

УДК: 616.858-008.6, 535.372

ТИОРИДАЗИН ВЫЗЫВАЕТ РОСТ ЭКСПРЕССИИ ПЕРЕНОСЧИКА ПИРУВАТА MPC1, АССОЦИИРОВАННОГО С ИММУННОЙ ИНФИЛЬТРАЦИЕЙ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ

© 2025 г. Э. А. Богомолова^{1, *}, М. М. Мурашко^{1, 3}, Е. М. Стасевич^{1, 2, 3},
А. Н. Уварова^{1, 2}, Э. А. Жеремян^{1, 2}, К. В. Корнеев^{1, 2},
член-корреспондент РАН Д. В. Купраш^{1, 2}, Д. Э. Демин^{1, 2, **}

Поступило 15.09.2024 г.

После доработки 15.11.2024 г.

Принято к публикации 20.11.2024 г.

Ген *MPC1* участвует в транспорте пирувата в митохондрии, играя важную роль в метаболических процессах. Недавно стало известно, что повышенная экспрессия *MPC1* коррелирует с увеличением количества иммунных клеток в злокачественных опухолях шейки матки и легкого человека. Сниженный уровень *MPC1* в опухолях желудка ассоциирован с более тяжелым течением болезни. Проведенный корреляционный анализ гена *MPC1* в образцах ткани легкого, гиппокампа и лобной доли человека на основании данных из базы GTEX выявил ассоциации этого гена с шизофренией, немелкоклеточным раком легкого и иммунными заболеваниями. Наши эксперименты показали, что уровень мРНК гена *MPC1* в клеточной линии немелкоклеточного рака легкого A549 увеличивается в 5 раз под влиянием применяемого при шизофрении нейролептика тиоридазина. Наблюдаемый рост уровня *MPC1* может вызывать инфильтрацию опухоли иммунными клетками, дополняя ранее известные данные, указывающие на способность тиоридазина замедлять клеточный рост, вызывать апоптоз и снижать способность клеток к миграции.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, *MPC1*, тиоридазин, шизофрения, иммунная инфильтрация

DOI: 10.31857/S2686738925010238, **EDN:** swhwpk

ВВЕДЕНИЕ

Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) составляет около 85% от всех случаев злокачественных опухолей легкого [1]. Иммунологическое окружение опухоли играет ключевую роль в развитии и прогрессировании рака, а также в ответе на терапию. Внедрение ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как блокаторы CTLA-4

и PD-1/PD-L1, стало прорывом в лечении немелкоклеточного рака легкого. Однако многие пациенты не отвечают на лечение или демонстрируют прогрессию заболевания. Это подчеркивает необходимость разработки новых биомаркеров и терапевтических подходов, основанных на взаимодействии опухоли и иммунной системы [2].

Ген *MPC1* играет ключевую роль в транспорте пирувата через внутреннюю мембрану митохондрий, обеспечивая его участие в окислительном фосфорилировании и энергетическом обмене клетки. Недавние исследования показали, что повышенный уровень экспрессии гена *MPC1* ассоциирован с инфильтрацией иммунных клеток в ткань опухолей рака легкого. В частности, наблюдается корреляция между уровнем *MPC1* и количеством фолликулярных Т-хелперов и эозинофилов, что может быть связано с эффективностью противоопухолевого иммунного ответа [3]. Помимо того, корреляция экспрессии *MPC1* с иммунной инфильтрацией обнаруживается в раке

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Лаборатория передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, Москва, Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва, Россия

³Московский физико-технический институт, Московская область, г. Долгопрудный, Россия

*e-mail: elvina.elochka@gmail.com

**e-mail: denisdeminbio@gmail.com

шейки матки [4]. Сниженный уровень *MPC1* связан с неблагоприятным прогнозом и прогрессией опухоли при раке желудка [5].

Известно, что комплекс митохондриального переносчика пирувата (MPC) состоит из субъединиц MPC1 и MPC2, и потеря любой из них приводит к дисфункции всего комплекса. В то же время однонуклеотидный полиморфизм rs10489202 в интроне гена MPC2 ассоциирован с шизофренией в восточноазиатских популяциях [6].

В последние годы антипсихотический препарат тиоридазин, применяющийся в лечении шизофрении, привлек внимание исследователей как потенциальное противоопухолевое средство, особенно в отношении различных видов рака, включая рак легкого [7]. Показана способность тиоридазина влиять на воспаление, блокируя киназу IKK β , что в свою очередь препятствует активации транскрипционного фактора NF- κ B [8]. Этот препарат способен вызывать апоптоз, подавлять пролиферацию и миграцию раковых клеток и избирательно уничтожать стволовые клетки рака, что делает его интересным кандидатом для борьбы с рецидивами и резистентными формами рака [9]. Эффекты тиоридазина в отношении раковых клеток связаны с активацией митохондриального апоптоза через ингибирование окисления жирных кислот. Он вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий, активацию каспазы-9, повышение уровня белка Вах и снижение уровня Bcl-2, что приводит к гибели клеток [7]. Прием тиоридазина ассоциирован со снижением риска рака желудка [10].

В данной работе был проведен анализ экспрессии мРНК гена *MPC1* в образцах ткани легкого человека на основании базы данных GTEX. Исходя из имеющихся в литературе данных о воздействии тиоридазина на митохондриальный апоптоз, было изучено влияние тиоридазина на экспрессию гена *MPC1* в клеточной линии немелкоклеточного рака легкого A549.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ведение клеток. В работе использовалась клеточная линия немелкоклеточного рака легкого A549. Для ведения клеток использовалась среда DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л (Панэко), с добавлением смеси антибиотиков из пенициллина (100 Ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (Панэко), 1% раствора заменимых аминокислот (Панэко), 10 мМ HEPES (GIBCO) и 10% эмбриональной бычьей сывороткой (Biosera). Тиоридазин (PHARMACEUTICAL WORKS JELFA S.A.) был добавлен к клеткам в концентрации 10, 20, 30 или 40 мкМ, к контрольным образцам добавлялся соответствующий объем культуральной среды.

Корреляционный анализ гена *MPC1*. Для поиска биологических процессов, в которых участвует ген *MPC1* был проведен корреляционный анализ, как описано в статье [11]. Вкратце, были использованы данные секвенирования РНК нормальных тканей человека из базы данных GTEx: 578 образцов легкого, 197 образцов гиппокампа, 209 образцов лобной доли (BA9), для них была рассчитана корреляция Спирмена экспрессии всех генов с экспрессией *MPC1*. Далее 1000 генов с наибольшими по модулю коэффициентами корреляции были использованы для анализа обогащения функциональных групп генов с помощью Metascape и EnrichR.

Выделение РНК и количественная полимеразная цепная реакция. Выделение тотальной РНК из клеток производилось через 24 часа после трансфекции с помощью реагента ExtractRNA (Евроген) по протоколу, рекомендованному в наборе. кДНК из тотальной РНК получали с помощью набора реагентов MMLV RT kit (Евроген) с использованием олиго-дТ праймеров и случайных нуклеотидных праймеров в соотношении 1 к 1, как описано в статье [12]. Анализ экспрессии был произведен с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) на приборе CFX96 Touch real-time PCR (Bio-Rad Laboratories), используя реагенты qPCRmix-HS SYBR (Евроген) и специфичные праймеры: для гена *MPC1* – GGACTATGTCCGAAGCAAGG; AAATGTCATCCGCCCACTGA. Нормировка производилась на ген бета-актина ACTB- ACTGGGACGACATGGAGAAA; GGCGTACAGGGATAGCACAG. На один триплекат количественного ПЦР была использована кДНК, полученная из 100 нг выделенной РНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия мРНК гена *MPC1* в тканях легкого человека коррелирует с группами генов, связанными с шизофренией, раком легкого и иммунопатологиями.

В результате анализа обогащения функциональных групп, проведенного на основании списка из тысячи генов, наиболее сильно коррелирующим с *MPC1* в тканях легкого и мозга (гиппокампа и лобной доли (BA9)), были выявлены биологические процессы, в которых может участвовать ген *MPC1*.

В нормальных тканях легкого человека процессы, потенциально связанные с *MPC1*, включают митохондриальный транспорт, процесс метаболизма амида, расщепление валина, лейцина и изолейцина, протонный трансмембранный транспорт, организацию мембраны, процесс биосинтеза липидов, клеточный катаболический процесс, деградацию митохондриальных белков

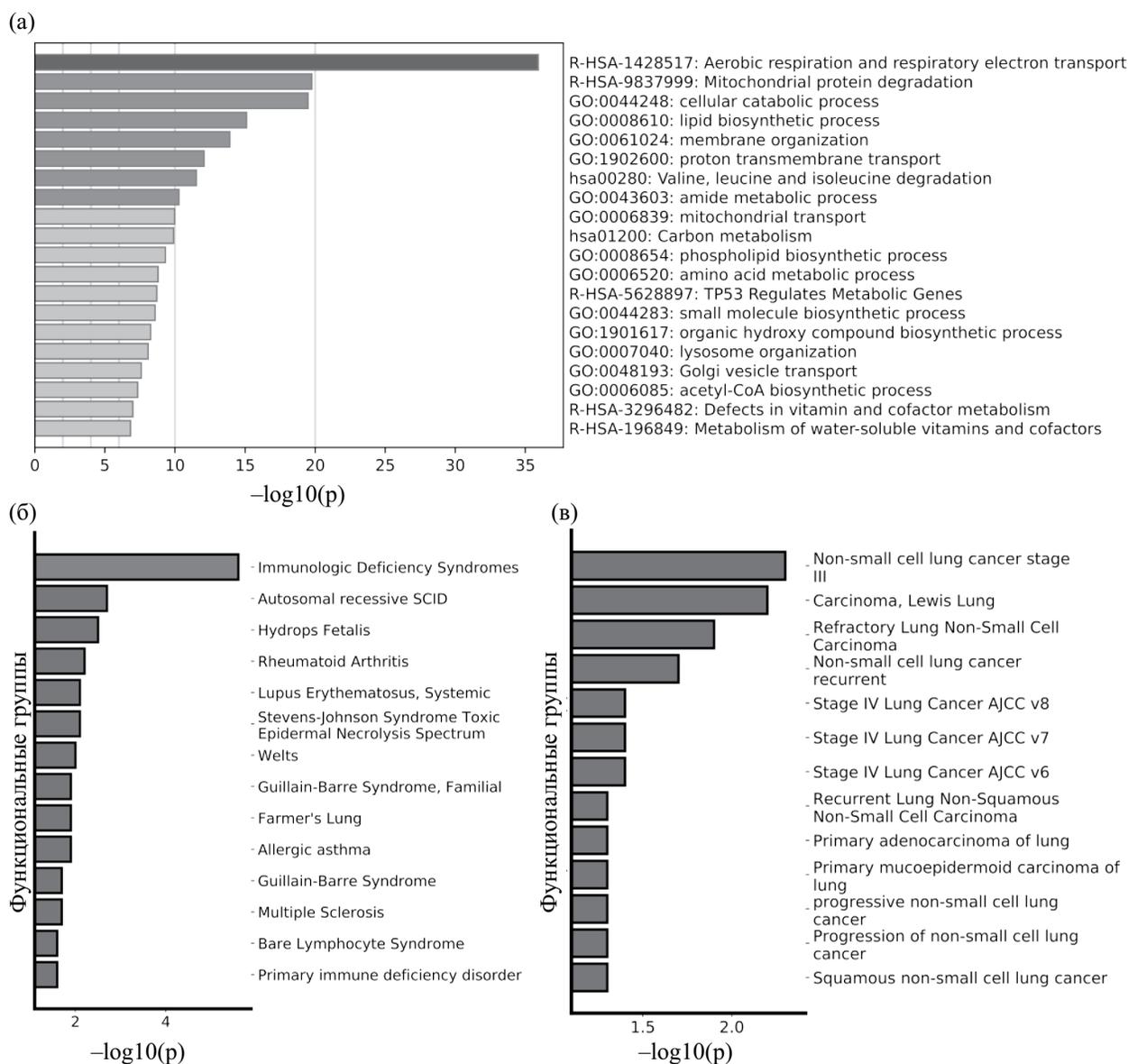


Рис. 1. Гены, коррелирующие с *MPC1* в тканях легкого, обогащают функциональные группы, связанные с метаболическими процессами (А), иммунопатологиями (Б), раком легкого (В). На рисунке представлены группы генов, полученные в результате корреляционного анализа экспрессии мРНК *MPC1* в образцах ткани человеческих легких. (А) Наиболее сильные обогащения функциональных групп, полученные с помощью сервиса Metascape. Обогащение групп генов из базы DisGeNet, связанных с иммунными заболеваниями (Б) и раком легкого (В).

и аэробное дыхание и респираторный электронный транспорт (рис. 1А).

Помимо понимания общих процессов интерес представляет ассоциация с биологическими процессами из базы DisGeNet, которые связаны с заболеваниями. Мы выявили множество потенциальных связей гена *MPC1* и групп и выбрали из них для демонстрации на рисунке группы, которые связаны с иммунными заболеваниями и раком легкого. На рис. 1Б отображены группы, связанные

с иммунными заболеваниями: иммунодефициты, аутоиммунные заболевания, неврологические расстройства, а также аллергические реакции. Эти результаты свидетельствуют о возможной связи *MPC1* с иммунной регуляцией и патогенезом различных иммунологических состояний.

На рис. 1В отображены группы, связанные с раком легкого: немелкоклеточный рак легкого, его прогрессирующие и рецидивирующие формы, а также стадии III и IV. Также были выявлены такие

типы опухолей, как первичная аденокарцинома легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого и различные карциномы легкого. Наблюдаемые ассоциации хорошо согласуются с данными о прогностическом значении *MPC1* при раке легкого [13] и о его возможной роли в патогенезе [14].

Формирование комплекса белков *MPC1* и *MPC2*, а также связь *MPC2* с шизофренией позволяет предположить в свою очередь связь гена *MPC1* с данным психическим расстройством. Мы провели анализ обогащения функциональных групп генов в тканях мозга, ассоциированных с шизофренией, и обнаружили, что для образцов гиппокампа шизофрения входит в топ-3, а в образцах лобной доли (ВА9) в список из 15 наиболее обогащенных групп.

Результаты корреляционного анализа подчеркивают роль *MPC1* в метаболических процессах и поддержании гомеостаза легочной ткани, а также предполагают ассоциацию с шизофренией в тканях мозга. Таким образом, полученные результаты в совокупности с литературными данными указывают на то, что *MPC1* потенциально может рассматриваться как биомаркер, связанный с развитием рака легкого, иммунопатологий и шизофрении.

Тиоридазин повышает уровень экспрессии мРНК гена *MPC1*.

Ранее было показано, что применяемый при шизофрении антипсихотик тиоридазин замедляет рост

и снижает способность клеток немелкоклеточного рака легкого к миграции, и при более высоких концентрациях приводит к апоптозу [15]. Наши результаты показали, что при концентрации тиоридазина в 10 мкМ не наблюдалось значимого повышения экспрессии мРНК гена *MPC1*. При концентрации 20 мкМ уже было видно значительное повышение в 5 ± 2 раз, далее при концентрациях в 30 мкМ и 40 мкМ также было обнаружено достоверное повышение уровня мРНК *MPC1* в 5 ± 3 и 5.9 ± 1.4 раз соответственно (рис. 2).

Терапевтические дозировки тиоридазина при лечении различных психических заболеваний, таких как шизофрения, составляют до 400 мг/день, при дозировке 400 мг/день в сыворотке крови человека наблюдается концентрации порядка 10 мкМ [16, 17]. Поэтому релевантность данной клеточной модели к терапевтическому применению тиоридазина требует отдельного изучения. Однако в клинических исследованиях необходимые концентрации препарата часто оказываются в несколько раз ниже, чем применяемые *in vitro* [18]. Следует отметить, что предыдущие исследования обнаружили корреляцию между повышенной экспрессией *MPC1* и инфильтрацией опухолей легкого фолликулярными Т-хелперами и эозинофилами [8], а инфильтрация немелкоклеточного рака легкого фолликулярными Т-хелперами ассоциирована с хорошим клиническим прогнозом [19]. Можно предположить, что повышение *MPC1* при воздействии тиоридазина может участвовать в привлечении данных типов иммунных клеток в опухоль.

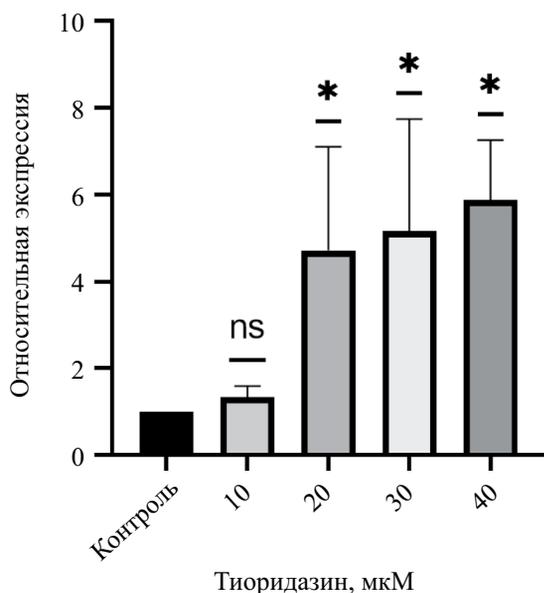


Рис. 2. Эффект тиоридазина на экспрессию мРНК *MPC1*. Измеренные с помощью количественного ПЦР уровни экспрессии при различных концентрациях тиоридазина. * означает р-значение меньше 0.05 по одновыборочному тесту Уилкоксона.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2019-1660).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Minna J.D., Roth J.A., Gazdar A.F. Focus on lung cancer // *Cancer Cell*. 2002. 1(1). P. 49–52.

2. Saigi M., Albuquerque-Bejar J.J., Sanchez-Cespedes M. Determinants of immunological evasion and immun checkpoint inhibition response in nonsmall cell lung cancer: the genetic front // *Oncogene*. 2019. 38(31). P. 5921–5932.
3. Li F., Huang C., Zhou M., et al. MPC1 is downregulated in lung cancer and associated with immune Infiltration // Piccaluga P.P., El-Hashash A., Guo X., eds. Fourth International Conference on Biomedicine and Bioinformatics Engineering (ICBBE 2024). SPIE. 2024:27.
4. Li M., Xu T., Yang R., Wang X., Zhang J., Wu S. Exploring MPC1 as a potential ferroptosislinked biomarker in the cervical cancer tumor microenvironment: a comprehensive analysis // *BMC Cancer*. 2024. 24(1). P. 1258.
5. Zhou X., Xiong Z. Juan, Xiao S. meng, et al. Overexpression of MPC1 inhibits the proliferation, migration, invasion, and stem cell-like properties of gastric cancer cells // *OncoTargets Ther*. 2017. 10. P. 5151–5163.
6. Yang Y., Wang L., Li L., et al. Genetic association and meta-analysis of a schizophrenia GWAS variant rs10489202 in East Asian populations // *Transl Psychiatry*. 2018. 8(1). P. 1–11.
7. Qian G., Dai L., Yu T. Thioridazine Sensitizes Cisplatin Against Chemoresistant Human Lung and Ovary Cancer Cells // *DNA Cell Biol*. 2019. 38(7). P. 718–724.
8. Baig M.S., Roy A., Saqib U., et al. Repurposing Thioridazine (TDZ) as an anti-inflammatory agent // *Sci Rep*. 2018. 8(1). P. 12471.
9. Shen J., Ma B., Zhang X., et al. Thioridazine has potent antitumor effects on lung cancer stem-like Cells // *Oncol Lett*. 2017. 13(3). P. 1563–1568.
10. Lianos G.D., Alexiou G.A., Rausei S., Galani V., Mitsis M., Kyritsis A.P. Repurposing antipsychotic drugs for cancer treatment: current evidence and future perspectives // *Expert Rev Anticancer Ther*. Published online February 1, 2022. Accessed October 25, 2024.
11. Demin D.E., Murashko M.M., Uvarova A.N., et al. Adversary of DNA integrity: A long non-coding RNA stimulates driver oncogenic chromosomal rearrangement in human thyroid cells // *Int J Cancer*. 2023. 52(7). P. 1452–1462.
12. Demin D.E., Stasevich E.M., Murashko M.M., Tkachenko E.A., Uvarova A.N., Schwartz A.M. Full and D-Box-Deficient PTTG1 Isoforms: Effects on Cell Proliferation // *Mol Biol (Mosk)*. 2022. 56(6). P. 1104.
13. Zou H., Yin Y., Xiong K., et al. Mitochondrial Pyruvate Carrier 1 as a Novel Prognostic Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer // *Technol Cancer Res Treat*. 2024. 23:15330338241282080.
14. Zou H., Chen Q., Zhang A., et al. MPC1 deficiency accelerates lung adenocarcinoma progression through the STAT3 pathway // *Cell Death Dis*. 2019. 10(3). P. 148.
15. Huang W. Thioridazine promotes primary ciliogenesis in lung cancer cells through enhancing cell autophagy // *Int J Clin Exp Med*. 2017. 10. P. 13960–13969.
16. Mårtensson E., Roos B.E. Serum levels of thioridazine in psychiatric patients and healthy volunteers // *Eur J Clin Pharmacol*. 1973. 6(3). P. 181–186.
17. Cohen B.M., Lipinski J.F., Waternaux C. A fixed dose study of the plasma concentration and clinical effects of thioridazine and its major metabolites // *Psychopharmacology (Berl)*. 1989. 97(4). P. 481–488.
18. Groothuis F.A., Heringa M.B., Nicol B., Hermens J.L.M., Blaauboer Bas J., Kramer N.I. Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations // *Toxicology*. 2015. 332. P. 30–40.
19. Ma Q.Y., Huang D.Y., Zhang H.J., Chen J., Miller W., Chen X.F. Function of follicular helper T cell is impaired and correlates with survival time in nonsmall cell lung cancer // *Int Immunopharmacol*. 2016. 41. P. 1–7.

THIORIDAZINE INDUCES INCREASE IN EXPRESSION OF THE PYRUVATE TRANSPORTER *MPC1* ASSOCIATED WITH IMMUNE INFILTRATION IN MALIGNANT TUMORS

E. A. Bogomolova^{1, *}, M. M. Murashko^{1, 3}, E. M. Stasevich^{1, 2, 3},
A. N. Uvarova^{1, 2}, E. A. Zheremyan^{1, 2}, K. V. Korneev^{1, 2},
Corresponding Member of the RAS D. V. Kuprash^{1, 2}, D. E. Demin^{1, 2, **}

¹Laboratory of Intracellular Signaling in Health and Disease, Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

²Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³Department of Molecular and Biological Physics, Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

*e-mail: elvina.elochka@gmail.com

**e-mail: denisdeminbio@gmail.com

The *MPC1* gene is involved in the transport of pyruvate into mitochondria, playing an important role in metabolic processes. Recently, it has been reported that higher *MPC1* expression correlates with an increased number of immune cells in human cervical and lung cancers, indicating an enhanced antitumor immune response. Reduced *MPC1* levels in gastric tumors are associated with a more severe disease course. Correlational analysis of the *MPC1* gene in human lung, hippocampus and frontal cortex tissue samples based on data from the GTEx database revealed associations of this gene with schizophrenia, non-small cell lung cancer, and immune diseases. Our experiments showed that the mRNA level of the *MPC1* gene in the non-small cell lung cancer cell line A549 increases 5-fold under the influence of the schizophrenia neuroleptic thioridazine. The observed elevation of *MPC1* level may cause tumor infiltration by immune cells, complementing the previously reported data indicating the ability of thioridazine to slow cell growth, induce apoptosis and reduce the ability of cells to migrate.

Keywords: non-small cell lung cancer, MPC1, thioridazine, schizophrenia, immune infiltration