

А.А. Мельникова<sup>1,2</sup>, А.А. Афонин<sup>1</sup>, Л.Н. Комарова<sup>1</sup>

## ИНТЕГРАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *PMAIP1* И *BIRC5*, А ТАКЖЕ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ SK-N-BE(2) В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

<sup>1</sup> Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск<sup>2</sup> Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –

филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск

Контактное лицо: Анжелика Александровна Мельникова, e-mail: angelik\_melnikova@mail.ru

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Оценка влияния ионизирующего излучения с различной линейной передачей энергии на экспрессию генов *PMAIP1* (Noxa) и *BIRC5* (Survivin) для выяснения молекулярных механизмов, определяющих радиочувствительность опухолевых клеток.

**Материал и методы:** Объектом исследования являлись клетки нейробластомы линии SK-N-BE(2). Было сформировано четыре группы исследования: группа, подверженная воздействию ионизирующего излучения, группа, обработанная доxorубицином, группа комбинированного действия ионизирующего излучения и доxorубицина, а также контрольная группа. Облучение ионами <sup>12</sup>C проводили на ускорителе У-70 Института физики высоких энергий (ИФВЭ) «Курчатовского института» (г. Протвино). Облучение осуществлялось в дозе 4 Гр в водном фантоме со средней энергией 455 МэВ/ нуклон. Средняя ЛПЭ излучения на начальном участке составила 11 кэВ/мкм, в пике – 120–140 кэВ/мкм. Также клетки облучали в дозе 4 Гр  $\gamma$ -излучением на базе ВНИИРАЭ на уникальной научной установке «Гамма-установка радиационного облучения ГУР-120» (источник излучения <sup>60</sup>Co, E<sub>ср</sub> = 1,25 МэВ). Мощность дозы составляла 0,9 Гр/мин. Клетки обрабатывали химиопрепаратом доxorубицин в концентрации 0,004 мг/мл за 24 ч до облучения. Тотальная РНК выделялась с помощью набора RNA Solo и количественно определена спектрофотометрически (NanoDrop ND-1000). Обратная транскрипция и амплификация проводились одновременно в режиме реального времени с использованием набора OneTube RT-PCR (Евроген) с SYBR Green I в качестве флуоресцентного индикатора. Анализ белок-белковых взаимодействий проводился с использованием базы данных STRING. Визуализация и анализ сети взаимодействий были выполнены в Cytoscape v3.10.3 (плагин CytoHubba), а функциональная аннотация – с помощью Metascape (анализ GO-терминов и путей KEGG,  $p < 0,01$ ).

**Результаты:** В клетках SK-N-BE(2) доxorубицин демонстрировал достоверное снижение экспрессии гена *BIRC5*, что согласуется с его известной проапоптотической активностью. Комбинированное действие  $\gamma$ -излучения (4 Гр) и доxorубицина продемонстрировало аддитивный эффект (0,04). Облучение ионами <sup>12</sup>C продемонстрировало значительное снижение экспрессии *BIRC5* при монотерапии (0,02), но менее выраженное снижение в случае комбинированного действия с доxorубицином (0,10). Доxorубицин индуцировал экспрессию гена *PMAIP1* (0,16), этот эффект синергически усиливался при комбинированном действии с  $\gamma$ -излучением (0,25), но подавлялся при воздействии ионов <sup>12</sup>C (0,05), что, вероятно, обусловлено активацией антиапоптотических механизмов.

**Ключевые слова:** ионная (<sup>12</sup>C) лучевая терапия, гамма-терапия, белки семейства Bcl-2, SK-N-BE (2), доxorубицин, *BIRC5*, *PMAIP1*, gene ontology

**Для цитирования:** Мельникова А.А., Афонин А.А., Комарова Л.Н. Интегративный анализ экспрессии генов *PMAIP1* и *BIRC5*, а также белок-белковых взаимодействий в клетках нейробластомы SK-N-BE(2) в условиях комбинированной терапии // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т. 70. № 6. С. 12–19. DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-6-12-19

А.А. Melnikova<sup>1,2</sup>, А.А. Afonin<sup>1</sup>, L.N. Komarova<sup>1</sup>

## Integrative Analysis of *Pmaip1* and *Birc5* Gene Expression, as Well as Protein-Protein Interactions in SK-N-BE(2) Neuroblastoma Cells in Combination Therapy

<sup>1</sup> National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia<sup>2</sup> A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russia

Contact person: A.A. Melnikova, e-mail: angelik\_melnikova@mail.ru

### ABSTRACT

**Purpose:** Evaluation of the effect of ionizing radiation with various linear energy transfer on the expression of the *PMAIP1* (Noxa) and *BIRC5* (Survivin) genes to elucidate the molecular mechanisms determining the radiosensitivity of tumor cells.

**Material and methods:** The object of the study was SK-N-BE(2) cells. Four study groups were formed: a group exposed to ionizing radiation; a group treated with doxorubicin; a group of combined exposure to ionizing radiation and doxorubicin; and an untreated control group. The cells were irradiated with <sup>12</sup>C ions at the U-70 accelerator of the Institute for High Energy Physics (IHEP) of the National Research Centre «Kurchatov Institute» (Protvino, Moscow Region).

The irradiation was carried out at a dose of 4 Gy in an aqueous phantom with an average energy of 455 MeV/nucleon. The average LET of radiation in the initial phase was 11 keV/μm, with a peak of 120–140 keV/μm. The cells were also irradiated with gamma radiation on the basis of the Russian Institute of Radiology and Agroecology at the unique scientific facility «Gamma radiation irradiation unit GUR-120» (radiation source <sup>60</sup>Co, 1.25 MeV) at a dose of 4 Gy. The dose rate was 0.9 Gy /min. The cells were treated with the chemotherapy drug doxorubicin at a concentration of 0.004 mg/ml 24 hours before irradiation. Total RNA was isolated using an RNA Solo kit and quantified

spectrophotometrically (NanoDrop ND-1000). Reverse transcription and amplification were performed simultaneously in real time using the OneTube RT-PCR kit with SYBR Green I as a fluorescent indicator. Key regulatory targets were identified from a set of common targets using STRING (protein-protein interaction network analysis, Homo sapiens), visualized and analyzed in Cytoscape v3.10.3 (CytoHubba plugin), and functionally annotated using Metascape (GO and KEGG pathway analysis,  $p < 0,01$ ).

**Results:** In SK-N-BE(2) cells, doxorubicin demonstrated a significant decrease in the expression of the *BIRC5* gene, which is consistent with its known proapoptotic activity. The combined effect of gamma radiation (4 Gy) and doxorubicin demonstrated an additive effect (0,04). Irradiation with  $^{12}\text{C}$  ions demonstrated a significant decrease in *BIRC5* expression with monotherapy (0,02), but a less pronounced decrease in the case of combined action with doxorubicin (0,10). Doxorubicin induced the expression of the *PMAIP1* gene (0,16), this effect was synergistically enhanced when combined with gamma radiation (0,25), but was suppressed when using  $^{12}\text{C}$  ions (0,05), which is probably due to the activation of antiapoptotic mechanisms.

**Conclusion:** The results of the analysis of Gene Ontology and gene expression in SK-N-BE(2) cells confirmed the functional specialization of *PMAIP1* (mitochondrial apoptosis) and *BIRC5* (cell cycle regulation). Doxorubicin and gamma radiation enhanced apoptosis by affecting these genes, while  $^{12}\text{C}$  ions activated DNA repair, suppressing *PMAIP1* and weakening the effect on *BIRC5*.

**Keywords:**  $^{12}\text{C}$  ion radiation therapy, gamma therapy, *Bcl-2* family proteins, SK-N-BE (2), doxorubicin, *BIRC5*, *PMAIP1*, gene ontology

**For citation:** Melnikova AA, Afonin AA, Komarova LN. Integrative Analysis of *Pmaip1* and *Birc5* Gene Expression, as Well as Protein-Protein Interactions in SK-N-BE(2) Neuroblastoma Cells in Combination Therapy. Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70(6):12–19. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-6-12-19

## Введение

Резистентность опухолевых клеток является преобладающим фактором, снижающим эффективность ключевых методов лечения, в том числе лучевой терапии, что составляет значительную проблему в современной клинической практике. Следовательно, изучение молекулярных механизмов, определяющих выживаемость опухолевых клеток после воздействия ионизирующего излучения, является наиболее приоритетным направлением исследований. Для разработки эффективных стратегий противораковой терапии особенно важны исследования, направленные на понимание механизмов репарации ДНК и клеточной гибели, индуцируемых лечением.

Цитотоксическое действие ионизирующего излучения и других ДНК-повреждающих агентов обусловлено их способностью индуцировать апоптоз в опухолевых клетках. Этот процесс регулируется сложным взаимодействием белков семейства *Bcl-2*, включающим как про-, так и антиапоптотические факторы. Проапоптотические белки *BH3-only*, среди которых *PMAIP1* (*Noxa*), играют ключевую роль в запуске апоптоза. *Noxa* ингибирует антиапоптотические белки (например, *Mcl-1*), что может приводить к активации эффекторных белков *Bax/Bak*, пермеабилзации митохондриальной мембраны и инициации необратимого апоптотического каскада [1–3].

На контрасте с проапоптотическими механизмами, *Survivin*, член семейства ингибиторов апоптоза (*IAP*), представляет собой перспективную молекулярную мишень благодаря своей роли в клеточной пролиферации и подавлении апоптоза, участии в процессах онкогенеза и метастазирования, развития лекарственной резистентности, а также значительно большей экспрессии в опухолевых клетках по сравнению с нормальными тканями [4–9].

С целью выяснения молекулярных механизмов, определяющих радиочувствительность опухолевых клеток, представляется необходимым изучить влияние ионизирующего излучения с различной линейной передачей энергии (ЛПЭ) на экспрессию генов *PMAIP1* (*Noxa*) и *BIRC5* (*Survivin*). В частности, количественный анализ изменений уровня экспрессии этих генов, продукты которых являются ключевыми регуляторами апоптоза, позволит установить зависимость между параметрами облучения и клеточным ответом.

## Материал и методы

Объектом исследования были выбраны клетки нейробластомы линии SK-N-BE(2). Клетки культивирова-

ли при стандартных условиях (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (CB 53 Binder, Германия) в полной питательной среде DMEM, содержащей 10 % FBS и гентамицин (50 мкг/мл). Исследование включало контрольную группу и три экспериментальные группы, включающие воздействие ионизирующего излучения, доксорубина, или комбинацию этих агентов.

### Обработка клеток противоопухолевым препаратом

Обработка клеток линии SK-N-BE(2) химиопрепаратом доксорубин в концентрации 0,004 мг/мл осуществлялась за 24 ч до процедуры облучения.

### Облучение клеток

Облучение ионами  $^{12}\text{C}$  проводили на ускорителе У-70 Института физики высоких энергий (г. Протвино). Облучение осуществлялось в дозе 4 Гр в водном фантоме со средней энергией 455 МэВ/нуклон. Средняя ЛПЭ излучения на начальном участке составила 11 кэВ/мкм, в пике 120–140 кэВ/мкм.

Также клетки облучали  $\gamma$ -излучением на базе ВНИИРАЭ на уникальной научной установке «Гамма-установка радиационного облучения ГУР-120» (источник  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$ ,  $E_{\gamma} = 1,25$  МэВ) в дозе 4 Гр. Мощность дозы составляла 0,9 Гр/мин.

Перед началом облучения клетки снимали с культурального флакона раствором Трипсина–Версена в отношении 1:1 и разводили до концентрации 50 тыс. кл/мл. Далее суспензию клеток перенесли в пробирки типа Эппендорф в объеме по 1,5 мл.

### Выделение РНК из клеток

Выделение суммарной РНК из культуры клеток ( $1 \times 10^6$  клеток) проводилось с помощью коммерческого набора RNA Solo, включающего микроцентрифужные колонки с силикагелевыми мембранами для селективного связывания и очистки РНК.

### Определение концентрации РНК

Квантификация и оценка чистоты выделенной РНК проводилась с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США) и программного обеспечения NanoDrop 1000. Соотношение абсорбции при длинах волн 260 нм и 280 нм ( $A_{260/280}$ ) находилось в диапазоне 2–2,2, что свидетельствует о высокой чистоте препарата РНК.

### Анализ белок-белковых взаимодействий (ББВ)

Для определения белок-белковых взаимодействий (ББВ) был использован ресурс STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins). Учитывались только экспериментально подтвержденные взаимодействия и данные из доверенных баз данных (уровень достоверности  $\geq 0,9$ , вид – Homo sapiens). Анализ результатов отображался в виде сети, где узлы представляют белки, а ребра – взаимодействия. Визуализация сети ББВ осуществлялась с помощью Cytoscape 3.10.3, а анализ степени связности узлов проводился с помощью плагина CytoNCA 2.1.6.

### Биоинформатический анализ GO и KEGG

Для обнаружения регуляторных сетей генов на основе иерархических категорий в соответствии с молекулярными функциями, биологическими процессами и клеточными компонентами был проведен анализ Gene Ontology (GO). Для характеристики обогащенных путей был выполнен анализ с помощью Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) с использованием базы данных ShinyGO 0.82. Идентифицированные мишени были введены в платформу Metascape (вид – Homo sapiens,  $p < 0,01$ ).

### Анализ экспрессии генов PMAIP1 и BIRC5

Олигонуклеотидные последовательности праймеров были разработаны компанией ЗАО «Евроген» (Россия): для BIRC5 прямой 5'-CCACTGAGAACGAGCCAGACTT-3' и обратный 5'-GTATTACAGGCGTAAGCCACCG-3', для PMAIP1 (Noxa) прямой 5'-CCAGCCGCCAGTCTAATCA-3' и обратный 5'-GTGCCCTTGGAAACGGAAGA-3'. Для соотношения сигналов (нормализации) использовали кДНК GAPDH; праймеры для GAPDH: прямой 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3' и обратный 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'.

### Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR)

Для одновременного проведения обратной транскрипции и амплификации кДНК был применен метод одностадийной ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием коммерческого набора OneTube RT-PCR SYBR (Евроген), детектирование продуктов реакции осуществлялось с помощью флуоресцентного красителя SYBR Green I.

### Статистическая обработка данных

Анализ экспрессии генов проводился в трёх аналитических повторностях для каждой пробы, с последующим усреднением результатов. Обработку результатов проводили с помощью метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Данные количественной оценки экспрессии генов представляли в относительных единицах, рассчитанных при сравнении с уровнями экспрессии референсного гена GAPDH. Перед статистическим анализом нормальность распределения данных проверялась с помощью критерия Шапиро–Уилки в программе Microsoft Excel 2019 (Microsoft, Редмонд, Вашингтон, США). Визуализация данных осуществлялась с помощью box-plots, отображающих медиану, первый и третий квартили ( $Q_1$  и  $Q_3$ ), а также межквартильный размах. Статистическая значимость различий между группами оценивалась с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты построения и анализа сети ББВ с использованием программного обеспечения Cytoscape 3.10.3 и специализированного плагина cytoHubba, позволяющего идентифицировать ключевые узлы и подсети в сети взаимодействий, представлены на рис. 1.

Для построения сети ББВ были использованы только экспериментально подтвержденные взаимодействия Homo sapiens из надежных баз данных (уровень достоверности  $\geq 0,9$ ). Анализ близости белков-кандидатов к белкам с известными взаимодействиями проводился для BIRC5 (взаимодействия с Med31, Aurka, Aurkb, Aurkc, Incenp, Xiap, Casp9, Trp53, Cdca8, Diablo) и PMAIP1 (взаимодействия с Trp53, Bcl2, Bcl2l11, Bid, Bcl2l1, Bbc3, Bax, Bcl2A1, Mcl1, Bcl2l2). Визуализация сети представлена градиентной цветовой шкалой: красный цвет соответствует наивысшему рангу взаимодействия (rank 1, для генов BIRC5 и PMAIP1), желтый – более низкому рангу. Синим цветом показаны соседние гены Med31 и Bcl2l2. Ранг 2 присвоен гену Xiap. Оранжевым цветом отмечены гены Aurka, Aurkb, Cdca8 (ранг 3). Генам Incenp, trp53, Aurkc присвоен ранг 6, Diablo – ранг 9, Casp9 – ранг 10.

Для идентификации иерархически организованных регуляторных сетей генов, классифицированных по молекулярным функциям, биологическим процессам и клеточным компонентам, был применён анализ онтологии генов (GO) (рис. 2–4).

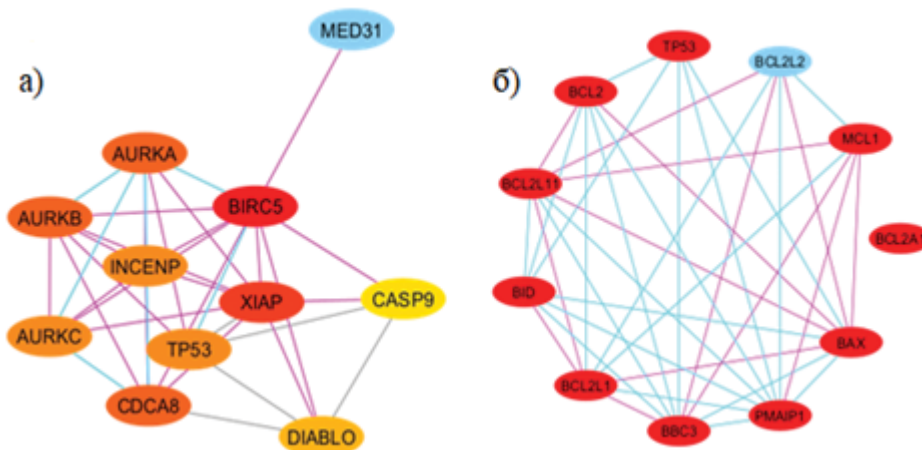


Рис. 1. Сеть белок-белковых взаимодействий для: а) – BIRC5; б) – PMAIP1  
Fig. 1. A network of protein-protein interactions for: а) – BIRC5; б) – PMAIP1

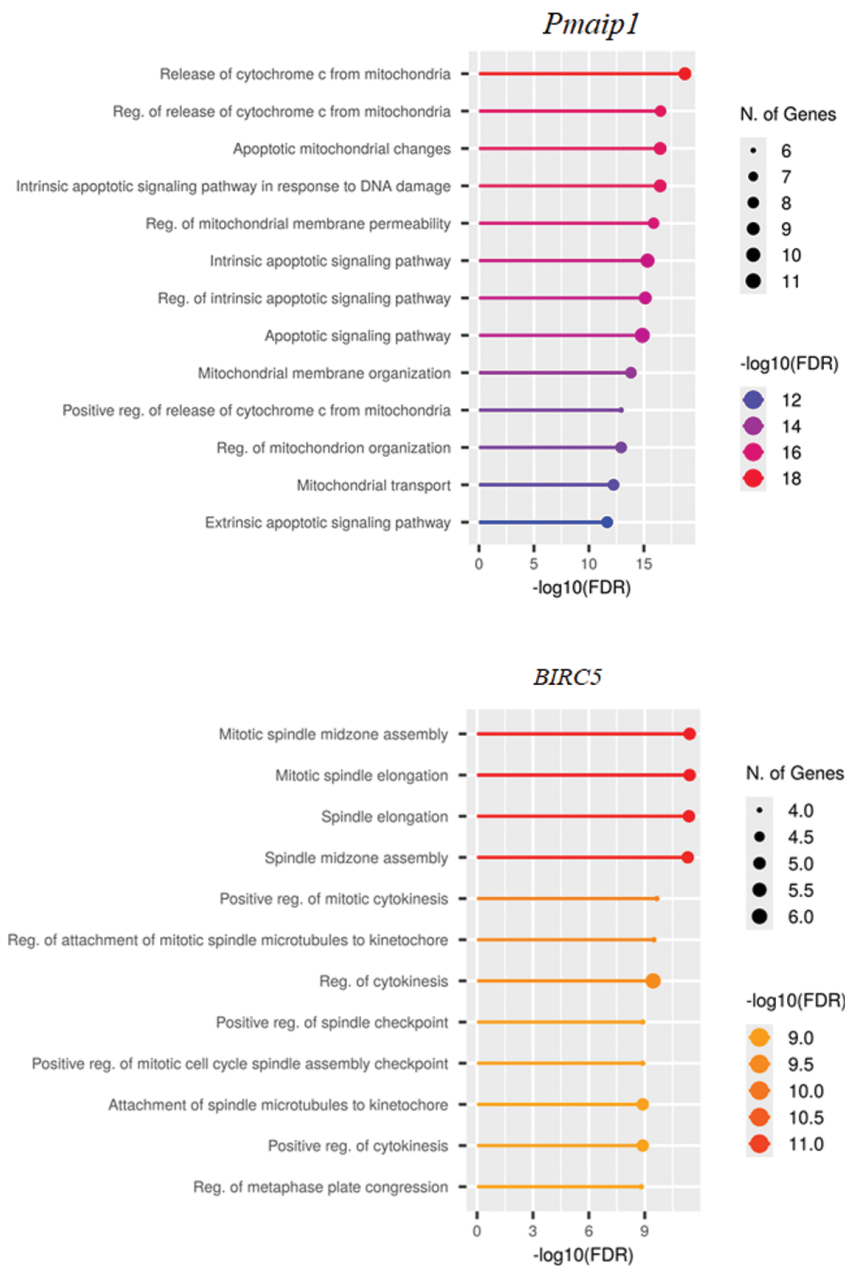


Рис. 2. Биологические процессы, в которые вовлечены гены. Данные ранжированы по значениям Fold Enrichment  
 Fig. 2. Biological processes that involve genes. The data is ranked by Fold Enrichment values

На представленных графиках показано обогащение GO-терминов по клеточным компартментам для генов *PMAIP1* и *BIRC5*. Значение  $-\log_{10}(\text{FDR})$  (False Discovery Rate) по оси X отражает статистическую значимость обогащения (более высокое значение соответствует большей значимости). Размер точек на графиках коррелирует с количеством генов, ассоциированных с каждым GO-термином.

Результаты исследования указывают на многостороннее участие *PMAIP1* в митохондриальном апоптозе. Наблюдается значимое обогащение GO-терминов, связанных с высвобождением цитохрома C, регуляцией этого процесса, а также морфологическими и функциональными изменениями митохондрий. Кроме того, *PMAIP1* вовлечен во внутренний путь апоптоза, активируемый повреждением ДНК, что предполагает его роль в контроле клеточного цикла и ответа на стресс. Дополнительные данные свидетельствуют об участии *PMAIP1* в

регуляции проницаемости внутренней митохондриальной мембраны, организации митохондриальных мембран и митохондриального транспорта.

В противоположность этому, анализ GO-терминов для *BIRC5* демонстрирует его ключевое участие в регуляции клеточного деления и контроля клеточного цикла. Наблюдается значительное обогащение GO-терминов, связанных с формированием и функционированием митотического веретена, включая его сборку, удлинение и прикрепление микротрубочек к кинетохорам, что критично для точной сегрегации хромосом во время митоза. *BIRC5* также участвует в регуляции цитокinesis, контрольных точек митоза (включая контрольную точку сборки веретена) и конгрессии хромосом в метафазе, подтверждая его важную роль в обеспечении точного деления клеток.

Анализ GO позволил выявить клеточные компоненты, с которыми функционально связаны гены *PMAIP1* и *BIRC5* (рис. 3).

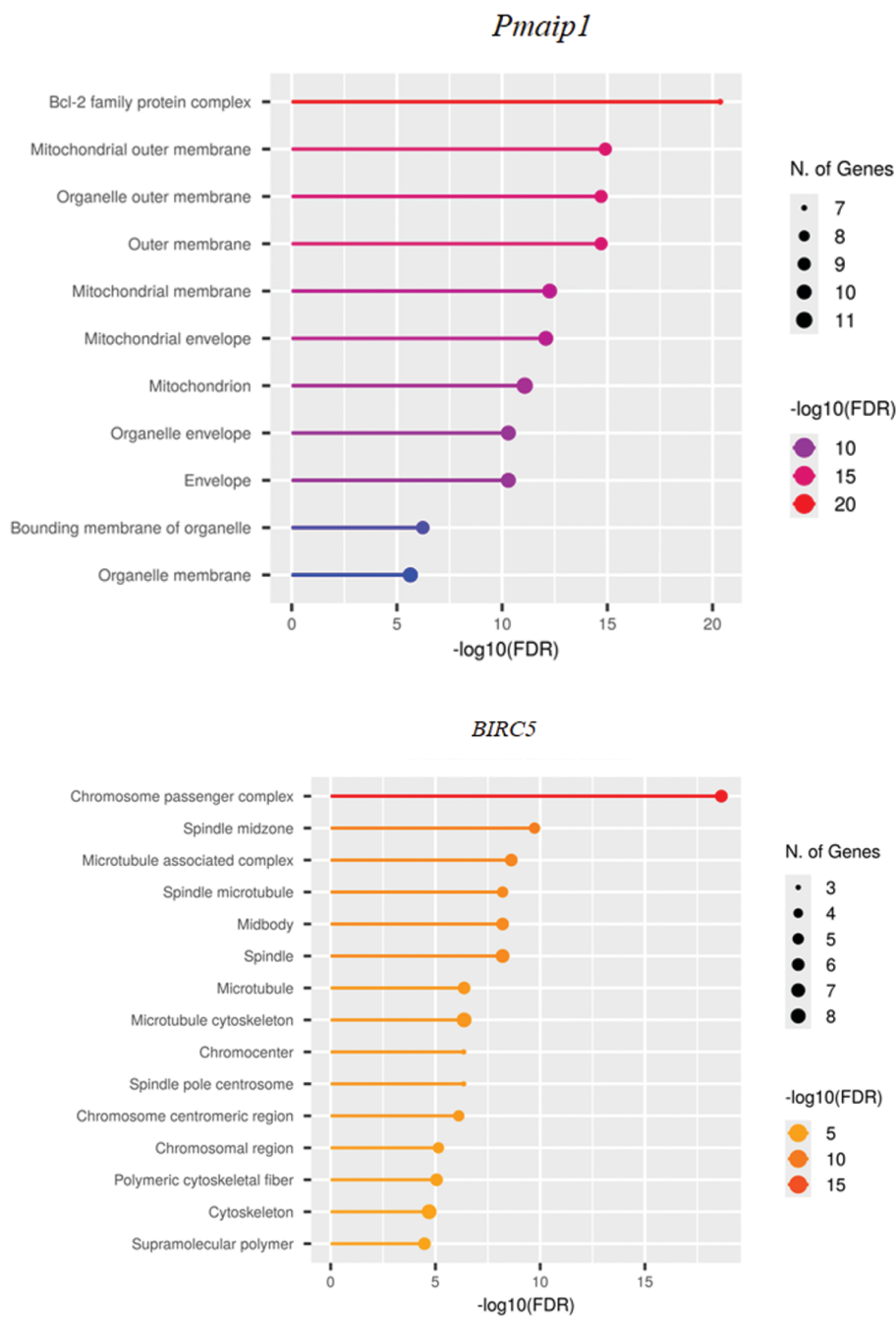


Рис. 3. Клеточные компоненты, в которые вовлечены гены. Данные ранжированы по значениям Fold Enrichment  
 Fig. 3. Cellular components that involve genes. The data is ranked by Fold Enrichment values

Биоинформационный анализ онтологии генов для *PMAIP1* и *BIRC5* выявил различия в субклеточной локализации и функциональных взаимодействиях. Анализ компонентов клеточных структур показал значительное обогащение для *PMAIP1* терминами, связанными с митохондриями, включая митохондриальные мембраны (внутреннюю и внешнюю), а также мембраны других органелл. Наиболее выраженным является обогащение по термину «белковый комплекс семейства Bcl-2», что подтверждает участие *PMAIP1* в апоптотической регуляции через взаимодействие с белками этого семейства.

В противоположность этому, анализ GO для *BIRC5* показал обогащение компонентов, ассоциированных с клеточным делением и цитоскелетом. Наиболее значимое обогащение наблюдается для «хромосомного пас-

сажирского комплекса», что соответствует установленной роли *BIRC5* в регуляции митоза и цитокинеза. Дополнительное обогащение по терминам, описывающим компоненты митотического веретена деления (средняя зона веретена, белки, ассоциированные с микротрубочками, микротрубочки веретена) и другие структурные элементы цитоскелета, подтверждает участие *BIRC5* в формировании и функционировании митотического аппарата.

В совокупности, GO-анализ клеточных компонентов подтверждает функциональное разделение ролей *PMAIP1* и *BIRC5*: *PMAIP1*, локализованный преимущественно на митохондриях, играет ключевую роль в регуляции апоптоза, в то время как *BIRC5* участвует в регуляции клеточного деления, формировании и функ-

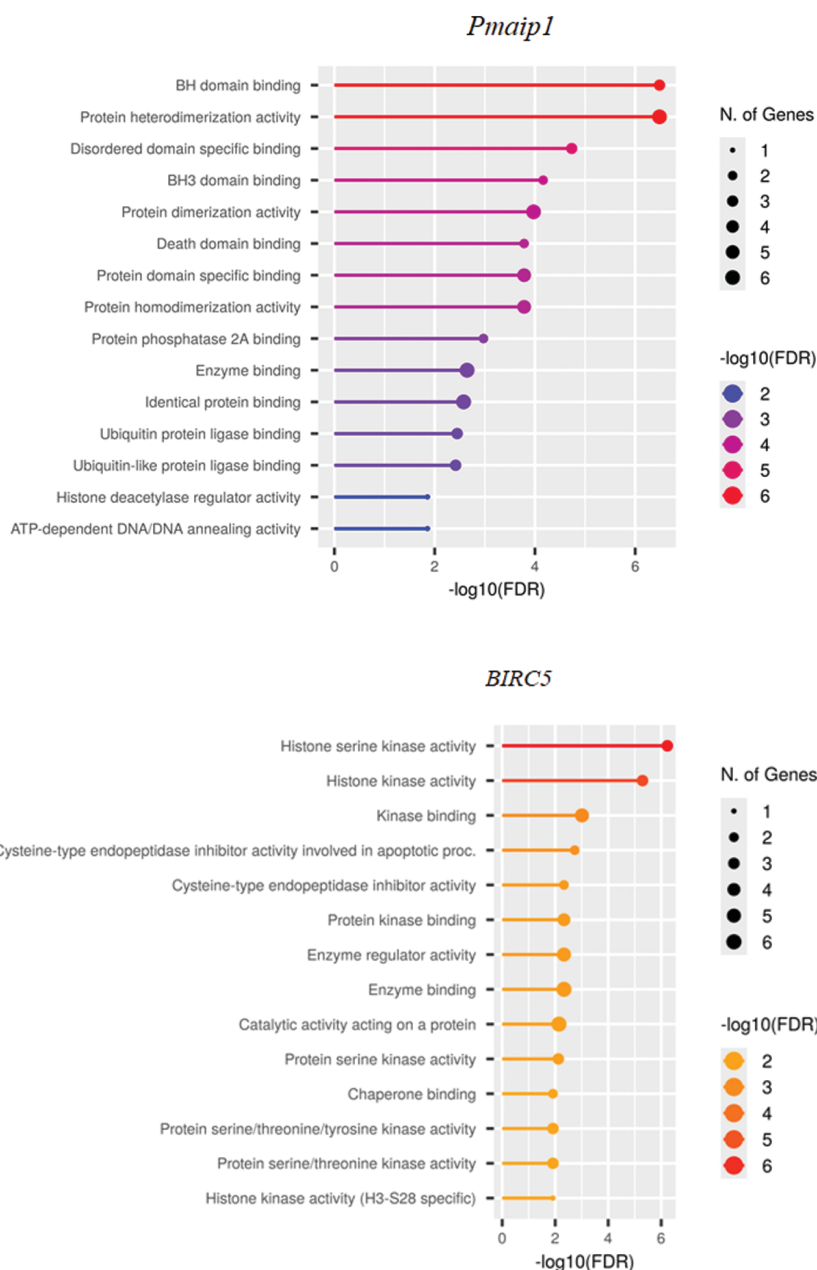


Рис. 4. Молекулярные функции, в которые вовлечены гены. Данные ранжированы по значениям Fold Enrichment  
 Fig. 4. The molecular functions that genes are involved in. The data is ranked by Fold Enrichment values

ционировании митотического веретена и организации цитоскелета. Эти результаты подчеркивают фундаментальную роль обоих генов в контроле клеточного цикла и гомеостаза.

На следующем этапе исследования, для выявления иерархических регуляторных сетей генов, был проведен анализ GO с учётом их молекулярных функций (рис. 4).

Онтологический анализ молекулярных функций *PMAIP1* и *BIRC5* выявил их различные, но взаимодополняющие роли. Анализ обогащения GO-терминов показал, что *PMAIP1* преимущественно участвует в процессах, опосредованных ББВ, демонстрируя значительное обогащение терминами, связанными со связыванием белков, включая взаимодействие с доменами ВН, ВН3, а также гомо- и гетеродимеризацию. Кроме того, *PMAIP1* проявляет активность по связыванию с ферментами, в частности, с протеинфосфатазой 2А, а также участвует в процессах убиквитинирования белков, что указывает

на его потенциальную роль в регуляции стабильности белков-мишеней.

Напротив, функциональная аннотация *BIRC5* характеризуется преобладанием киназной активности, с обогащением GO-терминов, связанных с киназными доменами, включая гистоновые и серин/треониновые протеинкиназы. Это свидетельствует о регуляции *BIRC5* клеточного цикла и апоптоза путём фосфорилирования белковых субстратов. Его ингибирующая активность в отношении цистеиновых эндопептидаз, участвующих в апоптозе, подтверждает его антиапоптотическую роль. Дополнительные функции *BIRC5* включают модуляцию ферментативной активности, каталитическую активность и взаимодействие с шаперонами.

Результаты анализа GO-терминов, рассматриваемые в совокупности, демонстрируют существенные различия в функциональных механизмах *PMAIP1* и *BIRC5*. В частности, *PMAIP1* предпочтительно участвует в фор-

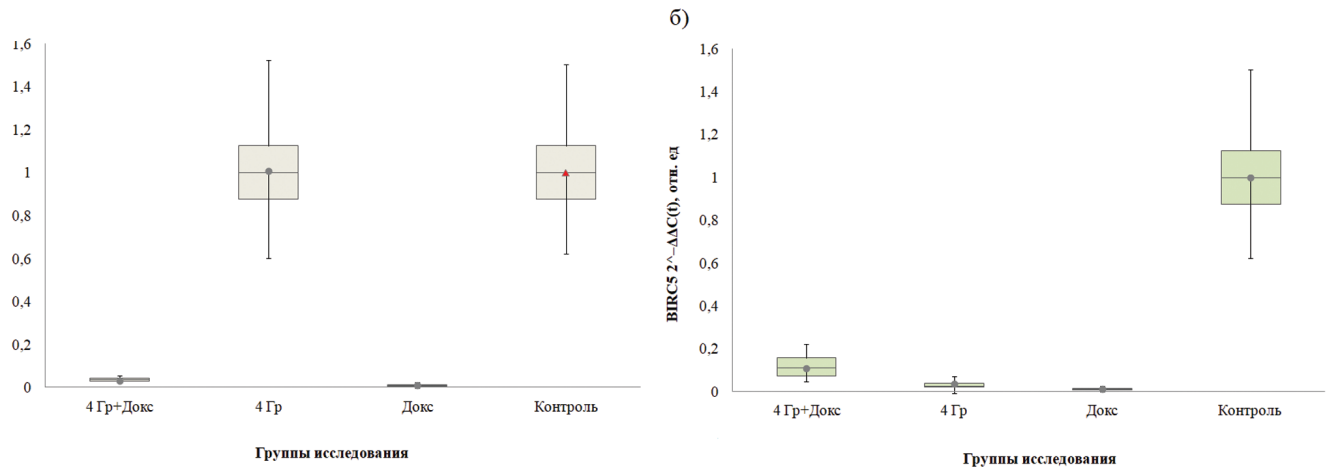


Рис. 5. Экспрессия гена BIRC5 в клетках SK-N-BE(2): а) –  $\gamma$ -излучение; б) – ионы  $^{12}\text{C}$   
 Fig. 5. Expression of the BIRC5 gene in SK-N-BE(2) cells: а) – gamma radiation; б) –  $^{12}\text{C}$  ions

мировании макромолекулярных комплексов и регуляции начальных этапов сигнальных каскадов. Более того, BIRC5 осуществляет регуляцию на более поздних стадиях клеточного цикла за счет киназной активности и ингибирования протеаз, что влияет на ферментативную активность и процесс апоптоза. Таким образом, выявленные различия в молекулярных функциях указывают на их комплементарные роли в поддержании гомеостаза и регуляции клеточного цикла. Следует подчеркнуть, что высокая статистическая значимость обогащения GO-терминов, подтвержденная значениями  $-\log_{10}(\text{FDR})$ , укрепляет надежность полученных выводов.

На основании результатов анализа онтологии генов, было проведено исследование экспрессии целевых генов в клеточной линии нейробластомы SK-N-BE(2) с целью экспериментальной верификации выявленных функциональных связей. Уровни экспрессии гена BIRC5 после воздействия исследуемых групп факторов на клетки SK-N-BE(2) представлены на рис. 5.

В рамках проведённого исследования выявлено, что воздействие доксорубина на клетки SK-N-BE(2) приводит к значительному снижению экспрессии гена BIRC5, что согласуется с его установленным механизмом действия, связанным с индукцией повреждений ДНК и активацией апоптотических сигнальных каска-

дов. При этом  $\gamma$ -излучение в данных экспериментальных условиях не продемонстрировало значимого влияния на экспрессию BIRC5. Тем не менее, комбинированное действие доксорубина и  $\gamma$ -излучения привело к дополнительному снижению экспрессии (0,04), что может указывать на наличие слабо выраженного синергического эффекта в индукции апоптоза. Облучение ионами  $^{12}\text{C}$  продемонстрировало значительное снижение экспрессии BIRC5 при монотерапии (0,02), но менее выраженное снижение в случае комбинированного действия с доксорубином (0,10). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о сложном взаимодействии различных терапевтических стратегий в регуляции экспрессии гена BIRC5 в клетках нейробластомы.

На рис. 6 продемонстрированы уровни экспрессии гена PMAIP1 после воздействия исследуемых групп факторов на клетки SK-N-BE(2).

Анализ экспрессии проапоптотического гена PMAIP1 в данной работе продемонстрировал закономерности, связанные с взаимодействием доксорубина и ионизирующего излучения. Отмечено умеренное повышение экспрессии PMAIP1 (0,16) при воздействии доксорубина, что согласуется с известным проапоптотическим механизмом. Комбинированное действие доксорубина и  $\gamma$ -излучения (4 Gr) привело к синергическому уси-

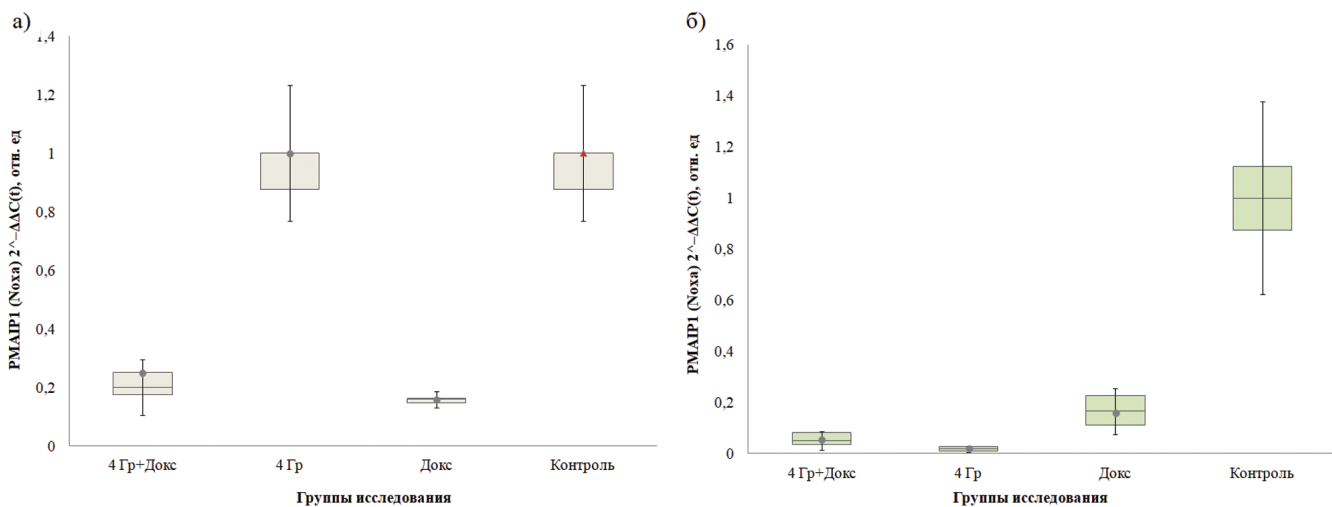


Рис. 6. Экспрессия гена PMAIP1 в клетках SK-N-BE(2): а) –  $\gamma$ -излучение; б) – ионы  $^{12}\text{C}$   
 Fig. 6. Expression of the PMAIP1 gene in SK-N-BE(2) cells: а) – gamma radiation; б) –  $^{12}\text{C}$  ions

лению этого эффекта (0,25). В то же время, комбинированное действие доксорубина и ионов  $^{12}\text{C}$  привело к значительному подавлению экспрессии *PMAIP1* (0,05), что может быть обусловлено активацией клеточных механизмов, направленных на подавление апоптоза в ответ на высокую плотность ионизации и значительное повреждение ДНК.

### Обсуждение

В результате проведенного исследования была выявлена сложная взаимосвязь между индуцированным повреждением ДНК и регуляцией апоптоза в клетках SK-N-BE(2), опосредованная влиянием доксорубина и ионизирующего излучения. Воздействие доксорубина приводило к существенному снижению экспрессии антиапоптотического гена *BIRC5*. Следует отметить, что  $\gamma$ -излучение не вызывало значимых изменений уровня экспрессии *BIRC5*, в то время как при комбинированном действии доксорубина и  $\gamma$ -излучения наблюдался аддитивный эффект. Кроме того, излучение с высокой ЛПЭ (ионы  $^{12}\text{C}$ ) также индуцировало снижение экспрессии *BIRC5*, однако этот эффект был менее выражен при комбинированном действии с доксорубином, что может быть обусловлено активацией механизмов репарации ДНК. В отличие от *BIRC5*, доксорубин индуцировал экспрессию проапоптотического гена *PMAIP1*, причём комбинированное действие доксорубина и  $\gamma$ -излучения продемонстрировало синергический эффект. При этом комбинированное действие доксорубина и ионов  $^{12}\text{C}$  приводило к подавлению экспрессии *PMAIP1*, что, вероятно, связано с активацией антиапоптотических сигнальных путей в ответ на высокую степень повреждения ДНК. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сложной и многофакторной регуляции апоптоза, зависимой от типа и комбинации

терапевтических стратегий и степени индуцированного повреждения ДНК.

### Заключение

Проведенное в рамках данной работы исследование выявило функциональную специализацию *PMAIP1* и *BIRC5*, подтвержденную анализом экспрессии генов в клетках нейробластомы линии SK-N-BE(2). Полученные данные указывают на вовлеченность *PMAIP1* в различные этапы митохондриально-опосредованного апоптоза. Наблюдается значимое обогащение GO-терминов, связанных с высвобождением цитохрома C из митохондрий, регуляцией этого процесса, а также апоптотическими изменениями в митохондриальной морфологии и функции. Кроме того, *PMAIP1* демонстрирует участие во внутреннем сигнальном пути апоптоза, запускаемом повреждением ДНК, что свидетельствует о его роли в контроле клеточного цикла и ответа на стресс. Напротив, *BIRC5* вовлечён в регуляцию клеточного цикла, в частности, в процессы митоза и цитокинеза, что подтверждается обогащением GO-терминов, связанных с митотическим веретеном и хромосомным пассажирским комплексом. Экспериментальные данные экспрессии генов подтверждают эти выводы. Доксорубин индуцировал снижение *BIRC5* и повышение *PMAIP1*. Комбинированное действие доксорубина и  $\gamma$ -излучения продемонстрировало синергизм. Ионизирующее излучение с высокой ЛПЭ (протоны и ионы  $^{12}\text{C}$ ) подавляло экспрессию *BIRC5*, однако в комбинации с доксорубином это снижение было менее выражено, что указывает на активацию механизмов репарации ДНК. Таким образом, результаты подтверждают сложную взаимосвязь между индуцированным повреждением ДНК, регуляцией апоптоза и функциональной специализацией *PMAIP1* и *BIRC5*.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Roufayel R., Younes K., Al-Sabi A., Murshid N. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life (Basel)*. 2022;12;2:256. doi:10.3390/life12020256.
2. Greaves G., Milani M., Butterworth M., Carter R.J., Byrne D.P., Eyers P.A., Luo X., Cohen G.M., Varadarajan S. BH3-Only Proteins Are Dispensable for Apoptosis Induced by Pharmacological Inhibition of Both MCL-1 and BCL-X L. *Cell Death Differ*. 2019;26:1037-1047. doi: 10.1038/s41418-018-0183-7.
3. Huang K., O'Neill K.L., Li J., Zhou W., Han N., Pang X., Wu W., Struble L., Borgstahl G., Liu Z. BH3-Only Proteins Target BCL-XL/MCL-1, Not BAX/BAK, to Initiate Apoptosis. *Cell Res*. 2019;29:942-952. doi: 10.1038/s41422-019-0231-y.
4. Rafatmanesh A., Behjati M., Mobasseri N., Sarvzadeh M., Mazoochi T., Karimian M. The Survivin Molecule as a Double-Edged Sword in Cellular Physiologic and Pathologic Conditions and its Role as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *J Cell Physiol*. 2020;235;2:725-744. doi:10.1002/jcp.29027.
5. George R., Hehlhans S., Fleischmann M., Rödel C., Fokas E., Rödel F. Advances in Nanotechnology-Based Platforms for Survivin-Targeted drug Discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2022;17;7:733-754. doi:10.1080/17460441.2022.2077329.
6. Wijaya W., Phyu S.M., Jiang S. Extracellular Vesicle (EV) Survivin for Cancer Diagnostics and Therapeutics: A Review. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2024;29;8:302. doi:10.31083/j.fbl2908302.
7. Liao J., Qing X., Li X., et al. TRAF4 Regulates Ubiquitination-Modulated Survivin Turnover and Confers Radioresistance. *Int J Biol Sci*. 2024;20;1:182-199. doi:10.7150/ijbs.87180.
8. Fang X.L., Cao X.P., Xiao J., et al. Overview of Role of Survivin in Cancer: Expression, Regulation, Functions, and its Potential as a Therapeutic Target. *J Drug Target*. 2024;32;3:223-240. doi:10.1080/1061186X.2024.2309563.
9. Martínez-Sifuentes M.A., Bassol-Mayagoitia S., Nava-Hernández M.P., et al. Survivin in Breast Cancer: A Review. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2022;26;9:411-421. doi:10.1089/gtmb.2021.0286.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Участие авторов.** А.А. Мельникова – проведение экспериментов, разработка исследования; А.А. Афонин – проведение экспериментов; Л.Н. Комарова – концепция исследования, научное руководство.

**Поступила:** 20.07.2025. Принята к публикации: 25.08.2025.

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

**Financing.** The study had no sponsorship.

**Contribution.** A.A. Melnikova – conducting experiments, research development; A.A. Afonin – conducting experiments; L.N. Komarova – development of the research concept, scientific supervision.

**Article received:** 20.07.2025. Accepted for publication: 25.08.2025.