

doi 10.18699/vjgb-26-84

Выявление потенциальных генов-мишеней малых некодирующих фрагментов тРНК трематод среди дифференциально экспрессирующихся генов моноцитов человека

Е.А. Лишай ^{1, 2} , М.Ю. Пахарукова ^{1, 2}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 lishai.ekaterina@gmail.com

Аннотация. РНК-интерференция – эволюционно консервативный механизм посттранскрипционной регуляции генов, представленный у всех видов живых организмов, в настоящее время актуален для многих направлений молекулярной медицины, включая диагностику и новые подходы к иммуномодуляции. В последнее время появляется все больше данных об участии внеклеточных везикул и их компонентов в контексте взаимодействия между паразитом и хозяином. Трематода *Opisthorchis felinus*, паразитирующая в желчных протоках человека, вызывает описторхоз, что сопровождается хроническим воспалением и рядом неблагоприятных последствий. Длительное выживание паразита, вероятно, связано с иммуномодуляцией хозяина. Однако механизм влияния везикул трематод на моноциты человека неизвестен. Целью настоящей работы было найти потенциальные гены-мишени фрагментов тРНК трематод в геноме человека и проанализировать их представленность среди дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в транскриптоме моноцитов человека линии THP-1. В результате поиска генов-мишеней для восьми наиболее представленных фрагментов тРНК *O. felinus* было выявлено 1299 потенциальных генов, которые могут быть мишенями в моноцитах человека. Семь кДНК библиотек клеточной культуры моноцитов человека линии THP-1 до и после обработки выделенными везикулами взрослой особи *O. felinus* были просеквенированы методом парных прочтений 2×150 пар оснований (технология DNBseq, BGI, Китай), получено около 43.8 млн прочтений на библиотеку. Среди 1484 ДЭГ в моноцитах было обнаружено 159 генов-мишеней фрагментов тРНК везикул, экспрессия которых значимо менялась при обработке экзосомо-подобных везикул (ЭПВ). Выявленные потенциальные гены-мишени относились к путям, связанным с регуляцией клеточного цикла и клеточной гибели (контроль целостности ДНК (M16357), переход из фазы G1 в фазу S (M2074), апоптоз (M15303) и программируемая клеточная гибель (M27436)), иммунного ответа (путь моноцитов (M4956), дифференцировка мононуклеарных макрофагов (M25144), презентация антигена через МНС-1 (M1066), процессинг антигена через протеасому (M1070)). Вероятно, фрагменты тРНК трематоды *O. felinus* могут вносить вклад в регуляцию этих процессов в моноцитах хозяина.

Ключевые слова: описторхоз; тРНК; экзосомо-подобные везикулы; РНК-интерференция; транскриптомика; моноциты человека

Для цитирования: Лишай Е.А., Пахарукова М.Ю. Выявление потенциальных генов-мишеней малых некодирующих фрагментов тРНК трематод среди дифференциально экспрессирующихся генов моноцитов человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(5):830-838. doi 10.18699/vjgb-26-84

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 24-44-00048).

Благодарности. Биоинформатический анализ проведен с использованием вычислительных ресурсов Центра коллективного пользования «Биоинформатика» ИЦиГ СО РАН (FWNR-2026-0027).

Identification of potential target genes of the trematode transport RNA-derived small RNAs among differentially expressed genes of human monocytes

E.A. Lishai ^{1, 2} , M.Y. Pakharukova ^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 lishai.ekaterina@gmail.com

Abstract. RNA interference is an evolutionarily conserved mechanism of post-transcriptional gene expression regulation present in all living organisms. It is highly relevant to multiple areas of molecular medicine, including diagnostics and novel immunomodulatory approaches. Recent studies have increasingly highlighted the role of extracellular vesicles and their cargo in parasite-host interactions. The trematode *Opisthorchis felinus*, which parasitizes the human biliary tract,

causes opisthorchiasis, a disease associated with chronic inflammation and other hepatobiliary injuries. The long-term survival of the parasite is likely linked to modulation of host immune response. Nevertheless, the mechanism by which liver fluke vesicles affect human immune cells remains unclear. The aim of this study was to identify potential human gene targets of tRNA-derived small RNAs and to assess their enrichment among differentially expressed genes (DEGs) in the transcriptome of THP-1 human monocytes. Target prediction for eight most abundant *O. felinus* tRNA fragments identified 1299 potential target genes in human monocytes. Seven cDNA libraries prepared from THP-1 monocytes before and after treatment with vesicles from adult *O. felinus* were sequenced using paired-end 2 × 150 bp sequencing (DNBseq, BGI), yielding 43.8 million reads per library. Among 1484 DEGs, 159 predicted targets of tRNA-derived small RNAs showed significant expression changes upon vesicle treatment. These genes were associated with pathways involved in cell-cycle regulation and cell death, including DNA integrity control (M16357), G1/S transition (M2074), apoptosis (M15303), and programmed cell death (M27436), as well as immune-related pathways, including the monocyte pathway (M4956), mononuclear macrophage differentiation (M25144), MHC-I antigen presentation (M1066), and proteasome-mediated antigen processing (M1070). These findings suggest that *O. felinus* tRNA-derived small RNAs may contribute to the regulation of these processes in human monocytes.

Key words: opisthorchiasis; tRNA; exosome-like vesicles; RNA interference; transcriptomics; human monocytes

For citation: Lishai E.A., Pakharukova M.Y. Identification of potential target genes of the trematode transport RNA-derived small RNAs among differentially expressed genes of human monocytes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(5):830-838. doi 10.18699/vjgb-26-84

Введение

РНК-интерференция как инструмент посттрансляционной регуляции экспрессии генов – эволюционно консервативное и широко распространенное явление среди всех видов живых организмов. Активное исследование этого направления в генетике и молекулярной биологии подчеркивается актуальностью применения молекул некодирующих РНК в регуляции активности генов-мишеней, диагностике и иммуномодулировании. Многие малые некодирующие РНК, подавляющие экспрессию генов-мишеней на посттранскрипционном уровне, транспортируются внеклеточными везикулами. Роль малых РНК во взаимодействии между разными видами, в том числе в системе «паразит–хозяин», остается малоизученной. Перспективным объектом для таких исследований является эпидемиологически значимый вид трематод *Opisthorchis felinus*.

Opisthorchis felinus (Rivolta, 1884) паразитирует в желчных протоках рыбоядных млекопитающих, включая человека. Длительная инфекция приводит к хроническому воспалению и развитию неоплазии эпителия желчных протоков (Xia et al., 2015; Mordvinov et al., 2021; Lishai et al., 2024). При этом возможность длительного существования трематод в организме хозяина, вероятно, связана с модулированием иммунного ответа хозяина. С этим может быть связано снижение проявлений аутоиммунных заболеваний, таких как болезнь Крона или астма, при паразитарных инфекциях (Araújo et al., 2004; Saltykova et al., 2014).

Модулирование иммунного ответа, как и влияние на другие процессы в организме хозяина, в том числе приводящие к канцерогенным последствиям, невозможно без осуществления коммуникации между паразитом и хозяином. Одним из способов такой коммуникации могут быть внеклеточные везикулы, которые поглощаются клетками хозяина посредством различных механизмов. Например, холангиоциты человека используют клатрин-зависимый эндоцитоз для захвата экзосомо-подобных везикул (ЭПВ) *O. felinus* (Pakharukova et al., 2023). ЭПВ содержат различные биологически активные молекулы, в частности малые некодирующие РНК (мнРНК), включая тРНК.

Большой интерес для исследователей представляют фрагменты тРНК – малые РНК, полученные из тРНК (tRNA-derived small RNA, tsRNA), которые широко изучаются как новые регуляторные молекулы при различных заболеваниях (Prehn, Jirström, 2020; Chen et al., 2024; Strømme et al., 2024). Они входят в состав внеклеточных везикул, в частности ЭПВ различных паразитов, и могут влиять на клетки хозяина (Artuyants et al., 2020; Fontenla et al., 2022; Kusakisako et al., 2023).

Моноциты являются клетками врожденной иммунной системы и участвуют в первоначальном ответе на патогены (Passos et al., 2017). Внеклеточные везикулы, выделяемые паразитами, могут влиять на поляризацию моноцитов хозяина и продукцию ими цитокинов (Silverman et al., 2010; Lertjuthaporn et al., 2022; Norouzi et al., 2022; Khawawisetsut et al., 2023). Однако процессы, происходящие в моноцитах человека при воздействии ЭПВ трематоды *O. felinus*, остаются малоизученными. Кроме того, неизвестно, могут ли влиять на моноциты человека фрагменты тРНК, содержащиеся в ЭПВ трематоды.

Таким образом, цель работы – изучение влияния ЭПВ (*in vivo*) и входящих в их состав фрагментов тРНК (*in silico*) трематоды *O. felinus* на моноциты человека линии THP-1. Работа включала в себя секвенирование транскриптома моноцитов человека THP-1 после обработки ЭПВ *O. felinus* и идентификацию генов-мишеней фрагментов тРНК из ЭПВ трематоды среди обнаруженных дифференциально экспрессирующихся генов.

Материалы и методы

Животные. Для исследования использовали двухмесячных золотистых хомячков *Mesocricetus auratus* из вивария ИЦиГ СО РАН. Метацеркарии *O. felinus* были выделены по ранее описанной методике (Pakharukova et al., 2018, 2019) из речной рыбы (*Leuciscus idus*), выловленной в р. Оби рядом с г. Новосибирском. Хомяки были заражены перорально 75 метацеркариями на каждого. Взрослых трематод извлекали из желчных протоков хомячков через два месяца после заражения и промывали 10 раз стерильным физиологическим раствором (Pakharukova et al., 2018,

Последовательности фрагментов тРНК *O. felineus* и их представленность в ЭПВ *O. felineus*

Фрагмент тРНК	Последовательность	Представленность в ЭПВ <i>O. felineus</i> (%)
Asp-GTC-1	5'-TCCTCGGTGGTATAGTGGTGAGTATCTCCGCCTGTC-3'	13.82
Asp-GTC-2	5'-TCCTCGGTATAGTGGTGAGTATCTCCGCCTGTC-3'	7.16
Asp-GTC-3	5'-TCCTCGGTATAGTGGTGAGTATCTCCGCCTGTC-3'	2.86
His-GTG-1	5'-GGCCGTCGTAGTCTAGTGGTTAGGACATTGCGTT-3'	2.04
Ile-AAT-1	5'-GGGTCTGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGCAC-3'	4.70
Ile-AAT-2	5'-GGGTCTGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGCACC-3'	3.45
Ile-AAT-3	5'-GGGTCTGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGCA-3'	3.91
Tyr-GTA-1	5'-GGGTCGTTAGCTCAGCTGGTAGAGCAGCG-3'	3.74

2019). Исследования на животных одобрены Биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН (№ 42 от 25.05.2018).

Выделение экзосомо-подобных везикул осуществляли из среды содержания 300 взрослых трематод (среда RPMI 1640, 1 % глюкозы, 100 ед./мл пенициллина G, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина B), как описано ранее (Pakharukova et al., 2023).

Предсказание генов-мишеней фрагментов тРНК из ЭПВ *O. felineus*. В работе использовали описанные ранее фрагменты тРНК (Lishai, Pakharukova, 2026), полученные в результате секвенирования малых РНК из экзосомо-подобных везикул *O. felineus*. В частности, библиотеки малых РНК картировали на последовательности предсказанных тРНК из генома *O. felineus* (GCA_004794785.1) с помощью программы tRNAscan-SE 2.0 v.2.0.9 (Chan et al., 2021). Из 4523 полученных предсказанных последовательностей генов тРНК были удалены псевдогены (4276) и оставшиеся последовательности (247), определенные как гены тРНК. После картирования на гены тРНК были выбраны наиболее представленные последовательности для каждой изоакцепторной тРНК для каждой аминокислоты. В результате получено 50 последовательностей, на которые были снова картированы библиотеки малых РНК и определены наиболее представленные фрагменты тРНК (см. таблицу).

Для предсказания генов-мишеней фрагментов тРНК применяли сервис tRfTarget 2.0 (Li N. et al., 2024) (<http://trfTarget.net/>), который использует комбинацию алгоритмов RNAhybrid (Rehmsmeier et al., 2004) и IntaRNA (Mann et al., 2017) и выдает те сайты связывания, которые определяются обоими алгоритмами и для которых свободная энергия меньше –15 ккал/моль. В качестве мишеней для фрагментов тРНК использовали последовательности 3'-нетранслируемых областей мРНК белок-кодирующих генов человека из базы Ensembl Genes 115 (Human Genes GRCh38.p14) (<https://www.ensembl.org/biomart/martview/330951e98fb906b5999fa97914e6118c>).

Из 220194 полученных транскриптов были удалены последовательности короче семи нуклеотидов, а также транскрипты, последовательности которых не известны. В результате осталось 196902 транскрипта (89 %), которые относились к 19082 генам.

Для анализа функционального обогащения в моноцитах человека из предсказанных генов-мишеней были удалены

гены, которые не экспрессируются в моноцитах и клетках крови (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/single+cell/immune+cell/monocytes>). Список удаленных генов представлен в Приложении 1¹. Анализ проводили с помощью R-пакетов msigdb v.1.18.0 (Bhuva et al., 2025) (Gene Ontology (GO) и Molecular Signatures Database (MsigDB_Curated)) и clusterProfiler v.4.18.4 (Yu et al., 2012). Для визуализации использовали R-пакет ggplot2 v.4.0.1 (<https://ggplot2.tidyverse.org/>), программы LibreOffice Calc v.24.2.7.2 (<https://www.libreoffice.org/discover/calc/>) и Inkscape v.1.4.2 (<https://inkscape.org/ru/>).

Получение транскриптомных данных моноцитов человека линии THP-1. Моноциты человека линии THP-1 культивировали в среде, содержащей RPMI 1640 (Gibco, США), 10 % FBS (Gibco), 100 ед./мл пенициллин (Sigma Aldrich, США), 10 мкг/мл стрептомицин (Sigma Aldrich) и 29.2 мкг/мл L-глутамин (Gibco). Клетки предварительно активировали до макрофаго-подобных клеток при помощи 100 нг/мл РМА (форбол-12-миристан-13-ацетат) (Solarbio, Китай) с последующей отмывкой в среде без РМА. Каждый этап длился 24 ч. Из клеток, обработанных ЭПВ *O. felineus* в концентрации 10 мкг/мл в течение суток, и необработанных клеток выделяли РНК с использованием набора Aurum Total RNA Extraction Kit (Bio-Rad, США). Качество образцов оценивали с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer и набора Total RNA Nano Kit (Agilent Technologies, США).

Семь библиотек кДНК (4 образца РНК из необработанных клеток и 3 образца РНК из клеток, обработанных ЭПВ *O. felineus*) были сделаны в соответствии со стандартным протоколом New England Biolabs с применением наборов NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module и NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina. Для селекции фрагментов ДНК по размеру использовали гранулы Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). После ПЦР-обогащения и проверки качества библиотек было проведено секвенирование методом парных прочтений 2 × 150 пар оснований на платформе DNBSec (BGI, Китай). Качество библиотек проверяли с использованием FastQC v.0.12.1 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Данные секвенирования доступны в репозитории NCBI BioProject (PRJNA1429255).

¹ Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx43.xlsx>

Биоинформатический анализ транскриптомных данных. Библиотеки были картированы на референсный геном человека GRCh38.p14 (GCA_000001405.29) с помощью программы STAR v.2.7.10a (Dobin et al., 2013).

Для анализа дифференциальной экспрессии генов при обработке моноцитов человека THP-1 применяли тест Вальда с порогом 0.05 из R-пакета DESeq2 v.1.50.2 (Love et al., 2014). Дифференциально экспрессирующимися генами (ДЭГ) считали гены, уровень экспрессии которых менялся более чем в 2 раза и скорректированное значение p было меньше 0.05 (поправка Бенджамини–Хохберга). Из матрицы транскриптов удаляли низкоэкспрессирующиеся гены (сумма значений экспрессии гена по всем библиотекам менее 24).

Анализ главных компонент проводили с применением матрицы экспрессии всех генов после трансформации (функция `vst()` с параметром `blind = F` из R-пакета DESeq2 v.1.50.2). Для анализа использовали функцию `prcomp()` из R-пакета stats v.4.5.2.

Анализ функционального обогащения путей проводили с помощью баз данных Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (на основе аннотации генома человека из R-пакета `org.Hs.eg.db` v.3.22.0) и Molecular Signatures Database (MsigDB) (R-пакет `msigdb` v.1.18.0) и R-пакета `clusterProfiler` v.4.18.4. Для визуализации результатов использовали LibreOffice Calc v.24.2.7.2 и Inkscape v.1.4.2. Для ДЭГ, являющихся генами-мишенями фрагментов

тРНК, анализ функционального обогащения проводился аналогично.

Для оценки значимости обогащения ДЭГ моноцитов человека THP-1 генами-мишенями фрагментов тРНК применяли тест хи-квадрат Пирсона с поправкой Йейтса из R-пакета stats v.4.5.2.

Для построения сети взаимодействий фрагментов тРНК с ДЭГ использовали программу Inkscape v.1.4.2.

Результаты

Обработка моноцитов человека

THP-1 экзосомо-подобными везикулами *O. felinus* вызывает изменение экспрессии генов и активацию клеточных путей, связанных с иммунологическими реакциями и клеточным циклом

В результате секвенирования получено около 43.8 млн прочтений в среднем на одну библиотеку. Картирование библиотек на геном человека идентифицировало примерно 37 млн (84.63 %) уникально картированных прочтений (в среднем на библиотеку), при этом около 3.7 млн прочтений в среднем на библиотеку (8.63 %) картировано более одного раза.

Анализ главных компонент показал кластеризацию образцов в зависимости от способа обработки клеток (рис. 1, а). Выявлено 1484 дифференциально экспрессирующихся гена (экспрессия меняется более чем в 1.5 раза

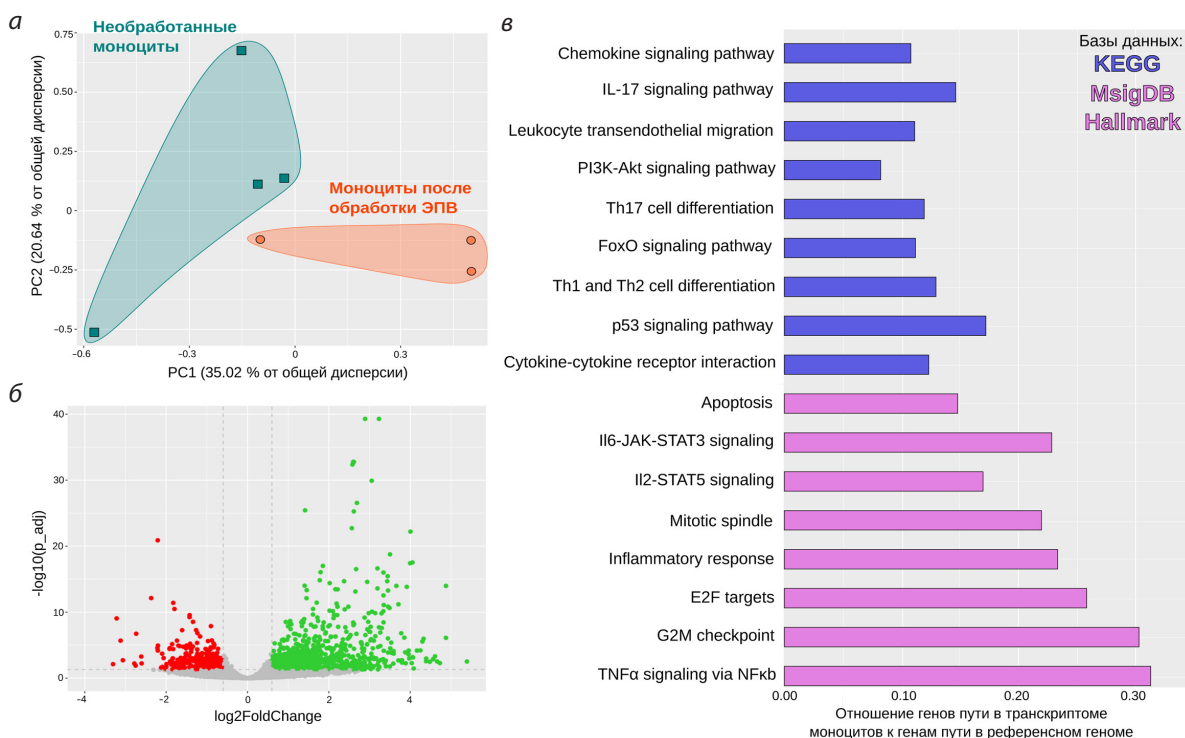


Рис. 1. Транскриптомный анализ моноцитов человека (линия THP-1) после обработки экзосомо-подобными везикулами *O. felinus*.

а – результаты анализа главных компонент; **б** – диаграмма Volcano распределения ДЭГ в экспериментальной группе по сравнению с необработанными моноцитами. Красным и зеленым цветом отмечены гены, для которых скорректированное значение $p < 0.05$ ($-\log_{10}(p_adj) > 1/3$) и экспрессия увеличивается более чем в 1.5 раза (зеленый цвет, $\log_2\text{FoldChange} > 0.6$) или снижается более чем в 1.5 раза (красный цвет, $\log_2\text{FoldChange} < -0.6$); **в** – анализ функционального обогащения ДЭГ по базам данных Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) и Molecular Signatures Database (MsigDB).

и скорректированное значение p меньше 0.05): 392 гена с пониженной экспрессией, 1092 гена с повышенной экспрессией (см. рис. 1, б) (Приложение 2). Более чем в 25 раз ($\log_2\text{FoldChange} > 4.6$) увеличивался уровень экспрессии генов *JCHAIN*, *LINC03063*, *CD8B2*, *MLC1*, *RNASE2*. Наиболее сильно, более чем в 6.9 раза ($\log_2\text{FoldChange} < 2.78$), снижался уровень экспрессии генов *LOC124902900*, *HBA1*, *HBA2*, *LOC124900173*, *LOC112268061*.

Анализ функционального обогащения ДЭГ проведен с использованием баз данных KEGG и MsigDB (набор Hallmark). По базе данных KEGG обнаружено 43 регуляторных пути (скорректированное значение $p < 0.05$) среди ДЭГ с повышенной экспрессией и 9 путей (скорректированное значение $p < 0.05$) среди ДЭГ с пониженной экспрессией. По базе данных MsigDB обнаружено восемь регуляторных путей (скорректированное значение $p < 0.05$) среди ДЭГ с повышенной экспрессией и один путь (скорректированное значение $p < 0.05$) среди ДЭГ с пониженной экспрессией. Данные представлены в Приложении 2.

Среди ДЭГ с повышенной экспрессией наблюдалось обогащение по путям, связанным с иммунологическими процессами (миграция лейкоцитов через эндотелий (*hsa04670*), Th17 дифференцировка (*hsa04659*), Th1 и Th2 дифференцировка (*hsa04658*), воспалительный ответ (*M5932*)), а также по путям, связанным с клеточным

циклом и клеточной гибелью (образование веретена деления при митозе (*M5893*), контрольная точка G2M (*M5901*), апоптоз (*M5902*), p53 сигнальный путь (*hsa04115*)) (см. рис. 1, в).

Предсказание генов-мишеней фрагментов тРНК *O. felinus* среди генов, экспрессирующихся в моноцитах человека

Для предсказания генов-мишеней использовали последовательности 3'-нетранслируемых областей мРНК белок-кодирующих генов в геноме человека (196902 последовательностей для 19082 генов). Для дальнейшей работы использовали гены, для которых хотя бы в одной последовательности 3'-нетранслируемой области был найден сайт связывания с каким-либо одним фрагментом тРНК. Определено 2145 генов-мишеней среди белок-кодирующих генов человека. Поскольку нас интересовало потенциальное действие фрагментов тРНК на моноциты человека, из списка предсказанных генов были удалены гены, не экспрессирующиеся в клетках крови и в моноцитах. В результате выявлено 1299 генов, которые могут быть мишенями для фрагментов тРНК *O. felinus* в моноцитах человека. Наибольшее количество генов-мишеней найдено для фрагмента тРНК Asp-GTC-3 (522 гена), а наименьшее (95 генов) – для His-GTG-1 (рис. 2, а) (Приложение 3).

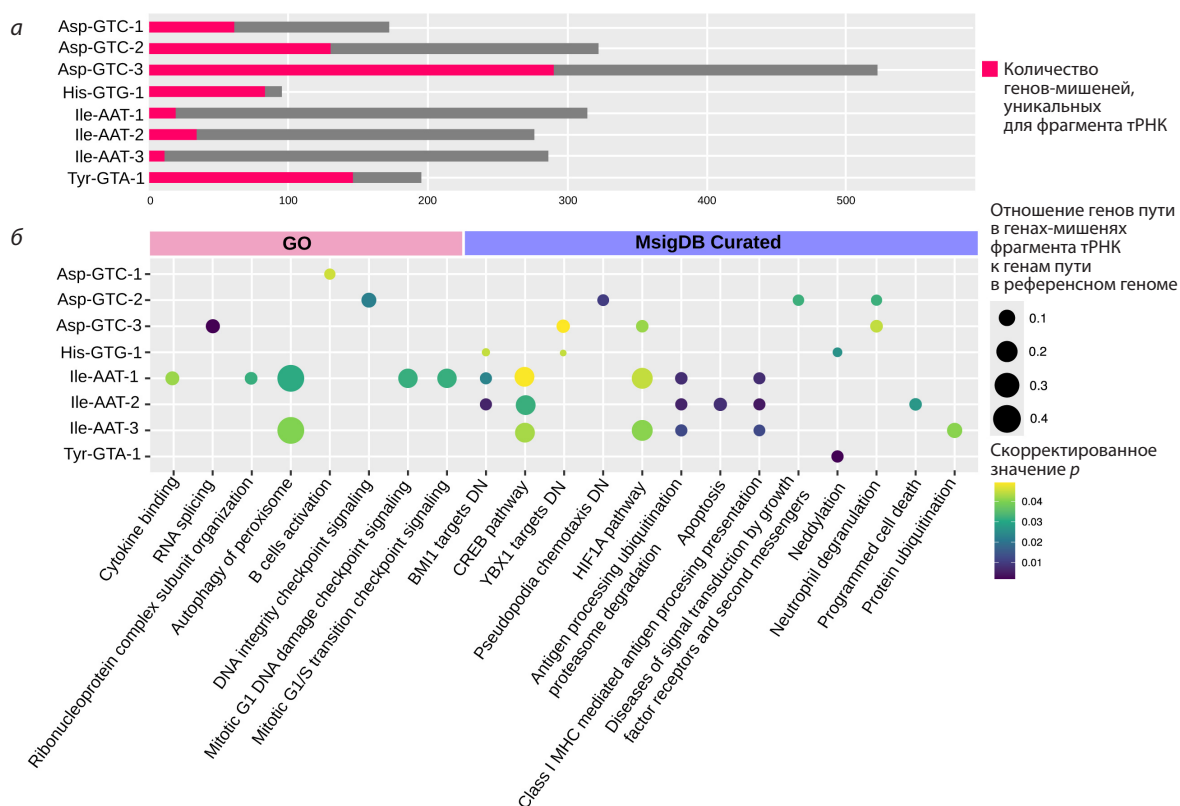


Рис. 2. Предсказание генов-мишеней фрагментов тРНК среди генов, экспрессирующихся в моноцитах человека. а – количество генов-мишеней для каждого фрагмента тРНК. Розовым цветом отмечено количество генов, имеющих сайт связывания только с одним тРНК фрагментом, серым – количество генов, являющихся мишенями нескольких фрагментов тРНК; б – функциональное обогащение генов-мишеней каждого фрагмента тРНК по базам данных GO (Gene Ontology) и curated MsigDB (curated collection of the Molecular Signatures Database – База данных молекулярных сигнатур, регуляторные пути которой курируются и аннотируются вручную).

Наибольшее количество обогащенных путей выявлено для генов-мишеней фрагмента Ile-AAT-1: 15 регуляторных путей по базе MsigDB и 26 наборов генов по базе GO. Гены-мишени Asp-GTC-1 и Tyr-GTA-1 были обогащены по наименьшему количеству путей (два термина GO для 172 генов-мишеней Asp-GTC-1 и два пути MsigDB для 195 генов-мишеней Tyr-GTA-1). Интересно, что самый большой набор генов-мишеней был обогащен практически таким же количеством путей, как и самый маленький (18 путей для Asp-GTC-3 и 17 путей для His-GTG-1).

Гены-мишени в моноцитах человека были обогащены по путям, связанным с клеточным циклом и гибелью клетки (контроль клеточного цикла (M16357, GO:0044774, GO:0044819), программируемая гибель клеток (M27436, M15303)), иммунным ответом и воспалением (дегрануляция нейтрофилов (M27620), презентация антигена через МНС-1 (M1066), процессинг антигена через протеасому (M1070), активация В-клеток (M10657), связывание цитокинов (M18255)). Данные представлены в Приложении 3.

Таким образом, выявлено, что фрагменты тРНК из ЭПВ *O. felinus* имеют предсказанные сайты связывания в ге-

нах хозяина, продукты экспрессии которых вовлечены в важные клеточные процессы. Можно предполагать, что, участвуя в регуляции этих генов через малые некодирующие РНК в составе ЭПВ, трематоды могут быть способны влиять на активность иммунных клеток хозяина.

Поиск генов-мишеней фрагментов тРНК среди ДЭГ в моноцитах THP-1

Несмотря на то что моноциты человека THP-1 – широко используемая клеточная модель для изучения роли моноцитов в иммунных реакциях, существуют различия в экспрессии генов между первичными моноцитами и моноцитами THP-1 (Bosshart, Heinzelmann, 2016; Liu Y. et al., 2021). Поэтому для поиска генов-мишеней фрагментов тРНК среди ДЭГ в моноцитах THP-1 после обработки ЭПВ трематоды были выбраны все предсказанные гены-мишени (2145), а не только гены-мишени, экспрессирующиеся в моноцитах. Выявлено обогащение генами-мишенями набора ДЭГ (критерий хи-квадрат с поправкой Йейтса = 6.145, значение $p = 0.014$): из 1484 ДЭГ генами-мишенями были 159 генов. В результате для полученных генов была построена сеть взаимодействий (рис. 3) (Приложение 4).

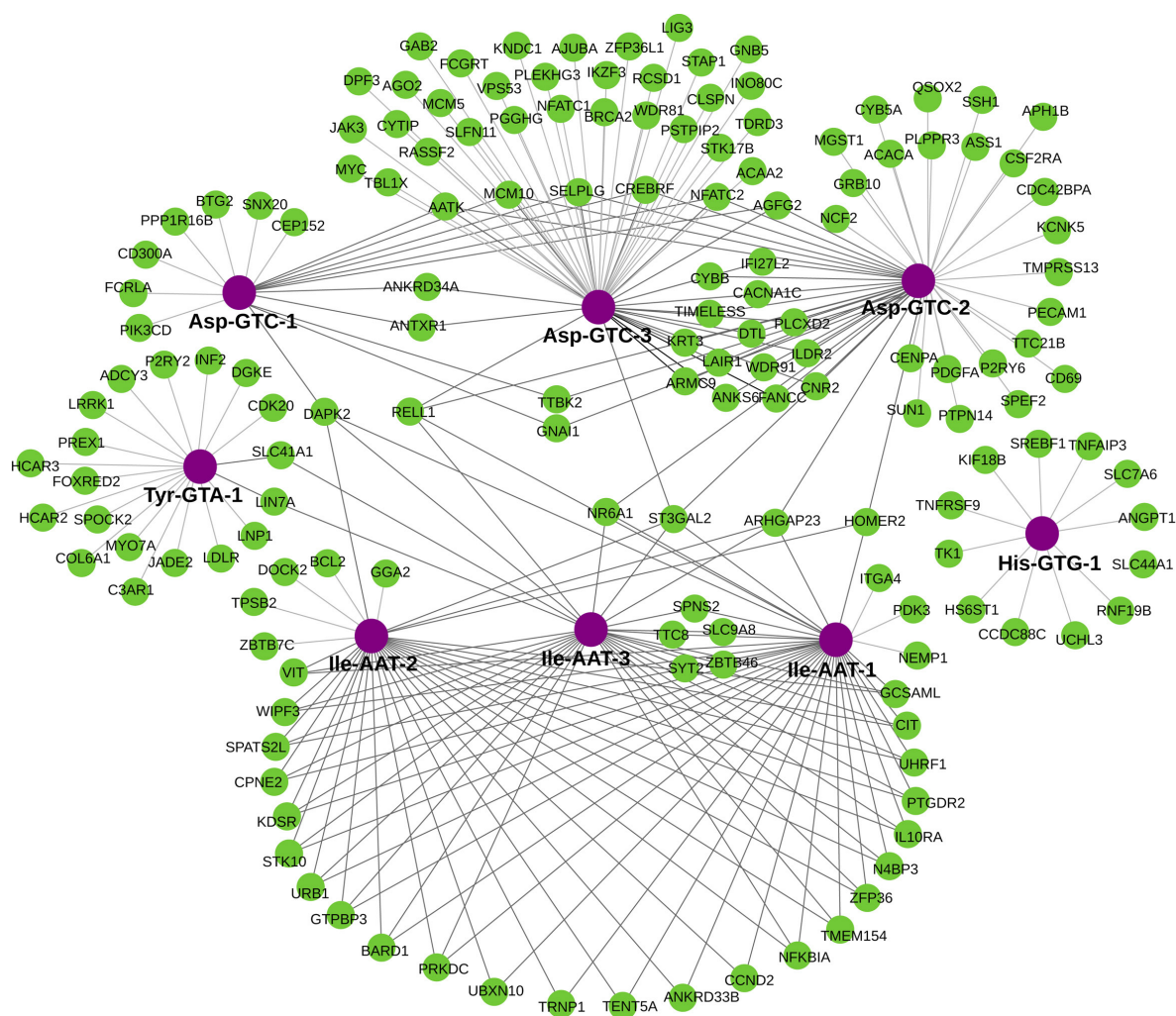


Рис. 3. Сеть взаимодействий между фрагментами тРНК и ДЭГ в моноцитах человека THP-1.

Гены-мишени, экспрессия которых значимо менялась при обработке моноцитов ТНР-1 ЭПВ *O. felinus*, относились к путям, связанным с регуляцией клеточного цикла и клеточной гибели (контроль целостности ДНК (M16357), переход из фазы G1 в фазу S (M2074), апоптоз (M15303) и программируемая клеточная гибель (M27436)), иммунного ответа (путь моноцитов (M4956), дифференцировка мононуклеарных макрофагов (M25144), презентация антигена через МНС-1 (M1066), процессинг антигена через протеасому (M1070)). Данные представлены в Приложении 4.

Обсуждение

Экзосомы и ЭПВ являются важным и консервативным элементом межклеточных коммуникаций у многих видов живых организмов, и только недавно началось изучение роли этих внеклеточных везикул в контексте взаимодействия между паразитом и хозяином. В состав везикул входят различные биологически активные молекулы, такие как белки, малые и длинные некодирующие РНК, мРНК, липиды (Zhang et al., 2022; Pakharukova et al., 2023).

Экзосомы паразитов способны проникать внутрь клеток хозяина и вызывать изменения в экспрессии генов и продукции секретируемых белков. Так, при обработке эпителиальных клеток шейки матки человека Ect1 E6/E7 экзосомами *Trichomonas vaginalis* усиливалась продукция провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 (Twu et al., 2013). Макрофаги мыши RAW264.7 поглощали экзосомы *Toxoplasma gondii*, при этом отмечались увеличение продукции провоспалительных цитокинов IL-12, TNF α и IFN γ и снижение противовоспалительного цитокина IL-10 (Li Y. et al., 2018).

Для *Schistosoma japonicum* было изучено влияние экзосом на экспрессию генов в макрофагах мыши RAW264.7 и выявлено изменение экспрессии генов, относящихся к путям Rap1, TNF и Toll-подобных рецепторов, взаимодействия цитокинов с рецепторами цитокинов. При этом обработка входящими в состав экзосом микроРНК вызывала увеличение продукции TNF α этими клетками (Liu J. et al., 2019). В нашем случае при обработке активированных моноцитов человека ТНР-1 ЭПВ *O. felinus* мы наблюдали значимое увеличение экспрессии генов, относящихся к сигнальному пути TNF α и являющихся участниками провоспалительного ответа: *TNF*, *CCL2*, *CXCL2*, *CXCL3*, *IL6ST*, *NFKB2*, *REL*, *RELB*.

Интересно, что экзосомы *Fasciola hepatica* не вызывали повышения уровня продукции TNF α в моноцитах ТНР-1, но увеличивали уровень продукции TGF- β , NOS2 (Sánchez-López et al., 2023). Различия между ответом моноцитов ТНР-1 на ЭПВ *F. hepatica* и *O. felinus* соотносятся с исследованиями, где описано, что экскреторно-секреторный продукт и секретируемые белки *F. hepatica* смещают фенотип макрофагов в сторону противовоспалительного M2 фенотипа (Flynn et al., 2007; Figueroa-Santiago, Espino, 2014), тогда как воздействие взрослых трематод *Opisthorchis viverrini* и экскреторно-секреторный продукт *Clonorchis sinensis* – близкородственных видов *O. felinus*, способствует развитию провоспалительного M1 фенотипа (Hongsrichan et al., 2014; Kim et al., 2017). Однако до сих

пор неизвестно, какие именно молекулы, входящие в состав экскреторно-секреторного продукта этих трематод, могут обуславливать различия в иммунном ответе хозяина.

Малые РНК, происходящие из тРНК (tsRNAs), являются отдельным классом малых некодирующих РНК и входят в состав экзосом различных видов паразитов (Fontenla et al., 2022; Kusakisako et al., 2023; Natali et al., 2023), но их роль во взаимодействии между паразитом и хозяином до сих пор остается недостаточно изученной. На сегодняшний день нет данных об эффекте фрагментов тРНК из экзосом паразитов на клетки хозяина в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Тем не менее фрагменты тРНК активно изучаются как маркеры различных заболеваний и новые регуляторные молекулы, в том числе и в иммунных клетках. Так, при колоректальном раке повышен уровень фрагментов тРНК (tRF-3022b, tRF-3030b и tRF-5008b) в экзосомах из плазмы крови; снижение уровня этих фрагментов приводит к остановке клеточного цикла в раковых клетках и индуцирует апоптоз. Фрагмент tRF-3022b может снижать поляризацию макрофагов M2, поскольку этот фрагмент тРНК связывается с фактором ингибирования макрофагов MIF (Lu et al., 2022). Фрагмент 5'-His-GUG повышен в моноцитах ТНР-1 и снижается при дифференцировке клеток в макрофаги. При этом макрофаги, трансфицированные этим фрагментом (т.е. с повышенным уровнем 5'-His-GUG), показывают снижение выживаемости при воздействии индуктором апоптоза (Jayaram et al., 2025).

Паразитарные фрагменты тРНК имеют сайты связывания с 3'-нетранслируемыми областями мРНК генов человека, но, вероятно, их действие будет зависеть от клеточного типа. В моноцитах человека гены-мишени фрагментов тРНК относятся к путям, связанным с клеточным циклом, гибелью клетки, иммунным ответом. Вероятно, трематоды способны влиять на эти процессы в иммунных клетках хозяина, секретируя ЭПВ с фрагментами тРНК.

Чтобы оценить возможное влияние фрагментов тРНК из ЭПВ на экспрессию их генов-мишеней, мы провели поиск генов-мишеней среди ДЭГ в моноцитах ТНР-1 после обработки ЭПВ *O. felinus* и выявили значимое обогащение. Экспрессия части генов-мишеней снижалась, но были и гены, экспрессия которых увеличивалась. Это может быть связано с неканоническими механизмами регуляции генов, как описано для микроРНК (Valinezhad et al., 2014).

Гены-мишени, экспрессия которых значимо менялась при обработке моноцитов ТНР-1 ЭПВ трематоды, относились к путям клеточного цикла и иммунного ответа. При этом пути во многом совпадали с обогащенными путями для всех генов-мишеней, экспрессирующихся в моноцитах и клетках крови. Вероятно, фрагменты тРНК паразита могут вносить некоторый вклад в регуляцию этих процессов в моноцитах хозяина, меняя уровень экспрессии небольшого количества генов.

Однако требуется проведение экспериментов *in vivo* с синтезированными аналогами фрагментов тРНК, чтобы подтвердить участие паразитарных РНК в регуляции этих процессов. Кроме того, поскольку в состав экскреторно-секреторного продукта и экзосомо-подобных ве-

зикул *O. felineus* входит спектр биологически активных соединений (Pakharukova et al., 2023), может происходить синергическое действие компонентов на клетки хозяина, поэтому необходимо изучать и другие типы биологически активных молекул, например микроРНК.

Заключение

Роль экзосомо-подобных везикул трематоды *O. felineus* в развитии иммунного ответа хозяина остается недостаточно изученной. В частности, неизвестна роль входящих в состав везикул малых некодирующих РНК, таких как фрагменты тРНК. В настоящее время эти молекулы активно изучаются в контексте различных заболеваний и как новые регуляторные молекулы.

В этом исследовании выполнен транскриптомный анализ моноцитов человека THP-1, обработанных экзосомо-подобными везикулами *O. felineus*, предсказаны гены-мишени известных фрагментов тРНК трематоды среди генов, экспрессирующихся в моноцитах человека, а также проведен поиск генов-мишеней среди дифференциально экспрессирующихся генов в моноцитах THP-1 после обработки экзосомо-подобными везикулами *O. felineus*.

В дальнейшем необходимо валидировать полученные результаты в экспериментах *in vivo*, включая: 1) исследование пролиферативной и миграционной активности, а также клеточного цикла клеток, обработанных синтезированными аналогами фрагментов тРНК; 2) проверку взаимодействия генов-мишеней с использованием репортерных конструкций, содержащих 3'-некодируемые области мРНК генов-мишеней; 3) оценку уровня экспрессии генов-мишеней на уровне мРНК (ПЦР в реальном времени) и белков (Вестерн-блот анализ).

Список литературы / References

- Araújo M.I., Hoppe B.S., Medeiros M. Jr, Carvalho E.M. *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(5): 27-32. doi 10.1590/s0074-02762004000900005
- Artuyants A., Campos T.L., Rai A.K., Johnson P.J., Dauros-Singorenko P., Phillips A., Simoes-Barbosa A. Extracellular vesicles produced by the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* contain a preferential cargo of tRNA-derived small RNAs. *Int J Parasitol*. 2020; 50(14):1145-1155. doi 10.1016/j.ijpara.2020.07.003
- Bhuva D., Smyth G., Garnham A. msigdb: an ExperimentHub package for the Molecular Signatures Database (MSigDB). R package version 1.18.0. 2025. doi 10.18129/B9.bioc.msigdb
- Bosshart H., Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med*. 2016;4(21):438. doi 10.21037/atm.2016.08.53
- Chan P.P., Lin B.Y., Mak A.J., Lowe T.M. tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(16):9077-9096. doi 10.1093/nar/gkab688
- Chen W., Peng W., Wang R., Bai S., Cao M., Xiong S., Li Y., Yang Y., Liang J., Liu L., Yazdani H.O., Zhao Y., Cheng B. Exosome-derived tRNA fragments tRF-GluCTC-0005 promotes pancreatic cancer liver metastasis by activating hepatic stellate cells. *Cell Death Dis*. 2024;15(1):102. doi 10.1038/s41419-024-06482-3
- Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21. doi 10.1093/bioinformatics/bts635
- Figueroa-Santiago O., Espino A.M. *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein induces the alternative activation of human macrophages. *Infect Immun*. 2014;82(12):5005-5012. doi 10.1128/IAI.02541-14
- Flynn R.J., Irwin J.A., Olivier M., Sekiya M., Dalton J.P., Mulcahy G. Alternative activation of ruminant macrophages by *Fasciola hepatica*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;120(1-2):31-40. doi 10.1016/j.vetimm.2007.07.003
- Fontenla S., Langleib M., de la Torre-Escudero E., Domínguez M.F., Robinson M.W., Tort J. Role of *Fasciola hepatica* small RNAs in the interaction with the mammalian host. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;11:812141. doi 10.3389/fcimb.2021.812141
- Hongsrichan N., Intuyod K., Pinlaor P., Khoontawad J., Yongvanit P., Wongkham C., Roytrakul S., Pinlaor S. Cytokine/chemokine secretion and proteomic identification of upregulated annexin A1 from peripheral blood mononuclear cells cocultured with the liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Infect Immun*. 2014;82(5):2135-2147. doi 10.1128/IAI.00901-13
- Jayaram A., Galande S., Sharbati S., Deshpande D., Pawar K. Profile of tRNA-derived short non-coding RNAs during monocyte differentiation and their role in macrophage survival. *RNA Biol*. 2025;22(1): 1-9. doi 10.1080/15476286.2025.2525886
- Khowawisetsut L., Vimontpatanon S., Lekmanee K., Sawasdiopin H., Srimark N., Chotivanich K., Pattanapanyasat K. Differential effect of extracellular vesicles derived from *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells on monocyte polarization. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3): 2631. doi 10.3390/ijms24032631
- Kim E.M., Kwak Y.S., Yi M.H., Kim J.Y., Sohn W.M., Yong T.S. *Clonorchis sinensis* antigens alter hepatic macrophage polarization *in vitro* and *in vivo*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(5):e0005614. doi 10.1371/journal.pntd.0005614
- Kusakisako K., Nakao R., Katakura K. Detection of parasite-derived tRNA and rRNA fragments in the peripheral blood of mice experimentally infected with *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* using next-generation sequencing analysis. *Parasitol Int*. 2023;93:102716. doi 10.1016/j.parint.2022.102716
- Lertjuthaporn S., Somkird J., Lekmanee K., Atipimonpat A., Sukapimrom K., Sawasdiopin H., Tiewcharoen S., Pattanapanyasat K., Khowawisetsut L. Extracellular vesicles from *Naegleria fowleri* induce IL-8 response in THP-1 macrophage. *Pathogens*. 2022;11(6): 632. doi 10.3390/pathogens11060632
- Li N., Yao S., Yu G., Lu L., Wang Z. tRFtarget 2.0: expanding the targetome landscape of transfer RNA-derived fragments. *Nucleic Acids Res*. 2024;52(5):345-350. doi 10.1093/nar/gkad815
- Li Y., Liu Y., Xiu F., Wang J., Cong H., He S., Shi Y., Wang X., Li X., Zhou H. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:467-477. doi 10.2147/IJN.S151110
- Lishai E., Pakharukova M. The liver fluke *Opisthorchis felineus* exosomal tRNA-derived small RNAs as potential mediators of host manipulation. *Biomolecules*. 2026;16(2):244. doi 10.3390/biom16020244
- Lishai E.A., Zaparina O.G., Kapushchak Y.K., Sripa B., Hong S.J., Cheng G., Pakharukova M.Y. Comparative liver transcriptome analysis in hamsters infected with food-borne trematodes *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, or *Clonorchis sinensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024;18(12):e0012685. doi 10.1371/journal.pntd.0012685
- Liu J., Zhu L., Wang J., Qiu L., Chen Y., Davis R.E., Cheng G. *Schistosoma japonicum* extracellular vesicle miRNA cargo regulates host macrophage functions facilitating parasitism. *PLoS Pathog*. 2019; 15(6):e1007817. doi 10.1371/journal.ppat.1007817
- Liu Y., Li H., Czajkowsky D.M., Shao Z. Monocytic THP-1 cells diverge significantly from their primary counterparts: a comparative examination of the chromosomal conformations and transcriptomes. *Hereditas*. 2021;158(1):43. doi 10.1186/s41065-021-00205-w
- Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15:550. doi 10.1186/s13059-014-0550-8

- Lu S., Wei X., Tao L., Dong D., Hu W., Zhang Q., Tao Y., Yu C., Sun D., Cheng H. A novel tRNA-derived fragment tRF-3022b modulates cell apoptosis and M2 macrophage polarization via binding to cytokines in colorectal cancer. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):176. doi 10.1186/s13045-022-01388-z
- Mann M., Wright P.R., Backofen R. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(1):435-439. doi 10.1093/nar/gkx279
- Mordvinov V.A., Minkova G.A., Kovner A.V., Ponomarev D.V., Lvova M.N., Zapparina O., Romanenko S.A., Shilov A.G., Pakharukova M.Y. A tumorigenic cell line derived from a hamster cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis felinus* liver fluke infection. *Life Sci.* 2021;277:119494. doi 10.1016/j.lfs.2021.119494
- Natali L., Luna Pizarro G., Moyano S., de la Cruz-Thea B., Musso J., Rópolo A.S., Eichner N., Meister G., Musri M.M., Feliziani C., Touz M.C. The exosome-like vesicles of *Giardia* assemblages A, B, and E are involved in the delivering of distinct small RNA from parasite to parasite. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11):9559. doi 10.3390/ijms24119559
- Norouzi M., Pirestani M., Arefian E., Dalimi A., Sadraei J., Mirjalali H. Exosomes secreted by *Blastocystis* subtypes affect the expression of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (TNF α , IL-6, IL-10, IL-4). *Front Med.* 2022;9:940332. doi 10.3389/fmed.2022.940332
- Pakharukova M.Y., Pakharukov Y.V., Mordvinov V.A. Effects of miconazole/clotrimazole and praziquantel combinations against the liver fluke *Opisthorchis felinus* in vivo and in vitro. *Parasitol Res.* 2018;117(7):2327-2331. doi 10.1007/s00436-018-5895-6
- Pakharukova M.Y., Samsonov V.A., Serbina E.A., Mordvinov V.A. A study of tribendimidine effects in vitro and in vivo on the liver fluke *Opisthorchis felinus*. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):23. doi 10.1186/s13071-019-3288-z
- Pakharukova M.Y., Savina E., Ponomarev D.V., Gubanov N.V., Zapparina O., Zakirova E.G., Cheng G., Tikhonova O.V., Mordvinov V.A. Proteomic characterization of *Opisthorchis felinus* exosome-like vesicles and their uptake by human cholangiocytes. *J Proteomics.* 2023;283-284:104927. doi 10.1016/j.jprot.2023.104927
- Passos L.S., Gazzinelli-Guimarães P.H., Oliveira Mendes T.A., Guimarães A.C., Silveira Lemos D.D., Ricci N.D., Gonçalves R., Bartholomeu D.C., Fujiwara R.T., Bueno L.L. Regulatory monocytes in helminth infections: insights from the modulation during human hookworm infection. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):253. doi 10.1186/s12879-017-2366-0
- Prehn J.H.M., Jirstrom E. Angiogenin and tRNA fragments in Parkinson's disease and neurodegeneration. *Acta Pharmacol Sin.* 2020;41(4):442-446. doi 10.1038/s41401-020-0375-9
- Rehmsmeier M., Steffen P., Hochsmann M., Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA.* 2004;10(10):1507-1517. doi 10.1261/rna.5248604
- Saltykova I.V., Ogorodova L.M., Bragina E.Y., Puzyrev V.P., Freidin M.B. *Opisthorchis felinus* liver fluke invasion is an environmental factor modifying genetic risk of atopic bronchial asthma. *Acta Trop.* 2014;139:53-56. doi 10.1016/j.actatropica.2014.07.004
- Sánchez-López C.M., González-Arce A., Soler C., Ramírez-Toledo V., Trellis M., Bernal D., Marcilla A. Extracellular vesicles from the trematodes *Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum* trigger different responses in human THP-1 macrophages. *J Extracell Vesicles.* 2023;12(4):e12317. doi 10.1002/jev2.12317
- Silverman J.M., Clos J., Horakova E., Wang A.Y., Wiesig M., Kelly I., Lynn M.A., McMaster W.R., Foster L.J., Levings M.K., Reiner N.E. Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 2010;185(9):5011-5022. doi 10.4049/jimmunol.1000541
- Strømme O., Heck K.A., Brede G., Lindholm H.T., Otterlei M., Arum C.J. tRNA-derived fragments as biomarkers in bladder cancer. *Cancers.* 2024;16(8):1588. doi 10.3390/cancers16081588
- Twu O., de Miguel N., Lustig G., Stevens G.C., Vashisht A.A., Wohlschlegel J.A., Johnson P.J. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003482. doi 10.1371/journal.ppat.1003482
- Valinezhad Orang A., Safaralizadeh R., Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *Int J Genomics.* 2014;2014:970607. doi 10.1155/2014/970607
- Xia J., Jiang S.C., Peng H.J. Association between liver fluke infection and hepatobiliary pathological changes: a systematic review and meta-analysis. *PloS One.* 2015;10(7):e0132673. doi 10.1371/journal.pone.0132673
- Yu G., Wang L.G., Han Y., He Q.Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS.* 2012;16(5):284-287. doi 10.1089/omi.2011.0118
- Zhang X., Duan S., Li X., Ding J., Zuo L., Sun B., Zhang X., Jiang X., Gao Y., Hu X., Han S. Differences in the secretory exosomes of *Clonorchis sinensis* adults at different incubation times. *Acta Trop.* 2022;234:106604. doi 10.1016/j.actatropica.2022.106604

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.10.2025. После доработки 04.03.2026. Принята к публикации 24.04.2026.