

УДК 577.19

Липополисахарид-индуцированное острое повреждение легких: анализ особенностей развития и возможность подавления аптамером к TNF- α

А. В. Сенькова*, И. А. Савин, Е. Л. Черноловская, А. С. Давыдова, М. И. Мещанинова, А. Бишани, М. А. Воробьева, М. А. Зенкова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: alsenko@mail.ru

Поступила в редакцию 22.03.2024

Принята к печати 15.04.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27393

РЕФЕРАТ Острое повреждение легких (ОПЛ) является специфической формой воспаления, которое характеризуется диффузным повреждением альвеол, некардиогенным отеком легких, а также легочным и системным воспалением. Патогенез ОПЛ включает развитие каскадной воспалительной реакции, сопровождающейся подъемом уровней провоспалительных цитокинов и хемокинов на локальном и системном уровне. Разработка молекулярно-генетических инструментов, направленных на ключевые компоненты цитокинового сигналинга в качестве мишени, представляется перспективным подходом к терапии ОПЛ. В работе проанализированы особенности развития липополисахарид (ЛПС)-индуцированного ОПЛ у мышей, а также возможность его подавления аптамером к провоспалительному цитокину TNF- α . Показано, что уровень TNF- α резко повышается и остается стабильно высоким при развитии ОПЛ, а морфологические признаки воспаления в дыхательной системе мышей, вызванные ЛПС, наиболее выражены через 24 ч после индукции. Интраназальное введение мышам с ОПЛ аптамера к TNF- α , конъюгированного с полиэтиленгликолем 40 кДа (PEG-aptTNF- α), вызывало уменьшение интенсивности воспалительных изменений в ткани легких. Оценка уровней потенциальных генов-мишеней TNF- α (*Usp18*, *Traf1*, *Tnfrsf25*) показала повышение их экспрессии в легких при развитии ОПЛ и снижение – при введении PEG-aptTNF- α . Таким образом, топическое использование аптамеров, направленных к TNF- α , может служить эффективным инструментом терапии ОПЛ и других воспалительных заболеваний легких.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА острое повреждение легких, провоспалительные цитокины, аптамерные конструкции, гены-мишени.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОПЛ – острое повреждение легких; ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром; TNF- α – фактор некроза опухоли альфа; aptTNF- α – аптамер к TNF- α ; PEG – полиэтиленгликоль; ЛПС – липополисахарид; БАЛЖ – бронхоальвеолярная жидкость.

ВВЕДЕНИЕ

Острое повреждение легких (ОПЛ), а также его последствие – острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) – являются специфической формой воспаления легких, которое характеризуется диффузным повреждением альвеол, некардиогенным отеком легких, а также легочным и системным нейтрофил-ассоциированным воспалением [1, 2]. Этиологическими факторами ОПЛ и ОРДС могут быть различные стимулы и заболевания, такие, как бактериальные и вирусные пневмонии [3, 4], механическая вентиляция [5, 6], воздействие хи-

микатов [7, 8], острая травма головного мозга [9], сепсис [10, 11], острый панкреатит [12] и многие другие патологии. В последние годы рост показателей заболеваемости и смертности от ОПЛ/ОРДС связан с пандемией новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной коронавирусом, ассоциированным с тяжелым острым респираторным дистресс-синдромом (SARS-CoV-2) [13, 14]. Патогенез ОПЛ/ОРДС включает развитие местной и системной каскадной воспалительной реакции, сопровождающейся подъемом уровней провоспалительных цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β , GM-CSF, G-CSF)

и хемокинов (CXCL10/IP10, MIP-1 α , CCL2), вплоть до критических значений, приводящих к развитию полиорганной недостаточности [14–16].

В настоящее время терапия ОРДС и сопутствующих ему иммунных нарушений в основном симптоматическая, направлена на облегчение симптомов и часто включает механическую вентиляцию легких и введение кортикостероидных гормонов. Перспективным подходом к лечению указанной патологии может быть использование молекулярно-генетических инструментов, направленных на ключевые цитокины в качестве мишени. Одним из таких инструментов являются моноклональные антитела к TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ и другим компонентам цитокинового сигналинга [17, 18]. Олигонуклеотидные аптамеры представляют собой другой класс биомолекул, селективно узнающих мишень, которые в настоящее время рассматриваются в качестве потенциальной альтернативы антителам для создания таргетных терапевтических средств. От антител аптамеры выгодно отличаются воспроизводимый химический синтез и стабильность ключевых характеристик, возможность введения в их состав дополнительных химических модификаций для регуляции времени жизни аптамера в организме с сохранением его сродства к молекуле-мишени [19, 20]. Важно отметить, что по своей природе аптамеры являются нуклеиновыми кислотами, что позволяет дополнительно регулировать их функциональную активность, используя комплементарный олигонуклеотид-антидот [21, 22]. Такой набор свойств вызывает интерес к использованию аптамеров для подавления активности растворимых сывороточных белков, в том числе ассоциированных с воспалением [23, 24].

В настоящей работе проанализированы особенности развития ЛПС-индуцированного ОПЛ у мышей, а также возможность его подавления аптамером к провоспалительному цитокину TNF- α . Показано, что TNF- α является ключевым игроком в развитии ОПЛ, а интраназальное введение мышам с ОПЛ

аптамера к TNF- α , конъюгированного с полиэтиленгликолем 40 кДа (PEG-aptTNF- α), подавляет развитие воспаления в дыхательной системе экспериментальных животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез ДНК-аптамера к TNF- α и контрольного олигонуклеотида

Нуклеотидные последовательности олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе, представлены в *табл. 1*. Контрольный неаптамерный олигонуклеотид со случайной последовательностью был сгенерирован на основе ДНК-аптамера aptTNF- α с использованием сервиса (<https://www.gensm/tools/create-scrambled-sequence>).

Олигонуклеотиды были синтезированы твердофазным фосфитамидным методом в масштабе 0.4 мкмоль на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 («Биоссет», Россия) по протоколу, оптимизированному для данного прибора, с использованием β -цианэтил-N,N-диизопропилфосфитаминов 5'-N-защищенных 2'-дезоксирибонуклеозидов (Glen Research, США). В качестве полимерного носителя использовали стеклянные частицы CPG (controlled pore glass) с диаметром пор 500 Å с присоединенным через 5'-гидроксильную группу 3'-O-диметокситритилтимидином (Glen Research). Олигонуклеотиды, содержащие на 5'-конце остаток аминоксанола, синтезировали с использованием коммерчески доступного модификатора 6-(трифторацетиламино)-гексил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфитамида (Glen Research). После синтеза олигонуклеотиды отделяли от носителя и удаляли защитные группы обработкой 40% водным раствором метиламина (300 мкл) в течение 15 мин при 65°C. Полностью деблокированные олигонуклеотиды очищали методом препаративного электрофореза в денатурирующем 15% полиакриламидном геле (ПААГ).

Таблица 1. ДНК-аптамер к TNF- α , неаптамерный скрамблированный олигодезоксирибонуклеотид и их конъюгаты с PEG

Аптамер	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'
PEG-aptTNF- α	PEG-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCG CCA CTA CAG GGG AGC TGC CAT TCG AAT AGG TGG GCC GCT _{inv}
aptTNF- α	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCG CCA CTA CAG GGG AGC TGC CAT TCG AAT AGG TGG GCC GCT _{inv}
PEG-Scr	PEG-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGA GGC GGT ATG ACC AGG CTA ATC GGC CGA GCC TCC GTG CGT _{inv}
Scr	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGA GGC GGT ATG ACC AGG CTA ATC GGC CGA GCC TCC GTG CGT _{inv}

PEG – остаток полиэтиленгликоля 40 кДа; T_{inv} – 3'-концевой остаток тимидина, соединенного с соседним нуклеотидом 3'-3'-фосфодиэфирной связью.

Синтез конъюгатов с полиэтиленгликолем 40 кДа

Для синтеза пегилированных конъюгатов к раствору 5'-аминомодифицированного олигонуклеотида (0.1 мкмоль) в 0.1 М тетраборатном буфере (рН 9.5) добавляли раствор 1 мкмоль N-гидроксисукцинимидного эфира линейного полиэтиленгликоля (PEG) с молекулярной массой 40 кДа (Sigma-Aldrich, США) в диметилформамиде (Sigma-Aldrich). Реакционную смесь инкубировали при перемешивании при 25°C в течение 16 ч. Полученные конъюгаты очищали от избытка реагентов с помощью электрофореза в денатурирующем 12% ПААГ с последующей элюцией водой и концентрированием с использованием ультрацентрифужных модулей Amicon 10K (Merck, США). Очищенные конъюгаты перед введением животным стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

Лабораторные животные

В работе использовали 6–8-недельных мышей-самок линии Balb/C разведения вивария Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных содержали по шесть особей в клетке в хорошо освещенном помещении. Мыши имели свободный доступ к еде и воде. Все процедуры с животными проводили в соответствии с рекомендациями по правильному использованию и уходу за лабораторными животными (Директива ЕС 2010/63/ЕС). Эксперименты на животных одобрены межинститутской Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) (протокол № 56 от 10.08.2019 г.).

ЛПС-индуцированное острое повреждение легких

Острое повреждение легких (ОПЛ) у мышей индуцировали путем интраназального (и/н) введения ЛПС (055:B5, Sigma-Aldrich) в дозе 10 мкг/мышь под изофлюрановой анестезией. В эксперименте по исследованию динамики воспалительных изменений в дыхательной системе мышей выводили из эксперимента через 6, 16 и 24 ч после индукции и производили забор бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ), сыворотки крови и ткани легких для последующего анализа. В эксперименте по исследованию противовоспалительной активности аптамеров к TNF- α мышам через 1 ч после индукции ОПЛ и/н вводили аптамер aptTNF- α в дозе 1 мг/кг или его конъюгат PEG-aptTNF- α в дозах 1 и 5 мг/кг. Мышей с ОПЛ без лечения и получавших соответствующие скрамблированные олигонуклеотиды (Scr в дозе 1 мг/кг и PEG-Scr в дозах 1 и 5 мг/кг) использова-

ли в качестве контроля. Все препараты вводили и/н в 50 мкл физиологического раствора под изофлюрановой анестезией. Мышей выводили из эксперимента через 24 ч после индукции и производили забор материала (БАЛЖ и ткань легких) для последующего анализа. Всего было по шесть мышей в каждой группе.

Анализ бронхоальвеолярной жидкости

Легкие мышей из контрольных и экспериментальных групп промывали 1 мл холодного физиологического раствора. Собранную БАЛЖ центрифугировали на 1500 об/мин в течение 10 мин при 4°C, супернатант собирали для иммуоферментного анализа (ИФА). Осадок клеток ресуспендировали в 50 мкл физиологического раствора и определяли общее число лейкоцитов ($\times 10^5$ клеток/мл) в камере Горяева после разбавления раствором Тюрка в соотношении 1 : 20.

Оценка уровня провоспалительных цитокинов методом ИФА

Уровни провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 определяли в образцах БАЛЖ с помощью наборов для проведения ИФА (#BMS607-3 и #KMC0061, Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Абсорбцию измеряли на длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра Multiscan RC (Thermo LabSystems, Финляндия).

Оценка профиля цитокинов

Для оценки уровня провоспалительных цитокинов и хемокинов в БАЛЖ использовали LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) (Biolegend, США) в соответствии с инструкцией производителя и проточный цитометр NovoCyte 3000 (ACEA Bioscience, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Legendplex online software.

Гистология

Ткань легких фиксировали в 10% забуференном формалине, дегидратировали в растворах этанола и ксилола восходящей концентрации и заключали в парафин HISTOMIX. Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм нарезали на микротоме Microm HM 355S и окрашивали гематоксилином и эозином. Все гистологические препараты были исследованы и отсканированы с помощью микроскопа AxioStar Plus с цифровой камерой AxioCam MRc5 на увеличении $\times 200$.

Оценку интенсивности воспалительных изменений в легких проводили полуколичественным методом с использованием следующей шкалы: 0 – патологические изменения отсутствуют, 1 – воспаление вы-

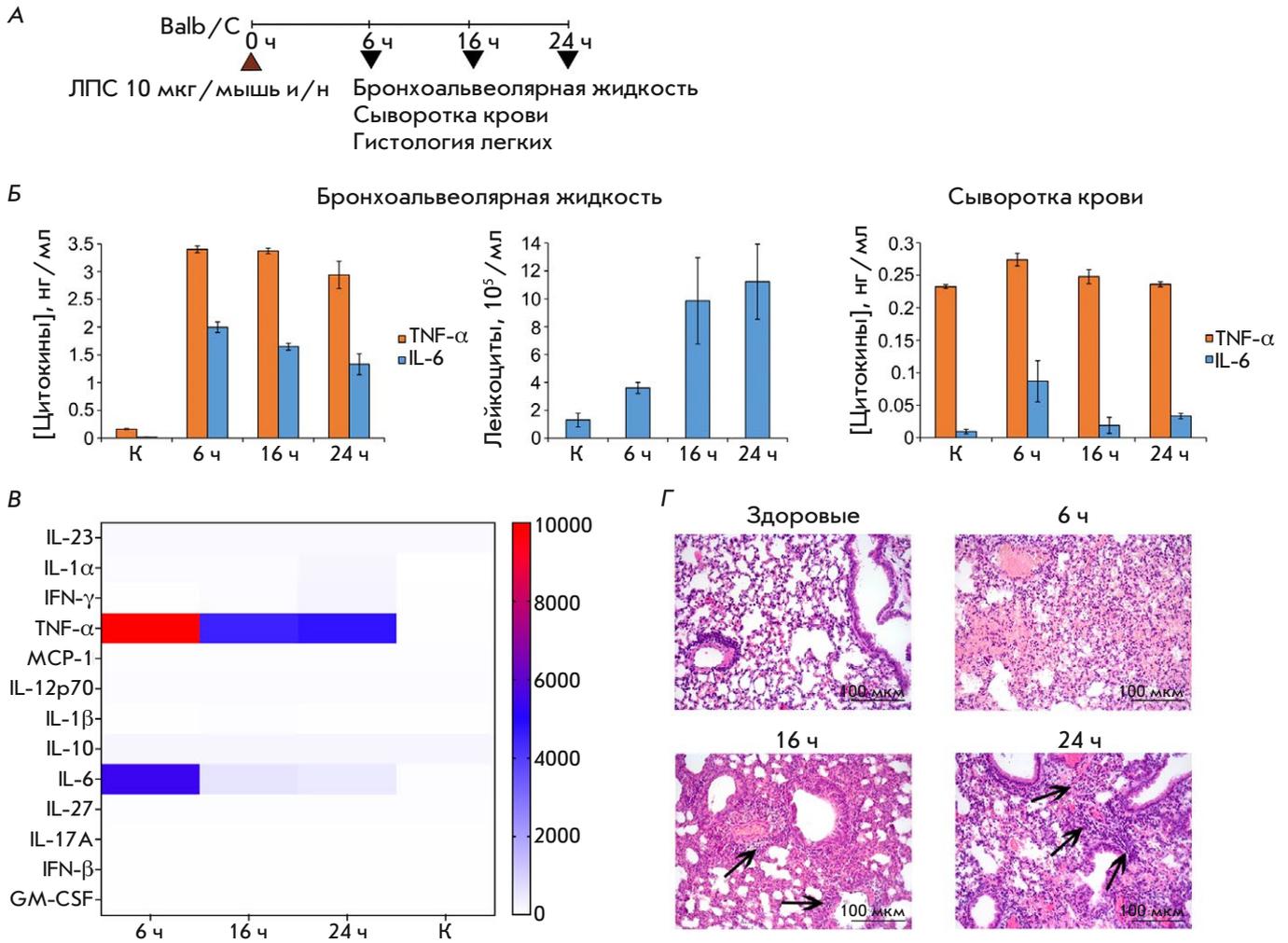


Рис. 1. Цитокиновый профиль и воспалительные изменения в дыхательной системе мышей с ЛПС-индуцированным острым повреждением легких в динамике. **А** – схема эксперимента. У мышей линии Balb/C индуцировали острое повреждение легких (ОПЛ) путем интраназального (и/н) введения ЛПС (10 мкг/мышь). Забор материала проводили через 6, 16 и 24 ч после индукции. **Б** – уровни провоспалительных цитокинов (TNF- α и IL-6) и общее число лейкоцитов в БАЛЖ, а также уровни TNF- α и IL-6 в сыворотке крови мышей с ОПЛ через 6, 16 и 24 ч после индукции. **В** – цитокиновый профиль БАЛЖ мышей с ОПЛ в динамике, оцененный с помощью мультиплексного ИФА. Данные приведены в виде пг/мл. **Г** – гистологический анализ ткани легких мышей с ОПЛ через 6, 16 и 24 ч после индукции. Окр. гематоксилином и эозином, ув. $\times 200$. Черными стрелками обозначена воспалительная инфильтрация. К – контроль (здоровые животные)

значимое повышение только двух провоспалительных цитокинов: TNF- α и IL-6. Причем уровень TNF- α оставался высоким на протяжении всего периода наблюдения, тогда как уровень IL-6 снижался уже через 16 ч после индукции (рис. 1Б). Уровни остальных цитокинов (IL-23, IL-1 α , IFN- γ , MCP-1, IL-12p70, IL-1 β , IL-10, IL-27, IL-17A, IFN- β , GM-CSF) не изменялись.

Гистологический анализ ткани легких мышей с ОПЛ показал, что введение ЛПС вызывает развитие патологических изменений в дыхательной

системе, представленных воспалительной гранулоцитарной инфильтрацией, деструктивными (десквамация альвеолярного эпителия) и дисциркуляторными (венозное полнокровие, отек и кровоизлияния) нарушениями (рис. 1Г). Следует отметить, что на разных сроках наблюдения степень выраженности данных изменений была различной: через 6 ч после индукции преобладали изменения, связанные с нарушением кровообращения, через 16 ч появлялись начальные признаки миграции клеток к очагу воспаления, тогда как к 24 ч воспали-

тельная инфильтрация в ткани легких была полностью сформирована, локализуясь преимущественно вокруг сосудов и бронхов (рис. 1Г).

Таким образом, определение динамики воспалительных изменений и цитокинового профиля мышцей с ОПЛ показало, что именно TNF- α остается на стабильно высоком уровне на протяжении всего периода наблюдения, свидетельствуя о важной роли данного цитокина в сигнальных путях воспалительного ответа. Морфологические признаки воспаления, вызванные ЛПС в дыхательной системе мышцей, были наиболее выражены через 24 ч после индукции, делая данный временной интервал оптимальным для оценки противовоспалительной активности исследуемых конструкций.

Выбор и синтез ДНК-аптамера к TNF- α

На данный момент опубликовано несколько нуклеотидных последовательностей РНК- и ДНК-аптамеров, способных специфично связывать TNF- α [25]. Большинство из них обладают сродством к белку-мишени в наномолярном диапазоне и способны ингибировать функциональную активность TNF- α *in vitro*. Для исследования был выбран ДНК-аптамер aptTNF- α , который, как показано ранее, обладает способностью подавлять развитие воспаления в *in vivo* моделях острого повреждения легких и печени при его внутривенном или интратрахеальном введении [26]. Общая длина этого аптамерного олигонуклеотида составляет 41 нуклеотид, что делает его химический синтез достаточно быстрым и экономичным (последовательность aptTNF- α приведена в табл. 1). В качестве аналогичной неаптамерной ДНК для контроля специфичности действия аптамера использовали скрамблированный олигонуклеотид той же длины и нуклеотидного состава. Противовоспалительная активность бивалентных аптамеров *in vivo*, в которых два аптамерных модуля ковалентно соединены остатком полиэтиленгликоля 20 кДа, была показана ранее [26]. В нашей работе мы выбрали другую стратегию химической модификации аптамера для увеличения времени его жизни в организме животных и использовали модификации, которые в настоящее время являются практически «золотым стандартом» для аптамеров, предназначенных для экспериментов *in vivo* или клинических исследований [27, 28]. На 3'-конец для защиты от экзонуклеазного гидролиза был введен дополнительный остаток тимидина, присоединенный 3'-3'-фосфодиэфирной связью, для чего при твердофазном синтезе олигонуклеотидов использовали коммерчески доступный полимерсвязанный 3'-О-диметокситритилтимидин, а на 5'-конец вводили полиэтиленгликоль (PEG) с молекулярной

массой 40 кДа для улучшения фармакокинетических характеристик аптамера при его топической доставке в дыхательную систему мышцей.

Таким образом, предложенный нами вариант аптамерной конструкции обеспечивает более контролируемый синтез и выделение пегилированного конъюгата, поскольку при детектированных нами уровнях TNF- α в БАЛЖ (не более 4 нг/мл) этот белок с высокой вероятностью представлен мономерной, а не тримерной формой [29]. Аналогичный набор модификаций использован и для контрольного неаптамерного олигонуклеотида.

Противовоспалительная активность аптамера к TNF- α на модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких

Противовоспалительную активность аптамеров к TNF- α (aptTNF- α и PEG-aptTNF- α) изучали на модели ЛПС-индуцированного ОПЛ. Аптамеры вводили мышам интраназально, поскольку высокий уровень данного цитокина детектировался именно в БАЛЖ. В качестве контроля специфичности действия аптамера мышам вводили соответствующие скрамблированные олигонуклеотиды (Scr или PEG-Scr). Исследуемые конструкции вводили через 1 ч после индукции ОПЛ с последующим забором материала через 24 ч (рис. 2А), поскольку именно в эту временную точку морфологические изменения в дыхательной системе мышцей были наиболее выражены и окончательно сформированы.

Введение ЛПС вызывало повышение общего числа лейкоцитов в БАЛЖ мышцей с ОПЛ в 7.7 раза по сравнению со здоровыми животными (рис. 2Б). Введение aptTNF- α или соответствующего Scr не влияло на данный показатель, тогда как введение пегилированного аптамера PEG-aptTNF- α в дозе 5 мг/кг достоверно снижало общее число лейкоцитов в БАЛЖ в 1.8 раза по сравнению с контролем и в 2.7 раза по сравнению с PEG-Scr, введенным в той же дозе (рис. 2Б). PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг также вызывал снижение данного показателя в 1.5 и 1.8 раза по сравнению с контролем и Scr соответственно. Данные различия (для дозы 1 мг/кг) оказались статистически недостоверными, однако они показывают дозозависимый характер действия PEG-aptTNF- α . Уровень TNF- α в БАЛЖ мышцей с ОПЛ был повышен в 85 раз по сравнению со здоровыми животными, а введение PEG-aptTNF- α не оказывало значительного влияния на этот показатель (рис. 2В). Уровень TNF- α после введения непегилированного аптамера не исследовали, поскольку данная конструкция не вызывала снижения общего числа лейкоцитов в БАЛЖ как одного из показателей противовоспалительного действия препарата.

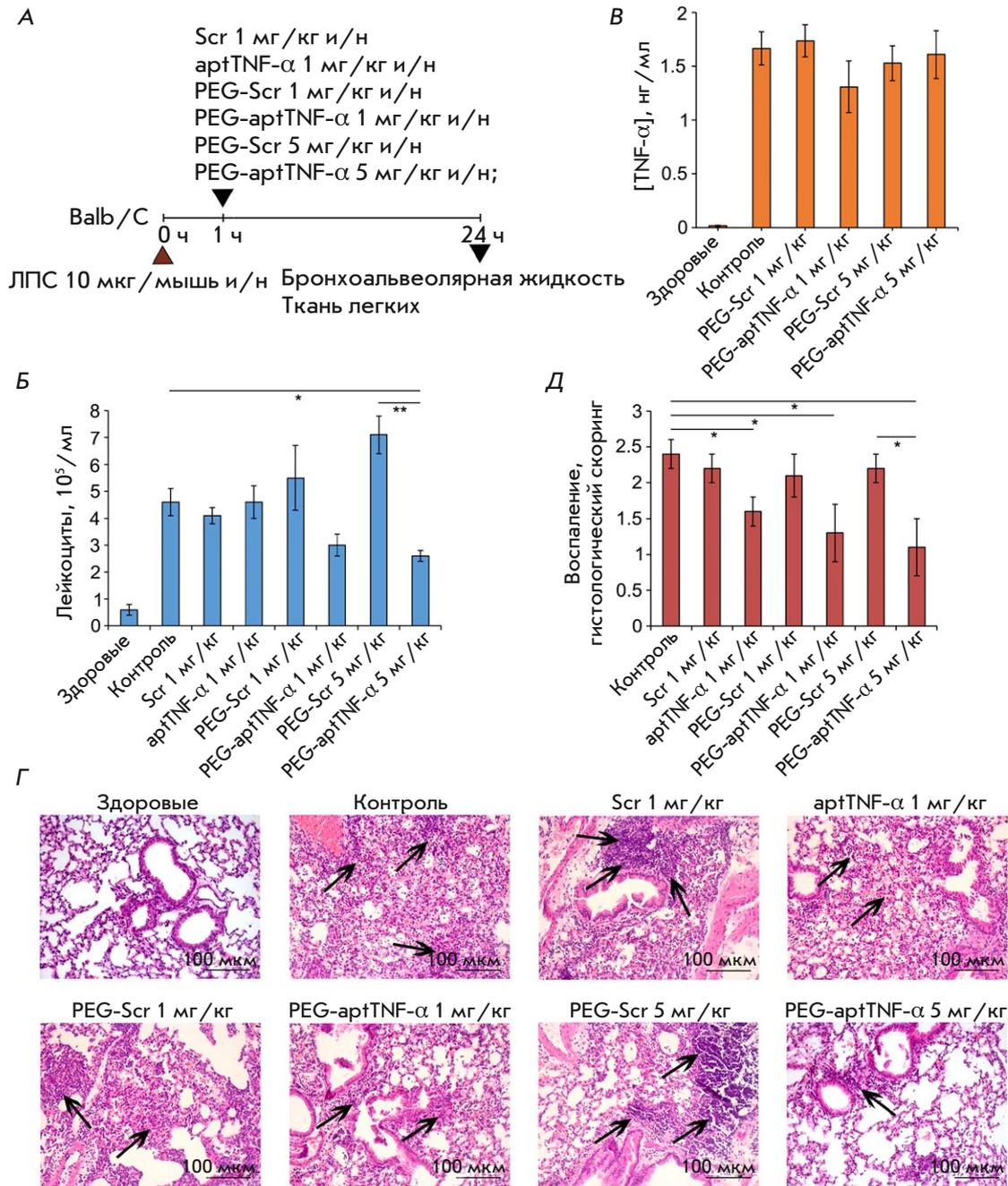


Рис. 2. Влияние аптамеров к TNF-α на развитие ЛПС-индуцированного острого повреждения легких у мышей. А – схема эксперимента. У мышей линии Balb/C индуцировали острое повреждение легких (ОПЛ) путем интраназального (и/н) введения ЛПС (10 мкг/мышь). Через 1 ч после индукции мышам и/н вводили аптамеры к TNF-α: aptTNF-α в дозе 1 мг/кг и PEG-aptTNF-α в дозах 1 и 5 мг/кг. Мышей с ОПЛ без лечения и получавших соответствующий скрамблированный олигонуклеотид (Scr и PEG-Scr) использовали в качестве контролей. Мышей выводили из эксперимента через 24 ч после индукции и производили забор материала для последующего анализа. Б, В – общее число лейкоцитов (Б) и уровень TNF-α (В) в БАЛЖ мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ без лечения и после введения аптамеров к TNF-α. Г, Д – гистологическое исследование (Г) и полуколичественная оценка интенсивности воспалительных изменений (Д) в легких мышей контрольных и экспериментальных групп. Окр. гематоксилином и эозином, ув. ×200. Черными стрелками обозначена воспалительная инфильтрация. Для оценки воспаления в легких использована следующая шкала: 0 – патологические изменения отсутствуют, 1 – воспаление выражено слабо, 2 – воспаление выражено умеренно, 3 – выраженные воспалительные изменения. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; **p* < 0.05, ***p* < 0.01

Согласно результатам гистологического исследования, введение исследуемых конструкций вызывает дозозависимое снижение интенсивности описанных ранее морфологических проявлений ЛПС-индуцированного ОПЛ. Применение aptTNF- α и PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг приводило к снижению интенсивности воспалительных изменений в ткани легких – в 1.5 и 1.8 раза по сравнению с контролем и в 1.4 и 1.6 раза по сравнению с соответствующим Scr (рис. 2Г,Д). Однако эти различия были статистически значимыми только при сравнении аптамеров и контроля. Введение PEG-aptTNF- α в дозе 5 мг/кг вызывало статистически значимое снижение воспаления в ткани легких как по сравнению с группой контроля (в 2.2 раза), так и по сравнению с группой, получавшей PEG-Scr (в 2 раза).

Таким образом, аптамер PEG-aptTNF- α , направленный к провоспалительному цитокину TNF- α , блокирует развитие воспалительных изменений в дыхательной системе мышей, вызванных введением ЛПС, однако не нормализует показатели до уровня здоровых животных. Следует отметить дозозависимый характер противовоспалительного действия aptTNF- α /PEG-aptTNF- α , что, скорее всего, связано с более эффективным связыванием TNF- α при увеличении дозы препарата, а противовоспалительное действие достоверно показано только для конъюгата с PEG за счет улучшенных фармакокинетических характеристик препарата.

Анализ уровней экспрессии генов-мишеней TNF- α в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным острым повреждением легких без лечения и после введения аптамера к TNF- α

Следующим этапом нашего исследования были поиск и оценка уровней экспрессии генов – возможных мишеней TNF- α – при развитии ЛПС-индуцированного ОПЛ и при его коррекции аптамером к TNF- α для подтверждения влияния использованных конструкций на способность целевого секретируемого белка связываться со своим рецептором и активировать сигналинг. Выбор генов, а именно *Usp18*, *Traf1* и *Tnfaip3*, сделан на основе опубликованных данных, согласно которым уровни их экспрессии повышаются под действием TNF- α при широком спектре биологических и патологических процессов, таких, как ЛПС-индуцированный сепсис [30], повреждение миокарда по типу ишемия-реперфузия [31], церебральная ишемия [32], активация сигнальных путей NF- κ B и интерферонов типа I [33–36], а также гемопоэз и регенерация миелоидного ростка кроветворения [37].

Уровни экспрессии *Usp18*, *Traf1* и *Tnfaip3* были оценены в ткани легких мышей с помощью ОТ-ПЦР

(рис. 3). Легкие здоровых животных характеризовались низким уровнем экспрессии исследуемых генов (принятым за 1), в то время как введение ЛПС приводило к значительному увеличению уровней их экспрессии (контроль): *Usp18* в 7 раз, *Traf1* в 2 раза и *Tnfaip3* в 61 раз по сравнению со здоровыми животными.

В ходе оценки влияния аптамеров на экспрессию исследуемых генов в ткани легких мышей с ОПЛ были выявлены следующие закономерности. Введение PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг приводило к статистически значимому снижению уровня экспрессии гена *Usp18* до уровня у здоровых животных: в 5.9 раза по сравнению с контролем и в 2.6 раза по сравнению с PEG-Scr. PEG-aptTNF- α в дозе 5 мг/кг также приводил к снижению уровня экспрессии *Usp18* в 2.6 и 3 раза по сравнению с контролем и PEG-Scr соответственно. Однако статистически значимые отличия выявлены только между аптамером и скамблированным олигонуклеотидом (рис. 3). Введение PEG-aptTNF- α в дозах 1 и 5 мг/кг приводило к снижению экспрессии гена *Traf1* в 3.5 и 2.6 раза по сравнению с контролем и в 1.8 и 1.7 раза по сравнению с PEG-Scr соответственно. Однако статистически значимой разницы в эффектах PEG-aptTNF- α и PEG-Scr в дозе 5 мг/кг не наблюдали (рис. 3). В случае гена *Tnfaip3* единственным статистически значимым было снижение в 1.6 раза уровня экспрессии под действием PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг по сравнению с группой PEG-Scr (рис. 3). Введение PEG-Scr в дозах 1 и 5 мг/кг не оказывало статистически значимого влияния на экспрессию всех исследуемых генов. Введение aptTNF- α в дозе 1 мг/кг приводило к статистически недостоверному снижению уровней экспрессии *Usp18* и *Traf1* в 1.7–2.4 раза, а в случае *Tnfaip3* – к повышению его экспрессии (в 1.3 раза) по сравнению с контролем (рис. 3).

Таким образом, наиболее эффективное снижение уровней экспрессии потенциальных генов-мишеней зафиксировано при введении PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг, тогда как значимые противовоспалительные эффекты выявлены при использовании данного аптамера в дозе 5 мг/кг, что может быть связано с выбором времени определения уровней экспрессии этих генов, когда максимальное действие более высокой дозы аптамера на экспрессию TNF- α ассоциированных генов уже прошло.

ОБСУЖДЕНИЕ

TNF- α – плейотропный цитокин, продуцируемый активированными макрофагами, Т-лимфоцитами и натуральными киллерами – является одним из важнейших регуляторов иммунного ответа, поэ-

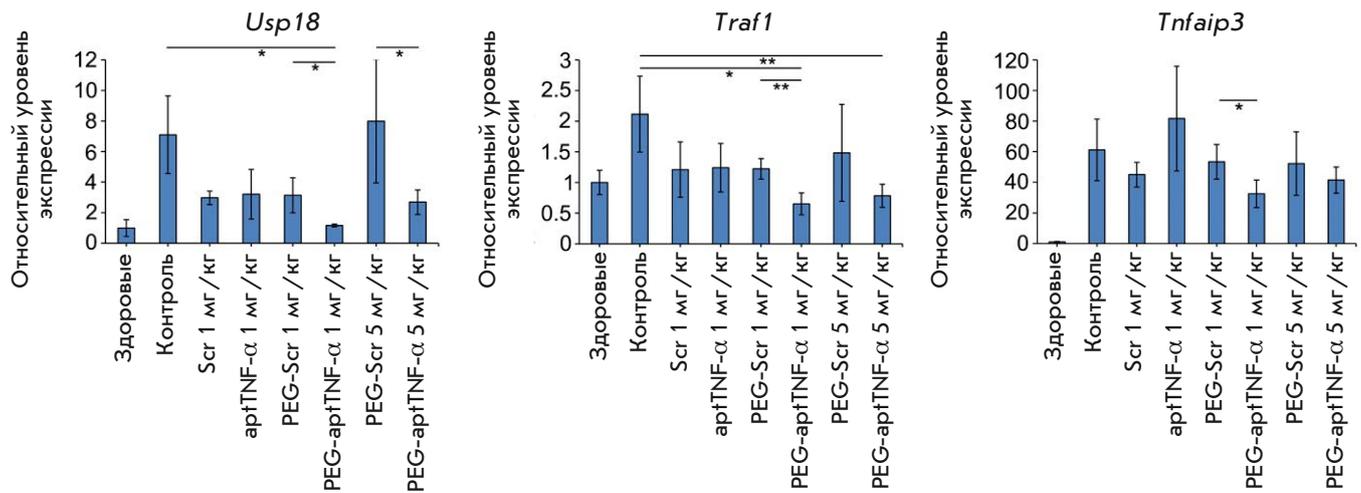


Рис. 3. Уровни экспрессии генов – возможных мишеней TNF-α (*Usp18*, *Traf1* и *Thfaip3*) в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным острым повреждением легких без лечения и после введения аптамеров. Уровни экспрессии генов нормированы по уровню экспрессии *Hprt*, который использовали в качестве внутреннего стандарта. Три образца из каждой группы проанализированы в трех повторностях. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

тому воздействие на уровень этого цитокина может быть эффективной стратегией коррекции иммунных нарушений, ассоциированных с опухолевыми, воспалительными, обменными и инфекционными заболеваниями [38, 39]. Учитывая многообразие заболеваний и биологических процессов, в которых TNF-α принимает участие, количество генов и сигнальных путей, регулирующих и регулируемых TNF-α, исчисляется десятками [40, 41].

В настоящее время основными анти-TNF-α препаратами, одобренными к применению в клинике, являются моноклональные антитела, которые, однако, вызывают такие побочные эффекты, как повышение чувствительности к инфекциям, развитие демиелинизирующих заболеваний и злокачественных новообразований [41]. Использование анти-TNF-α-средств другой природы, таких, как аптамеры, возможно, позволит сократить количество и тяжесть осложнений.

В данной работе противовоспалительная активность аптамера к TNF-α, а также влияние химических модификаций на эффективность его действия изучены на мышинной модели ЛПС-индуцированного ОПЛ. Следует отметить, что выбор способа введения аптамера обоснован и аргументирован данными профилирования уровня цитокинов в БАЛЖ и сыворотке крови при развитии ОПЛ у мышей в динамике. Показано, что уровень TNF-α в БАЛЖ значительно выше, чем в сыворотке крови, что свидетельствует о перспективности топического интраназального введения аптамера по сравнению с системным. Что касается доз аптамера, исполь-

зованных в эксперименте, нами были выбраны концентрации, которые с высокой вероятностью должны обеспечивать целевой эффект, принимая во внимание, что концентрации пегилированных аптамеров в диапазоне 1–10 мг/кг являются оптимальными для *in vivo* экспериментов и клинических исследований [42].

Обнаружено, что PEG-aptTNF-α обладает более выраженным противовоспалительным действием, чем немодифицированный аналог, что может быть связано с его более длительным временем жизни в организме животных. PEG-aptTNF-α демонстрирует определенную дозозависимость: в дозе 5 мг/кг он был более эффективен, чем в дозе 1 мг/кг. Однако, несмотря на противовоспалительную активность, наблюдаемую в БАЛЖ и ткани легких, значимое снижение количества самого TNF-α в БАЛЖ не зафиксировано. Подобное расхождение может быть следствием того, что аптамер и анти-TNF-α-антитела, используемые в ИФА, могут связываться с разными пространственно удаленными эпитопами TNF-α, при этом взаимодействие с аптамером не влияет на связывание антител. Однако в отсутствие данных структурных исследований или молекулярного моделирования, которые бы указали, с каким именно эпитопом TNF-α происходит связывание анти-TNF-α-аптамера, эта гипотеза нуждается в дальнейшем подтверждении.

Поскольку прямое измерение уровня TNF-α не привело к ожидаемым результатам, было решено оценить эффект аптамера к TNF-α с помощью анализа количества мРНК генов, которые участву-

ют в регуляции и передаче сигнала TNF- α . В качестве потенциальных генов-мишеней TNF- α были выбраны гены, которые напрямую задействованы в регуляторном каскаде TNF- α и уровень которых повышается при развитии ОПЛ.

В начале сигналинга растворимая форма TNF- α связывается с рецептором TNF1 типа (TNFR1), вызывая тримеризацию рецептора и вовлечение в процесс белка домена смерти (TRADD) и серин-треониновой протеинкиназы 1 (RIPK1) (рис. 4). Далее TRADD взаимодействует с гетеродимером TRAF1/TRAF2, образуя комплекс I, который активирует сигнальный путь NF- κ B и запускает синтез провоспалительных цитокинов, в том числе IFN-I [33]. В дальнейшем IFN-I воздействует через рецепторы IFNAR1/2 и сигнальный путь JAK/STAT на следующее важное звено в развитии воспалительного ответа – ось ISG15/USP18, которая регулирует активность иммунной системы [36] и снижает интенсивность воспалительного ответа, подавляя сигнальный путь JAK/STAT, что указывает на возможную петлю отрицательной обратной связи между USP18, IFN-I и, как следствие, TNF- α [43, 44].

Другая ключевая молекула механизма обратной регуляции – белок 3, индуцируемый TNF- α (TNFAIP3), также известный как A20. Базальный уровень экспрессии TNFAIP3 низок в большинстве клеток, однако быстро возрастает при развитии воспалительного ответа [45]. TNFAIP3 рекрутируется в сигнальный комплекс TNFR1, где дубиквитирует RIPK1, что приводит к потере стабильности комплекса I и блокированию дальнейшей активации NF- κ B. Диссоциировавший из комплекса I TRADD образует комплексы с Fas-ассоциированным белком домена смерти (FADD) и каспазой-8 (комплекс IIa) или с RIPK1, FADD и каспазой-8 (комплекс IIb), которые в дальнейшем приводят к апоптозу или некроптозу [46].

Учитывая вовлечение описанных генов в сигналинг и регуляцию TNF- α , введение аптамера к TNF- α , как и ожидалось, приводило к снижению уровня экспрессии генов-мишеней, выбранных для валидации, а именно: *Traf1* как компонента гетеродимерного комплекса, непосредственно участвующего в передаче сигнала TNF- α ; *Tnfaip3*, блокирующего активацию провоспалительного сигнального пути NF- κ B; и *Usp18*, регулирующего интенсивность воспалительного ответа после активации NF- κ B по механизму отрицательной обратной связи, что говорит о правомерности использования генов-мишеней TNF- α для оценки биологического действия анти-TNF- α -аптамера. Как и в случае морфологических изменений в дыхательной системе мышей, PEG-aptTNF- α обладал более выраженным

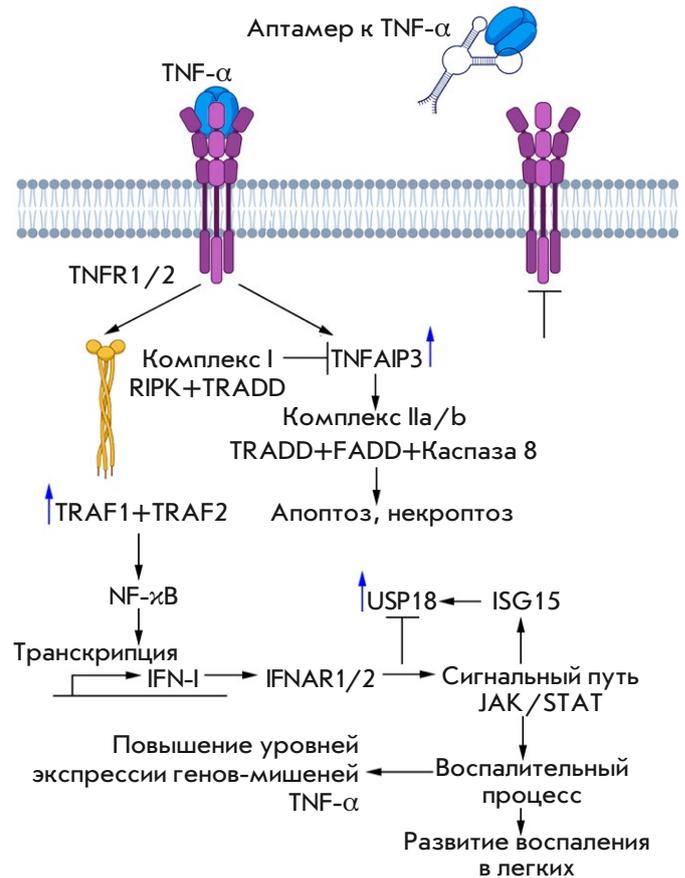


Рис. 4. Общая схема сигналинга TNF- α

эффектом на уровень экспрессии генов, чем немодифицированные аптамеры.

Таким образом, проведенное исследование еще раз продемонстрировало важность TNF- α как терапевтической мишени при ОПЛ, а также преимущество использования химически модифицированных аптамеров для блокирования его функции. Секреторный белок является крайне привлекательной мишенью для аптамера, поскольку для связывания с ним не требуется доставка препарата в клетку, вместо этого терапевтический аптамер может вводиться системно или локально в те органы и ткани, где повышен уровень белка-мишени. Возможность введения аптамера после начала развития патологии и блокирование действия антитодом также представляются крайне привлекательными и делают терапевтические аптамеры практически «идеальными лекарствами».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что TNF- α является одним из ключевых игроков цитокинового сигналинга при развитии ЛПС-индуцированного ОПЛ, а интраназальное введение

аптамеров к TNF- α эффективно снижает воспалительные изменения в дыхательной системе мышцей, вызванные ЛПС, влияет на ассоциированные с TNF- α гены-мишени и может рассматриваться в качестве инструмента для терапии ОПЛ различной этиологии и других заболеваний легких, сопровождающихся иммунными нарушениями. ●

Финансирование.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30011) и государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mowery N.T., Terzian W.T.H., Nelson A.C. // *Curr. Probl. Surg.* 2020. V. 57. № 5. P. 100777.
2. Chen X., Tang J., Shuai W., Meng J., Feng J., Han Z. // *Inflamm. Res.* 2020. V. 69. № 9. P. 883–895.
3. Lucas R., Hadizamani Y., Gonzales J., Gorshkov B., Bodmer T., Berthiaume Y., Moehrlen U., Lode H., Huwer H., Hudel M., et al. // *Toxins (Basel)*. 2020. V. 12. № 4. P. 223.
4. Shah R.D., Wunderink R.G. // *Clin. Chest Med.* 2017. V. 38. № 1. P. 113.
5. Goligher E.C., Douflé G., Fan E. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015. V. 191. № 12. P. 1367–1373.
6. Agrawal D.K., Smith B.J., Sottile P.D., Albers D.J. // *Front. Physiol.* 2021. V. 12.
7. Pauluhn J. // *Toxicology*. 2021. V. 450.
8. Laskin D.L., Malaviya R., Laskin J.D. // *Toxicol. Sci.* 2019. V. 168. № 2. P. 287–301.
9. Zhang C.N., Li F.J., Zhao Z.L., Zhang J.N. // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 2021. V. 321. № 5. P. 885–891.
10. Sever I.H., Ozkul B., Erisik Tanriover D., Ozkul O., Elgormus C.S., Gur S.G., Sogut I., Uyanikgil Y., Cetin E.O., Erbas O. // *Exp. Lung Res.* 2021. P. 1–10.
11. Jiao Y., Zhang T., Zhang C., Ji H., Tong X., Xia R., Wang W., Ma Z., Shi X. // *Crit. Care*. 2021. V. 25. № 1. P. 356.
12. Kong L., Deng J., Zhou X., Cai B., Zhang B., Chen X., Chen Z., Wang W. // *Cell Death Dis.* 2021. V. 12. № 10. P. 928.
13. Jamal M., Bangash H.I., Habiba M., Lei Y., Xie T., Sun J., Wei Z., Hong Z., Shao L., Zhang Q. // *Virulence*. 2021. V. 12. № 1. P. 918–936.
14. Ramasamy S., Subbian S. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2021. V. 34. № 3. P. e0029920
15. Dharra R., Kumar Sharma A., Datta S. // *Cytokine*. 2023. V. 169. P. 156287.
16. Gao Y., Zhou A., Chen K., Zhou X., Xu Y., Wu S., Ning X. // *Chem. Sci.* 2024. V. 15. № 6. P. 2243.
17. Attiq A., Yao L.J., Afzal S., Khan M.A. // *Int. Immunopharmacol.* 2021. V. 101. P. 108255.
18. Patel S., Saxena B., Mehta P. // *Heliyon*. 2021. V. 7. № 2. P. e06158.
19. Adachi T., Nakamura Y. // *Mol.* 2019. V. 24. № 23. P. 4229.
20. Ji D., Feng H., Liew S.W., Kwok C.K. // *Trends Biotechnol.* 2023. V. 41. № 11. P. 1360–1384.
21. Stoll H., Steinle H., Wilhelm N., Hann L., Kunnakattu S.J., Narita M., Schlensak C., Wendel H.P., Avci-Adali M. // *Molecules*. 2017. V. 22. № 6. P. 954.
22. Yu H., Frederiksen J., Sullenger B.A. // *RNA*. 2023. V. 29. № 4. P. rna.079503.122.
23. Stephens M. // *Pharmacol. Ther.* 2022. V. 238. P. 108173.
24. Luo Z., Chen S., Zhou J., Wang C., Li K., Liu J., Tang Y., Wang L. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. P. 976960.
25. Shatunova E.A., Korolev M.A., Omelchenko V.O., Kurochkina Y.D., Davydova A.S., Venyaminova A.G., Vorobyeva M.A. // *Biomedicines*. 2020. V. 8. № 11. P. 1–44.
26. Lai W.Y., Wang J.W., Huang B.T., Lin E.P.Y., Yang P.C. // *Theranostics*. 2019. V. 9. № 6. P. 1741–1751.
27. Qi S., Duan N., Khan I.M., Dong X., Zhang Y., Wu S., Wang Z. // *Biotechnol. Adv.* 2022. V. 55. P. 107902.
28. Zhang Y., Zhang H., Chan D.W.H., Ma Y., Lu A., Yu S., Zhang B., Zhang G. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. P. 104–108.
29. Daub H., Traxler L., Ismajli F., Groitl B., Itzen A., Rant U. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 9265.
30. Hu B., Ge C., Zhu C. // *Int. Immunol.* 2021. V. 33. № 9. P. 461–468.
31. Xu W., Zhang L., Zhang Y., Zhang K., Wu Y., Jin D. // *J. Am. Heart Assoc.* 2019. V. 8. № 21. P. e012575.
32. Xiang J., Zhang X., Fu J., Wang H., Zhao Y. // *Neuroscience*. 2019. V. 419. P. 121–128.
33. Courtois G., Fauvarque M.O. // *Biomed.* 2018. V. 6. № 2. P. 43.
34. Catrysse L., Vereecke L., Beyaert R., van Loo G. // *Trends Immunol.* 2014. V. 35. № 1. P. 22–31.
35. MacParland S.A., Ma X.-Z., Chen L., Khattar R., Cherepanov V., Selzner M., Feld J.J., Selzner N., McGilvray I.D. // *J. Virol.* 2016. V. 90. № 12. P. 5549–5560.
36. Sarasin-Filipowicz M., Wang X., Yan M., Duong F.H.T., Poli V., Hilton D.J., Zhang D.-E., Heim M.H. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. № 17. P. 4841–4851.
37. Yamashita M., Passegué E. // *Cell Stem Cell*. 2019. V. 25. № 3. P. 357–372.
38. Savenkova D.A., Gudymo A.S., Korablev A.N., Taranov O.S., Bazovkina D.V., Danilchenko N.V., Perfilyeva O.N., Ivleva E.K., Moiseeva A.A., Bulanovich Y.A., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 2. P. 1156.
39. Wong M., Ziring D., Korin Y., Desai S., Kim S., Lin J., Gjertson D., Braun J., Reed E., Singh R.R. // *Clin. Immunol.* 2008. V. 126. № 2. P. 121–136.
40. Falvo J.V., Tsytsykova A.V., Goldfeld A.E. // *Curr. Dir. Autoimmun.* 2010. V. 11. № 1. P. 27–60.
41. Leone G.M., Mangano K., Petralia M.C., Nicoletti F., Fagone P. // *J. Clin. Med.* 2023. V. 12. № 4. P. 1630.
42. Kovacevic K.D., Gilbert J.C., Jilma B. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. V. 134. P. 36–50.
43. Malakhova O.A., Kim K. Il, Luo J.K., Zou W., Kumar K.G.S., Fuchs S.Y., Shuai K., Zhang D.E. // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 11. P. 2358–2367.
44. François-Newton V., de Freitas Almeida G.M., Payelle-Brogard B., Monneron D., Pichard-Garcia L., Piehler J., Pellegrini S., Uzé G. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 7. P. e22200.
45. Devos M., Mogilenko D.A., Fleury S., Gilbert B., Becquart C., Quemener S., Dehondt H., Tougaard P., Staels B., Bachert C., et al. // *J. Invest. Dermatol.* 2019. V. 139. № 1. P. 135–145.
46. Martens A., van Loo G. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2020. V. 12. № 1. P. a036418.