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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель

доктор медицинских наук, доцент **Губский Леонид Васильевич**

Официальные оппоненты

Писарев Владимир Митрофанович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов критических состояний Научно-исследовательского института общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» Министерства высшего образования и науки Российской Федерации

Яснецов Виктор Владимирович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник - заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии, заместитель заведующего отделом космической радиобиологии и фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН)

Полоников Алексей Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, заведующий лабораторией статистической генетики и биоинформатики, директор НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «01» октября 2025 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.005 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6 и на сайте https://www.rudn.ru/science/dissovet/dissertacionnye-sovety/pds-0300005

Автореферат разослан «____» августа 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета ПДС 0300.005,

кандидат биологических наук, доцент Гигани Ольга Олеговна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

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 нейропатологических 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, PGP, PGPL 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, PGP, PGPL 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.

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.

Научная новизна работы

В настоящей диссертационной работе впервые исследованы эффекты пептидов семакс, PGP, PGPL 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.

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 последующий 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 грантов Российского научного фонда, Российского фонда фундаментальных исследований.

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 действию 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.

Личный вклад автора

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.

Внедрение результатов 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.

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).

Публикации материалов исследования

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.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Лабораторные животные. Исследования были выполнены на самцах белых крыс линии Вистар массой 200-300 грамм 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). 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 2018 г.).

Модель преходящей ишемии мозга у крыс. Перед началом оперативного вмешательства с соблюдением всех мер асептики и антисептики 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-Z Anesthesia systems, USA).

Под операционным микроскопом выполняли на шее срединный разрез, выделяли место бифуркации общей сонной артерии (ОСА) на внутреннюю сонную артерию (ВСА) и наружную сонную артерию (НСА). На НСА накладывали две лигатуры, на ОСА и ВСА – микрохирургические клипсы. Сосудистыми ножницами между лигатурами производили разрез. Монофиламент с силиконовым покрытием (Doccol Corporation, USA) 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. Лигатура на НСА затягивалась, чтобы предотвратить кровотечение, микрохирургические клипсы снимались. По истечении вышеуказанного времени монофиламент извлекали, рану ушивали, крысу помещали в клетку, где она отходила из-под действия наркоза.

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» МРТ - исследование проводилось двукратно: через 3 часа после окончания операции и непосредственно перед декапитацией.

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 1.

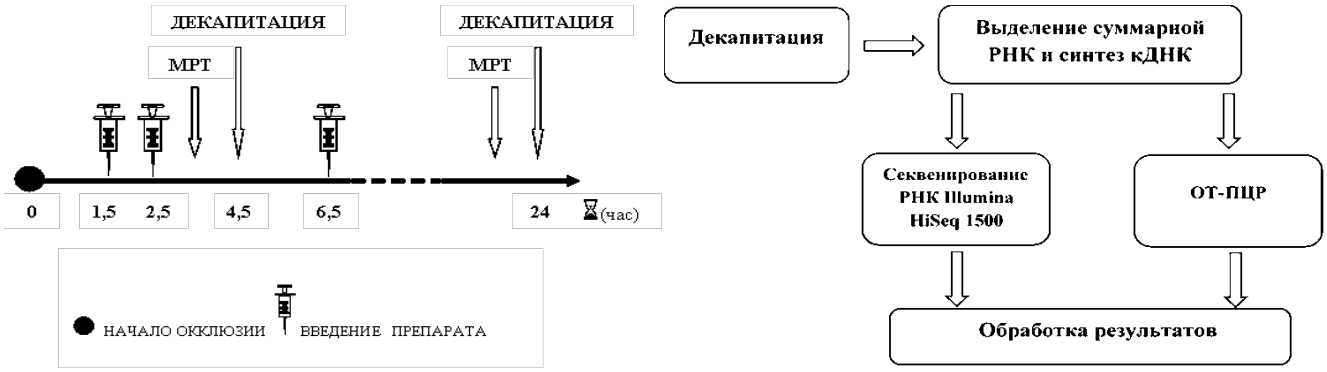

Рисунок 1 – Схема эксперимента.

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

Для данного эксперимента были взяты животные групп «ишемия» (IR) и «ишемия+семакс» (IS), которые ежедневно 1 раз в сутки внутрибрюшинно получали 0,9%

раствор NaCl 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 с помощью МРТ 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 также на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки с использованием шкалы mNSS (Modified Neurological Severity Scores), позволяющей оценить моторный дефицит, тактильную и проприоцептивную чувствительность, рефлексы и координаторную сферу. Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics 26.

Гистологическое исследование головного мозга крыс. Для данной части работы были взяты группы «ложная операция» (SH), «ишемия» (IR) и «ишемия+семакс» (IS) во временных подгруппах 4,5 и 24 часа после начала окклюзии**.** После выведения крыс из эксперимента, головной мозг 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 микротомирования 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», USA). 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 артифициальных, суправитальных и реактивных изменений клеток нервной ткани, вызванных манипуляциями при выделении головного мозга и его погружением в фиксирующие смеси [Garcia J.H. и соавт., 1995; Li Y. и соавт., 1998; Lipton P. и соавт., 1999]. Гистотопографическое картирование зон повреждения и точное определение уровней коронарных срезов проводили по стереотаксическому атласу головного мозга крыс [Buttner-Ennever J., 1997].

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

Продолжение Таблицы 1

Группы	Подгруппы	RNA-seq	ОТ-ПЦР	Гистология	14 суток
«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		

Магнитно-резонансная томография. Исследование характера и размера тканевых повреждений мозга животных проводилось на томографе для малых лабораторных животных ClinScan (Bruker BioSpin, USA) 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^2; 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) Т2 – 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). Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics 26.

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 длинной 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 ($Pagj < 0,05$).

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$(dT)_{18}$праймеры (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ проводили с помощью ПЦР в реальном времени на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). С целью анализа влияния пептидов семакс, PGP, PGPL была исследована экспрессия 6 генов, принадлежащих к кластеру воспаления (IC) и 6 генов - кластеру нейротрансмиссии (NC) относительно 2 генов сравнения (*Gapdh*, *Rpl3*). Так, к кластеру IC принадлежали гены: *IL1b*, *IL6*, *Ccl3*, *Socs3*, *Hspb1*, *Fos.* К кластеру NC относились следующие гены: *Cplx2*, *Neurod6*, *Gabra5*, *Chrm1*, *Gria3*, *Ptk2b.* 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 диссертационной работе.

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. 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 $p < 0,05$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 2a, 2b).

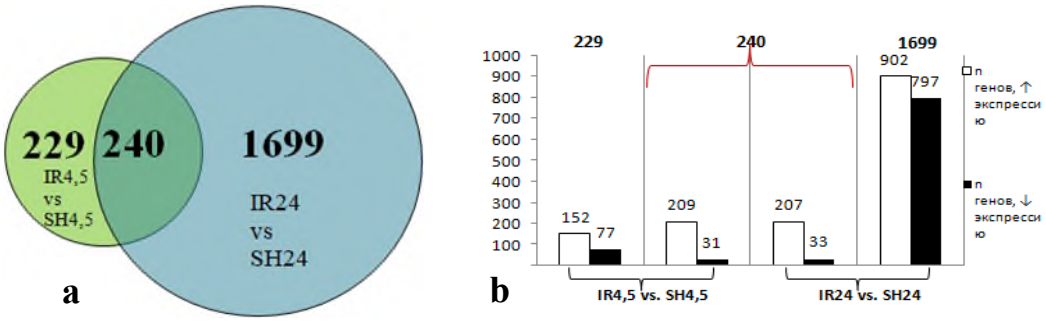

Рисунок 2 – RNA-seq анализ ДЭГ в условиях модели преходящей фокальной ишемии мозга у крыс. a. С помощью диаграммы Венна продемонстрировано количество генов, достоверно изменивших свою экспрессию в группах «IR4,5 vs. SH4,5» и «IR24 vs. SH24». b. Графическое отображение количества генов, проявивших повышенную 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 Padj < 0,05.

На Рисунке 3 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±0,0472), уровень *Ccl2* > 70 раз (73,332±0,0472), уровень *Atf3* был увеличен более чем в 64 раза (64,111±0,002). Уровни мРНК гена белка теплового шока *Hspa1(a,b)* и гена *Msr1*, который кодирует рецептор 1 акцептора макрофагов, были увеличены более чем в 80 раз в «IR24 vs. SH24» и составили (82,726±0,0004) и (82,190±0,0112) соответственно.

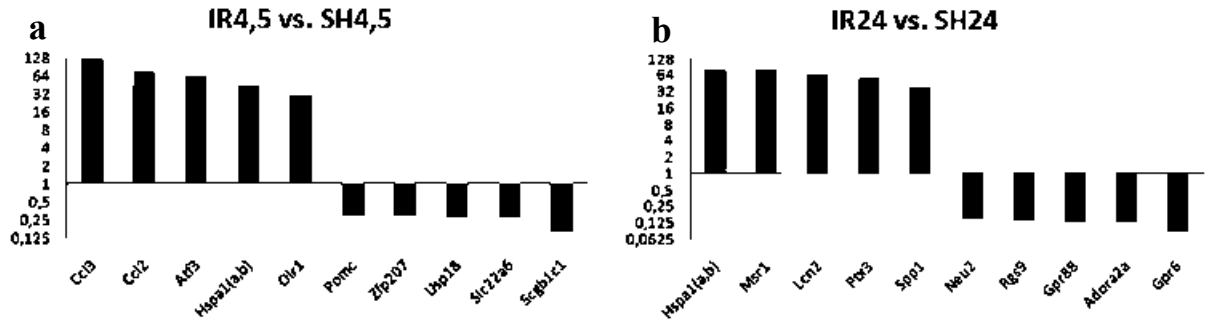

Рисунок 3 – Гены, наиболее заметно изменившие экспрессию при ишемии. a. Первые 10 генов, изменившие уровни экспрессии при ишемии спустя 4,5 часа после окклюзии (IR4,5 vs. SH4,5). b. Первые 10 генов, изменившие уровень экспрессии при ишемии спустя 24 часа после окклюзии (IR24 vs. SH24). Различия считали статистически значимыми при вероятности Padj < 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 4).

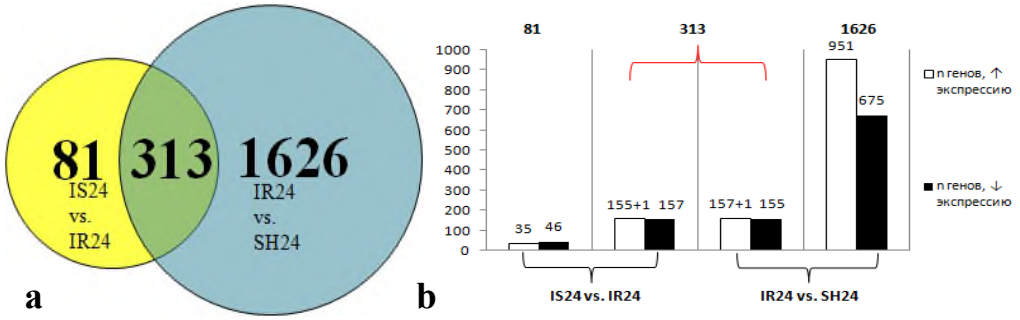

Рисунок 4 – RNA-seq анализ ДЭГ под действием семакса в условиях модели преходящей фокальной ишемии мозга у крыс. а. С помощью диаграммы Венна продемонстрировано количество генов, достоверно изменивших свою экспрессию в группах «IS24 vs. IR24» и «IR24 vs. SH24». б. Графическое отображение количества генов, проявивших повышенную и пониженную экспрессию в сравнениях «IS24 vs. IR24» и «IR24 vs. SH24». Различия считали статистически значимыми при вероятности Padj < 0,05.

На Рисунке 5 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 3х 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».

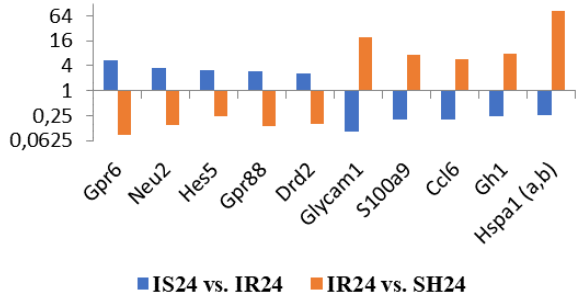

Рисунок 5 – Гены, наиболее заметно изменившие экспрессию в подкорковых структурах головного мозга крыс в группах сравнения «IS24 vs. IR24» и «IR24 vs. SH24». Различия считали статистически значимыми при вероятности Padj < 0,05.

Таким образом, посредством высокопроизводительного метода 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 имело повышенную экспрессию. 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.

Анализ функциональных категорий, кодируемых ДЭГ, в условиях ишемически-реперфузионного повреждения и под влиянием семакса

Ишемически-реперфузионное повреждение спустя 4,5 часа после окклюзии (IR4,5) повлияло на уровни экспрессии ДЭГ, ассоциированных с 34 функциональными категориями. Большее количество функциональных категорий, связанных с ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга, наблюдалось спустя 24 часа после окклюзии (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).

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 окклюзии. Так, большое количество генов с пониженной экспрессией были связаны с процессами транскрипции и с функционированием нейротрансмиттерных систем спустя 24 часа после окклюзии.

При воздействии семакса в условиях ишемически-реперфузионного повреждения спустя 24 часа после преходящей фокальной ишемии суммарное количество функциональных категорий равнялось 34. В первые 5 функциональных категорий с наименьшим *Padj* входили «disulfide bond», «glycoprotein», «signal», «secreted», «calcium». 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. В то же время функциональные категории иммунитета и воспалительного ответа («intermediate filament», «immunity», «innate immunity») были связаны с ДЭГ, проявившими пониженную экспрессию в сравнении IS24 vs. IR24.

Анализ сигнальных путей, ассоциированных с ДЭГ, в условиях ишемически-реперфузионного повреждения и под влиянием семакса

В условиях ишемически-реперфузионного повреждения мозга были обнаружены 22 пути, связанных с ДЭГ в группе IR4.5 vs. SH4.5, 82 сигнальных пути в группе IR24 vs. SH24 и 26 в группе IR24 vs. IR4.5. Идентифицированные сигнальные пути участвовали в воспалении, нейросигнализации, образовании и функционировании рибосом, функционировании протеаз, репликации ДНК и других процессах. Сравнительный анализ выявленных сигнальных путей показал, что 4 сигнальных пути, которые участвуют в воспалении (MAPK, протеогликаны при раке, дифференцировка остеокластов и сигнальный путь p53), были общими для всех групп и отражали эффекты ишемически-реперфузионного повреждения (Рисунок 6а). Наиболее

значимые сигнальные пути, связанные с ДЭГ в исследуемых группах, показаны на Рисунке 6b, c и d.

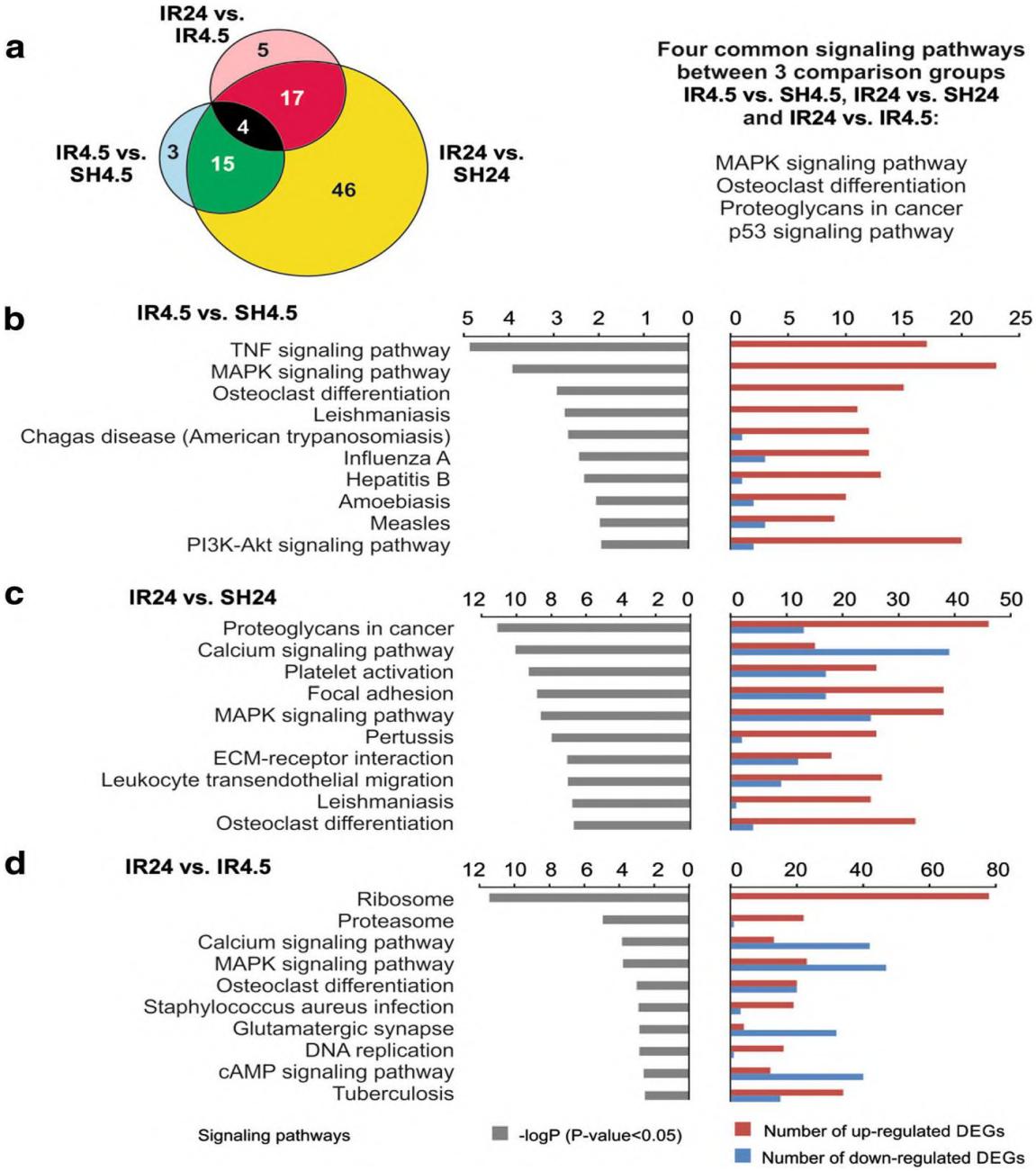

Рисунок 6 – Анализ сигнальных путей, связанных с ДЭГ через 4.5 и 24 ч после преходящей фокальной ишемии мозга у крыс. a. С помощью диаграммы Венна продемонстрировано количество сигнальных путей для групп IR4,5 vs. SH4,5; IR24 vs. SH24; IR24 vs. IR4,5, а также общие пути для всех групп. b, c и d. демонстрируют наиболее значимые сигнальные пути (Padj < 0,05), связанные с ДЭГ в группах IR4,5 vs. SH4,5; IR24 vs. SH24; IR24 vs. IR4,5.

С генами, изменившими свою экспрессию под влиянием гептапептида семакс в подкорковых структурах мозга спустя 24 часа после окклюзии, были ассоциированы 25 сигнальных путей (IS24 по сравнению с IR24). Среди них 17 сигнальных путей перекрывались между сравнениями IS24 vs. IR24 и IR24 vs. SH24 (Рисунок 7a). 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 связанны 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 7b). 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 противовоспалительный ответы, тем самым противодействуя ишемически-реперфузионному повреждению через 24 часа после преходящей фокальной ишемии мозга.

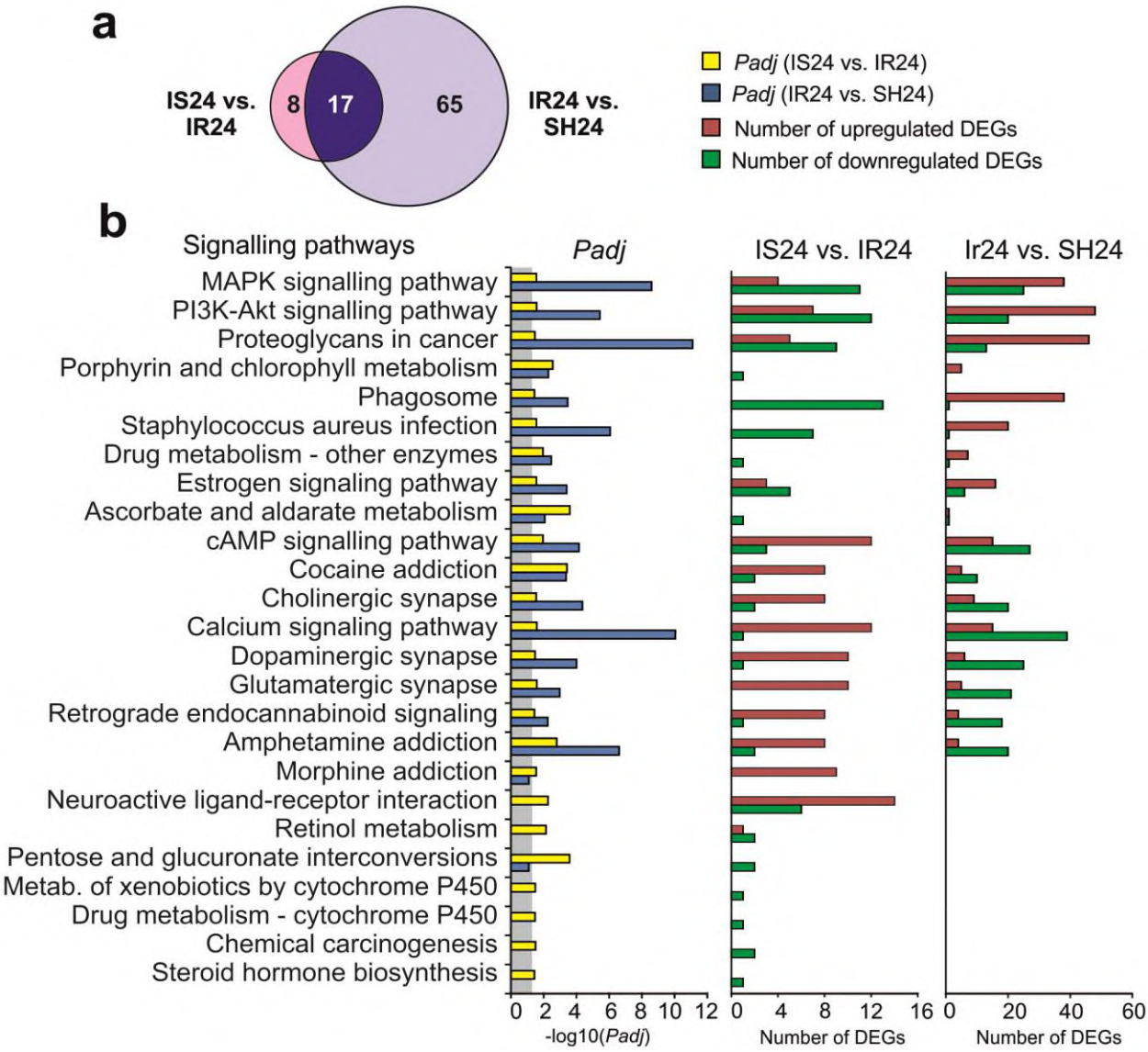

Рисунок 7 – Анализ сигнальных путей, связанных с ДЭГ, под воздействием семакса через 24ч после преходящей фокальной ишемии мозга у крыс. a. С помощью диаграммы Венна продемонстрировано количество генов и общие гены для групп IS24 vs. IR24 и IR 24 vs. SH24. b. Сигнальные пути и количество генов, показавших повышенный и пониженный уровни

экспрессии в сравнениях IS24 vs. IR24, IR24 vs. SH24. Для анализа были выбраны гены и сигнальные пути, у которых Padj < 0,05. Padj ≥ 0,05 отмечены серым фоном.

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

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 8a. 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 ишемии (Рисунок 8b). 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 8b).

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. 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 8c). Дифференциальная экспрессия генов IC и NC, связанных с действием PGPL в условиях IR продемонстрирована на Рисунке 8d. Под действием PGPL 3 гена NC изменили уровни экспрессии в сравнении 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 ≤ 0,001)*, *Chrm1 (1.85, p=0,011)* и *Gria3 (1.70, p=0,017)* (Рисунок 8d).

Также был проведен поиск ДЭГ, связанных с действиями PGP и PGPL в сравнении с воздействием семакса в условиях преходящей фокальной ишемии мозга у крыс. 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 8e). 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 8e).

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 8f). 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 IL в 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 8f).

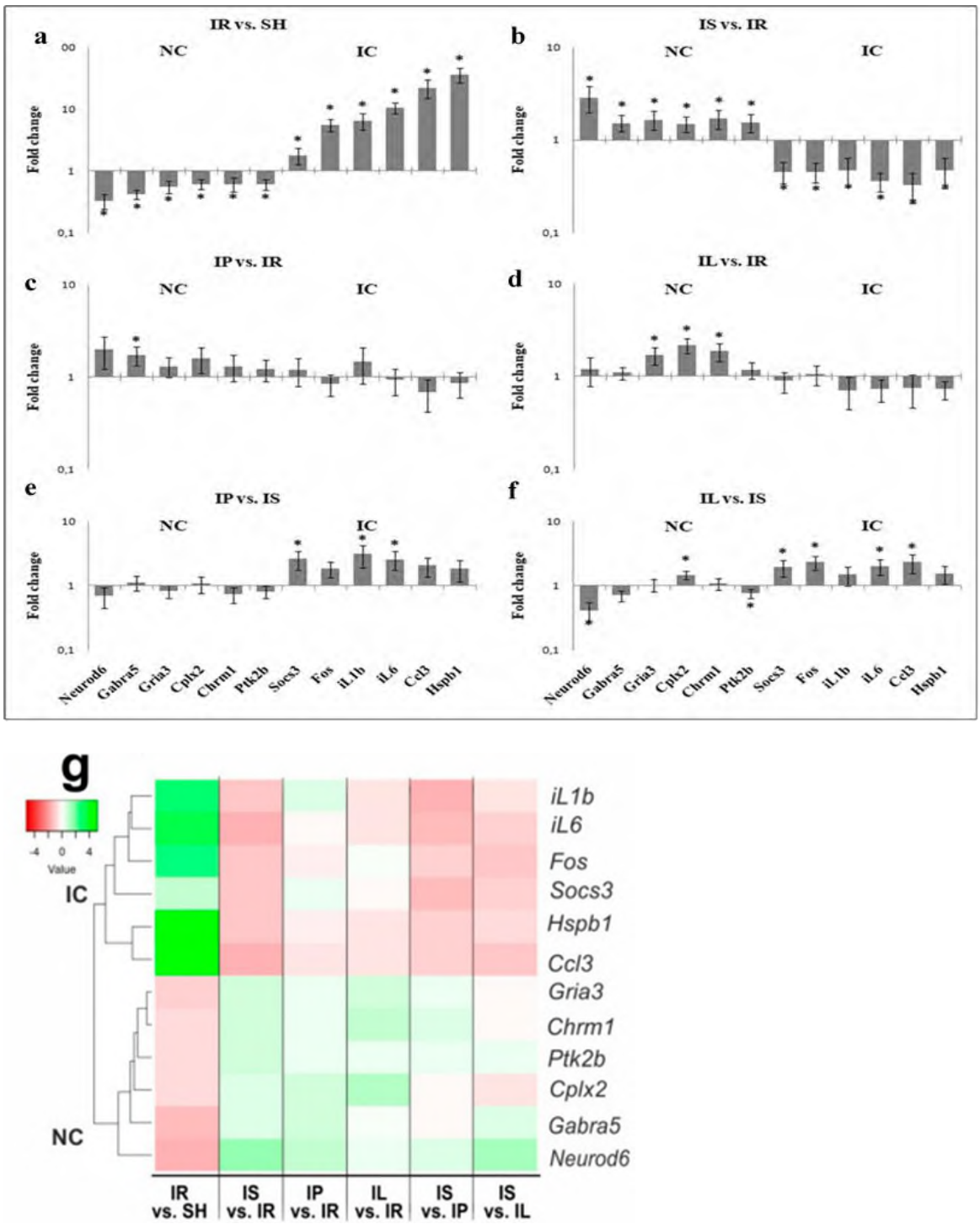

Рисунок 8 – Анализ ДЭГ и различия эффектов пептидных препаратов в условиях ишемически - реперфузионного повреждения спустя 24 часа после начала окклюзии (a - f). Анализ уровней экспрессии генов с помощью ОТ – ПЦР в воспалительном (IC) и нейротрансмиттерном кластерах (NC) в группах a) IR vs. SH, b) IS vs. IR, c) IP vs. IR, d) ILvs. IR, e) IP vs. IS, f) ILvs. 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, были подтверждены изменения в экспрессии 12 выбранных генов в условиях ишемии и введения семакса в подкорковых структурах исследованных крыс через 24 часа после преходящей фокальной ишемии. В ходе исследования продемонстрировано, что PGP и PGPL проявляли эффекты преимущественно 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), но активировало экспрессию ряда генов, продукты которых участвуют в нейротрансмиссии.

Морфология тканей мозга крыс в условиях модели преходящей фокальной ишемии

У крыс группы IR в условиях обратимой эндоваскулярной окклюзии 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. Типичная картина формирования фокальной ишемии в стриатуме показана на Рисунке 9. Зоны инфаркта имели вытянутую форму в дорсовентральном направлении и захватывали большую часть латеральной области каудопутамена (Рисунок 9 а, б) с отчетливой визуализацией пенумбры – пограничной зоны между ядром инфаркта и нормальной тканью мозга (Рисунок 9 в), и очагов формирования ядра инфаркта с необратимым повреждением нервной ткани, наличием участков некроза с деструкцией элементов нейропиля и погибшими пикноморфными нейронами (Рисунок 9 г). При этом зоны инфаркта охватывали значительную часть базальных ядер до мозолистого тела и наружной капсулы. Менее выраженные патоморфологические изменения наблюдались в пенумбре (Рисунок 9 в).

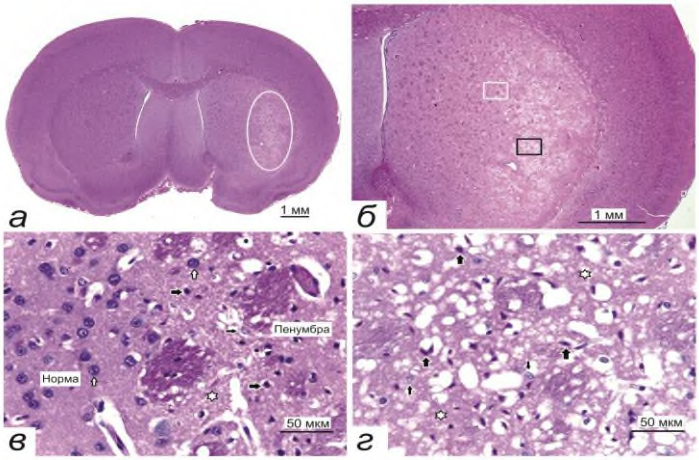

Рисунок 9 – Микрофотографии коронарных срезов головного мозга крысы, окрашенных гематоксилином и эозином, через 24 ч после обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии. а – Коронарный срез головного мозга на уровне +0.5 мм от брегмы; овалом отмечена зона ишемического повреждения стриатума правого 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

перицеллюлярный 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.

Оценка результатов магнитно-резонансного исследования у крыс

В результате моделирования преходящей фокальной ишемии головного мозга были получены инфаркты, которые можно разделить на два вида по локализации очага поражения: подкорковый и полушарный (Рисунок 10).

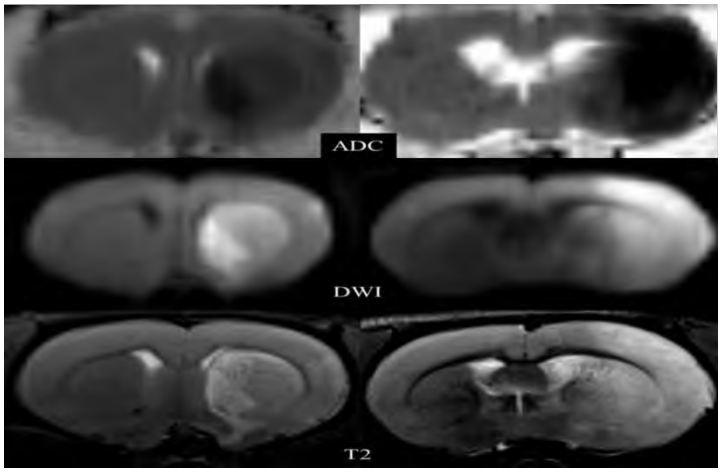

Рисунок 10 – Очаги ишемического повреждения головного мозга по данным МРТ (DWI с построением карт ADC, T2 ВИ) у крыс в условиях модели преходящей фокальной ишемии, слева – подкорковая локализация очага, справа – полушарная.

При многофакторном дисперсионном анализе выявлено, что 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 11).

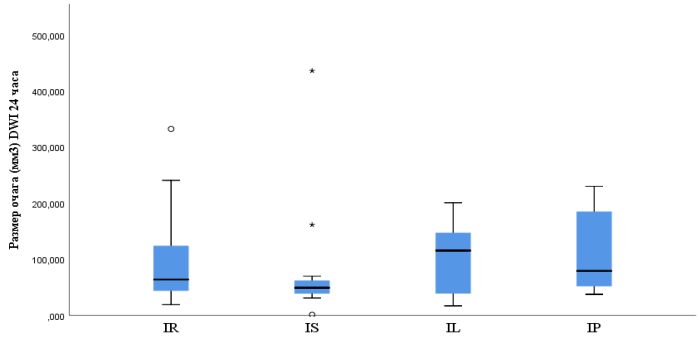

Рисунок 11 – Влияние пептидных препаратов на объем ишемического очага по данным DWI во временной точке 24 часа. Медиана с межквартильным размахом (минимум и максимум) очага повреждения в группах животных IR, IS, IL и IP.

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

При анализе выживаемости в эксперименте с длительным наблюдением за животными (14 суток) при сравнении групп «ишемия» (IR) и «ишемия+семакс» (IS) с помощью log-rank теста показано, что достоверных различий между группами выявлено не было (Рисунок 12a).

Для оценки различий в размерах очагов ишемического повреждения между группами IS и IR в различные временные интервалы наблюдения была применена общая линейная модель с повторными измерениями. Так, 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 12b).

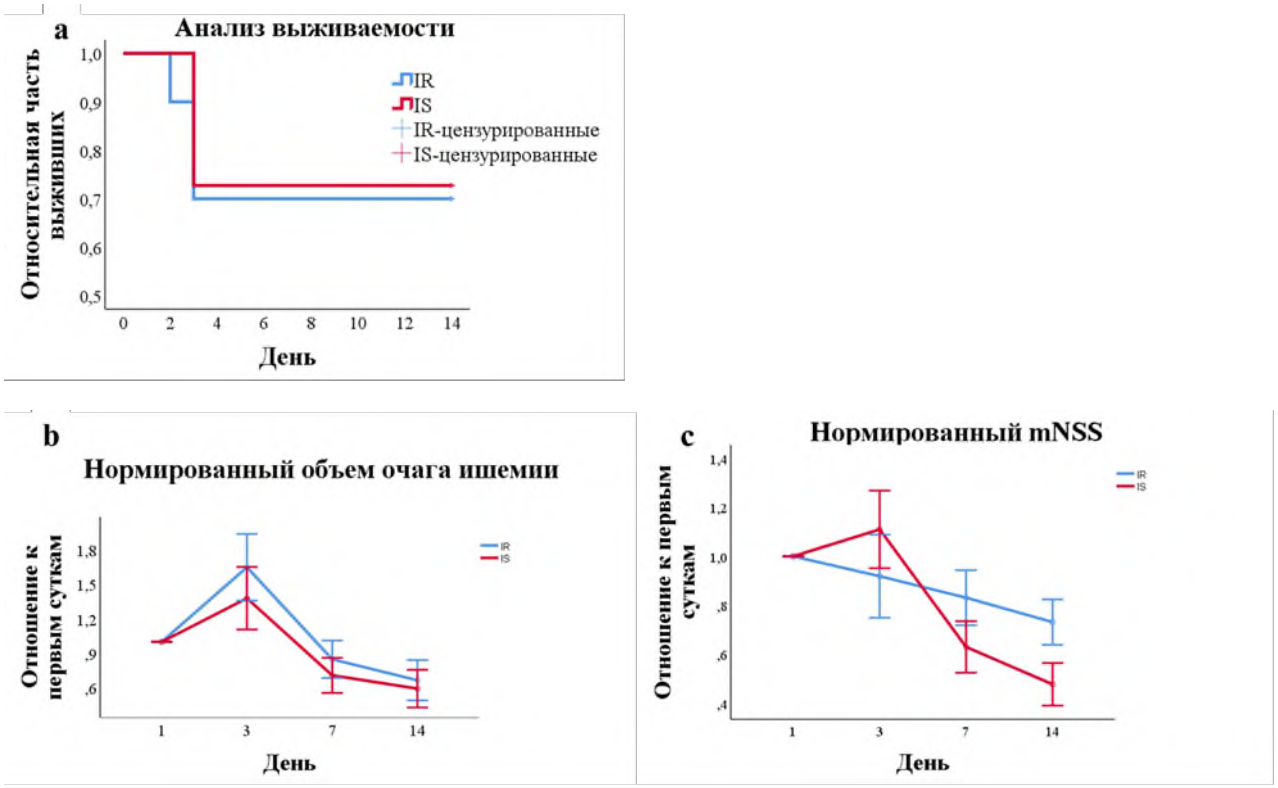

Рисунок 12 – Влияние семакса в условиях преходящей фокальной ишемии мозга при длительном наблюдении за животными (14 суток). a) Кривые выживаемости Каплана – Майера для групп IS и IR. b) Графическая демонстрация динамики размеров очагов ишемического повреждения по данным МРТ головного мозга в группах IR и IS в различные временные интервалы наблюдения (1, 3, 7, 14 дни). Представлены средние значения размеров очагов и 95% доверительные границы для среднего. c) 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.

При анализе динамики изменения (нормированного к первым суткам) неврологического дефицита были показаны статистически значимые различия в группах IS и IR к 14 дню наблюдений (рисунок 12c), $p < 0,05$. Суммарный балл по шкале mNSS в группе IS был ниже, что позволяет предполагать видимый нейропротективный эффект в позднее время от начала лечения.

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 И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВСА – внутренняя сонная артерия
ДЭГ – дифференциально экспрессируемые гены
МРТ – магнитно-резонансная томография
НСА – наружная сонная артерия
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
СМА – средняя мозговая артерия
RNA-seq – полногеномное секвенирование РНК

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Статьи

1. Денисова, А.Е. Биологические эффекты глипролинов меланокортинового ряда / И.Б. Филиппенков, В.В. Ставчанский, Л.В. Дергунова, С.А. Лимборская, Л.В. Губский // Фарматека. – 2018. – №5. – С. 26-30.

2. Дергунова, Л.В. Пептидный препарат АКТГ(4-7)PGP (семакс) подавляет транскрипцию генов провоспалительных медиаторов, индуцированную обратимой ишемией мозга крыс / В.Г. Дмитриева, И.Б. Филиппенков, В.В. Ставчанский, А.Е. Денисова, В.В. Южаков, Л.Е. Севанькаева, Л.В. Валиева, О.Ю. Сударкина, Л.В. Губский, Н.Ф. Мясоедов, С.А. Лимборская// Молекулярная биология. – 2021. – Т.55, – №3. – С. 402-411.

3. Сударкина, О.Ю. Исследование механизма нейропротективного действия пептидного препарата Семакс в мозге крыс в условиях ишемии-реперфузии / В.Г. Дмитриева, И.Б. Филиппенков, В.В. Ставчанский, А.Е. Денисова, Л.В. Губский, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова

// Медицинская генетика. – 2020. – №5(214). – С. 76-78.

4. Dergunova, L.V. Genome-wide transcriptome analysis using RNA-Seq reveals a large number of differentially expressed genes in a transient MCAO rat model / I.B. Filippenkov, V.V. Stavchansky, A.E. Denisova, V.V. Yuzhakov, S.A. Mozerov, L.V. Gubsky, S.A. Limborska // BMC Genomics. – 2018. – V.19, – №1. – P. 1-16.

5. Filippenkov, I.B. Novel Insights into the Protective Properties of ACTH (4-7)PGP (Semax) Peptide at the Transcriptome Level Following Cerebral Ischaemia-Reperfusion in Rats / V.V. Stavchansky, A.E. Denisova, V.V. Yuzhakov, L.E. Sevan`kaeva, O.Y. Sudarkina, V.G. Dmitrieva, L.V. Gubsky, N.F. Myasoedov, S.A. Limborska, L.V. Dergunova // Genes. – 2020. – V.11, – №6. – P. 1-17.

6. Sudarkina, O.Yu. Brain Protein Expression Profile Confirms the Protective Effect of the ACTH(4-7)PGP Petide (Semax) in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion / I.B. Filippenkov, V.V. Stavchansky, A.E. Denisova, V.V. Yuzhakov, L.E. Sevan`kaeva, L.V. Valieva, J.A. Remizova, V.G. Dmitrieva, L.V. Gubsky, N.F. Myasoedov, S.A. Limborska, L.V. Dergunova // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V.22, – №12. – P. 1-16.

7. Stavchansky, V.V. Insight into Glyproline Peptides Activity through the Modulation of the Inflammatory and Neurosignaling Genetic Response Following Cerebral Ischemia-Reperfusion / I.B. Filippenkov, J.A. Remizova, A.E. Denisova, I.V. Mozgovoy, L.V. Gubsky, N.F. Myasoedov, L.A. Andreeva, S.A. Limborska, L.V. Dergunova // Genes. – 2022. – V.13, – №12. – P.1-15.

Тезисы

1. Денисова, А.Е. Оценка влияния пептидов PGP и PGPL на экспрессию генов нейросигнализации в условиях модели преходящей фокальной ишемии мозга у крыс / И.Б. Филиппенков, В.В. Ставчанский, Н.Ф. Мясоедов, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова, Л.В. Губский // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Материалы XI Всероссийского съезда неврологов и IV конгресса Национальной ассоциации по борьбе с инсультом. – Санкт-Петербург – 2019. – Т.119 – С. 515.

2. Денисова, А.Е. Применение магнитно-резонансной томографии в анализе нейропротективного эффекта пептидного препарата семакс в условиях модели обратимой фокальной ишемии мозга у крыс / И.Б. Филиппенков, В.В. Ставчанский, Л.В. Дергунова, Л.В. Губский // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. VIII Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем»: материалы конференции. – Москва – Звенигород: Медиа Сфера, 2019. – С. 25.

3. Дмитриева, В.Г. Исследование изменений работы генов при развитии заболеваний и под действием пептидных препаратов / В.В. Ставчанский, И.Б. Филиппенков, А.Е. Денисова, А.В. Рожкова, Е.Б. Зуйкова, Е.В. Носова, О.Ю. Сударкина, Д.Ю. Литвинов, А.Д. Дергунов, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 2018. – Т.36 – С. 47-48.

4. Limborska, S.A. Peptide drug Semax affects neurotransmitter systems in the rat brain in conditions of transient focal ischemia / V.V. Stavchansky, A.E. Denisova, E.V. Medvedeva, I.B. Filippenkov, V.G. Dmitrieva, K.A. Ivanova, N.F. Myasoedov, L.V. Dergunova // European Journal of

Human Genetics. Supplement. – United Kingdom: Nature Publishing Group, 2019. – V. 26 – P. 629-630.

РЕЗЮМЕ

кандидатской диссертации Денисовой Алина Евгеньевны «Действие пептидных препаратов на экспрессию генов в условиях экспериментальной модели преходящей ишемии мозга у крыс»

Полученные в ходе экспериментальной модели преходящей фокальной ишемии данные о транскрипции генов и отличиях в их экспрессии 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 нейропротекции. 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.

SUMMARY

of the PhD thesis by Alina E. Denisova

«Effects of peptide-based drugs on gene expression in a rat model of transient cerebral ischemia»

The data obtained from an experimental model of transient focal cerebral ischemia regarding gene transcription and differences in gene expression have broadened the understanding of ischemia-reperfusion injury mechanisms. These findings are highly relevant for future research aimed at developing novel therapeutic approaches to ischemic stroke. The study revealed that Semax suppresses the expression of inflammation-related genes while enhancing the expression of genes involved in neurotransmission, which may underlie one of its neuroprotective mechanisms. Further investigation of Semax, PGP, and PGPL on other gene clusters holds promise for uncovering additional mechanisms of action and pharmacological effects in experimental models of cerebral ischemia.