

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ АНТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В МОДЕЛЬНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HeLa

Кутилин Д.С., Могушкова Х.А.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения
РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Раково-тестикулярные антигены (РТА) могут использоваться в качестве мишени при иммунотерапии злокачественных опухолей различных локализаций, в том числе рака шейки матки. Однако иммунотерапия часто применяется в комплексе с химиотерапией антрациклиновыми антибиотиками, в частности доксорубицином (DXR), эффекты которого на экспрессию генов РТА не изучены. Поэтому целью исследования стало изучение влияния разных концентраций доксорубицина и времени экспозиции на транскрипционный профиль 16 раково-тестикулярных (РТ) генов клеток HeLa CCL-2. В работе использовали культуру клеток человека – рак шейки матки линии HeLa CCL-2. Культивирование клеток HeLa CCL-2 проводилось в стерильных культуральных флаконах с адгезионной поверхностью и вентилируемыми крышками в условиях 5% CO₂ и 95% влажности при 37 °С в среде RPMI-1640 с 10% фетальной телячьей сывороткой при концентрации гентамицина 50 мкг/мл и различными концентрациями доксорубицина: 0 мкг/мл (контроль), 2 мкг/мл и 4 мкг/мл. Определение уровня экспрессии 16 РТ-генов проводили методом количественной RT-PCR на термоциклере Bio-Rad CFX96. Нормализацию проводили по референсному гену и экспрессии соответствующих генов в образцах контроля. Установлено, что существенное влияние на экспрессию генов *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *PRAME1* и *SYCP1* оказывает время культивирования и концентрация DXR, при этом на экспрессию *SSX2*, *MAGEA2*, *GAGE4* и *MAGEC1* эти факторы существенного влияния не оказывают, а концентрация DXR, отдельно взятая, не влияет на экспрессию *MAGEB1* и *MAGEB2*. Полученные данные по скорости ответа на воздействие DXR позволили выделить ранние РТ-гены (повышающие экспрессию – *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *NY-ESO1*, *SYCP1*, и снижающие экспрессию – *GAGE1* и *BAGE*) и поздние РТ-гены (повышающие экспрессию – *GAGE3* и *XAGE3*). Эти результаты необходимо учитывать при проведении иммунотерапии, основанной на технологии дендритно-клеточных вакцин.

Ключевые слова: раково-тестикулярные антигены, экспрессия генов, доксорубицин, HeLa

Адрес для переписки:

Кутилин Денис Сергеевич
ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский
онкологический институт» Министерства
здравоохранения РФ
344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63, корп. 8.
Тел.: 8 (863) 300-02-00 (доб. 472).
E-mail: k.denees@yandex.ru

Address for correspondence:

Kutilin Denis S.
Rostov Research Institute of Oncology
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14 Line, 63,
bldg 8.
Phone: 7 (863) 300-02-00 (add. 472).
E-mail: k.denees@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.С. Кутилин, Х.А. Могушкова «Влияние
противоопухолевых антибиотиков антрациклинового
ряда на транскрипционную активность раково-
тестикулярных антигенов в модельном эксперименте
на клеточной линии HeLa» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 539-546.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-539-546

© Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., 2019

For citation:

D.S. Kutilin, Kh.A. Mogushkova “Effect of anthracycline
antitumor antibiotics upon transcription activity of cancer-testis
antigens in model experiments with HeLa cells”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 3, pp. 539-546.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-539-546

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-539-546

EFFECT OF ANTHRACYCLINE ANTITUMOR ANTIBIOTICS UPON TRANSCRIPTION ACTIVITY OF CANCER-TESTIS ANTIGENS IN MODEL EXPERIMENTS WITH HeLa CELLS

Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Cancer-testis antigens (CTA) can be used as a target for immunotherapy of various malignant tumors, including cervical cancer. However, immunotherapy is often used in combination with anthracycline chemotherapy, in particular, doxorubicin (DXR). Their effects upon expression of CTA genes have not been yet studied. Therefore, we studied the effects of doxorubicin at different concentrations and exposure time upon transcriptional profile of 17 cancer-testicular (CT) genes of HeLa CCL-2 cells. A long-term line of human cervical cancer cells (HeLa CCL-2 line) was used in this work. Culturing of HeLa CCL-2 cells was carried out in sterile culture flasks with adhesive surface and ventilated lids at 5% CO₂ and 95% humidity at 37 °C, in RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum, supplied with gentamicin (50 µg/ml), and different concentrations of doxorubicin: 0 µg/ml (control), 2 µg/ml, and 4 µg/ml. Expression levels of 16 RT-genes were determined by quantitative RT-PCR using a Bio-Rad CFX96 thermal cycler. Normalization of results was performed against a reference gene, and expression of tested genes in the control samples. We have found that the time of *in vitro* exposure, and concentration of doxorubicin exert a significant influence upon expression of *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE*, *CTAG1B*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *PRAME1* and *SYCP1* genes, however, without affecting the *SSX2*, *MAGEA2*, *GAGE4* and *MAGEC1* expression, and DXR concentration as a single factor did not affect *MAGEB1* and *MAGEB2* expression. Time of response to DXR effects enabled us to discern early cancer testicular genes with increased expression (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *NY-ESO1*, *SYCP1*), reduced expression (*GAGE1* and *BAGE*), and late inducible testicular genes (*GAGE3* and *XAGE3*). These results must be taken into account when carrying out immunotherapy based on the dendritic-cell vaccine technology.

Keywords: cancer-testis antigens, gene expression, doxorubicin, HeLa

Раково-тестикулярные антигены (РТА) являются одной из групп опухоль-ассоциированных антигенов. Экспрессия РТА в зрелых соматических клетках практически отсутствует, а ее появление может служить молекулярным маркером малигнизации ткани [1, 4]. Иммунный ответ на РТА может быть активизирован с помощью дендритно-клеточных противоопухолевых вакцин [1, 2]. Однако иммунотерапия наиболее часто применяется в качестве дополнения к основным методам лечения опухолей – хирургическому лечению, радио- и химиотерапии [3]. К числу наиболее часто используемых химиотерапевтических средств для лечения различных видов рака относятся антрациклиновые антибиотики, которые ингибируют синтез нуклеиновых кислот, за счет интеркаляции между парами азотистых оснований, что приводит к нарушению вторичной спирализации ДНК [7, 9, 14]. Доксорубин (DXR) в настоящее время продолжает использоваться в составе химиотерапии при раке шейки матки [13], при этом его эффекты на экспрессию генов РТА и результаты последующей иммунотерапии остаются неизученными. Поэтому целью нашего исследования стала оценка влияния

разных концентраций доксорубина и времени экспозиции (культивирования клеток) на транскрипционный профиль РТА клеток HeLa CCL-2.

В работе использована культура клеток человека – рак шейки матки линии HeLa CCL-2. Культивирование клеток HeLa CCL-2 проводилось в 9 стерильных плоскодонных культуральных флаконах площадью 25 см² с адгезионной поверхностью и вентилируемыми крышками (Sarstedt, Германия). Инкубирование шло в условиях контролируемого 5% CO₂ и 95% влажности при 37 °C в мультигазовом инкубаторе CB 150 (Binder, Германия). Культивирование клеток проводилось в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) с 10% фетальной телячьей сывороткой (Thermo Scientific hyclone, США) при концентрации гентамицина 50 мкг/мл и различными концентрациями доксорубина (DXR): 0 мкг/мл (контроль), 2 мкг/мл и 4 мкг/мл (по 3 флакона). Через 1, 5 и 24 часа культивирования проводилось микроскопирование монослойной культуры с помощью инвертированного микроскопа DM IL LED Fluo (Leica, Германия) и цифровой камеры DFC365FX (Leica, Германия). После микроскопирования клеточные линии снимались с подложки флакона пу-

тем трипсинизации раствором Трипсин/Версена (Биолот, Россия). Подсчет общего количества клеток и анализ соотношения живых и мертвых клеток проводился в камере Горяева с использованием 0,4% раствора трипанового синего. После чего клеточная масса отмывалась от среды фосфатно-солевым буферным раствором Дюльбекко (DPBS) (Биолот, Россия) и осаждалась центрифугированием.

В процессе эксперимента проводилось генотипирование HeLa CCL-2 с помощью набора реактивов COOrDIS Sprint («Гордиз», Россия) и реал-тайм амплификатора (Applied Biosystems).

Суммарную РНК из образцов выделяли по методу Р. Chomczynski и N. Sacchi [8]. Для удаления следов геномной ДНК полученные образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНК-азы. Синтез кДНК проводили с использованием коммерческих наборов Reverta-L («Интерлабсервис», Россия) [5]. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1) осуществлялся нами с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST на основе следующих принципов: область отжига олигонуклеотидных праймеров должна быть в диапазоне 58–60 °С; GC-состав в диапазоне 40–60%; в последовательности праймера

должны отсутствовать стабильные вторичные структуры – шпильки и димеры, e-value последовательности праймера должно стремиться к нулю и быть не больше 0,05, а query coverage (покрытие целевой последовательности) – 100% (для версии BLASTN 2.3.1+), температуры отжига праймеров (Forward и Reverse) не должны различаться более чем на 0,50. При подборе праймеров учитывался сплайсинг мРНК (использовали опцию “Primer must span an exon-exon junction” программы Primer-BLAST) [6]. Определение относительной экспрессии 16 генетических локусов (*MAGE-A1*, *MAGE-A2*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-B1*, *MAGE-B2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGE-C1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1*, *PRAME1*) проводили методом Real-Time qPCR (референсный ген – *GAPDH*) на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США).

Полученную библиотеку кДНК амплифицировали в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25мМ каждого из dNTP, 2,5 мМ MgCl₂, 1-ый ПЦР-буфер и 1 ед. акт. SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия), краситель EVA-Green и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена (*GAPDH*) или гена-мишени. Количественную RT-PCR-

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СПЕЦИФИЧНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ

TABLE 1. SEQUENCES OF SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS

№	Название генетического локуса Name of the genetic locus	Последовательности праймеров 5'→3' Sequences of primers 5'→3'	
		Прямой Forward	Обратный Reverse
1	<i>MAGEA1</i>	GAAGGAACCTGACCCAGGC	AGGGAATCCTGTCTCTGGG
2	<i>MAGEA2</i>	CGCAGGCTCCGTGAGG	CTGTGTTGACCTGAGTCACT
3	<i>MAGEA3</i>	TGAGCAACGAGCGACGG	TCAGCCTGTCCCTCAGAA
4	<i>MAGEB1</i>	TTCAGTGTGGTGTCCAGCAG	CGAGTTGACTCCTGGATGATCT
5	<i>MAGEB2</i>	AGCCAGGGGTGAATTCTCAG	GGCACGGAGCTTACTCTTCT
6	<i>GAGE-1</i>	CTGATGGGCAGGAGATGGAC	CCAGTCTGGGCAACATAGTGA
7	<i>GAGE3</i>	TCACACAGATGAGTTGGCGA	CTGTGTGAAATATGAGTTGGCGA
8	<i>GAGE4</i>	GAGGAGGTGAAAACGCCTGA	GCATCATTTCAACGTGCCTTCT
9	<i>MAGEC1</i>	ACGAGGATCGTCTCAGGTCA	CCAGGTCTTCAACTCCTGCT
10	<i>MAGEA4</i>	CTGACCAGCAGCTTGGGAT	TCCAGGGAATCCTGTCTCC
11	<i>BAGE</i>	GCCGGCTCCTTTCAGGATT	ACATCTTTCAGGAGCTTGGTCA
12	<i>NY-ESO1</i>	TCACTGTGTCCGGCAACATA	TGATGGAGAGCTGCAGTTGG
13	<i>XAGE3</i>	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCG	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCG
14	<i>SSX2</i>	CACGGTTGGTGCTCAAATACC	CCGAGGCTTTTCATCTTTTCCC
15	<i>SYCP1</i>	CGGTGAAACCTCAGACCCT	AGTCTTTGCAAATGGAACCTCAA
16	<i>PRAME1</i>	GCTGAGCCATTGTCTCGTTC	AGGTCTCAGTCACTTGTGGCC
17	<i>GAPDH</i>	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	TGCCTTCACTTGTATTTGGA

амплификацию проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: первичная денатурация: $t = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 мин; 40 циклов: $t = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 с, $t = 58\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 с (регистрация сигнала), $t = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 с. Относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле $RE = 2^{-C_t}$ [6]. Нормализацию проводили по референсному гену *GAPDH* [1, 2, 5] и экспрессии соответствующих генов в образцах контроля, последовательно по схеме, приведенной ниже:

1. Нормализация по референсному гену:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{reference}}$$

2. Расчет среднего арифметического $\Delta C(t)$ по каждому гену для контрольной и опытной групп.

3. Нормализация по контрольной группе: $\Delta\Delta C(t) = \Delta C(t)_{\text{среднее опытной группы}} - \Delta C(t)_{\text{среднее контрольной группы}}$.

4. Окончательный результат (кратное различие): $2^{-\Delta\Delta C(t)}$

Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с повторениями (оценивалось влияние факторов А – время культивирования и Б – концентрация доксорубицина), а также Post Hoc теста (тест Newman–Keuls) в программе Statistica 8.0 (StatSoft Inc.).

Во время модельного эксперимента изменение генотипа HeLa CCL-2 не было обнаружено. Результаты генотипирования свидетельствуют о соответствии используемой клеточной линии генотипу HeLa CCL-2 (www.lgcstandards-atcc.org) и об отсутствии контаминации (табл. 2).

В ходе исследования установлено достоверное ($p < 0,001$) влияние факторов времени инкубации

(культивирования) и концентрации доксорубицина (вместе и по отдельности) на выживаемость клеток HeLa CCL-2.

При культивировании клеток HeLa с концентрацией доксорубицина 0 мкг/мл (контроль) в течение 1, 5 и 24 часов наблюдалось увеличение количества живых клеток на 3,8, 20,2 и 129,4%, соответственно, относительно изначального количества (порядка 1 млн 700 тыс.). При культивировании клеток HeLa в среде с концентрацией доксорубицина 2 мкг/мл через 1 час отсутствовал значимый прирост количества живых клеток (менее 1%), а через 5 и 24 часа наблюдалось снижение их количества на 13,1 и 35,9% соответственно. При инкубации клеток HeLa в среде с концентрацией доксорубицина 4 мкг/мл через 1 час также отсутствовал значимый прирост количества живых клеток, а через 5 и 24 часа наблюдалось снижение их количества на 35,0 и 53,0% соответственно (рис. 1А, Б, В).

Также установлено, что факторы времени инкубации клеток и концентрации DXR, вместе взятые, статистически достоверно ($p < 0,005$) влияют на экспрессию 12 из 16 (75%) исследованных генов раково-тестикулярных антигенов (PT-генов): *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *PRAME1* и *SYCP1*. При этом факторы времени инкубации клеток и концентрация DXR статистически достоверно не влияли на экспрессию генов *SSX2*, *MAGEA2*, *GAGE4* и *MAGEC1*, концентрация DXR, отдельно взятая, статистически достоверно не влияет на экспрессию генетических локусов *MAGEB1* и *MAGEB2* (влияет фактор времени инкубации, $p < 0,05$), а фактор времени инкубации не влияет на экспрессию гена *PRAME1* (влияет фактор концентрации DXR, $p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 2. STR АЛЛЕЛИ HeLa CCL-2 ИЗ БАЗЫ ДАННЫХ ATCC И STR АЛЛЕЛИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ В ДАННОМ ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 2. HeLa CCL-2 STR ALLELES FROM THE ATCC DATABASE AND THE STR ALLELES OF THE CELL LINE USED IN THIS STUDY

STR	Аллель STR HeLa CCL-2 (ATCC) HeLa CCL-2 STR allele (ATCC)	Аллель STR клеточной линии, используемой в данном исследовании STR allele of the cell line used in this study
Amelogenin	X	X
D13S317	12, 13,3	12, OL
D16S539	9, 10	9, 10
D5S818	11, 12	11, 12
D7S820	8, 12	8, 12
THO1	7	7
TPOX	8, 12	8, 12
vWA	16, 18	16, 18
CSF1PO	9, 10	9, 10

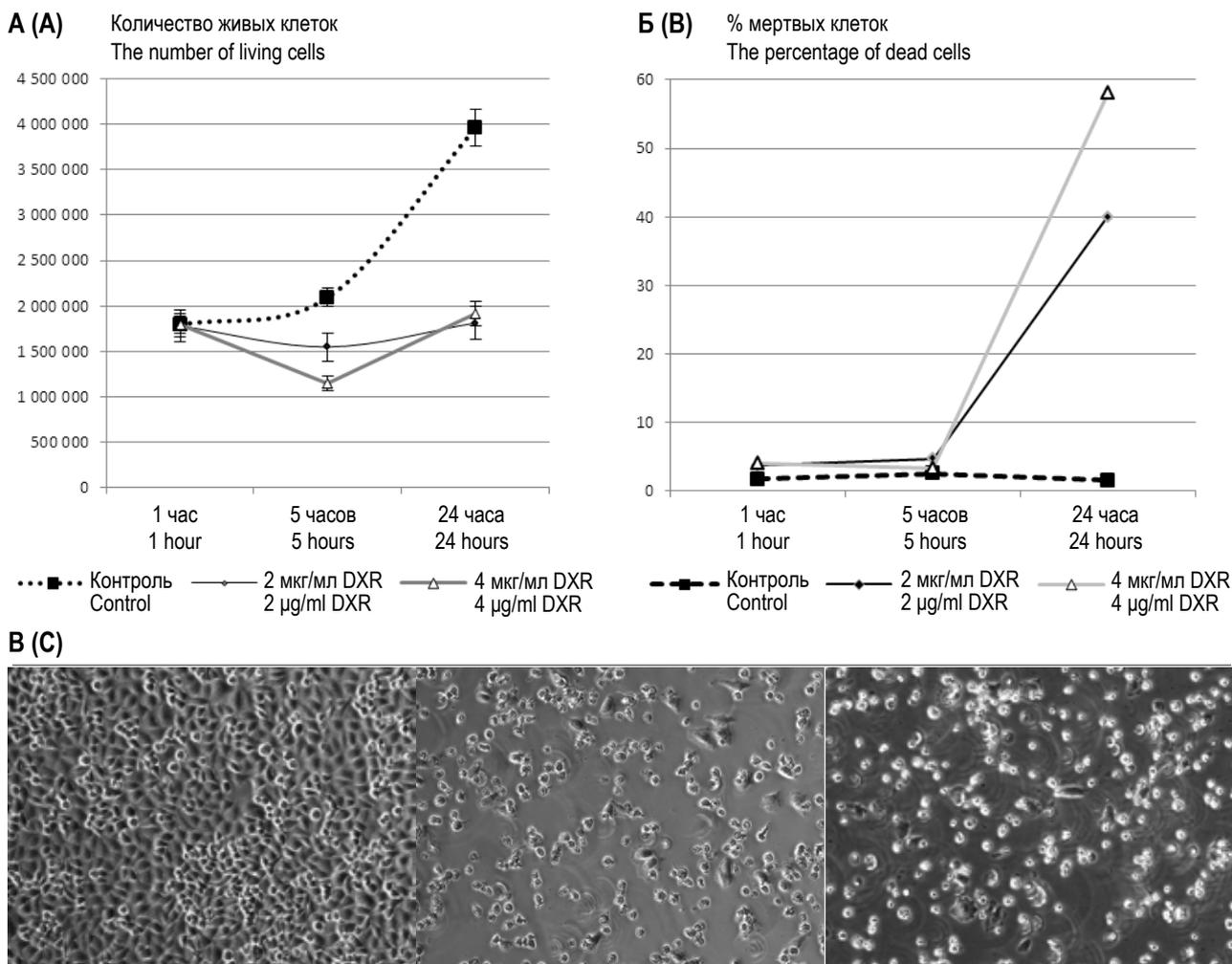


Рисунок 1. Изменение количества клеток HeLa при культивировании в течение 1, 5 и 24 часов в среде, содержащей разную концентрацию доксорубина (0, 2 и 4 мкг/мл)

Примечание. А) жизнеспособных клеток. Б) нежизнеспособных клеток (млн/мл). В) микрофотографии клеточной линии HeLa при культивировании 24 часа в среде с концентрацией доксорубина 0, 2 и 4 мкг/мл (на рисунке увеличение концентрации слева направо). Увеличение 100×. Фазовый контраст.

Figure 1. Changes in the number of HeLa cells during cultivation for 1, 5 and 24 hours in medium containing doxorubicin (0, 2 and 4 µg/ml)

Note. A) viable cells. B) non-viable cells (million/ml). C) micrographs of the HeLa cell line when cultured for 24 hours in medium with a concentration of doxorubicin 0, 2 and 4 µg/ml (in the figure the increase in concentration from left to right). An increase of 100×. Phase contrast.

Выполненное с использованием теста Newman–Keuls попарное сравнение 9 групп по 2 факторам для каждого РТ-гена выявило следующие статистически значимые отличия для $p < 0,002$ (рис. 2, 3):

1) относительно контроля (среда без DXR) через 1 час культивирования при концентрации DXR 2 мкг/мл обнаружено повышение экспрессии *MAGEA1* в 6,9 раза, *MAGEA4* в 9,1 раза, *MAGEA3* в 2,0 раза и *SYCP1* в 41,3 раза, *NY-ESO1* (2 и 4 мкг/мл DXR), а также подавление экспрессии генов *GAGE1* и *BAGE* в 2,5 и 1,4 раза соответственно (2 мкг/мл DXR);

2) относительно контроля через 5 часов культивирования обнаружена пониженная экспрессия *BAGE* в 2,0 и 1,6 раза (2 и 4 мкг/мл DXR соответственно);

3) относительно контроля через 24 часа культивирования обнаружена сниженная экспрессия *GAGE1* в 1,4 раза (2 и 4 мкг/мл DXR), *BAGE* в 2,5 и 1,3 раза (2 и 4 мкг/мл DXR) и повышенная экспрессия гена *XAGE3* в 12,4 и 3,5 раза (2 и 4 мкг/мл DXR соответственно);

4) относительно точки 1 час культивирования с доксорубином разной концентрации обнаружено снижение экспрессии РТ-генов: *MAGEA1* в 11,5 раз, *MAGEA4* в 22,8 раза, *MAGEA3* в 2,2 раза, *MAGEB1* в 8,1 раза, *BAGE* в 1,3 и *SYCP1* в 103,3 раза (2 мкг/мл DXR) через 5 часов культивирования; *MAGEA1* в 7,7 раза, *MAGEA4* в 10,1 раза, *MAGEA3* в 1,7 раза, *MAGEB1* в 20,3 раза (2 мкг/мл DXR), *MAGEB2* в 4,3 раза (4 мкг/мл DXR), *BAGE* в 1,7 раза и *SYCP1* в 45,9 раза (2 мкг/мл DXR) через 24 часа культивирования;

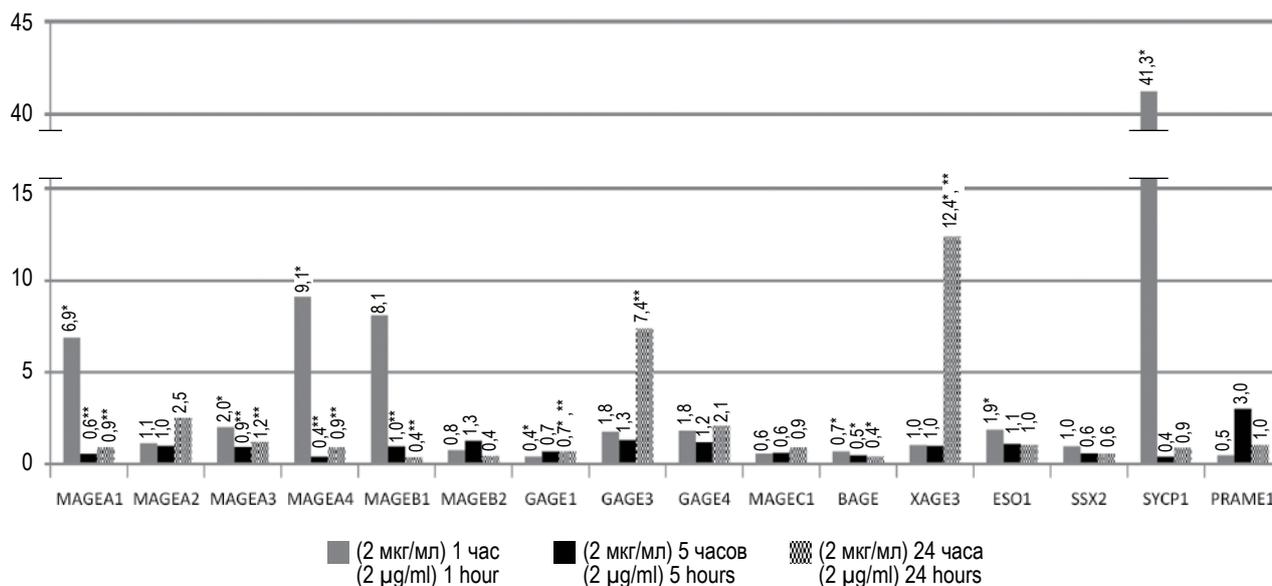


Рисунок 2. Влияние доксорубина в концентрации 2 мкг/мл среды на экспрессию РТ-генов в клетках HeLa CCL-2 при культивировании в течение 1, 5 и 24 часов

Примечание. * – статистически достоверные отличия относительно контроля; ** – статистически достоверные отличия относительно 1 часа культивирования ($p < 0,002$).

Figure 2. The effect of 2 µg/ml doxorubicin on the expression of CT-genes in HeLa CCL-2 cells during cultivation for 1, 5 and 24 hours

Note. *, statistically significant differences relative to the control; **, statistically significant differences relative to 1 hour of cultivation ($p < 0.002$).

5) относительно точки 1 час культивирования с доксорубином разной концентрации обнаружено повышение экспрессии *GAGE1* в 1,8 раза (2 мкг/мл DXR) через 24 часа, *GAGE3* в 4,1 раза (2 мкг/мл DXR) через 24 часа, *XAGE3* в 12,4 и 2,9 раза (2 и 4 мкг/мл DXR соответственно) через 24 часа культивирования (рис. 2, 3).

Таким образом, максимальное (от 6,9 до 41,3 раз) увеличение транскрипционной активности у 31% (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *ESO1*, *SYCP1*) исследованных РТ-генов наблюдается через 1 час культивирования клеток HeLa CCL-2 в среде, содержащей 2 мкг/мл доксорубина, при этом для 12% (*GAGE1*, *BAGE*) исследованных РТ-генов наблюдается снижение транскрипционной активности, а 57% исследованных РТ-генов не изменяют ее по сравнению с контролем. После 1 часа культивирования клеток HeLa CCL-2 в среде содержащей 2 мкг/мл доксорубина (5-24 часа) наблюдается снижение экспрессии 31% РТ-генов (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1* и *BAGE*), увеличение экспрессии 18% РТ-генов (*GAGE1*, *GAGE3*, *XAGE3*) и отсутствие достоверного изменения экспрессии 51% РТ-генов. При культивировании клеток HeLa CCL-2 в среде, содержащей 4 мкг/мл доксорубина, наблюдается изменение экспрессии только 31% исследованных РТ-генов, при этом менее выраженное, чем при концентрации доксорубина 2 мкг/мл. Подобный эффект, вероятно, может быть связан

с более выраженным цитотоксическим действием доксорубина (из-за продукции свободных радикалов хинона (убисемихинона) [12]) в дозе 4 мкг/мл (см. рис. 1), при этом выживают клетки, толерантные к данному антрациклиновому антибиотику. Формирование толерантных клеток при увеличении концентрации доксорубина ранее было показано в работе Tsou S.H. и соавт. [15]. За счет интеркаляции между парами азотистых оснований доксорубин ингибирует топоизомеразу II, релаксирующую суперспираль ДНК для транскрипции [11], вызывает выведение гистонов из транскрипционно-активного хроматина, в результате нарушается регуляция эпигенома и транскриптома [10]. Соответственно, разные концентрации DXR (2 и 4 мкг/мл) будут оказывать разное воздействие на транскрипционную активность генов в культуре, в зависимости от количества толерантных к данному препарату клеток.

Полученные данные позволили также сформировать группы РТ-генов по времени ответа на воздействие DXR (для 2 мкг/мл): 1) ранние РТ-гены, повышающие экспрессию (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *NY-ESO1*, *SYCP1*) и снижающие экспрессию (*GAGE1* и *BAGE*) под воздействием DXR; 2) поздние РТ-гены, повышающие экспрессию под воздействием DXR (*GAGE3* и *XAGE3*).

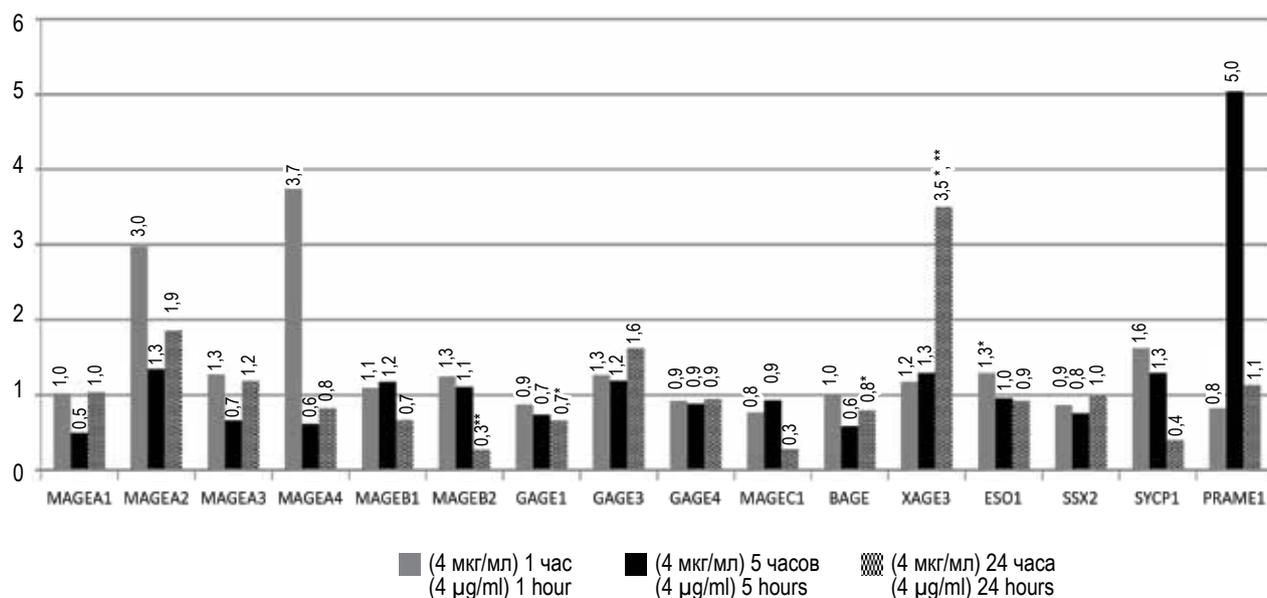


Рисунок 3. Влияние доксорубицина в концентрации 4 мкг/мл среды на экспрессию РТ-генов в клетках HeLa CCL-2 при культивировании в течение 1, 5 и 24 часов

Примечание. * – статистически достоверные отличия относительно контроля; ** – статистически достоверные отличия относительно 1 часа культивирования ($p < 0,002$).

Figure 3. The effect of 4 µg/ml doxorubicin on the expression of CT-genes in HeLa CCL-2 cells during cultivation for 1, 5 and 24 hours

Note. *, statistically significant differences relative to the control; **, statistically significant differences relative to 1 hour of cultivation ($p < 0.002$).

Существенное влияние на экспрессию РТ-генов клеточной линии HeLa CCL-2 *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE*, *CTAG1B*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *PRAME1* и *SYCP1* оказывает время культивирования и концентрация доксорубицина, при этом на экспрессию РТ-генов *SSX2*, *MAGEA2*, *GAGE4* и *MAGEC1* эти факторы существенного влияния не оказывают, а концентрация DXR, отдельно взятая, не влияет на экспрессию *MAGEB1*

и *MAGEB2*. Полученные данные также позволили сформировать следующие группы РТ-генов:

1) ранние РТ-гены, повышающие экспрессию (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *NY-ESO1*, *SYCP1*) и снижающие экспрессию (*GAGE1* и *BAGE*) под воздействием DXR;

2) поздние РТ-гены, повышающие экспрессию под воздействием DXR (*GAGE3* и *XAGE3*). Эти результаты имеют важное значение для проведения иммунотерапии, в частности для создания и применения дендритно-клеточных вакцин.

Список литературы / References

1. Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Ващенко Л.Н., Никитина В.П., Кит О.И. Транскрипционная активность раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы люминальных подтипов А и В // Современные проблемы науки и образования, 2017. № 4. [Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Vashchenko L.N., Nikitina V.P., Kit O.I. Transcriptional activity of cancer-testis antigens in patients with breast cancer of luminal subtypes A and B. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 4. (In Russ.)]
2. Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Кит О.И. Транскрипционный профиль раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 383-390. [Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Kit O.I. Transcriptional profile of cancer-testicular antigens in patients with breast cancer. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 383-390. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390.
3. Давыдов М.И., Ганцев Ш.Х. Онкология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 920 с. [Davydov M.I., Gantsev Sh.Kh. *Oncology: a textbook*. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 920 p.
4. Кит О.И., Солдатова К.И., Кутилин Д.С., Водолажский Д.И. Раково-тестикулярные антигены в диагностике опухолей толстой кишки // Современные проблемы науки и образования, 2018. № 2. [Kit O.I., Soldatova K.I., Kutilin D.S., Vodolazhsky D.I. Cancer-testis antigens in colon tumors diagnostics., *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2018, no. 2. (In Russ.)]

5. Кутилин Д.С., Бондаренко Т.И., Корниенко И.В., Михалева И.И. Влияние пептида дельта-сна на экспрессию генов антиоксидантных ферментов в мозге и крови крыс при физиологическом старении организма // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157, № 5. С. 634-637. [Kutilin D.S., Bondarenko T.I., Kornienko I.V., Mikhaleva I.I. Effect of delta sleep-inducing peptide on the expression of antioxidant enzyme genes in the brain and blood of rats during physiological aging. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 5, pp. 634-637. (In Russ.)]
6. Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Водолажский Д.И., Франциянц Е.М., Кит О.И. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком // Нефрология, 2017. № 21 (1). С. 80-86. [Kutilin D.S., Dimitriadi S.N., Vodolazhsky D.I., Frantsiyants E.M., Kit O.I. Effect of thermal ischemia-reperfusion on expression of apoptosis-regulating genes in the renal tissue of patients with renal cell carcinoma. *Nefrologiya = Nephrology*, 2017, no. 21 (1), pp. 80-86. (In Russ.)]
7. Calcagno A.M., Salcido C.D., Gillet J.P., Wu C.P., Fostel J.M., Mumau M.D., Gottesman M.M., Varticovski L., Ambudkar S.V. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2010, no. 102, pp. 1637-1652.
8. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.*, 2006, Vol. 1, no. 2, pp. 581-585.
9. Hanada M. Amrubicin, Chapter 6 in case studies in modern drug discovery and development. Eds. Huang X., Aslanian R.G. John Wiley & Sons, 2012.
10. Pang B., de Jong J., Qiao X., Wessels L.F., Neeffes J. Chemical profiling of the genome with anti-cancer drugs defines target specificities. *Nat. Chem. Biol.*, 2015, Vol. 11, no. 7, pp. 472-480.
11. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.*, 2010, Vol. 17, no. 5, pp. 421-433.
12. Rossi S. Australian Medicines Handbook. Adelaide: The Australian Medicines Handbook Unit Trust, 2013.
13. Soper J.T., Reisinger S.A., Ashbury R., Jones E., Clarke-Pearson D.L. Feasibility study of concurrent weekly cisplatin and whole abdominopelvic irradiation followed by doxorubicin/cisplatin chemotherapy for advanced stage endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group trial. *Gynecol. Oncol.*, 2004, Vol. 95, no. 1, pp. 95-100.
14. Takimoto C.H., Calvo E. Principles of oncologic pharmacotherapy in cancer management: a multidisciplinary approach. Pazdur R., Wagman L.D., Camphausen K.A., Hoskins W.J. (Eds). 11 ed., London, UK: UBM Medica, 2008, pp. 42-58.
15. Tsou S.H., Chen T.M., Hsiao H.T., Chen Y.H. A critical dose of doxorubicin is required to alter the gene expression profiles in MCF-7 cells acquiring multidrug resistance. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 1, e0116747. doi: 10.1371/journal.pone.0116747.

Авторы:

Кутилин Д.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Могушкова Х.А. — аспирант ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Kutilin D.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Mogushkova Kh.A., Postgraduate Student, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 03.09.2018

Принята к печати 03.09.2018

Received 03.09.2018

Accepted 03.09.2018