

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-108-115>

Феномен подавления эстрогенового сигналинга в клетках рака молочной железы под действием ультрафиолетового облучения: роль белков Snail

Д. В. Сорокин^{1,2}, О. Е. Андреева¹, А. М. Щербаков^{1,2}, Д. И. Сальникова¹, М. В. Гудкова¹, М. А. Красильников^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»; Россия, 603022 Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@yandex.ru

Введение. Исследование влияния облучения или любых других ДНК-повреждающих агентов на чувствительность опухолей к консервативной терапии, лекарственной или гормональной, относится к числу наиболее актуальных задач, во многом определяющих целесообразность комбинированной терапии онкологических больных.

Цель исследования – изучение влияния облучения на активность ключевых сигнальных белков и уровень гормональной зависимости клеток рака молочной железы.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7. В качестве экспериментальной модели для изучения реакции опухолевых клеток на повреждение ДНК использовалось ультрафиолетовое (УФ) облучение в диапазоне 254 нм с интенсивностью 25–50 Дж/м². Скорость роста клеток определяли с помощью МТТ-теста; выживаемость клеток после облучения анализировали с использованием колониеобразующего теста. Определение транскрипционной активности рецептора эстрогенов проводили методом репортерного анализа, экспрессии клеточных белков – методом иммуноблоттинга.

Результаты. Однократное УФ-облучение клеток MCF-7 приводит к резкому повышению уровня апоптотических маркеров: p53, cPARP, подавлению экспрессии белков ростового сигналинга: CDK4/6 и рецептора эстрогенов α (ER α). На этом фоне наблюдается усиление фосфорилирования протеинкиназы Akt и выраженное повышение экспрессии Snail1 – одного из ключевых белков эпителиально-мезенхимального перехода. В клетках УФ-резистентной сублинии MCF-7/UVR, полученной в условиях повторяющихся циклов облучения, уровень белков апоптотического и ростового сигналинга (p53, cPARP, CDK4/6) возвращается к контрольному значению, за исключением фосфорилированной формы Akt и Snail1, содержание которых остается высоким. Трансфекция в клетки MCF-7 плазмиды, экспрессирующей Snail1, сопровождается активацией апоптотического сигналинга, снижением активности ER α и развитием частичной гормональной резистентности; при этом чувствительность клеток к облучению практически не меняется. Трансфекция микроРНК-181a-2 – одной из микроРНК, ассоциированной с резистентностью клеток, – одновременно активирует Akt и Snail1 и приводит к развитию перекрестной резистентности клеток к облучению и гормональным препаратам.

Заключение. Полученные данные позволяют рассматривать активацию Snail1 под действием облучения в качестве одного из факторов, участвующих в дерегуляции эстрогенового сигналинга и формировании устойчивости клеток к гормональным препаратам, в то время как одновременная активация Akt и Snail1 сопровождается развитием перекрестной резистентности к облучению и гормональным соединениям.

Ключевые слова: рак молочной железы, гормональная резистентность, облучение, рецептор эстрогенов, Snail1, протеинкиназа Akt

Для цитирования: Сорокин Д. В., Андреева О. Е., Щербаков А. М. и др. Феномен подавления эстрогенового сигналинга в клетках рака молочной железы под действием ультрафиолетового облучения: роль белков Snail. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):108–115. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-108-115>

Phenomenon of suppression of estrogen signaling in breast cancer cells under ultraviolet irradiation: role of Snail proteins

D. V. Sorokin^{1,2}, O. E. Andreeva¹, A. M. Scherbakov^{1,2}, D. I. Salnikova¹, M. V. Gudkova¹, M. A. Krasil'nikov^{1,2}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; 23 Gagarin Prospekt, Nizhny Novgorod 603022, Russia

Contacts: Mikhail Alexandrovich Krasil'nikov krasilnikovm1@ya.ru

Introduction. The study of the effect of irradiation or any other DNA-damaging agents on the sensitivity of tumors to conservative therapy, drug or hormonal, is among the most important tasks that determine the efficiency of combined therapy of cancer patients.

Aim. To investigate the effect of irradiation on the activity of key signaling proteins and the level of hormone dependence of breast cancer cells.

Materials and methods. The experiments were performed on in vitro cultured estrogen-dependent MCF-7 breast cancer cells. Ultraviolet (UV) irradiation in the range of 254 nm with the intensity of 25–50 J/m² was used as an experimental model to study the response of tumor cells to DNA damage. Cell growth rate was determined using the MTT test, cell survival after irradiation was analyzed using the colony-forming test. Estrogen receptor transcriptional activity was determined by reporter assay; cellular protein expression was determined by immunoblotting.

Results. Single UV irradiation of MCF-7 cells leads to a marked increase in the level of apoptotic markers: p53, cPARP, suppression of expression of growth signaling proteins: CDK4/6 and estrogen receptor α (ER α). The above changes are accompanied with an increase in phosphorylation of Akt protein kinase and a marked increase in the expression of Snail1, one of the key proteins of epithelial-mesenchymal transition. In UV-resistant MCF-7/UVR cell subline obtained under repeated irradiation cycles, the levels of apoptotic and growth signaling proteins (p53, cPARP, CDK4/6) return to control levels, except for the phosphorylated form of Akt and Snail1, whose content remains high. Transfection of Snail1-expressing plasmid into MCF-7 cells is accompanied by activation of apoptotic signaling, suppression of ER α activity, and development of partial hormone resistance; however, the sensitivity of cells to irradiation is practically unchanged. Transfection of microRNA-181a-2, one of the microRNAs associated with cell resistance, simultaneously activates Akt and Snail1 and leads to the development of cross-resistance of cells to irradiation and hormonal drugs.

Conclusion. The obtained data allow us to consider irradiation-induced Snail1 activation as one of the factors involved in deregulation of estrogen signaling and formation of cell resistance to hormonal drugs, while simultaneous activation of Akt and Snail1 is accompanied by the development of cross-resistance to irradiation and hormonal drugs.

Keywords: breast cancer, hormonal resistance, irradiation, estrogen receptor, Snail1, protein kinase Akt

For citation: Sorokin D.V., Andreeva O.E., Scherbakov A.M. et al. Phenomenon of suppression of estrogen signaling in breast cancer cells under ultraviolet irradiation: role of Snail proteins. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):108–15. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-108-115>

ВВЕДЕНИЕ

Основным подходом в лечении рака молочной железы (РМЖ) является сочетание хирургического вмешательства — оперативного удаления опухоли — с консервативной адъювантной или неoadъювантной терапией: облучением, лекарственной и гормональной терапией. Как известно, 70–80 % опухолей молочной железы являются эстрогензависимыми, и в этих случаях гормональная терапия оказывается одним из наиболее эффективных способов консервативного лечения. Вопрос о результативности сочетания различных видов консервативной терапии, в первую очередь гормональной терапии и облучения, изучался и продолжает анализироваться во многих работах, однако полученные данные зачастую оказываются противоречивыми. Основные вопросы — «Как влияет облучение опухолевых клеток на их уровень гормональной зависимости?», «Каков механизм возможных изменений гормональной зависимости опухолей молочной железы под действием облучения?», «Насколько долговременными оказываются такие изменения?» — практически не исследованы на экспериментальном уровне. Большинство работ в этом направлении основаны на анализе клинических данных эффективности комбинации облучения и гормональной терапии в различных группах больных и, как уже отмечалось, носят во многом противоречивый характер [1–5]. Известны лишь единичные экспериментальные работы, свидетельствующие о воз-

можности изменений гормонального сигналинга в облученных клетках [6, 7].

В целом на сегодняшний день ни в клинических, ни в экспериментальных наблюдениях не представлены доказательства влияния облучения (или отсутствия такового влияния) на уровень гормональной чувствительности злокачественных опухолей. В какой мере такие новообразования сохраняют гормональную зависимость и, соответственно, чувствительность к гормональной терапии, и, если происходят нарушения функционирования гормонального аппарата, то на каком уровне, каковы причины развития индуцированной облучением гормональной резистентности?

Ранее, с использованием культивируемых *in vitro* клеток меланомы в качестве экспериментальной модели, мы показали, что ультрафиолетовое (УФ) облучение приводит к развитию частичной устойчивости меланомы, ассоциированной с активацией одного из белков эпителиально-мезенхимального перехода — Snail1, к таргетным препаратам [8]. В настоящей работе исследовалось влияние облучения на активность ключевых сигнальных белков и уровень гормональной зависимости клеток эстрогензависимого РМЖ. Мы показали, что хроническое УФ-облучение клеток РМЖ MCF-7 приводит к формированию пула УФ-резистентных клеток, отличающихся низкой активностью рецептора эстрогенов α (ER α) и частичной гормональной резистентностью, сопровождающейся

выраженной активацией Snail. Продемонстрировано непосредственное участие Snail1 в формировании гормональной резистентности облученных клеток и показано участие одной из экзосомальных микроРНК – микроРНК-181a-2 – в поддержании высокого уровня Snail1 и развитии резистентного фенотипа клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках эстрогензависимого РМЖ MCF-7. В работе использовались следующие методы.

Культивирование клеток. Клетки MCF-7 культивировали в стандартной среде DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной сыворотки телят (FBS NuClone, США) и гентамицин (50 ед./мл) (ООО «ПанЭко», Россия), при 37 °С и 5 % CO₂. Культивирование клеток выполняли в инкубаторе NU-5840E (NuAire, США). При анализе скорости роста количество клеток определяли с использованием МТТ-теста.

Репортерный анализ. Для определения транскрипционной активности ER проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, любезно предоставленной George Reid [9]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применялась котрансфекция клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы. Активность люциферазы измерялась по стандартному протоколу (Promega, США) на люминометре Tecan Infinite M200 Pro (США). Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в исследованных образцах).

Трансфекция. Плазида, экспрессирующая Snail1, любезно предоставлена Antonio Garcia de Herreros [10]. Трансфекция клеток MCF-7 проводилась с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) по методике производителя.

В работе использовались конструкции микроРНК-scrambled- и микроРНК-181-a2 («Синтол», Россия). РНК растворяли в буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA) в концентрации 100 мкМ и проводили отжиг по стандартной методике. Трансфекцию РНК в конечной концентрации 50 нМ выполняли с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Иммуноблоттинг. Для получения тотального клеточного экстракта к образцам клеток добавляли по 130 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-HCl pH 7,4; 1 % Igepal CA-630, 150 мМ NaCl, 1 мМ тетраацетата этилендиамина, 1 мМ дитиотреитола, 1 мкг/мл апротинина, лейпептина и пепстатина, 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия (Merck, США). Образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000 g, 10 мин, 4 °С, центрифуга Eppendorf 5417R) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблоттинг,

как описано ранее [11]. В цитозольных экстрактах исследовали содержание phospho-Akt, Akt, Snail, Slug, phospho-p53, p53, p21, CDK4, CDK6, ERα и расщепленной формы PARP (Cell Signaling Technology, США). Для контроля эффективности иммуноблоттинга использовали антитела к α-тубулину (Cell Signaling Technology, США).

Ультрафиолетовое облучение и отбор устойчивых к нему клеток. Облучение проводили с помощью УФ-лампы Vilber Lourmat (Франция) мощностью 6 Вт модели VL-6. LC (свет 254 нм). Клетки MCF-7 подвергали УФ-облучению (254 нм) интенсивностью 25 или 50 Дж/м². Для отбора УФ-резистентных клеток клетки MCF-7 подвергали воздействию УФ 1 раз в неделю в течение 12 нед, как описано ранее [12].

Колониеобразующий тест. Клетки MCF-7 рассеивали на культуральные чашки диаметром 60 мм (Corning Incorporated, Corning, США) в стандартной среде DMEM, содержащей 10 % FBS (фетальной бычьей сыворотки). На следующий день культуральную среду удаляли, клетки облучали УФС (длина волны 254 нм) и рассеивали на 6-луночный культуральный планшет (Corning, США) в стандартной культуральной среде с образованием 50–2000 колоний на лунку. Колонии фиксировали и окрашивали 20 % метанолом и 0,2 % кристаллическим фиолетовым после 10-дневного периода инкубации в инкубаторе с 5 % CO₂, 37 °С. Любую колонию, состоящую из более чем 50 клеток, оценивали как выживший клон.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках эстрогензависимого РМЖ MCF-7. Клетки облучали под лампой 6W Vilber Lourmat (Франция) модели VL-6. LC (интенсивность 25–50 Дж/м²) и через 24 ч после облучения анализировали уровень основных (анти)апоптотических белков методом иммуноблоттинга. Ультрафиолетовое облучение привело к резкому повышению уровня апоптотических маркеров p53, cPARP и подавлению экспрессии белков ростового сигналинга (CDK4/6 и ERα). На этом фоне наблюдалось усиление фосфорилирования протеинкиназы Akt и выраженное повышение экспрессии Snail1 – одного из ключевых белков эпителиально-мезенхимального перехода, при этом экспрессия другого ассоциированного с эпителиально-мезенхимальным переходом белка – Slug – практически не менялась (рис. 1, а).

Ранее мы показали, что хроническое УФ-облучение клеток MCF-7 приводит к формированию пула УФ-резистентных клеток, отличающихся относительной устойчивостью к гормональным препаратам и конститутивно низкой активностью ERα [12].

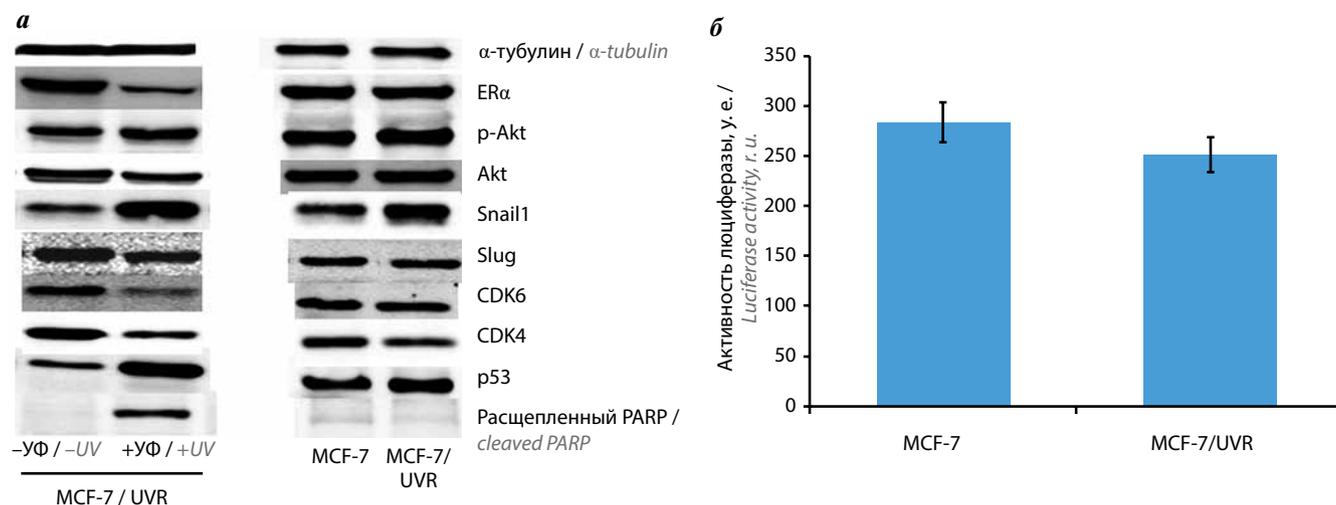


Рис. 1. Влияние ультрафиолетового (УФ) облучения на клетки MCF-7. Иммуноблоттинг образцов клеток MCF-7 через 24 ч после УФ-облучения (а) и образцов УФ-резистентной сублинии MCF-7/UVR (б). Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов. Транскрипционную активность рецептора эстрогена α (ERα) анализировали методом репортерного анализа через 24 ч после трансфекции в клетки плазмиды, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом (в). Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Fig. 1. Effect of ultraviolet (UV) irradiation on MCF-7 cells. Immunoblotting of MCF-7 cell samples 24 h after UV irradiation (a) and samples of UV-resistant MCF-7/UVR subline (b) was performed. Results from one of three independent experiments are presented. Estrogen receptor α (ERα) transcriptional activity was analyzed by reporter assay 24 h after cell transfection with a plasmid containing a luciferase reporter gene under the control of an estrogen-responsive element (v). Mean values ± standard deviation of three independent experiments are presented

Проведенный в настоящем исследовании анализ содержания белков (анти)апоптотического и ростового сигналинга (p53, cPARP, CDK4/6, Akt, Snail1) показал, что уровень большинства белков в резистентных клетках возвращается к исходному и практически не отличается от уровня контрольных клеток — за исключением фосфорилированной формы Akt и Snail1, содержание которых остается высоким в резистентных клетках (рис. 1, б). Анализ транскрипционной активности ERα подтвердил незначительное снижение активности ERα в резистентных клетках (рис. 1, в).

Если активация PI3K/Akt-сигналинга при блоке ERα довольно хорошо описана и носит преимущественно компенсаторный характер [13, 14], то вопрос об участии Snail1 в подавлении эстрогенового сигналинга и развитии УФ-резистентности остается открытым. Для ответа на него клетки MCF-7 были трансфицированы плазмидой, кодирующей wSnail1, с последующим анализом экспрессии основных сигнальных белков и активности эстрогенового аппарата. Трансфекция wSnail1 приводила к развитию частичной устойчивости клеток к тамоксифену (рис. 2, а), которая сопровождалась активацией апоптотического сигналинга (рис. 2, б) и снижением активности ERα (рис. 2, в). Примечательно, что трансфекция wSnail1 практически не снижала чувствительность клеток MCF-7 к УФ-облучению (рис. 2, г), что, скорее всего, связано со Snail1-индуцированной стимуляцией апоптотического сигналинга и свидетельствует об избирательности действия Snail1 на эстрогеновый аппарат клетки.

В проведенных ранее исследованиях мы продемонстрировали возможность межклеточного распространения гормональной резистентности с участием

экзосом и выявили ключевые экзосомальные микроРНК, участвующие в формировании резистентного фенотипа. В частности, было обнаружено, что трансфекция микроРНК-181a-2 в клетки MCF-7 приводит к развитию и поддержанию частичной гормональной резистентности клеток [15]. В настоящей работе исследовалась зависимость между Snail1 и микроРНК-181a-2, а также роль последней в регуляции ответа клеток на УФ-облучение. Было обнаружено, что трансфекция микроРНК-181a-2 сопровождается стимуляцией фосфорилирования Akt и накоплением Snail1 (рис. 3, а) на фоне повышения устойчивости клеток к УФ-облучению (рис. 3, б). Собственно трансфекция Snail1 не влияет на чувствительность клеток к облучению, но стимулирует развитие гормональной резистентности (см. рис. 2), поэтому можно предположить, что в данном случае мы сталкиваемся с избирательным действием Snail1 на эстрогеновый сигналинг, в то время как одновременная активизация антиапоптотического Akt-сигналинга приводит к развитию резистентности клеток к облучению.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния облучения на чувствительность опухолей к консервативной терапии (лекарственной или гормональной) относится к числу наиболее актуальных задач, во многом определяющих тактику лечения и целесообразность комбинированной терапии онкологических больных. Интерес представляют исследования, продемонстрировавшие эффект усиления множественной лекарственной устойчивости в опухолевых клетках после облучения, связанный с накоплением в клетках ABC-транспорте-

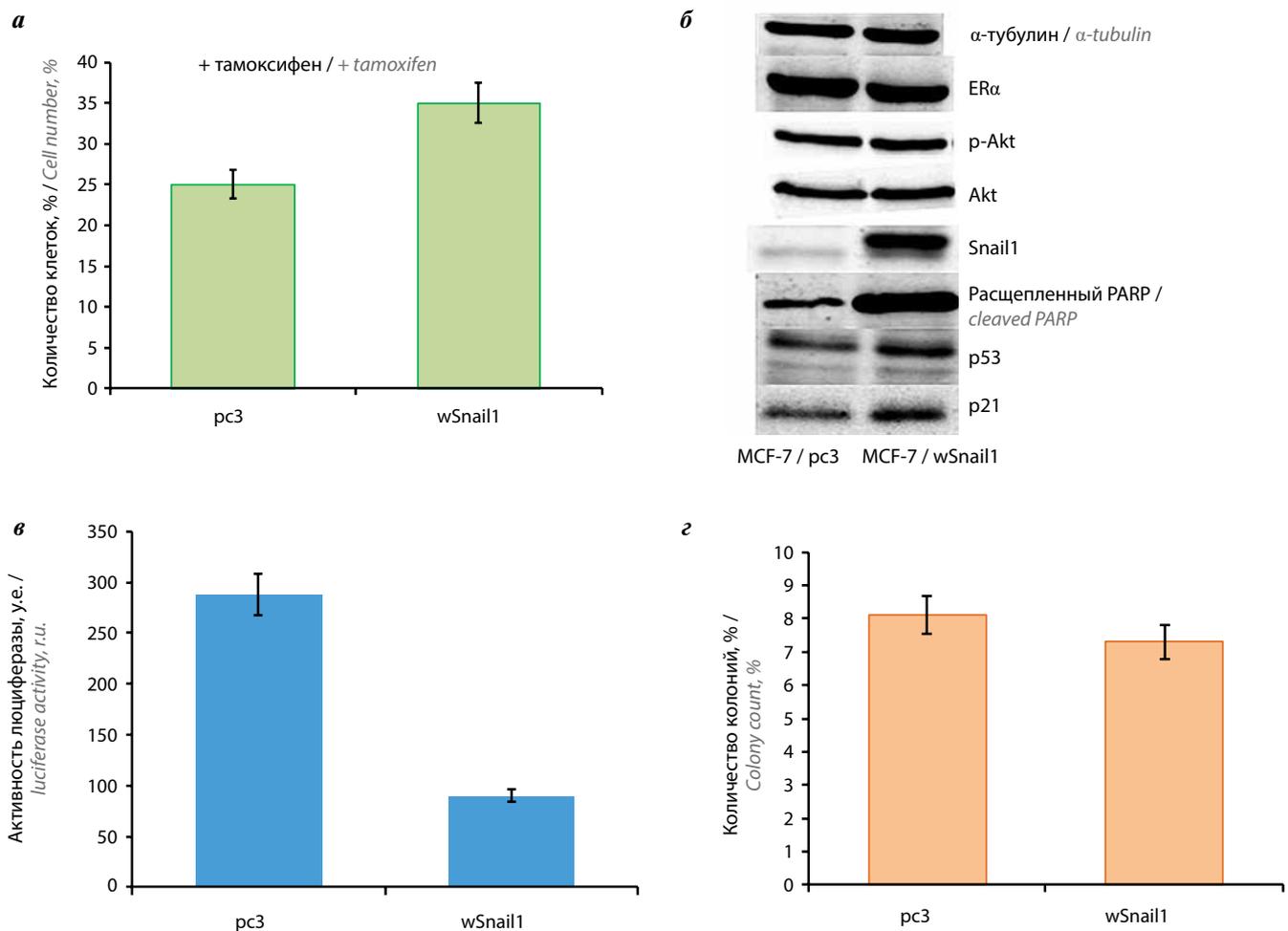


Рис. 2. Трансфекция *wSnail1* и чувствительность клеток МСF-7 к тамоксифену и ультрафиолетовому (УФ) облучению: а – через 24 ч после трансфекции клетки культивировали в присутствии 5 мкМ тамоксифена в течение 3 сут и определяли количество выживших клеток с помощью МТТ-теста; б – иммуноблоттинг образцов клеток МСF-7 через 24 ч после трансфекции *wSnail1*. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов; в – влияние *wSnail1* на транскрипционную активность рецептора эстрогена α (*ERα*) (репортерный анализ); г – колониеобразующий тест. Клетки через 24 ч после трансфекции *wSnail1* облучали УФ и рассевали на 6-луночный планшет, окраску колоний проводили через 10–14 сут. Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Fig. 2. Transfection of *wSnail1* and sensitivity of MCF-7 cells to tamoxifen and ultraviolet (UV) irradiation. Transfection with control plasmid *pc3* and *wSnail1* plasmid: а – cells 24 h after transfection were cultured in the presence of 5 μM tamoxifen for 3 days and the number of viable cells was determined by MTT assay; б – immunoblotting of MCF-7 cell samples 24 h after transfection. Results from one of three independent experiments are presented; в – effect of *wSnail1* on estrogen receptor α (*ERα*) transcriptional activity (reporter assay); г – colony-forming test. The cells were exposed to UV 24 h after *wSnail1* transfection and seeded on 6-well plates; the colonies were stained after 10–14 days. Mean values ± standard deviation of three independent experiments are presented

ров [16]. Существуют довольно противоречивые данные о связи облучения и гормональной устойчивости. Согласно результатам исследований, в случае РМЖ облучение либо не приводит к изменению показателей общей выживаемости при ER-отрицательном РМЖ, либо сопровождается лишь незначительным их увеличением [1, 2], в то время как при ER-положительном РМЖ подобной тенденции не обнаружено [3–5]. В работах на культивируемых *in vitro* клетках РМЖ продемонстрировано, что облучение может (в зависимости от дозы и продолжительности воздействия) вызывать нарушения гормонального аппарата клеток, в том числе частичную потерю ERα и развитие резистентности к антиэстрогенам [6, 7]. Обнаружена корреляция между возникновением приобретенной радиорезистентности и гормональной

резистентностью клеток РМЖ, что в целом подтверждает возможность нарушения гормонального сигналинга на фоне облучения [17–20].

В настоящей работе УФ-облучение использовалось в качестве экспериментальной модели для изучения реакции опухолевых клеток на повреждения ДНК. Мы исследовали изменения эстрогенового сигналинга и уровень экспрессии ключевых сигнальных белков в клетках гормонозависимого РМЖ МСF-7 после однократного и хронического облучения. Как и ожидалось, однократное облучение приводит к активации белков апоптотического сигналинга (p53, cPARP) наряду со снижением экспрессии белков пролиферативного каскада (CDK4, CDK6). При этом наблюдается выраженная активация ключевого антиапоптотического белка – протеинкиназы Akt и основного

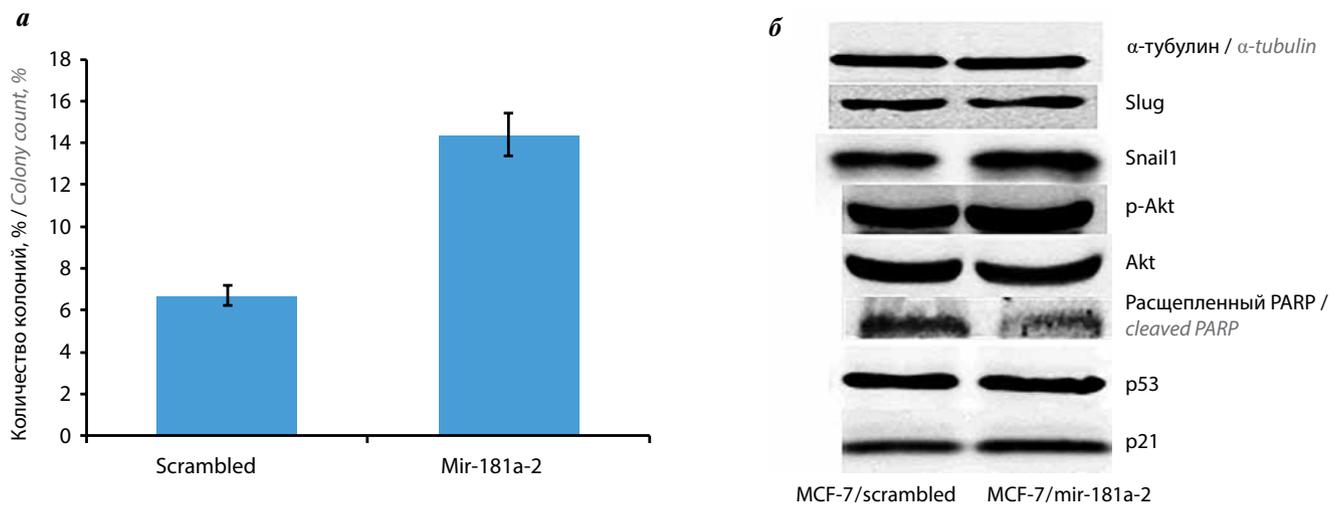


Рис. 3. МикроРНК-181а-2 (*mir-181a-2*) и чувствительность клеток МСF-7 к облучению. Клетки трансфицировали микроРНК-scrambled (случайная последовательность) и *mir-181a-2*. Иммуноблоттинг образцов клеток МСF-7 через 24 ч после трансфекции (а). Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов. Колониеобразующий тест (б). Через 24 ч после трансфекции клетки облучали ультрафиолетом (УФ), окраску колоний проводили через 10–14 сут. Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов (Fig. 3. MicroRNA-181a-2 (*mir-181a-2*) and the sensitivity of MCF-7 cells to irradiation. Cells were transfected with microRNA-scrambled (random sequence) and *mir-181a-2*. Immunoblotting of MCF-7 cell samples 24 h after transfection (a). Results from one of three independent experiments are presented. Colony-forming test (b). Cells were irradiated with ultraviolet (UV) 24 h after transfection, and colony staining was performed 10–14 days later. Mean values ± standard deviation of three independent experiments are presented

регулятора эпителиально-мезенхимального перехода Snail1.

Как известно, повторяющиеся циклы облучения приводят к селекции резистентных клонов опухолевых клеток, устойчивых к облучению [21–23]. Аналогичную картину мы наблюдали в случае УФ-облучения: в условиях хронического облучения клеток МСF-7 формируется УФ-устойчивый пул, что было описано выше. Полученные подобным образом УФ-резистентные клетки отличались низкой активностью ERα и повышенной устойчивостью к действию антиэстрогенов [12]. В настоящей работе мы впервые описали эффект гиперэкспрессии Snail1 в УФ-резистентных клетках и в экспериментах по трансфекции Snail1-содержащей плазмиды продемонстрировали непосредственное участие Snail1 в развитии перекрестной резистентности клеток к гормональным соединениям.

Следует отметить, что в опубликованной ранее работе по влиянию УФ-облучения на клетки меланомы мы также обнаружили эффект активации Snail1 в облученных клетках на фоне подавления эстрогенового сигналинга [8]. Это в определенной степени свидетельствует об общих закономерностях в изменении Snail1 и эстрогенового сигналинга в облученных клетках. Косвенным подтверждением координированной регу-

ляции Snail1 и ERα явились эксперименты по трансфекции микроРНК-181а-2, основанные на описанной ранее способности последней вызывать инактивацию ER и приводить к частичному снижению гормональной зависимости клеток [15]. Мы продемонстрировали выраженную активацию Snail1 в клетках после трансфекции микроРНК-181а-2, сопровождающуюся развитием относительной УФ-резистентности, что позволяет рассматривать активацию Snail1 под действием облучения в качестве одного из факторов, участвующих в дерегуляции эстрогенового сигналинга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные данные показывают, что Snail1 является одним из белков, активируемых в облученных клетках, и демонстрируют его участие в инактивации эстрогенового аппарата в условиях хронического облучения клеток. В свою очередь, одновременная активация Akt и Snail1 как в УФ-резистентных клетках, так и в клетках, трансфицированных микроРНК-181а-2, сопровождается развитием резистентности и к облучению, и к гормональным соединениям, что свидетельствует о необходимости координированной активации этих белков при формировании перекрестной резистентности клеток.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Eaton B.R., Jiang R., Torres M.A. et al. Benefit of adjuvant radiotherapy after breast-conserving therapy among elderly women with T1–T2N0 estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer* 2016;122(19):3059–68. DOI: 10.1002/cncr.30142 PMID: 27328114
- Yang P.S., Chen C.M., Liu M.C. et al. Radiotherapy can decrease locoregional recurrence and increase survival in mastectomy patients with T1 to T2 breast cancer and one to three positive nodes with negative estrogen receptor and positive lymphovascular invasion status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;77(2):516–22. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.05.016
- Hughes K.S., Schnaper L.A., Bellon J.R. et al. Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women age 70 years or older with early breast cancer: long-term follow-up of CALGB 9343. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2382–7. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.2615
- Chen J.X., Zhang W.W., Dong Y. et al. The effects of postoperative radiotherapy on survival outcomes in patients under 65 with estrogen receptor positive tubular breast carcinoma. *Radiat Oncol* 2018;13(1):226. DOI: 10.1186/s13014-018-1177-9.
- Chesney T.R., Yin J.X., Rajae N. et al. Tamoxifen with radiotherapy compared with Tamoxifen alone in elderly women with early-stage breast cancer treated with breast conserving surgery: a systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol* 2017;123(1):1–9. DOI: 10.1016/j.radonc.2017.02.019
- Paulsen G.H., Strickert T., Marthinsen A.B. et al. Changes in radiation sensitivity and steroid receptor content induced by hormonal agents and ionizing radiation in breast cancer cells *in vitro*. *Acta Oncol* 1996;35(8):1011–9. DOI: 10.3109/02841869609100720
- Bravata V., Cava C., Minafra L. et al. Radiation-induced gene expression changes in high and low grade breast cancer cell types. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):1084. DOI: 10.3390/ijms19041084
- Шеголев Ю.Ю., Карпухина М.А., Сорокин Д.В. и др. Хроническое ультрафиолетовое облучение индуцирует развитие устойчивой резистентности клеток меланомы к противоопухолевым препаратам. *Успехи молекулярной онкологии* 2023;10(3):50–8. Shchegolev Yu.Yu., Karpukhina M.A., Sorokin D.V. et al. Continuous ultraviolet irradiation induces the development of irreversible resistance of melanoma cells to anticancer drugs. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):50–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-50-58
- Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER α on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Molecular Cell* 2003;11(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x
- Vincent T., Neve E.P., Johnson J.R. et al. A SNAIL1–SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2009;11(8):943–50. DOI: 10.1038/ncb1905
- Shchegolev Yu., Sorokin D., Scherbakov A. et al. Upregulation of Akt/Raptor signaling is associated with rapamycin resistance of breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2020;330:109243. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109243
- Scherbakov A.M., Sorokin D.V., Razuvaeva V.E. et al. DNA damage agents result in the irreversible block of estrogen receptor α signaling and progression of hormonal resistance in receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. 2023. (Unpublished data). (In press.).
- Tokunaga E., Kimura Y., Mashino K. et al. Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer* 2006;13(2):137–44. DOI: 10.2325/jbcs.13.137
- Nicolini A., Ferrari P., Kotlarova L. et al. The PI3K-AKT-mTOR pathway and new tools to prevent acquired hormone resistance in breast cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2015;16(9):804–15. DOI: 10.2174/138920101609150715141545
- Andreeva O.E., Sorokin D.V., Mikhaevich E.I. et al. Towards unravelling the role of ER α -targeting miRNAs in the exosome-mediated transferring of the hormone resistance. *Molecules* 2021;26(21):6661. DOI: 10.3390/molecules26216661
- Wang Y., Chen Q., Jin S. et al. Up-regulation of P-glycoprotein is involved in the increased paclitaxel resistance in human esophageal cancer radioresistant cells. *Scand J Gastroenterol* 2012;47(7):802–8. DOI: 10.3109/00365521.2012.683042
- Steelman L.S., Navolanic P., Chappell W.H. et al. Involvement of Akt and mTOR in chemotherapeutic- and hormonal-based drug resistance and response to radiation in breast cancer cells. *Cell Cycle* 2011;10(17):3003–15. DOI: 10.4161/cc.10.17.17119
- Jang H., Baek J., Nam K.S. et al. Determination of the optimal time for tamoxifen treatment in combination with radiotherapy. *Int J Oncol* 2016;49(5):2147–54. DOI: 10.3892/ijo.2016.3687
- Luzhna L., Lykkesfeldt A.E., Kovalchuk O. et al. Altered radiation responses of breast cancer cells resistant to hormonal therapy. *Oncotarget* 2015;6(3):1678–94. DOI: 10.18632/oncotarget.3188
- Chen X., Ma N., Zhou Z. et al. Estrogen receptor mediates the radiosensitivity of triple-negative breast cancer cells. *Med Sci Monit* 2017;23:2674–83. DOI: 10.12659/msm.904810
- Cabrera-Licon A., Perez-Anorve I.X., Flores-Fortis M. et al. Deciphering the epigenetic network in cancer radioresistance. *Radiother Oncol* 2021;159:48–59. DOI: 10.1016/j.radonc.2021.03.012
- Podralska M., Ciesielska S., Kluiver J. et al. Non-coding RNAs in cancer radiosensitivity: microRNAs and lncRNAs as regulators of radiation-induced signaling pathways. *Cancers (Basel)* 2020;12(6):1662. DOI: 10.3390/cancers12061662
- Zhang H., Si J., Yue J. et al. The mechanisms and reversal strategies of tumor radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2021;147(5):1275–86. DOI: 10.1007/s00432-020-03493-3

Вклад авторов

Д.В. Сорокин: иммуноблоттинг, статистическая обработка данных;

А.М. Щербаков: статистическая обработка данных, анализ полученных данных, подготовка иллюстративного материала;

О.Е. Андреева: репортерный анализ, проведение исследований на клеточных культурах, МТТ-анализа и колониеобразующего теста;

Д.И. Сальникова: отбор клеток с устойчивостью к УФ-облучению, проведение колониеобразующего теста;

М.В. Гудкова: руководство проектом, написание текста статьи;

М.А. Красильников: идея и организация исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

D.V. Sorokin: immunoblotting, statistical data processing;

A.M. Shcherbakov: statistical data processing, analysis of the obtained data, preparation of illustrative material;

O.E. Andreeva: reporter gene assays, conducting research on cell cultures, MTT assay and colony-forming test;

D.I. Salnikova: selection of UV-resistant cells, colony-forming test;

M.V. Gudkova: project management, article writing;

M.A. Krasil'nikov: idea and organization of the research, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>

Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>

А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>

Д.И. Сальникова / D.I. Salnikova: <https://orcid.org/0000-0002-0809-3710>

М.В. Гудкова / M.V. Gudkova: <https://orcid.org/0000-0003-2694-5232>

М.А. Красильников / M.A. Krasil'nikov: <https://orcid.org/0000-0002-5902-7633>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00368).

Funding. This research was funded by the Russian Scientific Foundation (grant No. 22-25-00368).