

Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках-предшественниках нейронов NPC и в опухолевых клетках MCF7 человека

Торшин И.Ю.^{1,2}, Громова О.А.^{1,2}, Фролова Д.Е.³,
Гришина Т.Р.³, Лапочкина Н.П.³

¹ – Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук», Москва

² – Центр хранения и анализа больших данных, МГУ, Москва

³ – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново

Резюме. Различные типы клеток по-разному откликаются на воздействие витамина D₃. В работе представлены результаты дозозависимого дифференциального хемотранскриптомного анализа холекальциферола по отношению к клеткам опухоли молочной железы (линия MCF7) и к клеткам-предшественникам нейронов (линия NPC). В опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов), и снижалась экспрессия генов, вовлечённых в поддержание энергетического метаболизма (482 гена), деление/пролиферацию клеток (387 генов), ремонт ДНК (391 ген), синтез и транспорт белков (188 генов) и в поддержание хронического воспаления (факторы ФНО/NF-κB, 105 генов). В нейрональных клетках схожие изменения в экспрессии этих категорий генов происходили в значительно меньшей степени и не достигали статистической значимости. Снижение ремонта ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, снижение энергетического метаболизма снижает способность опухолевых клеток к делению и к сопротивлению терапевтическому воздействию. Интересно отметить, что витамин D₃ способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих клеточный ответ на гамма-излучение (9 генов) и способствовал усилению противоопухолевых эффектов витамина А (5 генов). Также, витамин D₃ снижал экспрессию генов, ингибиторы белков которых являются перспективными противоопухолевыми препаратами (казеинкиназа, c-src тирозинкиназа, c-тус и др). Таким образом, витамин D₃ дозозависимо подавлял деление именно опухолевых клеток, не оказывая негативного воздействия на выживаемость нейронов.

Ключевые слова: хемотранскриптомика; холекальциферол; интеллектуальный анализ данных; фармакоинформатика; противоопухолевое действие

Для цитирования:

Торшин И.Ю., Громова О.А., Фролова Д.Е., Гришина Т.Р., Лапочкина Н.П. Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках-предшественниках нейронов NPC и в опухолевых клетках MCF7 человека // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.35–51. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10013.

Dose-dependent chemotranscriptomics analysis of the differential effects of vitamin D₃ on gene expression in human neuronal progenitor cells NPC and in MCF7 tumor cells

Torshin I.Yu.^{1,2}, Gromova O.A.^{1,2}, Frolova D.E.³, Grishina T.R.³, Lapochkina N.P.³

¹ – Federal Research Center «Computer Science and Control» of the Russian Academy of Sciences, Moscow

² – Center for storage and analysis of big data, Moscow State University, Moscow

³ – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Resume. Different cell types respond differently to the effects of vitamin D₃. The paper presents the results of a dose-dependent differential chemotranscriptome analysis of vitamin D₃ in relation to breast tumor cells (MCF7 line) and neuron progenitor cells (NPC line). Expression of the genes involved in immunomodulation (192 genes) was significantly increased in tumor cells and in the intracellular signaling from receptors (275 genes) and the expression of genes involved in maintaining energy metabolism (482 genes), cell division / proliferation (387 genes), DNA repair (391 gene), synthesis and transport of proteins (188 genes) and in maintaining chronic inflammation (factors of TNF / NF-κB. 105 genes). In neuronal cells, similar changes in the expression of these categories of genes occurred to a much lesser extent and did not reach statistical significance. The reduction in DNA repair in tumor cells stimulates their apoptosis, the decrease in energy metabolism reduces the ability of tumor cells to divide and to resist therapeutic effects. It is interesting to note that vitamin D₃ contributed to a decrease in the expression of genes supporting the cellular response to gamma radiation (9 genes) and contributed to the enhancement

of the antitumor effects of vitamin A (5 genes). Also, vitamin D₃ reduced the expression of genes that express potential target proteins of antitumor drugs (casein kinase, c-src tyrosine kinase, c-myc, etc.). Thus, vitamin D₃ suppressed the division of tumor cells in a dose-dependent manner, without adversely affecting the survival of neurons.

Keywords: chemotranscriptomics, cholecalciferol, data mining; pharmacoinformatics; antitumor effect; big data

For citations:

Torshin IYu, Gromova OA, Frolova DE, Grishina TR, Lapochkina N.P. Dose-dependent chemotranscriptomics analysis of the differential effects of vitamin D₃ on gene expression in human neuronal progenitor cells NPC and in MCF7 tumor cells. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:35–51. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10013.

Введение

Физиологическое воздействие витамина D₃ не ограничивается общеизвестной ролью в регуляции гомеостаза кальция и фосфора, но также ассоциировано с комплексом иммуномодулирующих, нейропротекторных, противоопухолевых свойств, влияниями на уровни факторов роста и обновления тканей, поддержание баланса между жировой и мышечной тканями, синтез гормонов, липидный метаболизм и др. [1].

Активация рецепторов VDR является наиболее важным способом реализации биологических эффектов витамина D₃, попадающего в ЖКТ в форме холекальциферола. Формирование нанодисперсной водной эмульсии является первым важным шагом усвоения витамина D₃. Витамин D₃ может поступать в ЖКТ уже в виде раствора мицелл (препарат «Аквадетрим») или же эмульгироваться внутри кишечника при участии желчных кислот в тонком кишечнике. Всасываясь из мицелл в кровь, холекальциферол поступает в печень и почки, посредством которых синтезируется наиболее биологически активный витамин D₃ – кальцитриол (1,25-дигидроксивитамин D₃ или «1,25(OH)2D₃»). Биологическое воздействие активной формы витами-

на D₃ оказывается через связывание с рецептором витамина D (VDR) [1, 2]. Рецептор витамина D, подобно стероидным и многим другим гормональным рецепторам, является фактором транскрипции, регулирующим экспрессию нескольких тысяч генов в геноме человека. Молекула рецептора включает витамин-связывающий и ДНК-связывающий домены (рис. 1).

Далеко не все роли витамина D были исследованы. Поэтому, исследования воздействий рецепторов VDR с геномной ДНК (полногеномные анализы) имеют важное значение для комплексной оценки физиологического воздействия витамина D на здоровье человека. В частности, системно-биологический анализ данных полногеномных исследований рецептора VDR, проведенных секвенированием посредством иммунопреципитации хроматина (технология ChIP-seq), указал на весьма широкий спектр потенциальных применений витамина D в терапии [3]. Было установлено потенциальное воздействие витамина D на транскрипцию около 2 700 генов человека. Была произведена рубрикация всех известных к настоящему времени специфических биологических ролей витамина D, которые включают поддержание стабильности генома (в т. ч. цикл деления клетки, ремонт ДНК, реструктурирование хро-

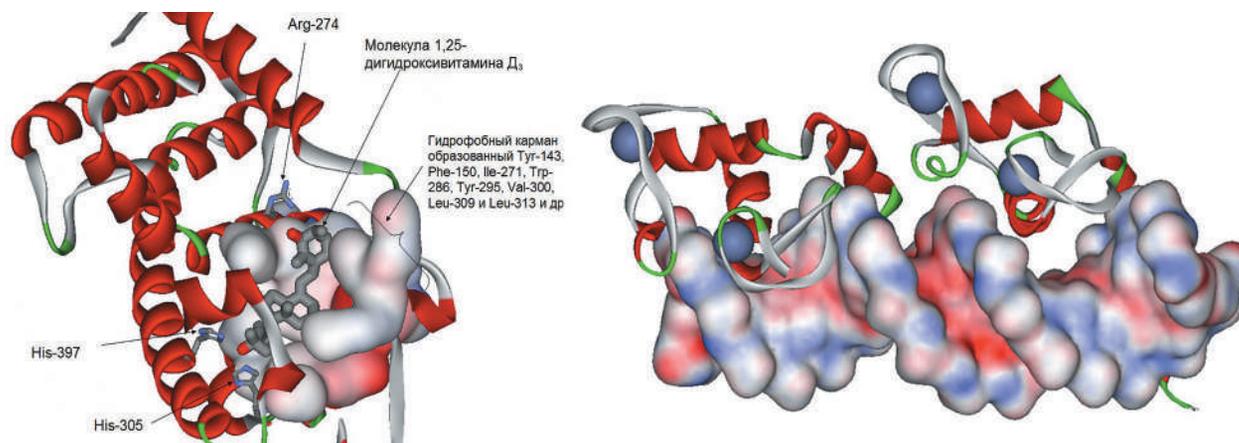


Рис. 1. Пространственная структура рецептора витамина D (VDR)

А) Витамин-связывающий домен рецептора

Б) ДНК-связывающий домен рецептора. Показаны атомы цинка (сферы) необходимые для взаимодействия с геномной ДНК и активации рецептором процессов транскрипции



Рис. 2. Результаты полногеномного анализа сайтов связывания рецептора витамина D в геноме человека

мосом), поддержку процессов синтеза и деградации белков, иммунитета, регуляцию эмбриогенеза, энергетический метаболизм. К геномным ролям витамина D также относятся: осуществление эффектов нейротрофических и ростовых факторов (в т. ч. инсулина), регуляция свертывания крови, гаметогенез и апоптоз (рис. 2). Результаты анализа также указали на эпигенетический потенциал витамина D, осуществляющийся посредством нормализации ацетилирования гистонов – специальных ДНК-стабилизирующих белков, и существенно расширили перспективы применений препаратов витамина D для профилактики и терапии широкого круга заболеваний [3].

С терапевтической точки зрения крайне важно знать о дифференцированном действии витамина D на различные типы клеток. Фармакологический опыт показывает, что подавляющее большинство синтетических лекарств действуют по очень узким молекулярным механизмам, ингибируя некоторые фиксированные белки (например, статины ингибируют HMG-CoA-редуктазу, цитотоксические противоопухолевые препараты ингибируют те или иные киназы и др.). Поэтому, ожидать существенных различий при воздействии на разные типы клеток, по умолчанию, не приходится.

В то же время, витамин D, действуя в значительной мере через одноименный рецептор (VDR), влияет на экспрессию (транскрипцию) нескольких тысяч генов. Поскольку на транскрипцию генов влияют и многие другие факторы, связанные с состоянием

клетки, то эффекты витамина D будут в существенной мере зависеть от типа клеток. Наблюдаемые в экспериментальных и клинических исследованиях противоопухолевые эффекты витамина D указывают на ингибирование роста опухолевых клеток без какого-либо негативного воздействия на другие типы клеток. Поэтому, представляет интерес выяснить, каким именно образом осуществляется такое дифференцированное действие витамина D.

Изучение дифференцированного действия витамина D на опухолевые клетки особенно важно, принимая во внимание необходимость продолжительного использования препаратов витамина D. Дело в том, что формирование резистентности опухолевых клеток к различным противоопухолевым препаратам осуществляется, в основном, на уровне протеома (секвестрация и выведение лекарств, повышение активности ферментов, обеспечивающих метаболизм ксенобиотиков, повышение репарации ДНК, подавление апоптотических сигнальных каскадов, пребывание клетки вне фазы клеточного цикла, взаимодействие с ростовыми факторами и цитокинами) [4]. Поэтому, резистентность опухолевых клеток к действию того или иного препарата вырабатывается гораздо сложнее, если препарат не только «тактически» ингибирует тот или иной белок протеома, но, «стратегически» снижает экспрессию генов, важных для выживания и пролиферации опухолевых клеток (что и наблюдается в случае кальцитриола).

В настоящей работе представлены результаты хемотранскриптомного исследования дозозависимых эффектов воздействия кальцитриола на транскрипцию 12 700 аннотированных генов человека в клетках-предшественниках нейронов (линия NPC) и линии MCF7 опухолевых клеток молочной железы. Моделировалась стимуляция клеток кальцитриолом в 6 различных концентрациях в течение 24 ч. В результате проведенного анализа установлены функциональные группы генов и конкретные гены, экспрессия которых дозозависимо и достоверно изменяется под воздействием кальцитриола в двух исследованных типах клеток. Соответственно, была получена комплексная дифференциальная картина возможных воздействий кальцитриола на транскриптом опухолевых и нормальных клеток человека.

Материалы и методы

Транскриптомные исследования лекарств *in vitro* требуют комплекса специального оборудования для анализа экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов, крайней аккуратности в выборе анализируемых клеточных культур, обработке получаемых данных и, поэтому, весьма дорогостоящи (от 10 000 до 20 000 евро на транскриптомное исследование только 1-й молекулы). В общем случае, такого рода исследования практически не доступны ни в России, ни за рубежом для подавляющего большинства врачей-исследователей.

В то же время, в базе данных GEO (Gene Expression Omnibus. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) накоплены результаты более чем 160 000 транскриптомных исследований (>50 000 терабайт транскриптомных данных). С использованием новейших методов искусственного интеллекта для анализа «сверхбольших данных» (big data) в Институте фармакоинформатики при ФИЦ ИУ РАН был разработан метод хемотранскриптомного анализа эффектов молекул.

Результаты транскриптомных экспериментов в базе данных GEO представлены в виде таблиц, столбцам которой соответствуют гены, а строкам – соответствующие воздействия на клетку (например, те или иные молекулы). Элементами таблицы являются изменения экспрессии гена при соответствующем воздействии. Каждой такой «таблице транскриптомного эксперимента» соответствуют (1) *тип клеток*, для которых изучались изменения экспрессии, (2) *интенсивность воздействия* (прежде всего, концентрации воздействующих молекул) и (3) *время воздействия* (6, 12, 24 ч и др.). Изменения экспрессии оцениваются относительно контроля (как правило, ДМСО, диметилсульфоксид).

При задании (1) *типа клеток* (например, фибробласты), (2) концентрации и (3) времени воздействия,

каждый столбец такой таблицы соответствует химической реакции «Ген_{*i*} → мРНК_{*i*}», в результате которой осуществляется синтез *i*-ой молекулы мРНК_{*i*}, соответствующей *i*-ому гену (Ген_{*i*}). Данные, содержащиеся в таком столбце таблицы **T** транскриптомного эксперимента, включающей информацию об изменении экспрессии **N** генов при воздействии **n** молекул, могут рассматриваться как описание определённого элемента реактома (т. е. совокупности всех химических реакций). Соответственно, становится возможным применение теории хемографов [5], методологии хемоинформационного [6–9] и хемореактомного анализа [9–12] для осуществления хемотранскриптомного моделирования.

Хемотранскриптомный анализ. Исходной выборкой информации для обучения алгоритмов хемотранскриптомного анализа является *i*-й $g_i = (X_j, \Delta_j)^T$ столбец таблицы, $T = (X_j, \Delta_j)$, $i = 1, \dots, N$, $j = 1, \dots, n$ соответствующий *i*-му гену и содержащий информацию о структуре *j*-й воздействующей молекулы (хемограф X_j) и изменение транскрипции (экспрессии) генов при воздействии данной молекулы, $\Delta_j \in R$. Хемограф (χ -граф) – особая разновидность графа (т. е. математического объекта, являющегося как совокупности множества вершин и множества ребер – связей между вершинами). Хемографом называется конечный, связный, неориентированный, размеченный граф без петель, с кликовым числом, не превышающим 3.

Данные, представленные в столбцах g_i , обрабатываются методами хемоинформационного анализа, основанными на комбинаторной теории разрешимости [9–12]. Комбинаторная теория разрешимости, представляющая собой развитие алгебраического подхода к задачам распознавания, является современным математическим инструментом для исследования признаков описаний объектов. В применении к анализу хемографов, практически важны *теорема о полноте кортежей инвариантов произвольного хемографа и теорема соответствия критерия полноты инварианта критерию разрешимости/регулярности* [5, 9], на основании которых становится возможным определение и настройка («обучение») функций расстояния между хемографами.

При использовании *метрики Хэмминга*, функция расстояния между хемографами d_χ над бинарными χ -инвариантами определяется как
$$d_\chi(X_1, X_2) = \frac{1}{|\mathcal{X}|} \sum_{k=1}^{|\mathcal{X}|} \omega_k \hat{1}[k] \hat{\beta}[X_1] \chi \oplus \hat{1}[k] \hat{\beta}[X_2] \chi$$
 где:

χ – множество элементарных χ -инвариантов (всех возможных фрагментов химических структур);

$\hat{1}[\chi]$ – кортеж-инвариант (список фрагментов структур, применимый к структуре любой молекулы);

$\hat{\beta}[\mathbf{X}_j]$ – способ вычисления бинарных признаков описаний для хемографа.

\mathbf{X}_j , соответствующих фрагментам молекулярной структуры из множества χ ;

ω_k – вес k -го признака. Приведённое выше выражение, отражающее «химическое расстояние» между двумя произвольными молекулами \mathbf{X}_1 и \mathbf{X}_2 , является основой хемоинформационного анализа вообще и хемотранскриптомного анализа, в частности.

Расстояние d_χ является настраиваемой метрикой, т. к. содержит произвольно настраиваемые параметры – веса ω_k . Для набора данных, заданных i -м столбцом (\mathbf{g}_i) таблицы \mathbf{T} транскриптомного эксперимента, настройка вектора параметров (ω_k) может осуществляться теми или иными методами машинного обучения. Мы используем метод хеометрического анализа, который подразумевает использование процедуры согласования пар метрик, одной из которых является «химическое расстояние» d_χ , а второй – метрика d_Δ , вычисляемая на основе значений изменений экспрессии Δ_j , представленных в столбце \mathbf{g}_i . Согласование заключается в подборе таких значений веса ω_k , при которых различия между значениями согласуемой пары метрик, d_χ и d_Δ , минимально.

Задача машинного обучения для согласования метрик формулируется как $\arg \min_{(\omega_k)} [L(d_\chi(X_i, X_j), d_\Delta(\Delta_i, \Delta_j))] \quad i=1, \dots, N, j=1, \dots, n$, где L – используемая функция потерь (сумма квадратов невязок, стандартное отклонение и т. п.). Соответственно, в результате обучения алгоритма «химическое расстояние» $d_\chi(X_{i1}, X_{i2})$ между парой молекул \mathbf{X}_{i1} и \mathbf{X}_{i2} соответствует различию значения в значениях изменений экспрессии Δ_{i1} и Δ_{i2} , отражаемых метрикой $d_\Delta(\Delta_{i1}, \Delta_{i2})$ с точностью до линейного преобразования y_i , т. е. $d_\Delta(\Delta_{i1}, \Delta_{i2}) = y_i(d_\chi(X_{i1}, X_{i2})) = a_{\chi \rightarrow \Delta} d_\chi(X_{i1}, X_{i2}) + b_{\chi \rightarrow \Delta}$.

В целом, на первом этапе хемотранскриптомного анализа для i -го гена, описываемого столбцом таблицы \mathbf{T} проводится обучение алгоритмов для вычисления химических расстояний d_χ .

На втором этапе, для исследуемой молекулы \mathbf{X} считываются расстояния $d_\chi(\mathbf{X}, \mathbf{X}_j)$ до всех хемографов \mathbf{X}_j столбца $\mathbf{g}_i = (\mathbf{X}_j, \Delta_j)^T$ и, по формуле $d_\Delta = y_i(d_\chi)$, вычисляются оценки рассто-

яний d_Δ от искомого изменения экспрессии Δ_χ до известных значений Δ_j столбца \mathbf{g}_i . Затем, для каждой j -й молекулы по формуле $\Delta_\chi = d^{-1}(d_\Delta, \Delta_j)$ вычисляются оценки искомого изменения экспрессии, образующие множество чисел $A = \{\Delta_{\chi_1}, \Delta_{\chi_2}, \dots, \Delta_{\chi_n}, \dots, \Delta_{\chi_n}\}$, к которому применяется оператор $\hat{\phi}(x)$ для формирования эмпирической функции распределения (э. ф. р.) так, что $\hat{\phi}(x)A = \sup\{|B \subseteq A | \forall a \in B : a \leq x\} / |A|$, $x \in R$. С использованием полученной э. ф. р. $\hat{\phi}(x)A$ искомое изменение экспрессии Δ_χ вычисляется как математическое ожидание $\hat{\phi}(x)A$, а точность вычисления Δ_χ – как стандартное отклонение $\hat{\phi}(x)A$. Представленные далее в таблицах и рисунках оценки изменений экспрессии различных констант были получены как математическое ожидание и дисперсия соответствующей эмпирической функции распределения.

На третьем этапе, для исследуемой молекулы \mathbf{X} для каждого гена вычисляются оценки $\Delta_\chi(c_m)$ при различных концентрациях c_m вещества \mathbf{X} . Графики в координатах $\{\Delta_\chi(c_m), c_m\}$ анализируются методами регрессионного анализа и выявляются достоверные дозозависимые тренды изменения экспрессии в зависимости от c_m . Отбираются только те кривые $\Delta_\chi(c_m)$, которые могут быть описаны достоверными линейными трендами (коэффициент корреляции 0,6 и более, $p < 0,05$ по критерию Колмогорова–Смирнова) во всём диапазоне исследуемых концентраций (0,01–10 мкмоль кальцитриола). Для каждого из отобранных трендов устанавливается знак изменения экспрессии i -го гена («+»-тренд – достоверное повышение экспрессии при увеличении концентрации кальцитриола, «-»-тренд – достоверное снижение экспрессии i -го гена при увеличении концентрации кальцитриола), и соответствующие трендам гены подразделяются на список генов, для которых показано достоверное повышение экспрессии, группу генов и список генов со сниженной экспрессией. К двум полученным спискам генов применяются методы системно-биологического анализа.

Системно-биологический анализ. Списки генов с достоверным повышением или снижением экспрессии генов, которые были получены в результате применения, описанного выше хемотранскриптомного подхода, анализировались посредством метода функционального связывания [2]. Анализ проводится с использованием международной номенклатуры Gene Ontology (GO), описывающей физиологические функции генов и соответствующих белков. Данный

метод основан на системном рассмотрении органов, тканей, клеток и их мельчайших компонентов — белков, ДНК, метаболитов (в т. ч. витаминов и других микронутриентов), в рамках фундаментальных основ молекулярной биологии и биохимии. Так, на основе информации определённой геномной ДНК синтезируется соответствующий белок, выполняющий строго очерченный круг специфических функций. Как мутации гена, так и дефициты кофакторов белка (ионов металлов — кальция, магния, цинка, витаминов группы В и др.) будут приводить к падению активности тех или иных белков и проявлению той или иной специфической клинической симптоматики.

Метод анализа функциональных взаимосвязей, соединяя данные различных уровней (данные о моногенных заболеваниях, биохимические данные о кофакторах белков, данные о клеточных ролях белков, симптоматика и критерии диагностики заболеваний и т. д.), позволяет систематически рассмотреть все возможные функциональные эффекты воздействия кальцитриола на транскрипцию каждого из генов. В целом, при использовании метода анализа функциональных взаимосвязей для каждого гена человека составляется аннотированная таблица изменений экспрессии генов, включающая следующие описания [2]: соответствующий гену белок, список биохимически необходимых эссенциальных кофакторов белка (в т. ч. с указанием потребности ионов кальция для активности рассматриваемого белка), список моногенных заболеваний, связанных с полной или частичной потерей активности этого белка, список клеточных функций белка (по номенклатуре GO и др.), список отдельных симптомов заболеваний, список диагнозов по МКБ-10 и другая информация из баз данных.

Далее, в полученной таблице выделяются гены, частота встречаемости функциональных описаний которых существенно отличается при достоверном повышении экспрессии по сравнению с достоверным снижением экспрессии, и проводятся последующие анализы их функций на основании статистических критериев. Для статистической обработки результатов исследования использовались методы математической статистики, включающие расчёт числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия χ -квадрат, Т-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни и теста Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Хемотранскриптомный анализ (24 ч инкубации) показал достоверные дозозависимые эффек-

ты витамина D₃ на транскрипцию 3 620 генов в линии клеток MCF7 и 4 465 генов в линии клеток NPC. При этом изменения транскрипции 2 831 генов были приблизительно одинаковы в обеих линиях клеток. Достоверные дозозависимые изменения транскрипции соответствовали значению $p < 0,05$ (t-тест), модулю коэффициента корреляции более 0,5 и изменению транскрипции на 5 % или более в расчёте на 1 мкмоль витамина D₃. Для опухолевых клеток MCF7 экспрессия 1 012 генов снизилась (список генов «MCF7-»), а экспрессия 2 607 генов повысилась (список «MCF7+»). В случае нейрональных клеток NPC экспрессия 2010 генов снизилась (список «NPC-»), а экспрессия 2 454 генов повысилась (список «NPC+»). Таким образом, даже наблюдаемые различия в числах генов указывают на дифференцированность воздействия витамина D₃ на разные типы клеток.

Для установления более детальных закономерностей в группах генов, экспрессия которых дозозависимо повышалась или снижалась при моделировании воздействия витамина D₃, был проведён сравнительный системно-биологический анализ четырёх списков генов. В ходе проведения системно-биологического анализа были выявлены различия в частоте встречаемости ключевых слов в описаниях генов (данные UNIPROT), функциональных категорий генов/белков по номенклатуре GO (Gene Ontology), данных о встречаемости различных кофакторов, ассоциированных с генами заболевания и элементы реактома человека.

Анализы с использованием функциональной аннотации генов по международной номенклатуре «GO» позволили установить дифференцированное действие витамина D на опухолевые клетки и на нейрональные клетки. Были установлены достоверные отличия в экспрессии генов, относящихся к 97 категориям номенклатуры «GO». Экспертный анализ позволил рубрицировать эти 97 категорий в 9 функциональных групп генов: «Синтез/транспорт белка», «Регуляция экспрессии генов», «Ремонт ДНК», «Энергетический метаболизм», «Деление клеток», «Воспаление», «Внутриклеточная передача сигнала», «Деградация белка», «Иммунomodуляция» (табл. 1, 2). На рис. 3 отражены профили частоты встречаемости генов этих 9 функциональных групп в зависимости от количественного изменения экспрессии гена на 1 мкмоль витамина D₃.

Хемотранскриптомный анализ показал, что под воздействием витамина D₃ в линии NPC нейрональных клеток может изменяться транскрипция гораздо большего числа генов (4 465 генов), чем в линии MCF7 опухолевых клеток (3 620 генов). Тем не менее, из 97 выявленных категорий функций генов по номенклатуре GO, достоверные изменения экспрессии генов из 73 катего-

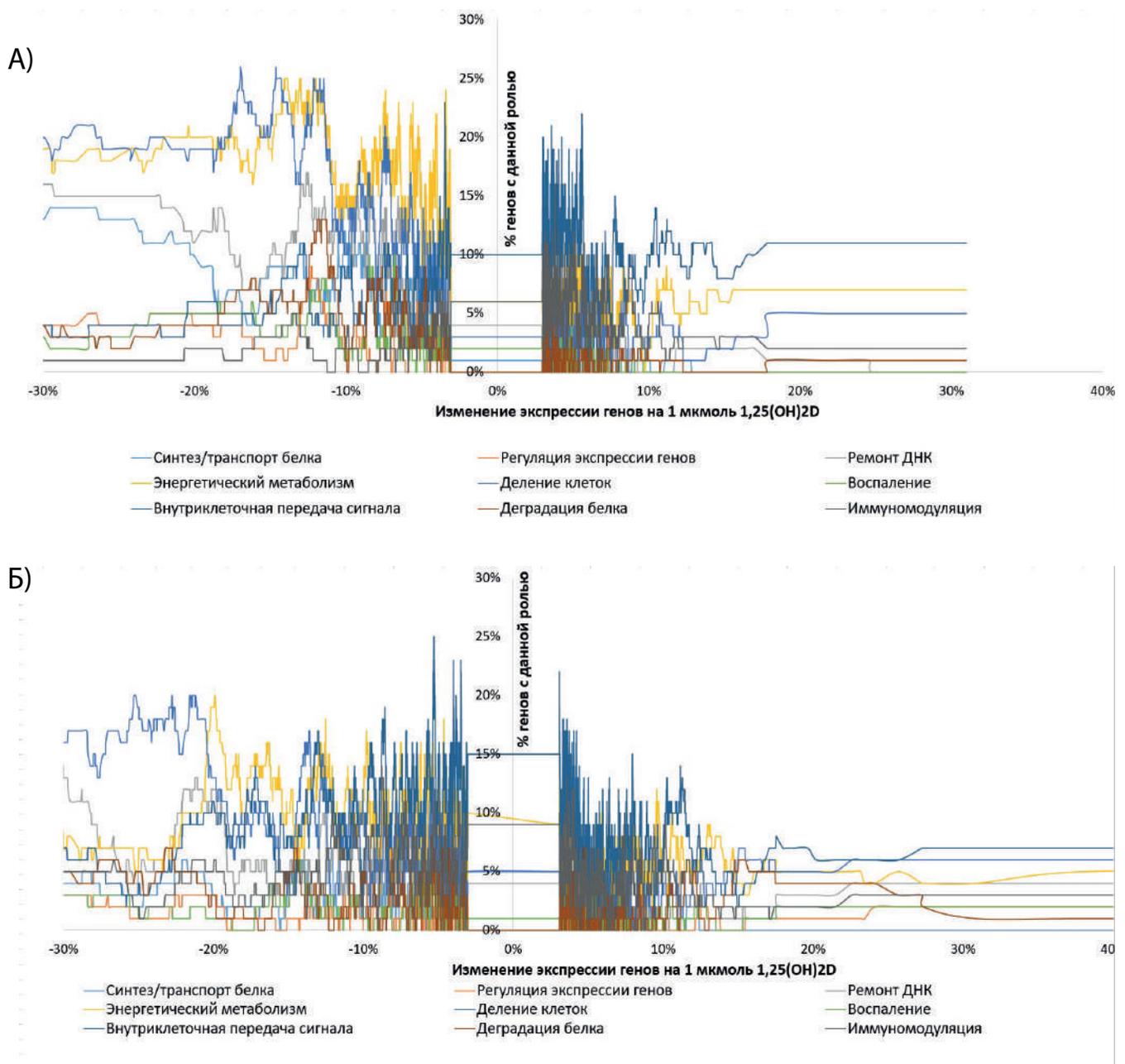


Рис. 3. Частота встречаемости генов каждой из 9 функциональных групп, экспрессия которых дозозависимо изменяется при воздействии витамина D₃ на клетки (по результатам хемотранскриптомного анализа)

А) Профиль частоты встречаемости генов функциональных групп для опухолевых клеток MCF7. Очевидно, что экспрессия генов систематически снижается в группах генов «Синтез/транспорт белка», «Регуляция экспрессии генов», «Ремонт ДНК», «Энергетический метаболизм», «Деление клеток», «Воспаление», «Дegrадация белка»

Б) Профиль частоты встречаемости генов функциональных групп для нейрональных клеток NPC

рий GO наблюдались исключительно в линии опухолевых клеток MCF7 (табл. 2), но не в линии нейрональных клеток (табл. 1). Таким образом, 74 категории генов, перечисленные в табл. 2, описывают *дифференцированное противоопухолевое воздействие витамина D*.

На рис. 4. отображены числа генов «*n*-» и «*n*+», соответствующие функциональным категориям генов, перечисленным в табл. 1 и 2. Анализ профилей ча-

стоты встречаемости генов 9 функциональных групп (рис. 4 и данных на рис. 5) позволяет утверждать, что в опухолевых клетках MCF7 систематически снижается экспрессия генов из групп «энергетический метаболизм», «деление/пролиферация клеток», «ремонт ДНК», «синтез и транспорт белков», «поддержание хронического воспаления». Одновременно, в опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия

Таблица 1

Категории международной номенклатуры генов GO (Gene Ontology), экспрессия генов в которых одинаковым образом изменялась в обеих линиях клеток (опухолевых MCF7, нейрональных NPC) при воздействии витамина D₃

Категория GO	Описание категории GO	n-	n+	P
	Синтез/транспорт белка			
[GO:0070125]	трансляция белка в митохондриях	35	1	1,25E-08
[GO:0006409]	экспорт тРНК из ядра	19	1	5,46E-05
[GO:0005761]	митохондриальная рибосома	13	0	0,000305
	Регуляция экспрессии генов			
[GO:0060964]	регулирование подавления генов посредством микроРНК	28	1	4,85E-07
	Ремонт ДНК			
[GO:0036297]	межниточный перекрестный ремонт ДНК	21	1	1,9E-05
[GO:0032201]	поддержание теломер через полуконсервативную репликацию	31	2	3,99E-07
[GO:0032212]	позитивное регулирование поддержания теломер посредством теломеразы	14	2	0,002647
[GO:1900034]	регулирование клеточного ответа на тепло	35	8	3,48E-05
	Энергетический метаболизм			
[GO:0006110]	регуляция гликолитического процесса	19	1	5,46E-05
	Деление клеток			
[GO:0007052]	организация митотического шпинделя	19	1	5,46E-05
[GO:0060071]	сигнальный путь Wnt	40	7	1,28E-06
[GO:0051301]	деление клеток	136	28	7,19E-18
[GO:0090263]	позитивная регуляция канонического сигнального пути Wnt	40	11	4,37E-05
[GO:0000278]	клеточный цикл (митоз)	41	12	6,07E-05
[GO:0000086]	G2/M митотический переход	47	14	2,06E-05
[GO:0071850]	остановка клеточного цикла	1	7	0,033717
	Воспаление			
[GO:0038061]	передача сигналов через NF-κB	36	4	3,67E-07
	Внутриклеточная передача сигнала			
[GO:0070374]	позитивное регулирование каскадов ERK1 и ERK2	7	31	9,16E-05
[GO:0007188]	аденилатциклаза-модулирующий G-белковый сигнальный путь рецепторов	0	7	0,008095
	Деградация белка			
[GO:0000502]	протеасомный комплекс	32	2	2,38E-07
[GO:0031398]	позитивная регуляция убиквитирования белков	14	5	0,038484
	Иммуномодуляция			
[GO:1901687]	процесс биосинтеза производных глутатиона	1	7	0,033717
[GO:0071347]	клеточный ответ на интерлейкин-1	2	15	0,001579
[GO:0071354]	клеточный ответ на интерлейкин-6	0	5	0,025256
[GO:0070498]	сигнальный путь интерлейкина-1	0	4	0,045392

Примечания: «n-» – число генов со сниженной экспрессией; «n+» – число генов со повышенной экспрессией при воздействии витамина D₃; p – статистическая достоверность различий по критерию χ².

Категории международной номенклатуры генов GO (Gene Ontology), экспрессия генов в которых при воздействии витамина D₃ достоверно изменялась только в линии опухолевых MCF7

Категория GO	Описание категории GO	n-	n+	P
	Синтез/транспорт белка			
[GO:0006626]	трансляция белка в митохондриях	19	1	5,46E-05
[GO:0030150]	экспорт тРНК из ядра	10	1	0,006581
[GO:0000028]	сборка малой рибосомальной субъединицы	10	1	0,006581
[GO:0032543]	митохондриальный синтез белка	10	1	0,006581
[GO:0006400]	модификация тРНК	5	0	0,025256
[GO:0046826]	отрицательная регуляция экспорта белка из ядра	5	0	0,025256
[GO:0005840]	рибосома	14	3	0,007505
[GO:0006413]	иницирование синтеза белка (трансляции)	35	8	3,48E-05
[GO:0061077]	фолдинг белков	13	3	0,012245
	Регуляция экспрессии генов			
[GO:0003899]	5'-3'-РНК-полимеразная активность	18	0	2,12E-05
[GO:0000375]	сплайсинг мРНК	13	0	0,000305
[GO:0006362]	продолжение транскрипции от промотора РНК-полимеразы I	13	1	0,001315
[GO:0006361]	инициация транскрипции от промоторов РНКазы-1	13	1	0,001315
[GO:0048026]	позитивная регуляция сплайсинга мРНК	10	1	0,006581
	Ремонт ДНК			
[GO:0006303]	ремонт двухконцевых обрывов ДНК	25	0	5,28E-07
[GO:0006297]	ресинтез ДНК при ремонте ДНК	23	1	6,66E-06
[GO:0042276]	синтез ДНК поверх повреждений, подверженный ошибкам	20	0	7,35E-06
[GO:0070987]	безошибочный синтез ДНК поверх повреждений	18	0	2,12E-05
[GO:0000731]	синтез ДНК при ремонте ДНК	18	1	9,25E-05
[GO:0006284]	ремонт ДНК посредством вырезки повреждённых нуклеотидов	15	0	0,000104
[GO:0045739]	позитивная регуляция репарации ДНК	14	0	0,000178
[GO:0006301]	ремонт ДНК после репликации	11	1	0,003839
[GO:0043968]	ацетилирование гистона H2A	9	1	0,011309
[GO:0003684]	связывание повреждённой ДНК	26	3	1,81E-05
[GO:0031571]	контрольная точка повреждения ДНК G1	7	1	0,033717
[GO:0000076]	контрольная точка репликации ДНК	5	0	0,025256
[GO:0043097]	переработка пиримидиновых нуклеозидов	5	0	0,025256
[GO:0000002]	поддержание митохондриального генома	5	0	0,025256
[GO:0071480]	клеточный ответ на гамма-излучение	9	4	0,034559
[GO:0070911]	глобальный ремонт геномной ДНК вырезкой нуклеотидов	9	2	0,034559
[GO:0010224]	ответ на УФО	4	0	0,045392
[GO:0034644]	клеточный ответ на УФО	11	3	0,032206
[GO:0006977]	отклик на повреждение ДНК, передача сигнала посредством p53, приводящая к остановке клеточного цикла	19	6	0,009103
[GO:0060548]	отрицательная регуляция апоптоза	15	5	0,024982
[GO:0000723]	поддержание теломер	22	10	0,033183
	Внутриклеточная передача сигнала			
[GO:0006120]	митохондриальный перенос электронов, от НАДФ к убихинону	16	1	0,000267
[GO:0008137]	активность НАДФ-дегидрогеназы	15	1	0,000453
[GO:0005747]	митохондриальный комплекс I дыхательной цепи	15	1	0,000453

[GO:0001836]	высвобождение цитохрома с из митохондрий	7	0	0,008095
[GO:0006119]	окислительное фосфорилирование	6	0	0,014233
[GO:0005753]	митохондриальный АТФ-синтазный комплекс	6	0	0,014233
[GO:0006094]	глюконеогенез	16	4	0,007145
[GO:0051156]	метаболизм глюкозо-6-фосфата	4	0	0,045392
[GO:0051539]	кофактор 4/4-железо-серный кластер	14	5	0,038484
[GO:0005759]	матрикс митохондрий	81	35	1,46E-05
[GO:0005739]	митохондрия	283	133	7,88E-15
	Деление клеток			
[GO:0070374]	позитивное регулирование каскадов ERK1 и ERK2	7	31	9,16E-05
[GO:0007188]	аденилатциклаза-модулирующий G-белковый сигнальный путь рецепторов	0	7	0,008095
	Деградация белка			
[GO:0008543]	сигнальный путь рецептора фактора роста фибробластов	25	5	0,000247
[GO:0005657]	репликационная "вилка"	5	0	0,025256
[GO:0046655]	метаболизм фолиевой кислоты	5	0	0,025256
[GO:0015631]	связывание тубулина	16	4	0,007145
[GO:0035999]	интерконверсия тетрагидрофолатов	4	0	0,045392
[GO:0070531]	комплекс BRCA1-A (подавление роста опухолей)	4	0	0,045392
[GO:0045652]	регуляция дифференциации мегакариоцитов	4	13	0,028708
	Воспаление			
[GO:0033209]	сигнальный путь ФНО-альфа	35	9	8,1E-05
[GO:0032481]	позитивная регуляция синтеза интерферона типа I	14	4	0,01816
[GO:0035722]	сигнальный путь интерлейкина-12	20	9	0,040355
	Внутриклеточная передача сигнала			
[GO:0007165]	передача сигнала	76	130	0,000112
[GO:0005509]	связывание ионов кальция	45	87	0,000201
[GO:0001972]	связывание ретиноидов рецепторами	0	5	0,045069
[GO:0007259]	каскад JAK-STAT	0	8	0,004637
[GO:0030574]	катаболизм коллагена	2	13	0,004434
[GO:0045597]	положительная регуляция клеточной дифференциации	0	7	0,008095
	Деградация белка			
[GO:0019773]	альфа-субъединица протеасомы	7	0	0,008095
[GO:0000209]	полиубиквитирование белков	68	20	2,29E-07
[GO:0042787]	убиквитирование и катаболизм белков	30	13	0,009147
	Деградация белка			
[GO:0010629]	отрицательная регуляция экспрессии генов	18	34	0,025525
[GO:0006955]	иммунный ответ	12	42	3,95E-05
[GO:0002250]	адаптивный иммунный ответ	6	31	3,64E-05
[GO:0030593]	хемотаксис нейтрофилов	2	13	0,004434
[GO:0038111]	сигнальный путь интерлейкина-7	1	8	0,019493
[GO:0043124]	отрицательная регуляция IκB-киназы/NF-κB	1	9	0,011309
[GO:0042347]	отрицательная регуляция импорта NF-κарраВ в ядро клетки	0	4	0,045392

Примечания: «n-» – число генов со сниженной экспрессией; «n+» – число генов со повышенной экспрессией; p – статистическая достоверность различий по критерию χ^2 .



Рис. 4. Функциональные аннотации по номенклатуре GO и изменения экспрессии генов, вызываемые витамином D₃ при воздействии на опухолевые клетки линии MCF7 (по результатам хемотранскриптомного анализа)

Примечание: Красным цветом обозначены группы генов по аннотации GO, экспрессия которых преимущественно повышалась. Синим цветом обозначены группы генов, экспрессия которых преимущественно снижалась.

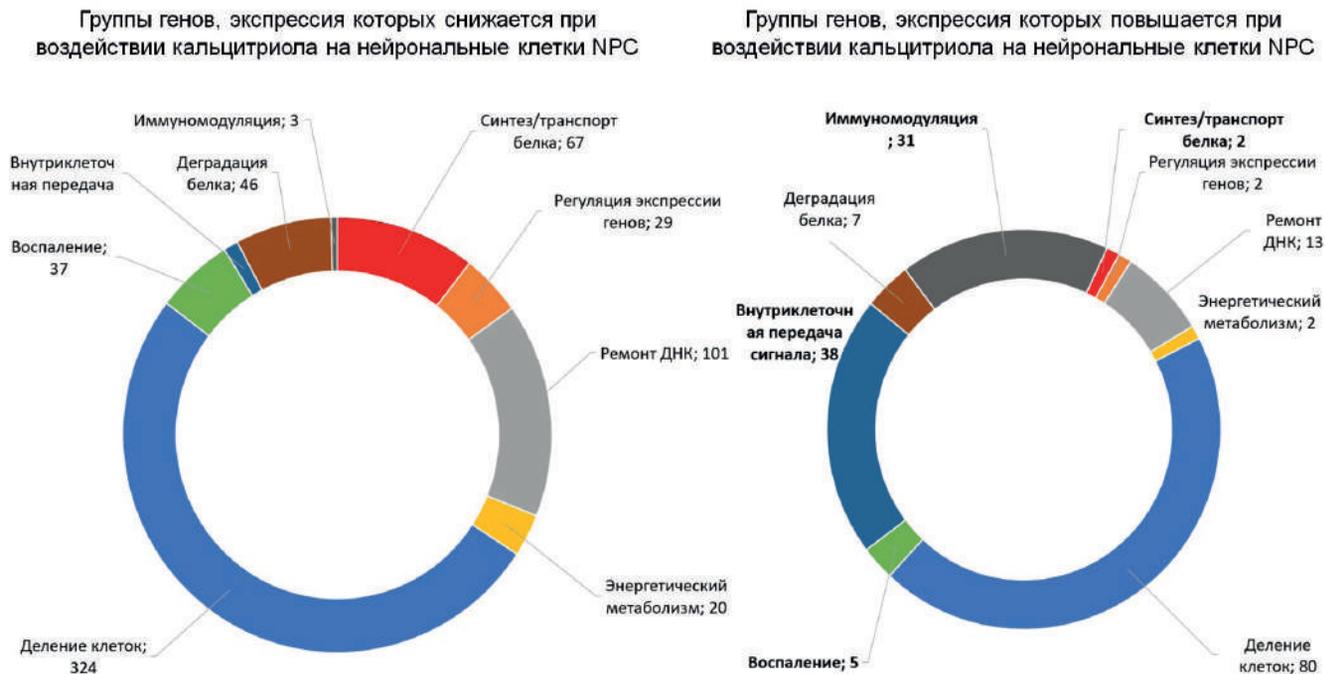


Рис. 5. Процентные соотношения встречаемости функциональных групп генов со сниженной и с повышенной экспрессией при воздействии витамина D₃ на клетки (по результатам хемотранскриптомного анализа)

генов, вовлечённых в иммуномодуляцию и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов.

Таким образом, гены, экспрессия которых дозозависимо повышается при воздействии витамина D₃, существенно отличаются по своим биологическим функциям от генов, экспрессия которых дозозависимо

понижается (на что наглядно указывают диаграммы процентных соотношений функциональных групп генов, см. рис. 5). Установленные изменения транскрипции имеют важную физиологическую интерпретацию.

Во-первых, хемотранскриптомный анализ витамина D₃ в опухолевых клетках MCF7 указывает на

систематическое снижение экспрессии генов, вовлечённых в синтез и транспорт белков (188 генов) и в деградацию белков (151 ген). Эти изменения соответствуют ингибированию *гомеостаза белков*: и новые белки синтезируются медленнее, и старые, дисфункциональные белки перерабатываются медленнее. Снижение протеасомального распада белков способствует снижению хронического воспаления (каскад NF-kB, см. далее) и, одновременно, увеличению продолжительности активации апоптотических сигнальных каскадов. Снижение синтеза белка (в т. ч. митохондриального синтеза белка, сплайсинг мРНК, транспорта и фолдинга белков) соответствует снижению количества ферментов, обеспечивающих метаболизм ксенобиотиков (в т. ч. противоопухолевых средств) и количества белков, участвующих в энергетическом метаболизме клетки (синтез АТФ).

Во-вторых, под воздействием витамина D₃ установлено выраженное снижение экспрессии генов, вовлечённых в энергетический метаболизм (482 гена, нейрональные клетки – только 20 генов, табл. 1, 2). Снижение экспрессии этих категорий генов (в т. ч. генов, кодирующих митохондриальные комплексы дыхательной цепи, ферменты окислительного фосфорилирования, метаболизма глюкозо-6-фосфата, НАДФ-дегидрогеназу и др. (табл. 2) соответствует *снижению обеспеченности опухолевых клеток АТФ*. Иначе говоря, витамин D₃ дифференцированно снижает энергообеспеченность именно опухолевых клеток, что способствует снижению интенсивности процессов пролиферации и сопротивляемость опухолевых клеток к терапевтическому воздействию.

В-третьих, витамин D₃ *способствует снижению транскрипции генов, непосредственно вовлечённых собственно в пролиферацию опухолевых клеток* (387 генов, нейрональные – 324 гена) и в процессы ремонта ДНК (391 ген, нейрональные – 101 ген). Белки, соответствующие этим генам, осуществляют такие фундаментальные процессы, как поддержание целостности теломер, ремонт ДНК, активность сигнального пути рецептора фактора роста фибробластов, метаболизм фолиевой кислоты и др. (табл. 1, 2). Снижение активности теломеразы соответствует уменьшению числа возможных делений клетки, а снижение ремонта ДНК является одним из механизмов преодоления резистентности опухолевых клеток к терапии [4]. Снижение ремонта ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, усиливая эффекты снижения синтеза АТФ.

В-четвёртых, хемотранскрипционный анализ указал на снижение транскрипции генов из функциональной группы «Хроническое воспаление» (MCF7 – 105 генов, нейрональные клетки – 37 генов). Гены этой группы вовлечены преимущественно в осуществление биологических эффектов провоспалительных факто-

ров ФНО-альфа и NF-kB. Установлено, что витамин D действительно ингибирует эффекты провоспалительного транскрипционного фактора NF-kB [1]. Результаты хемотранскрипционного анализа показывают, что данный механизм действия витамина D₃ осуществляется посредством предотвращения протеасомной деградации регуляторного белка IκB и торможения транслокации NF-kB внутрь клеточного ядра. Взаимодействуя с регулятором IκB, транскрипционный фактор NF-kB не может перемещаться в клеточное ядро и активировать экспрессию генов, опосредующих провоспалительные эффекты цитокина ФНО-альфа.

В-пятых, под воздействием витамина D₃ в опухолевых клетках MCF7 достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов). Экспрессия этих категорий генов повышалась и в нейрональных клетках, но в значительно меньшей степени (иммуномодуляция – 31 ген, внутриклеточная передача сигналов – 38 генов). Повышение экспрессии этих групп генов соответствует дифференцированному противоопухолевому действию витамина D.

Иммуномодуляция витамином D при воздействии на опухолевые клетки заключается в снижении хронического воспаления (экспрессия 9 генов отрицательной регуляции IκB-киназы/NF-kB и 4 генов отрицательной регуляции импорта NF-κappaB в ядро клетки) на фоне активации лимфоцитарного иммунного ответа. В опухолевых клетках MCF7 отмечено преимущественное повышение экспрессии генов, поддерживающих адаптивный иммунный ответ (31 ген), хемотаксис нейтрофилов (13 генов) и сигнальный путь интерлейкина-7 (8 генов). Интерлейкин-7 играет исключительно важную роль в делении и созревании клеток лимфоидного ряда; дефицит интерлейкина-7 может быть одной из причин тяжёлого комбинированного иммунодефицита [13].

Интенсификация *внутриклеточной передачи сигнала* также соответствует противоопухолевому действию витамина D. Опухолевые заболевания характеризуются выраженной активацией пролиферативных сигнальных каскадов на фоне блокады каскадов, регулирующих дифференцировку клеток [14]. Поэтому, в ходе противоопухолевой терапии необходима поддержка внутриклеточной передачи сигнала, поддерживающей дифференциацию клеток.

В клетках MCF7 витамин D₃ стимулирует экспрессию генов, поддерживающих положительную регуляцию клеточной дифференциации (категория [GO:0045597], 7 генов). В частности, каскад JAK-STAT (8 генов) стимулирует дифференциацию клеток эпителия молочных желёз [15]. Стимулируя, экспрессию генов в категории [GO:0030574] «ката-

близм коллагена» (13 генов), витамин D снижает жёсткость внеклеточного матрикса вокруг опухолевых клеток. Известно, что повышенная механическая жёсткость внеклеточного матрикса вызывает механосенситивную передачу сигнала в мезенхимальных клетках, которая стимулирует пролиферацию клеток опухолей молочной железы [16]. Кроме того, рецепторы ретиноидов (категория [GO:0001972] «связывание рецепторами ретиноидов») способствуют подавлению роста опухолей через сигнальные каскады p53/p21/p16 и PI3K-AKT, способствуя ингибированию метаболизма углеводов опухолевых клеток и нормализации процессов дифференциации [17]. Таким образом, витамин D способствует усилению противоопухолевых эффектов витамина A.

Крайне интересно отметить, что витамин D способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих клеточный ответ на гамма-излучение (категория [GO:0071480], 9 генов). Например, витамин D₃ способствует снижению экспрессии гена ATR (в среднем, на 8 % на 1 мкмоль витамина D₃). Это ген кодирует одноимённый белок ATR – серин/треониновую протеинкиназу, которая действует как датчик повреждения ДНК и активирует внутриклеточную сигнализацию при ионизирующем излучении или ультрафиоле-

товом излучении. ATR фосфорилирует белки BRCA1, CHEK1, MCM2, RAD17, RPA2, SMC1, p53/TP53, гистоны H2AX/H2AFX, тем самым регулируя механизм ответа на повреждение ДНК [18, 19]. Витамин D₃ также снижает экспрессию генов (TMEM109, трансмембранный белок 109, опосредует клеточный ответ на повреждение ДНК излучением [20]), XRCC5 (белок репарации ДНК, участвует в стабилизации повреждённых концов ДНК [21]), GTF2H5 (транскрипционный фактор, восстанавливает повреждения нуклеотидов) и др. Снижение экспрессии генов этой функциональной категории способствует усилению отклика опухолевых клеток на радиотерапию.

В заключение приведём ещё несколько примеров конкретных генов, экспрессия которых дозозависимо изменялась при хемотранскриптомном моделировании эффектов витамина D на опухолевые клетки MCF7. Витамин D снижал экспрессию генов, ингибиторы белков которых являются перспективными противоопухолевыми препаратами (казеинкиназа, c-src тирозинкиназа, c-тус и др. – см. табл. 3 и рис. 5).

Следует отметить, что многие из перечисленных в табл. 2 и на рис. 4–6 изменений транскрипции генов под воздействием витамина D₃ соответствуют действию уже имеющихся или перспективных про-

Таблица 3

Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамина D₃ (по результатам хемотранскриптомного анализа)

Ген	% ИЭ	Белок	Функция белка
CSNK1A1	-46,5	Казеинкиназа альфа-1	Передача сигналов в каскаде Wnt
CSK	-32,5	c-src тирозинкиназа	Подавляет передачу сигналов различными рецепторами
MTHFD1	-29,6	Метилтетрагидрофолат дегидрогеназа	Синтез биологически активных фолатов
ZDNHC7	-24,3	Цинковый палец ZDNHC7	Пальмитоилирует рецепторы эстрогенов
HSD17B10	-23,7	Гидроксистероид 17-бета дегидрогеназа 10	Катализирует 17-бета-окисление андрогенов
KLF8	-22,8	Крупель-подобный фактор 8	Способствует прогрессии цикла деления клетки
MYCBP	-20,4	c-тус-связывающий белок	Активирует транскрипционную активность MYC-киназы
PLCB3	11,5	Фосфолипаза С-бета-3 фосфатидилинозитол-специфическая	Синтез сигнальных молекул диацилглицерина (ДАГ) и инозитол-1.4.5-трифосфата (ИФ3)
CTNNBIP1	12,0	Бета-катенин-взаимодействующий белок 1	Отрицательный регулятор сигнального пути Wnt
RASSF4	12,5	Ras-ассоциированный 4	Супрессор роста опухолей
DDIT4	14,5	Транскрипт 4, индуцируемый повреждением ДНК	Ингибирует белок mTORC1 через сигнальный путь AKT1-TSC1/2-RHEB
IRF5	15,6	Интерферон-регуляторный фактор 5	Участвует в активации транскрипции интерферонов A и B

Примечание: %ИЭ – процент изменения экспрессии на 1 мкмоль витамина D₃.

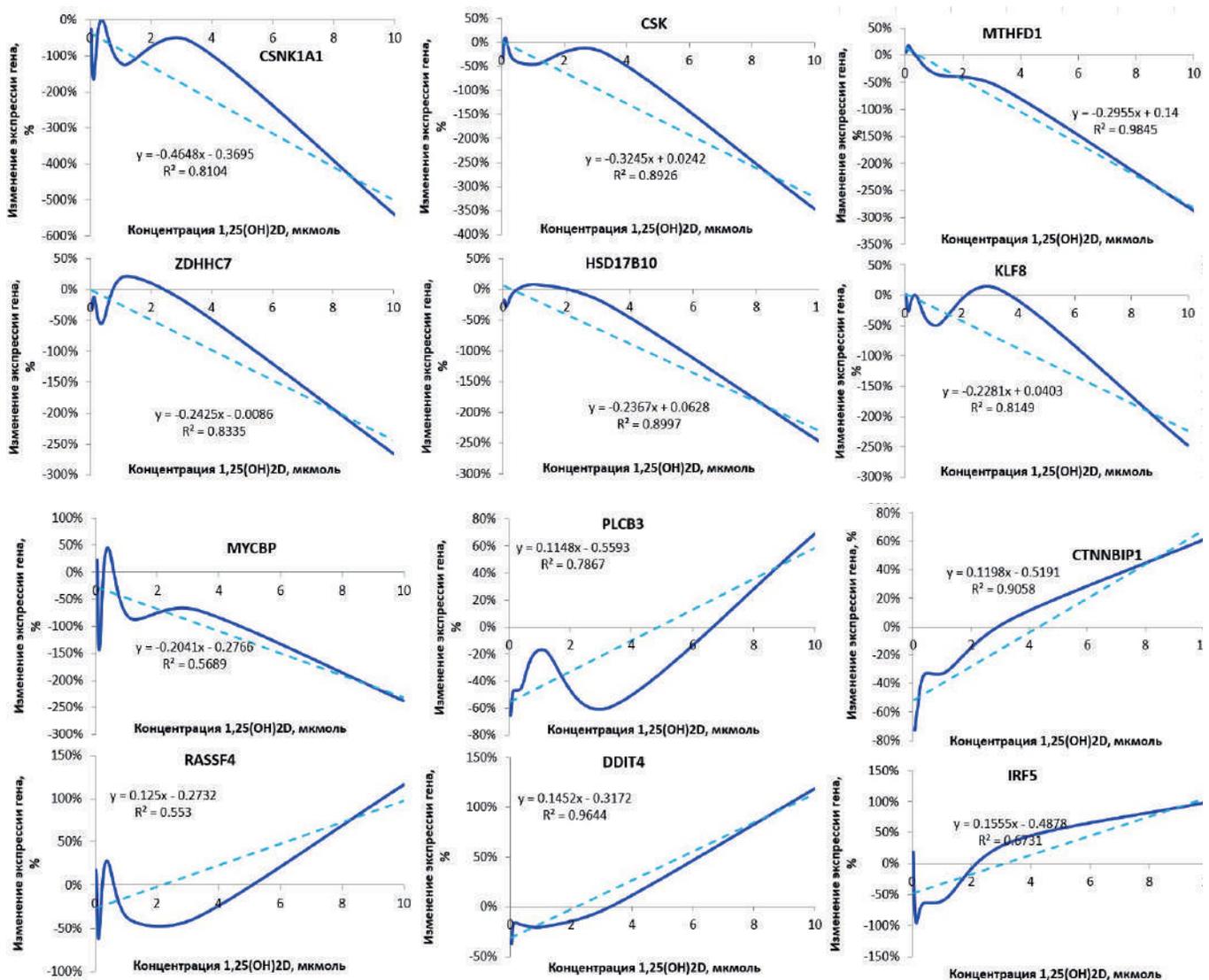


Рис. 6. Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамин D₃ (по результатам хемотранскриптомного анализа)

тивоопухолевых препаратов. Например, снижение транскрипции гена CSNK1A1 (-46,48 % на 1 мкМ), кодирующего казеинкиназу альфа-1, соответствует снижению количества молекул этого фермента в клетке. Казеинкиназы участвуют в передаче сигналов Wnt посредством фосфорилирования белков, а ингибиторы казеинкиназ – перспективные противоопухолевые препараты [22]. Повышение транскрипции гена CTNNB1P1 (11,98 % на 1 мкМ) соответствует увеличению общей внутриклеточной активности бета-катенин-взаимодействующего белка 1, который действует как отрицательный регулятор сигнального пути Wnt. Многие ингибиторы пути Wnt используются как противоопухолевые средства [23].

Снижение транскрипции генов CSK (-32,45 % на 1 мкМ), MYCBP (-20,41 % на 1 мкМ) и MTHFD1 (-29,55 % на 1 мкМ) также соответствует действию

противоопухолевых средств. Ген CSK кодирует c-src тирозинкиназу, которая участвует в регуляции роста дифференцировки, миграции клеток и иммунного ответа (фосфорилирует киназы LCK, SRC, HCK, FYN, LYN и подавляет передачу сигналов различными рецепторами [24]. Ген MYCBP, кодирующий с-тус-связывающий белок, необходим для активации транскрипционной активности MYC-киназы. Ингибиторы MYC-киназы – перспективные противоопухолевые средства. Ген MTHFD1 кодирует метилентетрагидрофолат дегидрогеназу, участвующую в эндогенном синтезе биологически активных фолатов. Как известно, антифолиевые препараты (метотрексат, триметоприм, азатиоприн, азидотимидин) являются противоопухолевыми препаратами.

Витамин D способствует снижению транскрипции генов, участвующих в метаболизме стероидных

гормонов. Ген ZDHHC7 (-24,25 % на 1 мкМ) кодирует «цинковый палец» ZDHHC7, который необходим для пальмитоилирования рецепторов эстрогенов (ESR1), прогестерона (PGR) и андрогенов (AR), направляя их в плазматическую мембрану клетки и, тем самым, усиливая действие этих стероидов на клетку [25]. Одновременно снижается транскрипция гена HSD17B10 (-23,67 % на 1 мкМ), кодирующего гидроксистероид-17-бета дегидрогеназу 10, катализирующую 17-бета-окисление андрогенов и эстрогенов. Противдействие витамином D эффектам стероидных гормонов особенно важно для такой эстроген-зависимой опухолевой линии клеток, как MCF7 [25].

Витамин D также способствует *повышению транскрипции генов, кодирующих белки с известным противоопухолевым действием*: RASSF4 (12,50 % на 1 мкМ, белок «Ras-ассоциированный домен 4» – супрессор роста опухолей, способствующий остановке цикла деления клетки и апоптозу [26]), DDIT4 (14,52 % на 1 мкМ, «транскрипт-4, индуцируемый повреждением ДНК» – ингибирует mTORC1 через сигнальный путь AKT1-TSC1/2-RHEB, активирует апоптоз в ответ на повреждение ДНК [27]), SLURP1 (18 % на 1 мкМ, белок SLURP1 обладает противоопухолевой активностью [28]) и др.

Таким образом, хемотранскриптомный анализ витамина D₃ указал на характерные изменения транскрипции генов, способствующие снижению интенсивности метаболизма белков и ДНК, снижению пролиферации клеток и хронического воспаления и, в целом, противоопухолевым эффектам. При этом было показано дифференциальное действие витамина D₃ именно на опухолевые клетки (MCF7); на нейроны витамин D₃, наоборот, оказывал разноплановое цитопротекторное действие.

Противоопухолевое действие витамина D₃ в составе «Аквадетрима» было продемонстрировано экспериментально. Исследование было проведено на 50 самцах мышей-гибридов F1 (возраст 2,5–3 мес., масса тела 26–29 г). В качестве опухолевой модели использована перевиваемая эпидермоидная карцинома лёгких Льюис (КЛЛ). Подопытные животные легко переносили препарат, не было отмечено каких-либо симптомов интоксикации. Воздействие препарата до 13 сут. развития КЛЛ сопровождалось нарастающей тенденцией торможения роста опухоли на 25–30 % ($p = 0,016$). В группе животных, получавших Аквадетрим, наблюдались отчётливые признаки подавления процессов метастазирования – число малых метастазов статистически значимо снижалось на 35–40 % ($p < 0,05$) [29]. Таким образом, препарат Аквадетрим, действующим началом которого является витамин D в водном растворе мицелл, достоверно подавляет процессы метастазирования карциномы лёгких Лью-

ис. Результаты хемотранскриптомного исследования указывают на механизмы дифференциального противоопухолевого воздействия препарата.

Заключение

Исследование транскриптомных эффектов препаратов представляет собой «передовой фронт» современной молекулярной фармакологии и позволяют установить неочевидные механизмы действия препаратов, более детально очертить спектр патологий, на которые может благоприятно воздействовать исследуемая молекула. Как правило, для подавляющего большинства имеющихся на рынке лекарств данные о воздействии на транскриптом отсутствуют. В то же время изучать эффекты лекарств на транскрипцию генов крайне важно, т. к. транскриптомные исследования указывают на долговременные последствия приёма лекарств [2]. Изучение долговременных, транскриптомных эффектов прогормона витамина D особенно важно в случае его противоопухолевых активностей.

В настоящей работе представлены результаты дифференциального хемотранскриптомного анализа витамина D₃ (Аквадетрим) по отношению к клеткам опухоли молочной железы (линия MCF7) и к клеткам-предшественникам нейронов (линия NPC) в условиях инкубации клеток с витамином D₃ в течение 24 ч. Достоверные дозозависимые эффекты влияния витамина D₃ на транскрипцию генов (что соответствует изменению транскрипции на 5 % или более на 1 мкмоль витамина D₃) показаны для 3 620 генов в линии клеток MCF7 и для 4 465 генов в линии клеток NPC. При этом оценки изменений экспрессии 2 831 генов были приблизительно одинаковы в обеих линиях клеток. Анализы с использованием функциональной аннотации генов по международной номенклатуре «GO» позволили установить дифференцированное действие витамина D на опухолевые клетки и на нейрональные клетки. Были установлены достоверные отличия в экспрессии генов, относящихся к 97 категориям номенклатуры «GO». В опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов). Экспрессия этих категорий генов повышалась и в нейрональных клетках, но в значительно меньшей степени (иммуномодуляция – 31 ген, внутриклеточная передача сигналов – 38 генов). В опухолевых клетках существенно снижалась экспрессия генов, вовлечённых в поддержание энергетического метаболизма (482 гена), деление/пролиферацию клеток (387 генов), ремонт ДНК (391 ген), синтез и транспорт белков (188 генов) и в поддержание хронического воспаления

(факторы ФНО/NF- κ B, 105 генов). В нейрональных клетках количества генов в этих категориях были существенно ниже (энергетический метаболизм – 20 генов, пролиферация клеток – 324 гена, ремонт ДНК – 101 ген, синтез/транспорт белков – 67 генов, поддержание воспаления – 37 генов). Снижение ремонта ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, снижение энергетического метаболизма снижает способность опухолевых клеток к делению и к сопротивлению терапевтическому воздействию. Интересно отметить, что витамин D₃ способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих кле-

точный ответ на гамма-излучение (9 генов) и способствовал усилению противоопухолевых эффектов витамина А (5 генов). Также витамин D снижал экспрессию генов, ингибиторы белков которых являются перспективными противоопухолевыми препаратами (казеинкиназа, с-src тирозинкиназа, с-тус и др.). Таким образом, витамин D₃ в существенной мере подавляет деление именно опухолевых клеток, одновременно профилируя неврологические осложнения противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ17-07-00935.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Громова Ольга Алексеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: unesco.gromova@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7663-710X

SPIN-код: 6317-9833

д. м. н., профессор, в. н. с., научный руководитель института фармакоинформатики, ФИЦ ИУ РАН, Москва; в. н. с., МГУ, Москва

Gromova Olga

Corresponding author

e-mail: unesco.gromova@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7663-710X

SPIN-код: 6317-9833

DM, professor, Leading Researcher, Head of Institute of pharmacoinformatics FRC CSC RAS, Moscow; Leading Researcher, MSU, Moscow

Торшин Иван Юрьевич

ORCID iD 0000-0002-2659-7998,

SPIN-код: 1375-1114

к. х. н., с. н. с., ФИЦ ИУ РАН, Москва; с. н. с., МГУ, Москва

Torshin Ivan

ORCID iD 0000-0002-2659-7998,

SPIN code: 1375-1114

PhD in Chemistry, Senior researcher in of Institute of Pharmacoinformatics at the Department of Intellectual Systems FRC CSC RAS, Moscow; Senior Research Officer MSU, Moscow

Фролова Дарья Евгеньевна

ассистент кафедры онкологии, ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Frolova Daria

assistant of Oncology Department, FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Гришина Татьяна Романовна

ORCID ID: 0000-0002-1665-1188

SPIN-код: 1241-0701

д. м. н., профессор, зав. кафедрой фармакологии, ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Grishina Tatiana

ORCID ID: 0000-0002-1665-1188

SPIN code: 1241-0701

DM, professor, Head of Department of pharmacology, FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Лапочкина Нина Павловна

ORCID ID: 0000-0001-6722-2810

ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Lapochkina Nina

ORCID ID: 0000-0001-6722-2810

FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Литература / References

1. Громова О.А., Торшин И.Ю. *Витамин D. Смена парадигмы* / под ред. Е.И. Гусева, И.Н. Захаровой. – М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017. – 568 с. [Gromova OA, Torshin IYu. *Vitamin D. Smena paradigmy*. Ed by EI Guseva, IN Zakharova. Moscow: GEOTAR-Media; 2017. (In Russ).]. ISBN 978-5-9704-4058-2.
2. Torshin IYu. *Sensing the change: from molecular genetics to personalized medicine*. Nova Biomedical Books. NY. USA. 2009. In “Bioinformatics in the Post-Genomic Era” series. ISBN 1-60692-217-0.
3. Громова О.А., Торшин И.Ю., Спиричев В.Б. Полногеномный анализ сайтов связывания рецептора витамина D указывает на широкий спектр потенциальных применений витамина D в терапии // *Медицинский совет*. – 2016. – №1. – С.12–21. [Gromova OA, Torshin IYu, Spirichev VB. The genome-wide analysis of the vitamin D receptor binding sites evidences a wide range of potential therapeutic applications of vitamin D. *Meditsinskiy Sovet*. 2016;1:12–21. (In Russ).]. DOI:10.21518/2079-701X-2016-1-12-21
4. Свирновский А.И. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям как медико-биологическая проблема. *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье*. – 2014. – Т.11. – №5. – С.15–38. [Svirnovski AI. Rezistentnost' opukholevykh kletok k terapevticheskim vozdeystviyam kak mediko-biologicheskaya problema. *Mezhdunarodnye obzory: klinicheskaya praktika i zdorov'e*. 2014;11(5):15–38. (In Russ).]. DOI: 10.21518/2079-701X-2016-1-12-21
5. Torshin IYu, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. part 1: fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2014;24(1):11–23. DOI: 10.1134/S1054661814010209
6. Торшин И.Ю., Громова О.А., Федотова Л.Э., и др. Хемоинформационный анализ молекулы оротовой кислоты указывает на противовоспалительные, нейропротекторные и кардиопротекторные свойства лиганда магния // *Фарматека*. – 2013. – Т.266 – №13. – С.95–104. [Torshin IYu, Gromova OA, Fedotova LE, et al. Chemoinformation analysis of orotic acid molecule indicates anti-inflammatory, neuroprotective and cardioprotective properties of the magnesium ligand. *Pharmateca*. 2013;266(13):95–104. (In Russ).]
7. Torshin IYu. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2011;21(4):652–662. DOI: 10.1134/S1054661811040171
8. Torshin IYu, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. part 1: factorization approach. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017;27(1):16–28. DOI: 10.1134/S1054661817010151
9. Torshin IYu, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs: Part 2. Local completeness of invariants of chemographs in view of the combinatorial theory of solvability. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2014;24(2):196–208. DOI: 10.1134/S1054661814020151
10. Громова О.А., Торшин И.Ю., Федотова Л.Э., Громов А.Н. Хемореактомный анализ сукцината этилметилгидроксипиридина // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. – 2016. – Т8. – №3. – С.53–60. [Gromova OA, Torshin IYu, Fedotova LE, Gromov AN. Chemoreactome analysis of ethylmethylhydroxypyridine succinate. *Neurologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika. Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*. 2016;8(3):53–60. (In Russ).]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2016-3-53-60>
11. Громова О.А., Торшин И.Ю., Федотова Л.Э. Геронтоинформационный анализ свойств молекулы мексидола // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. – 2017. – Т.9. – №4. – С.46–54. [Gromova OA, Torshin IYu, Fedotova LE. Geriatric information analysis of the molecular properties of mexidole. *Neurologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika*. 2017;9(4):46–54. (In Russ).]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2017-4-46-54>
12. Торшин И.Ю., Громова О.А., Сардарян И.С., Федотова Л.Э. Сравнительный хемореактомный анализ мексидола // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2017. – Т.117. – №1-2. – С.75–83. [Torshin IYu, Gromova OA, Sardaryan IS, Fedotova LE. A comparative chemoreactome analysis of mexidol. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(1-2):75–83. (In Russ).]. DOI: 10.17116/jnevro20171171275-84
13. Huang HY, Luther SA. Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs. *Semin Immunol*. 2012;24(3):175–89. DOI: 10.1016/j.smim.2012.02.008.
14. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(4). pii: 5/4/a006098.
15. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer*. 2015;113(3):365–71. DOI: 10.1038/bjc.2015.233
16. Ishihara S, Inman DR, Li WJ, et al. Mechano-Signal Transduction in Mesenchymal Stem Cells Induces Prosaposin Secretion to Drive the Proliferation of Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 2017;77(22):6179–6189. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0569
17. Zhang R, Li H, Zhang S, et al. RXRalpha provokes tumor suppression through p53/p21/p16 and PI3K-AKT signaling pathways during stem cell differentiation and in cancer cells. *Cell Death Dis*. 2018;9(5):532. DOI: 10.1038/s41419-018-0610-1
18. Zhang J, Bao S, Furumai R, et al. Protein phosphatase 5 is required for ATR-mediated checkpoint activation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(22):9910–9. DOI: 10.1128/MCB.25.22.9910-9919.2005
19. Kang Y, Cheong HM, Lee JH, et al. Protein phosphatase 5 is necessary for ATR-mediated DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(1):476–81. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.12.005
20. Yamashita A, Taniwaki T, Kaikoi Y, Yamazaki T. Protective role of the endoplasmic reticulum protein mitsugumin23 against ultraviolet C-induced cell death. *FEBS Lett*. 2013;587(9):1299–303. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.03.024
21. Willis DM, Loewy AP, Charlton-Kachigian N, et al. Regulation of osteocalcin gene expression by a novel Ku antigen transcription factor complex. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37280–91. DOI: 10.1074/jbc.M206482200
22. Liu C, Li Y, Semenov M, et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 2002;108(6):837–847.
23. Graham TA, Clements WK, Kimelman D, Xu W. The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT. *Mol Cell*. 2002;10(3):563–571.
24. Sun G, Budde RJ. Expression, purification, and initial characterization of human Yes protein tyrosine kinase from a bacterial expression system. *Arch Biochem Biophys*. 1997;345(1):135–42. DOI: 10.1006/abbi.1997.0236
25. Pedram A, Razandi M, Deschenes RJ, Levin ER. DHHC-7 and -21 are palmitoyltransferases for sex steroid receptors. *Mol Biol Cell*. 2012;23(1):188–99. DOI: 10.1091/mbc.E11-07-0638
26. Eckfeld K, Hesson L, Vos MD, et al. RASSF4/AD037 is a potential ras effector/tumor suppressor of the RASSF family. *Cancer Res*. 2004;64(23):8688–93. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2065
27. Gery S, Park DJ, Vuong PT, et al. RTP801 is a novel retinoic acid-responsive gene associated with myeloid differentiation. *Exp Hematol*. 2007;35(4):572–8. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.01.049
28. Ridge RJ, Sloane NH. Partial N-terminal amino acid sequence of the anti-neoplastic urinary protein (ANUP) and the anti-tumour effect of the N-terminal nonapeptide of the unique cytokine present in human granulocytes. *Cytokine*. 1996;8(1):1–5. DOI: 10.1006/cyto.1996.0001.29
29. Громова О.А., Пронин А.В., Гришина Т.Р., и др. Противоопухолевые эффекты Аквадетрима водного раствора мицелл с витамином D // *Фарматека*. – 2015. – Т.313. – №20. – С.63–68. [Gromova OA, Pronin AV, Grishina TR, et al. Antitumor effects of Akvadetrim – vitamin D aqueous micellar solution. *Pharmateca*. 2015;313(20): 63–68. (In Russ).]