

Нові дані щодо механізму дії багатокomпонентного препарату Траумель порівняно з монокомпонентним диклофенаком у моделі гострого запалення: мережевий метааналіз

Гостре та хронічне запалення являють собою динамічні, багатфакторні процеси. Вони контролюються нелінійним зворотним зв'язком і прямими регуляторними петлями, які становлять безліч потенційних просторово-часових мішеней для терапевтичних втручань [1-3]. Для кращого розуміння нелінійних взаємозв'язків між різними типами імунних клітин, сигнальними та регуляторними молекулами, асоційованими з виникненням, перебігом і розв'язанням гострого запалення (ГЗ), ми розробили вичерпний «Атлас розв'язання запалення» – AP3 (<https://air.bio.informatik.uni-rostock.de>) як дослідницький інструмент для визначення та пріоритизації терапевтичних мішеней, аналізу впливу молекулярних порушень на ГЗ та його фенотипи, кращого розуміння механізмів дії лікарських засобів (ЛЗ) [4].

Згідно із сучасними науковими даними розв'язання ГЗ є активним процесом; цей факт дає змогу припустити, що його стимуляція може стати новим терапевтичним підходом. Хоча розроблення ЛЗ фокусується на моделі «одна молекула – одна мішень», клінічні докази демонструють обмежену ефективність монокомпонентної терапії [5, 6]. З іншого боку, застосування ЛЗ, що впливають на численні мішені, які беруть участь у різноманітних біохімічних шляхах, здатне подолати адаптивну резистентність [6-10]. ЛЗ, що містять кілька активних речовин (характерна особливість багатьох ЛЗ природного походження), можуть бути ефективнішими в лікуванні багатфакторних захворювань [11-13].

У цьому дослідженні ми використали раніше опубліковану транскриптомічну базу даних часових рядів у мишачій моделі загоєння шкірних ран *in vivo* [24-27]. Вихідний матеріал включав аналіз відповідей на лікування монокомпонентним ЛЗ диклофенаком і багатокomпонентним ЛЗ Траумель (Tr14) [27]. Диклофенак являє собою нестероїдний протизапальний препарат, що пригнічує синтез простагландинів (простагландин E2, простагландини, тромбоксани) шляхом інгібування циклооксигенази-1 і -2 [28, 29]. На відміну від диклофенаку Tr14 регулює кілька шляхів, асоційованих із розв'язанням ГЗ, у тому числі апоптозу, міграції лейкоцитів, ангиогенезу в моделях загоєння ран у мишей *in vivo* [24, 27]. Tr14 позитивно впливає на синтез спеціалізованих прозапальних ліпідних медіаторів (СДЛМ) у людських моноцитарних макрофагах, посилюючи еферозитоз і продукцію СДЛМ у зимозан-індукованій мишачій моделі [30]. Крім того, в попередніх подвійних сліпих рандомізованих контрольованих дослідженнях доведено, що Tr14 зменшує одну з ознак ГЗ – біль, який виникає після травми опорно-рухового апарату [25, 26, 31].

Це дослідження доповнює попередню роботу та використовує мережу молекулярних взаємодій AP3 із метою дослідження впливу диференційованої експресії на запальні шляхи й типи клітин. AP3 полегшує та покращує транскриптомічний аналіз шляхом (1) фільтрації генів, безпосередньо пов'язаних із запаленням; (2) інтуїтивно зрозумілої візуалізації просторово-часових відмінностей в ефективності лікування; (3) визначення напрямку та сили збагачених процесів; (4) генерування підмереж причинно-наслідкових взаємодій, які пов'язують диференційовану експресовані гени (DEG) із запальними фенотипами. Ці переваги дають змогу докладніше зрозуміти механізми дії обох ЛЗ, ніж монокомпонентний аналіз. Використовуючи системний біологічний підхід з AP3, ми порівняли, як ці два принципово різні ЛЗ (багатокomпонентний) по-різному модулюють молекулярні та клітинні профілі задля кращого розуміння механізму їхнього впливу на ГЗ та його розв'язання.

Результати

Tr14 і диклофенак мають різні часові профілі експресії генів, унікальних для сигнального шляху ГЗ

У загальнодоступній транскриптомічній базі даних часових рядів із моделі загоєння ран у мишей зафіксовано 6 значень, що випадали: 3 – в контрольній групі (ін'єкції фізіологічного розчину) (12, 72 та 96 год), 2 – в групі Tr14 (12

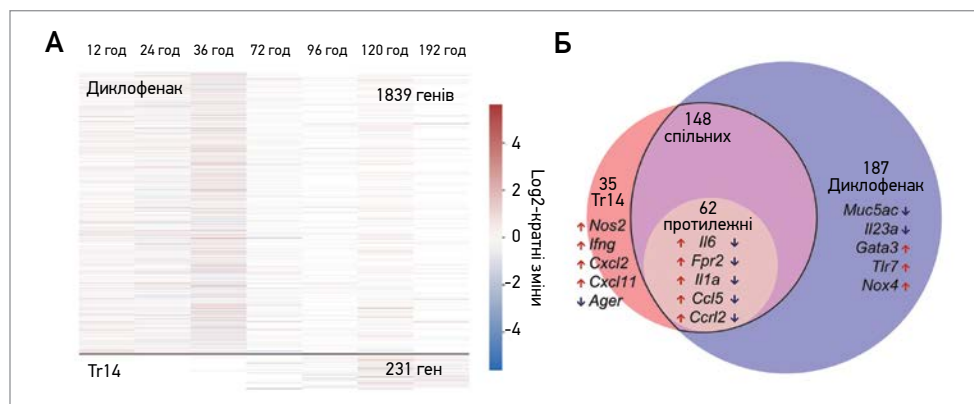


Рис. 1. Теплова мапа демонструє профіль експресії (Log2-кратні зміни) унікальних DEG при застосуванні Tr14 і диклофенаку порівняно з відповідним контролем у різні часові точки в ММВ AP3 (А); діаграма Венна демонструє унікальні DEG, які присутні в підмапах AP3 та беруть безпосередню участь у регуляції ГЗ та його фенотипів (Б)

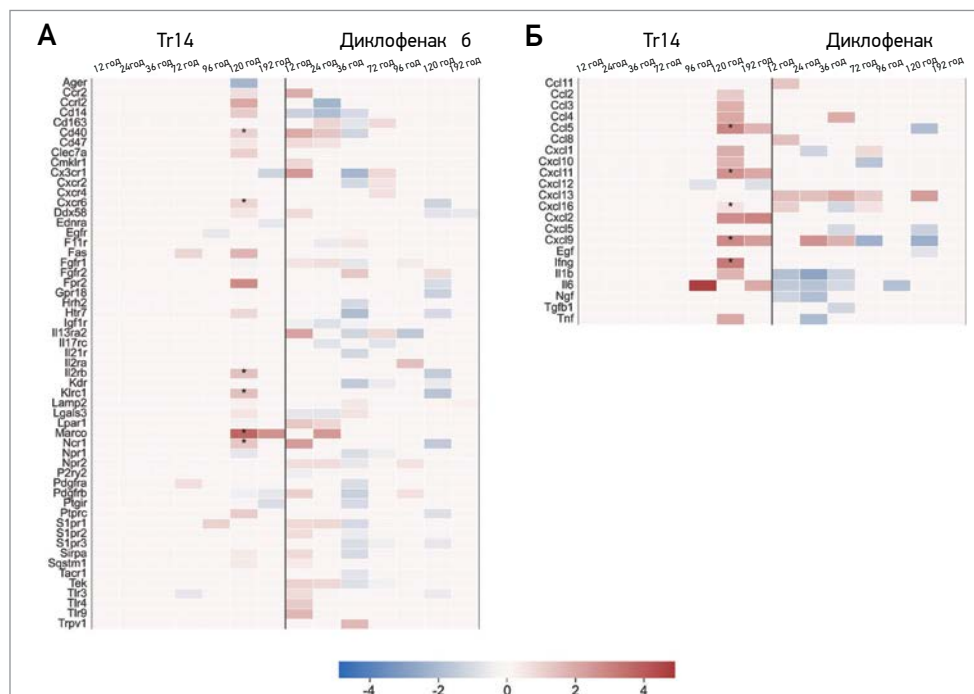


Рис. 2. Обрані гени рецепторів (А) та цитокінів (Б), асоційовані з різними типами імунних клітин, рівень диференційованої експресії яких був значно підвищений принаймні в одній часовій точці на тлі застосування Tr14, диклофенаку порівняно з відповідним контролем. Теплова карта демонструє, що в часову точку 120 год, коли під впливом Tr14 зростала експресія більшості генів, у групі диклофенаку вона суттєво знижувалася

і 120 год), 1 – у групі диклофенаку (96 год). Після видалення цих відхилень ми спостерігали збільшення кількості DEG у диференційованому аналізі досліджуваних груп порівняно з контролем.

Відповідно до мапи міжмолекулярної взаємодії (ММВ) AP3 у групі диклофенаку виявлено 1839 унікальних DEG, асоційованих із регуляцією ГЗ та його фенотипів, у групі Tr14-231 DEG порівняно з плацебо-контролем у всіх проаналізованих часових точках (рис. 1А).

Більшість DEG ідентифіковані в ранніх часових точках (до 36 год) у групі диклофенаку, тоді як у групі Tr14 більшість DEG виявлено після 72 год. Ми додатково відфільтрували DEG, представлені тільки в субмапах AP3, які безпосередньо пов'язані з ініціацією ГЗ, його перебігом, розв'язанням, гомеостазом (рис. 1Б). Це дало змогу виявити 187 унікальних DEG у групі диклофенаку, які не експресувалися в жодній часовій точці в групі Tr14 порівняно з плацебо. Аналогічно виявлено 35 унікальних DEG у групі Tr14 у всіх проаналізованих часових точках. Для

порівняння: знайдено 148 спільних DEG під час застосування обох ЛЗ. Серед них 62 гени диференційовано експресувалися в протилежних напрямках (підвищення експресії в групі Tr14 із відповідним зниженням у групі диклофенаку порівняно з контролем, або навпаки).

Tr14 і диклофенак демонструють протилежну експресію цитокінів і рецепторів за пізньої гострої запальної відповіді

Профілі експресії цитокінів і рецепторних білків, представлених у субмапах імунних типоспецифічних клітин в AP3, ідентифікували у двох досліджуваних групах і порівнювали з відповідним контролем (рис. 2). Переважна більшість цитокінів і рецепторів, пов'язаних з імунними клітинами, значно підвищувалися в часову точку 120 год у групі Tr14, але знижувалися в 36 та 120 год у тварин, які отримували диклофенак. Для порівняння: в 12 год регуляція більшості генів зростала під впливом

диклофенаку. Рисунок 2 демонструє відсутність взаємозв'язку між клітино-типо-специфічними генами та цитокінами / рецепторами DEG. Однак значна диференційована експресія стосується лише порівняння рівнів зчитування в одній і тій самій часовій точці та не означає біологічно значущої експресії.

Тому для ідентифікації генів із біологічно значущим рівнем експресії ми відібрали гени з високою вихідною середньою кількістю зчитувань у 120 год порівняно з усіма ранніми часовими точками (ці гени позначені на рисунку 2 зірочкою). Для цитокінів цими генами виявилися *Ccl5*, *Cxcl11*, *Cxcl16*, *Cxcl9* та *Ifng*, для рецепторів – *Cd40*, *Cxcr6*, *Il2rb*, *Klrc1*, *Marco* та *Ncr1*. За винятком *Ifng* усі значно індуковані цитокіни виявилися хемокінами, що додатково сприяло зростанню клітинної відповіді в 120 год на тлі застосування Tr14. Рисунок 2 демонструє значне зниження регуляції вищеперелічених генів у цю саму часову точку в групі диклофенаку.

Tr14 і диклофенаку властиві різні механізми дії при запальних фенотипах

Із метою визначення відмінностей у механізмах дії при запальних фенотипах ми візуалізували прогнозовані фенотипові зміни в різні моменти часу. На рисунку 3 представлено обрані процеси/фенотипи з підвищеною (червоний) або зниженою (синій) регуляцією в кожній часовій точці протягом чотирьох фаз ГЗ, описаних в AP3, із використанням усіх або тільки унікальних DEG для кожного досліджуваного препарату.

ГЗ та фенотипи згруповані в 4 фази (ініціація, перехід, розв'язання, гомеостаз). Кільця від внутрішньої до зовнішньої частини кола становлять часові точки: 12, 24, 36, 72, 96, 120 і 192 год.

У ранніх часових точках відзначали пригнічення більшості процесів ГЗ у групі диклофенаку порівняно з мишами, які отримували Tr14. У часовій точці 120 год спостерігали пригнічення значної кількості процесів розв'язання ГЗ у групі диклофенаку, тоді як у групі Tr14 їх регуляція була підвищена; більшість із них була пов'язана з активацією імунних клітин. Лікування Tr14 сприяло обмеженим змінам експресії генів у 12 та 24 год, у 120 год ефект досягав свого піку, особливо в процесах/фенотипах, асоційованих із розв'язанням ГЗ. У мишей, які отримували диклофенак, відзначали зміни більшості обраних процесів/фенотипів ГЗ у ранніх часових точках порівняно з тваринами, які отримували плацебо. У групі диклофенаку спостерігали найбільшу кількість значно диференційовано регульованих фенотипів у 36 год. Зафіксовано лише незначні відмінності між прогнозованими фенотипами для обох наборів DEG; цей факт указує на те, що збагачення фенотипу відбувається переважно завдяки унікальним DEG. Наведені дані додатково підтверджують фундаментальну різницю в механізмах дії обох ЛЗ.

Фенотипоспецифічні мережі демонструють диференційований вплив лікування на нейтрофіли та макрофаги

Щоби краще зрозуміти молекулярні взаємодії, які лежать в основі прогнозованих фенотипів, ми ідентифікували фенотипоспецифічні ключові

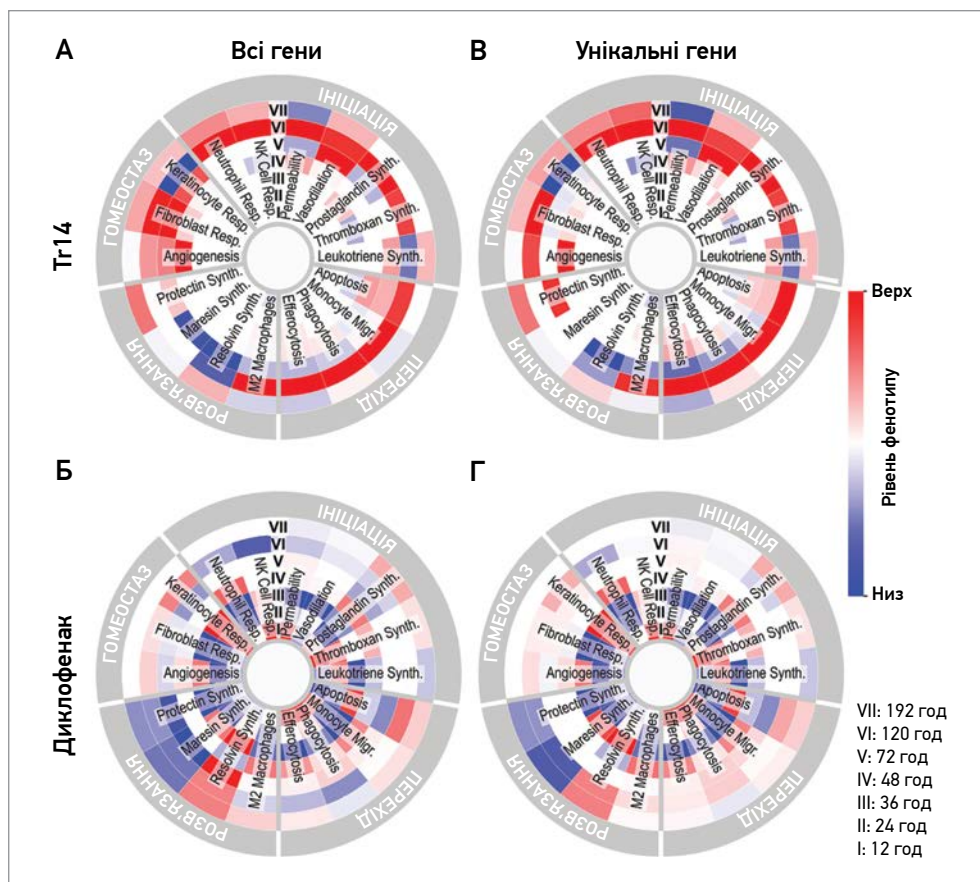


Рис. 3. Вплив Tr14 на обрані фази ГЗ та фенотипи порівняно з контролем (фізіологічний розчин) (А, Б); вплив диклофенаку на аналогічні показники порівняно з плацебо-контролем (Б, В); ГЗ та фенотипи нормалізувалися в діапазоні від +1 (підвищення регуляції; червоний колір) до -1 (зниження регуляції; синій колір) (А-Г)

регуляторні мережі (КРМ) із ММВ АРЗ. Під час визначення КРМ для кожного фенотипу чотири процеси продемонстрували суттєву різницю між двома ЛЗ: апоптичний процес, нетоз, кліренс апоптичних клітин (еферцитоз), M2-фенотип і поведінка. Тимчасом як ми спостерігали зниження регуляції генів, що індують нетоз (*Padi4*) під впливом Tr14 у 96 год, Tr14 підвищував регуляцію генів, пов'язаних з апоптозом (*Casp1*, *Casp3*, *Casp7* і *Casp8*) та рецепторів, що індують апоптоз (*Fpr2*) у 120 год. У ту саму

часову точку Tr14 сприяв загальному підвищенню регуляції маркерних генів нейтрофілів (*Itgam*, *Ncf1*, *Ncf2*). Зафіксовано значне посилення регуляції багатьох споріднених генів-рецепторів у 120 год у групі Tr14, включаючи субодиницю *Il2rg* рецептора інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), субодиницю *Il10ra* рецептора ІЛ-10 і субодиницю *Il13ra1* рецептора ІЛ-13. Активація еферцитозу під впливом Tr14 асоційована з активацією його цитокінового профілю, значним підвищенням регуляції фагоцитарних маркерів. З іншого боку,

диклофенак знижував регуляцію *Il2rg* та *Il10ra* у 120 год і субодиницю *Il13ra1* рецепторів ІЛ-4 та ІЛ-13 у 36 год. У 120 год диклофенак додатково знижував регуляцію *Fpr2* та підвищував регуляцію *Padi4*. Ці дані вказують на те, що вісь «нейтрофіли – макрофаги» є ключовою частиною відмінностей механізмів дії Tr14 і диклофенаку.

Обговорення

Ми з'ясували, що Tr14 індукуює протилежні транскрипційні зміни порівняно з диклофенаком, особливо в 120 год. І навпаки: деякі процеси, індювані Tr14 у 120 год, також активуються диклофенаком, але в 36 год. Одним із пояснень може бути те, що ранній інгібувальний вплив диклофенаку на ГЗ забезпечує зміщення часової активації деяких процесів, тоді як інші залишаються заблокованими. Наші спостереження свідчать, що Tr14 посилює пізню фізіологічну імунну відповідь, яка на більш ранній стадії пригнічується впливом протизапального ЛЗ диклофенаку. Різниця у фенотипових впливах цих двох ЛЗ може бути зумовлена їхньою принципово різною фармакодинамічною природою. Диклофенак, як нестероїдний протизапальний засіб, чинить прямий потужний інгібувальний вплив на ферменти циклооксигенази (PTGS1, PTGS2), що призводить до помітних змін у низхідній передачі сигналів і метаболічних каскадів, пов'язаних із біосинтезом (СДЛМ) [27, 63, 64]. Після введення ЛЗ початковий вплив на ранню транскрипцію генів триває протягом тривалого часу. Для порівняння: багатокомпонентний препарат Tr14 спочатку чинить менший вплив; імовірно, він модулює біосинтез СДЛМ або їхні ефекти завдяки багатоцільовим механізмам. Отже, ранній вплив Tr14 на ліпідний медіаторний шлях та окремі мішені може не виявлятися на транскрипційному рівні, особливо в об'ємних зразках тканин.

Може здатися парадоксальним, що Tr14 позиціонується як протизапальний засіб, який сприяє розв'язанню запалення, навіть незважаючи на те що він збільшує експресію генів багатьох прозапальних генів, на відміну від їх пригнічення диклофенаком. Однак існують докази,

які підтверджують, що прозапальний фенотип на ранніх стадіях ГЗ є необхідною умовою для сприяння розв'язанню запалення та відновлення тканинного гомеостазу [65].

Висновки

Ми досліджували гіпотезу, чи зможе імуномодулювальний препарат, який одночасно впливає на декілька мішеней (Tr14), продемонструвати більший потенціал у нівелюванні ГЗ із меншою кількістю побічних ефектів, аніж звичайний протизапальний препарат, розроблений як невелика молекула (диклофенак). Використавши раніше опублікований нами АРЗ, ми вивчили зміни експресії генів, пов'язаних із запальними процесами та клітинними профілями. Своєчасний і ефективний перехід від прозапальної фази у фазу розв'язання ГЗ, включаючи синтез медіаторів, що сприяють розсмоктуванню та формуванню M2-фенотипу, залежить від певних клітинних і молекулярних механізмів, які відбуваються на ранніх стадіях [73]. Tr14, на відміну від диклофенаку, не пригнічує експресію прозапальних генів на ранніх стадіях ГЗ, але підтримує експресію генів на пізніх стадіях; це свідчить про те, що він відповідає основним критеріям препаратів, які сприяють нівелюванню запалення. Порівнюючи ці два ЛЗ, ми виявили протилежні відповіді та часові відмінності, які свідчать про суттєві відмінності фармакодинаміки багатоцільових і моноцільових препаратів у розв'язанні запалення. Наші результати дають нове розуміння молекулярного та клітинного способів дії обох ЛЗ у разі ГЗ.

Стаття друкується в скороченні.

Список літератури доступний в оригінальній публікації.

Hoch M., Smita S., Cesnulevicius K. et al. Network analyses reveal new insights into the effect of multicomponent Tr14 compared to single-component diclofenac in an acute inflammation model. 2023. doi: 10.1186/s12950-023-00335-0.

Переклала з англ. **Тетяна Можина**