

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**ДЕНИСОВА АЛИНА ЕВГЕНЬЕВНА**

**ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В  
УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ПРЕХОДЯЩЕЙ  
ИШЕМИИ МОЗГА У КРЫС**

1.5.7. Генетика

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, доцент  
Губский Леонид Васильевич

Москва – 2025

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Введение.....	12
1.2 Модели церебральной ишемии у животных .....	13
1.3 Основные патофизиологические аспекты ишемического повреждения головного мозга.....	21
1.4 Современные методы анализа транскриптома и генетические аспекты ишемического повреждения головного мозга .....	25
1.5 Пептиды меланокортинового ряда и их биологические эффекты.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	42
2.1 Животные.....	42
2.2 Модель преходящей ишемии головного мозга.....	42
2.3 Дизайн исследования.....	43
2.4 Дизайн исследования с оценкой неврологического статуса, объема ишемического повреждения в условиях модели преходящей фокальной ишемии под влиянием семакса.....	45
2.5 Гистологическое исследование головного мозга крыс .....	45
2.6 Магнитно-резонансная томография.....	46
2.7 Полногеномное секвенирование мРНК (RNA-seq) .....	47
2.8 Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) .....	49
2.9 Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов .....	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	52
3.1 Изменение экспрессии генов в условиях ишемически-реперфузионного повреждения и под влиянием семакса с помощью метода RNA-seq .....	52

3.2 Проверка результатов RNA-seq с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.....	59
3.3 Анализ функциональных категорий, кодируемых ДЭГ, в условиях ишемически-реперфузионного повреждения и под влиянием семакса .....	600
3.4 Анализ сигнальных путей, ассоциированных с ДЭГ, в условиях ишемически-реперфузионного повреждения и под влиянием семакса.....	72
3.5 Анализ влияния пептидов семакс, PGP, PGPL на экспрессию генов в условиях ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга с помощью ОТ-ПЦР.....	76
3.6 Морфология тканей мозга крыс в условиях модели преходящей фокальной ишемии .....	81
3.7 Оценка результатов магнитно-резонансной томографии.....	833
3.8 Анализ влияния семакса на выживаемость, размер очага ишемического повреждения, неврологический дефицит в условиях преходящей фокальной ишемии мозга у крыс .....	86
3.9 Предполагаемый механизм множественного действия пептидов в мозге.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	900
ВЫВОДЫ .....	933
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	955
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	966
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	977
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	1233
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	1333
ПРИЛОЖЕНИЕ В .....	1755

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Сосудистые заболевания головного мозга, в частности, ишемический инсульт, являются одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения во всем мире. Несмотря на значимые исследования последних лет, не существует клинически доказанной эффективной нейропротективной терапии, способной уменьшать тяжесть повреждения мозга, вызванной инсультом. Поэтому разработка эффективных фармакологических препаратов для людей, страдающих вышеуказанной патологией мозга, остается перспективной задачей. Так как повреждение мозговой ткани вследствие ишемии вызвано комплексом сложных патофизиологических процессов, для оптимального определения терапевтических целей необходимо дальнейшее изучение механизмов церебральной ишемии на клеточном и молекулярном уровнях. Также важным подходом в разработке новых стратегий лечения церебральной ишемии является выявление новых соединений с нейропротекторными свойствами или повышение эффективности уже существующих. Для достижения наилучших результатов, разрабатываемые соединения должны обладать широким спектром действия, а именно, быть направленными на несколько нейрпатологических и/или нейропротективных путей, а также обладать минимальными побочными эффектами на организм.

В связи со стремительным развитием методов молекулярной генетики, большой интерес в последнее время представляет исследование особенностей функционирования множества генов на транскриптомном уровне в условиях ишемического повреждения и при воздействии фармакологически активных веществ. В настоящее время активно исследуется класс регуляторных пептидов – глипролинов, главной особенностью которых является разнонаправленность действия и способность их метаболитов оказывать самостоятельные биологические эффекты. Однако, молекулярные механизмы, лежащие в основе действия данных пептидов, остаются неясными.

## Степень разработанности темы исследования

Современные технологии в транскриптомике в настоящее время играют большую роль в медико-биологических исследованиях. Они могут выявить взаимосвязь между генетическими изменениями и сложными биологическими процессами и имеют колоссальное значение в диагностике, прогностике и терапии заболеваний. Основное направление исследования заключается в детекции профиля экспрессии генов в ответ на ишемическое повреждение, идентификации молекулярных функций определенных генов. Все это необходимо для улучшения понимания патогенеза развития ишемического инсульта. Так обнаруженные определенные гены/кластеры генов могут служить «терапевтическими мишенями» для разработки новых лекарственных соединений или совершенствования уже имеющихся препаратов в лечении и/или профилактике ишемического инсульта.

### Цель и задачи

**Целью** настоящего исследования явилось изучение влияния пептидных соединений глипролинового ряда Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (семакс), Pro-Gly-Pro (PGP), Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) на экспрессию генов, участвующих в процессах воспаления и нейросигнализации, и на размер ишемического повреждения в условиях преходящей фокальной ишемии мозга у крыс.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Получить данные о транскрипции генов и отличиях в их экспрессии в различные временные интервалы (4,5 и 24 часа после начала окклюзии) в условиях модели преходящей фокальной ишемии и при применении гептапептида семакс на фоне церебральной ишемии, используя полногеномное секвенирование РНК (RNA-seq).

2. Оценить изменение относительного содержания мРНК ряда генов, участвующих в передаче сигналов в центральной нервной системе и в воспалительном ответе, в условиях модели преходящей фокальной ишемии мозга

крыс спустя 24 часа после начала окклюзии на фоне применения пептидов семакс, RGP, RGPL с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени.

3. Изучить по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) размеры очага повреждения головного мозга крыс в условиях модели преходящей фокальной ишемии и оценить влияние на данный показатель пептидов семакс, RGP, RGPL спустя 4,5 и 24 часа после начала окклюзии.

4. Исследовать влияние гептапептида семакс на показатель выживаемости, размер ишемического повреждения и неврологический дефицит спустя 1, 3, 7 и 14 суток после начала окклюзии в условиях модели преходящей фокальной ишемии мозга.

### **Научная новизна**

В настоящей диссертационной работе впервые исследованы эффекты пептидов семакс, RGP, RGPL на экспрессию генов на модели преходящей фокальной ишемии мозга, вызванной эндоваскулярной окклюзией средней мозговой артерии с использованием филамента. Изучен ответ транскриптома в условиях данной модели спустя 4,5 и 24 часа после начала окклюзии. Также в рамках полногеномного исследования показан эффект семакса на процессы, протекающие в головном мозге при церебральной ишемии. Впервые в различные временные интервалы под контролем МРТ оценены локация и объем очага ишемического повреждения, а также эффект нейропептидов на данные показатели. В рамках длительного наблюдения за животными (14 суток) оценен эффект семакса на показатель выживаемости, на динамику неврологических нарушений в условиях ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга.

Полученные в данной работе результаты представляют большой научно-практический интерес для дальнейших углубленных исследований в области молекулярной генетики, а также в клинической практике для расширения спектра терапевтических показаний уже используемого препарата семакс и внедрения новых лекарственных средств.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Применение на экспериментальных моделях церебральной ишемии современных транскриптомных технологий, таких как полногеномное секвенирование РНК (RNA-seq), позволяет получить сведения о функционировании генов, тем самым улучшив понимание сложных механизмов ишемически - реперфузионного повреждения головного мозга. Полученные в ходе исследования результаты могут быть использованы для разработки новых лекарственных технологий в лечении инсульта и совершенствовании уже применяющихся в клинической практике.

## **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных инструментальных методов исследования. Часть работы по моделированию экспериментальной ишемии головного мозга с последующей оценкой неврологического статуса и детекцией очага повреждения была выполнена с использованием высокотехнологичного лабораторного оборудования в Центре Коллективного Пользования «Медицинские и биотехнологические нанотехнологии» ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Работы по анализу транскриптома в условиях модели преходящей ишемии мозга выполнены в отделе молекулярных основ генетики человека Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» и в ЗАО «Геноаналитика». Анализ полученных данных проведен с применением описательных и аналитических статистических методов, а также с использованием следующих программ: ImageJ, IBM SPSS Statistics 26, Relative Expression Software Tool (REST) 2005, Microsoft Excel.

Настоящая исследовательская работа выполнена при поддержке следующих грантов: грант Российского научного фонда №19-14-00268 «Транскриптомные исследования регуляции клеточных функций мозга под действием пептидных препаратов в норме, при остром стрессе и экспериментальной ишемии», 2019-2021

(Grant from the Russian Science Foundation №19-14-00268 «Transcriptome studies of the regulation of brain cell functions under the action of peptide drugs in the norm, at the acute stress and experimental ischemia», 2019-2021); продление гранта Российского научного фонда №19-14-00268П «Транскриптомные исследования регуляции клеточных функций мозга под действием пептидных препаратов в норме, при остром стрессе и экспериментальной ишемии», 2022-2023 (Extension of grant from the Russian Science Foundation №19-14-00268P «Transcriptome studies of the regulation of brain cell functions under the action of peptide drugs in the norm, at the acute stress and experimental ischemia», 2022-2023); грант Российского фонда фундаментальных исследований №16-34-00760 «Исследование молекулярно-генетических особенностей воздействия синтетических нейропептидов на клетки тканей головного мозга при экспериментальной ишемии», 2016-2017 (Grant from the Russian Foundation for Basic Research №16-34-00760 «Research of molecular and genetic peculiar properties of synthetic neuropeptide actions to the brain cells in experimental ischemia», 2016-2017); грант Российского научного фонда №16-14-00077 «Поиск новых мишеней воздействия пептидных препаратов, улучшающих работу мозга, включая когнитивные функции, в норме и патологии», 2016-2018 (Grant from the Russian Science Foundation №16-14-00077 «Search for new targets of peptide drugs that improve brain functioning, including cognition in norm and pathology», 2016-2018).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Было идентифицировано большое количество генов (>17000) после ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга в условиях эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии, часть из которых продемонстрировала достоверные изменения экспрессии. Администрирование гептапептидом семаксом в ранние часы от момента окклюзии средней мозговой артерии не вызывало ответа транскриптома. Однако, через сутки были идентифицированы дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ), причем направление изменений было противоположно ишемически-реперфузионному

воздействию.

2. Было выявлено значительное количество функциональных категорий белков и сигнальных путей, ассоциированных с ДЭГ в условиях ишемически-реперфузионного повреждения, а также при применении семакса. В фокусе исследовательского интереса находились гены, связанные с процессами воспаления и передачи нервных сигналов в головном мозге. В условиях инфаркта головного мозга отмечалось повышение экспрессии генов, отвечающих за процессы воспаления и подавление экспрессии генов, ответственных за передачу сигнала в ЦНС. В то же время действие гептапептида было противоположным действием ишемически-реперфузионного повреждения.

3. Было показано, что применение пептидов PGP и PGPL в условиях преходящей фокальной ишемии не оказывало статистически значимого влияния на уровень экспрессии генов воспаления, в то время как некоторые гены, участвующие в нейротрансмиссии, достоверно изменили свою экспрессию. Была подчеркнута важность последовательности АКТГ (4 – 7) для проявлений эффекта семакса.

4. Было выявлено положительное влияние семакса на динамику очаговой неврологической симптоматики к 14 суткам от начала обратимой окклюзии средней мозговой артерии, в то время как пептид не влиял на динамику очага повреждения по данным МРТ и на показатель выживаемости.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов основывается на правильно спланированной методике эксперимента, на достаточном количестве наблюдений, на использовании современных методов исследования и статистической обработки данных.

Апробация работы состоялась 14 ноября 2023 года на совместном заседании кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, кафедры общей и медицинской генетики медико-биологического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ

им. Н.И. Пирогова и кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики имени академика Л.О. Бадаляна педиатрического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол №3 от 14.11.23).

Основные результаты диссертации были доложены и обсуждены на международных конференциях: Международная Школа молодых ученых по молекулярной генетике «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем» (г. Звенигород, Россия, 19 -24 ноября 2018), European Human Genetics Conference (Copenhagen, Denmark, May 27-30 2017), Нейронаука для медицины и психологии: XVII Международный междисциплинарный конгресс (г. Судак, Крым, Россия, 3 – 10 июня 2021), XI Всероссийский съезд неврологов и IV конгресс Национальной ассоциации по борьбе с инсультом (г. Санкт – Петербург, Россия, 15 – 19 июня 2019).

### **Личный вклад автора в исследование**

С учетом анализа отечественных и зарубежных литературных источников, исследований предыдущих лет, автором определен фокус научных интересов и произведена разработка дизайна исследования. Лично автором выполнены хирургические вмешательства на всех участвующих в эксперименте лабораторных животных, а именно моделирование преходящей фокальной ишемии головного мозга, а также введение препаратов согласно дизайну исследования и оценка неврологического статуса. Автор самостоятельно проводила исследование на магнитно – резонансном томографе для малых лабораторных животных с дальнейшей интерпретацией получаемых изображений. Автор анализировала результаты, полученные в ходе полногеномного секвенирования РНК (RNA-seq) с последующим выбором генов для ОТ-ПЦР. Автор выполнила постановку ОТ-ПЦР с последующей интерпретацией результатов. Также принимала участие в подготовке материала для гистологического исследования. Статистическая обработка данных, написание и оформление научной работы выполнены автором лично.

## **Научные публикации**

По теме диссертации опубликовано 7 статей, 6 из которых опубликованы в рецензируемых медицинских журналах (по специальности «Генетика»), рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования РФ (из них 3 в журналах, индексируемых в Web of Science и/или SCOPUS). Результаты исследований представлены в 4 тезисах, опубликованных в сборниках научных конференций.

## **Внедрение результатов работы в практику**

Полученные в ходе данной работы результаты внедрены в практическую деятельность Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница №31 имени академика Г.М. Савельевой Департамента здравоохранения города Москвы».

Также полученные результаты внедрены в педагогическую деятельность кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста и состоит из введения; 3 глав, включающих в себя обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение; заключения и выводов, практических рекомендаций, приложений. Количество рисунков в работе - 19. Количество таблиц, включая приложения, – 10. Список литературы содержит 226 источников, из них зарубежных 209 источников, 17 отечественных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Введение

Из всех инсультов 87% имеют ишемическое происхождение, 10% происходят по типу внутримозгового кровоизлияния, 3% приходится на субарахноидальное кровоизлияние [206]. Единственным доказанным эффективным лечением острого ишемического инсульта является восстановление мозгового кровотока с помощью тромболитической терапии и/или механической тромбэктомии. В качестве тромболитического средства в настоящий момент активно применяется тканевой активатор плазминогена (rt-PA), который увеличивает скорость артериальной реперфузии, восстанавливает перфузию и улучшает функциональные исходы ишемического инсульта [173]. В недавнем рандомизированном исследовании было продемонстрировано, что внутривенное введение тенектеплазы (TNK-tPA) является разумной альтернативой альтеплазе для пациентов с ишемическим инсультом, удовлетворяющим стандартным критериям для тромболитической терапии [144]. Несмотря на значительный прогресс в лечении пациентов, где рандомизированные контролируемые испытания внутривенного тромболитизиса (WAKE-UP) и механической тромбэктомии (DAWN, DEFUSE-3, HERMES) позволили расширить терапевтические окна, ишемический инсульт является одной из причин длительной инвалидизации и частой причиной смертности.

Клиническая вариабельность инсульта, главным образом с точки зрения тяжести, течения и локализации очага повреждения, а также возраст пациентов, факторы риска и коморбидные состояния, создают большие проблемы для разработки фармакологических подходов, так как нужны большие группы пациентов, чтобы избежать влияния посторонних факторов в разнообразии заболевания. Хотя рандомизированные клинические испытания являются ключом к разработке новых методов лечения, они дают ограниченное представление о механизмах лечения, требующих обычно анализа на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях, что может быть получено только в условиях моделей на животных. Учитывая данный факт, были разработаны модели церебральной

ишемии на животных, которые могут имитировать изменения, происходящие во время и после инфаркта головного мозга у человека. Модели на животных имеют большое значение для понимания патофизиологических механизмов ишемического повреждения, а также для разработки и тестирования новых методов лечения, которые могли бы применяться как самостоятельно, так и в сочетании с уже имеющимися доказанными и эффективными методами – тромболизисом, тромбэктомией.

## 1.2 Модели церебральной ишемии у животных

Многочисленные модели церебральной ишемии были разработаны за многие годы. Все модели нарушения мозгового кровоснабжения можно разделить на модели глобальной и фокальной ишемии [17]. При глобальной церебральной ишемии происходит снижение мозгового кровотока во всех областях головного мозга, что вызывает нейрональное повреждение в участках головного мозга, наиболее подверженных действию ишемии. Очевидно, если глобальная ишемия сохранится бесконечно долго, все нейроны погибнут. Глобальную ишемию можно воспроизвести двумя способами, один из которых заключается в прерывании мозгового кровотока, тогда как второй способ индуцируется ингибированием системного кровообращения. Также все модели глобальной ишемии можно разделить на полную или частичную.

Таким образом, модель глобальной церебральной ишемии можно воспроизвести следующими способами:

1) Путем декапитации. Данная техника была предложена много лет назад *Lowry* и использовалась у мелких животных для изучения биохимических процессов вследствие глобальной ишемии [128]. Однако достоверная оценка механизмов затруднительна, так как данная модель не подлежит модификациям.

2) Путем использования шейной манжеты/жгута. Данная техника подходит для воспроизведения ишемического повреждения как у мелких, так и крупных животных. Однако, для получения полной ишемии с помощью данной технологии, позвоночные артерии должны быть окклюзированы отдельно, так как они проходят

в канале поперечных отростков шейных позвонков и не могут быть окклюзированы с помощью манжеты [102].

3) Путем воспроизведения ситуации остановки сердечной деятельности вследствие фибрилляции желудочков [31], которая достигается подачей тока в эндокард правого желудочка или путем чреспищеводной или трансторакальной кардиостимуля [45, 46, 180]. Также имитировать кардиопульмональный шок можно путем болюсного введения хлорида калия, приводящего к асистолии [109, 164]. После заранее определенного времени начинают сердечно-легочную реанимацию путем компрессии грудной клетки. Данная методика позволяет избежать механического или электрического повреждения сердца, однако одной из проблем применения этой модели является необходимость поддержания температуры головного мозга 40°C (у мышей) или увеличить продолжительность остановки сердечной деятельности до 12 минут для гистопатологических изменений в определенных областях головного мозга.

4) Путем асфиксии, которая достигается отсоединением аппарата искусственной вентиляции легких от эндотрахеальной трубки у фармакологически парализованного животного [104].

5) Путем прекращения кровообращения посредством «непрерывной компрессии грудной клетки» или путем «пережатия сосудистого пучка сердца» [167, 190].

6) Путем окклюзии обеих общих сонных артерий одновременно со снижением артериального давления, которое достигается путем контролируемого кровотечения. Данная модель впервые была предложена *Eklof* и *Siesjo* в 1972 году и первоначально использовалась для характеристики энергетических процессов в головном мозге [59]. Однако, системная гипотензия приводит к тяжелым метаболическим нарушениям в различных органах и системах, включая головной мозг [60]. При этом пребывание животных под действием анестезии ограничивает исследователям оценку неврологического статуса и поведения при ишемии или ранней реперфузии [75, 139].

7) Путем окклюзии четырех сосудов, которая производится в два этапа: сначала выполняется окклюзия позвоночных артерий методом электрокоагуляции и наложение атравматических петель на общие сонные артерии, животному дают восстановиться в течение суток; на следующий день во время бодрствования производится окклюзия обеих общих сонных артерий путем затягивания петель. Постоянное лигирование позвоночных артерий и плохая выживаемость ограничивали применение методики окклюзии четырех сосудов. Впервые данная модель глобальной ишемии была разработана *Pulsinelli* и *Brierley* в 1979 году и в дальнейшем претерпела ряд модификаций [194].

8) Путем воздействия на семь сосудов: термокоагуляция основной артерии, пережатие наружных сонных и крылонебных артерий для ограничения коллатерального кровотока с последующим пережатием общих сонных артерий.

Несмотря на то, что вышеуказанные методики достаточно просты в исполнении, результаты, полученные на моделях глобальной ишемии, трудно экстраполировать на людей, ишемия у которых чаще всего носит фокальный характер. Так как большинство ишемических инсультов у человека связаны с окклюзией средней мозговой артерии (СМА), модели разрабатывались таким образом, чтобы вызвать ишемию именно в этом артериальном сегменте. На сегодняшний день существует значительное разнообразие моделей фокальной ишемии у животных, каждая из которых имеет как свои сильные, так и слабые стороны. Выбор соответствующей модели зависит от задач исследования. Модели фокальной ишемии головного мозга:

- *Модель с использованием нити или филамента для эндоваскулярной окклюзии СМА*

Внутрисосудистая окклюзия СМА представляет собой модель, имитирующую окклюзию М1 сегмента СМА у людей с ишемическим инсультом. Для индуцирования окклюзии СМА эндоваскулярно во внутреннюю сонную артерию (ВСА) до места отхождения от нее СМА вводят покрытый силиконом филамент или термически раздуваемую нить. Во время внутрисосудистой окклюзии СМА скорость мозгового кровотока уменьшается до 10-20% от

исходных значений [89, 90, 145, 151]. После удаления филамента скорость мозгового кровотока быстро восстанавливается до базового или близкого к базовому уровню [90, 91, 151]. Эта процедура позволяет индуцировать высоко воспроизводимую постоянную или преходящую фокальную ишемию головного мозга, покрывающую всю территорию кровоснабжения СМА. Тяжесть ишемического повреждения может быть изменена путем управления длительностью окклюзии СМА (время обычно составляет от 20 до 120 минут у мышей и от 30 до 180 минут у крыс). Продолжительная окклюзия СМА вызывает инфаркт головного мозга, захватывающий стриатум и кору [89, 90, 145], в то время как кратковременная окклюзия может быть использована для индуцирования нейронного повреждения в стриатуме [91, 151], который наиболее подвержен ишемии. При эндоваскулярной окклюзии СМА ядро ишемии окружено четко определенной пенумброй, что делает данную модель полезной для исследований, изучающих терапевтические подходы в остром периоде мозгового инфаркта (что позволяет исследовать нейропротективные препараты). Если длительность окклюзии СМА достаточная, то модель хорошо воспроизводит сенсомоторный и когнитивный дефицит. Из-за быстрой реперфузии, приводящей к раннему восстановлению энергетического состояния тканей и отсроченному формированию инфаркта головного мозга [90, 91], вторичное повреждение мозга в условиях данной модели наиболее выражено, чем после тромбоэмболического инсульта. Недостатком данной модели является смертность животных, особенно после постоянной или длительной преходящей окклюзии СМА, которая приводит к отеку мозга, обезвоживанию, потере аппетита, поэтому постоянную или очень длительную окклюзию ( $\geq 90$  минут для мышей,  $\geq 150$  минут для крыс) следует избегать.

В настоящее время модель эндоваскулярной окклюзии СМА претерпела ряд изменений. Например, существуют различные техники введения филамента во ВСА. Так, в исследовании *Smith et al., 2015*, в котором изучались два различных хирургических подхода для введения филамента, а именно через общую сонную артерию (ОСА) или через наружную сонную артерию (НСА), было

продемонстрировано улучшение восстановления перфузии и улучшение выживаемости животных в том случае, когда филамент был введен через НСА. Разница в смертности в этом эксперименте могла быть связана с проходимостью ОСА после извлечения филамента. А именно, при введении филамента через НСА, ОСА сохраняла свою проходимость, в отличие от случая, когда филамент вводился через ОСА, которая постоянно была перевязана.

Другая модификация данной модели включала поддержание проходимости НСА и ее ветвей для предотвращения повреждения лицевых мышц, что способствовало выздоровлению животных, так как минимализировалось страдание функции жевания и, как следствие, уменьшалась послеоперационная потеря веса. Еще одно усовершенствование, которое было введено для снижения смертности в условиях модели эндоваскулярной окклюзии СМА у склонных к инсульту спонтанно гипертензивных крыс, заключалось в выполнении трепанационного отверстия. Эта дополнительная методика может применяться одновременно с уменьшением продолжительности окклюзии при использовании пожилых животных или животных с факторами риска, которые, в свою очередь, и так подвержены более высокой смертности после оперативного вмешательства.

С целью одновременного контроля положения филамента, отсутствия кровотока и геморрагических осложнений в послеоперационном периоде была разработана методика контроля филамента с использованием МРТ [82].

Несмотря на свои «сильные» стороны модель часто ранее подвергалась критике из-за того, что она не отражает клиническую картину инсульта, где обычно происходит постепенная реканализация, в то время как в условиях модели происходит быстрое восстановление тока крови. Тромболизис с тканевым активатором плазминогена (rt-PA) приводит к постепенному разрушению тромба, что может занимать от 30 минут до нескольких часов до полного лизиса. При извлечении филамента из сосуда будет «быстрая реперфузия», которая вряд ли будет наблюдаться при тромболизисе. С появлением механической тромбэктомии, доказавшей клиническую эффективность у пациентов с окклюзией церебральных артерий большого диаметра, модель приобрела новую клиническую актуальность.

Волна реперфузии, наблюдаемая при удалении филамента из сосуда, будет такой же как и при эндоваскулярной тромбэктомии.

- *Модель электрокоагуляции СМА.*

Впервые модель окклюзии СМА методом электрокоагуляции после предварительной трепанации черепа была предложена в 1981 году *Tamura et al.*[200]. В условиях данной модели в зависимости от места окклюзии СМА (до или после отхождения лентикюлостриарных артерий) могут быть индуцированы инфаркты, захватывающие как кору и стриатум, так и чисто инфаркты коры [175]. Метод электрокоагуляции может быть использован только для выполнения постоянной окклюзии СМА, а следовательно, реперфузия невозможна. Поэтому в последующем для получения преходящей ишемии модель была модифицирована с использованием микрохирургических клипс, крючков, лигатур, устройств для вазоконстрикторного пептида эндотелина – 1 [53, 103, 147, 170, 185]. Электрокоагуляционная модель имеет хорошую воспроизводимость и, как правило, меньшую вариабельность в размере ишемического повреждения в сравнении с моделью эндоваскулярной окклюзии СМА с филаментом. Однако в случае электрокоагуляции СМА инфаркты головного мозга имеют меньший размер, чем в результате внутрисосудистой окклюзии СМА с филаментом. Преимуществом данной модели является низкая смертность животных из-за выполнения краниотомии, которая помогает в борьбе с отеком головного мозга. В то же время эта модель является технически более сложной с точки зрения хирургических навыков, необходимых для проведения краниотомии и выделения СМА, чем модель эндоваскулярной окклюзии СМА с помощью филамента.

- *Тромбоэмболическая модель окклюзии СМА.*

Для имитации определенного патогенетического варианта ишемического инсульта, был разработан ряд тромбоэмболических моделей у животных. Один из вариантов – это введение в ВСА синтетических макросфер большого размера (300-400 мкм в диаметре) или микросфер малого размера (диаметром менее 50 мкм). Макросферы, как правило, вызывают крупные инфаркты, подобные инфарктам, вызванным постоянной эндоваскулярной окклюзией СМА [74]. Микросферы,

наоборот, вызывают небольшие инфаркты, которые в случае нескольких микросфер могут вызвать мультифокальное ишемическое поражение головного мозга [146]. Из-за синтетического состава микро- и макросфер данные модели не позволяют изучать тромболитические препараты. С целью оценки эффектов тромболитических препаратов, были созданы модели животных на крысах и мышах, у которых богатые фибрином аутологичные тромбы создаются *ex vivo* [106, 111]. Затем эти тромбы определенного диаметра и длины помещаются в специальный катетер, который вводят в НСА и затем продвигают в ВСА так, чтобы тромбы откладывались у места отхождения СМА. По сравнению с моделями эндоваскулярной окклюзии СМА, тромбоэмболическая модель вызывает более вариабельные инфаркты головного мозга. Путем титрования числа тромбов, можно индуцировать воспроизводимые инфаркты в бассейне СМА [106, 111]. Причем эти тромбы могут быть растворимы тромболитическими препаратами, а именно rt-PA [105]. Инфаркты головного мозга в условиях данной модели имеют четкую пенумбру, на которую можно влиять путем применения тромболиза [87]. Степень вторичного повреждения головного мозга ниже, чем при эндоваскулярной окклюзии СМА.

У спонтанно-гипертензивных крыс эта модель была использована для изучения патофизиологических механизмов вторичного кровоизлияния в головной мозг, вызванного rt-PA [36].

С целью воспроизведения стандартизированных окклюзий СМА была создана тромбоэмболическая модель *in situ* на мышах, в которой выполнялась небольшая краниотомия, и в просвет дистального отдела СМА с помощью микротрубочки вводился тромбин, приводящий к локальному образованию богатых фибрином тромбов [157].

Сильные стороны данной модели заключались в высокой воспроизводимости, низкой смертности животных и в пригодности данной модели для тестирования тромболитических средств как отдельно, так и совместно с другими лекарственными веществами. Раннее введение rt-PA вызвало быструю реперфузию, ассоциированную с уменьшением размера инфаркта, тогда как

позднее введение rt-PA усугубляло ишемическое повреждение головного мозга [157]. Эта модель отличается от инсульта у человека тем, что в данной модели индуцируется местный (локальный) тромбоз, а не тромбоэмболия.

Для предотвращения механического повреждения СМА модель была еще модифицирована путем применения фильтровальной бумаги, которую пропитывали хлоридом железа и клали на твердую мозговую оболочку животных, что приводило к образованию богатых тромбоцитами сгустков внутри СМА [92]. В отличие от сгустков, индуцированных тромбином, эти сгустки, индуцированные хлоридом железа, были устойчивы к тромболизису rt-PA [92].

- *Модель окклюзии СМА методом фототромбоза.*

Впервые модель была использована в 1985 году. Фототромботический инсульт вызывается системным (внутривенным или внутрибрюшинным) введением светочувствительного красителя – бенгальского розового с последующим облучением черепа лазером [54, 214]. Облучение приводит к активации красителя, который, в свою очередь, вызывает образование супероксидных радикалов, повреждающих мембраны эндотелиальных клеток. В результате эндотелиального повреждения активируются тромбоциты и образуются обогащенные тромбоцитами тромбы, которые закупоривают просвет сосуда. Эта модель имеет небольшую пенумбру, поэтому она не подходит для изучения средств, обладающих нейропротекторной активностью.

- *Модель окклюзии СМА с помощью эндотелина-1.*

Эндотелин-1 представляет собой пептид, который является мощным вазоконстриктором и может служить для воспроизведения фокальной ишемии головного мозга у крыс. Существует несколько моделей, использующих это средство для получения ишемического повреждения в бассейне СМА. Инвазивные подходы были в значительной степени заменены стереотаксической внутримозговой инъекцией эндотелина-1 в смежную с СМА область. Это позволяет избегать хирургических осложнений. После его применения происходит значительное уменьшение внутримозгового кровотока на данной территории и,

картина ишемического поражения характерна картине, получающейся при окклюзии СМА при хирургическом вмешательстве. На данной модели после периода существенного снижения внутримозгового кровотока происходит постепенное возвращение кровотока к нормальному уровню, которое является зависимым от дозы введенного эндотелина [184]. Недостатком данной модели является высокая вариабельность объема очага ишемического поражения, которая может возникнуть из-за разнообразия реакций кровеносных сосудов на эндотелин-1. *Ansari et al.* в своих исследованиях постарались повлиять на это путем использования лазерной доплеровской флоуметрии во время воздействия эндотелина-1 [21].

### **1.3 Основные патофизиологические аспекты ишемического повреждения головного мозга**

Большое разнообразие патофизиологических изменений, приводящих к церебральной ишемии и некрозу паренхимы, в настоящее время затрудняют создание единой концепции сложных метаболических и молекулярных процессов. Различные механизмы влияют друг на друга и пересекаются между собой в «сети». Часто трудно различить, являются ли данные изменения следствием ишемии или же вызваны реперфузионным повреждением. Концепция четырехфазного ответа на ишемическое воздействие была предложена *Dirangl et al.* 1999 [55]. Так, вслед за минутной фазой эксайтотоксичности следует фаза периинфарктной деполяризации, которая продолжается часами, затем присоединяется фаза воспаления (на протяжении дней) и в конечном итоге наступают поздние изменения, такие как апоптоз.

На ранней стадии фокальной церебральной ишемии эксайтотоксичность играет авторитетную роль. Из-за снижения подачи кислорода и субстратов недостаток высокоэнергетических фосфатов приводит к дисфункции ионных насосов, зависимых от АТФ. Впоследствии происходит деполяризация клеточных мембран и активация кальциевых и натриевых каналов. Это, в свою очередь, приводит к высвобождению глутамата. При этом в пресинаптической области

происходит дополнительное накопление глутамата из-за нарушения энергозависимых механизмов рециркуляции аминокислот. Эксперименты на животных указывают на быстрое повышение уровня глутамата вскоре после начала ишемии, который в дальнейшем остается увеличенным в течение всей продолжительности ишемии [33]. Повышенная внеклеточная концентрация глутамата приводит к увеличению потока кальция в клетки за счет активации рецепторов NMDA, AMPA и активации кальциевых каналов [85]. Кроме того, активируются метаботропные глутаматные рецепторы, что приводит к увеличению инозитолтрифосфата и активации фосфолипазы C, обеспечивающей открытие внутриклеточных резервуаров кальция. В результате этих взаимозависимых процессов высвобождения глутамата и перегрузки кальция возникает гиперэксайтотоксическая ситуация, сопровождающаяся сопутствующими вторичными повреждениями, связанными с кальцием, образованием свободных радикалов и изменениями экспрессии генов. Внутри- и внеклеточные электролитные смещения приводят к тому, что вода попадает во внутриклеточное пространство в направлении осмотического градиента, вызывая отек клеток. Среди вторичных повреждений, вызванных перегрузкой кальция, – разрушение цитоскелета, преимущественно структурного белка спектрина и микротрубочек, активированными зависящими от кальция внутриклеточными протеазами – кальпаинами. Кроме того, повышенный кальций отвечает за активацию фосфолипазы A<sub>2</sub>, увеличение синтеза NO и фрагментацию ДНК [56]. В то время как в физиологических метаболических условиях свободные радикалы образуются лишь в небольшой степени, в постишемическом течении происходит увеличение их высвобождения. К вредным последствиям влияния свободных радикалов относятся как разрушение митохондрий, белков, углеводов и ДНК, так и перекисное окисление липидов, что в конечном итоге заканчиваются растворением клеточных мембран [55, 85, 126].

Под периинфарктной деполяризацией понимается процесс повторяющихся деполяризаций, которые распространяются и тем самым приводят к увеличению зоны инфаркта. В результате сниженного энергоснабжения и увеличения выброса

калия и глутамата в рамках эксайтотоксичной фазы происходит деполяризация нервных и глиальных клеток, при этом клетки в ядре ишемии проходят аноксическую деполяризацию с необратимой потерей функций, в то время как в области пенумбры реполяризация клеток возможна благодаря остаточной перфузии. Продолжительность реполяризации напрямую зависит от степени снижения перфузии. Чем более выраженным является снижение перфузии, тем больше времени требуется ишемическим клеткам для реполяризации и тем больше вероятность того, что преходящая периинфарктная деполяризация перейдет в аноксическую деполяризацию [174].

В третьей фазе ответа на ишемическое повреждение мозг реагирует воспалительной реакцией, которая начинается уже через несколько часов после начала ишемии и может длиться от нескольких дней до нескольких недель [24]. На этой стадии инициируется экспрессия различных провоспалительных генов, индуцируя синтез транскрипционных факторов, медиаторов воспаления. В результате на эндотелиальной поверхности клетки индуцируется экспрессия молекул адгезии, которые связываются с комплементарными рецепторами на нейтрофильных гранулоцитах, способствуя проникновению последних в стенку сосудов, а затем и в паренхиму мозга. Макрофаги и моноциты следуют за нейтрофилами и мигрируют в ишемическую ткань. Иммигрировавшие в мозговую ткань лейкоциты способствуют производству и высвобождению токсичных медиаторов, тем самым внося важный вклад в повреждение ишемизированных клеток [78].

Четвертая фаза ишемического повреждения характеризуется апоптическими процессами. Когда нейроны теряют синаптический контакт со своими соседними клетками, то активация эндогенных протеаз (каспаз) побуждает клетки к собственной клеточной смерти. Как гены для каспаз, так и другие, которые способствуют подавлению или увеличению клеточной гибели, в большей степени экспрессируются и активируются на ранней и поздней фазах ишемии. В результате «запрограммированной клеточной гибели» клеточное ядро растворяется, ДНК и специфические компоненты расщепляются, в то время как клеточная мембрана

относительно долго остается нетронутой, поэтому только позже потенциально токсичные вещества из цитоплазмы попадают в окружающую среду. Модели ишемии на животных предоставляют свидетельства того, что в случае церебральной ишемии апоптоз как клеточная смерть, особенно в ишемической пенумбре, является значимым процессом и играет более значительную роль в некрозе клеток [55, 119]. На Рисунке 1 представлены основные патофизиологические процессы, приводящие к клеточной гибели вследствие ишемического повреждения.

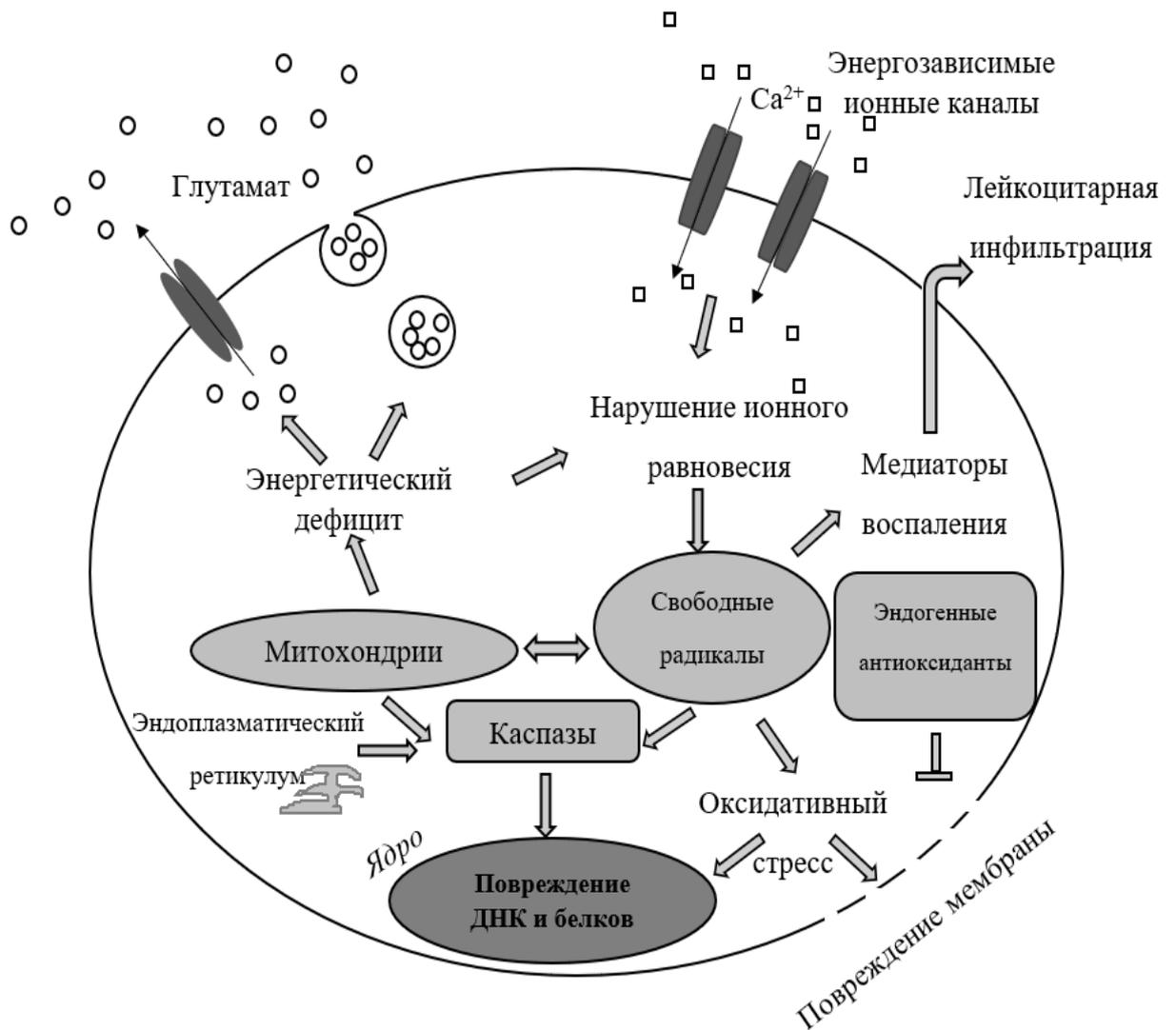


Рисунок 1 – Упрощенный обзор патофизиологических механизмов и путей клеточной гибели вследствие ишемии. Модификация *Dirnagl et al* и *Lo et al* [55, 126].

Повреждение ткани, связанное с ишемией головного мозга, в конечном итоге является результатом взаимодействия описанных патофизиологических процессов, каждый из которых представляет потенциальные цели для терапии. Предполагается, что в минуту в среднем могут погибнуть 1,9 млн нейронов, 14 млрд синапсов и 12 км нервных волокон [177]. По этим цифрам легко понять, насколько важна оптимизация по времени терапии ишемического инсульта. Поэтому дальнейшее изучение патофизиологических и молекулярных механизмов ишемического повреждения, а также ишемически – реперфузионного повреждения, очень важно для открытия новых стратегий лечения сосудистых катастроф головного мозга.

#### **1.4 Современные методы анализа транскриптома и генетические аспекты ишемического повреждения головного мозга**

На сегодняшний день единственной эффективной стратегией лечения ишемического инсульта является раннее восстановление кровотока в церебральных сосудах. Восстановление кровоснабжения органа, временно лишённого кровотока, хотя и эффективно в обеспечении оксигенации, часто парадоксально приводит к вторичному повреждению ткани [43, 61]. Эта концепция была продемонстрирована в случаях ишемического инсульта, инфаркта миокарда и острого повреждения почек. Это было также установлено при мультиорганном ишемически – реперфузионном поражении, например, во время травмы, остановки сердечной деятельности, а также во время хирургических процедур, таких как, например, трансплантация солидных органов, которая может сопровождаться острой трансплантационной недостаточностью и ранним отторжением. *Eltzschig* и *Eckle* в 2011 году дали схематический обзор клеточных и молекулярных механизмов, предположительно участвующих в реперфузионном повреждении, с участием как врожденной, так и приобретенной иммунной систем, а также системы комплемента, тромбоцитов и факторов свертывания. После активации этих систем гибель клеток может происходить через ряд механизмов, включая как некроз, так

и апоптоз, которые содержат в себе сложные механизмы передачи сигналов для клеточной гибели [95].

Одним из инструментов для изучения механизмов заболеваний и поиска способов их лечения является анализ транскриптома – совокупности индивидуальных молекул РНК, включая мРНК и некодирующие РНК, синтезируемых одной клеткой или группой клеток в данный момент времени. Обнаружение изменений экспрессии генов после ишемического инсульта является первым шагом к пониманию молекулярных механизмов повреждения, в то время как исследования протеомики и пептидомики дают дополнительное понимание [42, 64, 182]. Совершенствование методов молекулярной биологии, открытие ревертазной реакции, позволившей получать стабильные копии молекул мРНК – кДНК, разработка полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей амплифицировать молекулы кДНК, позволили проводить количественную оценку содержания транскриптов отдельных генов в клетках и тканях. Надежная оценка численности транскриптов в биологических образцах стала возможной после разработки технологий, позволивших проводить широкомасштабный анализ профиля экспрессии генов [187, 217]. К числу таких технологий относится применение ДНК-биочипов и метод полногеномного секвенирования РНК (RNA-seq).

#### *Технология ДНК-микрочипов*

С момента внедрения в середине 1990-х технология ДНК-микрочипов стала популярной для измерения численности транскриптов [179]. Принцип метода ДНК - микрочипов заключается в одновременном анализе экспрессии тысяч генов с помощью гибридизации мРНК, представленной в виде смеси одноцепочечных меченых кДНК, с множеством иммобилизованных на твердой поверхности ДНК-проб в виде коротких (20-25 нуклеотидов) геноспецифичных олигонуклеотидов или более протяженных (300-500 нуклеотидов) фрагментов кДНК, соответствующих отдельным генам. При этом флуоресцентно меченные последовательности кДНК гибридизуются с зондами, иммобилизованными на твердой подложке. После отмывки неспецифически связавшихся молекул

проводится регистрация сигналов гибридизации, измерение интенсивности флуоресценции красителя и биоинформатическая обработка данных с использованием специального программного обеспечения [217]. В настоящее время ArrayExpress и Gene Expression Omnibus – два основных хранилища результатов анализа транскриптомов, каждый из которых содержит почти миллион наборов данных ДНК микрочипов [176].

Данная технология нашла широкое применение в области исследования профиля экспрессии генов мозга при многих заболеваниях, в том числе при ишемическом инсульте [48, 196]. Так, исследование *Chung JY et al. 2011* показало изменение экспрессии генов в гиппокампах крыс спустя 24 часа в условиях модели фокальной ишемии мозга с использованием филамента с применением метода ДНК – микрочипов. При этом экспрессия 1882 генов была повышена и 2337 генов понижена [48]. Среди большого массива генов, экспрессия которых изменилась, акцент был сделан на генах, связанных с окислительным фосфорилированием и апоптозом. Мозг почти полностью зависит от непрерывного потока глюкозы и кислорода для производства энергии путем окислительного фосфорилирования. Что касается окислительного фосфорилирования, было обнаружено, что экспрессия транскриптов 10 генов была повышена, в то время как 7 генов – понижена. В частности, уровень экспрессии генов, кодирующих АТФазу, включая *Atp6v0d1*, *Atp6v0a1*, *Atp6v0e1* и *Atp6v0c*, был повышен, тогда как генов, кодирующих НАДФ – дегидрогеназу, включая *Ndufa1*, *Ndufb2* и *Ndufa7*, был понижен после преходящей фокальной ишемии в гиппокампе крыс. В патофизиологии ишемического инсульта гибель клеток отчасти обусловлена апоптозом, как об этом говорилось ранее. Митохондрии, которые являются важным источником активных форм кислорода, повреждаются вследствие опосредованного свободными радикалами разрушения внутренней митохондриальной мембраны и окисления белков, которые опосредуют транспорт электронов, экструзию  $H^+$  и производство АТФ [57]. В результате повреждения из митохондрий высвобождается цитохром С, который является триггером для

апоптоза. Учитывая этот факт, были исследованы изменения в экспрессии генов, связанных с апоптозом. Среди генов, связанных с апоптозом, более чем в 2 раза была повышена экспрессия семи генов: *Akt2*, *Tnfrsf1a*, *Pik3r2*, *Ppp3cb*, *Ppp1r13b*, *Ikbkb*, *Prkar2a*, в то время как четыре гена – *Prkar2b*, *Nfkb1*, *Atm*, *Chuk* - продемонстрировали пониженную экспрессию (менее 0,5) после преходящей фокальной церебральной ишемии в гиппокампе крысы.

Исследование *Sun Sl et al.* продемонстрировало изменение профилей экспрессии генов в гиппокампах крыс после окклюзии средней мозговой артерии. Так, используя метод ДНК-микрочипов, были обнаружены изменения в генной экспрессии сигнальных трансдукторов и путей активаторов факторов транскрипции (STAT) в гиппокампе крысы после окклюзии средней мозговой артерии. Исследование показало, что экспрессия генов *STAT2*, *5a*, *5b*, *6* и супрессора передачи сигналов цитокинов (*SOCS*) 4 была повышена ишемией [196].

Методы, такие как технология ДНК-микрочипов, основанные на гибридизации транскриптов с зондами, связанными с твердыми поверхностями, ими и ограничены. Данный метод позволяет обнаруживать однонуклеотидные полиморфизмы, экзонные соединения и гибридные гены, но только с зондами, предназначенными для этих целей. ДНК-микрочипы хороши ровно настолько, насколько хороши биоинформатические данные, доступные для генома и транскриптома модельного организма. В настоящее время в качестве альтернативного метода измерения численности транскриптов и исследования их структуры активно используется метод полногеномного секвенирования РНК (RNA-seq) [149].

#### *Метод секвенирования РНК (RNA – seq)*

Несмотря на возможность прямого секвенирования РНК, большинство экспериментов по RNA-seq проводятся на оборудовании, которые секвенируют молекулы ДНК [158]. Следовательно, необходимой стадией для секвенирования РНК, является создание библиотеки кДНК из РНК. Способ получения библиотеки кДНК варьируется в зависимости от исследуемых видов РНК, которые могут отличаться по размеру, последовательности, структурным особенностям и

численности. Основные идеи включают в себя: (1) выбор способа захвата представляющих интерес молекул РНК; (2) способ преобразования РНК в двухцепочечные кДНК в определенном размерном диапазоне; и (3) способы помещения адаптерных последовательностей на концы кДНК для амплификации и секвенирования. Основная проблема секвенирования интересующих нас РНК заключается в устранении рибосомных РНК (рРНК), которые являются наиболее распространенными видами РНК в клетке, но мало интересны в большинстве исследований. Было разработано несколько подходов для их элиминации из пула РНК. В эукариотических организмах большинство белок – кодирующих РНК (мРНК) содержат поли (А) хвост. Селекцию поли (А) РНК производят с помощью магнитных или целлюлозных олигоТ гранул. После поли (А) + селекции или элиминации рРНК образцы РНК обычно подвергаются фрагментации РНК до определенного размера перед обратной транскрипцией. Это необходимо из-за ограничения размера большинства современных платформ секвенирования, например, < 600 bp на секвенсорах Illumina. РНК могут быть фрагментированы щелочными растворами, растворами с двухвалентными катионами, такими как  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$  или ферментами, такими как РНКаза III. Альтернативно, интактные РНК могут быть подвергнуты обратной транскрипции, и полноразмерная кДНК может быть фрагментирована ДНКазой [152, 163]. В стандартном протоколе перед амплификацией и секвенированием определенного размера кДНК, полученные путем обратной транскрипции из фрагментированных РНК со случайными гексамерными праймерами или из фрагментированных полноразмерных кДНК, лигируют к ДНК-адаптерам. Так как большинство секвенаторов имеют предел обнаружения, библиотеки кДНК необходимо амплифицировать перед секвенированием с использованием ПЦР. Из-за предела обнаружения большинства секвенаторов библиотеки кДНК необходимо амплифицировать с помощью ПЦР перед секвенированием. Хотя во время ПЦР используется лишь небольшое количество циклов амплификации (8-12), изменения в размере и составе кДНК могут привести к неравномерной амплификации. Амплификация некоторых кДНК постоянна, в то время как другие продолжают амплифицироваться

экспоненциально. Для предотвращения искажения результатов амплификации, были разработаны методы, которые устраняют дубликаты ПЦР из результатов секвенирования. В одном из способов, который предполагает случайную фрагментацию РНК, окончательные записи секвенирования, имеющие одинаковые координаты начала и окончания, рассматривает как ПЦР-дубликаты и объединяет их [117, 118]. Однако недостатком этого подхода является исключение считываний, полученных из часто фрагментированных областей из-за не самой стохастической фрагментации [68]. Другим способом является использование молекулярных меток, также известных как уникальные молекулярные идентификаторы (UMI), для различения продуктов ПЦР [40, 107, 189], которые вводят в переходную последовательность до амплификации. В модифицированном протоколе получения кДНК из одиночных клеток молекулярные метки были введены транспозазой Tn5 во время фрагментации двухцепочечных амплифицированных кДНК [99]. Однако в некоторых приложениях, таких как цифровой подсчет целевых РНК, молекулярные метки добавляются во время обратной транскрипции [67, 101, 107]. Молекулярные метки различаются по размеру (количеству оснований) и сложности. В принципе, они содержат либо определенные последовательности, либо случайные нуклеотиды. Определенные последовательности, выбранные для их равномерного распространения в окончательных библиотеках, технически более трудно сделать из-за выбора последовательности и сложности производства. После пробоподготовки молекулы транскриптов (точнее, соответствующих им кДНК) можно секвенировать в одном направлении (одноконцевое прочтение) или в обоих (парноконцевое прочтение). Чувствительность и точность РНК-seq определяются числом прочтений, полученных с каждого образца [49, 88].

Метод RNA-seq может обнаруживать известные гены, а также открывать новые гены и варианты генов (например, сплайсинговые изоформы). В частности, парные прочтения являются эффективными в обнаружении стыков между удаленными экзонами, что особенно полезно для определения альтернативных событий сплайсинга [97]. RNA-seq может использовать данные того же

эксперимента для характеристики экзонных соединений, выявления некодирующей РНК [22], обнаружения однонуклеотидных полиморфизмов и гибридных генов [130]. Кроме того, существующие наборы данных могут быть пересмотрены по мере обнаружения новых последовательностей. Методика RNA-seq активно используется исследователями в изучении эпигенетических процессов [121]. RNA-seq более точный в детекции дифференциально экспрессирующихся генов и имеет гораздо более низкий предел обнаружения, чем стандартный геномный микрочип [225].

С помощью RNA-seq изменения в глобальной экспрессии генов в гиппокампах крыс спустя 24 часа после ишемически – реперфузионного повреждения были описаны в работе *Chunmei Wang et al. 2017* [210]. В ходе данного исследования в группе крыс с инфарктом головного мозга более чем двукратное изменение экспрессии продемонстрировали 182 гена: 156 генов проявили повышенную экспрессию и 26 генов снизили уровень экспрессии. Использование базы данных «Генная онтология» (Gene Ontology, или GO) подтвердило, что гены, имеющие различные уровни экспрессии, играют роль в процессах воспаления, стресса, иммунных реакциях, метаболизме глюкозы, в проапоптозе, антиапоптозе и в других биологических процессах. При ишемическом инсульте была увеличена экспрессия генов, кодирующих факторы воспаления. Так, значительно увеличение продемонстрировали гены, кодирующие TNF- $\alpha$ , IL-6 и молекулы клеточной адгезии (Icam). Также выраженную экспрессию показал ген *Gfap*, кодирующий сильный маркер глиоза и нейровоспаления. Что касается запрограммированной клеточной гибели, то экспрессия транскриптов гена ключевого антиапоптотического фактора Bcl – 2 была снижена, в то время как экспрессия гена проапоптотического фактора Bax, увеличивающего выброс цитохрома C, была повышена. С помощью RNA - seq была выявлена экспрессия других генов, связанных с апоптозом: *Bcl-6*, *Bad*, *Bak* и *Bag*. Экспрессия генов из семейства каспаз была также увеличена, тем самым показывая, что они могут быть вовлечены в процессы ишемии – реперфузии.

В ответ на стрессовые воздействия на клетку, такие как повышение температуры, гипоксия, ишемия и другие патологические состояния, происходит экспрессия белков теплового шока Hsp [137, 216], которые могут защищать клетки от повреждения посредством противовоспалительных и антиапоптотических механизмов или путем репарации поврежденных молекул. Так, *Chunmei Wang et al. 2017* показали, что экспрессия генов *Hspb1*, *Hspa1a* и *Hspa1b* была значительно увеличена спустя 24 часа после ишемически-реперфузионного повреждения. Уровень транскриптов *Wfs1* был значительно уменьшен, но содержание транскриптов *Atf6* и *Chop2* было повышено. Ишемия–реперфузия вызывает уменьшение уровня экспрессии гена *Wfs1*, который, в свою очередь, активирует путь *Atf–Chop*. Также в этом исследовании, как и в более ранних работах [220], было продемонстрировано, что ишемически-реперфузионное повреждение активирует Caspase-12, приводящую к некрозу клеток. Ранее была также установлена связь между ишемически-реперфузионным повреждением и активацией процесса аутофагии [221, 226]. Аутофагия представляет собой гомеостатический процесс, в котором клеточный баланс поддерживается благодаря лизосомальной системе [135, 218]. В физиологических процессах неправильно развивающиеся или поврежденные органеллы устраняются путем аутофагии. Однако неапоптотическая запрограммированная клеточная смерть начинается путем самопереработки и деградации клеточных компонентов, если аутофагия активирована нецелесообразно [188, 203]. Церебральная ишемия может активировать аутофагию. Так, в исследовании *Chunmei Wang et al. 2017* были обнаружены отклоняющиеся от нормы уровни мРНК гена калретикулина, *Atg12*, *Becn1*, *Atg5* и *Ukl1*. Анализ базы данных GO и интегрированной базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) показал, что ДЭГ были вовлечены в процессы воспаления, оксидативный стресс, ишемически-реперфузионный стресс, в процессы апоптоза, аутофагии и обмена веществ.

Что касается процессов нейровоспаления, то они имеют двоякое значение: с одной стороны усугубляют повреждение нейронов, с другой стороны способствуют восстановлению тканей [160]. Микрососудистая реакция,

опосредованная воспалительным ответом, была одной из причин вторичного повреждения головного мозга после реперфузии [63, 84]. Воспалительный ответ был представлен множеством воспалительных медиаторов и воспалительных клеток. Микроглия, астроциты, лейкоциты, особенно нейтрофилы, были основными эффекторными клетками во время реперфузионного повреждения [125, 197]. В отличие от механизма повреждения, вызванного ишемией, реперфузия вызвала повреждение и смерть клеток через новые сигнальные пути [51]. До сих пор нет успешного адьювантного лечения ишемически-реперфузионного повреждения. Поэтому поиск генов – кандидатов и сигнальных путей для уменьшения реперфузионной травмы может принести некоторые новые идеи для целевого лекарственного лечения. В исследовании *Xiao Cheng 2020* было показано, что повреждение, вызванное ишемией–реперфузией, запускало активацию микроглии [47]. Кроме того, реперфузия запускала провоспалительные медиаторы, ингибировала высвобождение противовоспалительных медиаторов по сравнению с ишемией без последующей реперфузии, а также регулировала неврологические факторы. Было продемонстрировано, что ишемически-реперфузионное повреждение головного мозга вызывает более сильное неврологическое повреждение и нейровоспаление по сравнению с церебральной ишемией без восстановления кровотока. С помощью RNA-seq в данном исследовании были выявлены специфические ДЭГ с повышенной и пониженной экспрессией, связанные с воспалительными реакциями после ишемически-реперфузионного повреждения. Гены, проявившие повышенную экспрессию (*TLR4*, *TRAF6*, *MYD88*, *IKBKG*, *NF – κB1*, *RELA*) принадлежали к TLR4/MYD88 воспалительному сигнальному пути, который ассоциирован с высвобождением провоспалительных факторов. Гены, продемонстрировавшие пониженную экспрессию (*HRAS*, *RAF1*, *MAPK11*) принадлежали к HRAS/RAF1 сигнальному пути, который способствует высвобождению нейротрофических факторов. Церебральная ишемия усугубляла высвобождение возможных провоспалительных агентов и уменьшала высвобождение противовоспалительных.

Тот факт, что применение ДНК-микрочипов и RNA-seq являются

высокопроизводительными методами, позволил предположить, что должна быть возможность использовать данные одного метода для проверки другого. Во многих исследованиях изучался уровень согласованности между данными, полученными с использованием ДНК-микрочипов и данными RNA-seq [69, 132, 136, 162, 195, 213, 225]. Некоторые из этих исследований указывают на значительную корреляцию между двумя методами, в то время как другие демонстрируют существенное несоответствие, указывающее на то, что существуют проблемы либо в самих методах, либо в способах сравнения наборов данных. В настоящий момент нет консенсуса относительно соответствия данных, полученных методом RNA-seq и ДНК-микрочипов. Лучшее соответствие было также достигнуто, когда данные RNA-seq сравнивались со средним геометрическим значением для четырех микрочипов, а не с отдельными микрочипами. В качестве независимой оценки использовали ОТ-ПЦР для измерения численности транскриптов для нескольких генов, и было установлено, что данные ОТ-ПЦР в большей степени согласуются с данными RNA-seq, чем с данными микрочипов [202]. Таким образом, это исследование подчеркивает преимущество оценки воспроизводимости измерений численности транскриптов с использованием нескольких независимых методов. В более общем плане, измерение должно проводиться с использованием более чем одного метода, когда существует возможность это сделать [202].

### **1.5 Пептиды меланокортинового ряда и их биологические эффекты**

Значимую роль в физиологии организма играют меланокортины, оказывающие выраженные биологические эффекты при различных патологических состояниях. Они включают альфа, бета, гамма - меланоцитстимулирующие гормоны, аденокортикотропный гормон (АКТГ) и некоторые фрагменты, содержащие, по крайней мере, аминокислотную последовательность His-Phe-Arg-Trp. Они влияют на репродуктивную функцию, на эмбриональное развитие мозга, гомеостаз, воспалительную и иммунную реакции, обучение, память и многие другие функции [116]. В ряде исследований было доказано, что меланокортины, в основном АКТГ, вызывающие активацию

рецепторов в центральной нервной системе (ЦНС), имеют существенный нейропротективный и восстановительный эффекты. Эта концепция подкрепляется опубликованными результатами исследования *Lisak* и *Benjamins*, которые продемонстрировали, что агонист рецепторов меланокортинов АКТГ оказывает протективное действие на олигодендроглию, олигодендроглиальные клетки-предшественники и нейроны, защищая их от эксайтотоксических, апоптотических, окислительных повреждений, которые встречаются в ЦНС при ряде заболеваний [123]. Исследования *in vivo* на моделях животных подтвердили нейропротективные эффекты меланокортинов при моделировании эксайтотоксического повреждения [66], субарахноидального кровоизлияния [73], травматического поражения ЦНС [178], в моделях болезни Альцгеймера [77] и повреждения периферических нервов и восстановления [32, 76, 223].

Доказанность широкого спектра физиологической активности меланокортинов, открытие негормональных функций их фрагментов и обнаружение рецепторов меланокортинов предоставили новые возможности для создания и исследования веществ, потенциально применимых в клинике при различных патологиях. Препятствием для использования природных меланокортинов в клинической практике является низкая биодоступность этих пептидов при системном введении. В Институте молекулярной генетики РАН совместно с научным коллективом МГУ им. Ломоносова был разработан аналог АКТГ, не обладающий гормональной активностью, – гептапептид семакс (MENFPGP, Met–Glu–His–Phe–Pro–Gly–Pro), включающий в себя фрагмент АКТГ<sub>4-7</sub> и трипептид PGP (Pro–Gly–Pro) отвечающий за его метаболическую стабильность и обеспечивающий его более высокую ферментативную устойчивость, а также обладающий собственной регуляторной активностью [1, 13, 16]. В настоящее время семакс является единственным регуляторным пептидом из данной группы, который зарегистрирован в качестве ноотропного лекарственного препарата на территории Российской Федерации и используется в клинической практике, однако другие пептиды также имеют перспективы к практическому использованию.

## Биологические эффекты семакса

Для изучения механизмов действия лекарственных средств и оценки их эффективности используются различные модельные системы *in vivo* и *in vitro*. Так, в многочисленных экспериментах *in vitro* и *in vivo* наблюдались ноотропные, нейропротекторные и противовоспалительные эффекты семакса [28, 166, 192]. Он положительно влияет на процессы обучения у животных, улучшая выработку рефлексов активного и пассивного избегания болевого раздражителя. При длительном воздействии пептида снижается тревожность и депрессивность. Также было показано, что семакс ускорял функциональное восстановление животных в условиях модели болезни Паркинсона, где повреждение дофаминергической системы достигалось благодаря использованию нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), повреждающего дофаминергические нейроны в черной субстанции головного мозга. Семакс также повышает болевой порог животных в различных экспериментальных моделях, а в реализацию анальгетического эффекта пептида вовлечены серотонинергическая и опиоидная системы [9].

Несмотря на внушительное количество исследований, полученное многообразие биологических эффектов семакса, его активное применение в клинической практике, молекулярные механизмы действия данного пептида остаются неизвестны. Было предположено, что в основе проявлений действий семакса может лежать инициация транскриптомного ответа клеток, индуцированная им в тех или иных физиологических условиях. Анализ транскриптома является одним из наиболее эффективных подходов к изучению механизмов, определяющих развитие различных физиологических, патологических и стрессовых состояний и применяется в исследовании механизмов действия пептидных препаратов. В качестве одного из механизмов нейропротективного действия пептида семакс рассматривалось его воздействие на экспрессию генов системы факторов роста и их рецепторов. В эксперименте с использованием препарата семакс на модели фокальной ишемии у крыс, вызванной электрокоагуляционной окклюзией дистального участка средней мозговой

артерии, через 3 часа после окклюзии было выявлено значимое повышение экспрессии мРНК генов, кодирующих факторы роста и их рецепторы *Lif*, *Bdnf*, *Vgf*, *Gfra1*, *TrkA* [8]. В одном из исследований последних лет на вышеуказанной модели ишемии проводилось полногеномное изучение экспрессии генов через 3 и 24 часа после окклюзии под действием препарата семакс [123, 124]. Была показана способность семакса в условиях фокальной церебральной ишемии воздействовать на процессы пролиферации, дифференцировки и миграции клеток, на формирование и функционирование сосудистой системы, в частности, на процессы васкулогенеза, а также способность влиять на экспрессию генов рибосомных белков и транскрипционных факторов, регулировать процессы поступления кальция внутрь клетки. Также в работе был представлен интересный факт об иммуномодулирующей способности семакса и о связи нейропротективного действия гептапептида с его влиянием на иммунную систему. Почти 50% всех генов, изменивших экспрессию под действием препарата, были связаны с функционированием иммунной системы. В частности, была существенно усилена экспрессия генов иммуноглобулинов и хемокинов [140, 141]. Результат хорошо согласуется с данными, показывающими, что иммуноглобулины, введенные внутривенно, обладают выраженным нейропротективным действием против ишемического повреждения мозга [23]. Также известно, что некоторые хемокины и их рецепторы вовлечены в разнообразные неврологические заболевания, включая ишемическое повреждение мозга.

Нейропротекторное действие семакса может быть также обусловлено его влиянием на AMPA-рецепторы, селективно связывающие альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовую кислоту. Когнитивно-стимулирующие свойства и нейропротективная способность семакса напрямую связаны со способностью модулировать токи AMPA рецепторов. В сравнении с одним из первых позитивных модуляторов AMPA рецепторов (ампакинов) – BDP, семакс вызвал более выраженную потенциацию токов AMPA-рецепторов [7]. Воздействие на AMPA-рецепторы улучшает память животных [129]. Кроме этого известно, что стимуляция AMPA-рецепторов вызывает усиленный синтез

нейротрофического фактора *Bdnf*, с которым ассоциированы нейропротекторный, ноотропный, антидепрессивный, анксиолитический эффекты [114].

Имеются литературные данные о взаимосвязи ионов металлов, играющих важные функции в патогенезе многих заболеваний, и эффектов пептида семакс [198]. Различные ионы металлов играют роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, ухудшении когнитивных процессов, в частности, показана взаимосвязь ионов меди (II) с нейротоксичностью [19, 41, 138, 142, 156]. Было обнаружено, что изменения количества меди и цинка дисрегулируют уровни экспрессии фактора роста нервов *Ngf* и нейротрофического фактора мозга *Bdnf*, ответственных за процессы обучения и формирования памяти. В исследовании на клеточных линиях изучалось влияние семакса на гомеостаз меди. Так, семакс проявил значительный и дозозависимый защитный эффект при интоксикации медью, образуя комплексы с ионами меди (II). Значительное снижение жизнеспособности клеток, наблюдаемое после обработки клеточной культуры в течение 48 ч  $\text{CuSO}_4$ , было нивелировано присутствием пептида в той же концентрации. Таким образом, была показана потенциальная роль семакса в регуляции или минимизации металл-индуцированного окислительного стресса, играющего значительную роль в патогенезе различных заболеваний [198].

### **Биологические эффекты глипролина PGP**

В последнее время активно исследуется класс регуляторных пептидов – глипролинов, содержащих последовательности Gly-Pro (GP) или Pro-Gly (PG), включающие от 2 до 10 аминокислот, некоторые из которых перспективны для медицинского применения [7]. Глипролины как класс самостоятельных биологически активных пептидов был представлен И.П. Ашмариным [2]. Глипролины образуются в организме в результате интра- и экстраклеточного катаболизма коллагена, эластина и родственных белков, а также в результате протеолитического расщепления белков, поступающих с пищей. Одним из таких пептидов является PGP (Pro–Gly–Pro), ранее использовавшийся в качестве стабилизатора для АКТГ<sub>4-7</sub> и тафцина. Более 20 лет назад началось исследование действия фрагмента PGP на гомеостаз слизистой оболочки желудка. Было

показано, что PGP проявляет наиболее выраженные протекторные противоязвенные эффекты, показанные на различных моделях язвообразования у животных (этаноловая, стрессогенная, ацетатная модели язвообразования) [15]. Предполагалось, что поддержание гомеостаза слизистой желудка невозможно без нормализации механизмов нервной регуляции. Так, пептид воздействует на структуры ЦНС, а также уменьшает постстрессорные нарушения системы микроциркуляции, которые заключаются в активации после стресса тучных клеток, приводящих в дальнейшем к выделению из них ряда вазоактивных соединений, в том числе гистамина. В ряде работ было выявлено стабилизирующее влияние PGP на тучные клетки. На фоне введения глипролинов уменьшалась постстрессорная активация тучных клеток и, как следствие, уменьшались выбросы вазоактивных соединений [14]. Было показано, что PGP проявляет выраженный противовоспалительный эффект. Он приводил к уменьшению отека, вызванного применением гистамина [4]. С учетом значительного спектра биологической активности при различных патологических состояниях, была также изучена экспрессия генов на модели фокальной ишемии мозга у крыс, вызванной электрокоагуляционной окклюзией средней мозговой артерии. Анализ спектра функциональных категорий генов, показавших изменение под действием PGP, указывает на заметное воздействие данного пептида на разнообразные биологические процессы, протекающие в мозге крыс при ишемии. При этом, так же как и для семакса, для PGP было показано изменение экспрессии генов, кодирующих факторы роста; генов, ответственных за процессы пролиферации, дифференцировки, миграции, выживаемости и гибели клеток; генов, участвующих в нейротрансмиссии. Однако, через 24 часа в условиях модели электрокоагуляционной окклюзии средней мозговой артерии при применении PGP наблюдалось значительное снижение экспрессии генов, ассоциированных с функцией иммунного ответа, противоположное действию семакса [11]. Роль данного феномена в интерпретации спектра активности пептида PGP при ишемическом повреждении требует дальнейшего исследования.

В работах предыдущих лет для пептидов, которые имеют в своей структуре остатки глицина и пролина, была показана способность усиливать антикоагулянтные, фибринолитические, антифибринстабилизирующие, антитромбоцитарные свойства. В одном из исследований, с целью увеличения способности ингибировать агрегацию тромбоцитов, было предложено изменить модификацию пептидов семакс и PGP. Изменение модификации, и как следствие, изменение фармакологических свойств данных пептидов, было достигнуто путем ацилирования свободной аминогруппы. Семакс и PGP, ацилированные арахидоновой кислотой (AA), показали антиагрегационную активность в условиях *in vitro* в присутствии таких проагрегантов, как аденозиндифосфат, адреналин, арахидоновая кислота. AA–семакс показал более сильный антиагрегационный эффект, чем AA–PGP. Также различался диапазон активных концентраций [3].

### **Биологические эффекты PGPL**

Еще одним пептидом из семейства глипролинов, спектр биологической активности которого активно изучается в настоящее время, является PGPL (Pro–Gly–Pro–Leu). PGPL в исследованиях *in vitro* показал умеренную антикоагулянтную активность, удлиняя активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время, суммарную фибринолитическую и фибриндеполимеризационную активность [214]. *In vivo* на модели тромбообразования у крыс пептид PGPL также показывал антикоагулянтные свойства (увеличение АЧТВ), активность фибринолитической системы плазмы (увеличение суммарной фибринолитической активности, неферментативной фибринолитической активности, увеличение активности тканевого активатора плазминогена [214]). Также в данной работе на модели тромбообразования у крыс были продемонстрированы антитромботические свойства данного пептида: уменьшение веса свежих фибриновых сгустков в сосуде. Лейцин в данных условиях не вызывал существенного влияния на систему гемостаза, в связи с чем было предположено, что антикоагулянтно-фибринолитические свойства связаны с наличием PGP в структуре данного пептида.

Принимая во внимание тот факт, что в лечении ишемических инсультов и инфарктов миокарда в настоящий момент активно применяются антикоагулянтные и антиагрегантные средства, пептиды PGP и PGPL с их вышеописанными свойствами можно рассматривать в качестве потенциальных средств для использования в клинической практике.

В литературе также имеются данные о гиполипидемическом действии пептида PGPL. В условиях модели гиперхолестеринемии на фоне использования PGPL было показано достоверное снижение уровня триглицеридов, возрастание уровня липопротеидов высокой плотности [12]. Известен также антидиабетогенный эффект пептида PGPL, продемонстрированный на модели диабета у животных (на фоне диабетогенного метаболита аллоксана), где введение PGPL в течение 7 дней приводило к достоверному снижению уровня глюкозы крови. Использование PGPL в качестве средства для профилактики было также продемонстрировано в данном исследовании: многократное введение PGPL перед введением диабетогенного метаболита предупреждало развитие аллоксанового диабета [10]. Можно полагать, что дальнейшие исследования транскриптома поврежденных клеток при патологии и при воздействии PGPL могут приблизить к пониманию механизмов функционирования данного пептида.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Животные

Исследования были выполнены на самцах белых крыс линии Вистар массой 200-300г в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации, положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, а также требованиями и рекомендациями «Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных» («Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», National Academy Press, USA 2011) [220]. Все манипуляции с животными одобрены комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол - заявка №15/2015 от 26 сентября 2018г).

### 2.2 Модель преходящей ишемии головного мозга

Перед началом оперативного вмешательства животное вводили в наркоз посредством индукции 3% изофлураном, затем использовали 1,5-2% изофлуран с 78% смесью воздуха со скоростью потока 1 л/мин для поддержания наркоза при помощи системы для анестезии животных EZ – 7000 (E-ZAnesthesia systems, USA). После этого животное фиксировали на спине, шерсть в области предполагаемого разреза на шее сбривали, операционное поле обрабатывали антисептиком.

Под операционным микроскопом выполняли на шее срединный разрез, поверхностную фасцию рассекали. Мышцы, располагающиеся под фасцией, последовательно раздвигали тупым способом, выделяли место бифуркации общей сонной артерии (ОСА) на внутреннюю сонную артерию (ВСА) и наружную сонную артерию (НСА). На НСА накладывали лигатуры: первая шелковая нить наиболее дистально, вторая около бифуркации; на ОСА и ВСА – микрохирургические клипсы. Сосудистыми ножницами между лигатурами производили разрез.

Монофиламент с силиконовым покрытием (Doccol Corporation, США) вводили в НСА в направлении к ОСА, где расположена микрохирургическая клипса, затем разворачивали и «вслепую» вводили в ВСА, далее продвигали к месту отхождения от нее средней мозговой артерии (СМА). В таком положении монофиламент оставался на 90 минут. Шелковая нить на НСА затягивалась, чтобы предотвратить кровотечение, микрохирургические клипсы снимались. По истечению вышеуказанного времени монофиламент извлекали, рану ушивали, крысу помещали в клетку, где она отходила из-под действия наркоза.

### 2.3 Дизайн исследования

Все животные были поделены на группы: 1) «ложная операция» (SH4,5 и SH24), животные подвергались под наркозом аналогичному хирургическому вмешательству: производился разрез на шее, выделялось место бифуркации, однако окклюзия СМА не производилась; 2) «ишемия» (IR4,5 и IR24); 3) «ишемия+семакс» (IS4,5 и IS24); 4) «ишемия+PGP» (IP4,5 и IP24); 5) «ишемия+PGPL» (IL4,5 и IL24). Каждая из этих групп, в свою очередь, была поделена на временные подгруппы: крысы выводились из эксперимента через 4,5 и 24 часа после начала окклюзии путем декапитации под действием наркоза. Животным с ишемией вводили препараты: раствор NaCl 0,9%, пептиды семакс, PGP и PGPL из расчета 100, 37.5 и 200 мкг/кг массы крысы соответственно. Для животных во временной подгруппе «4,5 часа» введение препаратов осуществлялось двукратно: сразу после окончания окклюзии, затем через час. Для животных во временной подгруппе «24 часа» введение препаратов осуществлялось трехкратно: сразу после окончания окклюзии, через час, через пять часов. У крыс временной подгруппы «4,5 часа» оценка ишемического повреждения с использованием МРТ проводилась непосредственно перед декапитацией, а у животных временной подгруппы «24 часа» МР-исследование проводилось двукратно: через 3 часа после окончания операции и непосредственно перед декапитацией.

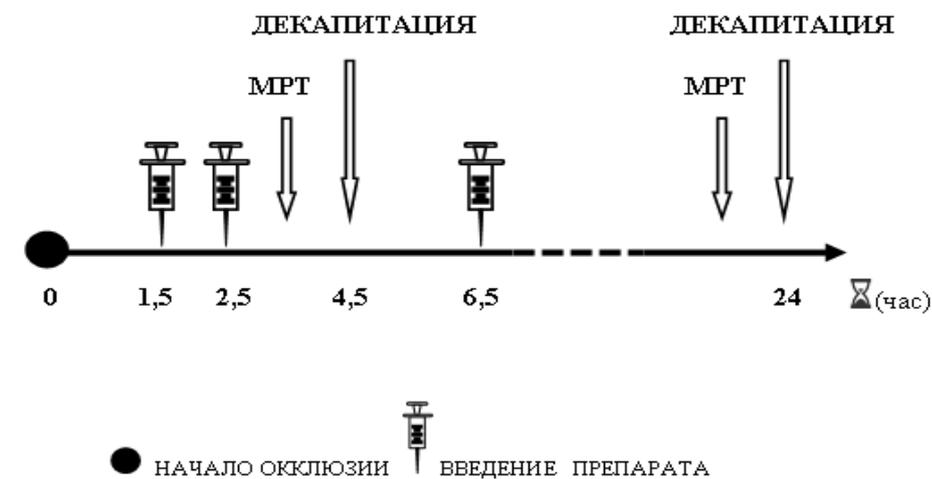


Рисунок 2 – Схема эксперимента.

После выведения животных из эксперимента в различные временные интервалы и выделения суммарной РНК из подкорковых структур головного мозга, исследование было представлено следующим образом: часть полученного материала определенных групп была использована для полногеномного секвенирования РНК (RNA-seq), другая – для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Схема эксперимента представлена на Рисунке 2. Подробные сведения о методах RNA-seq и ОТ-ПЦР изложены в подглавах 2.7. 2.8.

## **2.4 Дизайн исследования с оценкой неврологического статуса, объема ишемического повреждения в условиях модели преходящей фокальной ишемии под влиянием семакса**

Для данного эксперимента были взяты группы «ишемия» (IR) и «ишемия+семакс» (IS), которые ежедневно 1 раз в сутки внутрибрюшинно получали 0,9% физиологический раствор или семакс из расчета 100 мкг/кг. Животные выводились из эксперимента на 14 сутки от преходящей фокальной ишемии мозга путем введения летальной дозировки наркоза. Оценка очагов инфаркта головного мозга проводилась на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки с использованием стандартного МР – протокола. Анализ неврологического статуса в условиях фокальной ишемии и под влиянием семакса проводился с использованием шкалы mNSS (Modified Neurological Severity Scores), позволяющей оценить моторный дефицит, тактильную и проприоцептивную чувствительность, рефлексы и координаторную сферу. Послеоперационное тестирование также проводилось на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки. Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics 26.

## **2.5 Гистологическое исследование головного мозга крыс**

Головной мозг крыс извлекали из черепной коробки и фиксировали в течение 48 часов в кислой жидкости Буэна, в последствии тщательно отмывали от пикриновой кислоты в четырех сменах 70% этанола. Гистотопографическую вырезку мозга выполняли с фронтальной ориентацией двух тканевых блоков на уровнях -0,5...+5,0 мм и -4,0...-0,5 мм от брегмы для их последующего микромирования в каудоростральном направлении. После стандартной гистологической проводки на гистопроцессоре Leica TP1020 (Германия) ориентированные фрагменты мозга заключали в Гистомикс («БиоВитрум», Россия) на станции заливки HistoStar («Thermo Fisher Scientific», США). Для гистологических исследований серийные срезы толщиной 5-6 мкм, полученные с

блоков через 0,5 – 1 мм на микротоме Leica RM2235 (Германия), после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум»). Патоморфологический анализ выполнен с учетом критериев вариантов нормы и патологии нервных клеток, а также искусственных, суправитальных и реактивных изменений клеток нервной ткани, вызванных манипуляциями при выделении головного мозга и его погружением в фиксирующие смеси [70, 117, 119]. Гистотопографическое картирование зон повреждения и точное определение уровней коронарных срезов проводили по стереотаксическому атласу головного мозга крыс [35].

Общее количество животных, использованных во всей экспериментальной работе, указано в Таблице 1.

Таблица 1 – Суммарное количество животных, использованных в экспериментальной работе

Группы	Подгруппы	RNA-seq	ОТ-ПЦР	Гистология	14 суток
«Ложная операция» (SH)	SH4,5	3	8	3	
	SH24	3	8	3	
«Ишемия» (IR)	IR4,5	3	8	5	
	IR24	3	8	5	
	14 суток				10
«Ишемия+ семакс» (IS)	IS4,5	3	8	5	
	IS24	3	8	5	
	14 суток				10
«Ишемия+ PGP» (IP)	IP4,5		8		
	IP24		8		
«Ишемия+ PGPL» (IL)	IL4,5		8		
	IL24		8		

## 2.6 Магнитно-резонансная томография

Исследование характера и размера тканевых повреждений мозга животных проводилось на томографе для малых лабораторных животных ClinScan (Bruker

BioSpin, США) с индукцией магнитного поля 7 Тл (Центр коллективного пользования «Медицинские и биотехнологические нанотехнологии» ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России). Стандартный протокол исследования включал следующие режимы:

1) Диффузионно-взвешенные изображения (ДВИ/DWI) с построением карт измеряемого коэффициента диффузии (ИКД/ADC) (на основе эхо-планарной импульсной последовательности, TR/TE=9000/33 мс; b-факторы=0 и 1000 сек/мм<sup>2</sup>; количество диффузных направлений=6; количество усреднений=3; частотное подавление жира; FOV=30\*19,5 мм; толщина среза=1,0 мм; матрица = 86\*56; время исследования = 3,18) для оценки острого ишемического повреждения;

2) T2-взвешенные изображения (на основе импульсной последовательности турбо спин эха, фактор ускорения =10; TR/TE = 5230/46 мс; количество усреднений =2, частотное подавление жира; FOV =30\*21,1 мм; толщина среза = 0,7 мм; матрица =256\*162; время исследования = 3,03);

3) МР-ангиографию (3D-TOF-MRA на основе импульсной последовательности трехмерного градиентного эха, TR/TE=30/4.55 мс; пакеты = 4; угол возбуждения=70 градусов; количество усреднений=1; FOV=35\*19,3 мм; толщина среза=0,2 мм; матрица=320\*176; время исследования=6,30) для визуализации магистральных артерий, для контроля реканализации после извлечения филамента.

Количественная оценка объема очага инфаркта производилась с помощью программного пакета ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, USA).

## **2.7 Полногеномное секвенирование мРНК (RNA-seq)**

Суммарную РНК из подкорковых структур мозга крыс выделяли при помощи реагента TRIzol (Invitrogen, США) согласно рекомендации производителя. Качество и количество выделенной тотальной РНК проверяли на приборе BioAnalyser и набора RNA 6000 Nano Kit (Agilent, США). Для секвенирования РНК из суммарной РНК получали полиА фракцию при помощи олигоТ магнитных

шариков Dynabeads® mRNA Purification Kit (Ambion, США). Далее из полиА РНК были приготовлены библиотеки для массового параллельного секвенирования при помощи набора NEBNext® mRNA Library Prep Reagent Set (NEB, США). Концентрацию библиотек определяли при помощи набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на приборе Qbit 2.0. Распределение длин фрагментов библиотеки проводили при помощи набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, США). Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 (Illumina, США) с генерацией не менее 10 млн коротких чтений длиной 50 нуклеотидов. Работа по секвенированию РНК проводилась с участием фирмы ЗАО «Геноаналитика» (г. Москва, Россия). Уровень экспрессии генов выражался как число фрагментов на килобазу, отнесенное на миллион ридов (Fragments Per Kilobase Per Million Reads (FPKM)). При секвенировании мРНК в каждом образце проанализировано более 10 млн ридов.

Для РНК-секвенирования были взяты следующие группы: «ложная операция» (SH4,5; SH24), «ишемия» (IR4,5; IR24), «ишемия+семакс» (IS4,5; IS24) во временных точках 4,5 и 24 часа соответственно. Были получены данные об экспрессии генов в подкорковых структурах мозга крыс группы «ишемия» относительно группы «ложная операция» - (IR4,5 vs. SH4,5; IR24 vs. SH24), и группы «ишемия+семакс» относительно группы «ишемия» – (IS4,5 vs. IR4,5; IS24 vs. IR24) через 4,5 и 24 часа после окклюзии соответственно. Динамику изменения экспрессии генов у животных групп «ложная операция» через 24 и 4,5 ч отражало сравнение SH24 vs. SH4.5., у животных групп «ишемия» – сравнение IR24 vs. IR4,5. В каждом сравнении были отобраны гены, уровень экспрессии которых был увеличен или снижен более чем в 1,5 раза. Значимыми считались различия со значением вероятности  $p$ , скорректированным с помощью процедуры Бенджамини-Хохберга ниже 0,05 ( $P_{adj} < 0,05$ ).

## 2.8 Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Выделенную суммарную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) в присутствии ингибитора РНКаз согласно рекомендациям производителя и проводили депротеинизацию смесью фенола и хлороформа (1:1). Синтез кДНК выполняли с использованием набора реактивов RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. В качестве затравки использовали олиго(dT)<sub>18</sub>праймеры (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ проводили с помощью ПЦР в реальном времени на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Для проверки результатов RNA-seq был выполнен анализ для 20 генов: *Hspa1 (a, b)*, *Hspb*, *CD14*, *Drd2*, *Gng7*, *Neurod6*, *Ccl6*, *Cd63*, *Nfkb2*, *Myd88*, *Lrg1*, *Nos3*, *Grm3*, *Ptk2b*, *Thra*, *Cplx2*, *Gabra5*, *Htr6*, *Ttr*, *Vegfa*. С целью анализа влияния пептидов семакс, PGP, PGPL была исследована экспрессия 12 генов (*IL1b*, *IL6*, *Ccl3*, *Socs3*, *Hspb1*, *Fos*, *Cplx2*, *Neurod6*, *Gabra5*, *Chrm1*, *Gria3*, *Ptk2b*) относительно 2 генов сравнения (*Gapdh*, *Rpl3*). Из трех повторных измерений было рассчитано среднее значение порогового цикла (Ct). Эффективности ПЦР оценивали с использованием амплификации серии стандартных разведений кДНК. Специфичные праймеры были подобраны с помощью программы OLIGO Primer Analysis Software 6.31 и синтезированы фирмой Евроген (Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров и значения эффективностей для всех реакций ПЦР (1,83 – 2,01) представлены в Таблице 2.

Для ОТ-ПЦР в реальном времени были взяты следующие группы: «ложная операция» (SH24), «ишемия» (IR24), «ишемия+семакс» (IS24), «ишемия+PGP» (IP24) и «ишемия+PGPL» (IL24) через 24 часа. Были получены данные об экспрессии генов в подкорковых структурах мозга крыс группы «ишемия» относительно группы «ложная операция» (IR24 vs. SH24), группы «ишемия+семакс», «ишемия+PGP» и «ишемия+PGPL» анализировались относительно группы «ишемия» - (IS24 vs. IR24, IP24 vs. IR24, IL24 vs. IR24

соответственно). При сравнении групп данных статистически значимыми считались различия со значением вероятности  $p < 0,05$ . Расчеты были проведены с использованием программ Relative Expression Software Tool (REST) 2005 и Microsoft Excel.

Таблица 2 – Характеристика ПЦР – праймеров

Ген	Праймер (5'-3')	RefSeq ID	Длина продукта	Эффективность $\pm$ ошибка
<i>Gapdh</i>	F: АСТСТАСССАССГСААГТТСААСГ	NM_017008.4	148	2,01 $\pm$ 0,03
	R: GTAGACTCCACGACATACTCAGCAC			
<i>Rpl3</i>	F: ATGGGTCCTTGGGCTTCTTG	NM_198753.2	239	1,90 $\pm$ 0,00
	R: CACAATACCCACAACCACCA			
<i>Gria3</i>	F: AAGGCTACTGTGTTGATTTA	NM_032990	312	1,96 $\pm$ 0,00
	R: AGATTTCATAAGCCAAAGGA			
<i>Chrm1</i>	F: СТАТТГГТАСТСАТСТСС	NM_080773	336	2,01 $\pm$ 0,03
	R: AACGAAGGAAACCAGCCAT			
<i>Cplx2</i>	F: GGAGGAGTGAGGAGGACGGG	XM_017600440.1	132	1,83 $\pm$ 0,03
	R: CACCAAGCAGGGTAGATAGCAT			
<i>Gabra5</i>	F: ATCGGGTACTTTGTCATCCA	NM_017295	224	1,96 $\pm$ 0,00
	R: CAGACAGCAATGAACCAGT			
<i>Neurod6</i>	F: ATCCGGTCTCTTGCCAATCCTCAG	NM_00110923	145	1,96 $\pm$ 0,00
	R: CCTCAATGATGCTCTGGACAATTTGC			
<i>Ptk2b</i>	F: СТТАСГАСССТАТГГАГТАТ	NM_017318	407	2,08 $\pm$ 0,06
	R: АТГАСАТТГТГГТАСАСА			
<i>IL1b</i>	F: ААГАТГАГГАСССААГСАС	NM_031512.2	160	
	R: ТСАГАСАСАСАГАГСАТТ			
<i>IL6</i>	F: АССАСССАСААСАГАСССАГАТАТ	NM_012589.2	242	2,00 $\pm$ 0,00
	R: ТССАГААГАСССАГАСАГАТАТ			
<i>Ccl3</i>	F: АСТГСАСТГСАСТТСТСАТА	NM_013025.2	206	1,91 $\pm$ 0,00
	R: ГТТСАСТГСАСТТСАТАТАТ			
<i>Ccl6</i>	F: АСТГСАСТТСТСАТАТАТ	NM_001004202.2	128	1,93 $\pm$ 0,00
	R: ГТТГСАСАСААСССАСТТСАТА			
<i>CD14</i>	F: ТААССТАГААГСССАГАГААС	NM_021744	229	1,91 $\pm$ 0,05
	R: ГСАТГСАГАТАТГСАГААГТТ			
<i>CD63</i>	F: ГГАТГГАААГАГАГААТААГАТГ	NM_017125.3	106	1,97 $\pm$ 0,00
	R: ААССТААСТГСАТСАСАСА			
<i>Drd2</i>	F: ССАГАТАТГССААГТТСАТТ	NM_012547	262	1,95 $\pm$ 0,00
	R: ТТГАССГАСАТГТТГАСАТА			
<i>Gng7</i>	F: СТАТТГГААССТССГАТГСАТГ	NM_024138	168	2,02 $\pm$ 0,03
	R: ГСАТТГГАГАСАТТГАТГ			
<i>Grm3</i>	F: АСССАТГСАТСССААСАСА	NM_001105712	216	2 $\pm$ 0,03
	R: ТАСТАТСССАСАТГСАТГСАТ			
<i>Htr6</i>	F: ГСАТГГАТГСАСАСАСА	NM_024365	299	1,83 $\pm$ 0,03
	R: САТТСАТГСАТАТГСАТТГГАТГ			
<i>Lrg1</i>	F: АСТАТГГАСАТТГСАСАСА	NM_001009717.1	108	1,9 $\pm$ 0,05
	R: САСАСАСАТТСААГАСАТТ			

## Продолжение Таблицы 2

Ген	Праймер (5'-3')	RefSeq ID	Длина продукта	Эффективность $\pm$ ошибка
<i>Myd88</i>	F: CAGAGTGGAGAGCAGTGT	NM_198130	261	1,96 $\pm$ 0,03
	R: ATGCGACGACACSTTTTCTCA			
<i>Nfkb2</i>	F: CACTGCTTGCCACCAGACTGTG	XM_006231503.2	129	1,96 $\pm$ 0,00
	R: GAAGGGCCGGAAGACSTATCCTAC			
<i>Nos3</i>	F: TCTTTCGGAAGGCGTTTGA	NM_021838	211	1,89 $\pm$ 0,03
	R: ATTTTGTAACSTTTGTGCTGCT			
<i>Thra</i>	F: GTTACCTGGACAAAGACGA	NM_001017960; NM_031134	204	1,88 $\pm$ 0,00
	R: TGAAGCGGCACAACCTGGCAC			
<i>Ttr</i>	F: AGCCGTTTGCCTCTGGGAA	NM_012681.2	158	2 $\pm$ 0,00
	R: AACCACTCTGCGTATTCAT			
<i>Vegfa</i>	F: CCACGACAGAAGGGGAGCA	NM_031836.3	263	2 $\pm$ 0,00
	R: GTGCTGGCTTTGGTGAGG			
<i>Fos</i>	F: TGAAGAGGAAGAGAAACGGAGA	NM_022197.2	302	2 $\pm$ 0,00
	R: ACTCTGGGGTGGTAGCCTCA			
<i>Hspb1</i>	F: GGCTACATCTCTCGGTGCTT	NM_031970.4	137	1,93 $\pm$ 0,03
	R: GCTGATTGTGTGACTGCTTTG			
<i>Hspa1a</i>	F: GCAGACCTTCACCACCTACTC	NM_031971.2	315	1,92 $\pm$ 0,05
	R: TCGTCCTCCGCCTTGTAGC			
<i>Socs3</i>	F: GGACCAAGAACCTACGCATC	NM_053565.1	188	1,87 $\pm$ 0,03
	R: TGGCTGCTCCTGAACCTC			

## 2.9 Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ)

Для аннотирования функций дифференциально экспрессирующихся генов использовали базу данных для аннотации, визуализации и комплексного обнаружения DAVID v6.8, (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>). Значимыми считались различия со значением вероятности  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Изменение экспрессии генов в условиях ишемически-реперфузионного повреждения и под влиянием семакса с помощью метода RNA-seq

Используя метод секвенирования РНК, в подкорковых структурах мозга крыс был определен уровень экспрессии 17352 генов. Было выявлено, что при ишемии через 4,5 часа после начала окклюзии в сравнении с животными группы «ложная операция» (IR4,5 vs. SH4,5) достоверное изменение экспрессии продемонстрировали 469 генов, а через 24 часа (IR24 vs. SH24) количество ДЭГ составило уже 1939. Стоит также отметить, что в условиях ишемии количество генов, увеличивших свою экспрессию, было больше в обеих временных подгруппах, чем количество генов, снизивших свою экспрессию. Идентифицировали 229 генов (152 увеличивших и 77 снизивших экспрессию), которые изменили свою экспрессию при ишемии через 4.5 часа (IR4,5 vs. SH4,5), но не изменили ее через 24 часа после окклюзии (IR24 vs. SH24). Одновременно, было 1699 генов (902 увеличивших и 797 снизивших), которые изменили свою экспрессию при ишемии через 24 часа, но не изменили ее через 4.5 часа после окклюзии. Следует отметить, что 240 генов были общими для сравнений «IR4,5 vs. SH4,5» и «IR24 vs. SH24» (Рисунок 3а, 3б). Экспрессия более 86% этих ДЭГ была повышена.

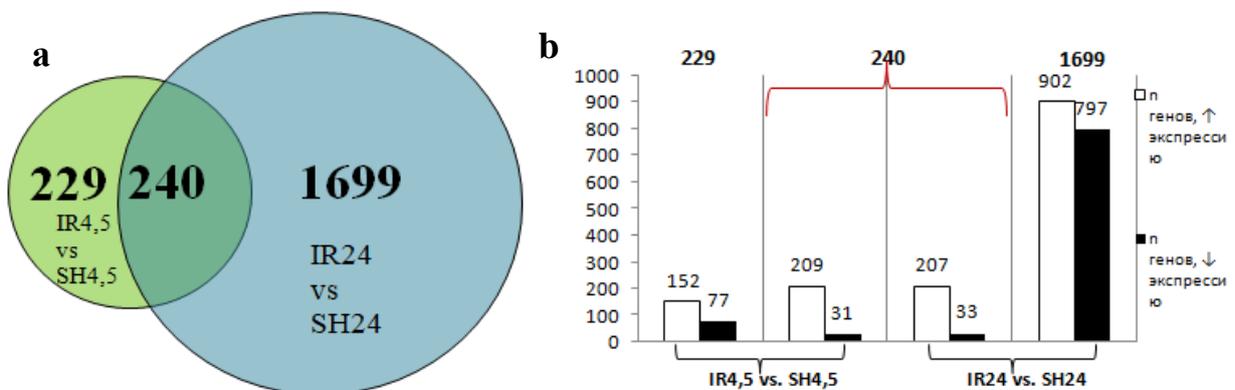


Рисунок 3 – RNA-seq анализ ДЭГ в условиях модели переходящей фокальной ишемии мозга у крыс. а. С помощью диаграммы Венна продемонстрировано количество генов, достоверно изменивших свою экспрессию в группах «IR4,5 vs.

SH4,5» и «IR24 vs. SH24». б. Графическое отображение количества генов, проявивших повышенную и пониженную экспрессию в сравнениях «IR4,5 vs. SH4,5» и «IR24 vs. SH24». Учитывали РНК, которые изменили свой уровень более чем в 1,5 раза и с  $P_{adj} < 0,05$ .

На Рисунке 4 представлено по 10 генов, которые продемонстрировали наиболее высокие и низкие уровни экспрессии в подкорковых структурах головного мозга при ишемически-реперфузионном повреждении спустя 4.5 и 24 часа после начала окклюзии. Так, например, в сравнении «IR4,5 vs. SH4,5» более чем в 120 раз был повышен уровень мРНК *Ccl3* ( $120,207 \pm 0,0472$ ), уровень *Ccl2* >70 раз ( $73,332 \pm 0,0472$ ), уровень *Atf3* был увеличен более чем в 64 раза ( $64,111 \pm 0,002$ ). Уровни мРНК гена белка теплового шока *Hspa1(a,b)* и гена *Msrl*, который кодирует рецептор 1 акцептора макрофагов, были увеличены более чем в 80 раз в «IR24 vs. SH24» и составили ( $82,726 \pm 0,0004$ ) и ( $82,190 \pm 0,0112$ ) соответственно.

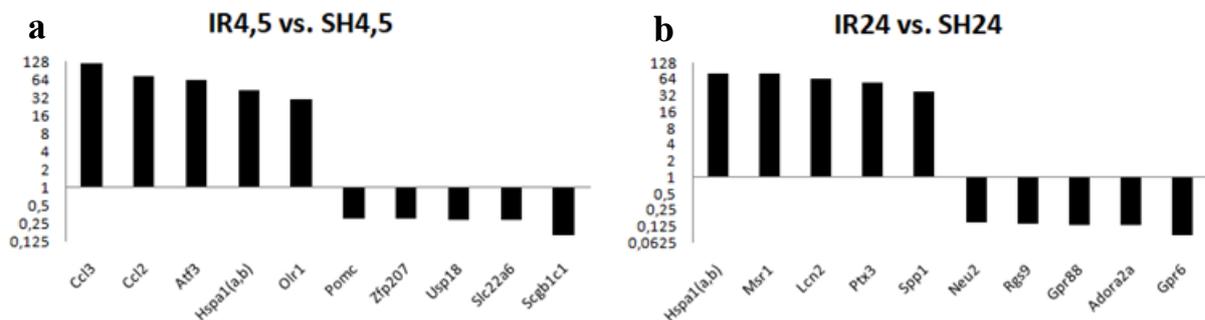


Рисунок 4 – Гены, наиболее заметно изменившие экспрессию при ишемии.

а. Первые 10 генов, изменившие уровни экспрессии при ишемии спустя 4,5 часа после окклюзии (IR4,5 vs. SH4,5). б. Первые 10 генов, изменившие уровень экспрессии при ишемии спустя 24 часа после окклюзии (IR24 vs. SH24). Различия считали статистически значимыми при вероятности  $P_{adj} < 0,05$ .

Через 4,5 часа после окклюзии под воздействием нейропептида семакс в сравнении с животными группы «ишемия» (IS4,5 vs. IR4,5) в подкорковых структурах мозга животных достоверных изменений уровней экспрессии генов выявлено не было. Через 24 часа после окклюзии под влиянием семакса в

сравнении с животными «ишемия» (IS24 vs. IR24) были выявлены 394 гена, из которых 191 ген показал увеличение экспрессии, а 203 снижение. 313 генов были общими для групп «IS24 vs. IR24» и «IR24 vs. SH24», причем уровни экспрессии этих генов имели разнонаправленную экспрессию в данных группах сравнения. Так, было обнаружено, что при воздействии семакса (IS24 vs. IR24) 155 генов увеличили свою экспрессию и 157 генов снизили, в то время как при ишемии через 24 часа (IR24 vs. SH24) наблюдался обратный эффект. Экспрессия только одного гена *Mx1* была повышена в обеих группах сравнения (IS24 vs. IR24 и IR24 vs. SH24). *Mx1* кодирует ГТФ-связывающий белок, который участвует в клеточном противовирусном ответе. Кодируемый белок индуцируется интерферонами типа I и II и противодействует процессу репликации различных РНК- и ДНК-вирусов (Рисунок 5).

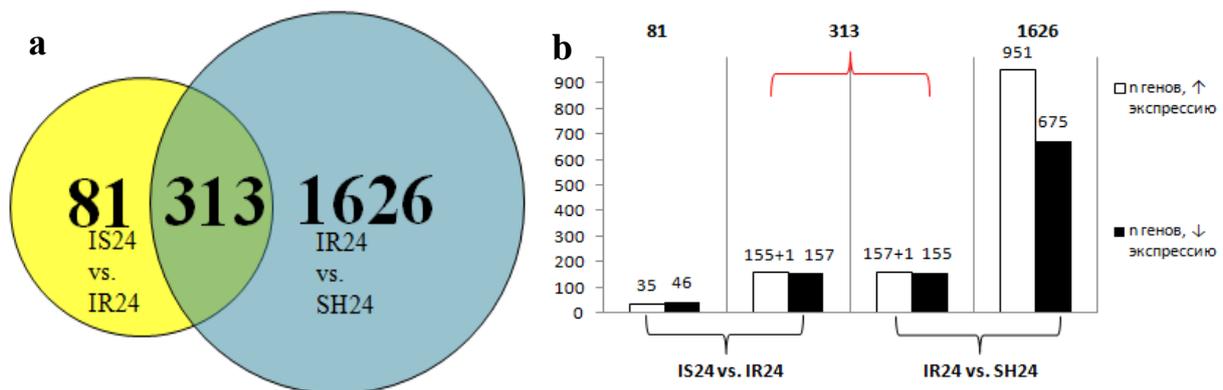


Рисунок 5 – RNA-seq анализ ДЭГ под действием семакса в условиях модели преходящей фокальной ишемии мозга у крыс. а. С помощью диаграммы Венна продемонстрировано количество генов, достоверно изменивших свою экспрессию в группах «IS24 vs. IR24» и «IR24 vs. SH24». б. Графическое отображение количества генов, проявивших повышенную и пониженную экспрессию в сравнениях «IS24 vs. IR24» и «IR24 vs. SH24». Различия считали статистически значимыми при вероятности  $P_{adj} < 0,05$ .

На Рисунке 6 представлены 10 генов, продемонстрировавших наиболее выраженные изменения экспрессии при воздействии семакса спустя 24 часа после окклюзии в сравнении с ишемией. Данные показывают, что уровни экспрессии

генов *Gpr6*, *Neu2*, *Hes5*, *Gpr88* и *Drd2* были увеличены в 2.5 раза в группе «IS24 vs. IR24» и были снижены в 4 раза в группе «IR24 vs. SH24». Одновременно, до 3 раз были снижены уровни экспрессии генов *Glycam1*, *S100a9*, *Ccl6*, *Gh1* и *Hspa1 (a, b)* в группе «IS24 vs. IR24» и были увеличены до 5 раз в группе «IR24 vs. SH24».

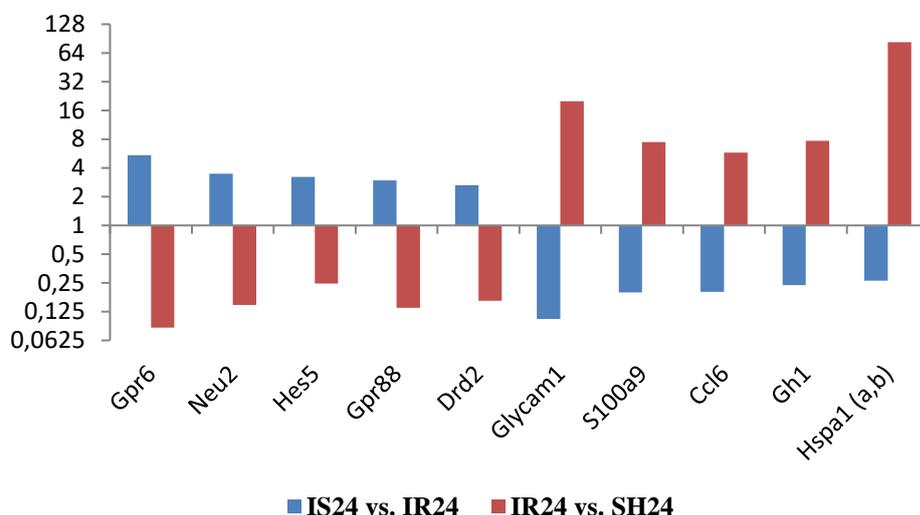


Рисунок 6 – Гены, наиболее заметно изменившие экспрессию в подкорковых структурах головного мозга крыс в группах сравнения «IS24 vs. IR24» и «IR24 vs. SH24». Различия считали статистически значимыми при вероятности  $P_{adj} < 0,05$

Разберем подробнее гены, которые показали наиболее выраженные изменения экспрессии при администрировании семаксом.

Несмотря на то, что рецепторы, связанные с G – белком (GPCRs) вовлечены во множественные физиологические и патологические процессы и служат лекарственными мишенями, большинство GPCR, в том числе и орфанные не используются. *Gpr88*, продемонстрировавший выраженное снижение экспрессии в группе «IR24 vs. SH24», кодирует специфичный для мозга орфанный рецептор с экспрессией в стриатуме, регулирующим различные функции мозга и поведение, включая познание, настроение, контроль движений. Таким образом, *Gpr88* стал лекарственной мишенью при расстройствах центральной нервной системы, включая шизофрению, болезнь Паркинсона, фобии и зависимость. Тем не менее, никакие эффективные *Gpr88* синтетические лиганды еще не вступили в

клинические испытания, а Gpr88 эндогенные лиганды до сих пор остаются неизвестными [222].

Еще один орфанный рецептор Gpr6, кодируемый одноименным геном, экспрессия которого была снижена в нашем исследовании также участвует в обучении, и тоже рассматриваться как терапевтическая мишень при болезни Паркинсона [154], а также при шизофрении [110]. Также было продемонстрировано его участие в нейропротекторной активности, а именно, в подавлении токсичности  $\beta$  - амилоида при болезни Альцгеймера [30].

Ген *Neu2* принадлежит к семейству гликогидролитических ферментов, которые удаляют остатки сиаловой кислоты из гликопротеинов и гликолипидов. В исследованиях было показано, что среди сиалидаз млекопитающих цитозольные Neu2 играют ключевую роль в дифференцировке мышц и нейронов *in vitro*, но его биологические функции *in vivo* остаются неясными из-за его очень низкой экспрессии у людей. Однако наличие цитоплазматических гликопротеинов, ганглиозидов и лектинов, участвующих в клеточном метаболизме и распознавании гликанов, говорит о функциональной важности цитозольных Neu2 сиалидаз. Нокаутирование гена *Neu2 in vivo* изменяло общий липидный метаболизм, нарушая двигательную функцию и приводя к диабету [155].

*Hes5* ген кодирует белок, являющийся транскрипционным фактором, который регулирует дифференцировку клеток во многих тканях. Нарушения экспрессии этого гена связаны с болезнями развития и онкологическими заболеваниями. Например, при немелкоклеточном раке легкого, увеличение экспрессии данного гена коррелировало с более инвазивным фенотипом опухоли и плохим прогнозом [81].

Также значимую экспрессию и разнонаправленную динамику при ишемии и при влиянии семакса продемонстрировал ген *Drd2*. Как известно, дофаминовая передача играет важную роль в развитии нервной системы и в таких функциях головного мозга, как двигательная активность, эмоции, обучение и память [183, 191, 211]. Мозг содержит 2 типа дофаминовых рецепторов в зависимости от последовательностей и функции: возбуждающие D1 – подобные рецепторы (*Drd1*

и Drd5) и тормозные D2 – подобные рецепторы (Drd2, Drd3 и Drd4). Drd2 генетически связан с несколькими нервно – психическими заболеваниями и является мишенью антипсихотиков. В недавнем исследовании было показано, что Drd2 участвует в регуляции процесса сокращения избыточных синапсов в нейронной сети. Дефицит Drd2 – ассоциированной регуляции сокращения синапсов приводит к тревожным расстройствам [224].

*S100a9* ген, кодирует Ca<sup>2+</sup> связывающий белок семейства S100. Экспрессия *S100a9* массово активируется во время инфекции и воспаления, защищая организм от распространения патогенов. В дополнение к бактерицидным эффектам было показано, что S100A9, в частности, участвует в контроле ранних воспалительных событий посредством стимуляции рекрутирования лейкоцитов и экспрессии провоспалительных цитокинов. Экспрессия S100A9 ограничена механизмами автоматического регулирования отрицательной обратной связи для предотвращения сверхэкспрессии [212]. Тем не менее, при различных воспалительных заболеваниях экспрессия S100A9 сильно повышается, что коррелирует со степенью тяжести заболевания, что свидетельствует о патогенной функции [181, 201, 212]. Некоторые белки S100, включая S100A9, связаны с патофизиологическими процессами при ожирении [169].

Как было сказано ранее, воспалительный ответ характеризуется инфильтрацией лейкоцитов, которая инициируется и организуется различными медиаторами воспаления. Из них хемокины, относящиеся к группе цитокинов, являются хемоаттрактантами для определенных типов лейкоцитов. Хемокины делятся на два подсемейства CXС и СС в зависимости от последовательности и положения остатков цистеина. Хемокины CXС обычно являются хемоаттрактантами для нейтрофилов, тогда как СС хемокины привлекают и активируют моноциты и лимфоциты. Было показано, что CCL6 присутствует в различных хронических воспалительных заболеваниях, включая экспериментальные демиелинизирующие заболевания, аллергические воспалительные заболевания дыхательных путей, блеомицин–индуцированный фиброз легких и хронические перитониты [25, 29, 93, 146]. Результаты этих

исследований демонстрируют важную роль CCL6 в хроническом воспалении, связанном с инфильтрацией макрофагов. Также была показана роль CCL6 в остром воспалении [113], в том числе и в нашем исследовании.

*Gh1* ген кодирует гормон роста, который влияет на многие процессы, в том числе на процессы роста и старения организма, участвуя в регуляции метаболизма углеводов, белков и жиров. Дефицит гормона роста у животных показал увеличение продолжительности жизни на 50%, тогда как повышенная продукция гормона роста коррелировала с уменьшением срока жизни трансгенных мышей [133]. Также влияет на способность сердечной мышцы к сокращению, активирует выработку инсулинподобного фактора-1 кардиомиоцитами и клетками сосудистого эндотелия, может увеличивать тонус сосудов.

Таким образом, ишемическое повреждение головного мозга, вызванное окклюзией симптомной артерии в сочетании с последующей реперфузией, приводит к многочисленным нарушениям регуляции мРНК генов, участвующих в церебральной ишемической реакции. В условиях модели преходящей окклюзии СМА с помощью филамента посредством высокопроизводительной методики RNA-seq было идентифицировано большое количество ДЭГ, а использование двух временных точек (4,5 часа и 24 часа от начала окклюзии), значительно увеличило количество ранее известных генов, участвующих в раннем и позднем ответе на ишемическое повреждение. Значительное количество генов в условиях данной модели имели повышенную регуляцию. Среди них были обнаружены гены, участвующие в воспалительной, иммунной и стрессовой реакции, а также при апоптозе и регуляции транскрипции. В условиях ишемии отмечалось массовое подавление генов, обеспечивающих функционирование нейромедиаторных систем (например, *Chrm1*, *Chrm4*, *Cplx2*, *Drd1*, *Drd2*, *Gabra5*, *Gria3*, *Grm3*, *Grm5*, *Gpr6*, *Gpr88*, *Htr6*, *Neurod6* и другие). В то же время действие гептапептида на несколько сотен генов было противоположным действию ишемически – реперфузионного повреждения, например, введение семакса повышало экспрессию *Gpr6*, *Neu2*, *Hes5*, *Gpr88*, *Drd2* и других генов, преимущественно участвующих в действии

нейрональных рецепторов и нейрогенезе, и подавляло экспрессию генов хемокинов (*Ccl6*, *Ccl9*), генов раннего ответа (*Hspa1 (a, b)*, *Fos*, *Jun*) и других.

### 3.2 Проверка результатов RNA-seq с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени

Для проверки результатов RNA-seq в условиях ишемически-реперфузионного повреждения был выполнен анализ экспрессии 20 генов с помощью ОТ-ПЦР. Была использована мРНК из подкорковых структур головного мозга 9 крыс в условиях переходящей фокальной ишемии спустя 24 часа и 9 крыс в условиях ложной операции. Оба метода идентифицировали 3 гена, продемонстрировавшие максимально высокие уровни экспрессии *Hspa1 (a,b)*, *Hspb*, *CD14* и 3 гена, показавшие максимально низкие уровни экспрессии *Drd2*, *Gng7*, *Neurod6*. Более того, оба метода идентифицировали гены с умеренно значимыми уровнями экспрессии: гены с повышенным уровнем экспрессии (*Ccl6*, *Cd63*, *Nfkb2*, *Myd88*, *Nos3*) и гены, у которых экспрессия была понижена (*Grm3*, *Ptk2b*, *Thra*, *Cplx2*, *Gabra5* и *Htr6*). В то же время, значительные результаты относительно дифференциальной экспрессии генов *Ttr* и *Vegfa* не были получены с использованием этих двух методов (Рисунок 7).

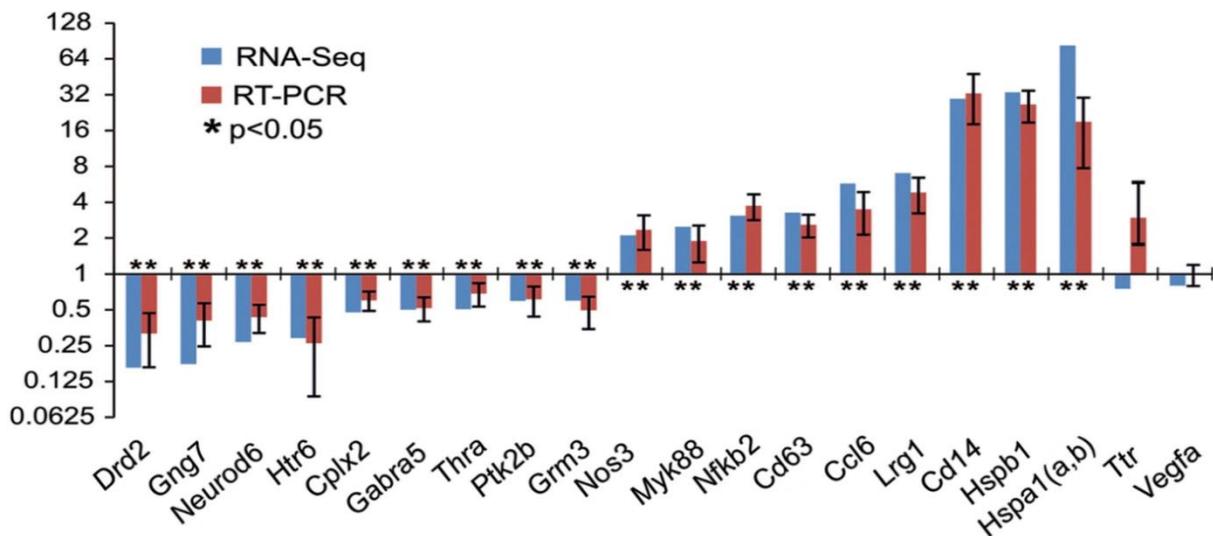


Рисунок 7 – Проверка результатов RNA-seq с помощью метода ОТ-ПЦР. Приведены данные для группы сравнения IR24 vs. SH24. Продемонстрированы восемнадцать генов, которые изменяют экспрессию более чем в 1,5 раза ( $p < 0,05$ )

и два гена, выбранных для анализа. Данные представлены в виде средних значений и  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Таким образом, результаты ОТ-ПЦР в достаточной степени подтвердили результаты RNA-seq, а незначительные вариации в генной экспрессии, обнаруженные этими методами, могли быть вызваны различиями в методологии и статистической обработке данных, используемых в каждом случае.

Для проверки результатов RNA-seq в условиях влияния семакса был также применен ОТ-ПЦР анализ для четырех генов с повышенным уровнем экспрессии (*Cplx2*, *Gabra5*, *Neurod6*, *Ptk2b*) и четырех со сниженной экспрессией (*Hspb1*, *Hspa1(a,b)*, *Fos*, *Lrg1*) и двух без выраженной экспрессии (*Ttr*, *Vegfa*). Как и в случае с ишемией, результаты были достаточным образом подтверждены (Рисунок 8).

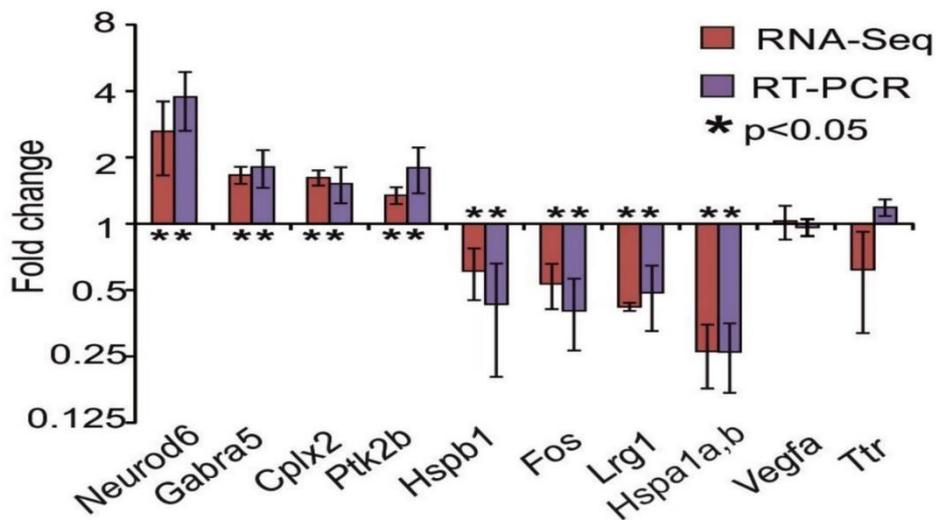


Рисунок 8 – Проверка результатов RNA-seq с помощью метода ОТ-ПЦР. Приведены данные для группы сравнения IS24 vs. IR24. Представлены восемь генов, у которых  $p < 0,05$  и два других гена, выбранных для анализа. Данные в виде средних значений и  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### 3.3 Анализ функциональных категорий, кодируемых ДЭГ, в условиях ишемически – реперфузионного повреждения и под влиянием семакса

Ишемически-реперфузионное повреждение спустя 4,5 часа после преходящей фокальной ишемии (IR4,5) повлияло на уровни экспрессии ДЭГ,

ассоциированных с 34 функциональными категориями. Большое количество функциональных категорий, связанных с ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга, наблюдалось спустя 24 часа после преходящей фокальной ишемии (IR24) и превысило 80, в то время как только 6 категорий («Phosphoprotein», «Angiogenesis», «Developmental protein», «Biological rhythms», «Disulfide bond», «Glycoprotein») были связаны с ложной операцией (SH24 vs. SH4,5). Функциональные категории белков, связанные с генами, продемонстрировавшими изменения экспрессии в условиях ишемически-реперфузионного повреждения спустя 4,5 и 24 часа после преходящей фокальной ишемии мозга, а также в условиях ложной операции представлены в Приложении А, Таблица А.1. Следует отметить, что в первые часы после восстановления кровотока в подкорковых структурах мозга крысы, проявившие повышенную экспрессию ДЭГ, были связаны с воспалительными, иммунными и стрессовыми реакциями, а также с процессами апоптоза и регуляции транскрипции. Как количество ДЭГ, так и уровни их экспрессии были значительно увеличены через 24 часа после преходящей фокальной ишемии. Так, большое количество генов с пониженной экспрессией были связаны с процессами транскрипции и с функционированием нейротрансмиттерных систем спустя 24 часа после преходящей фокальной ишемии.

При воздействии семакса в условиях ишемически-реперфузионного повреждения спустя 24 часа после преходящей фокальной ишемии суммарное количество функциональных категорий равнялось 34. В топ 5 функциональных категорий с наименьшим *Padj* входили «disulfide bond», «glycoprotein», «signal», «secreted», «calcium». Количество генов, которые продемонстрировали изменения экспрессии в каждой из вышеперечисленных функциональных категорий, показаны на Рисунке 9.

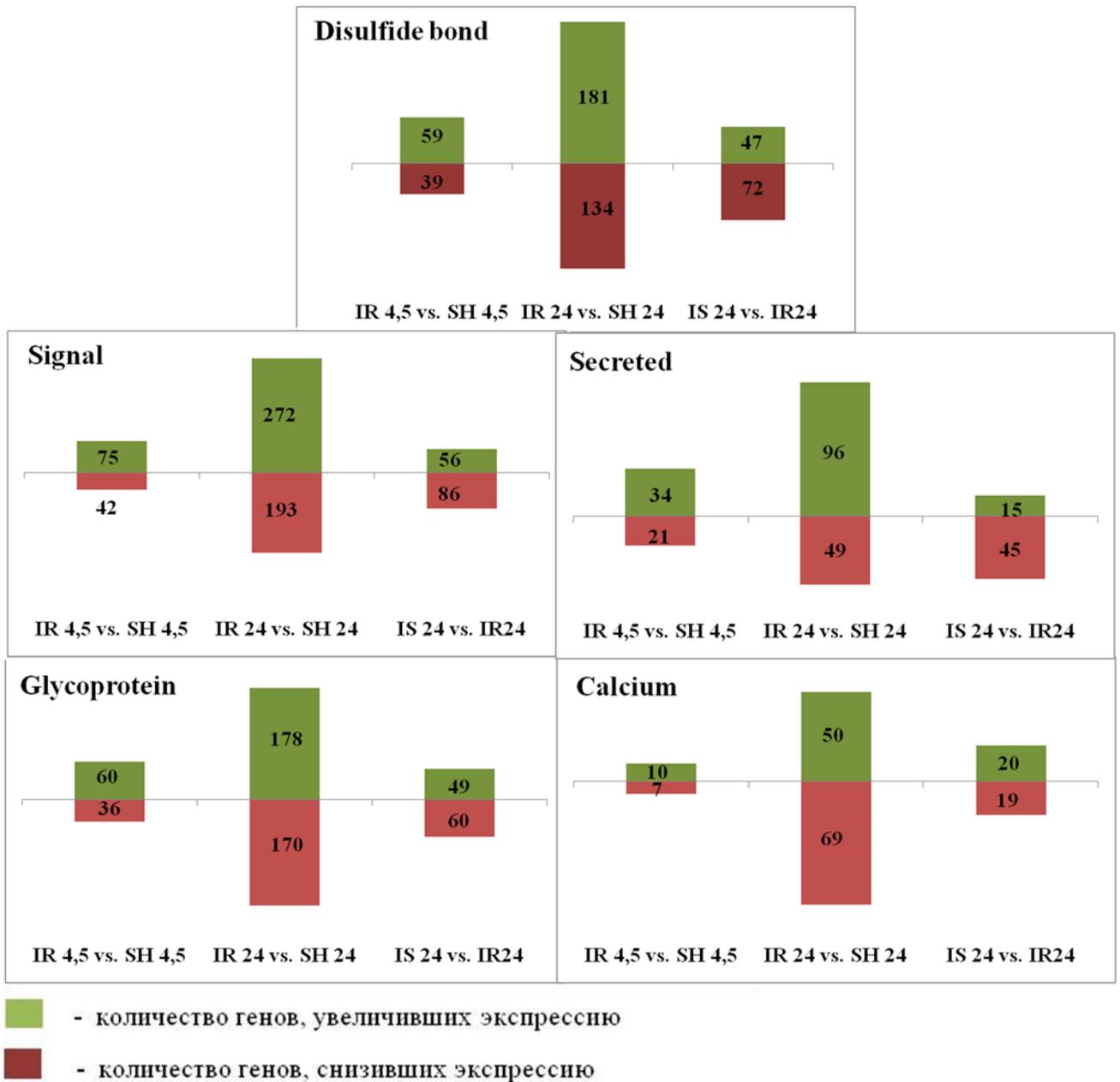


Рисунок 9 – Количество генов, изменивших свою экспрессию в группах IR 4,5 vs. SH4,5; IR24 vs. SH24 и IS24 vs. IR24 в функциональных категориях «disulfide bond», «signal», «secreted», «glycoprotein», «calcium».

Среди полученного массива данных были выбраны некоторые интересующие нас функциональные категории генов: «synapse», «cell junction», «postsynaptic cell membrane», «intermediate filament», «immunity». Стоит отметить, что для категорий «synapse», «cell junction» и «postsynaptic cell membrane» множество генов были общими. Количество генов, изменивших уровни экспрессии

в данных категориях, а также гены, продемонстрировавшие наиболее значимые изменения экспрессии, показаны на Рисунке 10.



■ - количество генов, увеличивших экспрессию

■ - количество генов, снизивших экспрессию

Рисунок 10 – Суммарное количество ДЭГ и гены, продемонстрировавшие наиболее значимые уровни экспрессии, в функциональных категориях «synapse», «postsynaptic cell membrane», «immunity», «cell junction», «intermediate filament».

Функциональные категории нейротрансмиттерных систем клеток «synapse», «postsynaptic cell membrane», «calmodulin-binding», «cell junction» были связаны преимущественно с генами, показавшими повышенную регуляцию в группе IS24 в сравнении с IR24 (Приложение А. Таблица А.2). В то же время функциональные категории иммунитета и воспалительного ответа («intermediate filament», «immunity», «innate immunity») были связаны с ДЭГ, проявившими пониженную экспрессию в IS24 в сравнении с IR24 (Приложение А. Таблица А.2).

Среди генов, относящихся к функциональной категории «cell junction» при сравнении IR4,5 vs. SH4,5 детектировались 11 генов, увеличивших, и 3 гена, снизивших экспрессию. Спустя 24 часа при ишемии IR24 vs. SH24 количество генов, изменивших экспрессию, возросло: 21 – увеличили и 70 – снизили экспрессию. При сравнении IS24 vs. IR24 было обнаружено повышение экспрессии 27 генов, снижение 4 генов. Гены, принадлежащие к функциональной категории «cell junction», а также уровни их экспрессии указаны в Приложении Б, Таблица Б.3.

В функциональной категории «postsynaptic cell membrane» при сравнении IR4,5 vs. SH4,5, 1 ген продемонстрировал увеличение экспрессии. Спустя 24 часа в сравнении IR24 vs. SH24 суммарное количество генов, изменивших экспрессию, увеличилось: 2 гена увеличили свою экспрессию, 33 – снизили. В сравнении IS24 vs. IR24 количество генов, увеличивших экспрессию, равнялось 11, снизивших – 1 (Приложение Б, Таблица Б.4). При сравнении ДЭГ при ишемии относительно «ложной операции» через 4,5 часа (IR4,5 vs. SH4,5) и 24 часа (IR24 vs. SH24) после начала окклюзии детектировалось 3 и 2 гена соответственно, увеличивших экспрессию и ассоциированных с функциональной категорией «synapse». 58 генов проявили пониженную экспрессию в IR24 vs. SH24. В сравнении IS24 vs. IR24 было обнаружено повышение экспрессии 22 генов и снижение экспрессии 1 гена (Приложение Б, Таблица Б.5).

Так, наиболее низкий уровень экспрессии при ишемически – реперфузионном повреждении в этой функциональной категории спустя 24 часа продемонстрировал ген *Otof* ( $0,241 \pm 0,000393$ ), в тоже время при воздействии

семакса уровень его экспрессии был достоверно повышен ( $2,253 \pm 0,00205$ ). Данный ген кодирует трансмембранный белок отоферлин, с которым связаны пути обработки звука и пероксисомальный липидный обмен. Основная функция данного белка – экзоцитоз пресинаптических пузырьков с глутаматом в синаптическую щель. Аномалии высвобождения нейротрансмиттера во внутренних волосковых клетках сопровождаются нарушением активации волокон слухового нерва. Таким образом, у людей мутации в этом гене связаны с заболеваниями спектра аудиторных нейропатий [171, 205].

Известно, что высвобождение нейромедиатора осуществляется комплексным мультипротеиновым механизмом, который аккумулируется вокруг цитоплазматического матрикса. Так, при ишемии спустя 24 часа достоверное снижение экспрессии продемонстрировал ген *Pclo* ( $0,621 \pm 0,000393$ ), кодирующий белок Pisco, принадлежащий к семейству пресинаптических цитоскелетных белков, который участвует в сборке и функционировании активных пресинаптических зон и в процессе переноса везикул. У человека вариации в этом гене связаны с биполярным расстройством и большим депрессивным расстройством. При администрировании семаксом экспрессия данного гена была достоверно повышена ( $1,649 \pm 0,002$ ). Также было показано, что данный белок ингибирует нейрофармакологические эффекты, вызванные метамфетамином, посредством модуляции поглощения дофамина и регуляции транспорта синаптических везикул в нейрональных клетках [100, 204].

Среди генов, также показавших разнонаправленную экспрессию в данной функциональной категории, были гены, кодирующие синтаксины и синуклеины. *Stx1a* ген кодирует члена надсемейства синтаксинов. Синтаксины являются специфическими для нервной системы белками, участвующими в стыковке синаптических везикул с пресинаптической плазматической мембраной. Stx1 белок и SNAP-25 участвуют в образовании белкового комплекса SNARE, который участвует в высвобождении нейротрансмиттера, например, глутамата. Сообщается, что нарушение образования белкового комплекса SNARE приводит к нарушению высвобождения нейромедиатора [62, 112, 150, 209]. Ранее в

исследованиях было обнаружено, что уровень белка *Stx1a* был значительно повышен в коре головного мозга у крысы в условиях модели ишемии, что предполагает попытку головного мозга сохранить нейрональную синаптическую функцию после церебральной ишемии. В последнее время активно рассматривают использование различных белков в качестве биомаркеров ишемического инсульта. В исследовании *Cappelletti et al. 2022* показали присутствие белков *Stx1a* и *SNAP 25* в образцах крови пациентов с инсультом. А увеличение уровня *Stx1a* в крови коррелирует с тяжестью ишемического инсульта, которая оценивалась с помощью шкалы Бартела, NIHSS [37]. В нашем же исследовании экспрессия гена *Stx1a* в условиях ишемии в подкорковых структурах головного мозга спустя 24 часа (IR24 vs. SH24) была достоверно снижена ( $0,601 \pm 0,000393$ ), в то время как при действии семакса (IS24 vs. IR24) была достоверно повышена ( $1,550 \pm 0,00205$ ). Экспрессия гена *SNAP25* также была снижена в нашем исследовании в условиях ишемически – реперфузионного повреждения. Полученные данные могут заложить основу для изучения изменений синаптической пластичности после ишемического повреждения головного мозга.

Еще один ген, который широко экспрессируется в головном мозге – это альфа-синуклеин *Sncα*. Одноименный белок может служить для интеграции пресинаптической сигнализации и мембранного трафика. Альфа-синуклеин влияет на сборку SNARE – комплекса, высвобождение нейромедиатора и гомеостаз пула синаптических везикул. Считается, что интернейронный перенос патологических видов α-синуклеина играет важную роль в прогрессирующем течении патологии Леви и увеличении тяжести клинических проявлений при болезни Паркинсона и других заболеваниях, обычно называемых синуклеинопатиями. Патологические условия и механизмы, запускающие это транссинаптическое распространение, имеют важное патогенетическое значение, однако еще не полностью выяснены. Экспериментальные модели *in vivo* подтверждают вывод о том, что повышенная экспрессия интранейронного α-синуклеина может сама индуцировать распространение белка по всему мозгу, а также от мозга к периферическим тканям [165]. Поскольку этот белок играет одну

из причинных ролей в развитии и прогрессировании таких заболеваний как болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви, множественная системная атрофия, чистая вегетативная недостаточность (PAF – Pure Autonomic Failure), он считается привлекательной мишенью для разработки новых методов лечения или замены существующих методов, которые нацелены только на симптомы заболевания. Так, в настоящее время осуществляются различные стратегии иммунизации против  $\alpha$ -синуклеина [108]. В нашем исследовании уровень экспрессии  $\alpha$ -синуклеина спустя 24 часа после начала ишемии был достоверно снижен, однако при воздействии семакса повышался ( $0,508 \pm 0,000393$ ;  $1,511 \pm 0,00366$ ).

Таким образом в функциональной категории «synapse» среди генов, проявивших разнонаправленную экспрессию были гены, кодирующие белки, участвующие в пресинаптическом пространстве, а именно, в цепи событий, отражающих доставку синаптических пузырьков к месту экзоцитоза, в передачи кальций – опосредованных сигналов, в кластеризации рецепторов, а также гены ГАМКэргических рецепторов, глутаматных рецепторов, холинергических рецепторов.

Количество генов, изменивших экспрессию в функциональной категории «intermediate filament» было следующим: при сравнении IR4,5 vs. SH4,5 только 1 ген изменил свою экспрессию, увеличив ее. Однако в группах IR24 vs. SH24 и IS24 vs. IR24 количество изменивших экспрессию генов увеличилось и составляло по 7 генов в каждой группе (6 генов продемонстрировали повышенную экспрессию и 1 сниженную при ишемии и, наоборот, 1 повысил свою экспрессию и 6 снизили при воздействии семакса). Стоит отметить, что действие семакса было противоположным действию ишемии. Гены, принадлежащие к данной функциональной категории продемонстрированы в Приложении Б, Таблица Б.6.

Одним из генов, значимо увеличивших экспрессию при ишемии через 24 часа после окклюзии, является ген *Vim* ( $6,200 \pm 0,000393$ ). Этот ген кодирует белок промежуточных филаментов типа III – виментин. Промежуточные филаменты вместе с микротрубочками и актиновыми микрофиламентами составляют цитоскелет. Кодированный белок отвечает за поддержание формы клеток и

целостности цитоплазмы и стабилизацию цитоскелетных взаимодействий. Хотя виментин является цитоплазматическим белком, он также существует во внеклеточном матриксе и на поверхности клеток. Виментин может оказывать множественные физиологические эффекты при различных заболеваниях и повреждениях нервной системы. Например, исследования виментина при повреждении спинного мозга и инсульте в основном сосредоточены на образовании реактивных астроцитов. Так, в исследованиях с повреждением спинного мозга у мышей, было продемонстрировано, что отсутствие виментина и GFAP может изменить морфологические особенности реактивных астроцитов, уменьшая образование глиальных рубцов, тем самым создавая среду, благоприятствующую регенерации аксонов [143]. Кроме того, внеклеточный виментин может быть нейротрофическим фактором, который способствует удлинению аксонов путем взаимодействия с рецептором инсулинподобного фактора роста [186]. В патогенезе бактериального менингита виментин клеточной поверхности является стимулятором менингита, действующий как рецептор для множества патогенных бактерий, включая *E. coli* K1, *Listeria monocytogenes* и стрептококк группы В. Мыши, лишённые виментина, менее восприимчивы к бактериальной инфекции и демонстрируют пониженный воспалительный ответ, что позволяет предположить, что виментин необходим для индукции патогенеза менингита [44].

Другим геном, который значительно повысил свою экспрессию при ишемии спустя 24 часа был ген *Nes* ( $7,662 \pm 0,000393$ ), кодирующий белок Нестин – белок промежуточных филаментов типа VI. Нестин представляет собой белок промежуточных филаментов, экспрессируемый в делящихся клетках на ранних стадиях развития в центральной нервной системе, периферической нервной системе, миогенных и других тканях. После дифференцировки нестин подавляется и заменяется тканеспецифичными белками промежуточных филаментов. Во время нейро- и глиогенеза нестин замещается специфическими для типа клеток промежуточными филаментами, например, нейрофиламентами и глиальным фибриллярным кислым белком GFAP. Экспрессия Нестина восстанавливается у

взрослых во время патологических ситуаций, таких как образование глиального рубца после повреждения центральной нервной системы и во время регенерации поврежденной мышечной ткани. Экспрессируется в нескольких структурах, включая центральную нервную систему; мезенхиму; глаз; в верхних отделах пищеварительного тракта и почках. Нестин является одним из онкомаркеров при колоректальном раке. Также в недавних исследованиях нестин использовался в качестве прогностического маркера в глиальных опухолях головного мозга [20].

Ген *Des* ( $3,380 \pm 0,000393$ ), также продемонстрировавший повышенную регуляцию при ишемическом повреждении, кодирует мышечно – специфический промежуточный филамент III типа. Гомополимеры этого белка образуют стабильную внутрицитоплазматическую сеть, соединяющую миофибриллы друг с другом и с плазматической мембраной. Десмин в избытке экспрессируется в клетках сердца, скелета и гладких мышц. В сердце десмин присутствует в структурах проводящей системы, включая синоатриальный, атриовентрикулярный узлы и пучках Гиса и волокнах Пуркинье. Генетические вариации и потеря десмина приводят к различным состояниям, так называемым десминопатиям, которые включают связанную с десмином кардиомиопатию, предсердные и желудочковые аритмии, внезапную сердечную смерть [193].

Мутации в этом гене также связаны со скелетными и дистальными миопатиями.

Ген *Lmna* ( $2,355 \pm 0,000393$ ) также проявлял повышенную экспрессию спустя 24 часа после эндоваскулярной окклюзии СМА. Данный ген кодирует белок из числа Ламинов, которые играют роль в разборке и последующей сборке ядра при митозе (клеточном делении), в структуре хроматина. Мутации в гене *Lmna* были связаны с физиологическим старением, а также дегенеративными расстройствами, широко называемыми ламинопатиями, включая мышечную дистрофию (дистрофия Эмери – Дрейфуса, конечно – поясная миодистрофия), невропатии, липодистрофии и синдром преждевременного старения (прогерия Хатчинсона – Гилфорда) [35, 79, 80, 148].

Как видно из Таблицы Б.6 (Приложение Б), под действием семакса экспрессия генов функциональной категории «intermediate filament»: *Vim, Nes, Des, Ltna*, в отличие от эффекта или действия ишемии, была снижена.

Функциональный анализ ДЭГ показал, что ишемия активирует экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе. Известно, что в ответ на патогенное воздействие в первую очередь активируются звенья врожденного иммунитета. По нашим данным количество генов, продемонстрировавших изменение экспрессии в функциональной категории «innate immunity», было больше в сравнении с категорией «adaptive immunity», что хорошо согласуется с имеющимися представлениями о механизмах защитных реакций иммунитета. Итого, в функциональной категории «иммунитет» при ишемии спустя 4,5 часа после начала окклюзии увеличение экспрессии продемонстрировали 13 генов, экспрессия 5 генов была достоверно снижена. Спустя 24 часа количество генов, увеличивших свою экспрессию, составило 53, снизивших 7. Под администрированием семаксом: 2 гена увеличивали уровни экспрессии, 13 снижали (Приложение Б, Таблица Б.7)

Рассмотрим некоторые из генов, изменивших свою экспрессию во всех группах наблюдения. Так, наиболее значимые уровни в группах IR4,5 vs. SH4,5, IR24 vs. SH24, IS24 vs. IR24 показал ген *Lcn2* ( $(4,825 \pm 0,003)$ ;  $(65,138 \pm 0,000393)$ ;  $(0,330 \pm 0,002)$ ), который кодирует белок, принадлежащий к семейству липокалинов. Члены этого семейства транспортируют небольшие гидрофобные молекулы, такие как липиды, стероидные гормоны и ретиноиды. Белок, кодируемый этим геном, является липокалином, ассоциированным с нейтрофильной желатиназой, и играет роль во врожденном иммунитете, ограничивая рост бактерий в результате секвестрирования железосодержащих сидерофоров. Присутствие этого белка в крови и моче является ранним биомаркером острого повреждения почек [131]. Также в последнее время данный белок рассматривается как маркер ревматоидного артрита [83]. Считается, что этот белок участвует во множественных клеточных процессах, включая поддержание гомеостаза кожи и подавление инвазии и метастазирования [86]. Мыши, лишённые этого гена, более восприимчивы к бактериальной инфекции, чем мыши дикого типа.

*Lgals3* продемонстрировал следующие уровни экспрессии: в группе IR4,5 vs. SH4,5 ( $3,439 \pm 0,002$ ), в IR24 vs. SH24 ( $26,597 \pm 0,000393$ ), а в IS24 vs. IR24 ( $0,553 \pm 0,002$ ). Этот ген кодирует белок галектин – 3, который локализуется во внеклеточном матриксе, цитоплазме и ядре. Галектин -3 можно обнаружить в широком спектре тканей и клеток, включая кожу, головной мозг, кишечный тракт, печень и различные раковые клетки [27]. Кроме того, несколько исследований показали, что активированные макрофаги, моноциты, нейтрофилы и тучные клетки также экспрессируют галектин-3 [70, 96]. Будучи важным воспалительным биомаркером, галектин-3 может способствовать секреции других провоспалительных факторов, таких как фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлейкин-6 (IL-6), посредством активации макрофагов [159]. Галектин-3 также участвует в развитии эндоцитоза липидов, клеточного апоптоза, клеточной дифференцировки, клеточной адгезии и метастазировании опухоли [58, 124, 134]. В последнее время активно рассматривается роль галектина-3 как потенциального медиатора атеросклеротического процесса [71].

Ген *CD14* в группе сравнения IR24 vs. SH24 продемонстрировал значительное увеличение экспрессии ( $29,674 \pm 0,000393$ ), в группе под влиянием семакса достоверное снижение ( $0,609 \pm 0,002$ ). Белок, кодируемый геном *CD14*, является поверхностным антигеном, который преимущественно представлен в моноцитах/макрофагах. Находясь во взаимодействии с другими протеинами, *CD14* активирует компоненты врожденного иммунитета, тем самым вызывая ответ на бактериальный липополисахарид и на вирусы. Этот ген был идентифицирован как кандидат при лечении SARS-CoV-2 - инфицированных пациентов, чтобы потенциально уменьшить или ингибировать тяжелый воспалительный ответ [161]. Также белок, кодируемый этим геном, играет значимую роль в патогенезе метаболических заболеваний, атеросклероза, опухолей [219].

Таким образом, были рассмотрены интересующие нас функциональные категории белков в условиях преходящей фокальной ишемии, и «яркие» представители из ДЭГ в этих категориях, показаны основные функции их

продуктов. Полученные данные могут послужить предпосылкой для дальнейших детальных исследований механизмов ишемии и влияния на них глипролинов.

### **3.4 Анализ сигнальных путей, ассоциированных с ДЭГ, в условиях ишемически – реперфузионного повреждения и под влиянием семакса**

ДЭГ, идентифицированные в подкорковых структурах мозга в условиях модели преходящей фокальной ишемии, были аннотированы согласно Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) с использованием DAVID v6.8. Были обнаружены 22 пути, связанных с ДЭГ в условиях ишемии спустя 4.5 часа после начала окклюзии (IR4.5 vs. SH4.5), и 82 сигнальных пути, ассоциированных с генами, изменившими свою экспрессию спустя 24 часа после начала окклюзии (IR24 vs. SH24). Первые включали преимущественно сигнальные пути, участвующие в воспалительном ответе, в то время как последние включали сигнальные пути, участвующие в воспалении и нейротрансмиссии. Было идентифицировано 26 сигнальных путей, ассоциированных с ДЭГ в подкорковых структурах головного мозга в условиях ишемического повреждения в группе IR24 vs. IR4.5, которые принимают участие в воспалении, нейросигнализации, образовании и функционировании рибосом, функционировании протеаз, репликации ДНК и других процессах (Приложение В, Таблица В.8). Сравнительный анализ выявленных сигнальных путей показал, что 4 сигнальных пути, которые участвуют в воспалительном ответе (MAPK, протеогликаны при раке, дифференцировка остеокластов и сигнальный путь p53), были общими для всех групп и отражали эффекты ишемически - реперфузионного повреждения (Рисунок 11a). Кроме того, 15 других сигнальных путей были общими для IR4.5 vs. SH4.5 и IR24 vs. SH24, а 17 сигнальных путей были общими между IR24 vs. IR4.5 и IR24 vs. SH24 (Рисунок 11a). Наиболее значимые сигнальные пути, связанные с ДЭГ в исследуемых группах, показаны на Рисунке 11b, c и d. Несколько сигнальных путей, участвующих в воспалительном ответе (PI3K-Akt, TNF и другие), были связаны с ДЭГ в подкорковых структурах мозга крысы через 4,5 ч после преходящей фокальной ишемии мозга у крыс (Рисунок 11b).

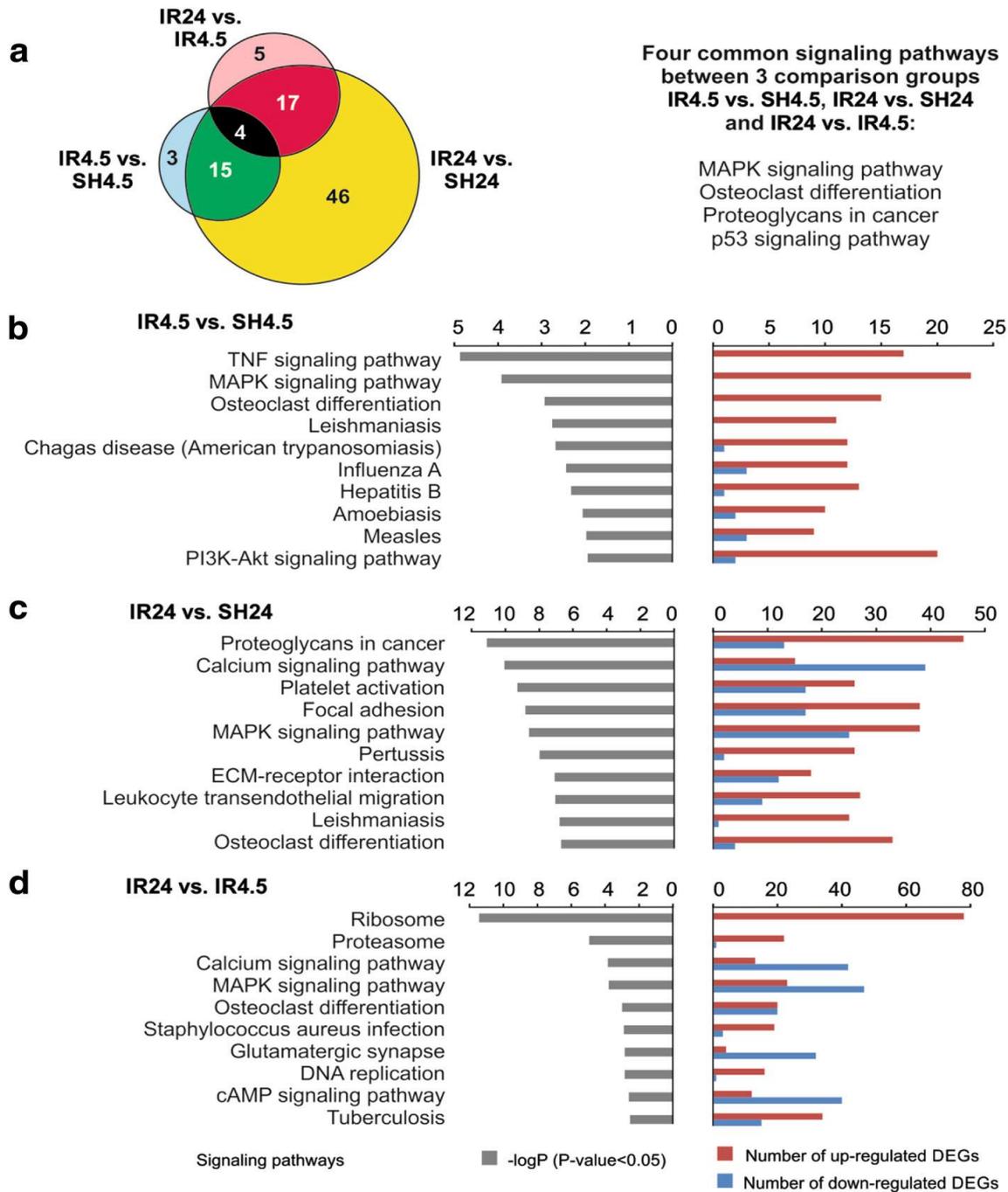


Рисунок 11 – Анализ сигнальных путей, связанных с ДЭГ через 4.5 и 24 ч после окклюзии в условиях модели переходящей фокальной ишемии.

а. С помощью диаграммы Венна продемонстрировано количество сигнальных путей для групп IR4,5 vs. SH4,5; IR24 vs. SH24; IR24 vs. IR4,5, а также общие пути для всех групп. б, с и д. демонстрируют наиболее значимые сигнальные пути ( $P_{adj} < 0,05$ ), связанные с ДЭГ в группах IR4,5 vs. SH4,5; IR24 vs. SH24; IR24 vs. IR4,5.

Активация ДЭГ, связанных с фокальной адгезией, трансэндотелиальной миграцией лейкоцитов, протеогликанов при онкологии и другими сигнальными путями, наблюдалась спустя 24 часа после начала окклюзии (Рисунок 11с). Сравнительный анализ ДЭГ, обнаруженных в двух условиях (IR24 vs. IR4.5 и IR24 vs. SH24), выявил сигнальные пути, участвующие в воспалительной реакции. В тоже время передача сигналов кальция, глутаматергический синапс, передача сигналов цАМФ и другие пути нейросигнализации были преимущественно связаны с ДЭГ, проявившими пониженную экспрессию (Рисунок 11d).

Следует отметить, что сигнальные пути «рибосома», «протеасома», «репликация ДНК» и «метаболизм пурина» были преимущественно связаны с ДЭГ, которые были повышены в подкорковых структурах головного мозга крысы группы сравнения IR24 против IR4.5 (Приложение В). Следует отметить, что никакая надежная связь между ДЭГ и каким-либо сигнальным путем не была идентифицирована в SH24 против SH4.5.

С генами, изменившими свою экспрессию под влиянием гептапептида семакса в подкорковых структурах мозга спустя 24 часа после окклюзии, были ассоциированы 25 сигнальных путей (IS24 по сравнению с IR24). В Приложении В показаны 82 сигнальных пути, связанных с ДЭГ, обнаруженными в мозге крыс в группах IR24 vs. SH24. Среди них 17 сигнальных путей перекрывались между сравнениями IS24 vs. IR24 и IR24 vs. SH24 (Рисунок 12а). Эти сигнальные пути участвуют в нейротрансмиссии, метаболизме веществ и воспалении. Имеется 8 сигнальных путей (метаболизм порфирина и хлорофилла, метаболизм лекарств - другие ферменты, фагосома, PI3K-Akt и MAPK и другие сигнальные пути), которые преимущественно связаны с генами, проявившими повышенную экспрессию в условиях ишемии спустя 24 часа (IR24 vs. SH24) и с генами, показавшими пониженную регуляцию под влиянием семакса (IS24 vs. IR24) (Рисунок 12b). И наоборот, было 8 сигнальных путей (амфетаминовая зависимость, ретроградная эндоканнабиноидная сигнализация, глутаматергические и дофаминергические синапсы и другие сигнальные пути), преимущественно связанные с ДЭГ с пониженной регуляцией у животных группы IR24 по сравнению

с SH24 и повышенными ДЭГ в сравнении IS24 vs. IR24. Таким образом, семакс инициирует нейротрансмиттерный и воспалительный ответы, тем самым противодействуя ишемически – реперфузионному повреждению через 24 часа после преходящей фокальной ишемии мозга.

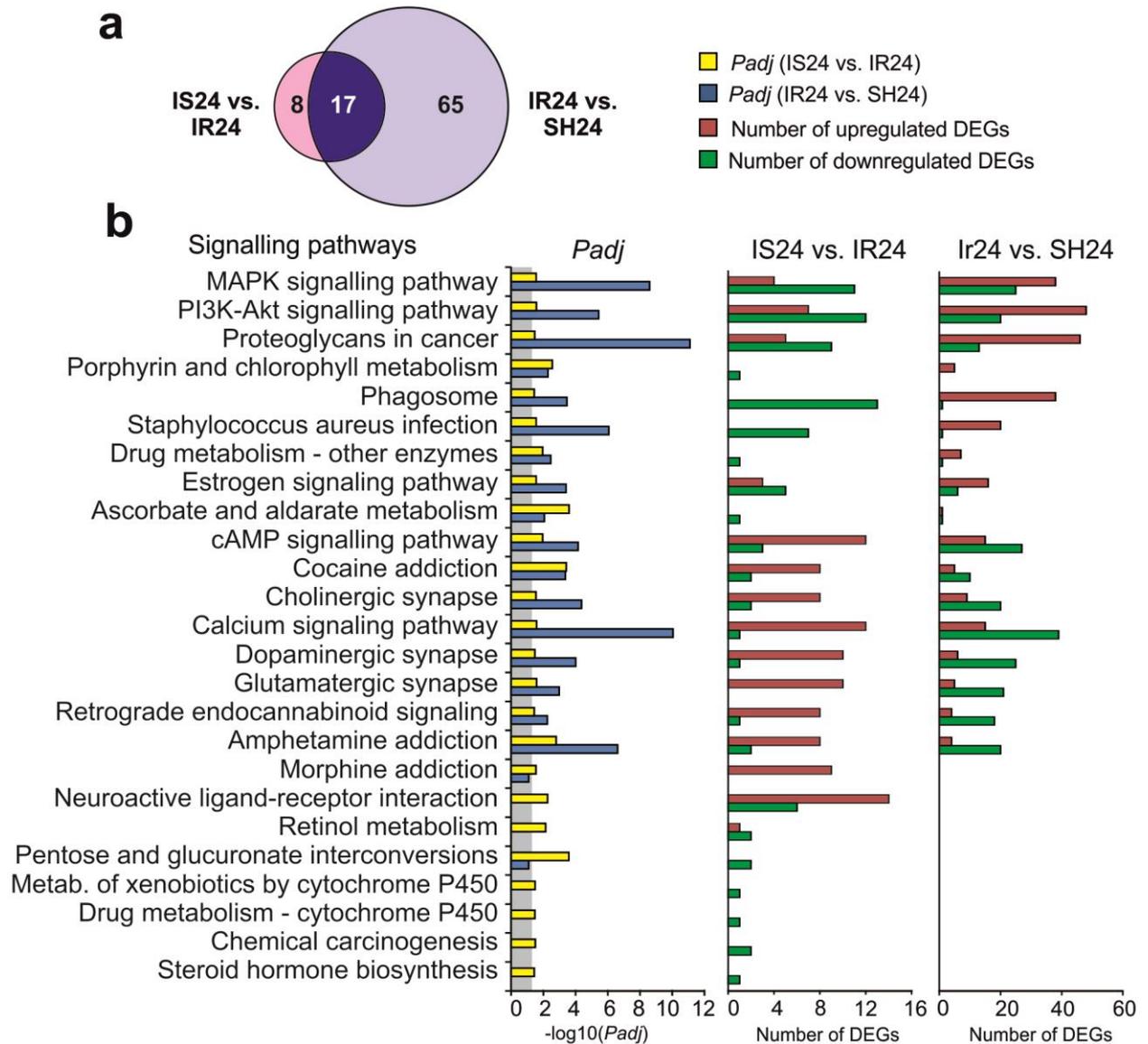


Рисунок 12 – Анализ сигнальных путей, связанных с ДЭГ, под воздействием семакса через 24 ч после окклюзии в условиях преходящей фокальной ишемии.

а. С помощью диаграммы Венна продемонстрировано количество генов и общие гены для групп IS24 vs. IR24 и IR 24 vs. SH24. б. Сигнальные пути и количество генов, показавших повышенный и пониженный уровни экспрессии в сравнениях IS24 vs. IR24, IR24 vs. SH24. Для анализа были выбраны гены и сигнальные пути, у которых  $P_{adj} < 0,05$ .  $P_{adj} \geq 0,05$  отмечены серым фоном.

### 3.5 Анализ влияния пептидов семакс, PGP, PGPL на экспрессию генов в условиях ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга с помощью ОТ-ПЦР

Учитывая полученные данные, RNA-seq на модели преходящей фокальной ишемии мозга у крыс, для оценки эффектов пептидов, содержащих в себе фрагмент PGP, была исследована экспрессия 6 генов, принадлежащих к кластеру воспаления (IC) и 6 генов - кластеру нейротрансмиссии. Так, к кластеру IC принадлежали гены: *IL1b*, *IL6*, *Ccl3*, *Socs3*, *Hspb1*, *Fos*. К кластеру NC относились следующие гены: *Cplx2*, *Neurod6*, *Gabra5*, *Chrm1*, *Gria3*, *Ptk2b*. Анализ экспрессии всех выбранных генов в условиях ишемически – реперфузионного повреждения головного мозга (IR) в сравнении с неповрежденными подкорковыми структурами в условиях ложной операции (SH) с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени продемонстрирован на Рисунке 13а. Все они были верифицированы как ДЭГ в данных группах сравнения. Все эти гены достоверно изменили свою экспрессию в подкорковых структурах головного мозга под влиянием семакса (IS) в сравнении с IR спустя 24 часа после преходящей фокальной (Рисунок 13b). Так, семакс ассоциируется с компенсаторными изменениями паттернов экспрессии мРНК в условиях ишемически-реперфузионного повреждения как для генов из кластера воспаления, так и для генов из кластера нейросигнализации (Рисунок 13b). Гистограмма иллюстрирует, что IR активирует экспрессию генов воспаления и подавляет экспрессию генов нейротрансмиссии в отличие от действия семакса спустя 24 часа после начала окклюзии (Рисунок 13 а,b). Изученные гены IC участвуют в большом диапазоне процессов контроля воспалительной реакции. Так, например, при ишемически-реперфузионном достоверно была повышена экспрессия гена раннего реагирования *Fos*, который, в свою очередь, вызывает экспрессию широкого спектра генов, приводящих к активации биохимических каскадов, участвующих в процессах контроля клеточного постоянства, процессах дифференцировки, пролиферации. Также была увеличена экспрессия гена *Hspb1*, кодирующего белок теплового шока *Hspb1*, участвующего в воспалительном

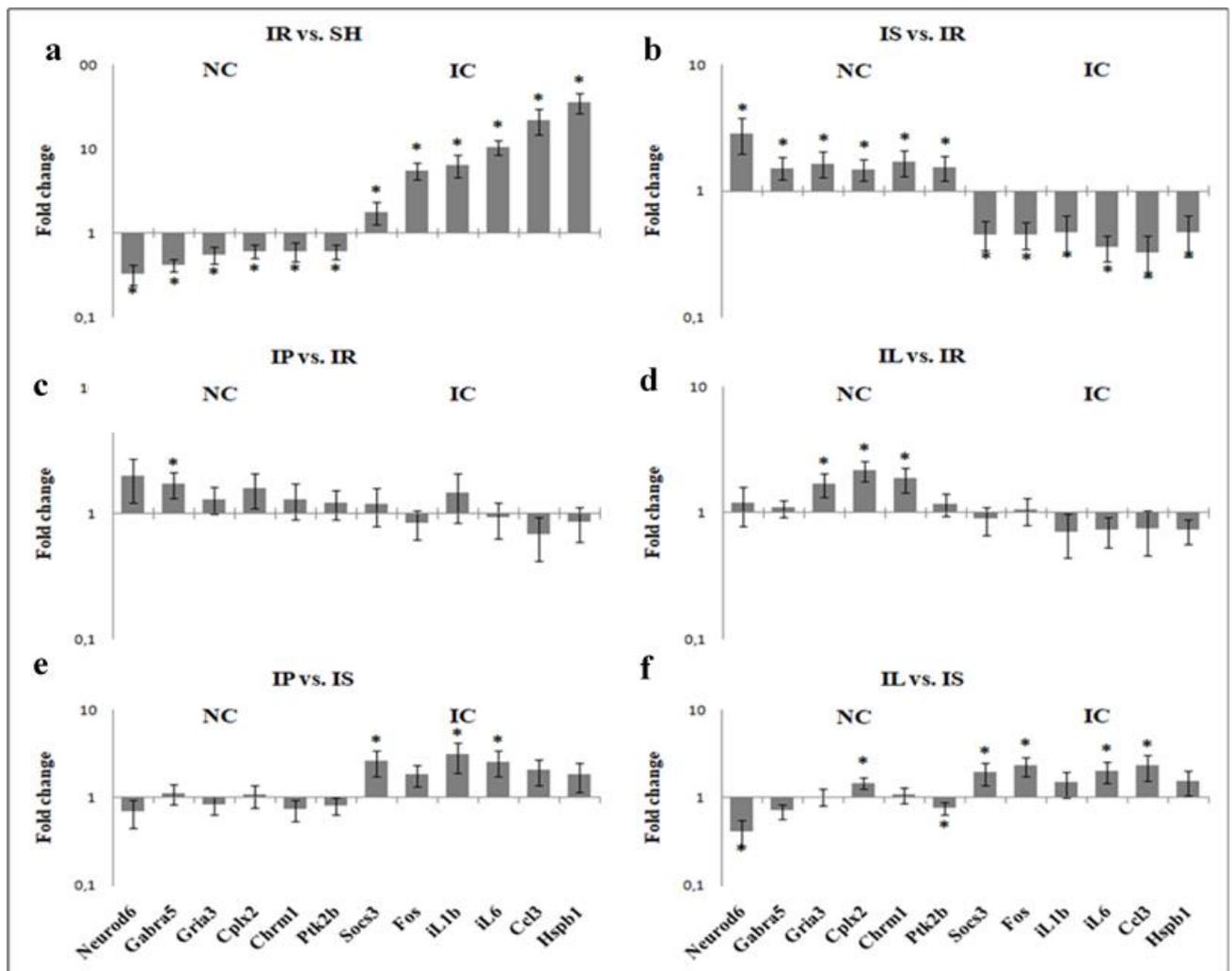
ответе и коррелирующего неблагоприятный исход клеток при повреждающем воздействии. В то же время при действии семакса были достоверно повышены уровни экспрессии генов *Neurod6*, *Cplx2*, *Gabra5*, которые кодируют белки, ответственные за энергетические процессы в головном мозге, выживание клеток, нейротрансмиссию, толерантность к повреждающим воздействиям, а также за развитие и дифференцировку клеток центральной нервной системы и нейросигнализацию.

Используя ОТ-ПЦР в реальном времени, были изучены уровни экспрессии генов из кластеров воспаления и нейротрансмиссии под влиянием PGP и PGPL в подкорковых структурах головного мозга спустя 24 часа после преходящей фокальной ишемии. Рисунок 13с демонстрирует результаты дифференциальной экспрессии, связанные с действием PGP в сравнении с ишемически-реперфузионным повреждением (IP vs. IR). Было показано, что введение PGP не обеспечило значительных изменений экспрессии генов IC. В то время как был только один ДЭГ из NC, а именно *Gabra5*, экспрессия которого была увеличена в сравнении IP vs. IR ( $1.72$ ,  $p = 0.004$ ) (Рисунок 13с). Дифференциальная экспрессия генов IC и NC, связанных с действием PGPL в условиях IR продемонстрирована на Рисунке 13d. Под действием PGPL 3 гена NC изменили уровни экспрессии в IL vs. IR. Так, повышенная регуляция была выявлена при действии PGPL через 24 часа после преходящей фокальной ишемии у следующих генов: *Cplx2* ( $2.17$ ,  $p \leq 0,001$ ), *Chrm1* ( $1,85$ ,  $p=0,011$ ) и *Gria3* ( $1,70$ ,  $p=0,017$ ) (Рисунок 13d).

Так же был проведен поиск ДЭГ, связанных с действиями PGP и PGPL в сравнении с воздействием семакса в условиях преходящей фокальной ишемии мозга у крыс. Гистограммы на Рисунках 13е и 13f иллюстрируют данные экспрессии для каждого исследованного гена в группах сравнения IP vs. IS и IL vs. IS, соответственно. Было показано, что введение PGP не приводит к статистически значимым изменениям в экспрессии генов NC относительно уровня экспрессии этих генов у крыс после введения семакса (Рисунок 13е). Однако, экспрессия трех генов из IC была статистически значимо изменена в группе IP в сопоставлении с

IS. Так, повышенная регуляция наблюдалась у генов *Socs3* (2,58,  $p=0,040$ ), *IL1b* (3,089,  $p=0,027$ ) и *IL6* (2,55,  $p=0,034$ ) (Рисунок 13е).

PGPL оказал влияние на 4 ДЭГ (*IL6*, *Ccl3*, *Socs3*, *Fos*) из IC и на 3 ДЭГ (*Cplx2*, *Neurod6*, *Ptk2b*) из NC в сравнении с влиянием семакса (Рисунок 13f). Итак, 2 гена из кластера нейротрансмиттеров имели пониженную регуляцию: *Neurod6* (0,41,  $p=0,010$ ) и *Ptk2b* (0,76,  $p=0,038$ ), тогда как повышенную имел *Cplx2* (1,46,  $p=0,021$ ). Одновременно, повышенные уровни экспрессии генов IC были выявлены в ILв сравнении с IS через 24 часа после начала окклюзии. *Socs3* (1,932,  $p=0,018$ ), *Fos* (2,32,  $p=0,005$ ), *iL6* (2,01,  $p=0,013$ ) и *Ccl3* (2,30,  $p=0,018$ ) (Рисунок 13f).



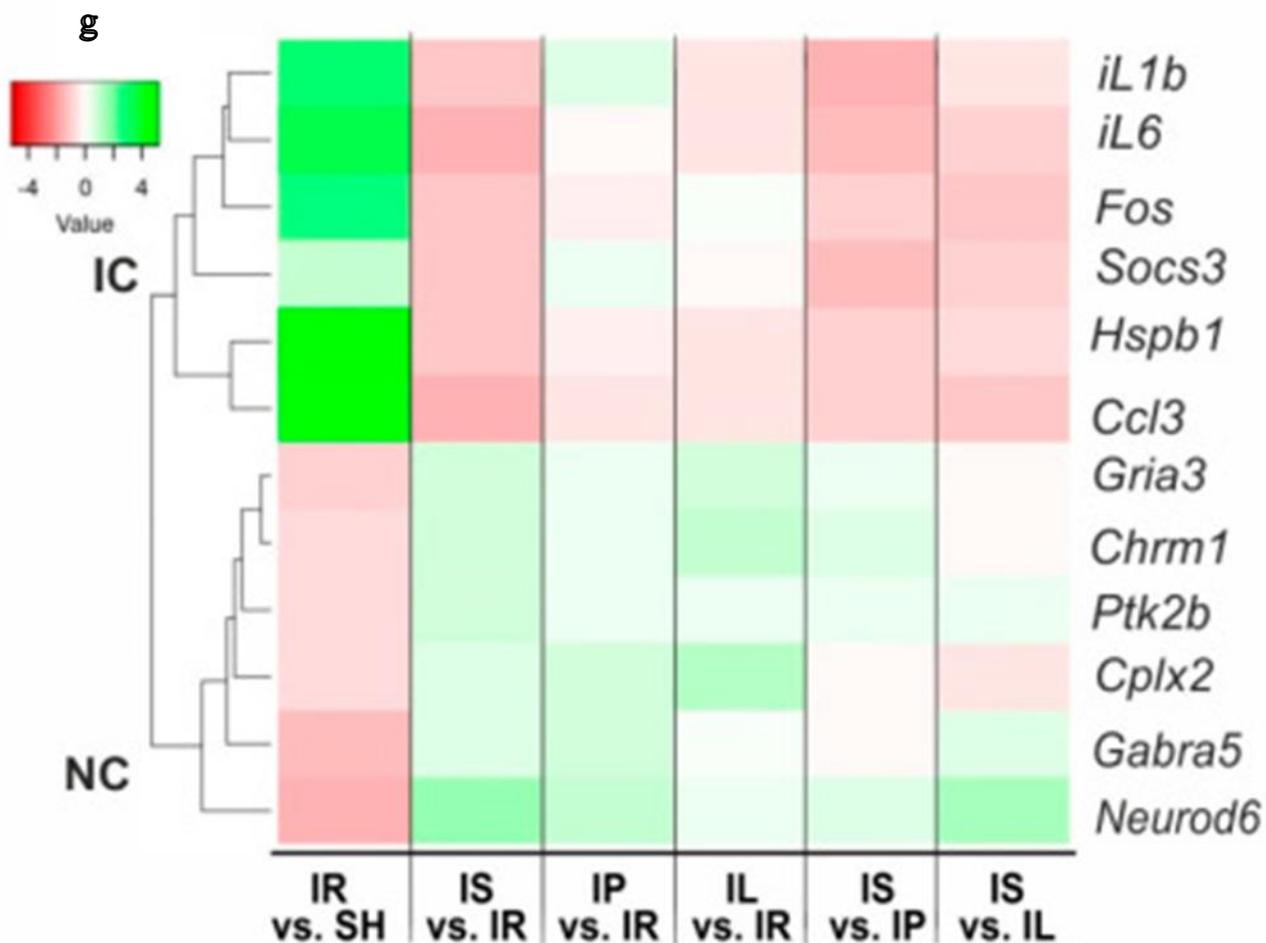


Рисунок 13 – Анализ ДЭГ и различия эффектов пептидных препаратов в условиях ишемически-реперфузионного повреждения спустя 24 часа после начала окклюзии (a - f). Анализ уровней экспрессии генов с помощью ОТ-ПЦР в воспалительном (IC) и нейротрансмиттерном кластерах (NC) в группах a) IR vs. SH, b) IS vs. IR, c) IP vs. IR, d) IL vs. IR, e) IP vs. IS, f) IL vs. IS. На гистограммах показаны средние значения + стандартная ошибка, \* - статистически значимые различия с  $p < 0,05$ . g) Иерархический кластерный анализ профилей экспрессии генов, полученных при различных попарных сравнениях. Каждый столбец представляет группу сравнения, а каждая строка представляет ДЭГ. Зеленые полосы представляют высокую относительную экспрессию, а красные полосы представляют низкую относительную экспрессию.

Используя ОТ-ПЦР в реальном времени, мы подтвердили изменения в экспрессии 12 выбранных генов в условиях ишемии и введения семакса в

подкорковых структурах исследованных крыс через 24 часа после преходящей фокальной ишемии. Кроме того, иерархическая кластеризация данных экспрессии генов обеспечила два кластера генов: гены, участвующие в воспалении (IC) и в процессах нейротрансмиссии (NC) соответственно. Стоит отметить, что гены NC были подавлены в условиях преходящей фокальной ишемии, тогда как после введения семакса они имели повышенную регуляцию. Наоборот, IC гены были активированы в условиях преходящей ишемии, тогда как они имели пониженную экспрессию после администрирования семаксом. Следует отметить, что изученные гены NC были связаны с процессами межклеточной трансдукции сигнала, эксайтотоксического повреждения и нейропротекции нервных клеток в условиях ишемически – реперфузионного повреждения, а белки, кодируемые генами IC, участвуют в большом диапазоне процессов контроля воспалительной реакции. В рамках нашей работы было изучено влияние действие PGP – содержащих пептидов (PGP и PGPL) в подкорковых структурах мозга крыс через 24 часа после начала окклюзии СМА.

В результате, как PGP, так и PGPL проявляли эффекты без изменений экспрессии генов при ишемически-реперфузионном повреждении (IR). Это подчеркивает важность структуры АКТГ (4-7) для проявления эффекта семакса. Введение пептидов PGP и PGPL не оказывало статистически значимого влияния на уровень экспрессии генов кластера воспаления (IC). Было показано, что PGP структурно воспроизводит ключевую единицу хемокина *Cxcl12*, который отвечает за активацию нейтрофилов. Кроме того, PGP способен связываться с хемокиновым CXCR2 рецептором и частично повторять функцию хемоаттрактанта для нейтрофилов [32]. Среди генов, участвующих в процессах нейросигнализации (NC кластер) один ген *Gabra5*, кодирующий  $\alpha 5$  субъединицу рецептора  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) продемонстрировал повышение экспрессии на фоне введения PGP спустя 24 часа в условиях преходящей фокальной ишемии. Регуляция активности ГАМК - рецептора важна при формировании защитной реакции в ответ на процессы эксайтотоксичности и активации микроглии при ишемии. Кроме того, три гена (*Cplx2*, *Chrm1* и *Gria3*) повышали уровень своей

экспрессии при введении PGPL спустя 24 часа после начала окклюзии СМА. Эти гены также принадлежат к NC, и белки, кодируемые этими генами, участвуют в регуляции процессов нейротрансмиссии. Ранее уже было отмечено, что в условиях церебральной ишемии происходит угнетение нейротрансмиттерной системы. Полученные нами данные не исключают роль PGPL в коррекции нейротрансмиссионной активности, нарушенной вследствие ишемически-реперфузионного повреждения.

### **3.6 Морфология тканей мозга крыс в условиях модели переходящей фокальной ишемии**

У крыс группы IR в условиях обратимой эндovasкулярной окклюзии правой СМА ишемические повреждения тканей мозга в виде отека и очагов «просветления» определяли в латеральных участках базальных ядер правого полушария в диапазоне от +1,7 до -3,3 от брегмы. Одно из составляющих базальных ядер полушарий головного мозга – полосатое тело (*corpus striatum*), образованное комплексом хвостатое тело–скорлупа (*nucleus caudatus–putaimen*) и бледным шаром (*globus pallidus*). У грызунов стриатум не дифференцирован на хвостатое ядро и скорлупу и представлен единым образованием, которое называют каудопутамен. Типичная картина формирования фокальной ишемии в стриатуме показана на Рисунке 14. Зоны инфаркта имели вытянутую форму в дорсовентральном направлении и захватывали большую часть латеральной области каудопутамена (Рисунок 14 а, б) с отчетливой визуализацией пенумбры – пограничной зоны между ядром инфаркта и нормальной тканью мозга (Рисунок 14 в), и очагов формирования ядра инфаркта с необратимым повреждением нервной ткани, наличием участков некроза с деструкцией элементов нейропиля и погибшими пикноморфными нейронами (Рисунок 14 г). При этом зоны инфаркта охватывали значительную часть базальных ядер до мозолистого тела и наружной капсулы. Менее выраженные патоморфологические изменения наблюдались в пенумбре (Рисунок 14 в). Необходимо отметить, что пенумбра, или “ишемическая полутьма” – это перифокальная область гипоксически поврежденных, но

сохраняющих жизнеспособность клеток, окружающая очаг первичного необратимого ишемического повреждения. Область полутени может оставаться жизнеспособной в течение некоторого времени после ишемического события и сохраняет возможность обратимых поражений мозга. Согласно патоморфологическим критериям, часть нейронов в перифокальной области инфаркта находилась в состоянии гипоксического повреждения (снижение базофилии хроматина в ядрах, отек и гомогенизация цитоплазмы) и гибели (пикноз и деструкция ядер, лизис цитоплазмы). В пенумбре располагались также нейроны без выраженных патологических изменений (Рисунок 14в). В медиальной области каудопутамена вне зон визуализируемой фокальной ишемии грубых патологических изменений в перикарионе большинства нейронов не выявлено.

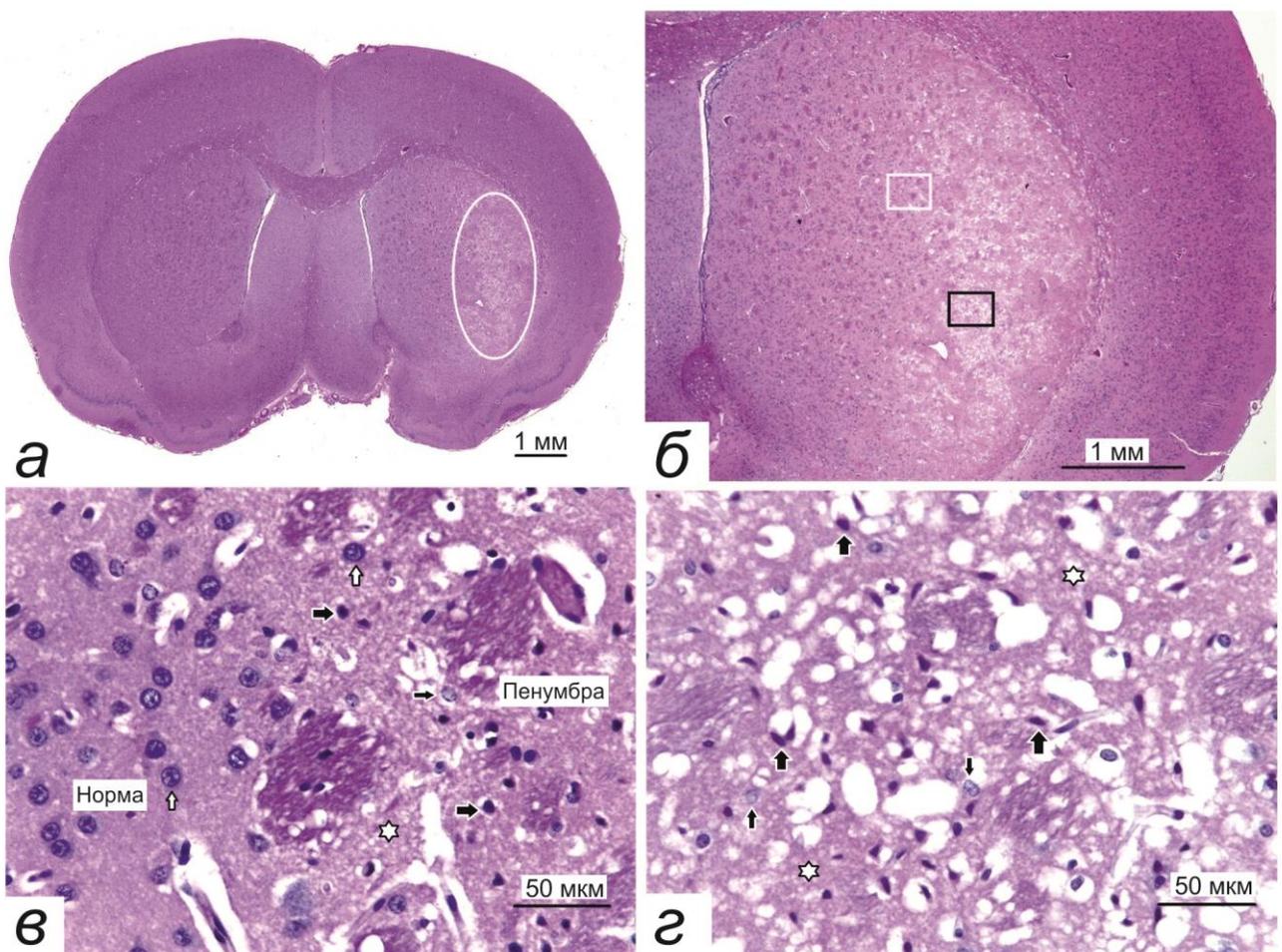


Рисунок 14 – микрофотографии коронарных срезов головного мозга крысы, окрашенных гематоксилином и эозином, через 24 ч после обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии

а – Коронарный срез головного мозга на уровне +0.5 мм от брегмы; овалом отмечена зона ишемического повреждения стриатума правого полушария. б – Фокальная ишемия латеральной области стриатума; фрагмент части а при большем увеличении. в – Фрагмент части б, отмеченный белым прямоугольником; зона перехода нормальной ткани в перифокальную область инфаркта; белые стрелки – интактные нейроны, тонкие черные стрелки – снижение базофилии хроматина в ядрах нейронов, толстые черные стрелки – пикноз ядер и перичеселлюлярный отек ишемически поврежденных нейронов, белые звездочки – отек и вакуолизация нейропиля. г – Фрагмент части б, отмеченный черным прямоугольником; локус формирования ядра инфаркта; тонкие черные стрелки – снижение базофилии хроматина в ядрах нейронов, толстые черные стрелки – пикноморфные нейроны, белые звездочки – отек и деструкция нейропиля.

### **3.7 Оценка результатов магнитно-резонансной томографии**

Инфаркты головного мозга, полученные в результате моделирования преходящей фокальной ишемии, можно разделить на два вида по локализации очага поражения: подкорковый и полушарный (Рисунок 15).

У всех животных с ишемическим повреждением была подтверждена реперфузия с помощью МР – ангиографии (3D-TOF MRA), а также подтверждено отсутствие ятрогенных кровоизлияний. Немаловажным для интерпретации результатов является тот факт, что очаг ишемии в условиях нашего эксперимента (4,5 и 24 часа) находился в стадии формирования.

Количественная оценка объема очага ишемии ( $\text{мм}^3$ ) проводилась по картам измеряемого коэффициента диффузии (ADC/ИКД) в рамках диффузионно – взвешенных изображений (DWI/ДВИ) и T2 ВИ с помощью программного пакета ImageJ. Результаты данной части экспериментальной работы обрабатывались в статистическом пакете IBM SPSS Statistics 26.0.

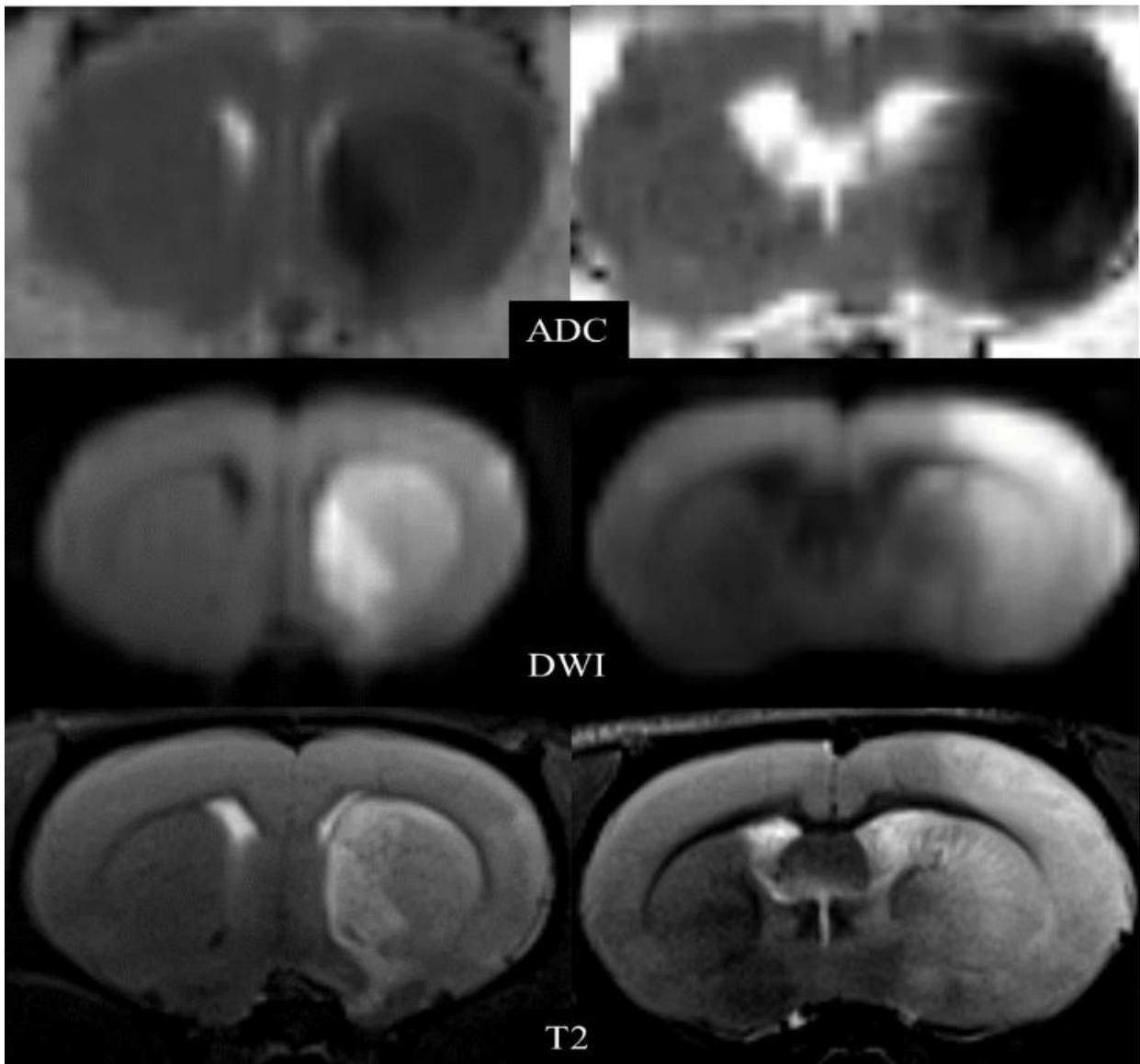


Рисунок 15 – Очаги ишемического повреждения головного мозга по данным МРТ (DWI с построением карт ADC, T2 ВИ) у крыс в условиях модели переходящей фокальной ишемии, слева – подкорковая локализация очага, справа – полушарная.

При многофакторном дисперсионном анализе было выявлено, что на показатель объема очага значимо влиял фактор времени: от 4,5 после начала окклюзии к 24 часам объем очага увеличивался ( $p=0,001$ ). Также по данным оценки всех животных с ишемией 24 часа взаимодействие фактора времени и вида инфаркта оказывало влияние на размер очага. Было показано, что у крыс с полушарным видом инфаркта объем очага по результатам DWI увеличивался от 4,5 к 24 часам, чего не наблюдалось у крыс с подкорковой локализацией поражения

( $p < 0,05$ ), что продемонстрировано на Рисунке 16. Из этого можно заключить, что подкорковый очаг ишемии имеет тенденцию формироваться до суток.

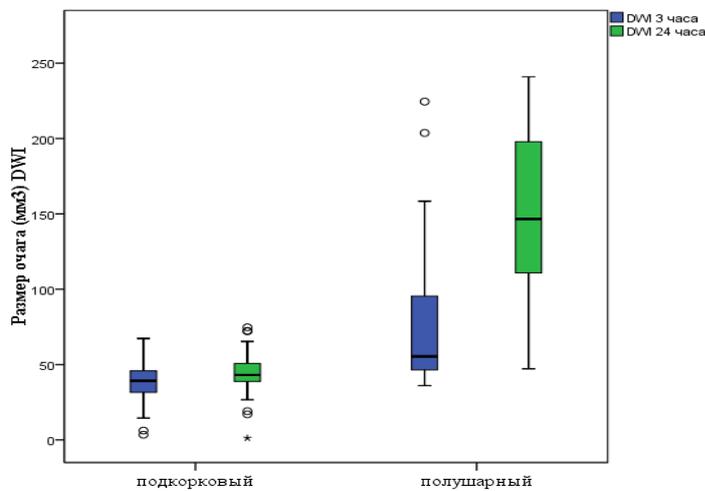


Рисунок 16 – Графическое отражение взаимодействия фактора времени и вида инфаркта на объем очага по DWI. Медиана с межквартильным размахом (минимум и максимум) очага повреждения по данным ADC во временных точках 4,5 и 24 часа в группах с подкорковым и полушарным инфарктом мозга.

Влияние применяемых пептидов на объем ишемии во всех исследуемых группах было статистически незначимо ( $p > 0,05$ ), также они не оказывали влияния на временную динамику с учетом вида инфаркта (Рисунок 17).

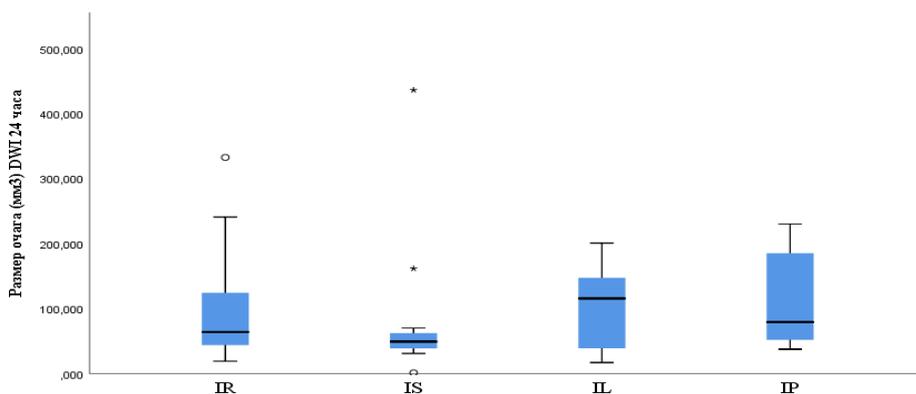


Рисунок 17 – Влияние пептидных препаратов на объем ишемического очага по данным DWI во временной точке 24 часа. Медиана с межквартильным размахом (минимум и максимум) очага повреждения в группах животных IR, IS, IL и IP.

### **3.8 Анализ влияния семакса на выживаемость, размер очага ишемического повреждения, неврологический дефицит в условиях преходящей фокальной ишемии мозга у крыс**

В настоящий момент одним из методов, наиболее часто используемых в научных исследованиях для анализа выживаемости, является метод Каплана – Майера, который служит для описания цензурированных наблюдений. С помощью данного метода можно оценить долю животных, у которых не наступил летальный исход и оценить вероятность отсутствия летального исхода к определенному моменту времени от начала наблюдения. Эта вероятность называется выживаемостью, а функция зависимости выживаемости от времени – функцией выживаемости. Кривые выживаемости являются графическим отражением данного метода. Была оценена выживаемость животных в группах «ишемия» (IR) и «ишемия+семакс» (IS). Величина снижения горизонтальных ступеней отражает кумулятивную долю животных, у которых к конкретному дню летальный исход не наступил. В то время сама ступень представляет собой тот момент времени, в который произошла смерть животного. Разницы между группами выявлено не было (Рисунок 18 а).

Для оценки различий в размерах очагов ишемического повреждения и оценки динамики неврологического статуса между группами IS и IR в различные временные интервалы наблюдения, была применена общая линейная модель с повторными измерениями. При анализе динамики изменения нормированного (к первым суткам) объема очага инфаркта по данным МРТ головного мозга статистически значимых различий между группами IR и IS выявлено не было,  $p > 0,05$  (Рисунок 18 б).

При анализе динамики изменения нормированного (к первым суткам) неврологического дефицита, оцененного с помощью шкалы mNSS, были показаны статистически значимые различия в группах IS и IR к 14 дню наблюдений (Рисунок 18 с),  $p < 0,05$ . Суммарный балл по шкале mNSS в группе IS был ниже, что

позволяет предполагать видимый нейропротективный эффект в позднее время от начала лечения.

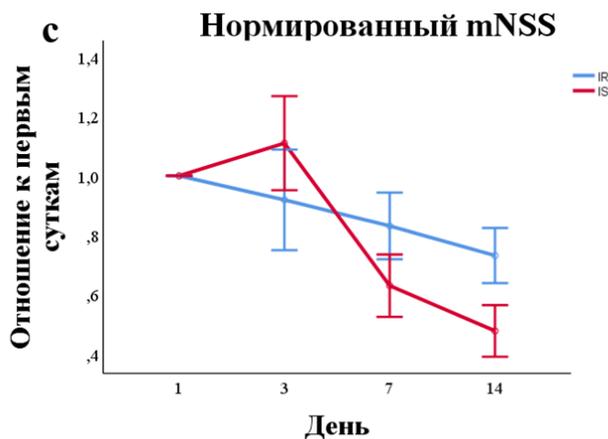
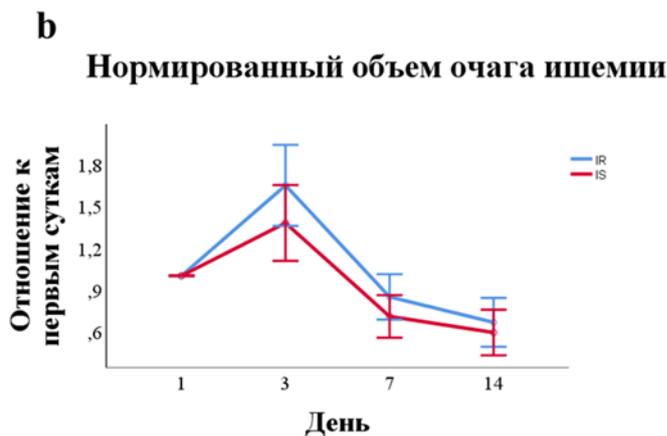
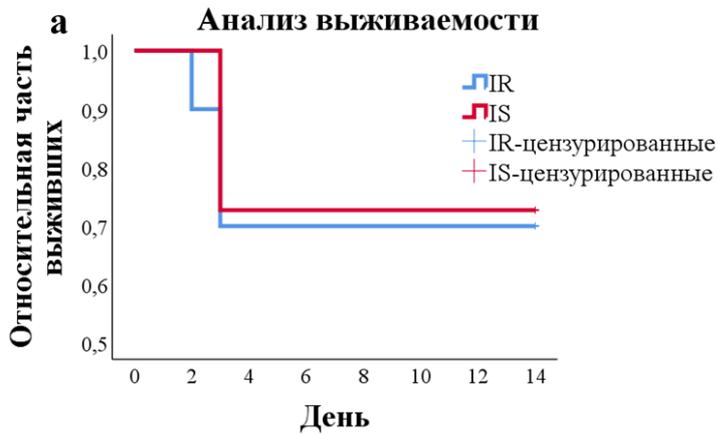


Рисунок 18 – Влияние семакса в условиях преходящей фокальной ишемии мозга при длительном наблюдении за животными (14 суток) а. Кривые выживаемости Каплана – Майера для групп IS и IR. б. Графическая демонстрация динамики размеров очагов ишемического повреждения по данным МРТ в группах IR и IS в

различные временные интервалы наблюдения (1, 3, 7 и 14 сутки). Представлены средние значения размеров очагов и 95% доверительные границы для среднего. с. Графическая демонстрация динамики баллов по mNSS в группах IR и IS в различные временные интервалы (1, 3, 7, 14 дни). Представлены средние значения размеров очагов и 95% доверительные границы для среднего.

Таким образом, при лечении и наблюдении животных в течение 14 суток в условиях преходящей фокальной ишемии мозга не было выявлено положительного влияния семакса на выживаемость, на размер очага инфаркта по данным МРТ. Однако было показано положительное влияние на динамику в неврологическом статусе у животных к 14 суткам наблюдения.

### **3.9 Предполагаемый механизм множественного действия пептидов в мозге**

Анализ транскриптома является ключевым подходом к изучению механизмов действия лекарственных веществ, в том числе пептидов. Это заключение основано на том, что при взаимодействии пептидов с рецепторами на клеточной мембране посредством активации различных сигнальных путей в ядре клетки происходит активация транскрипционных факторов и последующая инициация транскрипционного ответа клетки, связанного с эффектом пептида. В течение последних лет активно изучаются механизмы функционирования пептидов [5, 6, 115, 207, 208]. В исследованиях было показано влияние одного и того же пептида на работу сразу нескольких рецепторных групп, относящихся к различным системам клеточной сигнализации [5, 6]. На основании полученных данных было сделано предположение, что механизм действия регуляторного пептида может не ограничиваться связыванием с ортостерическими сайтами определенных рецепторов. Экспериментальные данные позволили выдвинуть предположение о том, что регуляторные пептиды могут связываться с альтернативными сайтами различных рецепторов, выступая в качестве аллостерического модулятора, тем самым изменяя ортостерический сайт и, как следствие, эффект связывания агониста. Это обуславливает большое разнообразие фармакологических эффектов

при воздействии пептидов. Схематически предполагаемый механизм пептидной регуляции представлен на Рисунке 19.

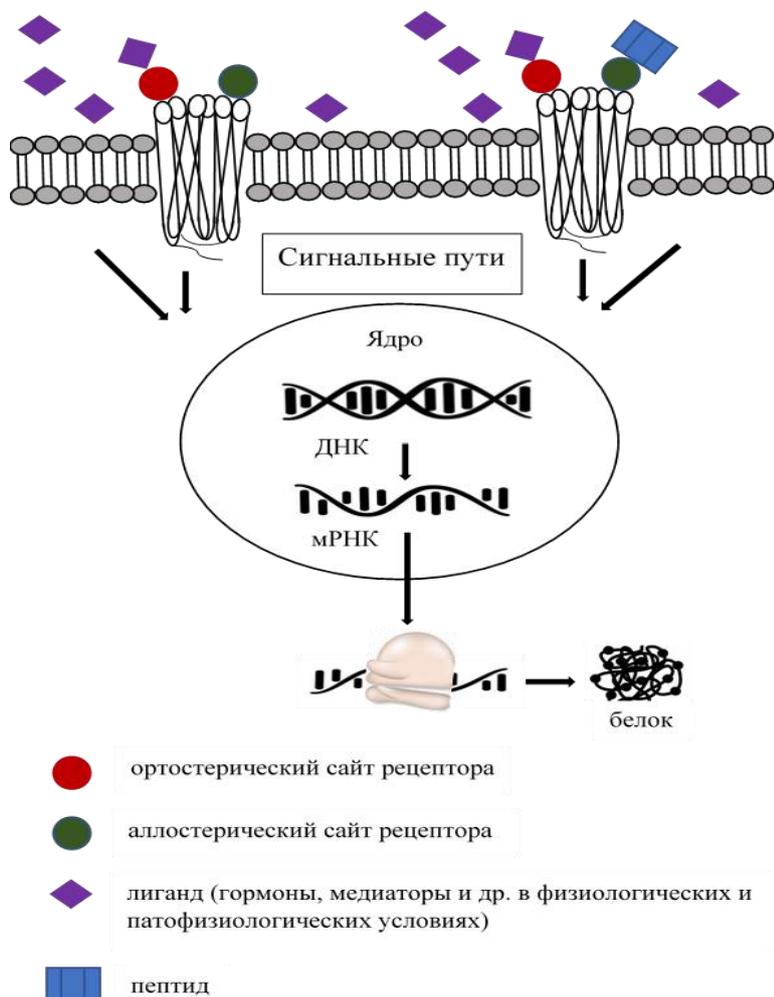


Рисунок 19 – Схема предполагаемого механизма пептидной регуляции.

Для объяснения множественных эффектов пептидов была предложена гипотеза, согласно которой в основе их действия лежит синактонный механизм [208]. Синактон – это совокупность основных продуктов метаболизма пептида (функциональное ядро), которые могут самостоятельно связываться с аллостерическими сайтами рецепторов и вместе с исходным соединением составлять комплекс биорегуляторов, работающих в определенной последовательности. Тем самым расширяя регуляторный потенциал исходной молекулы. Так, функциональное ядро семакса представлено пептидами PGP и HFPGP [208].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе для исследования механизмов ишемического повреждения и действия пептидов была использована экспериментальная модель ишемического инсульта, которая была инициирована эндоваскулярной окклюзией правой средней мозговой артерии филаментом в течение 90 минут с последующей реперфузией. Эта модель наилучшим образом отражает события, происходящие при ишемическом инсульте. Хорошо известно, что церебральная ишемия вызывает каскад биохимических и транскриптомных изменений в тканях мозга [98, 210]. Многочисленные исследования показали, что гены раннего ответа (*c – fos*, *c – jun*, гены «цинковых пальцев») запускают экспрессию широкого спектра генов, в том числе участвующих в пролиферации и в дифференцировке, в то время как гены, кодирующие белки теплового шока, участвуют в ответе на стресс, нейропротективном ответе и организации цитоскелета [18, 94, 199]. Показано, что реперфузия после ишемии вызывает дополнительное повреждение клеток мозга, включая разрушение эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла, нарушение гематоэнцефалического барьера, накопление избыточных кислородных радикалов и активацию апоптоза [127, 153, 168, 172, 215].

Ишемическое повреждение головного мозга, вызванное окклюзией артерий в сочетании с реперфузией, приводит к многочисленным нарушениям регуляции мРНК, участвующих в церебральной ишемической реакции [52, 65, 210]. Как упоминалось выше, в исследовании *Wang et al.* в условиях модели эндоваскулярной окклюзии СМА с помощью филамента во временной точке 24 часа изучали молекулярный механизм ишемически-реперфузионного повреждения в гиппокампе с помощью метода RNA-seq. Они обнаружили, что большинство генов связаны с воспалением, стрессом, иммунным ответом, метаболизмом глюкозы, апоптозом [210].

Продемонстрированный в данной работе анализ экспрессии генов с помощью RNA-seq подтвердил эти результаты. В то же время в нашем исследовании было обнаружено большее количество генов, а также

функциональных категорий и сигнальных путей, ассоциированных с перечисленными выше процессами, во временной точке 24 часа. Вероятно, это связано с тем, что в нашем исследовании изучалась область мозга крысы, которая была намного больше и включала не только гиппокамп, но и другие подкорковые структуры. В частности, было обнаружено массивное подавление экспрессии генов, обеспечивающих функционирование нейромедиаторных систем.

На сегодня транскриптомный анализ является основным подходом, позволяющим оценить транскрипционную активность генома клеток мозга при ишемии и под действием лекарственных средств. В настоящее время в клинической практике при лечении инсульта используется гептапептид семакс. С использованием метода RNA-seq, было оценено влияние семакса на уровень мРНК генов, функционирующих в подкорковых структурах мозга крысы через 4,5 и 24 часа после преходящей фокальной ишемии мозга. С помощью RNA-seq в подкорковых структурах мозга крыс были выявлены статистически значимые изменения экспрессии генов от воздействия семакса при ишемии только через 24 часа после окклюзии, что может указывать на отсутствие очевидного нейропротективного эффекта пептида в первые часы после ишемически – реперфузионного повреждения в условиях эксперимента. Также было показано, что спустя 24 часа после окклюзии СМА действие пептида на несколько сотен генов было противоположным действию ишемически-реперфузионного повреждения. Тем самым семакс может нормализовать экспрессию многих генов, нарушенных во время ишемии, а именно, пептид семакс подавляет экспрессию генов, связанных с воспалительными процессами, и активирует экспрессию генов, связанных с нейротрансмиссией.

С помощью ПЦР в реальном времени были подтверждены результаты полногеномного секвенирования РНК в условиях ишемически-реперфузионного повреждения, а также было подтверждено положительное влияние семакса на экспрессию генов, отвечающих за выживаемость клеток в условиях ишемии, участвующих в функционировании воспалительных и нейротрансмиттерных систем.

В условиях длительного наблюдения и лечения животных в течение 14 дней был продемонстрирован эффект семакса на динамику неврологического статуса: к 14 дню неврологический дефицит был менее выражен при применении пептида в сравнении с ишемизированными животными, что хорошо соотносится с имеющимися литературными данными.

В рамках данной работы было изучено также влияние PGP – содержащих пептидов (PGP и PGPL) в подкорковых структурах мозга крыс через 24 часа после обратимой окклюзии СМА. Введение пептидов PGP и PGPL не оказывало статистического влияния на уровень экспрессии генов, участвующих в воспалительном ответе, однако достоверно изменяло экспрессию некоторых генов, принимающих участие в передаче сигналов в ЦНС. Тем самым была подчеркнута важность структуры АКТГ (4-7) для проявления эффекта семакса. Полученные данные не исключают роль перспективных PGP – содержащих пептидов в коррекции нейротрансмиттерной активности, угнетенной вследствие ишемически-реперфузионного повреждения.

При оценке объема инфаркта мозга методом магнитно-резонансной томографии не было выявлено статистически достоверных эффектов на размер очага при введении нейропептидов в различные временные рамки от начала окклюзии.

Полученные данные о транскрипции генов и отличиях в их экспрессии в ходе экспериментальной модели преходящей фокальной ишемии позволили расширить представления о механизмах ишемически-реперфузионного повреждения, что является очень значимым для дальнейших исследований в поиске новых подходов в терапии ишемического инсульта. Обнаруженные в ходе исследования данные о подавлении семаксом экспрессии генов, связанных с воспалительными процессами, и активации экспрессии генов, связанных с нейротрансмиссией, могут объяснять один из механизмов нейропротективного эффекта. Перспективным является дальнейшее исследование семакса, PGP, PGPL на другие кластеры генов для поиска новых механизмов их действия и фармакологических эффектов в условиях экспериментальных моделей ишемии.

## ВЫВОДЫ

1. Преходящая фокальная ишемия мозга крыс, вызванная эндоваскулярной окклюзией средней мозговой артерии, по данным полногеномного секвенирования РНК (RNA-seq), в подкорковых структурах мозга крыс со стороны повреждения вызывает достоверное изменение экспрессии большого числа генов: 469 генов спустя 4,5 часа и 1939 генов спустя 24 часа после начала окклюзии.

2. Ишемически-реперфузионное повреждение мозга крыс в условиях модели эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии активирует экспрессию генов, участвующих в воспалительной, иммунной, стрессовой реакциях, в клеточной адгезии, при апоптозе, в регуляции транскрипции и подавляет экспрессию генов, участвующих в функционировании нейротрансмиттерных систем.

3. Семакс спустя 4,5 часа после начала окклюзии в условиях модели преходящей фокальной ишемии мозга крыс не вызывает достоверного изменения экспрессии генов в подкорковых структурах головного мозга по данным RNA-seq.

4. Семакс спустя 24 часа после начала окклюзии в условиях преходящей фокальной ишемии мозга крыс в подкорковых структурах головного мозга со стороны повреждения, по данным RNA-seq, снижает экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе и воспалении, но увеличивает экспрессию генов, участвующих в нейротрансмиссии.

5. Глипролины PGP и PGPL в условиях модели преходящей фокальной ишемии мозга крыс не влияют на экспрессию генов, участвующих в воспалительной реакции, но активируют экспрессию ряда генов (*Gabra5*, *Gria3*, *Cplx2*, *Chrm1*), продукты которых участвуют в нейротрансмиссии.

6. Пептиды семакс, PGP, PGPL при внутрибрюшинном введении не оказывают влияния на размер ишемического повреждения головного мозга по данным магнитно-резонансной томографии в условиях модели преходящей фокальной ишемии мозга крыс.

7. Семакс оказывает положительное влияние на динамику неврологического статуса, оцененного по шкале mNSS, к 14 дню после начала окклюзии в условиях преходящей фокальной ишемии мозга крыс.

8. Данные транскриптомного анализа, подтвержденные методом ОТ-ПЦР, указывают на то, что протективный эффект семакса спустя 24 часа после начала окклюзии в условиях модели преходящей фокальной ишемии обусловлен активацией процессов передачи сигналов в ЦНС, а также противовоспалительным и иммуномодулирующим эффектами, компенсирующими эффект ишемии.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании полученных в ходе данной работы результатов, разработаны следующие практические рекомендации для использования в клинической, научно-исследовательской и преподавательской деятельности:

1. Для улучшения понимания механизмов ишемически-реперфузионного повреждения целесообразно использовать современные транскриптомные технологии, такие как полногеномное секвенирование РНК (RNA-seq), в условиях экспериментальной преходящей фокальной ишемии мозга. Полученные данные необходимо применять в доклинических и клинических исследованиях препаратов, обладающих фармакологической активностью.

2. С помощью метода RNA-seq в условиях преходящей фокальной ишемии были получены данные по сравнительному анализу уровней мРНК в подкорковых структурах мозга крыс при ишемически-реперфузионном повреждении и при применении семакса. Так, длительно применяющийся в клинической практике препарат семакс, в условиях экспериментальной ишемии через 24 часа от начала окклюзии средней мозговой артерии, продемонстрировал ответ транскриптома, противоположный ишемически-реперфузионному повреждению. В том числе было показано положительное влияние препарата на передачу сигналов в ЦНС и подавление воспаления, что рассматривается как один из механизмов нейропротекции. Следует учитывать эти свойства при применении пептида в клинической практике.

3. Показанное с помощью ОТ-ПЦР влияние глипролинов PGP и PGPL на активацию экспрессии генов, участвующих в нейротрансмиссии (*Gabra5*, *Gria3*, *Cplx2*, *Chrm1*), следует учитывать при разработке протоколов дальнейших углубленных исследований в области открытия новых свойств данных препаратов в условиях экспериментальных моделей преходящей фокальной ишемии мозга.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АКТГ – адренокортикотропный гормон

ВСА – внутренняя сонная артерия

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены

МРТ – магнитно-резонансная томография

НСА – наружная сонная артерия

ОСА – общая сонная артерия

ОТ – ПЦР – метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

СМА – средняя мозговая артерия

ЦНС – центральная нервная система

DWI: англ. – Diffusion-weighted imaging – диффузионно – взвешенные изображения

3D-TOF MRA: англ. – 3D Time of flight angiography – 3Д время-пролетная магнитно-резонансная ангиография

PGP – Pro-Gly-Pro

PGPL – Pro-Gly-Pro-Leu

RNA-seq – полногеномное секвенирование мРНК

rt-PA: англ. – recombinant tissue plasminogen activator – рекомбинантный тканевой активатор плазминогена

T2-WI: англ. – T2-weighted image – T2-взвешенные изображения

TNK-tPA: англ. – Tenecteplase - Тенектеплаза

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ашмарин, И.П. Семакс – новое лекарственное средство для коррекции кровообращения мозга, гипоксических состояний и повышения умственной трудоспособности / И.П. Ашмарин, Н.Г. Левицкая, А.А. Каменский, Н.Ф. Мясоедов // Фарматека. – 1997. – № 4. – С. 32–33.
2. Ашмарин, И.П. Глипролины как самостоятельные регуляторы и стабилизаторы других пептидов / И.П. Ашмарин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2002. – Т. 1 – С.24.
3. Безуглов, В.В. Антиагрегационная активность конъюгатов арахидоновой кислоты и нейротропных пептидов проглипрола и Семакса / В.В. Безуглов, Н.М. Грецкая, Т.М. Ваильева, Г.Н. Петрухина, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов, В.А. Макаров // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, – № 6. – С. 30–32.
4. Бондаренко, Н.С. Пептид пролил - глицин - пролин (PGP) препятствует повышению проницаемости кровеносных сосудов при воспалении / Н.С. Бондаренко, А.Н. Шнейдерман, А.А. Гусева, Б.А. Умарова // Acta Naturae. – 2017. – Т. 9, – № 1 (32). – С.55–58.
5. Вьюнова, Т.В. Взаимодействие трипептида ProGlyPro, меченного по С концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами мозга крыс / Т.В. Вьюнова, Л.А. Андреева, К.В. Шевченко, В.П. Шевченко, М.Ю. Бобров, В.В. Безуглов, Н.Ф. Мясоедов // Доклады Академии наук. – 2018. – Т.419. – С.136–137.
6. Вьюнова, Т.В. Особенности специфического связывания пентапептида HFPGP, меченного по С концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами нервных клеток головного мозга крысы/ Т.В. Вьюнова, Л.А. Андреева, К.В. Шевченко, В.П. Шевченко, М.Ю. Бобров, В.В. Безуглов, Н.Ф. Мясоедов // Доклады Академии наук. – 2014. – Т. 456 – С. 490–493.
7. Григорьева, М.Е. Участие оксида азота в реализации гемостатических эффектов

пептидов глипролинового ряда / М.Е. Григорьева, Н.Ф. Мясоедов, Л.А. Ляпина // Доклады Российской Академии Наук. Науки О Жизни. – 2022. – Т.506, – №1. – С. 333–337.

8. Дмитриева, В.Г. Действие Семакса и его С-концевого трипептида RGR на экспрессию генов факторов роста и их рецепторов в условиях экспериментальной ишемии мозга крыс / В.Г. Дмитриева, Л.В. Дергунова, О.В. Поварова, В.И. Скворцова, С.А. Лимборская, Н.Ф. Мясоедов // Доклады академии наук. Биохимия, Биофизика, Молекулярная биология. – 2008. – Т. 422, – № 2 – С. 258–261.

9. Левицкая, Н.Г. Исследование спектра физиологической активности аналога АКТГ4-10 гептапептида Семакс / Н.Г. Левицкая, Н.Ю. Глазова, Е.А. Себенцова, Д.М. Манченко, Д.А. Виленский, Л.А. Андреева, А.А. Каменский, Н.Ф. Мясоедов // Нейрохимия. Экспериментальные работы. – 2008. – Т. 25, – № 1–2 – С.111–118.

10. Ляпина, Л.А. Фибринолитический и гипогликемический эффекты пептида Pro-Gly-Pro-Leu при развитии инсулинзависимого диабета у крыс / Л.А. Ляпина, Н.Ф. Мясоедов, Л.А. Андреева, А.М. Ульянов, Т.Ю. Оберган, Т.А. Шубина // Известия РАН, серия биологическая. – 2010. – Т. 3 – С. 375–379.

11. Медведева, Е.В. Трипептид Pro-Gly-Pro влияет на транскриптом коры головного мозга крыс в условиях фокальной ишемии / Е.В. Медведева, В.Г. Дмитриева, О.В. Поварова, С.А. Лимборская, В.И. Скворцова, Н.Ф. Мясоедов, Л.В. Дергунова // Молекулярная биология. Геномика, транскриптомика. – 2014. – Т. 48, – № 2. – С. 277–287.

12. Мясоедов, Н.Ф. Лейцин содержащие глипролины (PRO - GLY - PRO - LEU и LEU - PRO - GLY - PRO): участие в реакциях гемостаза *in vitro* и *in vivo* в условиях нарушений процессов свертывания крови и жирового обмена у крыс / Н.Ф. Мясоедов, Д.Л. Рочев, Л.А. Ляпина, Т.Ю. Оберган, Л.А. Андреева // Доклады академии наук. – 2013. – Т. 453, – № 4. – С. 457–460.

13. Скворцова, В.И. Применение пептидного нейропротектора «СЕМАКС 1%» в первые часы и дни острого церебрального инсульта / под редакцией В.И. Скворцовой // Методические рекомендации – 2011.

14. Самонина, Г.Е. Трипептид Pro-Gly-Pro и гомеостаз слизистой оболочки желудка / Г.Е. Самонина, Г.Н. Копылова, Б.А. Умарова // *Нейрохимия*. – 2008. – Т. 25, – № 1–2 – С. 128–131
15. Сангаджиева, А.Д. Влияние глипролинов PGP и N-acetyl-PGP на экспрессию генов цитокинов при стрессорном и ацетатном язвообразовании / А.Д. Сангаджиева, З.В. Бакаева, Г.Е. Самонина, М.В. Мезенцева, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов // *Биология*. – 2014. – Т. 4 – С.3–8.
16. Скворцова, В.И. Нейропептид Семакс - лекарство XXI века. / В.И. Скворцова, Е.Ю. Журавлева, Л.А. Андреева // *Вопросы фармакотерапии*. – 1998. – Т. 4 – С.39
17. Султанов, В.С. Церебропротекторные и энергостабилизирующие эффекты полипренольного препарата ропрена при ишемии головного мозга у крыс // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2010. – Т. 8 – С. 3.
18. Abe, K. Induction of the 'zinc finger' gene after transient focal ischemia in rat cerebral cortex / K. Abe, J. Kawagoe, S. Sato, M. Sahara, K. Kogure // *Neuroscience Letters*. – 1991. – V. 123, – № 2 – P. 248–250.
19. Adlard, P.A. Metals and Alzheimer's disease / P.A. Adlard, A.I. Bush // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2006. – V. 10, – № 2–3 – P. 145–163.
20. An, S. Diagnostic value of Nestin expression in adult gliomas / S. An, I.H. Song, C.G. Woo // *International Journal of Surgical Pathology*. – 2022. – C.106689692211257.
21. Ansari, S. Endothelin-1 induced middle cerebral artery occlusion model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in rat / S. Ansari, H. Azari, K.J. Caldwell, R.W. Regenhardt, V.S. Hedna, M.F. Waters, B.L. Hoh, A.P. Mecca // *Journal of visualized experiments*. – 2013. – № 72.
22. Arnvig, K.B. Sequence-based analysis uncovers an abundance of non-coding RNA in the total transcriptome of mycobacterium tuberculosis / K.B. Arnvig, I. Comas, N.R. Thomson, J. Houghton, H.I. Boshoff, N.J. Croucher, G. Rose, T.T. Perkins, J. Parkhill, G. Dougan, D.B. Young // *PLoS Pathogens*. – 2011. – V. 7, – № 11. – P.e1002342.
23. Arumugam, T.V. Targeting ischemic brain injury with intravenous immunoglobulin / T.V. Arumugam, P.K. Selvaraj, T.M. Woodruff, M.P. Mattson // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2008. – V. 12, – № 1. – P. 19–29.

24. Arvin, B. The role of inflammation and cytokines in brain injury / B. Arvin, L.F. Neville, F.C. Barone, G.Z. Feuerstein // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 1996. – V. 20, – № 3. – C. 445–452.
25. Asensio, V.C. C10 is a novel chemokine expressed in experimental inflammatory demyelinating disorders that promotes recruitment of macrophages to the central nervous system / V.C. Asensio, S. Lassmann, A. Pagenstecher, S.C. Steffensen, S.J. Henriksen, I.L. Campbell // *The American Journal of Pathology*. – 1999. – V. 154, – № 4. – P. 1181–1191.
26. Bakaeva, Z. V. Neuroprotective Potential of Peptides HFRWPGP (ACTH6–9PGP), KKRRPGP, and PyrRP in cultured cortical neurons at glutamate excitotoxicity / Z.V. Bakaeva, A.M. Surin, N.V. Lizunova, A.E. Zgodova, I.A. Krasilnikova, A.P. Fisenko, D.A. Frolov, L.A. Andreeva, N.F. Myasoedov, V.G. Pinelis // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2020. – V. 491, – № 1. – P. 62–66.
27. Barondes, S.H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins / S.H. Barondes, D.N. Cooper, M.A. Gitt, H. Leffler // *The Journal of biological chemistry*. – 1994. – V. 269, – № 33. – P.20807–10.
28. Bashkatova, V.G. Novel synthetic analogue of ACTH 4–10 (Semax) but not glycine prevents the enhanced nitric oxide generation in cerebral cortex of rats with incomplete global ischemia / V.G. Bashkatova, V.B. Koshelev, O.E. Fadyukova, A.A. Alexeev, A.F. Vanin, K.S. Rayevsky, I.P. Ashmarin, D.M. Armstrong // *Brain Research*. – 2001. – V. 894, – № 1. – P. 145–149.
29. Belperio, J.A. Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis / J.A. Belperio, M. Dy, M.D. Burdick, Y.Y. Xue, K. Li, J.A. Elias, M.P. Keane // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2002. – V. 27, – № 4. – P. 419–427.
30. Benoit, M.E. C1q-induced LRP1B and GPR6 proteins expressed early in Alzheimer disease mouse models, are essential for the C1q-mediated protection against Amyloid- $\beta$  neurotoxicity / M.E. Benoit, M.X. Hernandez, M.L. Dinh, F. Benavente, O. Vasquez, A.J. Tenner // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – V. 288, – № 1. – P. 654–665.

31. Berkowitz, I.D. Epinephrine dosage effects on cerebral and myocardial blood flow in an infant swine model of cardiopulmonary resuscitation / I.D. Berkowitz, H. Gervais, C.L. Schleien, R.C. Koehler, J.M. Dean, R.J. Traystman // *Anesthesiology*. – 1991. – V. 75, – № 6. – P. 1041–1050.
32. Bijlsma, W.A. The enhanced recovery of sensorimotor function in rats is related to the melanotropic moiety of ACTH/MSH neuropeptides /W.A. Bijlsma, P. Schotman, F.G.I. Jennekens, W.H. Gispen, D. De Wied // *European Journal of Pharmacology*. – 1983. – V. 92, – № 3–4. – P. 231–236.
33. Block, F. Neuroprotektion beim Schlaganfall / F. Block, M. Schwarz // *Der Nervenarzt*. – 1999. – V. 70, – № 2. – P. 101–110.
34. Bondarenko, N.S. Prolyl-glycyl-proline (PGP) Peptide Prevents an Increase in Vascular Permeability in Inflammation / Bondarenko N.S., Shneiderman A.N., Guseva A.A., Umarova B.A. // *Acta Naturae*. – 2017. – V. 9, – № 1. – P. 52–55.
35. Bonne, G. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy / G. Bonne, M.R. Di Barletta, S. Varnous, H.-M. Bécane, E.-H. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, C.R. Greenberg, F. Gary, J.-A. Urtizberea, D. Duboc, M. Fardeau, D. Toniolo, K. Schwartz // *Nature Genetics*. – 1999. – V. 21, – № 3. – P. 285–288.
36. Brinker, G. Brain hemorrhages after rt-PA treatment of embolic stroke in spontaneously hypertensive rats / G. Brinker, F. Pillekamp, K.-A. Hossmann // *NeuroReport*. – 1999. – V. 10, – № 9. – P. 1943–1946.
37. Buttner-Ennever, J. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 3rd edn. By George Paxinos and Charles Watson. San Diego: Academic Press. 1996. / J. BUTTNER-ENNEVER // *Journal of Anatomy*. – 1997. – V. 191, – № 2. – P. 315–317.
38. Cao F. Up-regulation of syntaxin1 in ischemic cortex after permanent focal ischemia in rats / F. Cao, R. Hata, P. Zhu, M. Niinobe, M. Sakanaka // *Brain Research*. – 2009. – V. 1272. – P. 52–61.
39. Cappelletti, P. Syntaxin-1a and SNAP-25 expression level is increased in the blood samples of ischemic stroke patients / P. Cappelletti, M. Filareti, L. Masuelli, R. Bei, K. Hassanzadeh, M. Corbo, M. Feligioni // *Scientific Reports*. – 2022. – V. 12, – № 1. –

P.14483

40. Casbon, J.A. A method for counting PCR template molecules with application to next-generation sequencing / J.A. Casbon, R.J. Osborne, S. Brenner, C.P. Lichtenstein // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – V. 39, – № 12. – P. e81–e81.
41. Ceccom, J. Copper chelator induced efficient episodic memory recovery in a Non-transgenic Alzheimer's mouse model / J. Ceccom, F. Coslédan, H. Halley, B. Francès, J.M. Lassalle, B. Meunier B. // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7, – № 8. – P.e 43105.
42. Chen, A. Upregulation of dihydropyrimidinase-related protein 2, spectrin  $\alpha$  II chain, heat shock cognate protein 70 pseudogene 1 and tropomodulin 2 after focal cerebral ischemia in rats—A proteomics approach / A. Chen, W. Liao, Q. Lu, W. Wong, P. Wong// *Neurochemistry International*. – 2007. – V. 50, – № 7–8. – P. 1078–1086.
43. Chen, G.Y. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage / G.Y. Chen, G. Nuñez // *Nature Reviews Immunology*. – 2010. – T. 10, – № 12. – P. 826–837.
44. Chen, K.-Z. Vimentin as a potential target for diverse nervous system diseases / K.-Z. Chen, S.-X. Liu, Y.-W. Li, T. He, J. Zhao, T. Wang, X.-X. Qiu, H.-F. Wu // *Neural Regeneration Research*. – 2023. – V. 18, – № 5. – P. 969.
45. Chen, M.-H. A simpler cardiac arrest model in rats / M.-H. Chen, T.-W. Liu, L. Xie, F.-Q. Song, T. He, Z. Zeng, S.-R. Mo // *The American Journal of Emergency Medicine*. – 2007. – V. 25, – № 6. – P. 623–630.
46. Chen, M.-H. Ventricular fibrillation induced by transoesophageal cardiac pacing: A new model of cardiac arrest in rats / M.-H. Chen, T.-W. Liu, L. Xie, F.-Q. Song, T. He, Z.-Y. Zeng, S.-R. Mo // *Resuscitation*. – 2007. – V. 74, – № 3. – P. 546–551.
47. Cheng, X. Cerebral ischemia-reperfusion aggravated cerebral infarction injury and possible differential genes identified by RNA-Seq in rats. / X. Cheng, Y.-L. Yang, W.-H. Li, M. Liu, Y.-H. Wang, G.-H. Du // *Brain research bulletin*. – 2020. – V. 156. – P. 33–42.
48. Chung, J.Y. Changes in Gene Expression in the Rat Hippocampus after Focal Cerebral Ischemia / J.Y. Chung, J.W. Yi, S.M. Kim, Y.J. Lim, J.H. Chung, D.J. Jo // *Journal of Korean Neurosurgical Society*. – 2011. – V. 50, – № 3. – P.173.

49. Conesa, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis / A. Conesa, P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomez-Cabrero, A. Cervera, A. McPherson, M.W. Szczesniak, D.J. Gaffney, L.L. Elo, X. Zhang, A. Mortazavi // *Genome Biology*. – 2016. – V. 17, – № 1. – P. 13.
50. Cox-Limpens, K.E.M. Endogenous brain protection: What the cerebral transcriptome teaches us / K.E.M. Cox-Limpens, A.W.D. Gavilanes, L.J.I. Zimmermann, J.S.H. Vles // *Brain Research*. – 2014. – V. 1564 – P. 85–100.
51. DeGraba, T.J. The role of inflammation after acute stroke: Utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy / T.J. DeGraba // *Neurology*. – 1998. – V. 51. – №3, Supplement 3 – P.S62–S68.
52. DeGracia, D.J. Regulation of mRNA following brain ischemia and reperfusion / D.J. DeGracia // *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. – 2017. – V. 8, – № 4. – C.e1415.
53. Dietrich, W.D. Morphological consequences of early reperfusion following thrombotic or mechanical occlusion of the rat middle cerebral artery / W.D. Dietrich, H. Nakayama, B. D. Watson, H. Kanemitsu // *Acta Neuropathologica*. – 1989. – V. 78, – № 6. – P. 605–614.
54. Dietrich, W.D. Photochemically induced cerebral infarction / W.D. Dietrich, B.D. Watson, R. Busto, M.D. Ginsberg, J.R. Bethea // *Acta Neuropathologica*. – 1987. – V. 72, – № 4. – P. 315–325.
55. Dirnagl, U. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view / U. Dirnagl, C. Iadecola, M.A. Moskowitz // *Trends in Neurosciences*. – 1999. – V. 22, – № 9. – P. 391–397.
56. Dubinsky, J.M. Examination of the Role of Calcium in Neuronal Death / J.M. Dubinsky J.M. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1993. – V. 679, – № 1. – P. 34–42.
57. Dugan, L.L. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes / L.L. Dugan, D.W. Choi // *Annals of Neurology*. – 1994. – V. 35, – № S1. – P. S17–S21.
58. Dunic, J. Galectin-3: An open-ended story / J. Dunic, S. Dabelic, M. Flögel // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2006. – V. 1760, – № 4. – P. 616–635.

59. Eklöf, B. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain / B. Eklöf, B.K. Siesjö // *Acta Physiologica Scandinavica* – 1972. – V. 86, – № 2. – P. 155–165.
60. Eklöf, B. The effect of bilateral carotid artery ligation upon Acid-Base Parameters and substrate levels in the rat brain / B. Eklöf, B.K. Siesjö // *Acta Physiologica Scandinavica* – 1972. – V. 86, – № 4. – P. 528–538.
61. Eltzschig, H.K. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation / H.K. Eltzschig, T. Eckle // *Nature Medicine*. – 2011. – V. 17, – № 11. – P. 1391–1401.
62. Etain, B. A SNAP25 promoter variant is associated with early-onset bipolar disorder and a high expression level in brain / B. Etain, A. Dumaine, F. Mathieu, F. Chevalier, C. Henry, J.-P. Kahn, J. Deshommès, F. Bellivier, M. Leboyer, S. Jamain // *Molecular Psychiatry*. – 2010. – V. 15, – № 7. – P. 748–755.
63. Fernandez-Lizarbe, S. Critical Role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol / S. Fernandez-Lizarbe, M. Pascual, C. Guerri // *The Journal of Immunology*. – 2009. – V. 183, – № 7. – P.4733–4744.
64. Fonteh, A.N. Identification of disease markers in human cerebrospinal fluid using lipidomic and proteomic methods / A.N. Fonteh, R.J. Harrington, A.F. Huhmer, R.G. Biringer, J.N. Riggins, M.G. Harrington // *Disease Markers*. – 2006. – V. 22, – № 1–2. – P. 39–64.
65. Ford, G. Expression analysis systematic explorer (EASE) analysis reveals differential gene expression in permanent and transient focal stroke rat models / G. Ford, Z. Xu, A. Gates, J. Jiang, B.D. Ford // *Brain Research*. – 2006. – V. 1071, – № 1. – P. 226–236.
66. Forslin Aronsson Å.  $\alpha$ -MSH Rescues Neurons from Excitotoxic Cell Death / Aronsson Å. Forslin, S. Spulber, M. Oprica, B. Winblad, C. Post, M. Schultzberg // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2007. – V. 33, – № 3. – P. 239–251.
67. Fu, G.K. Digital encoding of cellular mRNAs enabling precise and absolute gene expression measurement by single-molecule counting / G.K. Fu, J. Wilhelmy, D. Stern, H.C. Fan, S.P.A. Fodor // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86, – № 6 – P.2867–2870.
68. Fu, G.K. Molecular indexing enables quantitative targeted RNA sequencing and reveals poor efficiencies in standard library preparations / G.K. Fu, W. Xu, J. Wilhelmy,

- M.N. Mindrinos, R.W. Davis, W. Xiao, S.P.A. Fodor // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111, – № 5. – P. 1891–1896.
69. Fu, X. Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics / X. Fu, N. Fu, S. Guo, Z. Yan, Y. Xu, H. Hu, C. Menzel, W. Chen, Y. Li, R. Zeng, P. Khaitovich // *BMC Genomics*. – 2009. – V. 10, – № 1. – P. 161.
70. Gao, P. Galectin-3: its role in asthma and potential as an anti-inflammatory target / P. Gao, J.L. Simpson, J. Zhang, P.G. Gibson // *Respiratory Research*. – 2013. – V. 14, – № 1. – P.136.
71. Gao, Z. Galectin-3 Is a Potential Mediator for Atherosclerosis / Z. Gao, Z. Liu, R. Wang, Y. Zheng, H. Li, L. Yang // *Journal of Immunology Research*. – 2020. – V. 2020 – P. 1–11.
72. Garcia, J.H. Neuronal Necrosis After Middle Cerebral Artery Occlusion in Wistar Rats Progresses at Different Time Intervals in the Caudoputamen and the Cortex / J.H. Garcia, K.-F. Liu, K.-L. Ho // *Stroke*. – 1995. – V. 26, – № 4. – P. 636–643
73. Gatti, S. Protective action of NDP-MSH in experimental subarachnoid hemorrhage / S. Gatti, C. Lonati, F. Acerbi, A. Sordi, P. Leonardi, A. Carlin, S.M. Gaini, A. Catania // *Experimental Neurology*. – 2012. – V. 234, – № 1. – P. 230–238.
74. Gerriets, T. The macrosphere model / T. Gerriets, F. Li, M.D. Silva, X. Meng, M. Brevard, C.H. Sotak, M. Fisher // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2003. – V. 122, – № 2. – P. 201–211.
75. Ginsberg, M.D. Rodent models of cerebral ischemia. / M.D. Ginsberg, R. Busto // *Stroke*. – 1989. – V. 20, – № 12. – P. 1627–1642.
76. Gispen, W.H. Chapter 28 ACTH/MSH-derived peptides and peripheral nerve plasticity: neuropathies, neuroprotection and repair. 1994. – 223–229p.
77. Giuliani, D. NDP- $\alpha$ -MSH induces intense neurogenesis and cognitive recovery in Alzheimer transgenic mice through activation of melanocortin MC4 receptors / D. Giuliani, L. Neri, F. Canalini, A. Calevro, A. Ottani, E. Vandini, P. Sena, D. Zaffe, S. Guarini // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2015. – V. 67. – P. 13–21.

78. Gong, C. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice / C. Gong, Z. Qin, A.L. Betz, X.-H. Liu, G.-Y. Yang // *Brain Research*. – 1998. – V. 801, – № 1–2. – P. 1–8.
79. Gonzalez-Suarez, I. Loss of A-type lamins and genomic instability / I. Gonzalez-Suarez, A.B. Redwood, S. Gonzalo // *Cell Cycle*. – 2009. – V. 8, – № 23. – P.3860–3865.
80. Gonzalo, S. DNA Damage and Lamins, 2014. – 377–399p.
81. Gu, S. HES5 promotes cellular proliferation of non-small cell lung cancer through STAT3 signaling / S. Gu, R. Zhang, J. Gu, X. Li, L. Lv, J. Jiang, Z. Xu, S. Wang, C. Shi, D.P. Wang, C. Wu // *Oncology Reports*. – 2017. – V. 37, – № 1. – P. 474–482.
82. Gubskiy, I.L. MRI Guiding of the Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats Aimed to Improve Stroke Modeling / I.L. Gubskiy, D.D. Namestnikova, E.A. Cherkashova, V.P. Chekhonin, V.P. Baklaushev, L.V. Gubsky, K.N. Yarygin // *Translational Stroke Research*. – 2018. – V. 9, – № 4. – P. 417–425.
83. Gulkesen, A. Lipocalin 2 as a clinical significance in rheumatoid arthritis / A. Gulkesen, G. Akgol, A.K. Poyraz, S. Aydin, A. Denk, T. Yildirim, A. Kaya // *Central European Journal of Immunology*. – 2017. – V. 3. – P. 269–273.
84. Gulyás, B. Evolution of microglial activation in ischaemic core and peri-infarct regions after stroke: A PET study with the TSPO molecular imaging biomarker [C]vinpocetine / B. Gulyás, M. Tóth, M. Schain, A. Airaksinen, A. Vas, K. Kostulas, P. Lindström, J. Hillert, C. Halldin // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2012. – V. 320, – № 1–2. – P. 110–117.
85. Hamann, G.F. Acute cerebral infarction: pathophysiology and modern treatment concepts / G.F. Hamann // *Der Radiologe*. – 1997. – V. 37, – № 11. – P.843–852.
86. Hanai, J. Lipocalin 2 Diminishes invasiveness and metastasis of ras-transformed cells / J. Hanai, T. Mammoto, P. Seth, K. Mori, S.A. Karumanchi, J. Barasch, V.P. Sukhatme // *Journal of Biological Chemistry* – 2005. – V. 280, – № 14. – P.13641–13647.
87. Hara, T. Effect of thrombolysis on the dynamics of infarct evolution after clot embolism of middle cerebral artery in mice / T. Hara, G. Mies, K.-A. Hossmann // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2000. – V. 20, – № 10. – P.1483–1491.

88. Hart, S.N. Calculating Sample Size Estimates for RNA Sequencing Data / S.N. Hart, T.M. Therneau, Y. Zhang, G.A. Poland, J.-P. Kocher // *Journal of Computational Biology*. – 2013. – V. 20, – № 12. – P. 970–978.
89. Hata, R. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. /R. Hata, K.Maeda, D. Hermann, G. Mies, K.A. Hossmann // *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2000. – V. 20, – № 2. – P. 306–15.
90. Hata, R. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice / R. Hata, K. Maeda, D. Hermann, G. Mies, K.-A. Hossmann // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2000. – V. 20, – № 6. – P. 937–946.
91. Hermann, D. Relationship between metabolic dysfunctions, gene responses and delayed cell death after mild focal cerebral ischemia in mice / D. Hermann, E. Kilic, R. Hata, K.-A. Hossmann, G. Mies // *Neuroscience*. – 2001. – V. 104, – № 4. – P. 947–955.
92. Hermann, D.M. Modeling vascular risk factors for the development of ischemic stroke therapies / D.M. Hermann, C. Kleinschnitz // *Stroke*. – 2019. – V. 50, – № 5. – P. 1310–1317.
93. Hogaboam, C.M. Immunomodulatory role of C10 chemokine in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. / C.M. Hogaboam, C.S. Gallinat, D.D. Taub, R.M. Strieter, S.L. Kunkel, N.W. Lukacs // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. – 1999. – V. 162, – № 10. – P. 6071–9.
94. Honkaniemi, J. Expression of Zinc Finger Immediate early genes in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion / J. Honkaniemi, B.A. States, P.R. Weinstein, J. Espinoza, F.R. Sharp // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 1997. – V. 17, – № 6. – P. 636–646.
95. Hotchkiss, R.S. Cell Death / R.S. Hotchkiss, A. Strasser, J.E. McDunn, P.E. Swanson // *New England Journal of Medicine* – 2009. – V. 361, – № 16. – P. 1570–1583.
96. Hughes, R. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins / R. Hughes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* – 1999. – V. 1473, – № 1. – P. 172–185.

97. Hung, J.-H. Analysis of microarray and RNA-seq expression profiling data / J.-H. Hung, Z. Weng // *Cold Spring Harbor Protocols* – 2017. – V. 2017, – № 3. – C.pdb.top093104.
98. Iadecola, C. Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection / C. Iadecola, M.E. Ross // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1997. – V. 835, – № 1 – P. 203–217.
99. Islam, S. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers / S. Islam, A. Zeisel, S. Joost, G. La Manno, P. Zajac, M. Kasper, P. Lönnerberg, S. Linnarsson // *Nature Methods*. – 2014. – V. 11 – № 2 – P.163–166.
100. Ivanova, D. Bassoon and piccolo regulate ubiquitination and link presynaptic molecular dynamics with activity-regulated gene expression / D. Ivanova, A. Dirks, A. Fejtova // *The Journal of Physiology*. – 2016. – V. 594, – № 19. – P. 5441–5448.
101. Jabara, C.B. Accurate sampling and deep sequencing of the HIV-1 protease gene using a Primer ID / C.B. Jabara, C.D. Jones, J. Roach, J.A. Anderson, R. Swanstrom // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – V. 108, – № 50. – P.20166–20171.
102. Kabat, H. Recovery of function following arrest of the brain circulation / H. Kabat, C. Dennis, A.B. Baker // *American Journal of Physiology-Legacy Content*. – 1941. – V. 132, – № 3. – P. 737–747.
103. Kaplan, B. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. / B. Kaplan, S. Brint, J. Tanabe, M. Jacewicz, X.J. Wang, W. Pulsinelli // *Stroke*. – 1991. – V. 22, – № 8. – P.1032–1039.
104. Katz, L. Outcome model of asphyxial cardiac arrest in rats / L. Katz, U. Ebmeyer, P. Safar, A. Radovsky, R. Neumar // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* – 1995. – V. 15, – № 6. – P. 1032–1039.
105. Kilic, E. Recombinant tissue-plasminogen activator-induced thrombolysis after cerebral thromboembolism in mice / E. Kilic, D.M. Hermann, K.-A. Hossmann // *Acta Neuropathologica*. – 2000. – V. 99, – № 3. – P. 219–222.
106. Kilic, E. A reproducible model of thromboembolic stroke in mice / E. Kilic, D.M. Hermann, K.-A. Hossmann // *NeuroReport*. – 1998. – V. 9, – № 13. – P. 2967–2970.

107. Kivioja, T. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers / T. Kivioja, A.Vähärautio, K. Karlsson, M. Bonke, M. Enge, S. Linnarsson, J. Taipale // *Nature Methods*. – 2012. – V. 9, – № 1. – P. 72–74.
108. Knecht, L. Alpha-synuclein immunization strategies for synucleinopathies in clinical studies: A biological perspective / L. Knecht, J. Folke, R. Dodel, J.A. Ross, A. Albus // *Neurotherapeutics*. – 2022. – V. 19, – № 5. – P. 1489–1502.
109. Kofler, J. Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice / J. Kofler, K. Hattori, M. Sawada, A.C. DeVries, L.J. Martin, P.D. Hurn, R.J. Traystman // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2004. – V. 136, – № 1. – P. 33–44.
110. Komatsu, H. Novel therapeutic GPCRs for psychiatric disorders / H. Komatsu // *International Journal of Molecular Sciences* – 2015. – V.16, – № 12. – P.14109–14121.
111. Kudo, M. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. / M. Kudo, A. Aoyama, S. Ichimori, N. Fukunaga // *Stroke*. – 1982. – V. 13, – № 4. – P. 505–508.
112. Kustanovich, V. Biased paternal transmission of SNAP-25 risk alleles in attention-deficit hyperactivity disorder / V. Kustanovich, B. Merriman, J. McGough, J.T. McCracken, S.L. Smalley, S.F. Nelson // *Molecular Psychiatry*. – 2003. – V. 8, – № 3. – P. 309–315.
113. LaFleur, A.M. Role of CC chemokine CCL6/C10 as a monocyte chemoattractant in a murine acute peritonitis / A.M. LaFleur, N.W. Lukacs, S.L. Kunkel, A. Matsukawa // *Mediators of Inflammation*. – 2004. – V. 13, – № 5–6. – P. 349–355.
114. Lauterborn, J.C. Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons / J.C. Lauterborn, G. Lynch, P. Vanderklish, A. Arai, C.M. Gall // *The Journal of Neuroscience*. – 2000. – V. 20, – № 1. – P. 8–21.
115. Lee, S.M. Calcitonin and amylin receptor peptide interaction mechanisms: insights into peptidebinding modes and allosteric modulation of the calcitonin receptor by receptor activitymodifying proteins / S.M. Lee, D.L. Hay, A.A. Pioszak // *J. Biol. Chem*. – 2016. – V. 291 – P. 8686–8700.

116. Leone, S. Developments and new vistas in the field of melanocortins / S. Leone, G. Noera, A. Bertolini // *Biomolecular Concepts*. – 2015. – V. 6, – № 5–6. – P. 361–382.
117. Li, H. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform / H. Li, R. Durbin // *Bioinformatics*. – 2009. – V. 25, – № 14. – P. 1754–1760.
118. Li, H. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools /H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin // *Bioinformatics*. – 2009. – V. 25, – № 16. – P. 2078–2079.
119. Li, Y. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat / Y. Li, M. Chopp, N. Jiang, F. Yao, C. Zaloga // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 1995. – V. 15, – № 3. – P. 389–397.
120. Li, Y. Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat / Y. Li, C. Powers, N. Jiang, M. Chopp // *Journal of the Neurological Sciences*. – 1998. – V. 156 – № 2, – P. 119–132.
121. Liew, L.C. An RNA-Seq transcriptome analysis of histone modifiers and RNA silencing genes in Soybean during Floral Initiation Process / L.C. Liew, M.B. Singh, P.L. Bhalla // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8, – № 10. – P.e77502.
122. Lipton, P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons / P. Lipton // *Physiological Reviews* – 1999. – T. 79 – № 4 – C. 1431–1568
123. Lisak, R. Melanocortins, Melanocortin Receptors and Multiple Sclerosis / R. Lisak, J. Benjamins // *Brain Sciences*. – 2017. – V. 7, – № 8. – P. 104.
124. Liu, F.-T. Galectins as modulators of tumour progression / F.-T. Liu, G.A. Rabinovich // *Nature Reviews Cancer*. – 2005. – V. 5, – № 1. – P. 29–41.
125. Liu, X. Interleukin-4 is essential for Microglia/Macrophage M2 polarization and long-term recovery after cerebral ischemia /X. Liu, J. Liu, S. Zhao, H. Zhang, W. Cai, M. Cai, Ji X., R.K. Leak, Y. Gao, J. Chen, X. Hu // *Stroke*. – 2016. – V. 47, – № 2. – P. 498–504.
126. Lo, E.H. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke / E.H. Lo, T. Dalkara, M.A. Moskowitz // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2003. – V. 4, – № 5. – P. 399–414.
127. Lochhead, J.J. Oxidative stress increases blood–brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia–reoxygenation / J.J. Lochhead, G.

McCaffrey, C.E. Quigley, J. Finch, K.M. DeMarco, N. Nametz, T.P. Davis // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2010. – V. 30, – № 9. – P. 1625–1636.

128. Lowry, O.H. Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. / O.H. Lowry, J.V. Passonneau, F.X. Hasselberger, D.W. Schulz // *The Journal of biological chemistry*. – 1964. – V. 239 – P. 18–30.

129. Lynch, G. AMPA receptor modulators as cognitive enhancers / G. Lynch // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2004. – V. 4, – № 1. – P. 4–11.

130. Maher, C.A. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer / C.A. Maher, C. Kumar-Sinha, X. Cao, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Jing, L. Sam, T. Barrette, N. Palanisamy, A.M. Chinnaiyan // *Nature*. – 2009. – V. 458, – № 7234. – P. 97–101.

131. Makris, K. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Acute Kidney Injury / K. Makris // *Adv Clin Chem*. – 2012. – V.58, P.141-191.

132. Malone, J.H. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome / J.H. Malone, B. Oliver // *BMC Biology*. – 2011. – V. 9, – № 1. – P. 34.

133. Manhylova, T.A. Metabolic and hemodynamic effects of the growth hormone system — insulin-like growth factor / T.A. Manhylova, N.H. Gafarova // *Terapevticheskii arkhiv* – 2015. – T. 87, – № 12. – P. 128.

134. Marín-Royo, G. Inhibition of galectin-3 ameliorates the consequences of cardiac lipotoxicity in a rat model of diet-induced obesity / G. Marín-Royo, I. Gallardo, E. Martínez-Martínez, B. Gutiérrez, R. Jurado-López, N. López-Andrés, J. Gutiérrez-Tenorio, E. Rial, M. Bartolome, M.L. Nieto, V. Cachofeiro // *Disease Models & Mechanisms*. – 2018. – V. 11, – №2: dmm032086.

135. Mariño, G. Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection / G. Mariño, F. Madeo, G. Kroemer // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2011. – V. 23, – № 2. – P. 198–206.

136. Marioni, J.C. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays / J.C. Marioni, C.E. Mason, S.M. Mane, M. Stephens, Y. Gilad // *Genome Research*. – 2008. – T. 18, – № 9. – P. 1509–1517.

137. Martin, J.L. Small Heat Shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes / J.L. Martin, R. Mestril, R. Hilal-Dandan, L.L. Brunton, W.H. Dillmann // *Circulation*. – 1997. – V. 96, – № 12. – P. 4343–4348.
138. Marx, G. The Molecular Basis of Memory / G. Marx, C. Gilon // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2012. – V. 3, – № 8. – P. 633–642.
139. McBean, D.E. Rodent models of global cerebral ischemia: A comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion / D.E. McBean, P.A. Kelly // *General Pharmacology: The Vascular System*. – 1998. – V. 30, – № 4. – P. 431–434.
140. Medvedeva, E. V. Semax, an analog of ACTH(4–7), regulates expression of immune response genes during ischemic brain injury in rats / E.V. Medvedeva, V.G. Dmitrieva, S.A. Limborska, N.F. Myasoedov, L.V. Dergunova // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2017. – V. 292, – № 3. – P. 635–653.
141. Medvedeva, E. V The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: genome-wide transcriptional analysis / E.V. Medvedeva, V.G. Dmitrieva, O.V. Povarova, S.A. Limborska, V.I. Skvortsova, N.F. Myasoedov, L.V. Dergunova // *BMC Genomics*. – 2014. – V. 15, – № 1. – P. 228.
142. Meloni, G. Metal swap between Zn7-metlothionein-3 and amyloid- $\beta$ -Cu protects against amyloid- $\beta$  toxicity / G. Meloni, V. Sonois, T. Delaine, L. Guilloureau, A. Gillet, J. Teissié, P. Faller, M. Vašák // *Nature Chemical Biology*. – 2008. – V. 4, – № 6. – C. 366–372.
143. Menet, V. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes / V. Menet, M. Prieto, A. Privat, M. Giménez y Ribotta // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – V. 100, – № 15. – P. 8999–9004
144. Menon, B.K. Intravenous tenecteplase compared with alteplase for acute ischaemic stroke in Canada (AcT): a pragmatic, multicentre, open-label, registry-linked, randomised, controlled, non-inferiority trial / B.K. Menon, B.H. Buck, N. Singh, Z.E. Aljundi // *The Lancet*. – 2022. – V. 400, – № 10347. – P. 161–169.

145. Mies, G. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. / G. Mies, S. Ishimaru, Y. Xie, K. Seo, K.A. Hossmann // *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 1991. – V. 11, – № 5. – P. 753–61.
146. Miyake, K. Sustained decrease in brain regional blood flow after microsphere embolism in rats. / K. Miyake, S. Takeo, H. Kaijihara // *Stroke*. – 1993. – V. 24, – № 3. – P. 415–420.
147. Morancho, A. A new method for focal transient cerebral ischaemia by distal compression of the middle cerebral artery / A. Morancho, L. García-Bonilla, V. Barceló, D. Giralt, M. Campos-Martorell, S. Garcia, J. Montaner, A. Rosell // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. – 2012. – V. 38, – № 6. – P. 617–627.
148. Mounkes, L. The A-Type Lamins Nuclear Structural Proteins as a Focus for Muscular Dystrophy and Cardiovascular Diseases / L. Mounkes // *Trends in Cardiovascular Medicine*. – 2001. – V. 11, – № 7. – P. 280–285.
149. Nagalakshmi, U. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing / U. Nagalakshmi, Z. Wang, K. Waern, C. Shou, D. Raha, M. Gerstein, M. Snyder // *Science*. – 2008. – V. 320, – № 5881. – P. 1344–1349.
150. Nakamura, K. Genetic and expression analyses reveal elevated expression of syntaxin 1A ( STX1A) in high functioning autism / K. Nakamura, A. Anitha, K. Yamada, M. Tsujii, Y. Iwayama, E. Hattori, T. Toyota, S. Suda, N. Takei, Y. Iwata, K. Suzuki, H. Matsuzaki, M. Kawai, Y. Sekine, K.J. Tsuchiya, G. Sugihara, Y. Ouchi, T. Sugiyama, T. Yoshikawa, N. Mori // *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2008. – T. 11, – № 08. – P. 1073.
151. Namura, S. Activation and Cleavage of Caspase-3 in Apoptosis Induced by Experimental Cerebral Ischemia / S. Namura, J. Zhu, K. Fink, M. Endres, A. Srinivasan, K.J. Tomaselli, J. Yuan, M.A. Moskowitz // *The Journal of Neuroscience*. – 1998. – V. 18, – № 10. – P. 3659–3668.

152. Nicholson, A.W. Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage / A.W. Nicholson // *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. – 2014. – V. 5, – № 1. – P. 31–48.
153. Nour, M. Ischemia-Reperfusion Injury in Stroke / M. Nour, F. Scalzo, D.S. Liebeskind // *Interventional Neurology*. – 2012. – V. 1, – № 3–4. – P. 185–199.
154. Oeckl, P. G-protein coupled receptor 6 deficiency alters striatal dopamine and cAMP concentrations and reduces dyskinesia in a mouse model of Parkinson's disease / P. Oeckl, B. Hengerer, B. Ferger // *Experimental Neurology*. – 2014. – V. 257. – P. 1–9.
155. Oh, M. Defect in cytosolic Neu2 sialidase abrogates lipid metabolism and impairs muscle function in vivo / M. Oh, D.-I. Ha, C. Son, J.G. Kang, H. Hwang, S. Moon, M. Kim, J. Nam, J.S Kim, S.Y. Song, Y.-S. Kim, S. Park, J.S. Yoo, J.-H. Ko, K. Park // *Scientific Reports*. – 2022. – V. 12, – № 1. – P. 3216.
156. Opazo, C. Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease  $\beta$ -Amyloid / C. Opazo, X. Huang, R.A. Cherny, R.D. Moir, A.E. Roher, A.R. White, R. Cappai, C.L. Masters, R.E. Tanzi, N.C. Inestrosa, A.I. Bush // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277, – № 43. – P. 40302–40308.
157. Orset, C. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion / C. Orset, R. Macrez, A.R. Young, D. Panthou, E. Angles-Cano, E. Maubert, V. Agin, D. Vivien // *Stroke*. – 2007. – V. 38, – № 10. – P. 2771–2778.
158. Oszolak, F. Direct RNA sequencing / F. Oszolak, A.R. Platt, D.R. Jones, J.G. Reifengerger, L.E. Sass, P. McInerney, J.F. Thompson, J. Bowers, M. Jarosz, P.M. Milos // *Nature*. – 2009. – V. 461, – № 7265. – P. 814–818.
159. Papaspyridonos, M. Galectin-3 Is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction / M. Papaspyridonos, E. McNeill, J.P. Bono, A. Smith, K.G. Burnand, K.M. Channon, D.R. Greaves // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2008. – V. 28, – № 3. – P. 433–440.
160. Patel, A.R. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. / A.R. Patel, R. Ritzel, L.D. McCullough, F. Liu // *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. – 2013. – V. 5, – № 2. – P. 73–90.

161. Pati, A. A CD14 polymorphism (C-159T rs2569190) is associated with SARS-CoV-2 infection and mortality in the European population / A. Pati, S. Padhi, D. Panda, S. Suvankar, A.K. Panda // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – V. 224, – № 5. – P. 921–922.
162. Perkins, J.R. A Comparison of RNA-Seq and exon arrays for whole genome transcription profiling of the L5 spinal nerve transection model of neuropathic pain in the rat / J.R. Perkins, A. Antunes-Martins, M. Calvo, J. Grist, W. Rust, R. Schmid, T. Hildebrandt, M. Kohl, C. Orengo, S.B. McMahon, D.L. Bennett // *Molecular Pain*. – 2014. – V. 10 – P. 1744-8069-10–7.
163. Picelli, S. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects / S. Picelli, Björklund Å.K., B. Reinius, S. Sagasser, G. Winberg, R. Sandberg // *Genome Research*. – 2014. – V. 24, – № 12. – P. 2033–2040.
164. Pichiule, P. Vascular endothelial growth factor upregulation in transient global ischemia induced by cardiac arrest and resuscitation in rat brain / P. Pichiule, J.C. Chávez, K. Xu, J.C. LaManna // *Molecular Brain Research*. – 1999. – V. 74, – № 1–2. – C. 83–90.
165. Pinto-Costa, R. Overexpression-induced  $\alpha$ -Synuclein brain spreading / R. Pinto-Costa, E. Harbachova, P. La Vitola, D.A. Di Monte // *Neurotherapeutics* – 2022.
166. Potaman, V.N. Entry of the synthetic ACTH(4–10) analogue into the rat brain following intravenous injection / V.N. Potaman, L.V. Antonova, V.A. Dubynin, D.A. Zaitzev, A.A. Kamensky, N.F. Myasoedov, V.N. Nezavibatko // *Neuroscience Letters*. – 1991. – V. 127, – № 1 – P. 133–136.
167. Reid, K.H. Audiogenic seizures following global ischemia induced by chest compression in Long-Evans rats / K.H. Reid, C. Young, A. Schurr, M. Tseng, R.S. Payne, P. Keelen, J. Miller, V. Iyer // *Epilepsy Research*. – 1996. – V. 23, – № 3. – P. 195–209.
168. Ritter, L.S. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke / L.S. Ritter, J.A. Orozco, B.M. Coull, P.F. McDonagh // *Stroke*. – 2000. – V.31, – № 5. – P. 1153–1161.

169. Riuzzi, F. S100 proteins in obesity: liaisons dangereuses / F. Riuzzi, S. Chiappalupi, C. Arcuri, I. Giambanco, G. Sorci, R. Donato // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2020. – V. 77, – № 1. – P. 129–147.
170. Robinson, M.J. Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat / M. J. Robinson, I.M. Macrae, M. Todd, J.L. Reid, J. McCulloch // *Neuroscience Letters*. – 1990. – V. 118, – № 2. – P. 269–272.
171. Rodríguez-Ballesteros, M. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene ( OTOF ) / M. Rodríguez-Ballesteros, F.J. del Castillo, Y. Martín, M.A. Moreno-Pelayo, C. Morera, F. Prieto, J. Marco, A. Morant, J. Gallo-Terán, C. Morales-Angulo, C. Navas, G. Trinidad, M.C. Tapia, F. Moreno, I. del Castillo // *Human Mutation*. – 2003. – V. 22, – № 6. – P. 451–456.
172. Rosenberg, G.A. Matrix Metalloproteinases and TIMPs Are Associated With Blood-Brain Barrier Opening After Reperfusion in Rat Brain / G.A. Rosenberg, E.Y. Estrada, J.E. Dencoff // *Stroke*. – 1998. – V. 29, – № 10. – P. 2189–2195.
173. Roth, J.M. Recombinant Tissue Plasminogen Activator for the Treatment of Acute Ischemic Stroke / J.M. Roth // *Baylor University Medical Center Proceedings*. – 2011. – V. 24, – № 3. – P. 257–259.
174. Röther, J. “Spreading depression” und Periinfarktdepolarisationen / J. Röther // *Der Nervenarzt*. – 2000. – V. 71, – № 2. – P. 84–90.
175. Rubino, G.J. Ischemic cortical lesions after permanent occlusion of individual middle cerebral artery branches in rats. / G. J. Rubino, W. Young // *Stroke*. – 1988. – V. 19, – № 7. – P. 870–877
176. Rustici, G. ArrayExpress update—trends in database growth and links to data analysis tools / G. Rustici, N. Kolesnikov, M. Brandizi, T. Burdett, M. Dylag, I. Emam, A. Farne, E. Hastings, J. Ison, M. Keays, N. Kurbatova, J. Malone, R. Mani, A. Mupo, R. Pedro Pereira, E. Pilicheva, J. Rung, A. Sharma, Y.A. Tang, T. Ternent, A. Tikhonov, D. Welter, E. Williams, A. Brazma, H. Parkinson, U. Sarkans // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – V. 41 – № D1 – P.D987–D990.

177. Saver, J.L. Time Is Brain—Quantified / J.L. Saver // *Stroke*. – 2006. – V. 37, – № 1. – P. 263–266.
178. Schaible, E.-V. Single administration of tripeptide  $\alpha$ -MSH(11–13) attenuates brain damage by reduced inflammation and apoptosis after experimental traumatic brain injury in mice / E.-V. Schaible, A. Steinsträßer, A. Jahn-Eimermacher, C. Luh, A. Sebastiani, F. Kornes, D. Pieter, M.K. Schäfer, K. Engelhard, S.C. Thal // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8, – № 8. – C.e71056.
179. Schena, M. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a Complementary DNA Microarray / M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown // *Science*. – 1995. – V. 270, – № 5235. – P. 467–470.
180. Schmitz, B. Functional activation of cerebral blood flow after cardiac arrest in rat / B. Schmitz, B.W. Böttiger, K.-A. Hossmann // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 1997. – V. 17, – № 11. – P. 1202–1209.
181. Schonthaler, H.B. S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3 / H.B. Schonthaler, J. Guinea-Viniegra, S.K. Wculek, I. Ruppen, P. Ximénez-Embún, A. Guío-Carrión, R. Navarro, N. Hogg, K. Ashman, E.F. Wagner // *Immunity*. – 2013. – V. 39, – № 6. – P. 1171–1181.
182. Schuhmann, M.U. Brain injury and proteomics/peptidomics: is it relevant? An overview, 2005. – 465–470c.
183. Schultz, W. Multiple dopamine functions at different time courses / W. Schultz // *Annual Review of Neuroscience* – 2007. – V. 30, – № 1. – P. 259–288.
184. Sharkey, J. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery / J. Sharkey, S.P. Butcher // *Journal of Neuroscience Methods*. – 1995. – V. 60, – № 1–2. – P. 125–131.
185. Shigeno, T. Recirculation model following MCA occlusion in rats / T. Shigeno, G.M. Teasdale, J. McCulloch, D.I. Graham // *Journal of Neurosurgery* – 1985. – V. 63, – № 2. – P. 272–277.

186. Shigyo, M. Extracellular vimentin interacts with insulin-like growth factor 1 receptor to promote axonal growth / M. Shigyo, T. Kuboyama, Y. Sawai, M. Tada-Umezaki, C. Tohda // *Scientific Reports*. – 2015. – V. 5, – № 1. – P.12055.
187. Shilling, P.D. Functional genomics approaches to understanding brain disorders / P.D. Shilling, J.R. Kelsoe // *Pharmacogenomics*. – 2002. – V. 3, – № 1. – P. 31–45.
188. Shintani, T. Autophagy in health and disease: A double-edged sword / T. Shintani, D.J. Klionsky // *Science*. – 2004. – V. 306, – № 5698. – C. 990–995.
189. Shiroguchi, K. Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes / K. Shiroguchi, T.Z. Jia, P.A. Sims, X.S. Xie // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109, – № 4. – P. 1347–1352.
190. Soltys, Z. Morphological transformations of cells immunopositive for GFAP, TrkA or p75 in the CA1 hippocampal area following transient global ischemia in the rat. A quantitative study / Z. Soltys, K. Janeczko, O. Orzyłowska-Śliwińska, M. Zaremba, S. Januszewski, B. Oderfeld-Nowak // *Brain Research*. – 2003. – V. 987, – № 2. – P. 186–193.
191. Spencer, G.E. Neurotransmitters and neurodevelopment. Role of dopamine in neurite outgrowth, target selection and specific synapse formation. / G.E. Spencer, J. Klumperman, N.I. Syed // *Perspectives on developmental neurobiology*. – 1998. – V. 5, – № 4. – P. 451–467.
192. Storozhevykh, T.P. Effects of semax and its Pro-Gly-Pro fragment on calcium homeostasis of neurons and their survival under conditions of glutamate toxicity / T.P. Storozhevykh, G.R. Tukhbatova, Y.E. Senilova, V.G. Pinelis, L.A. Andreeva, N.F. Myasoyedov // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2007. – V. 143, – № 5. – P. 601–604.
193. Su, W. Desmin variants: Trigger for cardiac arrhythmias? / W. Su, S.W. van Wijk, B.J.J.M. Brundel // *Frontiers in Cell and Developmental Biology* – 2022. – 10:986718
194. Sugio, K. A model of bilateral hemispheric ischemia--modified four-vessel occlusion in rats / K. Sugio, N. Horigome, T. Sakaguchi, M. Goto // *Stroke*. – 1988. – V. 19, – № 7. – P. 922.

195. Sultan, M. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome / M. Sultan, M.H. Schulz, H. Richard, A. Magen, A. Klingenhoff, M. Scherf, M. Seifert, T. Borodina, A. Soldatov, D. Parkhomchuk, D. Schmidt, S. O’Keeffe, S. Haas, M. Vingron, H. Lehrach, M.-L. Yaspo // *Science*. – 2008. – V. 321, – № 5891. – P. 956–960.
196. Sun, S.-L. Modulation of signal transducers and activators of transcription (STAT) factor pathways during focal cerebral ischaemia: a gene expression array study in rat hippocampus after middle cerebral artery occlusion / S.-L. Sun, T.-J. Li, P.-Y. Yang, Y. Qiu, Y.-C. Rui // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. – 2007. – C.070717222933011
197. Szalay, G. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke / G. Szalay, B. Martinecz, N. Lénárt, Z. Környei, B. Orsolits, L. Judák, E. Császár, R. Fekete, B.L. West, G. Katona, B. Rózsa, Á. Dénes // *Nature Communications*. – 2016. – V. 7, – № 1. – P.11499.
198. Tabbì, G. Semax, an ACTH4-10 peptide analog with high affinity for copper(II) ion and protective ability against metal induced cell toxicity / G. Tabbì, A. Magrì, A. Giuffrida, V. Lanza, G. Pappalardo, I. Naletova, V.G. Nicoletti, F. Attanasio, E. Rizzarelli // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2015. – V. 142. – P. 39–46.
199. Takemoto, O. Induction of c- fos and c- jun Gene Products and Heat Shock Protein After Brief and Prolonged Cerebral Ischemia in Gerbils / O. Takemoto, H. Tomimoto, T. Yanagihara // *Stroke*. – 1995. – V. 26, – № 9. – P. 1639–1648.
200. Tamura, A. Focal cerebral ischaemia in the rat: description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion / A. Tamura, D.I. Graham, J. McCulloch, G.M. Teasdale // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 1981. – V. 1, – № 1. – P. 53–60.
201. Thorey, I.S. The Ca<sup>2+</sup>-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes / I.S. Thorey, J. Roth, J. Regenbogen, J.-P. Halle, M. Bittner, T. Vogl, S. Kaesler, P. Bugnon, B. Reitmaier, S. Durka, A. Graf, M. Wöckner, N. Rieger, A. Konstantinow, E. Wolf, A. Goppelt, S. Werner // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276, – № 38. – P. 35818–35825.

202. Trost, B. Concordance between RNA-sequencing data and DNA microarray data in transcriptome analysis of proliferative and quiescent fibroblasts / B. Trost, C.A. Moir, Z.E. Gillespie, A. Kusalik, J.A. Mitchell, C.H. Eskiw // *Royal Society Open Science*. – 2015. – V. 2, – № 9. – P.150402.
203. Uchiyama, Y. Autophagy–physiology and pathophysiology / Y. Uchiyama, M. Shibata, M. Koike, K.Yoshimura, M. Sasaki // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2008. – V. 129, – № 4. – P. 407–420.
204. Uno, K. The Piccolo intronic single nucleotide polymorphism rs13438494 regulates dopamine and serotonin uptake and shows associations with dependence-like behavior in genomic association study / K. Uno, D. Nishizawa, S. Seo, K. Takayama, S. Matsumura, N. Sakai, K. Ohi, T. Nabeshima, R. Hashimoto, N. Ozaki, J. Hasegawa, N. Sato, F. Tanioka, H. Sugimura, K.-I. Fukuda, S. Higuchi, H. Ujike, T. Inada, N. Iwata, I. Sora, M. Iyo, N. Kondo, M.-J. Won, N. Naruse, K. Uehara-Aoyama, M. Itokawa, M. Yamada, K. Ikeda, Y. Miyamoto, A. Nitta // *Current Molecular Medicine*. – 2015. – V. 15, – № 3. – P. 265–274.
205. Varga, R. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene / R. Varga // *Journal of Medical Genetics*. – 2003. – V. 40, – № 1. – P. 45–50.
206. Virani, S.S. Heart disease and stroke statistics—2020 Update: A report from the American Heart Association / S.S. Virani, A. Alonso, E.J. Benjamin, M.S. Bittencourt, C.W. Callaway, A.P. Carson, A.M. Chamberlain, A.R. Chang, S. Cheng, F.N. Delling, L. Djousse, M.S.V. Elkind, J.F. Ferguson, M. Fornage, S.S. Khan, B.M. Kissela, K.L. Knutson, T.W. Kwan, D.T. Lackland, T.T. Lewis, J.H. Lichtman, C.T. Longenecker, M.S. Loop, P.L. Lutsey, S.S. Martin, K. Matsushita, A.E. Moran, M.E. Mussolino, A.M. Perak, W.D. Rosamond, G.A. Roth, U.K.A. Sampson, G.M. Satou, E.B. Schroeder, S.H. Shah, C.M. Shay, N.L. Spartano, A. Stokes, D.L. Tirschwell, L.B. VanWagner, C.W. Tsao // *Circulation*. – 2020. – V. 141, – № 9.
207. Vyunova, T.V. Peptide based anxiolytics: the molecular aspects of heptapeptide Selank biological activity / T. Vyunova, L. Andreeva, K. Shevchenko and N. Myasoedov // *Protein. Pept. Lett.* – 2018. - V. 25, – P. 914–923.

208. Vyunova, T.V. Synacton and individual activity of synthetic and natural corticotropins/ T.V. Vyunova, L.A. Andreeva, K.V. Shevchenko, N.F. Myasoedov, N.F. // -J. Mol. Recognit., 30, e2597
209. Wang, C. Inhibition of calpains protects Mn-induced neurotransmitter release disorders in synaptosomes from mice: Involvement of SNARE complex and synaptic vesicle fusion / C. Wang, B. Xu, Z. Ma, C. Liu, Y. Deng, W. Liu, Z.-F. Xu // Scientific Reports. – 2017. – V. 7, – № 1. – P. 3701.
210. Wang, C. Global gene expression profile of cerebral ischemia-reperfusion injury in rat MCAO model / C. Wang, M. Liu, Y. Pan, B. Bai, J. Chen // Oncotarget. – 2017. – V. 8, – № 43. – P. 74607–74622.
211. Wang, M. Selective D2 receptor actions on the functional circuitry of working memory / M. Wang, S. Vijayraghavan, P.S. Goldman-Rakic // Science – 2004. – V. 303, – № 5659 – P. 853–856.
212. Wang, S. S100A8/A9 in inflammation / S. Wang, R. Song, Z. Wang, Z. Jing, S. Wang, J. Ma // Frontiers in Immunology. – 2018. – V. 9.
213. Wang, Z. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics / Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder // Nature Reviews Genetics. – 2009. – V. 10, – № 1. – P. 57–63.
214. Watson, B.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis / B.D. Watson, W.D. Dietrich, R. Busto, M.S. Wachtel, M.D. Ginsberg // Annals of Neurology. – 1985. – V. 17, – № 5. – P. 497–504.
215. White, B.C. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury / B.C. White, J.M. Sullivan, D.J. DeGracia, B.J. O’Neil, R.W. Neumar, L.I. Grossman, J.A. Rafols, G.S. Krause // Journal of the Neurological Sciences. – 2000. – V. 179, – № 1–2. – P. 1–33.
216. Williams, RS. Heat shock proteins and ischemic injury to the myocardium / RS Williams // Circulation. – 1997. – V. 96, – P. 4138–4140.
217. Wilson, K.E. Functional genomics and proteomics: application in neurosciences / K.E. Wilson, M.M. Ryan, J.E. Prime, D.P. Pashby, P.R. Orange, G. O’Beirne, J.G. Whateley, S. Bahn, C.M. Morris // Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry – 2004. – V. 75, – № 4. – P. 529–538.

218. Wong, E. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases / E. Wong, A.M. Cuervo // *Nature Neuroscience*. – 2010. – V. 13, – № 7. – P. 805–811.
219. Wu Z. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease / Z. Wu, Z. Zhang, Z. Lei, P. Lei // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2019. – V. 48, – P. 24–31.
220. Xing, B. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat / B. Xing, H. Chen, M. Zhang, D. Zhao, R. Jiang, X. Liu, S. Zhang // *Stroke*. – 2008. – V. 39, – № 8. – P. 2362–2369.
221. Yang, X. Inhibition of mTOR pathway by Rapamycin reduces brain damage in rats subjected to transient forebrain ischemia / X. Yang, C. Hei, P. Liu, Y. Song, T. Thomas, S. Tshimanga, F. Wang, J. Niu, T. Sun, P.A. Li // *International Journal of Biological Sciences*. – 2015. – V. 11, – № 12 – P. 1424–1435.
222. Ye, N. Orphan receptor GPR88 as an emerging neurotherapeutic target / N. Ye, B. Li, Q. Mao, E.A. Wold, S. Tian, J.A. Allen, J. Zhou // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2019. – V. 10, – № 1. – P. 190–200.
223. Zee, C.E.E.M. Van der  $\alpha$ -MSH and Org.2766 in peripheral nerve regeneration: different routes of delivery / C.E.E.M. Van der Zee, J.H. Brakkee, W.H. Gispen // *European Journal of Pharmacology*. – 1988. – V. 147, – № 3. – P. 351–357.
224. Zhang, Y.-Q. Dopamine D2 receptor regulates cortical synaptic pruning in rodents / Y.-Q. Zhang, W.-P. Lin, L.-P. Huang, B. Zhao, C.-C. Zhang, D.-M. Yin // *Nature Communications* – 2021. – V. 12, – № 1. – P. 6444.
225. Zhao, S. Comparison of RNA-seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells / S. Zhao, W.-P. Fung-Leung, A. Bittner, K. Ngo, X. Liu // *PLoS ONE* – 2014. – V. 9, – № 1. – e78644.
226. Zheng, Y. Inhibition of autophagy contributes to melatonin-mediated neuroprotection against transient focal cerebral ischemia in rats / Y. Zheng, J. Hou, J. Liu, M. Yao, L. Li, B. Zhang, H. Zhu, Z. Wang // *Journal of Pharmacological Sciences* – 2014. – V. 124, – № 3. – P. 354–364.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Анализ функциональных категорий ДЭГ в условиях переходящей фокальной ишемии головного мозга и под действием семакса

**Таблица А.1** – Анализ функциональных категорий для групп IR4,5 vs. SH4,5; IR24 vs. SH24; SH4,5 vs. SH24. Продемонстрировано количество ДЭГ с повышенной (Up) и пониженной (Down) экспрессией, а также  $p$  – значений, скорректированных с использованием метода Бенджамини – Хохберга ( $P_{adj}$ ). Показаны функциональные категории с  $p < 0,05$ .

Функциональные категории	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24			SH24 vs. SH4.5		
	Up	Down	$P_{adj}$	Up	Down	$P_{adj}$	Up	Down	$P_{adj}$
Innate immunity	10	3	5,04E-04	35	3	2,17E-09			
Inflammatory response	12	0	5,89E-05	16	2	6,39E-03			
Stress response	7	0	2,80E-03	12	0	1,70E-02			
Differentiation	14	3	3,38E-02	29	24	1,62E-03			
Cell adhesion	12	4	2,20E-02	29	23	7,52E-05			
Transcription regulation	35	5	3,54E-04	67	48	1,77E-04			
DNA replication				14	0	4,54E-03			
Adaptive immunity				13	4	5,51E-05			
Apoptosis				38	10	3,38E-04			
Synapse				2	58	4,10E-07			

Продолжение Таблицы А.1

Функциональные категории	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24			SH24 vs. SH4.5		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
Ion channel				10	43	8,05E-05			
Neurogenesis				9	23	1,30E-04			
Angiogenesis				10	5	2,02E-03	4	7	7,20E-04
Ubl conjugation	39	2	6,61E-05	94	30	2,67E-07			
Proto-oncogene	7	0	5,10E-03	13	1	8,79E-04			
Phosphoprotein	115	27	6,61E-07	375	245	1,76E-41	98	108	1,08E-05
Cytoplasm	75	15	4,82E-05	219	131	2,52E-17			
Nucleus	73	12	7,10E-04	198	92	2,88E-05			
DNA-binding	41	5	5,05E-05						
Transferase	38	7	4,49E-02	100	75	1,14E-06			
Transcription	35	5	9,68E-04	69	48	7,27E-04			
Developmental protein	18	6	9,99E-03	33	39	1,26E-03	15	21	7,67E-03
Lipoprotein	17	5	2,87E-02	36	40	8,48E-05			
Lipid biosynthesis	8	2	1,27E-02						
Sterol metabolism	7	1	1,67E-03						

Продолжение Таблицы А.1

Функциональные категории	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24			SH24 vs. SH4.5		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
Chemotaxis	7	1	2,04E-03						
Steroid metabolism	7	1	5,49E-03						
Heparin-binding	6	1	9,69E-03						
Steroid biosynthesis	6	0	8,41E-03						
Cholesterol metabolism	5	1	2,23E-02						
Sterol biosynthesis	5	0	1,38E-02						
Sulfation	4	1	2,90E-02						
Immunity	13	5	3,33E-04	53	7	7,73E-13			
SH2 domain				16	3	7,79E-05			
Chaperone				23	1	6,16E-04			
Acetylation				186	45	1,15E-06			
Activator				33	10	3,07E-03			
Isopeptide bond				61	14	1,61E-04			
Helicase				14	1	1,99E-02			
LIM domain				12	3	3,20E-02			

Продолжение Таблицы А.1

Функциональные категории	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24			SH24 vs. SH4.5		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
Synaptosome				1	12	1,98E-02			
Calcium channel				2	10	2,14E-02			
Potassium channel				1	14	1,99E-02			
Calcium transport				2	15	4,34E-03			
Potassium transport				2	19	8,46E-03			
Potassium				4	19	6,95E-03			
Voltage-gated channel				4	23	1,16E-03			
Postsynaptic cell membrane				2	33	1,43E-05			
Cell junction				21	70	1,09E-09			
Protein phosphatase inhibitor				1	6	2,39E-02			
Sarcoplasmic reticulum				1	7	3,28E-02			
Serine/threonine-protein kinase				17	26	4,87E-03			
Biological rhythms							4	7	2,42E-02
Signal	67	36	1,47E-02	239	169	6,27E-08			
Disulfide bond	59	39	7,97E-09	180	134	9,02E-14	50	59	2,51E-02

Продолжение Таблицы А.1

Функциональные категории	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24			SH24 vs. SH4.5		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
Glycoprotein	60	37	5,16E-09	179	171	5,10E-28	53	64	3,53E-04
Secreted	34	23	1,53E-07	96	49	1,91E-05			
Lipid metabolism	13	6	3,10E-03						
Cleavage on pair of basic residues	10	5	1,04E-03						
Extracellular matrix	6	6	3,23E-03	17	15	2,26E-05			
Pyrrolidone carboxylic acid	3	3	3,31E-02						
Hydroxylation				10	4	5,18E-03			
Myristate				11	8	1,42E-02			
Tyrosine-protein kinase				15	8	3,17E-04			
Microsome				10	8	4,70E-03			
Calmodulin-binding				13	19	2,04E-07			
EGF-like domain				14	20	3,60E-04			
Repressor				22	12	1,23E-02			
SH3 domain				20	14	1,62E-04			
Actin-binding				18	20	1,27E-05			

Продолжение Таблицы А.1

Функциональные категории	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24			SH24 vs. SH4.5		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
Immunoglobulin domain				24	18	3,04E-03			
Palmitate				16	19	1,29E-02			
Cell projection				21	40	4,76E-04			
Methylation				42	37	4,03E-06			
Cytoskeleton				44	31	2,94E-03			
Endoplasmic reticulum				54	35	2,87E-05			
Ion transport				22	61	2,05E-05			
Kinase				51	46	4,81E-06			
Calcium				50	69	7,22E-14			
ATP-binding				94	59	1,20E-07			
Hydrolase				102	55	5,00E-04			
Alternative splicing				57	106	1,22E-15			
Transport				73	89	5,45E-03			
Nucleotide-binding				118	83	4,89E-11			
Metal-binding				136	127	1,80E-05			

Продолжение Таблицы А.1

Функциональные категории	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24			SH24 vs. SH4.5		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
Calcium/phospholipid-binding				5	2	6,38E-03			
Integrin				9	4	6,37E-03			
Collagen				11	6	1,64E-03			
Metalloprotease				12	8	1,25E-02			
Glycosyltransferase				17	8	5,08E-03			
GTP-binding				23	19	1,59E-03			
Signal-anchor				25	20	3,45E-05			
Protease				43	15	3,20E-02			
Golgi apparatus				41	20	2,08E-02			
Membrane				383	367	8,24E-04			

**Таблица А.2** – Анализ функциональных категорий IS24 vs. IR24. Продемонстрировано количество ДЭГ с повышенной (Up) и пониженной (Down) экспрессией, а также  $p$  – значений, скорректированных с использованием метода Бенджамини – Хохберга ( $P_{adj}$ ). Показаны функциональные категории с  $p < 0,05$ . Цветом выделены функциональные категории, в которых более чем 80% генов показали пониженную или повышенную экспрессию.

Функциональные категории	Up	Down	$P_{adj}$	Up/(Up+Down), %	Down/(Up+Down), %
Disulfide bond	48	71	1,42E-23	40,3	59,7
Glycoprotein	49	59	2,22E-22	45,4	54,6
Signal	50	75	6,39E-14	40	60
Secreted	15	45	7,28E-12	25	75
Calcium	20	19	4,77E-09	51,3	48,7
Extracellular matrix	6	12	3,45E-08	33,3	66,7
Phosphoprotein	62	64	1,28E-07	49,2	50,8
Cell junction	27	4	3,40E-07	87,1	12,9
Synapse	22	1	2,14E-06	95,7	4,3
Membrane	101	80	1,53E-05	55,8	44,2
Alternative splicing	21	15	2,32E-05	58,3	41,7

Продолжение Таблицы А.2

<b>Функциональные категории</b>	<b>Up</b>	<b>Down</b>	<b>Padj</b>	<b>Up/(Up+Down), %</b>	<b>Down/(Up+Down), %</b>
Proteoglycan	2	6	6,76E-05	25	75
Innate immunity	2	11	8,42E-05	15,4	84,6
Immunity	2	13	1,83E-03	13,3	86,7
Postsynaptic cell membrane	11	1	2,57E-03	91,7	8,3
Metal-binding	33	32	3,61E-03	50,8	49,2
Neurogenesis	7	4	6,90E-03	63,6	36,4
Transmembrane helix	77	66	6,95E-03	53,8	46,2
Methylation	10	11	7,09E-03	47,6	52,4
Ion transport	15	8	7,09E-03	65,2	34,8
Microsome	1	3	7,47E-03	25	75
Transmembrane	77	66	8,07E-03	53,8	46,2
Glycosyltransferase	2	3	9,22E-03	40	60
Cytoplasm	31	36	1,41E-02	46,3	53,7
Cell membrane	51	29	1,73E-02	63,8	36,3
Calcium/phospholipid-binding	1	3	2,02E-02	25	75

Продолжение Таблицы А.2

<b>Функциональные категории</b>	<b>Up</b>	<b>Down</b>	<b>Padj</b>	<b>Up/(Up+Down), %</b>	<b>Down/(Up+Down), %</b>
Intermediate filament	1	6	2,03E-02	14,3	85,7
Leucine-rich repeat	5	6	2,10E-02	45,5	54,5
Lipid degradation	4	3	2,77E-02	57,1	42,9
Cell adhesion	8	6	3,31E-02	57,1	42,9
Endoplasmic reticulum	11	6	3,74E-02	64,7	35,3
Calmodulin-binding	7	1	3,74E-02	87,5	12,5
Ion channel	11	3	3,87E-02	78,6	21,4
Ubl conjugation	11	16	4,37E-02	40,7	59,3

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Функциональные категории нейротрансмиттерных и воспалительных систем для групп IR4,5 vs. SH4,5; IR24 vs. SH24; IR24 vs. IS24

**Таблица Б.3** – Анализ генов в подкорковых структурах мозга крысы с помощью метода RNA – seq, связанных с функциональной категорией «Cell junction». Цветом обозначены достоверные изменения экспрессии генов,  $p < 0,05$

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001009620	Tmem204	transmembrane protein 204 (Tmem204), mRNA	chr10:14233029-14258432	0,571	4,78E-02	0,668	2,15E-02	1,159	7,08E-01
NM_001106846	Cldn2	claudin 2 (Cldn2), mRNA	chr3:53461936-53472528	0,579	3,02E-02	1,041	8,10E-01	0,652	1,02E-02
NM_031329	Ocln	occludin (Ocln), mRNA	chr2:49686707-49736838	0,605	1,01E-02	0,887	4,54E-01	0,988	9,84E-01
NM_013185	Hck	hemopoietic cell kinase (Hck), mRNA	chr3:154982908-155025528	0,917	8,86E-01	4,040	3,93E-04	0,850	5,79E-01
NM_001127446	Dlc1	DLC1 Rho GTPase activating protein (Dlc1), mRNA	chr16:58878662-58926658	1,513	7,85E-03	0,937	6,63E-01	1,060	8,69E-01
NM_173101	Myo1e	myosin IE, mRNA	chr8:76241675-76432611	1,514	7,85E-03	1,287	4,12E-02	0,790	1,64E-01
NM_012567	Gja1	gap junction protein, alpha 1 (Gja1), mRNA	chr20:39612107-39624552	0,935	8,15E-01	0,691	1,04E-03	1,534	2,05E-03

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_052805	Chrna3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3 (neuronal) (Chrna3), mRNA	chr8:58176164-58189008	1,325	6,00E-01	0,968	8,83E-01	0,415	2,05E-03
NM_031751	Shank1	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1 (Shank1), mRNA	chr1:101362267-101409488	0,827	3,61E-01	0,819	1,01E-01	1,573	2,05E-03
NM_019146	Bsn	bassoon (presynaptic cytomatrix protein) (Bsn), mRNA	chr8:116227801-116319071	0,940	8,23E-01	0,669	3,93E-04	1,520	2,05E-03
NM_012956	Gabrb1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1 (Gabrb1), mRNA	chr14:38453153-38924067	0,855	5,59E-01	1,058	7,42E-01	1,503	8,93E-03
NM_012574	Grin2b	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B (Grin2b), mRNA	chr4:233824033-234258927	0,983	9,62E-01	0,673	3,93E-04	1,522	2,05E-03
NM_031005	Actn1	actinin, alpha 1 (Actn1), mRNA	chr6:116056247-116149471	1,530	2,00E-03	0,983	9,18E-01	0,944	8,65E-01
NM_139230	Nexn	nexilin (F actin binding protein) (Nexn), transcript variant s, mRNA	chr2:276130292-276151480	1,586	5,14E-03	0,567	3,93E-04	1,321	2,12E-01

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001109885	Fam129b	family with sequence similarity 129, member B (Fam129b), mRNA	chr3:17257992-17346096	1,404	2,25E-01	2,327	3,93E-04	0,809	3,72E-01
NM_013180	Itgb4	integrin, beta 4 (Itgb4), mRNA	chr10:103725178-103761358	0,764	3,19E-01	2,263	3,93E-04	0,683	1,35E-02
NM_001107248	Vcl	vinculin (Vcl), mRNA	chr15:3433520-3522277	1,645	2,00E-03	1,237	8,25E-02	1,015	9,73E-01
NM_053570	Cxadr	coxsackie virus and adenovirus receptor (Cxadr), mRNA	chr11:20481045-20528211	1,648	7,85E-03	0,716	2,67E-02	1,045	9,41E-01
NM_138894	Grasp	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein (Grasp), mRNA	chr7:140670665-140678432	1,926	2,00E-03	0,696	6,82E-03	1,160	6,00E-01
NM_001107254	Samd4a	sterile alpha motif domain containing 4A, mRNA	chr15:27721128-27820974	2,144	2,00E-03	1,377	3,16E-02	0,982	9,75E-01
NM_001039344	Tes	testis derived transcript (Tes), mRNA	chr4:44929780-44968306	2,370	2,00E-03	1,298	8,06E-02	0,773	2,29E-01
NM_031591	Pecam1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (Pecam1), mRNA	chr10:94598950-94660385	1,375	8,35E-02	2,046	3,93E-04	0,727	3,16E-02
NM_001100762	Havcr2	hepatitis A virus cellular receptor 2 (Havcr2), mRNA	chr10:31377041-31403296	2,545	2,00E-03	1,520	4,15E-02	0,805	5,54E-01

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_134346	Rap1b	RAP1B, member of RAS oncogene family (Rap1b), mRNA	chr7:60853892-60860953	1,243	3,70E-01	1,912	3,93E-04	0,822	3,10E-01
NM_020656	Parva	parvin, alpha (Parva), mRNA	chr1:184227711-184383031	0,973	9,62E-01	1,890	3,93E-04	0,815	4,08E-01
NM_017022	Itgb1	integrin, beta 1 (Itgb1), mRNA	chr19:72324611-72372325	1,036	9,11E-01	1,839	3,93E-04	0,944	8,58E-01
NM_021851	Lin7c	lin-7 homolog C (C, elegans) (Lin7c), mRNA	chr3:107611031-107618344	1,114	7,86E-01	1,838	3,93E-04	0,829	4,88E-01
NM_013133	Glr1	glycine receptor, alpha 1 (Glr1), mRNA	chr10:40687416-40784393	1,387	1,00E+00	1,827	2,76E-02	0,954	9,55E-01
NM_012523	Cd53	Cd53 molecule (Cd53), mRNA	chr2:228956378-229004197	1,160	6,76E-01	1,786	3,93E-04	0,702	6,02E-02
NM_001105755	Pkn2	protein kinase N2 (Pkn2), mRNA	chr2:267265824-267370861	1,312	1,17E-01	1,649	3,93E-04	0,954	9,01E-01
NM_023970	Trpv4	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 (Trpv4), mRNA	chr12:49492069-49529956	1,071	1,00E+00	1,645	1,02E-02	0,760	3,53E-01
NM_001105719	Mip	major intrinsic protein of lens fiber (Mip), mRNA	chr7:2614618-2621871	1,404	2,64E-02	1,644	7,32E-04	0,605	2,05E-03

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001112737	Limd1	LIM domains containing 1 (Limd1), mRNA	chr8:131705917-131751524	1,256	4,28E-01	1,637	1,34E-03	0,976	9,63E-01
NM_001107197	Igsf9	immunoglobulin superfamily, member 9 (Igsf9), mRNA	chr13:95389057-95405643	3,413	2,00E-03	0,636	1,00E+00	1,101	1,00E+00
NM_020308	Adam15	ADAM metallopeptidase domain 15 (Adam15), mRNA	chr2:208071873-208082511	0,906	6,89E-01	1,603	3,93E-04	0,883	5,76E-01
NM_001191840	Tgfb1i1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 (Tgfb1i1), mRNA	chr1:206710119-206716915	1,023	9,60E-01	1,588	1,04E-03	0,838	4,56E-01
NM_001012147	Pxn	paxillin (Pxn), mRNA	chr12:48595403-48642172	1,062	8,50E-01	1,563	3,93E-04	0,905	6,93E-01
NM_001004245	Esam	endothelial cell adhesion molecule (Esam), mRNA	chr8:39998698-40009626	1,290	2,19E-01	1,558	3,93E-04	0,791	1,90E-01
NM_031699	Cldn1	claudin 1 (Cldn1), mRNA	chr11:82888891-82904046	0,743	4,77E-01	1,557	2,17E-02	0,460	5,13E-03
NM_021654	Gja4	gap junction protein, alpha 4 (Gja4), mRNA	chr5:149142701-149145235	1,765	6,67E-02	1,550	2,29E-02	0,852	6,76E-01
NM_032063	Dll1	delta-like 1 (Drosophila) (Dll1), mRNA	chr1:242107683-242115792	1,360	3,66E-01	0,666	3,72E-02	1,312	4,17E-01
NM_001047102	Cadm2	cell adhesion molecule 2 (Cadm2), mRNA	chr11:7871256-8090075	0,779	2,58E-01	0,665	1,34E-03	1,488	1,24E-02

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001106525	Snph	Syntaphilin, mRNA	chr3:153455881-153496985	0,790	1,71E-01	0,663	3,93E-04	1,352	3,26E-02
NM_012832	Chrna7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal) (Chrna7), mRNA	chr1:125029450-125158153	0,872	7,80E-01	0,661	3,86E-02	1,205	6,48E-01
NM_001108721	Prima1	proline rich membrane anchor 1 (Prima1), mRNA	chr6:136279361-136330870	1,335	1,32E-01	0,660	1,34E-03	1,193	4,61E-01
NM_031608	Gria1	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1, mRNA	chr10:42257735-42571220	0,923	7,50E-01	0,659	3,93E-04	1,291	9,59E-02
NM_001111114	Grik1	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1 (Grik1), mRNA	chr11:31426626-31828315	0,951	9,08E-01	0,658	5,11E-03	1,316	2,19E-01
NM_153470	Lzts1	leucine zipper, putative tumor suppressor 1 (Lzts1), mRNA	chr16:22147126-22202136	0,769	1,00E-01	0,653	3,93E-04	1,404	1,52E-02
NM_053473	Ppp1r9a	protein phosphatase 1, regulatory subunit 9A (Ppp1r9a), mRNA	chr4:29885035-30148874	0,940	8,36E-01	0,653	3,93E-04	1,454	7,84E-03
NM_024379	Grid2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2 (Grid2), mRNA	chr4:158857418-160229216	0,998	9,96E-01	0,652	1,04E-03	1,362	1,18E-01

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_053621	Magi2	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2 (Magi2), mRNA	chr4:10987830-12456503	0,971	9,32E-01	0,642	3,93E-04	1,393	1,99E-02
NM_031730	Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2 (Kcnd2), mRNA	chr4:48099454-48609211	0,879	5,53E-01	0,642	3,93E-04	1,301	8,61E-02
NM_001270602	Grin1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1 (Grin1), mRNA	chr3:2487838-2516076	0,873	5,49E-01	0,641	3,93E-04	1,182	3,89E-01
NM_031024	Dbn1	drebrin 1 (Dbn1), mRNA	chr17:11788596-11802569	0,944	8,41E-01	0,640	3,93E-04	1,174	4,09E-01
NM_001025132	Cnih2	cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2 (Cnih2), mRNA	chr1:227405538-227411186	0,742	4,38E-02	0,638	3,93E-04	1,293	1,02E-01
NM_001025114	Wasf1	WAS protein family, member 1 (Wasf1), mRNA	chr20:50107710-50155913	0,918	7,33E-01	0,633	3,93E-04	1,296	8,61E-02
NM_020093	Park2	parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase (Park2), mRNA	chr1:49684357-50873567	1,338	4,65E-01	0,632	3,46E-02	1,130	8,35E-01

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001108938	Egflam	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains (Egflam), mRNA	chr2:76243790-76418008	0,743	2,52E-01	0,628	2,15E-03	1,163	6,32E-01
NM_145671	Klhl17	kelch-like family member 17 (Klhl17), mRNA	chr5:177128899-177133709	0,944	8,97E-01	0,625	1,34E-03	1,136	7,30E-01
NM_012573	Grin2a	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A (Grin2a), mRNA	chr10:4524961-4936873	0,808	3,66E-01	0,623	3,93E-04	1,334	8,48E-02
NM_021695	Synpo	synaptopodin (Synpo), mRNA	chr18:55104199-55125190	1,082	7,66E-01	0,622	3,93E-04	1,273	1,55E-01
NM_001110797	Pclo	piccolo presynaptic cytomatrix protein, mRNA	chr4:16428813-17031648	0,956	8,79E-01	0,621	3,93E-04	1,649	2,05E-03
NM_022282	Dlg2	discs, large homolog 2 (Drosophila) (Dlg2), mRNA	chr1:161406478-163514243	1,054	9,11E-01	0,619	9,70E-03	1,488	1,18E-01
NM_001005244	Dmd	dystrophin (Dmd), transcript variant Dp71ab, mRNA	chrX:53540768-53697914	1,146	6,50E-01	0,612	3,93E-04	1,338	1,41E-01
NM_020088	Tenm2	teneurin transmembrane protein 2, mRNA	chr10:20716457-21659087	0,986	9,67E-01	0,608	3,93E-04	1,506	2,05E-03
NM_001276470	Prprt2	proline-rich transmembrane protein 2 (Prprt2), transcript	chr1:205431759-205435350	0,921	7,71E-01	0,606	3,93E-04	1,170	4,76E-01

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
		variant 1, mRNA							
NM_053901	Dlgap2	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2 (Dlgap2), mRNA	chr16:79447601-80163271	1,417	5,00E-02	0,605	3,93E-04	1,401	7,59E-02
NM_057142	Lrrc7	leucine rich repeat containing 7 (Lrrc7), mRNA	chr2:283549881-283934360	1,006	9,90E-01	0,603	3,93E-04	1,510	5,13E-03
NM_001004133	Shank2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2 (Shank2), mRNA	chr1:224028790-224449190	0,905	6,80E-01	0,602	3,93E-04	1,384	2,29E-02
NM_053788	Stx1a	syntaxin 1A (brain) (Stx1a), mRNA	chr12:26682319-26710272	0,900	6,79E-01	0,601	3,93E-04	1,550	2,05E-03
NM_138535	Grip2	glutamate receptor interacting protein 2 (Grip2), mRNA	chr4:188120213-188170080	0,972	9,46E-01	0,601	3,93E-04	1,310	1,64E-01
NM_001113409	Syngap1	synaptic Ras GTPase activating protein 1 (Syngap1), mRNA	chr20:7594613-7623865	0,800	2,13E-01	0,601	3,93E-04	1,359	3,99E-02
NM_138835	Syt12	synaptotagmin XII (Syt12), mRNA	chr1:226557950-226587017	0,843	5,52E-01	0,599	7,32E-04	1,156	6,40E-01
NM_017318	Ptk2b	protein tyrosine kinase 2 beta (Ptk2b), mRNA	chr15:48646612-48766698	0,903	6,76E-01	0,594	3,93E-04	1,346	4,25E-02

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_175754	Aggrn	agrin (Aggrn), mRNA	chr5:177063798-177085091	0,947	8,49E-01	0,593	3,93E-04	1,413	1,24E-02
NM_001270576	Snap25	synaptosomal-associated protein 25 (Snap25), mRNA	chr3:136182050-136269422	1,229	3,53E-01	0,589	3,93E-04	1,200	3,48E-01
NM_019375	Sept3	septin 3 (Sept3), mRNA	chr7:123491252-123511261	0,958	8,85E-01	0,581	3,93E-04	1,382	2,37E-02
NM_053388	Gjb6	gap junction protein, beta 6 (Gjb6), mRNA	chr15:41248074-41256852	0,806	2,64E-01	0,578	3,93E-04	1,466	7,84E-03
NM_139330	Sipa111	signal-induced proliferation-associated 1 like 1 (Sipa111), mRNA	chr6:114193904-114304588	0,977	9,47E-01	0,570	3,93E-04	1,458	3,67E-03
NM_053764	Rgs14	regulator of G-protein signaling 14 (Rgs14), mRNA	chr17:11887269-11901352	0,736	7,05E-02	0,562	3,93E-04	1,413	2,29E-02
NM_022940	Pdzd2	PDZ domain containing 2 (Pdzd2), mRNA	chr2:82185699-82288609	0,984	9,62E-01	0,553	3,93E-04	1,534	2,05E-03
NM_022861	Unc13a	unc-13 homolog A, mRNA	chr16:19917584-19964213	0,980	9,53E-01	0,549	3,93E-04	1,313	7,61E-02
NM_173337	Camk2n1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (Camk2n1), mRNA	chr5:160625615-160627396	0,962	8,98E-01	0,538	3,93E-04	1,382	2,14E-02
NM_001106387	Lrrtm3	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3 (Lrrtm3), mRNA	chr20:28060836-28233801	0,986	9,71E-01	0,536	3,93E-04	1,606	3,67E-03

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001271136	Mink1	misshapen-like kinase 1 (Mink1), mRNA	chr10:56930889-56984074	0,872	5,43E-01	0,530	3,93E-04	1,335	5,62E-02
NM_030868	Nov	nephroblastoma overexpressed (Nov), mRNA	chr7:95015158-95022179	0,974	9,60E-01	0,513	3,93E-04	1,866	2,05E-03
NM_012628	Prkcg	protein kinase C, gamma (Prkcg), mRNA	chr1:63399168-63425577	0,821	3,05E-01	0,513	3,93E-04	1,285	1,15E-01
NM_019281	Gjd2	gap junction protein, delta 2 (Gjd2), mRNA	chr3:112040929-112043925	1,084	1,00E+00	0,511	1,13E-02	1,531	3,12E-01
NM_019169	Snca	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor) (Snca), mRNA	chr4:155592410-155690420	1,219	3,26E-01	0,508	3,93E-04	1,511	3,67E-03
NM_001112742	Gria3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3 (Gria3), mRNA	chrX:127656583-127922244	1,102	7,02E-01	0,505	3,93E-04	1,521	2,05E-03
NM_017295	Gabra5	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5 (Gabra5), mRNA	chr1:113844282-113955056	0,842	4,69E-01	0,500	3,93E-04	1,662	2,05E-03
NM_001004263	Itgb6	integrin, beta 6 (Itgb6), mRNA	chr3:51762612-51835353	1,037	9,55E-01	0,497	2,15E-03	1,084	1,00E+00
NM_001025020	Syndig1	synapse differentiation inducing 1 (Syndig1), mRNA	chr3:151405854-151571801	0,761	2,09E-01	0,497	3,93E-04	1,246	3,19E-01

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_012920	Camk2a	calcium/calmodulin dependent protein kinase II alpha, mRNA	chr18:55428486-55529045	0,723	4,35E-02	0,490	3,93E-04	1,575	2,05E-03
NM_021758	Lin7b	lin-7 homolog B (C, elegans) (Lin7b), mRNA	chr1:102422047-102424623	0,888	6,91E-01	0,487	3,93E-04	1,425	7,24E-02
NM_053878	Cplx2	complexin 2 (Cplx2), mRNA	chr17:12883634-12892106	0,777	1,31E-01	0,478	3,93E-04	1,617	2,05E-03
NM_023974	Synpr	synaptoporin (Synpr), mRNA	chr15:18562898-18741366	1,243	2,33E-01	0,461	3,93E-04	1,602	2,05E-03
NM_001100784	Gjc2	gap junction protein, gamma 2 (Gjc2), mRNA	chr10:45282829-45290655	0,845	4,24E-01	0,459	3,93E-04	1,501	2,05E-03
NM_019361	Arc	activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc), mRNA	chr7:115812498-115815943	1,347	7,07E-02	0,441	3,93E-04	1,187	4,17E-01
NM_053870	Kcnj4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4 (Kcnj4), mRNA	chr7:120710790-120738030	1,213	3,42E-01	0,440	3,93E-04	1,421	2,78E-02
NM_024140	Nrgn	neurogranin (Nrgn), mRNA	chr8:40015872-40024017	0,899	6,94E-01	0,409	3,93E-04	1,583	2,05E-03
NM_175579	Wnk4	WNK lysine deficient protein kinase 4 (Wnk4), mRNA	chr10:88979748-88996599	1,005	9,93E-01	0,407	3,93E-04	1,386	1,81E-01
NM_080773	Chrm1	cholinergic receptor, muscarinic 1	chr1:231819885-231821268	0,771	1,82E-01	0,407	3,93E-04	1,723	2,05E-03

Продолжение Таблицы Б.3

id	Символ гена	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
		(Chrm1), mRNA							
NM_001106058	Cldn10	claudin 10 (Cldn10), mRNA	chr15:107450002-107539150	0,988	9,77E-01	0,401	3,93E-04	1,646	2,05E-03
NM_172022	Lzts3	leucine zipper, putative tumor suppressor family member 3 (Lzts3), mRNA	chr3:129673987-129677772	0,848	4,15E-01	0,385	3,93E-04	1,531	2,05E-03
NM_214457	Phactr1	phosphatase and actin regulator 1, mRNA	chr17:25209367-25713271	0,762	8,87E-02	0,355	3,93E-04	1,760	2,05E-03
NM_031547	Chrm4	cholinergic receptor, muscarinic 4 (Chrm4), mRNA	chr3:87531939-87539676	0,783	2,27E-01	0,277	3,93E-04	1,757	2,05E-03
NM_001082977	Rasgrp2	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated) (Rasgrp2), mRNA	chr1:228761042-228776703	0,901	6,99E-01	0,262	3,93E-04	1,622	2,05E-03
NM_001276720	Otof	otofelin, mRNA	chr6:37140777-37237154	0,971	9,38E-01	0,241	3,93E-04	2,253	2,05E-03

**Таблица Б.4** – Анализ генов в подкорковых структурах мозга крысы с помощью метода RNA – seq, связанных с функциональной категорией «Postsynaptic cell membrane». Цветом обозначены достоверные изменения экспрессии генов,  $p < 0,05$ .

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
N M_ 052 805	Chrna3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3 (neuronal) (Chrna3), mRNA	chr8:58176164-58189008	1,325	6,00E-01	0,968	8,83E-01	0,415	2,05E-03
N M_ 031 751	Shank1	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1 (Shank1), mRNA	chr1:101362267-101409488	0,827	3,61E-01	0,819	1,01E-01	1,573	2,05E-03
N M_ 012 956	Gabrb1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1 (Gabrb1), mRNA	chr14:38453153-38924067	0,855	5,59E-01	1,058	7,42E-01	1,503	8,93E-03
N M_ 012 574	Grin2b	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B (Grin2b), mRNA	chr4:233824033-234258927	0,983	9,62E-01	0,673	3,93E-04	1,522	2,05E-03
N M_ 138 894	Grasp	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein (Grasp), mRNA	chr7:140670665-140678432	1,926	2,00E-03	0,696	6,82E-03	1,160	6,00E-01

Продолжение Таблицы Б.4

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
N M_ 021 851	Lin7c	lin-7 homolog C (C, elegans) (Lin7c), mRNA	chr3:10 761103 1- 107618 344	1,114	7,86E- 01	1,838	3,93E- 04	0,829	4,88E- 01
N M_ 013 133	Gria1	glycine receptor, alpha 1 (Gria1), mRNA	chr10:4 068741 6- 407843 93	1,387	1,00E+ 00	1,827	2,76E- 02	0,954	9,55E- 01
N M_ 012 832	Chrna7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal) (Chrna7), mRNA	chr1:12 502945 0- 125158 153	0,872	7,80E- 01	0,661	3,86E- 02	1,205	6,48E- 01
N M_ 031 608	Gria1		chr10:4 225773 5- 425712 20	0,923	7,50E- 01	0,659	3,93E- 04	1,291	9,59E- 02
N M_ 001 111 114	Grik1	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1 (Grik1), mRNA	chr11:3 142662 6- 318283 15	0,951	9,08E- 01	0,658	5,11E- 03	1,316	2,19E- 01
N M_ 153 470	Lzts1	leucine zipper, putative tumor suppressor 1 (Lzts1), mRNA	chr16:2 214712 6- 222021 36	0,769	1,00E- 01	0,653	3,93E- 04	1,404	1,52E- 02
N M_ 024 379	Grid2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2 (Grid2), mRNA	chr4:15 885741 8- 160229 216	0,998	9,96E- 01	0,652	1,04E- 03	1,362	1,18E- 01

Продолжение Таблицы Б.4

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
N M_ 031 730	Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2 (Kcnd2), mRNA	chr4:48 099454- 486092 11	0,879	5,53E- 01	0,642	3,93E- 04	1,301	8,61E- 02
N M_ 001 270 602	Grin1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1 (Grin1), mRNA	chr3:24 87838- 251607 6	0,873	5,49E- 01	0,641	3,93E- 04	1,182	3,89E- 01
N M_ 001 025 132	Cnih2	cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2 (Cnih2), mRNA	chr1:22 740553 8- 227411 186	0,742	4,38E- 02	0,638	3,93E- 04	1,293	1,02E- 01
N M_ 020 093	Park2	parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase (Park2), mRNA	chr1:49 684357- 508735 67	1,338	4,65E- 01	0,632	3,46E- 02	1,130	8,35E- 01
N M_ 145 671	Klhl17	kelch-like family member 17 (Klhl17), mRNA	chr5:17 712889 9- 177133 709	0,944	8,97E- 01	0,625	1,34E- 03	1,136	7,30E- 01
N M_ 012 573	Grin2a	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A (Grin2a), mRNA	chr10:4 524961- 493687 3	0,808	3,66E- 01	0,623	3,93E- 04	1,334	8,48E- 02

Продолжение Таблицы Б.4

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
N M_ 021 695	Synpo	synaptopodin (Synpo), mRNA	chr18:5 510419 9- 551251 90	1,082	7,66E- 01	0,622	3,93E- 04	1,273	1,55E- 01
N M_ 022 282	Dlg2	discs, large homolog 2 (Drosophila) (Dlg2), mRNA	chr1:16 140647 8- 163514 243	1,054	9,11E- 01	0,619	9,70E- 03	1,488	1,18E- 01
N M_ 001 005 244	Dmd	dystrophin (Dmd), transcript variant Dp71ab, mRNA	chrX:53 540768- 536979 14	1,146	6,50E- 01	0,612	3,93E- 04	1,338	1,41E- 01
N M_ 020 088	Tenm2	teneurin transmembrane protein 2, mRNA	chr10:2 071645 7- 216590 87	0,986	9,67E- 01	0,608	3,93E- 04	1,506	2,05E- 03
N M_ 053 901	Dlgap2	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2 (Dlgap2), mRNA	chr16:7 944760 1- 801632 71	1,417	5,00E- 02	0,605	3,93E- 04	1,401	7,59E- 02
N M_ 057 142	Lrrc7	leucine rich repeat containing 7 (Lrrc7), mRNA	chr2:28 354988 1- 283934 360	1,006	9,90E- 01	0,603	3,93E- 04	1,510	5,13E- 03
N M_ 001 004 133	Shank2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2 (Shank2), mRNA	chr1:22 402879 0- 224449 190	0,905	6,80E- 01	0,602	3,93E- 04	1,384	2,29E- 02
N M_ 138 535	Grip2	glutamate receptor interacting protein 2 (Grip2), mRNA	chr4:18 812021 3- 188170 080	0,972	9,46E- 01	0,601	3,93E- 04	1,310	1,64E- 01

Продолжение Таблицы Б.4

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
N M_ 139 330	Sipa111	signal-induced proliferation-associated 1 like 1 (Sipa111), mRNA	chr6:114193904-114304588	0,977	9,47E-01	0,570	3,93E-04	1,458	3,67E-03
N M_ 053 764	Rgs14	regulator of G-protein signaling 14 (Rgs14), mRNA	chr17:11887269-11901352	0,736	7,05E-02	0,562	3,93E-04	1,413	2,29E-02
N M_ 173 337	Camk2n1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (Camk2n1), mRNA	chr5:160625615-160627396	0,962	8,98E-01	0,538	3,93E-04	1,382	2,14E-02
N M_ 001 106 387	Lrrtm3	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3 (Lrrtm3), mRNA	chr20:28060836-28233801	0,986	9,71E-01	0,536	3,93E-04	1,606	3,67E-03
N M_ 001 271 136	Mink1	misshapen-like kinase 1 (Mink1), mRNA	chr10:56930889-56984074	0,872	5,43E-01	0,530	3,93E-04	1,335	5,62E-02
N M_ 001 112 742	Gria3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3 (Gria3), mRNA	chrX:127656583-127922244	1,102	7,02E-01	0,505	3,93E-04	1,521	2,05E-03
N M_ 017 295	Gabra5	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5 (Gabra5), mRNA	chr1:113844282-113955056	0,842	4,69E-01	0,500	3,93E-04	1,662	2,05E-03

Продолжение Таблицы Б.4

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
N M_ 001 025 020	Syndig1	synapse differentiati on inducing 1 (Syndig1), mRNA	chr3:15 140585 4- 151571 801	0,761	2,09E- 01	0,497	3,93E- 04	1,246	3,19E- 01
N M_ 021 758	Lin7b	lin-7 homolog B (C, elegans) (Lin7b), mRNA	chr1:10 242204 7- 102424 623	0,888	6,91E- 01	0,487	3,93E- 04	1,425	7,24E- 02
N M_ 019 361	Arc	activity- regulated cytoskeleton -associated protein (Arc), mRNA	chr7:11 581249 8- 115815 943	1,347	7,07E- 02	0,441	3,93E- 04	1,187	4,17E- 01
N M_ 053 870	Kcnj4	potassium inwardly- rectifying channel, subfamily J, member 4 (Kcnj4), mRNA	chr7:12 071079 0- 120738 030	1,213	3,42E- 01	0,440	3,93E- 04	1,421	2,78E- 02
N M_ 080 773	Chrm1	cholinergic receptor, muscarinic 1 (Chrm1), mRNA	chr1:23 181988 5- 231821 268	0,771	1,82E- 01	0,407	3,93E- 04	1,723	2,05E- 03
N M_ 172 022	Lzts3	leucine zipper, putative tumor suppressor family member 3 (Lzts3), mRNA	chr3:12 967398 7- 129677 772	0,848	4,15E- 01	0,385	3,93E- 04	1,531	2,05E- 03
N M_ 031 547	Chrm4	cholinergic receptor, muscarinic 4 (Chrm4), mRNA	chr3:87 531939- 875396 76	0,783	2,27E- 01	0,277	3,93E- 04	1,757	2,05E- 03

**Таблица Б.5** – Анализ генов в подкорковых структурах мозга крысы с помощью метода RNA – seq, связанных с функциональной категорией «synapse». Цветом обозначены достоверные изменения экспрессии генов,  $p < 0,05$ .

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_052805	Chrna3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3 (neuronal) (Chrna3), mRNA	chr8:58176164-58189008	1,325	6,00E-01	0,968	8,83E-01	0,415	2,05E-03
NM_031751	Shank1	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1 (Shank1), mRNA	chr1:101362267-101409488	0,827	3,61E-01	0,819	1,01E-01	1,573	2,05E-03
NM_019146	Bsn	bassoon (presynaptic cytomatrix protein) (Bsn), mRNA	chr8:116227801-116319071	0,940	8,23E-01	0,669	3,93E-04	1,520	2,05E-03
NM_012956	Gabrb1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1 (Gabrb1), mRNA	chr14:38453153-38924067	0,855	5,59E-01	1,058	7,42E-01	1,503	8,93E-03
NM_012574	Grin2b	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B (Grin2b), mRNA	chr4:233824033-234258927	0,983	9,62E-01	0,673	3,93E-04	1,522	2,05E-03
NM_138894	Grasp	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein (Grasp), mRNA	chr7:140670665-140678432	1,926	2,00E-03	0,696	6,82E-03	1,160	6,00E-01

Продолжение таблицы Б.5

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001107254	Samd4a		chr15:27721128-27820974	2,144	2,00E-03	1,377	3,16E-02	0,982	9,75E-01
NM_021851	Lin7c	lin-7 homolog C (C, elegans) (Lin7c), mRNA	chr3:107611031-107618344	1,114	7,86E-01	1,838	3,93E-04	0,829	4,88E-01
NM_013133	Gla1	glycine receptor, alpha 1 (Gla1), mRNA	chr10:40687416-40784393	1,387	1,00E+00	1,827	2,76E-02	0,954	9,55E-01
NM_001107197	Igsf9	immunoglobulin superfamily, member 9 (Igsf9), mRNA	chr13:95389057-95405643	3,413	2,00E-03	0,636	1,00E+00	1,101	1,00E+00
NM_001047102	Cadm2	cell adhesion molecule 2 (Cadm2), mRNA	chr11:7871256-8090075	0,779	2,58E-01	0,665	1,34E-03	1,488	1,24E-02
NM_001106525	Snph	syntaphilin, mRNA	chr3:153455881-153496985	0,790	1,71E-01	0,663	3,93E-04	1,352	3,26E-02
NM_012832	Chrna7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal) (Chrna7), mRNA	chr1:125029450-125158153	0,872	7,80E-01	0,661	3,86E-02	1,205	6,48E-01
NM_001108721	Prima1	proline rich membrane anchor 1 (Prima1), mRNA	chr6:136279361-136330870	1,335	1,32E-01	0,660	1,34E-03	1,193	4,61E-01
NM_031608	Gria1	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1, mRNA	chr10:42257735-42571220	0,923	7,50E-01	0,659	3,93E-04	1,291	9,59E-02

Продолжение таблицы Б.5

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_00111114; NM_00111117; NM_017241	Grik1	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1 (Grik1), mRNA	chr11:31426626-31828315	0,951	9,08E-01	0,658	5,11E-03	1,316	2,19E-01
NM_153470	Lzts1	leucine zipper, putative tumor suppressor 1 (Lzts1), mRNA	chr16:22147126-22202136	0,769	1,00E-01	0,653	3,93E-04	1,404	1,52E-02
NM_053473	Ppp1r9a	protein phosphatase 1, regulatory subunit 9A (Ppp1r9a), mRNA	chr4:29885035-30148874	0,940	8,36E-01	0,653	3,93E-04	1,454	7,84E-03
NM_024379	Grid2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2 (Grid2), mRNA	chr4:158857418-160229216	0,998	9,96E-01	0,652	1,04E-03	1,362	1,18E-01
NM_053621	Magi2	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2 (Magi2), mRNA	chr4:10987830-12456503	0,971	9,32E-01	0,642	3,93E-04	1,393	1,99E-02
NM_031730	Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2 (Kcnd2), mRNA	chr4:48099454-48609211	0,879	5,53E-01	0,642	3,93E-04	1,301	8,61E-02

Продолжение таблицы Б.5

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001270602	Grin1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1 (Grin1), mRNA	chr3:2487838-2516076	0,873	5,49E-01	0,641	3,93E-04	1,182	3,89E-01
NM_001025132	Cnih2	cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2 (Cnih2), mRNA	chr1:227405538-227411186	0,742	4,38E-02	0,638	3,93E-04	1,293	1,02E-01
NM_001025114	Wasf1	WAS protein family, member 1 (Wasf1), mRNA	chr20:50107710-50155913	0,918	7,33E-01	0,633	3,93E-04	1,296	8,61E-02
NM_020093	Park2	parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase (Park2), mRNA	chr1:49684357-50873567	1,338	4,65E-01	0,632	3,46E-02	1,130	8,35E-01
NM_001108938	Egflam	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains (Egflam), mRNA	chr2:76243790-76418008	0,743	2,52E-01	0,628	2,15E-03	1,163	6,32E-01
NM_145671	Klhl17	kelch-like family member 17 (Klhl17), mRNA	chr5:177128899-177133709	0,944	8,97E-01	0,625	1,34E-03	1,136	7,30E-01
NM_012573	Grin2a	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A	chr10:4524961-4936873	0,808	3,66E-01	0,623	3,93E-04	1,334	8,48E-02

Продолжение таблицы Б.5

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
		(Grin2a), mRNA							
NM_021695	Synpo	synaptopodin (Synpo), mRNA	chr18:55104199-55125190	1,082	7,66E-01	0,622	3,93E-04	1,273	1,55E-01
NM_001110797; NM_020098	Pclo	piccolo presynaptic cytomatrix protein, mRNA	chr4:16428813-17031648	0,956	8,79E-01	0,621	3,93E-04	1,649	2,05E-03
NM_022282	Dlg2	discs, large homolog 2 (Drosophila) (Dlg2), mRNA	chr1:161406478-163514243	1,054	9,11E-01	0,619	9,70E-03	1,488	1,18E-01
NM_001005244; NM_001005246; NM_012698	Dmd; Dmd; Dmd	dystrophin (Dmd), transcript variant Dp71ab, mRNA	chrX:53540768-53697914	1,146	6,50E-01	0,612	3,93E-04	1,338	1,41E-01
NM_020088	Tenm2	teneurin transmembrane protein 2, mRNA	chr10:20716457-21659087	0,986	9,67E-01	0,608	3,93E-04	1,506	2,05E-03
NM_001276470	Prrt2	proline-rich transmembrane protein 2 (Prrt2), transcript variant 1, mRNA	chr1:205431759-205435350	0,921	7,71E-01	0,606	3,93E-04	1,170	4,76E-01
NM_053901	Dlgap2	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2 (Dlgap2), mRNA	chr16:79447601-80163271	1,417	5,00E-02	0,605	3,93E-04	1,401	7,59E-02
NM_057142	Lrrc7	leucine rich repeat containing 7 (Lrrc7), mRNA	chr2:283549881-283934360	1,006	9,90E-01	0,603	3,93E-04	1,510	5,13E-03

Продолжение таблицы Б.5

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001004133; NM_133440; NM_133441; NM_201350	Shank2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2 (Shank2), transcript variant 1, mRNA	chr1:224028790-224449190	0,905	6,80E-01	0,602	3,93E-04	1,384	2,29E-02
NM_053788	Stx1a	syntaxin 1A (brain) (Stx1a), mRNA	chr12:26682319-26710272	0,900	6,79E-01	0,601	3,93E-04	1,550	2,05E-03
NM_138535	Grip2	glutamate receptor interacting protein 2 (Grip2), mRNA	chr4:188120213-188170080	0,972	9,46E-01	0,601	3,93E-04	1,310	1,64E-01
NM_00113409; NM_181092	Syngap1	synaptic Ras GTPase activating protein 1 (Syngap1), transcript variant 2, mRNA	chr20:7594613-7623865	0,800	2,13E-01	0,601	3,93E-04	1,359	3,99E-02
NM_138835	Syt12	synaptotagmin XII (Syt12), mRNA	chr1:226557950-226587017	0,843	5,52E-01	0,599	7,32E-04	1,156	6,40E-01
NM_175754	Aggn	agrin (Aggn), mRNA	chr5:177063798-177085091	0,947	8,49E-01	0,593	3,93E-04	1,413	1,24E-02
NM_001270576; NM_030991	Snap25; Snap25	synaptosomal-associated protein 25 (Snap25), transcript variant 2, mRNA	chr3:136182050-136269422	1,229	3,53E-01	0,589	3,93E-04	1,200	3,48E-01
NM_019375	Sept3	septin 3 (Sept3), mRNA	chr7:123491252-123511261	0,958	8,85E-01	0,581	3,93E-04	1,382	2,37E-02

Продолжение таблицы Б.5

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_139330	Sipa111	signal-induced proliferation-associated 1 like 1 (Sipa111), mRNA	chr6:114193904-114304588	0,977	9,47E-01	0,570	3,93E-04	1,458	3,67E-03
NM_053764	Rgs14	regulator of G-protein signaling 14 (Rgs14), mRNA	chr17:11887269-11901352	0,736	7,05E-02	0,562	3,93E-04	1,413	2,29E-02
NM_022861	Unc13a	Unc-13 homolog A, mRNA	chr16:19917584-19964213	0,980	9,53E-01	0,549	3,93E-04	1,313	7,61E-02
NM_173337	Camk2n1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (Camk2n1), mRNA	chr5:160625615-160627396	0,962	8,98E-01	0,538	3,93E-04	1,382	2,14E-02
NM_001106387	Lrrtm3	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3 (Lrrtm3), mRNA	chr20:28060836-28233801	0,986	9,71E-01	0,536	3,93E-04	1,606	3,67E-03
NM_001271136	Mink1	misshapen-like kinase 1 (Mink1), mRNA	chr10:56930889-56984074	0,872	5,43E-01	0,530	3,93E-04	1,335	5,62E-02
NM_012628	Prkcg	protein kinase C, gamma (Prkcg), mRNA	chr1:63399168-63425577	0,821	3,05E-01	0,513	3,93E-04	1,285	1,15E-01
NM_019169	Snca	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	chr4:155592410-155690420	1,219	3,26E-01	0,508	3,93E-04	1,511	3,67E-03

Продолжение таблицы Б.5

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
		(Snca), mRNA							
NM_001112742	Gria3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3 (Gria3), mRNA	chrX:127656583-127922244	1,102	7,02E-01	0,505	3,93E-04	1,521	2,05E-03
NM_017295	Gabra5	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5 (Gabra5), mRNA	chr1:113844282-113955056	0,842	4,69E-01	0,500	3,93E-04	1,662	2,05E-03
NM_001025020	Syndig1	synapse differentiation inducing 1 (Syndig1), mRNA	chr3:151405854-151571801	0,761	2,09E-01	0,497	3,93E-04	1,246	3,19E-01
NM_012920	Camk2a	calcium/calmodulin dependent protein kinase II alpha, mRNA	chr18:55428486-55529045	0,723	4,35E-02	0,490	3,93E-04	1,575	2,05E-03
NM_021758	Lin7b	lin-7 homolog B (C, elegans) (Lin7b), mRNA	chr1:102422047-102424623	0,888	6,91E-01	0,487	3,93E-04	1,425	7,24E-02
NM_053878	Cplx2	complexin 2 (Cplx2), mRNA	chr17:12883634-12892106	0,777	1,31E-01	0,478	3,93E-04	1,617	2,05E-03
NM_023974	Synpr	synaptoporphin (Synpr), mRNA	chr15:18562898-18741366	1,243	2,33E-01	0,461	3,93E-04	1,602	2,05E-03
NM_019361	Arc	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	chr7:115812498-115815943	1,347	7,07E-02	0,441	3,93E-04	1,187	4,17E-01

Продолжение таблицы Б.5

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
		(Arc), mRNA							
NM_053870	Kcnj4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4 (Kcnj4), mRNA	chr7:120710790-120738030	1,213	3,42E-01	0,440	3,93E-04	1,421	2,78E-02
NM_024140	Nrgn	neurogranin (Nrgn), mRNA	chr8:40015872-40024017	0,899	6,94E-01	0,409	3,93E-04	1,583	2,05E-03
NM_080773	Chrm1	cholinergic receptor, muscarinic 1 (Chrm1), mRNA	chr1:231819885-231821268	0,771	1,82E-01	0,407	3,93E-04	1,723	2,05E-03
NM_172022	Lzts3	leucine zipper, putative tumor suppressor family member 3 (Lzts3), mRNA	chr3:129673987-129677772	0,848	4,15E-01	0,385	3,93E-04	1,531	2,05E-03
NM_214457	Phactr1	phosphatase and actin regulator 1, mRNA	chr17:25209367-25713271	0,762	8,87E-02	0,355	3,93E-04	1,760	2,05E-03
NM_031547	Chrm4	cholinergic receptor, muscarinic 4 (Chrm4), mRNA	chr3:87531939-87539676	0,783	2,27E-01	0,277	3,93E-04	1,757	2,05E-03
NM_001082977	Rasgrp2	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated) (Rasgrp2), mRNA	chr1:228761042-228776703	0,901	6,99E-01	0,262	3,93E-04	1,622	2,05E-03

Продолжение таблицы Б.5

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_001276720	Otof	otoferlin, mRNA	chr6:37140777-37237154	0,971	9,38E-01	0,241	3,93E-04	2,253	2,05E-03

**Таблица Б.6** – Анализ экспрессии генов в подкорковых структурах мозга крысы с помощью метода RNA – seq, связанных с функциональной категорией «Intermediate filament». Цветом обозначены достоверные изменения экспрессии генов,  $p < 0,05$ .

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value
NM_017009	Gfap	glial fibrillary acidic protein (Gfap), mRNA	chr10:90763149-90771823	1,053	8,71E-01	6,273	3,93E-04	0,880	6,82E-01
NM_031140	Vim	vimentin (Vim), mRNA	chr17:82500897-82509383	0,937	8,12E-01	6,200	3,93E-04	0,579	2,05E-03
NM_022531	Des	desmin (Des), mRNA	chr9:82325842-82333548	1,063	8,94E-01	3,380	3,93E-04	0,583	2,05E-03
NM_053976	Krt18	keratin 18 (Krt18), mRNA	chr7:141425683-141429360	1,142	8,03E-01	1,265	1,90E-01	0,592	1,43E-02
NM_001002016	Lmna	lamin A/C (Lmna), mRNA	chr2:207245238-207265869	1,440	1,79E-02	2,355	3,93E-04	0,650	2,05E-03
NM_012987	Nes	nestin (Nes), mRNA	chr2:206746945-206755986	1,780	2,00E-03	7,662	3,93E-04	0,569	2,05E-03
NM_199370	Krt8	keratin 8 (Krt8), mRNA	chr7:141393003-141400457	1,121	7,68E-01	1,691	3,93E-04	0,566	2,05E-03
NM_001276440	Krt71	keratin 71 (Krt71), mRNA	chr7:141118057-141271225	0,716	2,66E-01	0,398	3,93E-04	1,898	3,74E-02

**Таблица Б.7** – Анализ генов в подкорковых структурах мозга крысы с помощью метода RNA – seq, связанных с функциональной категорией «Immunity». Цветом обозначены достоверные изменения экспрессии генов,  $p < 0,05$

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	P-value
NM_021744	Cd14	CD14 molecule (Cd14), mRNA	chr18:29265350-29266946	1,595	5,36E-02	29,674	3,93E-04	0,609	2,05E-03
NM_012977	Lgals9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (Lgals9), mRNA	chr10:66863437-66886611	0,438	2,00E-03	0,781	1,22E-01	1,253	3,80E-01
NM_001270701	Kcnn4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4 (Kcnn4), transcript variant 1, mRNA	chr1:82493756-82508496	1,027	1,00E+00	9,501	1,04E-03	0,831	6,96E-01
NM_017208	Lbp	lipopolysaccharide binding protein (Lbp), mRNA	chr3:160793300-160819979	0,847	1,00E+00	8,775	3,93E-04	0,282	2,05E-03

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_053587	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (S100a9), mRNA	chr2:209531411-209534093	2,448	1,17E-01	7,485	1,90E-03	0,199	2,05E-03
NM_198134	Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2 (Bst2), mRNA	chr16:19800347-19803919	0,534	3,99E-02	1,999	3,93E-04	0,719	9,23E-02
NM_013069	Cd74	Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain (Cd74), mRNA	chr18:55305872-55315246	0,560	2,00E-03	2,013	3,93E-04	0,476	2,05E-03
NM_031538	Cd8a	CD8a molecule (Cd8a), mRNA	chr4:164017632-164021870	0,682	1,00E+00	7,001	1,58E-02	0,567	2,28E-01
NM_001004084	RT1-Bb	RT1 class II, locus Bb (RT1-Bb), mRNA	chr20:6123271-6128913	2,243	1,00E+00	6,148	3,20E-02	0,299	6,35E-02
NM_012904	Anxa1	annexin A1 (Anxa1), mRNA	chr1:245192874-245208894	1,585	1,16E-01	5,462	3,93E-04	0,599	2,05E-03

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_134350	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (Mx2), mRNA	chr11:41546013-41570080	0,598	9,02E-03	1,847	3,93E-04	1,497	3,67E-03
NM_024145	Fgr	feline Gardner-Rasheed sarcoma viral oncogene (Fgr), mRNA	chr5:154839095-154866417	1,727	1,00E+00	4,859	3,93E-04	0,603	2,07E-02
NM_001025010	Nlr1	NLR family member X1 (Nlr1), mRNA	chr8:47202128-47218106	0,618	1,01E-02	0,870	3,46E-01	1,124	6,87E-01
NM_080767	Psm8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (Psm8), mRNA	chr20:6070356-6073320	0,819	6,81E-01	4,163	3,93E-04	0,785	2,20E-01
NM_001008524	C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain (C1qc), mRNA	chr5:159017523-159020850	1,087	7,87E-01	4,130	3,93E-04	0,701	8,93E-03
NM_013185	Hck	hemopoietic cell kinase (Hck), mRNA	chr3:154982908-155025528	0,917	8,86E-01	4,040	3,93E-04	0,850	5,79E-01

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_199093	Serping1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1 (Serping1), mRNA	chr3:78681825-78691120	0,862	6,47E-01	4,014	3,93E-04	0,758	8,24E-02
NM_032055	Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) (Tap1), mRNA	chr20:6058849-6069217	0,981	9,74E-01	3,421	3,93E-04	0,706	7,46E-02
NM_019262	C1qb	complement component 1, q subcomponent, B chain (C1qb), mRNA	chr5:159008942-159014492	0,939	8,43E-01	3,277	3,93E-04	0,724	2,21E-02
NM_001008827	RT1-A1	RT1 class Ia, locus A1 (RT1-A1), mRNA	chr20:7474638-7478156	0,876	8,27E-01	3,238	3,93E-04	0,696	1,55E-01

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_001008830; NM_001008839	RT1-A3; RT1-CE16	RT1 class I, locus A3 (RT1-A3), mRNA; RT1 class I, locus CE16 (RT1-CE16), mRNA	chr20:5857675-5878729	0,585	2,48E-01	3,065	3,93E-04	0,728	2,48E-01
NM_138900	C1s	complement component 1, s subcomponent (C1s), mRNA	chr4:224162095-224174100	1,155	7,16E-01	3,027	3,93E-04	0,829	3,48E-01
NM_001008829	RT1-A2	RT1 class Ia, locus A2 (RT1-A2), mRNA	chr20:7433458-7436984	0,828	6,23E-01	3,006	3,93E-04	0,703	4,81E-02
NM_012855	Jak3	Janus kinase 3 (Jak3), mRNA	chr16:19969813-19981129	0,999	9,94E-01	2,777	3,93E-04	0,850	5,54E-01
NM_001205348	Cd300a	CD300a molecule, mRNA	chr10:103094390-103107421	1,299	6,15E-01	2,738	7,32E-04	0,730	3,89E-01
NM_001030026	Ifi30	interferon gamma inducible protein 30 (Ifi30), mRNA	chr16:20283633-20287840	0,715	2,28E-01	2,688	3,93E-04	0,734	7,13E-02

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_001271058	Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1 (Mx1), mRNA	chr11:41398736-41424277	0,471	1,00E+00	2,640	3,93E-04	1,530	2,37E-02
NM_001077680	Bpifb1	BPI fold containing family B, member 1 (Bpifb1), mRNA	chr3:156046294-156078740	1,332	1,00E+00	16,229	6,36E-02	0,359	2,07E-02
NM_001008724	Fga	fibrinogen alpha chain (Fga), mRNA	chr2:201412181-201428141	0,310	1,00E+00	13,127	1,95E-01	0,452	2,21E-02
NM_001097582	Tlr7	toll-like receptor 7 (Tlr7), mRNA	chrX:28883040-28908313	0,963	9,39E-01	2,559	3,93E-04	0,815	3,88E-01
NM_198130	Myd88	myeloid differentiation primary response 88 (Myd88), mRNA	chr8:127229272-127233342	1,319	2,87E-01	2,487	3,93E-04	0,804	3,01E-01
NM_017187	Hmgb2	high mobility group box 2 (Hmgb2), mRNA	chr16:35886763-35889338	1,635	1,01E-02	1,907	3,93E-04	0,875	6,63E-01

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	P-value
NM_001008515	C1qa	complement component 1, q subcomponent, A chain (C1qa), mRNA	chr5:159023752-159026600	0,963	9,12E-01	2,285	3,93E-04	0,721	1,72E-02
NM_016994	C3	complement component 3 (C3), mRNA	chr9:8728464-8754412	1,660	2,00E-03	2,177	3,93E-04	0,825	3,17E-01
NM_001111098	Lyn	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase (Lyn), mRNA	chr5:21307093-21422840	1,695	3,66E-03	2,876	3,93E-04	0,827	3,31E-01
NM_138881	Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2 (Rsad2), mRNA	chr6:54375723-54388860	0,795	1,00E+00	2,220	3,93E-04	1,373	1,58E-01
NM_012591	Irf1	interferon regulatory factor 1 (Irf1), mRNA	chr10:38891467-38898470	1,825	1,22E-02	2,411	3,93E-04	0,662	2,29E-02

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_012555	Ets1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (Ets1), mRNA	chr8:33858346-33921593	1,941	2,00E-03	1,493	1,04E-03	0,874	5,82E-01
NM_031514	Jak2	Janus kinase 2 (Jak2), mRNA	chr1:254646698-254705434	1,972	2,00E-03	1,773	3,93E-04	0,833	3,45E-01
NM_023981	Csf1	colony stimulating factor 1 (macrophage) (Csf1), mRNA	chr2:229989434-230017945	1,407	3,75E-02	2,142	3,93E-04	0,796	1,72E-01
NM_001100762	Havcr2	hepatitis A virus cellular receptor 2 (Havcr2), mRNA	chr10:31377041-31403296	2,545	2,00E-03	1,520	4,15E-02	0,805	5,54E-01
NM_012708	Psmb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (Psmb9), mRNA	chr20:6052971-6058393	1,092	9,09E-01	2,029	3,93E-04	0,688	1,33E-01

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_173840	Lat2	linker for activation of T cells family, member 2 (Lat2), mRNA	chr12:27119772-27126127	1,093	9,41E-01	1,991	1,59E-02	0,956	9,55E-01
NM_001191865	Ripk2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2 (Ripk2), mRNA	chr5:34512874-34543807	1,210	5,27E-01	1,932	3,93E-04	0,869	6,38E-01
NM_001077671	Zc3h12a	zinc finger CCCH type containing 12A (Zc3h12a), mRNA	chr5:146878970-146887760	2,783	3,66E-03	1,337	2,11E-01	0,699	2,93E-01
NM_030836	Erap1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (Erap1), mRNA	chr2:1381116-1419645	1,024	9,59E-01	1,891	3,93E-04	0,930	8,18E-01
NM_001024995	Nrros	negative regulator of reactive oxygen species (Nrros), mRNA	chr11:74956755-74973822	1,111	8,39E-01	1,842	2,15E-03	0,889	7,79E-01

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_019335	Eif2ak2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 (Eif2ak2), mRNA	chr6:1419339-1456636	0,933	8,45E-01	1,841	3,93E-04	0,957	9,16E-01
NM_012758	Syk	spleen tyrosine kinase (Syk), mRNA	chr17:14703902-14759160	1,124	1,00E+00	1,776	1,90E-03	0,850	6,02E-01
NM_173045	Zc3hav1	zinc finger CCCH type, antiviral 1 (Zc3hav1), mRNA	chr4:65836585-65876469	0,835	6,21E-01	1,672	7,32E-04	0,837	5,20E-01
NM_198769	Tlr2	toll-like receptor 2 (Tlr2), mRNA	chr2:202253255-202258683	3,383	2,00E-03	3,684	3,93E-04	0,590	2,05E-03
NM_031832	Lgals3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (Lgals3), mRNA	chr15:28094343-28106279	3,439	2,00E-03	26,597	3,93E-04	0,553	2,05E-03
NM_001008847	RT1-Da	RT1 class II, locus Da (RT1-Da), mRNA	chr20:6207781-6212754	0,536	1,17E-01	1,614	8,00E-03	0,528	5,13E-03

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_001013982	Orai1	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1 (Orai1), mRNA	chr12:40878295-40879065	1,241	4,36E-01	1,593	3,93E-04	0,798	2,48E-01
NM_001034137	Sp110	SP110 nuclear body protein (Sp110), mRNA	chr9:92324920-92346959	0,698	3,04E-01	1,563	8,00E-03	1,060	9,05E-01
NM_012512	B2m	beta-2 microglobulin (B2m), mRNA	chr3:120627498-120633523	0,924	7,62E-01	1,563	3,93E-04	0,920	7,59E-01
NM_001009682	Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2 (Oasl2), mRNA	chr12:49263770-49276267	0,880	6,91E-01	1,523	5,77E-03	0,852	5,86E-01
NM_031753	Alcam	activated leukocyte cell adhesion molecule (Alcam), mRNA	chr11:53964951-54165636	1,136	5,58E-01	0,659	3,93E-04	1,319	6,78E-02
NM_133395	Serinc5	serine incorporator 5 (Serinc5), mRNA	chr2:41398813-41516426	1,151	5,08E-01	0,650	3,93E-04	1,328	5,11E-02
NM_130741	Lcn2	lipocalin 2 (Lcn2), mRNA	chr3:16763058-16766404	4,825	3,66E-03	65,138	3,93E-04	0,330	2,05E-03

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_017318	Ptk2b	protein tyrosine kinase 2 beta (Ptk2b), mRNA	chr15:48646612-48766698	0,903	6,76E-01	0,594	3,93E-04	1,346	4,25E-02
NM_001172305	Prkcb	protein kinase C, beta (Prkcb), mRNA	chr1:199295066-199639139	1,025	9,46E-01	0,576	3,93E-04	1,445	3,67E-03
NM_053897	F2rl1	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1 (F2rl1), mRNA	chr2:44378261-44391213	6,853	2,00E-03	1,403	1,00E+00	0,884	1,00E+00
NM_012727	Camk4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (Camk4), mRNA	chr18:25464160-25680624	0,834	4,89E-01	0,469	3,93E-04	1,445	5,50E-02
NM_138533	Spon2	spondin 2, extracellular matrix protein (Spon2), mRNA	chr14:83504581-83510376	1,278	5,99E-01	0,466	1,04E-03	1,175	7,89E-01
NM_001034010	Tril	TLR4 interactor with leucine-rich repeats (Tril), mRNA	chr4:148630038-148634884	0,802	2,11E-01	0,412	3,93E-04	1,895	2,05E-03

Продолжение Таблицы Б.7

ID	Ген	Описание	Локус	IR4,5 vs. SH4,5		IR24 vs. SH24		IS24 vs. IR24	
				Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
NM_133306	Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1 (Olr1), mRNA	chr4:211883404-211905489	29,941	2,00E-03	16,253	3,93E-04	0,836	5,71E-01

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Сигнальные пути, ассоциированные с ДЭГ в условиях модели переходящей  
фокальной ишемии

**Таблица В.8** – Анализ сигнальных путей, ассоциированных с ДЭГ в группах «IR4,5 vs. SH4,5» и «IR24 vs. SH24» согласно базе данных DAVID. Показано количество повышенных (Up) и пониженных (Down) ДЭГ, а также р-значений, скорректированных с использованием процедуры Бенджамини-Хохберга (Padj). Для анализа отбирали гены с изменением экспрессии > в 1,5 раза по сравнению с базовым значением и с р-значением < 0,05.

Сигнальные пути (KEGG)	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
rno03010:Ribosome						
rno03050:Proteasome						
rno03030:DNA replication						
rno05150:Staphylococcus aureus infection				20	1	8,52E-07
rno04670:Leukocyte transendothelial migration				27	9	8,94E-08
rno04666:Fc gamma R-mediated phagocytosis				16	6	4,47E-04
rno05152:Tuberculosis				37	7	2,08E-06
rno05205:Proteoglycans in cancer	14	2	1,26E-02	46	13	7,96E-12
rno04115:p53 signaling pathway	8	1	1,27E-02	19	3	2,12E-05
rno00230:Purine metabolism						
rno05206:MicroRNAs in cancer				29	8	1,07E-06
rno04380:Osteoclast differentiation	15	0	1,17E-03	33	4	2,00E-07
rno04611:Platelet activation				26	17	5,13E-10
rno05014:Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)						
rno04015:Rap1 signaling pathway				28	21	3,45E-06
rno04010:MAPK signaling pathway	23	0	1,20E-04	38	25	2,52E-09

Продолжение Таблицы В.8

Сигнальные пути (KEGG)	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
rno04020:Calcium signaling pathway				15	39	8,80E-11
rno04024:cAMP signaling pathway				15	27	6,92E-05
rno04261:Adrenergic signaling in cardiomyocytes				10	22	4,32E-04
rno04925:Aldosterone synthesis and secretion				6	18	4,43E-05
rno04921:Oxytocin signaling pathway				16	24	2,76E-06
rno05030:Cocaine addiction				5	10	4,21E-04
rno04724:Glutamatergic synapse				5	21	1,05E-03
rno04723:Retrograde endocannabinoid signaling				4	18	5,70E-03
rno05031:Amphetamine addiction				4	20	2,44E-07
rno04713:Circadian entrainment				4	23	2,16E-05
rno04151:PI3K-Akt signaling pathway	20	2	1,13E-02	48	20	3,65E-06
rno05133:Pertussis	8	0	4,30E-02	26	2	1,07E-08
rno05146:Amoebiasis	10	2	8,65E-03	20	13	5,34E-07
rno05142:Chagas disease (American trypanosomiasis)	12	1	2,05E-03	22	5	1,31E-04
rno05169:Epstein-Barr virus infection	15	0	2,52E-02	36	4	1,85E-03
rno05161:Hepatitis B	13	1	4,73E-03	26	7	7,15E-05
rno05166:HTLV-I infection	18	2	1,19E-02	47	6	3,47E-04
rno05164:Influenza A	12	3	3,60E-03	34	4	3,59E-05
rno05134:Legionellosis	7	0	1,43E-02	17	1	3,81E-05
rno05140:Leishmaniasis	11	0	1,74E-03	25	1	1,59E-07
rno05162:Measles	9	3	1,05E-02	25	0	9,78E-03
rno04064:NF-kappa B signaling pathway	10	0	1,39E-02	24	1	4,00E-05
rno04668:TNF signaling pathway	17	0	1,34E-05	26	2	6,89E-05

Продолжение Таблицы В.8

Сигнальные пути (KEGG)	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
rno05145:Toxoplasmosis	10	0	2,85E-02	26	3	9,82E-05
rno05203:Viral carcinogenesis	16	1	1,48E-02	34	7	3,57E-03
rno05160:Hepatitis C	8	3	3,81E-02			
rno05321:Inflammatory bowel disease (IBD)	8	0	2,74E-02			
rno05323:Rheumatoid arthritis	9	0	3,93E-02			
rno00053:Ascorbate and aldarate metabolism				1	1	8,63E-03
rno04725:Cholinergic synapse				9	20	4,25E-05
rno04728:Dopaminergic synapse				6	25	9,80E-05
rno00983:Drug metabolism - other enzymes				7	1	3,43E-03
rno04915:Estrogen signaling pathway				16	6	3,93E-04
rno04145:Phagosome				38	1	3,46E-04
rno00860:Porphyrin and chlorophyll metabolism				5	0	5,12E-03
rno05223:Non-small cell lung cancer				8	7	3,43E-03
rno05202:Transcriptional misregulation in cancer				29	9	2,40E-05
rno05221:Acute myeloid leukemia				12	3	3,43E-03
rno04612:Antigen processing and presentation				19	0	6,05E-03
rno04210:Apoptosis				13	3	3,51E-03
rno04662:B cell receptor signaling pathway				15	1	1,00E-02
rno05219:Bladder cancer				12	0	4,17E-03
rno05230:Central carbon metabolism in cancer				12	5	1,82E-03
rno04062:Chemokine signaling pathway				25	10	7,70E-04
rno05231:Choline metabolism in cancer				13	8	9,56E-03
rno04610:Complement and coagulation cascades				18	1	9,65E-04

Продолжение Таблицы В.8

Сигнальные пути (KEGG)	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
rno05414:Dilated cardiomyopathy				11	9	2,51E-03
rno04512:ECM-receptor interaction				18	12	8,14E-08
rno04012:ErbB signaling pathway				10	10	2,81E-03
rno04510:Focal adhesion				38	17	1,56E-09
rno04540:Gap junction				8	14	7,33E-04
rno04971:Gastric acid secretion				4	17	1,36E-04
rno05214:Glioma				9	8	7,65E-04
rno04912:GnRH signaling pathway				9	13	1,35E-03
rno04640:Hematopoietic cell lineage				16	3	3,95E-03
rno04066:HIF-1 signaling pathway				17	8	5,35E-04
rno05410:Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)				11	7	8,02E-03
rno04750:Inflammatory mediator regulation of TRP channels				8	16	5,03E-03
rno04911:Insulin secretion				5	17	5,29E-04
rno04630:Jak-STAT signaling pathway				27	0	5,05E-03
rno04730:Long-term depression				7	11	4,21E-04
rno04720:Long-term potentiation				4	17	2,19E-05
rno04916:Melanogenesis				9	12	7,64E-03
rno04650:Natural killer cell mediated cytotoxicity				22	6	2,73E-06
rno04722:Neurotrophin signaling pathway				14	10	7,93E-03
rno05200:Pathways in cancer				52	26	1,58E-06
rno04810:Regulation of actin cytoskeleton				26	11	1,43E-02
rno04970:Salivary secretion				5	14	1,88E-03
rno05132:Salmonella infection				18	2	2,17E-03

Продолжение Таблицы В.8

Сигнальные пути (KEGG)	IR4.5 vs. SH4.5			IR24 vs. SH24		
	Up	Down	Padj	Up	Down	Padj
rno05222:Small cell lung cancer				15	5	3,82E-03
rno04071:Sphingolipid signaling pathway				17	8	6,47E-03
rno04919:Thyroid hormone signaling pathway				15	9	5,03E-03
rno04918:Thyroid hormone synthesis				6	10	8,72E-03
rno04370:VEGF signaling pathway				12	7	8,13E-05