсибилизирующее её действие проявляется при более мягкой (42-43 °C) тепловой обработке и в основном обусловлено её протеотоксичностью, т.е. повреждением клеточных белков. В условиях *in vivo* большинство нативных белков имеет трёхмерную глобулярную структуру, которая стабильна при нормальных физиологических условиях благодаря многочисленным водородным связям, электростатическим и гидрофобным взаимодействиям между различными доменами белковой макромолекулы. Эти связи и взаимодействия обеспечивают правильную укладку законченной полипептидной цепи и допустимые (регулируемые) переходы между детерминированными конформациями трёхмерной глобулы. Находясь в физиологических диапазонах температуры, ионной силы и pH, такие глобулярные белки обычно не склонны к агрегации, поскольку все их «липкие» сайты упрятаны внутрь глобулы, экранированы или замкнуты друг на друга. Во время гипертермии поглощение белковыми молекулами квантов энергии приводит к «расплавлению» глобулярных структур, когда разрушаются внутримолекулярные водородные связи, гидрофобные домены экспонируются наружу, а глобулы постепенно разворачиваются, превращаясь в гибкие (термодинамически нестабильные) полипептидные нити. Такая тепловая денатурация внутриклеточных белков, как правило, сопровождается их агрегацией и потерей нормальной функциональной активности; впоследствии многие денатурированные белки подвергаются протеолизу и деградируют. Агрегация, инактивация и деградация термолабильных белков в прогретых клетках приводят к угнетению метаболизма, дисфункции мембранных помп и ионному дисбалансу, разборке цитоскелета и другим нарушениям клеточного гомеостаза, характерным для теплового стресса [16].

Очевидно, что в случае комбинирования лучевой терапии и гипертермии протеотоксичность теплового стресса будет усиливать генотоксичность радиационного воздействия, тем самым способствуя радиосенсибилизации опухоли-мишени. Действительно, чтобы выжить и восстановить пролиферативную активность, облучённая раковая клетка должна вовремя репарировать радиационные повреждения своего генома (прежде всего двойные разрывы ДНК [17]), что затруднительно осуществить после теплового стресса, когда внутриклеточные системы коммуникаций и регуляторных сигналов не работают из-за инактивации или деградации их функционально важных белковых компонентов. Известно, что гипертермия серьёзно изменяет специфическую реакцию облучённых злокачественных клеток на разрывы ядерной ДНК, нарушая работу киназы АТМ [15] и вызывая деградацию и падение экспрессии BRCA2 – ключевого фермента репарации разрывов ДНК, основанной на гомологической рекомбинации [18, 19]. Если,

благодаря всем этим эффектам, репарация радиационных повреждений ДНК не завершается в срок, такая раковая клетка обречена – она либо погибает в результате апоптоза, некроза или митотической катастрофы, либо переходит в необратимое состояние репликативной сенесценции (т.е. утрачивает способность к делению) [20]. Так на молекулярно-клеточном уровне реализуется феномен радиосенсибилизации опухолей посредством их гипертермической обработки.

Взаимодействие гипертермии с ионизирующим излучением

Биологический эффект ГТ при слабых и умеренных температурных режимах (39-42(43) °C) в основном проявляется сенсибилизирующим (сенситизирующим) действием, при высоких (>42(43) °C) – повреждающим. В отличие от действия ионизирующего излучения при ГТ наблюдается другая зависимость чувствительности клеток от стадии клеточного цикла. Клетки в позднем S-периоде характеризуются наибольшей радиорезистентностью и высокой термочувствительностью. Низкий внеклеточный pH опухоли и значительная разница между вне- и внутриклеточными его значениями заметно влияют на реакцию новообразования при различных видах лечения. В кислой среде подавляется радиационно-индуцированный апоптоз, а индуцированная гипертермией гибель клеток усиливается [21]. Выраженный радиосенсибилизирующий эффект ГТ при низких значениях pH особенно выражен для гипоксических клеток [22]. Из этого следует, что при лучевой терапии опухолей ГТ выступает как фактор, сглаживающий колебания в выживаемости клеток в зависимости от различных условий их пребывания (стадии клеточного цикла, уровней pO₂, pH). Взаимодействие радиации с гипертермией может проявляться аддитивным или синергетическим (потенцирующим) эффектами. Выраженность проявления этих эффектов определяется уровнем нагрева, дозой радиации, последовательностью применения двух повреждающих факторов и интервалом времени между воздействиями, типом опухоли [23-25].

На рис. 1 представлены кривые выживаемости клеток V79 при нагревании до 42 °C в течение 1,5-11 ч и последующем воздействии ионизирующей радиацией [25]. В этих опытах авторы наблюдали синергизм действия двух повреждающих факторов при всех режимах ГТ, а суммарный эффект зависел от продолжительности нагревания и дозы радиации.

Рис. 1. Кривые выживаемости клеток V79 после нагревания при 42 °C с продолжительностью от 1,5 до 11 часов и облучения в различных дозах [25].

По оси абсцисс – доза ионизирующей радиации (рад), по оси ординат – выживаемость клеток.

Синергизм действия ГТ и ЛТ был получен для многих опухолей и в условиях *in vivo*. Частота регрессии саркомы-180 при одной ГТ составила 10%, облучении – 20%, комбинации ГТ с ЛТ – 70-80% [26]. При раздельном нагревании и облучении (16 Гр) карциномы молочной железы мышей не было отмечено полной регрессии, при комбинации их – она наступила у 77% животных [27]. В опытах Robinson J.E. et al. [23] одно нагревание не приводило к полному рассасыванию карциномы молочной железы мышей, в то время как при одной ЛТ значение TD_{50} (доза радиации, приводящая к рассасыванию опухоли у 50% животных) равнялась 52,5 Гр. При комбинации ЛТ и ГТ с продолжительностью 60 мин, величина TD_{50} уменьшалась: при 41 °С – до 38 Гр, 42 °С – 19,2 Гр, 43 °С – 12,3 Гр. Коэффициент термического усиления (КТУ) составил 1,4 при 41 °С, 2,7 – при 42 °С и 4,3 – при 43 °С. Схожие результаты авторами были получены в опытах на меланоме, рабдомиосаркоме, остеосаркоме, аденокарциноме молочной железы мышей. Было также показано, что значение КТУ гипертермии зависит не только от уровня температуры, но и от величины разовой дозы ЛТ. Нагревание фибросаркомы мышей до 41 °С сразу после облучения не повышало повреждаемость опухоли, в то время как при 42,5 или 43,5 °С и ЛТ в дозе до 20 Гр КТУ составил 1,1-1,3, а в дозах 20-30 Гр – 1,4-1,5 [24].

Радиосенсибилизирующий эффект ГТ обнаружен не только для опухолевых, но и нормальных тканей. Было показано, что с увеличением уровня температуры и дозы радиации КТУ больше при применении ГТ до облучения, чем после. КТУ, оцененный по повреждению кишечника мышей при ГТ до облучения составил 1,25 для 41,3 °С, 1,5 – для 41,8 °С, а при нагревании после облучения равнялся 1,1 и 1,3 соответственно. Это различие более чётко проявлялось с увеличением уровня температуры и дозы радиации [28].

На рис. 2 представлен диапазон изменения КТУ в зависимости от уровня температуры для нормальных тканей, полученный при изучении реакции кожи уха, стопы, кишечника и хряща хвоста мышей и крыс [29].

Рис. 2. КТУ гипертермии в зависимости от уровня температуры для нормальных тканей [29].

Из рисунка следует, что КТУ для нормальных тканей в среднем возрастает от 1,2 при 41 °С и почти до 2 при 43 °С. В этой связи важным является оценка фактора терапевтического выигрыша (ФТВ) при использовании ГТ в комбинации с ЛТ. Количественно ФТВ определяется

отношением КТУ для опухолевых и нормальных тканей. О преимуществе применения различных комбинаций ГТ с ЛТ можно говорить, если величина ФТВ значительно больше единицы.

Stewart F.A., Denekamp J. [24] при изучении реакции фибросаркомы и кожи мышей на облучение и ГТ (41,5-43,5 °C, 60 мин) при различных последовательностях и интервалах воздействия (0-6 ч) обнаружили повышение ФТВ до 1,2-1,5 только при нагревании за 3 часа до или через 2-6 ч после облучения. При остальных схемах он был близок к единице. Hill S.A., Denekamp J. [30] на 6 опухолях мышей (карциномы D, NT, RH, саркомы S, F и MT2) изучили зависимости величины ФТВ от последовательности и интервала времени между ГТ и ЛТ. В этих опытах значения ФТВ в меньшей степени зависели от последовательности применения двух факторов: для интервалов времени не более 1 часа он не превышал 1,0, а в некоторых случаях был даже ниже. Для интервала 2-6 часов, за исключением саркомы S, значение ФТВ составляло 1,1-1,3, а иногда достигало 1,4-1,5.

Overgaard J. [31, 32] на карциноме молочной железы и кожи мышей изучил величину ФТВ при различных режимах ГТ (41,5-43,5 °C) и последовательностях применения её с облучением. Наилучшее значение ФТВ (1,67-2,09) он получил при нагревании через 4 ч после облучения. Однако по данным Jansen W. et al. [33], величина ФТВ на карциноме молочной железы мышей была выше 1,0 только при облучении сразу после ГТ, а при интервалах 1-4 часа она снижалась до 1,0. Robinson J.E. et al. [23] при облучении этой же опухоли в середине одночасового нагревания также обнаружили большее повреждение опухоли, чем кожи, т.е. величину ФТВ выше 1,0. Величина ФТВ возрастала с повышением температуры: при 41 °C составляла 1,2; 42 °C – 1,8; 42,5 °C – 1,9; 43 °C – 2,1. Overgaard J. [31, 32] тенденцию к повышению величины ФТВ с увеличением интервала между воздействиями наблюдал на мышах с аденокарциномой молочной железы при фракционированной термолучевой терапии (ТЛТ). Однако Stewart, Denekamp [34] при облучении фибросаркомы мышей в 1, 2 или 5 фракций и последующем нагревании сразу или через 3 ч выявили, что с увеличением фракции величина КТУ для опухоли снижается, а для кожи остаётся без изменений. Поэтому значение ФТВ выше единицы они получили только при однократном термолучевом воздействии с нагреванием через 3 ч после облучения.

Белки теплового шока и термотолерантность

В клеточных реакциях на гипертермию и радиационное воздействие участвуют так называемые белки теплового шока (БТШ), которые конститутивно экспрессируются в злокачественных клетках и являются одним из факторов устойчивости опухолей к термо-, химио- и радиотерапии [35]. Показано, что функционирование БТШ90 необходимо для пост-радиационной репарации ядерной ДНК [36]. Кроме того, БТШ90, БТШ70 и БТШ27 являются мощными супрессорами апоптоза [37] и помогают стрессированной клетке реактивировать или деградировать денатурированные белки [38]. В случае комбинации гипертермии и облучения эти БТШ образуют комплексы с денатурированными внутриклеточными белками, включаются в состав белковых агрегатов и при этом, вероятно, уже не могут действовать как радиопротекторы и блокаторы апоптоза. Таким образом, рекрутирование БТШ для защиты от протеотоксических эффектов гипертермии происходит в ущерб БТШ-опосредованной радиорезистентности раковых клеток и, следовательно, способствует их радиосенсибилизации. С другой стороны, тепловая денатурация клеточных белков провоцирует характерный стресс-ответ, который заключается в актива-

ции транскрипционного фактора HSF1 и последующей HSF1-зависимой индукции дополнительных БТШ [38]. Индукция и временное накопление БТШ90, БТШ70 и БТШ27 в переживших гипертермическую обработку клетках может сделать их на какой-то период термотолерантными и даже более устойчивыми к облучению [35, 39]. Эту информацию следует учитывать при фракционированном воздействии ионизирующей радиации и гипертермии. Это важно понимать, чтобы очередная обработка не приходилась на пик экспрессии индуцированных гипертермией БТШ, когда обогащённые БТШ опухолевые клетки легче переносят и тепловое и радиационное воздействие.

С практической точки зрения несколько более подробно следует рассмотреть феномен термотолерантности (ТТ). Она проявляется во всех клетках и тканях при предварительном тепловом воздействии. Максимум развития ТТ наблюдается в течение 1-2 суток после первого воздействия теплом и может соответствовать увеличению времени равноэффективного нагрева от 2 до 50 раз. Величина и динамика ТТ зависит от уровня первоначальной тепловой дозы, пролиферативной активности клеток и тканей [4, 5, 40-42]. Термотолерантность хряща хвоста мышей сохраняется более 2 недель (до 30 суток), сперматогенного эпителия – в течение 1 суток, клеток опухоли Льюис – до 1 недели [4, 43]. Имеются сведения, что ТТ может ослаблять действие радиации [44, 45] или химиопрепаратов [41, 46]. Влияние ТТ на химиосенсибилизирующий эффект ГТ на опухоли зависит от уровня температуры. По данным Liu T. et al. [41], на клетках рака желудка более выраженная ТТ была при нагревании до 46 °С, что привело к снижению эффекта термохимотерапии, и выживаемость клеток в этом случае была как при нагревании до 43 °С.

В основе развития ТТ лежит экспрессия белков теплового шока (БТШ) с различными молекулярными массами, в основном 70 кДа [47, 48]. Максимального значения БТШ, как и ТТ достигают через 2-4 часа после первого теплового воздействия, через 6-24 часа скорость синтеза уменьшается до исходного уровня.

Интересным представляется исследование Eng et al. [49], которые выявили, что уровень БТШ в крови у мышей при общей гипертермии (39,5 °С) зависит от условий температурного содержания их до нагревания. У животных, находившихся в помещении с температурой 22 °С, уровень белков БТШ70, БТШ90, БТШ110 был выше, чем у мышей, содержавшихся при температуре 30 °С. Все вышеуказанные процессы, которые происходят в опухоли и в её клетках под действием гипертермии, приводят к изменению их радиочувствительности. С другой стороны, есть возможность менять термочувствительность опухолевых клеток ингибиторами активности и экспрессии шаперонов [50].

Заключение

Взаимодействие ионизирующей радиации с гипертермией может проявляться аддитивным или синергетическим усилением радиационного ответа в облучённых клетках и тканях. Степень этого усиления зависит от многих факторов, таких как условия ГТ, доза радиации, последовательность применения двух повреждающих воздействий и интервал времени между воздействиями, тип опухоли и пр. Радиосенсибилизирующий эффект ГТ обнаружен не только для опухолевых, но и для нормальных тканей, что требует изучения фактора терапевтического выигрыша при лучевой терапии различных типов опухолей. В клеточных реакциях на ГТ и облуче-

ние активно участвуют БТШ, которые конститутивно экспрессируются в злокачественных клетках и вносят вклад в устойчивость опухолей к термо-, химио- и радиотерапии. Показано, что функционирование БТШ90 необходимо для пост-радиационной репарации разрывов ядерной ДНК. Кроме того, БТШ90, БТШ70 и БТШ27 являются мощными супрессорами апоптоза и помогают стрессированной клетке реактивировать или деградировать денатурированные белки. В случае комбинации ГТ и облучения эти БТШ образуют комплексы с денатурированными внутриклеточными белками и уже не могут действовать как радиопротекторы и блокаторы апоптоза. Таким образом, рекрутирование БТШ для защиты от протеотоксических эффектов ГТ происходит в ущерб БТШ-опосредованной радиорезистентности раковых клеток и, следовательно, способствует их радиосенсибилизации. С другой стороны, тепловая денатурация клеточных белков провоцирует HSF1-зависимую индукцию дополнительных БТШ в клетках-мишенях, что может повысить их термо- и радиорезистентность. Необходимо дальнейшее изучение биологических эффектов ГТ, чтобы сделать её радиосенсибилизирующее действие более селективным в отношении злокачественных опухолей.

Литература

1. **Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А.** Радиобиология человека и животных. М: Изд. Высшая школа, 2004. 549 с.
2. **Курпешев О.К.** Закономерности радиосенсибилизирующего и повреждающего эффектов гипертермии на нормальные и опухолевые ткани: Автореф. дис.... докт. мед. наук. Обнинск, 1989. 37 с.
3. **Курпешев О.К., Цыб А.Ф., Мардынский Ю.С., Бердов Б.А.** Механизмы развития и пути преодоления химиорезистентности опухолей. Часть 3. Возможные пути преодоления химиорезистентности опухолей //Российский онкологический журнал. 2003. № 2. С. 50-52.
4. **Datta N.R., Ordonez S.G., Gaip U.S., Paulides M.M., Crezee H., Gellermann J., Marder D., Puric E., Bodis S.** Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future //Cancer Treat. Rev. 2015. V. 41, N 9. P. 742-753. DOI: 10.1016/J.CTRV.2015.05.009.
5. **Курпешев О.К., Мардынский Ю.С., Максимов С.А.** Комбинированное лечение больных раком полости рта с использованием «условно-динамического» режима фракционирования лучевой терапии и локорегионарной гипертермии //Сибирское медицинское обозрение. 2011. Т. 67, № 1. С. 80-84.
6. **Бердов Б.А., Курпешев О.К., Мардынский Ю.С.** Влияние гипертермии и гипергликемии на эффективность лучевой терапии онкологических больных //Российский онкологический журнал. 1996. № 1. С. 12-16.
7. **Курпешев О.К., Мардынский Ю.С.** Радиомодификаторы в лучевой терапии опухолей //Терапевтическая радиология /под ред. А.Ф. Цыба, Ю.С. Мардынского. М., 2010. С. 13-43.
8. **Van der Zee J., Vujaskovic Z., Kondo M., Sugahara T.** Clinical hyperthermia. Part I. The Kadota Fund International Forum 2004 – Clinical group consensus //Int. J. Hyperthermia. 2008. V. 24. N 2. P. 111-122.
9. **Панкратов В.А., Андреев В.Г., Рожнов В.А., Гулидов И.А., Барышев В.В., Буякова М.Е., Вдовина С.Н., Курпешев О.К., Подлесных Н.И.** Одновременное применение химио- и лучевой терапии при самостоятельном консервативном и комбинированном лечении больных местно-распространённым раком гортани и гортаноглотки //Сибирский онкологический журнал. 2007. Т. 21, № 1. С. 18-22.
10. **Курпешев О.К., Рагулин Ю.А., Мозеров С.А., Орлова А.В., Лебедева Т.В.** Возможности локальной гипертермии при лечении больных отёчной формой рака молочной железы //Вопросы онкологии. 2016. Т. 62, № 5. С. 680-687.
11. **Barlev N.A.** Hot and toxic: hyperthermia and anti-mitotic drugs in cancer therapy //Cell Cycle. 2013. V. 12, N 16. P. 2533.
12. **Mehtala J.G., Torregrosa-Allen S., Elzey B.D., Jeon M., Kim Ch.; Wei A.** Synergistic effects of cisplatin chemotherapy and gold nanorod-mediated hyperthermia on ovarian cancer cells and tumors //Nanomedicine (London). 2014. V. 9, N 13. P. 1939-1955. DOI: 10.2217/nnm.13.209.
13. **Oei A.L., Vriend L.E.M., Crezee J., Franken N.A.P.** Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all //Radiat. Oncol. 2015. V. 10. P. 165-178. DOI: 10.1186/s13014-015-0462-0.
14. **Zhu S., Wang J., Xie B., Luo Zh., Lin X., Liaoe D.J.** Culture at a higher temperature mildly inhibits cancer cell growth but enhances chemotherapeutic effects by inhibiting cell-cell collaboration //PLoS ONE. 2015. V. 10, N 10. e0137042. DOI: 10.1371/journal.
15. **Pandita T.K., Pandita S., Bhaumik S.R.** Molecular parameters of hyperthermia for radiosensitization //Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 2009. V. 19, N 3. P. 235-251.
16. **Hyperthermic oncology from bench to bedside /Eds.: S. Kokura, T. Yoshikawa, T. Ohnishi.** Springer, 2016. 444 p.

17. **Mladenov E., Magin S., Soni A., Iliakis G.** DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy //Front. Oncol. 2013. N 3. P. 113. DOI: 10.3389/fonc.2013.00113.
18. **Harnicek D., Kampmann E., Lauber K., Hennel R., Cardoso Martins A.S., Guo Y., Belka C., Mortl S., Gallmeier E., Kanaar R., Mansmann U., Hucl T., Lindner L.H., Hiddemann W., Issels R.D.** Hyperthermia adds to trabectedin effectiveness and thermal enhancement is associated with BRCA2 degradation and impairment of DNA homologous recombination repair //Cancer. 2016. V. 139, N 2. P. 467-479.
19. **Van den Tempel N., Laffeber C., Odijk H., van Cappelen W.A., van Rhooon G.C., Franckena M., Kanaar R.** The effect of thermal dose on hyperthermia-mediated inhibition of DNA repair through homologous recombination //Oncotarget. 2017. V. 8, N 27. P. 44593-44604. DOI: 10.18632/oncotarget.17861.
20. **Schmitt C.A.** Cellular senescence and cancer treatment //Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Reviews on Cancer. 2007. V. 1775. P. 5-20.
21. **Song C.W., Griffin R., Shakil A.** Tumor pO₂ increased by mild temperature hyperthermia //Hyperthermic Oncology (Roma). 1996. V. II. P. 783-785.
22. **Herman T.S., Teicher B.A., Holden S.A., Collins L.S.** Interaction of hyperthermia and radiation in murine cells: hypoxia and acidosis in vitro, tumor subpopulations in vivo //Cancer Res. 1989. V. 49. P. 3338-3343.
23. **Robinson J.E., Wisenberg M.J., McCready W.A.** Radiation and hyperthermal response of normal tissue in situ //Radiology. 1974. V. 113, N 1. P. 195-198.
24. **Stewart F.A., Denekamp J.** The therapeutic advantage of combined heat and X-rays on a mouse fibrocarcinoma //Brit. J. Radiol. 1978. V. 51, N 604. P. 307-316.
25. **Dewey W.C.** The search for critical targets damaged by heat //Radiat. Res. 1989. V. 20. P. 191-204.
26. **Crile G.J.** Heat as an adjunct to the treatment of cancer //Cleveland Clin. 1961. V. 28. P. 75-89.
27. **Overgaard K., Overgaard J.** Radiation sensitizing effect of heat //Acta Radiol. 1974. V. 13. N 6. P. 501-511.
28. **Hume S.P., Field S.B.** Hyperthermic sensitization of mouse intestine to damage by X-rays: the effect of sequence and temporal separation of the two treatments //Brit. J. Radiol. 1978. V. 51, N 604. P. 302-307.
29. **Myers R., Field R.B.** The response of the rat tail on to combined heat and X-rays //Br. J. Radiol. 1977. V. 52. P. 581-586.
30. **Hill S.A., Denekamp J.** The response of six mouse tumours to combined heat and X-rays; implications for therapy //Brit. J. Radiol. 1979. V. 52. P. 209-218.
31. **Overgaard J.** Simultaneous and sequential hyperthermia and radiation treatment of an experimental tumor and its surrounding normal tissue in vivo //Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys. 1981. V. 6, N 11. P. 1507-1517.
32. **Overgaard J.** Fractionated radiation and hyperthermia: experimental and clinical studies //Cancer. 1981. V. 48, N. 5. P. 1116-1123.
33. **Jansen W., Scuren E., Breur K.** Thermal enhancement of the radiation response of the skin and mammary carcinoma in mice //Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation /Eds.: Streffer C. et al. Baltimore-Munich, 1978. P. 255-256.
34. **Stewart F.A., Denekamp J.** Loss of therapeutic advantage for combined heat and X-rays with fractionation //Nat. Cancer Inst. Monogr. Washington, 1982. N 61. P. 291-293.
35. **Kabakov A.E., Kudryavtsev V.A.** Heat shock proteins as molecular targets for anticancer therapy: approaches, agents, and trends //Heat shock proteins. Classifications, functions, and applications /Ed.: S. Usmani. New York: Nova Science Publishers, 2013. P. 25-56.
36. **Kudryavtsev V.A., Khokhlova A.V., Mosina V.A., Selivanova E.I., Kabakov A.E.** Induction of Hsp70 in tumor cells treated with inhibitors of the Hsp90 activity: a predictive marker and promising target for radiosensitization //PLoS ONE. 2017. V. 12, N 3. e0173640. DOI: 10.1371/journal.pone.0173640.

37. **Kennedy D., Jager R., Mosser D.D., Samali A.** Regulation of apoptosis by heat shock proteins //IUBMB Life. 2014. V. 66, N 5. P. 327-338.
38. **Vabulas R.M., Raychaudhuri S., Hayer-Hartl M., Hartl F.U.** Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response //Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. 2:a004390.
39. **Kabakov A.E., Malyutina Y.V., Latchman D.S.** Hsf1-mediated stress response can transiently enhance cellular radioresistance //Radiat. Res. 2006. V. 165. P. 410-423.
40. **Griffin R.J., Dings P.M., Jamshidi-Parsian A., Song C.W.** Mild temperature hyperthermia and radiation therapy: role of tumour vascular thermotolerance and relevant physiological factors //Int. J. Hyperthermia. 2010. V. 26, N 3. P. 256-263.
41. **Liu T., Ye Y.-W., Zhu A.-L., Yang T.Zh., Fu Y., Wei Ch.-Q., Liu Q., Zhao Ch.-Lin., Wang G.-J., Zhang X.-Fu.** Hyperthermia combined with 5-fluorouracil promoted apoptosis and enhanced thermotolerance in human gastric cancer cell line SGC-7901 //Onco Targets Ther. 2015. V. 8. P. 1265-1270. DOI: 10.2147/OTT.S78514.
42. **Bettaieb A., Averill-Bates D.A.** Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells //Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1853, N 1. P. 52-62. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.09.016.
43. **Колесникова А.И., Кальсина С.Ш., Лепёхина Л.А.** Термочувствительность клоногенных клеток и индукция в них термотолерантности //Медицинская радиология. 1987. Т. 32, № 1. С. 67-69.
44. **Бреслер С.Е., Бекетова А.Г., Носкин Л.А., Розенберг О.А., Степанова И.М., Суслов А.В.** Термоиндуцированная радиорезистентность клеток //Радиобиология. 1984. № 5. С. 579-583.
45. **Miyakoshi R.E.J., Heki S., Kano E.** Cellular responses to hyperthermia and radiation in Chinese hamster cells //Modification of Radiosensitivity in Cancer Treatment /Ed.: T. Sugahara. Tokyo-New York-London-Monreal: Academic Press, 1984. P. 335-350.
46. **Hettinga J.V.E., Lemstra W., Konings A.W.T., Kampinga H.H.** Cisplatin sensitivity and thermochemosensitisation in thermotolerant cDDP-sensitive and -resistant cell lines //Br. J. Cancer. 1995. V. 71. P. 498-504.
47. **Kregel K.C.** Invited review. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance //J. Appl. Physiol. 2002. V. 92. P. 2177-2186.
48. **Li G.C., Mivechi N.F., Weitzel G.** Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia //Int. J. Hyperthermia. 1995. V. 11, N 4. P. 459-488.
49. **Eng J. W.-L., Reed C.B., Kokolus K.M., Repasky E.A.** Housing temperature influences the pattern of heat shock protein induction in mice following mild whole body hyperthermia //Int. J. Hyperthermia. 2014. V. 30, N 8. P. 540-546. DOI: 10.3109/02656736.2014.981300.
50. **Кудрявцев В.А., Макарова Ю.М., Кабаков А.Е.** Термосенсибилизация опухолевых клеток ингибиторами активности и экспрессии шаперонов //Биомедицинская химия. 2012. Т. 58, № 6. С. 662-672.

Reactions of normal and tumor cells and tissues to hyperthermia in combination with ionizing radiation. Review

Kabakov A.E.¹, Anokhin Yu.N.², Lebedeva T.V.¹

¹ A. Tsyb MRRC, Obninsk;

² Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Obninsk

The review presents an analysis of literature data on the modifying effect of hyperthermia (HT) on the radiation response of normal and tumor cells and tissues, as well as on the use of HT to increase the radiosensitivity of tumors. The analyzed data indicate that the radiosensitizing effects of HT are manifested in the additive or synergistic enhancement of cytotoxicity in irradiated bio-objects. The degree of such enhancement depends on the level of heating, radiation dose, the sequence of the exposures and the interval between them, types of tissue, etc. The radiosensitizing effects of HT are manifested not only on tumors, but also on normal cells and tissues too. This circumstance requires determination of the therapeutic gain factor in different cases of application of the thermotherapy of tumors. Heat-shock proteins (HSPs), which are one of the factors of tumor resistance to thermo-, chemo- and radiotherapy, are actively involved in cellular reactions to HT and radiation exposure. It is shown that the functioning of HSP90 is necessary for the post-radiation repair of nuclear DNA breaks. In addition, HSP90, HSP70 and HSP27 are powerful suppressors of apoptosis and help the stressed cell to reactivate or degrade stress-denatured proteins. In the case of a combination of HT and radiation, these HSPs form complexes with denatured intracellular proteins and can no longer act as radioprotectors and blockers of apoptosis. Thus, recruitment of HSPs to protect against the proteotoxic effects of HT occurs to the detriment of HSP-mediated radioresistance of cancer cells and, consequently, contributes to their radiosensitization. However, the induction and transient increase in the levels of HSP90, HSP70 and HSP27 in cells that have survived HT can make them for some period thermotolerant and more radioresistant that should be taken into consideration in the case of consecutive combining HT and radiation therapy.

Key words: *ionizing radiation, heat shock proteins, radiosensitivity, hyperthermia, extra- and intracellular pO₂ and pH, blood flow, thermal sensitivity, therapeutic gain, therapy of tumors, thermotolerance.*

References

1. **Yarmonenko S.P., Vaynson A.A.** Radiobiology of humans and animals. Moscow, Izd. Vysshaya shkola, 2004, 549 p. (In Russian).
2. **Kurpeshev O.K.** Patterns of radiosensitizing and damaging effects of hyperthermia on normal and tumor tissues. Dr. med. sci. ref. dis. Obninsk, 1989. 37 p. (In Russian).
3. **Kurpeshev O.K., Tsyb A.F., Mardynsky Yu.S., Berdov B.A.** Chemoresistance of tumors: mechanisms of development and ways to overcome. Part 3. How to overcome chemoresistance of tumors. *Rossiiskij onkologicheskij zhurnal – Russian Journal of Oncology*, 2003, no. 2, pp. 50-52. (In Russian).
4. **Datta N.R., Ordonez S.G., Gaipal U.S., Paulides M.M., Crezee H., Gellermann J., Marder D., Puric E., Bodis S.** Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future. *Cancer Treat. Rev.*, 2015, vol. 41, no. 9, pp. 742-753. DOI: 10.1016/J.CTRV.2015.05.009.
5. **Kurpeshev O.K., Mardynsky Yu.S., Maksimov S.A., Medvedev V.S.** Combined treatment of patients with oral cancer by “conditional and dynamical” regime of fractional radiotherapy and loco-regional hyperthermia. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie – Siberian Medical Review*, 2011, vol. 67, no. 1, pp. 80-84. (In Russian).
6. **Berdov B.A., Kurpeshev O.K., Mardynsky Yu.S.** The effect of hyperthermia and hyperglycemia on the efficacy of radiation therapy for cancer patients. *Rossiiskij onkologicheskij zhurnal – Russian Journal of Oncology*, 1996, no. 1, pp. 12-16. (In Russian).

Kabakov A.E. – Head of Lab., C. Sc., Biol.; **Lebedeva T.V.** – Lead. Researcher, C. Sc., Biol. A. Tsyb MRRC. **Anokhin Yu.N.*** – Head of Dep., C. Sc., Med. IATE MEPhI.
Contacts: 1, Studgorodok, Obninsk, Kaluga region, Russia, 249036. Tel.: +7-910-542-97-30; e-mail: YNAnokhin@mephi.ru.

7. **Kurpeshev O.K., Mardynskiy Yu.S.** Radiomodifiers in Radiotherapy of Tumors. *Terapevticheskaya radiologiya – Therapeutic Radiology*. Eds.: A.F. Tsyb, Yu.S. Mardynsky. Moscow, 2010, pp. 13-43. (In Russian).
8. **Van der Zee J., Vujaskovic Z., Kondo M., Sugahara T.** Clinical hyperthermia. Part I. The Kadota Fund International Forum 2004 – Clinical group consensus. *Int. J. Hyperthermia*, 2008, vol. 24, no. 2, pp. 111-122.
9. **Pankratov V.A., Andreev V.G., Rozhnov V.A., Gulidov I.A., Barishev V.V., Buyakova M.E., Vdovina S.N., Kurpeshev O.K., Podlesnikh N.I.** Concurrent chemo-and radiation therapy in conservative alone and combined treatment of patients with locally advanced laryngeal and laryngopharyngeal cancers. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal – The Siberian Journal of Oncology*, 2007, vol. 21, no. 1, pp. 18-22. (In Russian).
10. **Kurpeshev O.K., Ragulin Yu.A., Mozerov S.A., Orlova A.V., Lebedeva T.V.** Possibilities of local hyperthermia in treatment for edematous breast cancer patients. *Voprosy onkologii – Problems in Oncology*, 2016, vol. 62, no. 5, pp. 680-687. (In Russian).
11. **Barlev N.A.** Hot and toxic: hyperthermia and anti-mitotic drugs in cancer therapy. *Cell Cycle*, 2013, vol. 12, no. 16, p. 2533.
12. **Mehtala J.G., Torregrosa-Allen S., Elzey B.D., Jeon M., Kim Ch., Wei A.** Synergistic effects of cisplatin chemotherapy and gold nanorod-mediated hyperthermia on ovarian cancer cells and tumors. *Nanomedicine (London)*, 2014, vol. 9, no. 13, pp. 1939-1955. doi:10.2217/nnm.13.209.
13. **Oei A.L., Vriend L.E.M., Crezee J., Franken N.A.P.** Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiat. Oncol.*, 2015, vol. 10, pp. 165-178. DOI: 10.1186/s13014-015-0462-0.
14. **Zhu S., Wang J., Xie B., Luo Zh., Lin X., Liaoe D.J.** Culture at a higher temperature mildly inhibits cancer cell growth but enhances chemotherapeutic effects by inhibiting cell-cell collaboration. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 10, e0137042. DOI: 10.1371/journal.
15. **Pandita T.K., Pandita S., Bhaumik S.R.** Molecular parameters of hyperthermia for radiosensitization. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 2009, vol. 19, no. 3, pp. 235-251.
16. *Hyperthermic oncology from bench to bedside*. Eds.: S. Kokura, T. Yoshikawa, T. Ohnishi. Springer, 2016, 444 p.
17. **Mladenov E., Magin S., Soni A., Iliakis G.** DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front. Oncol.*, 2013, no. 3, p. 113. DOI: 10.3389/fonc.2013.00113.
18. **Harnicek D., Kampmann E., Lauber K., Hennel R., Cardoso Martins A.S., Guo Y., Belka C., Mortl S., Gallmeier E., Kanaar R., Mansmann U., Hucl T., Lindner L.H., Hiddemann W., Issels R.D.** Hyperthermia adds to trabectedin effectiveness and thermal enhancement is associated with BRCA2 degradation and impairment of DNA homologous recombination repair. *Cancer*, 2016, vol. 139, no. 2, pp. 467-479.
19. **Van den Tempel N., Laffeber C., Odijk H., van Cappelen W.A., van Rhoon G.C., Franckena M., Kanaar R.** The effect of thermal dose on hyperthermia-mediated inhibition of DNA repair through homologous recombination. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 27, pp. 44593-44604. DOI: 10.18632/oncotarget.17861.
20. **Schmitt C.A.** Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, 2007, vol. 1775, pp. 5-20.
21. **Song C.W., Griffin R., Shakil A.** Tumor pO₂ increased by mild temperature hyperthermia. *Hyperthermic Oncology (Roma)*, 1996, vol. II, pp. 783-785.
22. **Herman T.S., Teicher B.A., Holden S.A., Collins L.S.** Interaction of hyperthermia and radiation in murine cells: hypoxia and acidosis in vitro, tumor subpopulations in vivo. *Cancer Res.*, 1989, vol. 49, pp. 3338-3343.
23. **Robinson J.E., Wisenberg M.J., McCready W.A.** Radiation and hyperthermal response of normal tissue in situ. *Radiology*, 1974, vol. 113, no. 1, pp. 195-198.
24. **Stewart F.A., Denekamp J.** The therapeutic advantage of combined heat and X-rays on a mouse fibrocarcinoma. *Brit. J. Radiol.*, 1978, vol. 51, no. 604, pp. 307-316.

25. **Dewey W.C.** The search for critical targets damaged by heat. *Radiat. Res.*, 1989, vol. 20, pp. 191-204.
26. **Crile G.J.** Heat as an adjunct to the treatment of cancer. *Cleveland Clin.*, 1961, no. 28, pp. 75-89.
27. **Overgaard K., Overgaard J.** Radiation sensitizing effect of heat. *Acta Radiol.*, 1974, vol. 13, no. 6, pp. 501-511.
28. **Hume S.P., Field S.B.** Hyperthermic sensitization of mouse intestine to damage by X-rays: the effect of sequence and temporal separation of the two treatments. *Brit. J. Radiol.*, 1978, vol. 51, no. 604, pp. 302-307.
29. **Myers R., Field R.B.** The response of the rat tail on to combined heat and X-rays. *Br. J. Radiol.*, 1977, vol. 52, pp. 581-586.
30. **Hill S.A., Denekamp J.** The Respons of Six mouse Tumours to Combined Heat and X-rays; Implications for Therapy. *Brit. J. Radiol.*, 1979, vol. 52, pp. 209-218.
31. **Overgaard J.** Simultaneous and sequential hyperthermia and radiation treatment of an experimental tumor and its surrounding normal tissue in vivo. *Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys.*, 1981, vol. 6, no. 11, pp. 1507-1517.
32. **Overgaard J.** Fractionated radiation and hyperthermia: experimental and clinical studies. *Cancer*, 1981, vol. 48, no. 5, pp. 1116-1123.
33. **Jansen W., Scuren E., Breur K.** Thermal enhancement of the radiation response of the skin and mammary carcinoma in mice. *Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation*. Eds: Streffer C. et al. Baltimore-Munich, 1978, pp. 255-256.
34. **Stewart F.A., Denekamp J.** Loss of therapeutic advantage for combined heat and X-rays with fractionation. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* Washington, 1982, no. 61, pp. 291-293.
35. **Kabakov A.E., Kudryavtsev V.A.** Heat shock proteins as molecular targets for anticancer therapy: approaches, agents, and trends. *Heat shock proteins. Classifications, functions, and applications*. Ed.: S. Usmani. New York, Nova Science Publishers, 2013, pp. 25-56.
36. **Kudryavtsev V.A., Khokhlova A.V., Mosina V.A., Selivanova E.I., Kabakov A.E.** Induction of Hsp70 in tumor cells treated with inhibitors of the Hsp90 activity: a predictive marker and promising target for radiosensitization. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 3, e0173640. DOI: 10.1371/journal.pone.0173640.
37. **Kennedy D., Jager R., Mosser D.D., Samali A.** Regulation of apoptosis by heat shock proteins. *IUBMB Life*, 2014, vol. 66, no. 5, pp. 327-338.
38. **Vabulas R.M., Raychaudhuri S., Hayer-Hartl M., Hartl F.U.** Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010, no. 2, a004390.
39. **Kabakov A.E., Malyutina Y.V., Latchman D.S.** Hsf1-mediated stress response can transiently enhance cellular radioresistance. *Radiat. Res.*, 2006, vol. 165, pp. 410-423.
40. **Griffin R.J., Dings P.M., Jamshidi-Parsian A., Song C.W.** Mild temperature hyperthermia and radiation therapy: role of tumour vascular thermotolerance and relevant physiological factors. *Int. J. Hyperthermia*, 2010, vol. 26, no. 3, pp. 256-263.
41. **Liu T., Ye Y.-W., Zhu A.-L., Yang T.Zh., Fu Y., Wei Ch.-Q., Liu Q., Zhao Ch.-Lin., Wang G.-J., Zhang X.-Fu.** Hyperthermia combined with 5-fluorouracil promoted apoptosis and enhanced thermotolerance in human gastric cancer cell line SGC-7901. *Onco Targets Ther.*, 2015, vol. 8, pp. 1265-1270. DOI: 10.2147/OTT.S78514.
42. **Bettaieb A., Averill-Bates D.A.** Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, vol. 1853, no. 1, pp. 52-62. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.09.016.
43. **Kolesnikova A.I., Kalsina S.Sh., Lepekhina L.A.** Thermosensitivity of clonogenic cells and induction of thermotolerance in them. *Meditsinskaya radiologiya – Medical Radiology*, 1987, vol. 32, no. 1, pp. 67-69. (In Russian).

44. **Bresler S.Ye., Beketova A.G., Noskin L.A., Rosenberg O.A., Stepanova I.M., Suslov A.V.** Thermoinduced radioresistance of cells. *Radiobiologiya – Radiobiology*, 1984, no. 5, pp. 579-583. (In Russian).
45. **Miyakoshi R.E.J., Heki S., Kano E.** Cellular responses to hyperthermia and radiation in Chinese hamster cells. *Modification of Radiosensitivity in Cancer Treatment*. Ed.: T. Sugahara. Tokyo-New York-London-Monreal, Academic Press, 1984, pp. 335-350.
46. **Hettinga J.V.E., Lemstra W., Konings A.W.T., Kampinga H.H.** Cisplatin sensitivity and thermochemosensitisation in thermotolerant cDDP-sensitive and -resistant cell lines. *Br. J. Cancer*, 1995, vol. 71, pp. 498-504.
47. **Kregel K.C.** Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.*, 2002, vol. 92, pp. 2177-2186.
48. **Li G.C., Mivechi N.F., Weitzel G.** Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia*, 1995, vol. 11, no. 4, pp. 459-488.
49. **Eng J.W.-L., Reed C.B., Kokolus K.M., Repasky E.A.** Housing temperature influences the pattern of heat shock protein induction in mice following mild whole body hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia*, 2014, vol. 30, no. 8, pp. 540-546. DOI: 10.3109/02656736.2014.981300.
50. **Kudryavtsev V.A., Makarova Y.M., Kabakov A.E.** Thermosensitization of tumor cells with inhibitors of chaperone activity and expression. *Biomeditsinskaya khimiya – Biomedical Chemistry (Moscow)*, 2012, vol. 58, no. 6, pp. 662-672. (In Russian).