

С.В. Коноваленко
Т.В. Задворний

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: рак молочної залози, фотобіомодуляція, доксорубіцин, апоптоз, проліферативна активність, молекулярні маркери.

ІНІЦІАЦІЯ АПОПТОЗУ В СИСТЕМІ *IN VITRO* ЯК НАСЛІДОК ПОЄДНОЇ ДІЇ ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ І ДОКСОРУБІЦИНУ

Лазерне випромінювання може бути ефективним у лікуванні пацієнтів зі злякисними новоутвореннями, а також гармонійно поєднуватися з іншими методами терапії. Тому вивчення різних сценаріїв поєднання впливу лазерного опромінення та хіміотерапевтичних препаратів є на сьогодні актуальним та перспективним напрямом експериментальної онкології. **Мета:** оцінити в системі *in vitro* ефективність поєднаної дії лазерного випромінювання низької енергії і доксорубіцину (DOX) щодо експресії молекулярних маркерів апоптозу та проліферативної активності у клітинах раку молочної залози (РМЗ) людини. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на двох культурах клітин РМЗ людини з різною чутливістю до цитостатиків: MCF-7 — чутливій та MCF-7DOX — резистентній до DOX. Залежно від комбінаторики чинників з урахуванням характеристик опромінення, використаних доз DOX та схем їх застосування виготовлені цитологічні препарати пухлинних клітин розподілено на 18 груп: контроль, фотобіомодуляція (ФБМ) 660 нм, ФБМ 810 нм, DOX 2,0 мкг/мл, DOX 0,5 мкг/мл, ФБМ 660 нм + DOX 2,0 мкг/мл, ФБМ 660 нм + DOX 0,5 мкг/мл, ФБМ 810 нм + DOX 2,0 мкг/мл, ФБМ 810 нм + DOX 0,5 мкг/мл. Експресію молекулярних маркерів апоптозу та проліферативної активності досліджували імуноцитохімічним методом із застосуванням відповідних моноклональних антитіл. **Результати:** у клітинах чутливої до DOX лінії MCF-7 за умови поєднаного впливу DOX та лазерів спостерігалось суттєве підвищення експресії маркерів p53 та Вах, а також зниження активності Ki-67. Антипроліферативний вплив був більш вираженим у разі застосування інфрачервоного лазера (810 нм) за концентрації DOX 2,0 мкг/мл. У клітинах резистентної лінії MCF-7/DOX поєднання дії хіміопрепарату у відносно низькій концентрації (0,5 мкг/мл) та лазерного опромінення при ФБМ (810 нм) призвело до суттєвого підвищення експресії маркерів Вах та p53 до рівня $70,1 \pm 3,6$ та $77,2 \pm 5,2$ балів H-Score відповідно, що вдвічі перевищує контрольні показники. Рівень експресії Ki-67 після впливу лазера (ФБМ 660 нм і 810 нм) та хіміотерапевтичного агента знизився, особливо помітно за застосування концентрації DOX 2,0 мкг/мл. **Висновки:** результати дослідження дозволяють розглядати застосування DOX у поєднанні з ФБМ як перспективну методику терапевтичної дії на пухлинні клітини з метою ініціації в них процесів апоптозу.

Рак молочної залози (РМЗ) залишається найбільш актуальною медико-соціальною проблемою, що зумовлено високими показниками захворюваності жінок на цю онкологічну патологію не тільки в Україні, але й у багатьох економічно розвинених країнах [1, 2]. На сьогодні сформовано сучасні уявлення про молекулярно-генетичну природу злякисного росту та значення спадкових факторів у схильності до розвитку РМЗ. Тривають клінічні та експериментальні дослідження, спрямовані на підвищення ефективності лікування цієї категорії хворих [3, 4].

Існує кілька базових терапевтичних підходів і схем хіміотерапії (ХТ) для лікування пацієток з РМЗ. Найчастіше у клінічній практиці використовують схеми, що ґрунтуються на застосуванні доцетакселу і антрациклінів [5, 6]. Сьогодні прийнято 2 основні стратегії лікування хворих на РМЗ: послідовна і комбінована поліхіміотерапія доцетакселом та антрациклінами, а за більш поширеного захворювання терапія має починатися з антрациклінів з подальшим одночасним застосуванням таксанів і трастузумабу [7, 8]. Отже, роль представника групи

антрациклінів доксорубіцину (DOX) і на сьогодні є визначною у лікуванні пацієнток з РМЗ. Суттєвим недоліком застосування DOX є його високі дозозалежні кардіотоксичні побічні ефекти: препарат спричиняє пошкодження міоцитів і зрештою призводить до патологічної кардіоміопатії [9, 10]. Тому оптимізація терапевтичних протоколів із застосуванням антрациклінових протипухлинних антибіотиків залишається у фокусі уваги дослідників і клініцистів.

Згідно з даними літератури лазерне випромінювання може бути високоефективним у терапії хворих зі злоякісними новоутвореннями як додатковий протипухлинний чинник, а також гармонійно поєднуватися з іншими відомими методами лікування з метою підвищення їх ефективності [11, 12]. Зокрема, низькоінтенсивне лазерне випромінювання при використанні методу фотобіомодуляції (ФБМ) може зіграти позитивну роль разом із ХТ за рахунок підвищення накопичення протипухлинних агентів в малігнізованих тканинах [13, 14]. Тому вивчення поєданого впливу лазерного опромінення та хіміотерапевтичних препаратів є на сьогодні актуальним напрямом експериментальної онкології. **Мета:** оцінити в системі *in vitro* ефективність поєднаної дії лазерного випромінювання низької енергії і DOX щодо експресії молекулярних маркерів апоптозу та проліферативної активності у клітинах РМЗ людини.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні використано клітини РМЗ людини ліній MCF-7 та MCF-7/DOX, отримані з Банку клітинних ліній тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України.

Клітини культивували в живильному середовищі DMEM з 10% фетальною телячою сироваткою і 40 мкг/мл гентаміцину (за 37 °С та 5% CO₂). Через 24 год до відповідних лунок планшета додавали по 100 мкл DOX (кінцеві концентрації 2 та 0,5 мкг/мл) та культивували за стандартних умов протягом 90 хв. Після культивування клітини опромінювали лазерами («Фотоніка Плюс», Україна) з довжиною хвилі 660 та 810 нм: час опромінення — 5 хв, густина потужності — 50 мВ/см², доза опромінення — 15 Дж/см². Залежно від комбінаторики чинників з урахуванням характеристик опромінення, використаних доз DOX та схем їх застосування зразки пухлинних клітин розподілено на 18 груп: контроль, ФБМ 660 нм, ФБМ 810 нм, DOX 2,0 мкг/мл, DOX 0,5 мкг/мл, ФБМ 660 нм + DOX 2,0 мкг/мл, ФБМ 660 нм + DOX 0,5 мкг/мл, ФБМ 810 нм + DOX 2,0 мкг/мл, ФБМ 810 нм + DOX 0,5 мкг/мл. Після опромінення клітини культивували в CO₂-інкубаторі протягом ще 48 год. Після завершення терміну інкубації клітини фіксували у суміші метанолу і ацетону у співвідношенні 1:1 впродовж 2 год.

за t -20 °С та імуноцитохімічним (ІЦХ) методом із застосуванням відповідних моноклональних антитіл (МкАт) досліджували експресію ряду молекулярних маркерів апоптозу та проліферативної активності (табл. 1). Для детекції ІЦХ-реакції використовували систему візуалізації Lab Vision™ UltraVision™ Quanto Detection System. Для перевірки специфічності взаємодії МкАт і, таким чином, отримання достовірних результатів під час проведення досліджень ставили контрольні реакції.

Таблиця 1
Моноклональні антитіла, які було використано для проведення ІЦХ-досліджень

Молекулярний маркер	Клон	Розведення	Фірма-виробник
Ki-67	MIB-1	1:100	DakoCytomation, Данія
Vax	6A/7	1:50	Thermo Scientific, США
Bcl-2	100/D5	1:50	Thermo Scientific, США
p53	DO-7	1:50	Thermo Scientific, США

Аналіз результатів ІЦХ-реакції проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин (коричневе забарвлення цитоплазми та/або ядер) за допомогою світлового мікроскопа PrimoStar (Zeiss, Німеччина) за збільшення ×100–400. Для кількісної оцінки експресії досліджених ІЦХ-маркерів використовували метод H-Score за формулою:

$$S = N_0 + 3 \cdot N_1 + 2 \cdot N_2 + 1 \cdot N_3,$$

де S — показник «H-Score», N₀ — кількість (%) клітин з відсутньою експресією маркерів, N₁, N₂ та N₃ — кількість (%) клітин з низькою, середньою та високою експресією маркерів відповідно.

Остаточний результат підрахунку виражали у балах, для чого кількісні показники у відсотках переводили в бали. На підставі отриманих даних рівень експресії вважали низьким (1–100 балів), середнім (101–200 балів) або високим (201–300 балів).

Статистичну обробку результатів було здійснено за допомогою програм Excel (MS Office 2010) та Origin 8.1 (OriginLab, США) з використанням t-тесту для незалежних вибірок даних, які відповідали нормальному розподілу. Результати представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартного відхилення (±SD). За критичний рівень достовірності під час перевірки статистичних гіпотез приймали p ≤ 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що у групах контролю, у яких не застосовували DOX та лазерне опромінення клітин MCF-7 (чутливих до DOX), було визначено найбільш виражену експресію маркера Bcl2. Аналогічна картина спостерігалася у групах із застосуванням лазерів з довжиною хвилі 660 та 810 нм без додавання DOX. У свою чергу, у групах з дією DOX без лазера за концентрації хіміотерапевтичного агента 2,0 мкг/мл та 0,5 мкг/мл зафіксовано більш виражену, ніж у групах контролю експресію маркера Vax. Важливим є те, що у групах, де було використано поєднання дії DOX та лазерів, спостерігалася суттєве підвищення експресії маркерів p53 та Vax

порівняно як з контрольними показниками, так і за умови впливу опромінення або засобу хіміотерапії в монорежимі (табл. 2).

Лазерне опромінення в монорежимі спроводувало зниження експресії маркера проліферації Ki-67. Примітно, що поєднане застосування лазера і DOX в обох концентраціях призвело до відчутного зниження активності Ki-67. Слід зазначити, що антипроліферативний вплив був більш вираженим при застосуванні інфрачервоного лазера з довжиною хвилі 810 нм за концентрації доксорубіцину 2,0 мкг/мл: до $130,3 \pm 1,5$ балів H-Score у порівнянні з $234,5 \pm 9,6$ в групах контролю (рис. 1).

Таблиця 2

Експресія біорегуляторів апоптозу в клітинах MCF-7

Характеристики чинників впливу на клітини MCF-7	Молекулярний маркер, бали H-Score		
	p53	Вax	Bcl-2
MCF-7 (контроль)	$38,7 \pm 2,1$	$42,3 \pm 2,5$	$121,3 \pm 7,6$
ФБМ 660 нм	$47,3 \pm 1,5^1$	$41,0 \pm 3,6$	$113,6 \pm 10,0$
ФБМ 810 нм	$52,3 \pm 3,1^1$	$78,0 \pm 3,0^1$	$105,6 \pm 5,1^1$
DOX 0,5 мкг/мл	$44,7 \pm 4,5^1$	$114,0 \pm 8,0^1$	$96,3 \pm 7,1^1$
DOX 2,0 мкг/мл	$39,3 \pm 6,0$	$175,0 \pm 3,0^1$	$76,3 \pm 1,5^1$
ФБМ 660 нм + DOX 0,5 мкг/мл	$54,7 \pm 8,1^1$	$131,3 \pm 7,0^{1,4}$	$90,0 \pm 10,4^{1,4}$
ФБМ 810 нм + DOX 0,5 мкг/мл	$63,3 \pm 3,5^{1,2,5}$	$151,3 \pm 7,0^{1,2,5}$	$90,7 \pm 5,6^{1,5}$
ФБМ 660 нм + DOX 2,0 мкг/мл	$146,7 \pm 4,7^{1,3,4}$	$180,6 \pm 4,0^{1,4}$	$61,0 \pm 4,6^{1,3,4}$
ФБМ 810 нм + DOX 2,0 мкг/мл	$165,6 \pm 6,0^{1,3,5}$	$187,0 \pm 8,5^{1,5}$	$58,7 \pm 4,2^{1,3,5}$

Примітки: ¹ – $p < 0,05$ порівняно з контролем (MCF-7 (контроль)); ² – $p < 0,05$ порівняно з DOX 0,5 мкг/мл; ³ – $p < 0,05$ порівняно з DOX 2,0 мкг/мл; ⁴ – $p < 0,05$ порівняно із ФБМ 660 нм; ⁵ – $p < 0,05$ порівняно із ФБМ 810 нм.

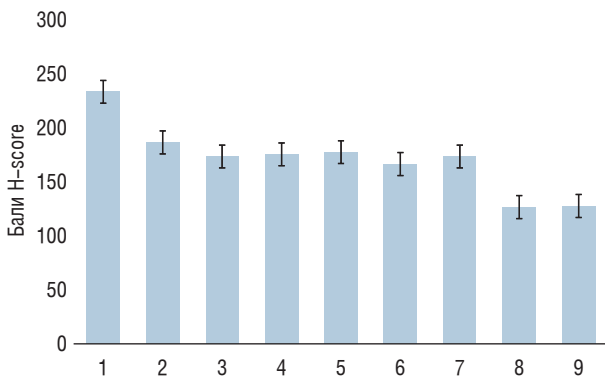


Рис. 1. Експресія Ki-67 у культурі клітин MCF-7 залежно від схеми застосування ФБМ та DOX (бали H-score, $p < 0,05$ порівняно з контролем). 1 – MCF-7 (контроль); 2 – ФБМ 660 нм; 3 – ФБМ 810 нм; 4 – DOX 0,5 мкг/мл; 5 – DOX 2,0 мкг/мл; 6 – ФБМ 660 нм + DOX 0,5 мкг/мл; 7 – ФБМ 810 нм + DOX 0,5 мкг/мл; 8 – ФБМ 660 нм + DOX 2,0 мкг/мл; 9 – ФБМ 810 нм + DOX 2,0 мкг/мл

Аналіз результатів дослідження резистентної культури MCF-7/DOX показав, що у групі з поєднанням DOX у відносно низькій концентрації (0,5 мкг/мл) та лазерного опромінення (незалежно від довжини хвилі) відбулося підвищення експресії маркерів Вax та p53 (табл. 3). Важливо відзначити, що подібний ефект також спостерігався і у разі дії DOX у концентрації 2,0 мкг/мл. Встановлено зни-

ження експресії Ki-67 після поєданого впливу лазера та хіміотерапевтичного агенту, особливо помітне при застосуванні DOX у концентрації 2,0 мкг/мл у поєднанні з лазерним опроміненням як з довжиною хвилі 660, так і 810 нм (рис. 2).

Таблиця 3

Експресія біорегуляторів апоптозу в клітинах MCF-7/DOX

Характеристики чинників впливу на клітини MCF-7/DOX	Молекулярний маркер, бали H-Score		
	p53	Вax	p53
MCF-7/DOX (контроль)	$35,2 \pm 3,1$	$30,3 \pm 4,5$	$185,3 \pm 7,6$
ФБМ 660 нм	$45,3 \pm 2,6^1$	$35,0 \pm 6,6$	$170,4 \pm 6,5$
ФБМ 810 нм	$47,4 \pm 4,1^1$	$42,3 \pm 4,1^1$	$166,3 \pm 5,1^1$
DOX 0,5 мкг/мл	$39,2 \pm 5,2$	$38,6 \pm 4,3$	$172,3 \pm 4,3^1$
DOX 2,0 мкг/мл	$55,8 \pm 4,2$	$62,5 \pm 3,9^1$	$145,6 \pm 4,2^1$
ФБМ 660 нм + DOX 0,5 мкг/мл	$62,6 \pm 3,4^{1,2,4}$	$52,3 \pm 5,2^{1,2,4}$	$158,3 \pm 5,2^{1,4}$
ФБМ 810 нм + DOX 0,5 мкг/мл	$70,1 \pm 3,6^{1,2,5}$	$77,2 \pm 5,2^{1,2,5}$	$145,3 \pm 3,5^{1,2,5}$
ФБМ 660 нм + DOX 2,0 мкг/мл	$80,7 \pm 3,7^{1,3,4}$	$115,4 \pm 6,1^{1,3,4}$	$115,2 \pm 6,6^{1,3,4}$
ФБМ 810 нм + DOX 2,0 мкг/мл	$92,3 \pm 5,0^{1,3,5}$	$130,0 \pm 5,4^{1,3,5}$	$93,7 \pm 5,2^{1,3,5}$

Примітки: ¹ – $p < 0,05$ порівняно з контролем (MCF-7 (контроль)); ² – $p < 0,05$ порівняно з DOX 0,5 мкг/мл; ³ – $p < 0,05$ порівняно з DOX 2,0 мкг/мл; ⁴ – $p < 0,05$ порівняно із ФБМ 660 нм; ⁵ – $p < 0,05$ порівняно із ФБМ 810 нм.

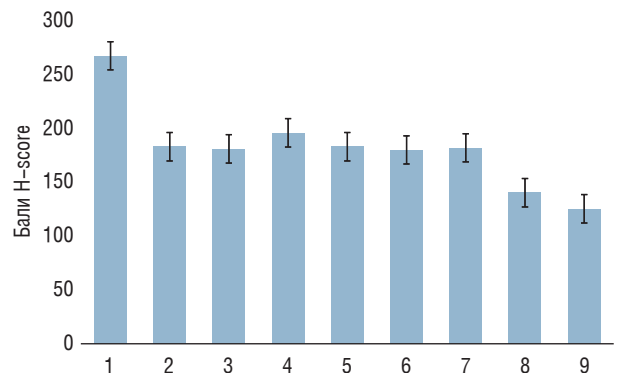


Рис. 2. Експресія Ki-67 у культурі клітин MCF-7/DOX залежно від схеми застосування ФБМ та DOX (бали H-score, $p < 0,05$ порівняно з контролем): 1 – MCF-7 (контроль); 2 – ФБМ 660 нм; 3 – ФБМ 810 нм; 4 – DOX 0,5 мкг/мл; 5 – DOX 2,0 мкг/мл; 6 – ФБМ 660 нм + DOX 0,5 мкг/мл; 7 – ФБМ 810 нм + DOX 0,5 мкг/мл; 8 – ФБМ 660 нм + DOX 2,0 мкг/мл; 9 – ФБМ 810 нм + DOX 2,0 мкг/мл

Виявилося, що культури клітин MCF-7 та MCF-7/DOX мають тенденцію до більшого антипроліферативного потенціалу у разі поєднання DOX з інфрачервоним лазерним опроміненням. Беручи до уваги оцінку проліферативного потенціалу клітин, можна зробити обґрунтоване припущення, що червоне (660 нм) та інфрачервоне (810 нм) лазерне опромінення реалізує свій інгібуючий вплив на культури MCF-7 та MCF-7/DOX у поєднанні з різними дозами DOX. Крім того, зниження активності Ki-67 в культурі MCF-7/DOX після застосування низької дози DOX (0,5 мкг/мл) та інфрачервоного лазера свідчить про синергічну дію ФБМ та DOX.

Таким чином, в експериментах *in vitro* з'ясовано, що синергічний вплив інфрачервоного лазерного світла та різних доз доксорубіцину на культуру MCF-7/DOX може призвести до апоптозу пухлинних клітин, що підтверджується оцінкою експресії відповідних маркерів. Також можна стверджувати, що саме зміни в експресії маркерів p53 та Bcl2 є результатом поєднаного впливу лазерного опромінення інфрачервоного спектру та хіміопрепарату на культури клітин MCF-7 та MCF-7/DOX.

Продемонстровано, що лазери з різною довжиною хвилі по-різному впливають на особливості росту клітин MCF-7 та MCF-7/DOX, що підтверджується оцінкою експресії Ki-67. Підвищення активності регуляторів апоптозу та пригнічення експресії фактора проліферації в культурах аденокарциноми молочної залози після поєднаного впливу лазера з довжиною хвилі 810 нм і DOX в концентрації 0,5 мкг/мл — це результати, які дозволяють обґрунтовано припустити, що енергія світла створює сприятливі умови для ефективної протипухлинної дії засобу хіміотерапії у порівняно нижчій концентрації.

Загальновідомо, що не останню роль у процесі злоякісної трансформації клітини відіграє блокування процесів апоптозу. Найбільш розповсюдженою молекулярною подією, що призводить до такого наслідку, є інактивація білка p53. За різними даними, до 50% пухлин молочної залози мають мутації гена p53 [15, 16], що забезпечують підвищення генетичної нестабільності, високий рівень проліферації та блокування апоптозу. У пухлинах молочної залози, як і в новоутвореннях інших локалізацій, наявність мутантного p53 асоційована зі зниженням чутливості до терапії та агресивним перебігом хвороби [17]. Після індукції апоптозу p53 може швидко локалізуватися в мітохондріях, щоб індукувати пермеабілізацію зовнішньої мембрани мітохондрій, що призводить до вивільнення проапоптотичних факторів з міжмембранного простору [18–21]. З огляду на те, що лазерне опромінення впливає на метаболічні процеси в мітохондріях, вивчення рівнів експресії протеїну p53 є обґрунтованим кроком у цьому дослідженні.

На сьогодні найбільш вивченими є два шляхи запрограмованої смерті клітини: зовнішній, опосередкований рецепторами смерті, і внутрішній, який називають мітохондріальним шляхом. Внутрішній шлях регулюється сімейством білків Bcl-2, які контролюють індукцію загибелі клітин головним чином через регуляцію проникності мітохондріальної мембрани та вивільнення апоптогенних факторів [22]. Внутрішній шлях також активується білками сімейства рецепторів клітинної поверхні CD95 (Apo-1 або Fas)/TRAIL/TNF, які розташовані на плазматичній мембрані і безпосередньо активують каспазний каскад через рекрутування «ініціатора» каспази-8 в білковому сигнальному комплексі, що індукує смерть клітини (death-inducing signaling complex — DISC) [23–25].

Проапоптотичний білок Вах, якій відіграє ключову роль у контролі апоптозу, зазвичай наявний у цитоплазмі. Коли клітина піддається дії апоптотичного стимулу, Вах переміщується в мітохондрії. Підвищена експресія цього білка опосередковує ранній апоптоз [26, 27]. Активація Вах може бути ініційована різними абіотичними факторами, такими як світло, тепло, зміна рН, стресові умови. Показано, що мутації та зміни в кодуючих ділянках і промоторах гена *Bax* впливають на експресію та функцію білка при різноманітних злоякісних пухлинах. Мутації в гені *Bax* часто призводять до втрати пухлино-супресорної функції, змін у каскадах апоптозу і стійкості до хіміотерапії [28–30].

Маркером проліферативної активності є ядерний антиген Ki-67, який експресується в активних фазах клітинного циклу (G1, S, G2 та M) та відсутній у фазі спокою (G0). Рівні експресії Ki-67 є низькими в G1 і S фазах та досягають максимуму під час G2 і M фаз клітинного циклу. У хворих на РМЗ для оцінки проліферативної активності пухлини зазвичай використовується імуногістохімічне дослідження з використанням антитіл до антигену Ki-67. Він може надати інформацію про прогноз і передбачити відповідь на лікування в ад'ювантній та неоад'ювантній схемах: високий показник Ki-67 асоціюється з поганим прогнозом [31].

Результати нашого дослідження доповнюють дані різних авторів, які встановили, що ФБМ може пригнічувати проліферацію пухлинних клітин та провокувати проапоптотичні ефекти [32, 33]. Вирішальну роль у виникненні апоптозу після лазерного впливу відіграє модуляція обміну активних форм кисню (АФК) і, зокрема, таке явище, як АФК-індуковане вивільнення АФК (ROS-induced ROS release) [34, 35]. Логіка поєднання лазерного опромінення і DOX для підвищення ефективності протипухлинної терапії підтверджується даними інших дослідників, які свідчать, що DOX також провокує апоптоз атипичних клітин [36, 37].

Таким чином, відкриваються перспективи застосування інфрачервоного лазерного опромінення у якості фактора, що діє як ад'ювант хіміотерапії. Підвищення експресії регуляторів апоптозу та пригнічення фактора проліферації в культурах РМЗ людини після поєднаного впливу лазера з довжиною хвилі 810 нм і DOX у концентрації 0,5 мкг/мл — це результати, які дозволяють обґрунтовано припустити можливість синергічної дії лазерного опромінення з хіміотерапевтичними засобами. Отримані результати відкривають перспективи подальшого вивчення синергічної дії інфрачервоного світла та хіміотерапії в системі *in vivo*.

ВИСНОВКИ

1. У системі *in vitro* встановлено синергічну дію інфрачервоного лазерного опромінення з DOX, що викликає підвищення експресії регуляторів апоптозу в пухлинних клітинах РМЗ людини.

2. У клітинах чутливої до DOX лінії MCF-7 за умови поєданого впливу DOX та лазерів спостерігали суттєве підвищення експресії маркерів p53 та Вах та зниження експресії Ki-67. Антипроліферативний вплив був більш вираженим при застосуванні інфрачервоного лазера (810 нм) та концентрації DOX 2,0 мкг/мл.

3. У резистентній культурі клітин (MCF-7/DOX) поєднаний вплив лазера з довжиною хвилі 810 нм та DOX у нижчій дозі (0,5 мкг/мл) призводить до підвищення експресії біорегуляторів апоптозу Вах та p53 вдвічі порівняно з показниками контролю. Поєднання дії інфрачервоного світла та хіміотерапевтичного чинника зумовлює пригнічення на 33,6% порівняно з контролем експресії маркера Ki-67.

4. Отримані дані дозволяють розглядати застосування DOX у поєднанні з ФБМ як перспективну терапевтичну методику впливу на пухлинні клітини для ініціації в них процесів апоптозу, а також як спосіб зниження токсичних ефектів хіміотерапії за рахунок зменшення доз препарату за збереження протипухлинної ефективності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Chekhun VF, Lukyanova NY, Chekhun SV, *et al.* Association of cd44⁺cd24⁻/low with markers of aggressiveness and plasticity of cell lines and tumors of patients with breast cancer. *Experimental Oncol* 2017; **39** (3): 203–11.
- Grybach SM, Polishchuk LZ, Chekhun VF. Analysis of the survival of patients with breast cancer depending on age, molecular subtype of tumor and metabolic syndrome. *Exp Oncol* 2018; **40** (3): 243–8.
- Chekhun VF, Borikun TV, Bazas VM, *et al.* Association of circulating Mir-21, -205, and -182 with response of luminal breast cancers to neoadjuvant FAC and AC treatment. *Exp Oncol* 2020; **42** (3): 162–6.
- Chekhun VF, Zhylchuk VE, Lukyanova NY, *et al.* Expression of drug resistance proteins in triple-receptor-negative tumors as the basis of individualized therapy of the breast cancer patients. *Exp Oncol* 2009; **31** (2): 123–4.
- Moo TA, Sanford R, Dang C, *et al.* Overview of breast cancer therapy. *PET Clin* 2018; **13** (3): 339–54. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.006.
- Zarcos-Pedrinaci I, Redondo M, Louro J, *et al.* Impact of adjuvant chemotherapy on the survival of patients with breast cancer diagnosed by screening. *Cancer Med* 2019; **8** (15): 6662–70. doi: 10.1002/cam4.2488.
- Cheung KL. Treatment strategies and survival outcomes in breast cancer. *Cancers (Basel)* 2020; **12** (3): 735. <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/735/htm>.
- Haidinger R, Bauerfeind I. Long-term side effects of adjuvant therapy in primary breast cancer patients: results of a web based survey. *Breast Care (Basel)* 2019; **14** (2): 111–16. doi: 10.1159/000497233. Epub 2019 Feb 15.
- Kong CY, Guo Z, Song P, *et al.* Underlying the mechanisms of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity: oxidative stress and cell death. *Int J Biol Sci* 2022; **18** (2): 760–70. doi: 10.7150/ijbs.65258.
- Yousefian M, Hosseinzadeh H, Hayes AW, *et al.* The protective effect of natural compounds on doxorubicin-induced cardiotoxicity via nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase inhibition. *J Pharm Pharmacol* 2022; **74** (3): 351–59. doi: 10.1093/jpp/rgab109. PMID: 34562089.
- Allison RR, Bagnato VS, Sibata CH. Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncol* 2010; **6** (6): 929–40. doi: 10.2217/fon.10.51.
- Lanzafame RJ. Photobiomodulation: an enlightened path emerges. *Photomed Laser Surg* 2013; **31** (7): 299–300. doi: 10.1089/pho.2013.9875.
- Hasan T, Ortel B, Solban N, Pogue B. Photodynamic therapy of cancer. *Cancer Med* 2003; **7**: 537–48.
- de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 2016; **22** (3): 7000417. doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.
- Alothman SJ, Kang K, Liu X, *et al.* Characterization of transcriptome diversity and in vitro behavior of primary human high-risk breast cells. *Sci Rep* 2022; **12** (1): 6159. doi: 10.1038/s41598-022-10246-4.
- Lukyanova NY, Kulik GI, Yurchenko OV, *et al.* Expression of p53 and Bcl-2 Proteins in Epithelial Ovarian Carcinoma With Different Grade of Differentiation. *Exp Oncol* 2000; **22** (1-2): 91–3.
- Zhan Y, Guan X, Zhang Y, *et al.* Identification of an immune-related gene pair signature in breast cancer. *Transl Cancer Res* 2022; **11** (6): 1523–33. doi: 10.21037/tcr-21-2309.
- Li X, Niu Z, Sun C, *et al.* Regulation of P53 signaling in breast cancer by the E3 ubiquitin ligase RNF187. *Cell Death Dis* 2022; **13** (2): 149. doi: 10.1038/s41419-022-04604-3.
- Butera G, Manfredi M, Fiore A, *et al.* Tumor suppressor role of wild-type p53-dependent secretome and its proteomic identification in PDAC. *Biomolecules* 2022; **12** (2): 305. doi: 10.3390/biom12020305.
- Phan TTT, Lin YC, Chou YT, *et al.* Tumor suppressor p53 restrains cancer cell dissemination by modulating mitochondrial dynamics. *Oncogenesis* 2022; **11** (1): 26. doi: 10.1038/s41389-022-00401-x.
- Mohd Faheem M, Bhagat M, Sharma P, Anand R. Induction of p53 mediated mitochondrial apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer cells by plant mediated synthesis of silver nanoparticles from *Bergenia ligulata* (Whole plant). *Int J Pharm* 2022; **619**: 121710. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121710.
- Young A, Bu W, Jiang W, *et al.* Targeting the pro-survival protein BCL-2 to prevent breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2022; **15** (1): 3–10. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-21-0031.
- Kawiak A, Kostecka A. Regulation of Bcl-2 family proteins in estrogen receptor-positive breast cancer and their implications in endocrine therapy. *Cancers (Basel)* 2022; **14** (2): 279. doi: 10.3390/cancers14020279.
- Zhang G, Xu Z, Yu M, Gao H. Bcl-2 interacting protein 3 (BNIP3) promotes tumor growth in breast cancer under hypoxic conditions through an autophagy-dependent pathway. *Bioengineered* 2022; **13** (3): 6280–92. doi: 10.1080/21655979.2022.2036399.
- Valentini E, D'Aguzzo S, Di Martile M, *et al.* Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins: machine learning virtual screening and biological evaluation of new small molecules. *Theranostics* 2022; **12** (5): 2427–44. doi: 10.7150/thno.64233.
- Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, *et al.* The Role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol* 2012; **2012**: 524308. doi: 10.1155/2012/524308.
- Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5** (2): a008722. doi: 10.1101/cshperspect.a008722.
- Alam M, Alam S, Shamsi A, *et al.* Bax/Bcl-2 cascade is regulated by the egfr pathway: therapeutic targeting of non-small cell lung cancer. *Front Oncol* 2022; **12**: 869672. doi: 10.3389/fonc.2022.869672.
- Zou R, Zhao W, Xiao S, Lu Y. A signature of three apoptosis-related genes predicts overall survival in breast cancer. *Front Surg* 2022; **9**: 863035. doi: 10.3389/fsurg.2022.863035.
- Sharifi S, Barar J, Hejazi MS, Samadi N. Roles of the Bcl-2/Bax ratio, caspase-8 and 9 in resistance of breast cancer cells to

paclitaxel. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; **15** (20): 8617–22. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.20.8617.

31. **Kreipe H, Harbeck N, Christgen M.** Clinical validity and clinical utility of Ki67 in early breast cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2022; **14**: 17588359221122725. doi: 10.1177/17588359221122725.

32. **Zhang L, Du Z, He L, et al.** ROS-induced oxidative damage and mitochondrial dysfunction mediated by inhibition of SIRT3 in cultured cochlear cells. *Neural Plast* 2022; **2022**: 5567174. doi:10.1155/2022/5567174

33. **Schartinger VH, Galvan O, Riechelmann H, Dudas J.** Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. *Support Care Cancer* 2012; **20**: 523–9. doi: 10.1007/s00520-011-1113-0

34. **Ravera S, Bertola N, Pasquale C, et al.** 808-nm photobiomodulation affects the viability of a head and neck squamous carcinoma cellular model, acting on energy metabolism and oxidative stress production. *Biomedicines* 2021; **9** (11): 1717. doi:10.3390/biomedicines9111717

35. **Hamblin MR.** Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. *Photochem Photobiol* 2018; **94** (2): 199–212. doi:10.1111/php.12864

36. **Somu P, Mohanty S, Paul S.** () A detailed overview of ROS-modulating approaches in cancer treatment. In: **Chakraborti S.** (eds) *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Therapeutic Aspects*. Springer, Singapore 2022. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1247-3_213-1

37. **Pilco-Ferreto N, Calaf GM.** Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *Int J Oncol* 2016; **49** (2): 753–62. doi: 10.3892/ijo.2016.3558.

THE COMBINATION OF LASER IRRADIATION AND DOXORUBICIN AS A FACTOR OF TUMOR CELL APOPTOSIS INDUCTION

S.V. Konovalenko, T.V. Zadvornyy

RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. As an additional antitumor factor, laser radiation can be highly effective in the treatment of patients with malignant neoplasms, and can also be harmoniously combined with other known methods of therapy to enhance their effectiveness. Therefore, the study of various scenarios of laser irradiation and chemotherapeutic drugs combination is currently a relevant and promising area of experimental oncology. **Aim:** to assess in vitro the effectiveness of the combined action of low-energy laser radiation and doxorubicin (DOX) on the expression of molecular markers of apoptosis and proliferative activity in human breast cancer cells. **Objects and meth-**

ods: the study was conducted on two cultures of human breast cancer cells with different sensitivity to cytostatics: MCF-7 — sensitive and MCF-7DOX — resistant to DOX. Depending on the combinatorics of the active factors, taking into account the characteristics of irradiation, the doses of DOX used and the schemes of their use, the manufactured cytological preparations of tumor cells are divided into 18 groups: control, photobiomodulation (PBM) 660 nm, PBM 810 nm, DOX 2.0 µg/ml, DOX 0.5 µg/ml, PBM 660 nm + DOX 2.0 µg/ml, PBM 660 nm + DOX 0.5 µg/ml, PBM 810 nm + DOX 2.0 µg/ml, PBM 810 nm + DOX 0.5 µg/ml. Expression of molecular markers of apoptosis and proliferative activity was studied by immunocytochemical method using appropriate monoclonal antibodies. **Results:** in cells of the DOX-sensitive MCF-7 line, under the condition of combined exposure to DOX and lasers, a significant increase in the expression of p53 and Bax markers, as well as a decrease in Ki-67 activity, was observed. The antiproliferative effect was more pronounced using an infrared laser (810 nm) at a DOX concentration of 2.0 µg/ml. It was found also, that the combination of DOX in a relatively low concentration (0.5 µg/ml) and laser irradiation (810 nm) significantly increased the expression of Bax and p53 comparing with control indicators. The proliferation factor Ki-67 after the combined exposure to laser and chemotherapeutic agent showed a decrease in the level of expression, and it was especially noticeable when using a DOX concentration of 2.0 µg/ml, both in combination with the 660 and 810 nm laser. **Conclusions:** the results of the study allow us to consider the use of DOX in combination with photobiomodulation as a promising method of influencing tumor cells with the aim of initiating apoptosis processes in them.

Key Words: breast cancer, photobiomodulation, doxorubicin, apoptosis, proliferative activity, molecular markers.

Адреса для листування:

Коноваленко С.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: servlakon@ukr.net

Одержано: 13.10.2022