

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *LYST* И *SLFN12L* В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ЛЕГКИХ С ХРОНИЧЕСКИМ ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© 2024 г. И. Е. Малышева^{1,*}, О. В. Балан¹, Э. Л. Тихонович^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, 185910 Россия

²Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск, 185019 Россия

*e-mail: i.e.malyshева@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.04.2024 г.

После доработки 10.06.2024 г.

Принята к публикации 14.06.2024 г.

В настоящей работе изучена экспрессия генов *LYST* и *SLFN12L* в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) у больных саркоидозом легких с хроническим течением заболевания и у здоровых людей (контроль). В исследовании приняли участие 45 человек – 20 больных (без терапии, с хроническим течением саркоидоза легких (II стадия заболевания), средний возраст больных 41,00 ± 12,56 года) и 25 здоровых людей (средний возраст 45,86 ± 2,13 года). Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Установлено достоверное снижение количества транскриптов гена *SLFN12L* ($p = 0.002$) и уменьшение содержания мРНК гена *LYST* ($p = 0.09$) в ЛПК больных саркоидозом легких по сравнению с контролем. Дифференциальная экспрессия *LYST* и *SLFN12L* может свидетельствовать о вовлечении указанных генов в патогенез данного заболевания, а также о возможном участии в модулировании иммунных реакций при развитии воспалительных процессов при саркоидозе легких.

Ключевые слова: *Homo sapiens*, саркоидоз легких, лейкоциты периферической крови, ПЦР в режиме реального времени, *LYST*, *SLFN12L*, экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0016675824110096 **EDN:** WBCMAC

Саркоидоз легких (болезнь Бенье–Бека–Шуманна) относится к системным воспалительным заболеваниям неизвестной этиологии. В большинстве случаев (до 90%) эпителиоидно-клеточные гранулемы (характерный признак заболевания) образуются в легких. В дальнейшем они могут рассасываться или претерпевать фиброзные изменения, что может способствовать развитию дыхательной недостаточности [1, 2]. Разнообразие клинических проявлений и вариантов течения заболевания, а также отсутствие конкретного диагностического критерия сопряжено с определенными трудностями диагностики саркоидоза легких [3]. В связи с этим актуальным является поиск молекулярно-генетических маркеров для ранней диагностики и разных вариантов течения заболевания. В развитии данного заболевания важную роль играют средовые, иммунологические, генетические факторы [4]. Генетическая составляющая в патогенезе саркоидоза легких имеет немаловажное значение, о чем свидетельствует более частое возникновение заболевания в определенных расовых и этнических группах, а также более высокая

распространенность саркоидоза среди родственников первой степени родства [5, 6].

В последние годы проведены комплексные исследования по анализу данных секвенирования метиома, транскриптома, миРНК у больных саркоидозом. В результате было выявлено множество новых генетических локусов и генов предрасположенности к саркоидозу, что указывает на сложные генетические и патофизиологические механизмы развития этого заболевания [7]. I. Konigsberg с соавт. [8], анализируя метиом и транскриптом (в частности миРНК в клетках бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) больных саркоидозом), установили молекулярные изменения, связанные с развитием и прогрессированием заболевания. Выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены, такие как *LYST*, *SLFN12L* и др. [8]. Согласно данным литературы, ген *LYST* (также известный как *CHS1*) кодирует белок-регулятор лизосомального гомеостаза, участвующий в транспорте везикул, слияний их с лизосомами и высвобождении лизосомальных ферментов, а также в сохранении количества

Таблица 1. Последовательность праймеров для ПЦР-РВ

Ген (№ в NCBI)	Праймер	Последовательность праймера 5'-3'	Источник
<i>18sRNA</i> (NR_145819.1)	Прямой	agaaacggctaccacatcca	[15]
	Обратный	caccagacttgccctcca	
<i>RPL19</i> (NM_000981.4)	Прямой	aatcgccaaatgccaactc	Собственный дизайн
	Обратный	ccttccgcttacctatgc	
<i>LYST</i> (NM_000081.4)	Прямой	caaagggagtgtggatttc	Собственный дизайн
	Обратный	caatagtgtgtggctcgc	
<i>SLFN12L</i> (NM_001363830.2)	Прямой	tctccagttatcaccaggcca	Собственный дизайн
	Обратный	tgttcctgcgttcatccctcc	
<i>LC3B2</i> (NM_001085481.3)	Прямой	cggtgataatagaacgatacaagg	Собственный дизайн
	Обратный	ctgagattgggtgtggagacg	
<i>p53</i> (NM_000546.6)	Прямой	cgtcagaaggccaggact	[16]
	Обратный	catccctcccccacaacaa	
<i>ATG5</i> (NM_004849.4)	Прямой	ttcctggagtctgttacc	Собственный дизайн
	Обратный	atctttgtcatctgtcattttcc	

лизосом после аутофагии [9, 10]. В результате мутаций в гене *LYST* нарушается формирование внутриклеточных гранул в различных клетках. Так, при синдроме Чедиака–Хигаши (редкое иммунодефицитное аутосомно-рецессивное заболевание), дефектный лизосомальный транспорт в нейтрофилах приводит к образованию в клетках гигантских гранул. При этом происходит снижение хемотактических реакций и способность этих клеток к внутриклеточному уничтожению бактерий [11]. Наряду с *LC3B2* и *ATG* ген *LYST* может рассматриваться как маркер аутофагии. Важную роль в процессах апоптоза, а также в дифференцировке иммунных клеток и иммунной регуляции играют белки, кодируемые генами семейства *Schlafen* (*SLFN*) [12]. Так, повышение содержания *SLFN12* блокирует процессы трансляции и активирует апоптоз. Высокая экспрессия этого гена отмечена в моноцитах, а *SLFN5* – в Т-лимфоцитах первичных культур клеток человека [13]. В клетках БАЛ у больных саркоидозом регистрируется дифференциальная экспрессия гена *SLFN12L* [8]. Сведения о том, как изменяется уровень экспрессии указанных генов в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) больных при развитии саркоидоза легких II стадии (которая наиболее часто рентгенологически диагностируется у большей части больных [14]), могут иметь важное значение для изучения патогенетических механизмов развития и прогрессирования саркоидоза легких.

В настоящем исследовании проведена оценка уровня экспрессии генов *LYST*, *SLFN12L* в ЛПК у

больных саркоидозом легких с хроническим течением заболевания (II стадия заболевания), без терапии, а также у здоровых людей (контроль). Было обследовано 45 человек – 20 больных (без терапии, с хроническим течением саркоидоза легких (II стадия заболевания), средний возраст больных $41,00 \pm 12,56$ года) и 25 здоровых людей (средний возраст $45,86 \pm 2,13$ года). Диагноз «саркоидоз легких» установлен в соответствии с критериями на основе клинико-рентгенологических и лабораторных изменений. Саркоидоз у всех пациентов (100%) был верифицирован гистологически на основании исследования биоптата. Больные саркоидозом легких со стабильным течением при отсутствии активности данного заболевания находились без терапии и не получали других видов лечения на момент проведения исследования.

Длительность наблюдения больных саркоидозом легких – от 1 года до 12 лет. До проведения исследований было получено информированное письменное согласие от всех пациентов. Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, выраженные нарушения функции внутренних органов, а также перенесенные в последний месяц инфекционные заболевания, курение табака, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела ≥ 30 кг/м. Работа была выполнена с соблюдением этических норм согласно критериям Всемирной ассоциации медицинских редакторов (The World Association of Medical Editors – WAME) и одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская

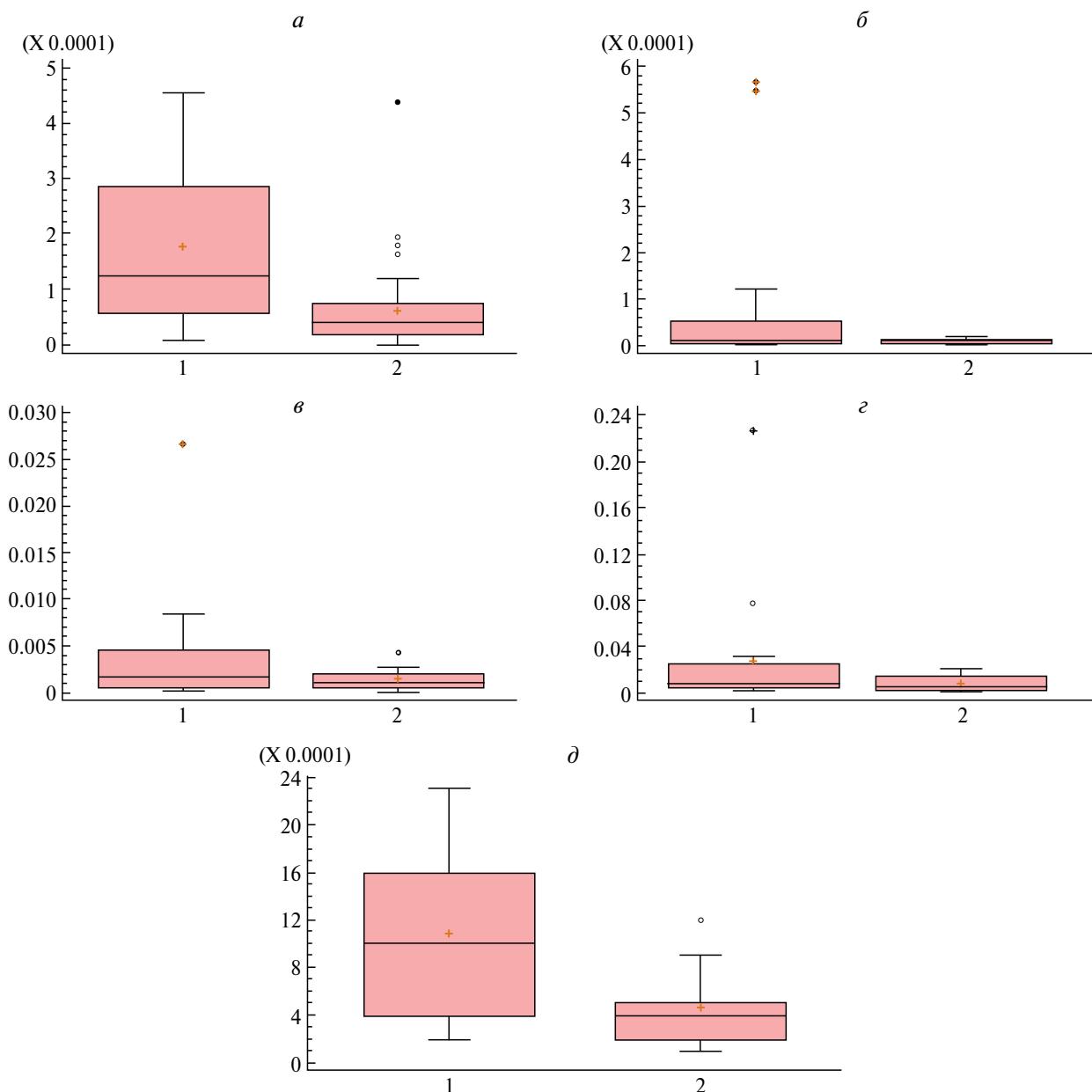


Рис. 1. Уровень экспрессии генов *SLFN12L* (*a*), *LYST* (*b*), *LC3B2* (*c*), *p53* (*d*) и *ATG5* (*e*) в ЛПК условно здоровых доноров (1) и пациентов с саркоидозом легких (2). Горизонтальные линии внутри прямоугольников – медиана, • – среднее значение.

больница им. В.А. Баранова» г. Петрозаводска, протокол № 165 от 02.11.2023 г. Образцы венозной крови использовали в качестве материала для исследования. Пробы периферической крови в исследуемых группах людей были взяты в утренние часы (8.00), натощак.

Из лейкоцитов периферической крови выделяли тотальную РНК, используя реагент для выделения РНК PureZol (Bio-Rad). Синтез кДНК осуществляли с помощью набора MMLV RT kit («ЕвроГен», Россия). Уровень экспрессии генов *LYST*,

SLFN12L, а также *LC3B2*, *p53* и *ATG5* в ЛПК оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием наборов qPCRmix-HS SYBR («ЕвроГен», Россия). В качестве референсных генов были выбраны *18sRNA* и *RPL19*. ПЦР-РВ для каждого образца проводили не менее трех раз. Конструирование праймеров осуществляли в программе Beacon Designer 5.0. Нуклеотидная последовательность праймеров представлена в табл. 1.

Статистическая обработка данных проведена в программе StatGraphics Centurion XVI (версия 16.1.11). Достоверность различий уровня транскриптов гена между группами оценивали с помощью непараметрического критерия *U* Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП ФИЦ КАРНЦ РАН.

Результаты исследований представлены на рис. 1. На фоне хронического течения саркоидоза легких в ЛПК пациентов, не находящихся на противовоспалительной терапии, отмечается статистически значимое снижение уровня экспрессии *SLFN12L*, сопровождающееся уменьшением уровня мРНК гена *p53*. Экспрессия генов *LYST* и *LC3B2* (маркера уровня аутофагии) также была снижена и сопровождалась статистически значимым уменьшением уровня мРНК гена *ATG5*. Кроме того, положительная тесная связь выявлена между экспрессией *LYST* и *ATG5*, коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил 0,56 ($p = 0,0001$).

Повышенный уровень экспрессии исследуемых генов в ЛПК больных саркоидозом легких, вероятно, свидетельствует об их вовлечении в патогенез данного заболевания. Возможно, кодируемые генами *LYST* и *SLFN12L* белковые продукты вовлечены в модулирование иммунных процессов, которые, в свою очередь, могут вносить определенный вклад в развитие воспаления [17] и фибропролиферативные нарушения при саркоидозе легких посредством снижения активности аутофагии. Наблюдаемые изменения уровня экспрессии исследуемых генов в ЛПК больных саркоидозом легких с хроническим развитием заболевания II стадии можно использовать для изучения патогенетических механизмов.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра Российской академии наук (тема FMEN-2022-0017 12203100099-1).

Исследование одобрено Этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» г. Петрозаводска, протокол № 165 от 02.11.2023 г.

Все процедуры, выполненные в ходе исследования с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников или их законных представителей было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Саркоидоз / под ред. А. А. Визеля. М.: Атмосфера, 2010. 30 с.
2. *Baughman R. P., Culver D. A., Judson M. A.* A concise review of pulmonary sarcoidosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011. V. 183. № 5. P. 573–581. DOI: 10.1164/rccm.201006-0865CI
3. *Lynch J. P., Ma Y. L., Koss M. N., White E. S.* Pulmonary sarcoidosis // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007. V. 28. № 31. P. 53–74. DOI: 10.1055/s-2007-970333
4. *Patterson K. C., Chen E. S.* The pathogenesis of pulmonary sarcoidosis and implications for treatment // *CHEST*. 2018. V. 153. № 6. P. 1432–1442. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00778.x
5. *McDougal K., Fallin M., Moller D. et al.* Variation in the lymphotoxin-alpha/tumor necrosis factor locus modifies risk of erythema nodosum in sarcoidosis // *J. Invest. Dermatol.* 2009. V. 129. № 8. P. 1921–1926. DOI: 10.1038/jid.2008.456
6. *Terwiel M., van Moorsel C. H. M.* Clinical epidemiology of familial sarcoidosis: A systematic literature review // *Respir. Med.* 2019. V. 149. P. 36–41.
7. *Hocavar K., Maver A., Kunej T., Peterlin B.* Sarcoidosis related novel candidate genes identified by multi-omics integrative analyses // *OMICS*. 2018. V. 22. № 5. P. 322–331. DOI: 10.1089/omi.2018.0027
8. *Konigsberg I. R., Lin N. W., Liao S. Y. et al.* Multi-omic signatures of sarcoidosis and progression in bronchoalveolar lavage cells // *bioRxiv*. 2023. DOI: 10.1101/2023.01.26.525601
9. *Ji X., Chang B., Naggert J. K., Nishida P. M.* Lysosomal trafficking regulator // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 854. P. 745–750. DOI: 10.1007/978-3-319-17121-0_99
10. *Lattao R., Rangone H., Llamazares S. et al.* Mauve/*LYST* limits fusion of lysosome-related and promotes centrosomal recruitment of microtubule nucleating proteins // *Dev. Cell*. 2021. V. 56. № 7. P. 1000–1013. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.02.019
11. *Silva L. M., Brenchley L., Moutsopoulos N. M.* Primary immunodeficiencies reveal the essential role of tissue neutrophils in periodontitis // *Immunol. Rev.* 2019. V. 287. № 1. P. 226–235. DOI: 10.1111/imr.12724
12. *Jo U., Pommier Y. S.* Structural, molecular, and functional insights into *Schlafen* proteins // *Exp. Mol. Med.* 2022. V. 54. № 6. P. 730–738. DOI: 10.1038/s12276-022-00794-0
13. *Puck A., Aigner R., Modak M. et al.* Expression and regulation of *Schlafen* (SLFN) family members in primary human monocytes, monocyte-derived dendritic cells and T-cells // *Res. Immunol.* 2015. V. 5. P. 23–32.

14. Criado E., Sánchez M., Ramírez J., et al. Pulmonary sarcoidosis: Typical and atypical manifestations at high-resolution CT with pathologic correlation // *RadioGraphics*. 2010. V. 30(6). P. 1567–1586.
DOI: 10.1148/radiographics.306105512
15. Pinto J., Dias V., Zoller H. et al. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes // *Immunology*. 2010. V. 130 № 2. P. 217–230.
DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x
16. Zhang F., Sriram S. Identification and characterization of the interferon- β -mediated p53 signal pathway in human peripheral blood mononuclear cells // *Immunology*. 2009. V. 128. Pt. 2. P. e905–e918.
DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03104.x
17. Pang Y., Wu L., Tang C. et al. Autophagy-inflammation interplay during infection: Balancing pathogen clearance and host inflammation // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13.
DOI: 10.3389/fphar.2022.832750

Expression of the *LYST* and *SLFN12L* Genes in Peripheral Blood Leukocytes in Patients with Chronic Pulmonary Sarcoidosis

I. E. Malysheva^{1,*}, O. V. Balan¹, E. L. Tikhonovich^{1, 2}

¹*Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia*

²*Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, 185019 Russia*

*e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

The expression of the *LYST* and *SLFN12L* genes in peripheral blood leukocytes (PBL) in patients with pulmonary sarcoidosis with a chronic course of the disease and in healthy people was studied in this work. Patients with chronic pulmonary sarcoidosis, on the second stage of the disease (20 people without therapy, average age of whom was 41.00 ± 12.56 years) and 25 healthy people (average age was 45.86 ± 2.13 years) were enrolled in this study. The level of gene expression was determined by real-time PCR. A significant decrease in the transcripts of the *SLFN12L* gene ($p = 0.002$) and a low content of mRNA of the *LYST* gene ($p = 0.09$) in the PBL of patients with pulmonary sarcoidosis compared to healthy people was established. Differential expression of *LYST* and *SLFN12L* may indicate the involvement of these genes in the pathogenesis of this disease, and it is possible they participate in the modulation of immune reactions during the development of inflammatory processes in pulmonary sarcoidosis.

Keywords: *Homo sapiens*, pulmonary sarcoidosis, peripheral blood leukocytes, real-time PCR, *LYST*, *SLFN12L*, gene expression.