

ПЕПТИД СЕЛАНК ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ГИППОКАМПЕ КРЫС В РАННИЕ ЧАСЫ ПОСЛЕ ОСТРОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

© 2024 г. И. Б. Филиппенков^{1,*}, Н. Ю. Глазова^{1,2}, Е. А. Себенцова^{1,2}, И. В. Мозговой¹,
В. В. Ставчанский¹, Н. Ф. Мясоедов¹, Н. Г. Левицкая^{1,2}, С. А. Лимборская¹, Л. В. Дергунова¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: filippenkov-ib.img@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2024 г.

После доработки 11.01.2024 г.

Принята к публикации 23.01.2024 г.

Стрессорные воздействия являются фактором риска развития тревожно-депрессивных расстройств, сердечно-сосудистых заболеваний и когнитивных нарушений. Пептидный препарат ThrLysProArgProGlyPro (селанк), аналог эндогенного тафтцина, вошел в клиническую практику в качестве анксиолитического агента, работающего как позитивный аллостерический модулятор. На модели острого иммобилизационного стресса с помощью метода высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-Seq) показано, что селанк способен значительно изменять экспрессию генов в гиппокампе крыс через 2 ч после стрессогенного воздействия. Так, введение селанка (300 мкг/кг) крысам за 30 мин до начала иммобилизации длительностью 1 ч приводило к изменению экспрессии 549 генов (кратность >1.5 и $Padj < 0.05$), относящихся к системам процессинга и презентации антигенов и передачи нервного импульса. В то же время при введении селанка крысам в отсутствие стрессовой нагрузки значимого изменения экспрессии генов в гиппокампе не наблюдалось. Таким образом, селанк уже в ранние часы после острого стресса может регулировать вызванные им процессы на молекулярно-генетическом уровне, не оказывая влияния на геномную активность при отсутствии такого воздействия.

DOI: 10.56304/S1992722324602210

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что как острый, так и хронический стресс вызывает в организме человека и животных физиологические изменения, которые могут лежать в основе многих патологических состояний [1]. Стрессогенные воздействия являются фактором риска развития тревожно-депрессивных расстройств, посттравматических стрессовых расстройств, сердечно-сосудистых заболеваний и когнитивных нарушений [2–4]. Однако нейробиологические механизмы, опосредующие острые и долговременные последствия стресса, недостаточно исследованы [5]. Изучение механизмов негативных последствий острого стресса и поиск путей их фармакологической коррекции являются актуальной проблемой современной нейробиологии и медицины.

В настоящее время активно разрабатываются способы снижения масштабов стрессогенного влияния на головной мозг посредством протек-

ции нервных клеток физиологически активными веществами. Так, многие физиологические процессы в организме поддаются прямой или опосредованной регуляции веществами пептидной природы [6, 7]. Одним из препаратов, созданных на основе природных регуляторных пептидов, является ThrLysProArgProGlyPro (**селанк**) — аналог эндогенного фрагмента тяжелой цепи иммуноглобулина G — тафтцина, стабилизированный трипептидом ProGlyPro (**PGP**). Селанк вошел в клиническую практику в качестве анксиолитического агента, обладающего стимулирующим, ноотропным и нормализующим эмоциональное состояние действием при минимальных побочных реакциях [8].

Согласно [9] селанк способен к позитивной аллостерической модуляции ГАМК-рецепторов. При этом известно, что эффекторное воздействие пептидов зачастую связано с модуляцией не единичных рецепторных систем, а с влиянием на множество типов клеточных рецепторов. В свою очередь, рецепторы могут влиять на целый ряд

сигнальных и метаболических путей, в том числе опосредованно воздействуя на экспрессию генов в ядре [10, 11]. В ответ на стрессогенное воздействие выделяются медиаторы стрессорного ответа (гормоны, пептиды, нейромедиаторы), которые, воздействуя на соответствующие рецепторы в центральной нервной системе), могут регулировать экспрессию генов в различных областях мозга [12–14]. При этом способность селанка к аллостерическому связыванию с рецепторами в условиях ортостерического связывания рецепторов с медиаторами стресса, вероятно, может приводить к существенным изменениям сигналов, передаваемых клеткам при стрессе. Применение геномных подходов, в частности основанных на изучении изменений уровня матричных РНК (мРНК) генов, может позволить понять генез процессов, запускаемых селанком при стрессе, лежащих в основе механизмов действия пептида. Так, ранее с помощью метода ПЦР было показано, что селанк влияет на экспрессию генов (*Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb3*, *Gabre* и др.), связанных с нейротрансмиссией, в лобной коре крыс [15]. Эти данные позволяют предположить, что селанк может модулировать профиль экспрессии генов ГАМК-системы, а также нейросигнализацию и нейрорецепцию.

В данной работе использовали метод высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-Seq), чтобы изучить влияние селанка на активность генома клеток мозга крыс в первые часы после перенесенного острого иммобилизационного стресса и оценить сигнальные системы, модуляцию которых обеспечивает действие селанка при стрессе. Были изучены изменения уровня мРНК генов в гиппокампе как в ключевой структуре мозга, участвующей в контроле поведения, связанного с тревогой, и реакции на острый стресс [4]. В результате выявили, что селанк в ранние часы после острого стресса вызывает изменение экспрессии сотен генов (кратность >1.5 и $Padj < 0.05$), относящихся к системам процессинга и презентации антигенов и передачи нервного импульса в гиппокампе крыс. При этом пептид не оказывает влияния на геномную активность клеток гиппокампа в нормальных внестрессовых условиях. Таким образом, селанк на фоне развития стрессорной реакции может обеспечивать глобальную регуляцию активности клеток гиппокампа на молекулярно-генетическом уровне.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Экспериментальные группы. Опыты проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 200–230 г. Животных содержали в виварии при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и

стандартному лабораторному корму. Исследование проведено с соблюдением биоэтических норм обращения с экспериментальными животными в соответствии с “Правилами надлежащей лабораторной практики” (Приказ МЗ РФ № 199 от 01.04.2016) и требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента от 22.09.2010.

Гептапептид ThrLysProArgProGlyPro (селанк) был синтезирован в Лаборатории молекулярной фармакологии пептидов НИЦ “Курчатовский институт”. Пептид вводили в водном растворе в дозе 300 мкг/кг внутривентально в объеме 1 мл/кг за 30 мин до начала стрессогенного воздействия. Контрольным животным вводили эквивалентный объем дистиллированной воды в соответствующие сроки.

Использовали четыре группы крыс – нестрессированные крысы, получавшие растворитель (NS-V) или селанк (NS-L), а также стрессированные крысы, получавшие растворитель (STR-V) или селанк (STR-L). Крыс разделяли на группы случайным образом. Время, дозировка и способ введения селанка были выбраны на основе исследований [16–18].

Модель острого стресса

Стрессирующий фактор. В качестве стрессирующего фактора использовали иммобилизацию в сочетании с акустическим воздействием длительностью 1 ч. На период иммобилизации крысу помещали в рестрейнер – индивидуальный фиксатор для лабораторных животных (производство ООО “Открытая наука”, Россия). В качестве акустического воздействия использовали звук электрического звонка (3 мин – звонок, затем 1 мин – пауза).

Оценка эмоционального состояния животных. Через 90 мин после окончания стрессорного воздействия (через 3 ч после инъекции) для оценки эмоционального состояния крыс использовали тест “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ). Экспериментальная камера лабиринта (ООО “Открытая наука”, Россия) состоит из четырех расходящихся из центра рукавов. Два противоположных рукава закрыты с торцов стенками и затемнены, два других – открыты и ярко освещены. Крысу помещали в центр лабиринта и в течение 5 мин регистрировали время нахождения в различных отсеках лабиринта (центральная площадка, открытые и закрытые рукава лабиринта), количество заходов в открытые и закрытые рукава, а также число свешиваний с открытых рукавов.

Крыс выводили из эксперимента методом декапитации через 3.5 ч после инъекции. Каждая группа сравнения включала по 10 крыс.

Статистическая обработка результатов оценки эмоционального состояния животных. При ста-

статистической обработке полученных результатов использовали пакет программ Statistica, версия 10. При сравнении времени, проведенного в различных отсеках лабиринта, использовали трехфакторный дисперсионный анализ (3-way ANOVA) (факторы ОТСЕК, СТРЕСС и СЕЛАНК). Сравнение числа заходов в рукава и числа свешиваний проводили при помощи 2-way ANOVA (факторы СЕЛАНК и СТРЕСС). В случае статистически значимого эффекта факторов или их взаимодействия для дальнейшей оценки различий между группами при post-hoc-анализе использовали критерий Fisher LSD.

Транскриптомный анализ

Получение ткани. Из мозга крыс извлекали область гиппокампа. Образцы данной ткани помещали в раствор RNAlater на 24 ч при 0°C, затем хранили при –70°C.

Получение РНК. Из полученных образцов гиппокампа крыс была выделена тотальная РНК при помощи реагента Trizol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) согласно рекомендации производителя. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой 1 (Thermo Fisher Scientific) в присутствии ингибитора РНКаз RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя. Качество и количество выделенной тотальной РНК проверяли на приборе BioAnalyser с помощью набора RNA 6000 Nano Kit (Agilent, США). Показатель целостности РНК (RIN) был не менее 9.

Полногеномное секвенирование РНК (RNA-Seq). ПолиА-фракцию РНК получали из тотальной РНК 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). RNA-Seq проводили на приборе HiSeq1500 (Illumina, США) с генерацией не менее 10 миллионов коротких чтений длиной 1 × 50 нуклеотидов. Каждая группа NS-V, NS-L, STR-V и STR-L включала в себя по три животных.

Обработка результатов RNA-Seq. Для картирования и подсчета количества прочтений использовали программы Tophat и Cufflinks. Уровень экспрессии генов рассчитывали как число фрагментов на килобазу, отнесенное на миллион прочтений (fragments per kilobase per million reads (FPKM)), с использованием программы Cuffdiff.

Дифференциально экспрессированными генами (ДЭГ) считали только те гены, которые изменили уровень своей экспрессии больше чем в 1.5 раза. Значимыми считали различия, имеющие значение вероятности p , скорректированное с поправкой Бенджамини–Хохберга ($Padj$) < 0.05.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкг РНК, с использованием реагентов набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Вильнюс, Литва) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа мРНК использовали праймеры Oligo(dT)₁₈.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I. Праймеры были подобраны с помощью Oligo Analyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) и синтезированы компанией ЗАО “Евроген Ру” (табл. 1). Амплификацию кДНК проводили на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США), как описано в [18]. Каждая группа включала в себя по пять животных.

Обработка результатов ПЦР в реальном времени. Каждый образец кДНК анализировали трижды. Из трех повторных измерений рассчитали среднее значение порогового цикла (C_t). Уровень мРНК гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Gapdh* использовали для нормализации результатов ПЦР. Расчеты проводили с использованием Relative Expression Software Tool (REST) 2005 software [19]. Для оценки содержания исследуемых мРНК относительно мРНК гена сравнения использовали формулу $E^{C_t(\text{ref})}/E^{C_t(\text{tar})}$, где E — эффективность ПЦР-реакции, $C_t(\text{tar})$ — средняя величина C_t для исследуемых РНК и $E^{C_t(\text{ref})}$ — для мРНК гена сравнения (*Gapdh*). Эффективности ПЦР оценивали с использованием амплификации серии стандартных разведений кДНК. Значения эффективностей для всех реакций ПЦР находились в пределах 1.82–2.05 (табл. 1). При сравнении групп данных между собой статистически значимыми считали различия с вероятностью $p < 0.05$. Дополнительную обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Excel.

Биоинформатический анализ

Анализ функциональных аннотаций генов. Программы для аннотации, визуализации и интегрированного обнаружения (DAVID v2021) [20] и для анализа обогащения наборов генов (GSEA) [21] использовали для аннотирования функций ДЭГ. При сравнении групп данных статистически значимые различия учитывали с вероятностью $Padj < 0.05$ (с поправкой Бенджамини–Хохберга в DAVID v2021 и FDR в GSEA).

Таблица 1. Характеристика праймеров для ПЦР в реальном времени

Ген	Праймер (5'–3'): прямой (F), обратный (R)	RefSeq	Размер продукта (п.н.)	E ± SE
<i>Pla2g3</i>	F: CAAGTTCCACCTGCTCAACA, R: GTGCCTTTATCCCAGAAATG	NM_001106015	207	2.02 ± 0
<i>Hif3a</i>	F: GTGAGCACCATGACGAAACCCTCG, R: ATGCGCCTCACAATCAGCTACTTGC	NM_022528.2	134	1.96 ± 0
<i>Cd74</i>	F: GTGTCTCTGTCTGGTGGCT, R: CGCATCAGCAAGGGAGTAG	NM_013069.2	193	1.87 ± 0.18
<i>Grm3</i>	F: ACCCTCTGTCCCAACACCA, R: TACTTCCCACCTGTCTGCT	NM_001105712	216	2.02 ± 0.03
<i>Adcy5</i>	F: TGTCTTCGTGCTGGCTCTGT, R: TGGTAGTACAGTTCATCATTCG	NM_022600	210	1.94 ± 0
<i>Cnot3</i>	F: GCTCTACAGATAGTGAAGTCA, R: TGCTGGTTGCTGTGGACA	NM_001107471.2	70	1.82 ± 0.05
<i>Cyr61</i>	F: CTGTCTTTGGCACGGAACCT, R: ATTTCTTGGTCTTGCTGC	NM_031327.3	249	2.05 ± 0.04
<i>Gapdh</i>	F: ACTCTACCCACGGCAAGTTCAACG, R: GTAGACTCCACGACATACTCAGCAC	NM_017008.4	148	2.01 ± 0.03

Примечание. E ± SE – эффективность ПЦР ± стандартная ошибка среднего, RefSeq – идентификатор референсной нуклеотидной последовательности МРНК, п.н. – пары нуклеотидов.

Иерархический кластерный анализ ДЭГ проводили с использованием Heatmapper [22].

Генные сети. Программное обеспечение Cytoscape 3.8.2 использовали для визуализации регуляторной сети [23].

Другие расчеты и построения, включая графики “Volcano-plot”, были построены с помощью Microsoft Excel (Microsoft Office 2010, Microsoft, США).

Доступность данных и материалов

Данные RNA-Seq депонировали в базу данных Sequence Read Archive под кодом доступа PRJNA1049747, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA1049747>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние острого иммобилизационного стресса и введения селанка на поведение крыс в тесте ПКЛ

Через 1.5 ч после окончания стрессорного воздействия (через 3 ч после введения пептида) проводили изучение поведения крыс в тесте ПКЛ. Применение трехфакторного анализа ANOVA для времени, проведенного в различных отсеках лабиринта, показало статистически значимое влияние фактора ОТСЕК ($F_{2,72} = 163.5$; $p < 0.0001$). Кроме того, наблюдали значимое взаимодействие факторов СТРЕСС и ОТСЕК ($F_{2,72} = 9.0$; $p < 0.001$), а также факторов СЕЛАНК и ОТСЕК

($F_{2,72} = 4.10$; $p = 0.02$). Дальнейший анализ показал, что крысы всех групп больше времени проводили в закрытых рукавах по сравнению как с открытыми рукавами, так и с центром лабиринта ($p < 0.00001$). В группах NS-V, NS-L и STR-V значимых различий между временем в открытых рукавах и в центре лабиринта отмечено не было ($p > 0.45$). В группе STR-L время на открытых рукавах статистически значимо превышало время, проведенное в центре лабиринта ($p = 0.04$). Межгрупповое сравнение показало статистически значимое снижение времени в закрытых рукавах ($p = 0.003$), а также увеличение времени в открытых рукавах на уровне тенденции ($p = 0.07$) в группе STR-V относительно группы NS-V. Кроме того, зарегистрированы статистически значимое увеличение времени в открытых рукавах ($p = 0.0001$) и снижение времени в закрытых рукавах ($p < 0.0001$) в группе STR-L относительно группы NS-V. Значимых различий между группами NS-L и NS-V отмечено не было ($p > 0.10$). В группе STR-L наблюдалось статистически значимое увеличение времени в открытых рукавах ($p = 0.03$) по сравнению с группой STR-V (рис. 1а–1в).

Применение двухфакторного анализа ANOVA показало статистически значимое влияние факторов СТРЕСС и СЕЛАНК на число заходов в открытые рукава ($F_{1,36} = 14.38$; $p = 0.001$ и $F_{1,36} = 12.86$; $p = 0.001$) и свешиваний с открытых рукавов лабиринта ($F_{1,36} = 12.67$; $p = 0.001$ и $F_{1,36} = 7.79$; $p = 0.01$). Кроме того, зарегистрировано значимое влияние фактора СЕЛАНК на число за-

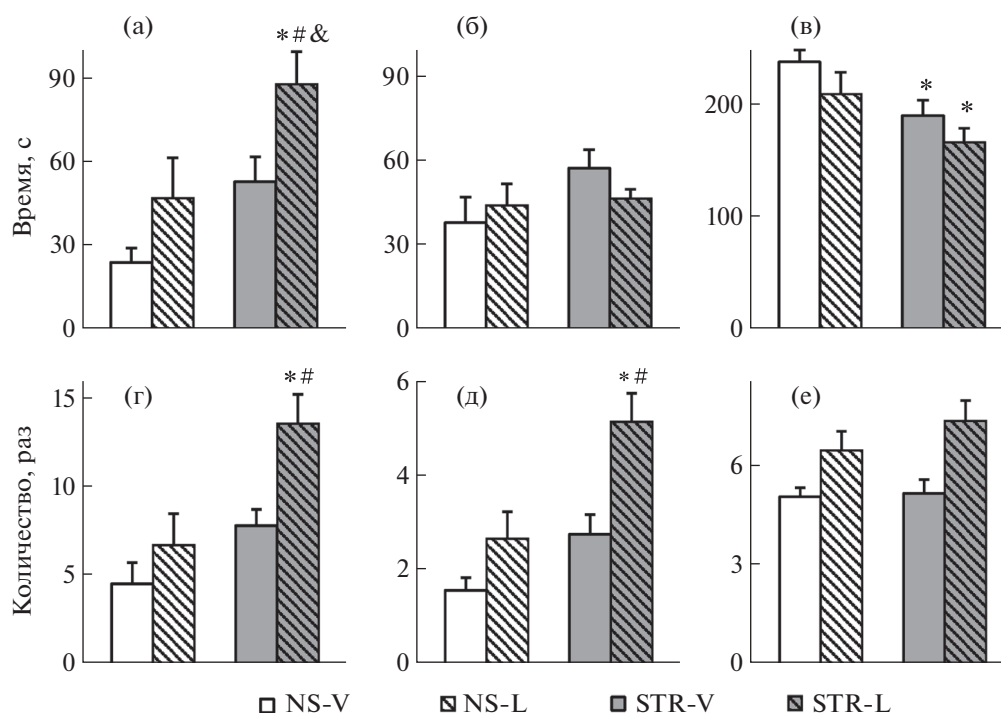


Рис. 1. Влияние острого стресса и селанка на поведение крыс в тесте ПКЛ. Селанк вводили в дозе 300 мкг/кг за 30 мин до начала стрессогенного воздействия. Время, проведенное в открытых рукавах (а), в центре (б) и в закрытых рукавах лабиринта (в). Количество свешиваний с открытых рукавов (г), заходы в открытые (д) и закрытые рукава (е) лабиринта. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего; * – значимые ($p < 0.01$) отличия от группы NS-V; # – значимые ($p < 0.03$) отличия от группы STR-V; & – значимые ($p < 0.05$) отличия от времени в центре лабиринта в соответствующей группе.

ходов в закрытые рукава ($F_{1,36} = 4.79$; $p = 0.035$). Значимого взаимодействия указанных факторов для данных показателей поведения в ПКЛ отмечено не было ($F_{1,36} < 1.8$; $p > 0.20$). Множественное сравнение показало увеличение числа заходов в открытые рукава на уровне тенденции ($p < 0.10$) в группе STR-V относительно группы NS-V. Кроме того, зарегистрировано статистически значимое увеличение числа заходов в открытые рукава ($p < 0.00001$) и числа свешиваний с открытых рукавов ($p < 0.0001$) в группе STR-L относительно группы NS-V. Значимых различий между группами NS-L и NS-V отмечено не было ($p > 0.10$). В группе STR-L наблюдалось статистически значимое увеличение числа заходов в открытые рукава ($p = 0.001$) и числа свешиваний ($p = 0.01$) по сравнению с группой STR-V. Кроме того, отмечалось увеличение числа заходов в закрытые рукава на уровне тенденции ($p < 0.07$) в группе STR-L по сравнению с группами NS-V и STR-V (рис. 1г–1е).

По результатам работы введение селанка нестрессированным животным не приводило к изменению поведения в тесте ПКЛ через 3 ч после инъекции. Крысы, перенесшие острый стресс, меньше времени проводили в закрытых рукавах лабиринта и чаще выходили на открытые рукава по сравнению с нестрессированным контролем,

т.е. демонстрировали более активное поведение. Характер изменений поведения животных, получавших инъекцию селанка перед стрессогенным воздействием, свидетельствует о снижении уровня тревожности и усилении исследовательского поведения как по сравнению с контролем, так и относительно стрессированных крыс, которым вводили растворитель.

RNA-Seq-анализ влияния острого стресса на транскриптом гиппокампа крыс

В результате RNA-Seq получены данные об изменении уровня мРНК для 17367 генов крысы. График “volcano plot” иллюстрирует различия в экспрессии мРНК между группами STR-V и NS-V (рис. 2а). Обнаружены 22 ДЭГ (кратность > 1.5 ; $Padj < 0.05$) под действием стресса в группе STR-V относительно (vs.) NS-V. Из них только три гена (*Alox15*, *Aox1*, *RT1-Da*) повысили уровень экспрессии и 19 генов понизили его (*Gjb6*, *Gpd1*, *Gpr22*, *Met*, *Cep131*). Величины дифференциальной экспрессии перечисленных генов представлены на рис. 2б.

ПЦР в реальном времени использовали, чтобы изучить экспрессию генов *Pla2g3*, *Cd74*, *Hif3a*, *Cnot3*, *Cyr61*, *Adcy5* и *Grm3* в сравнении STR-V vs.

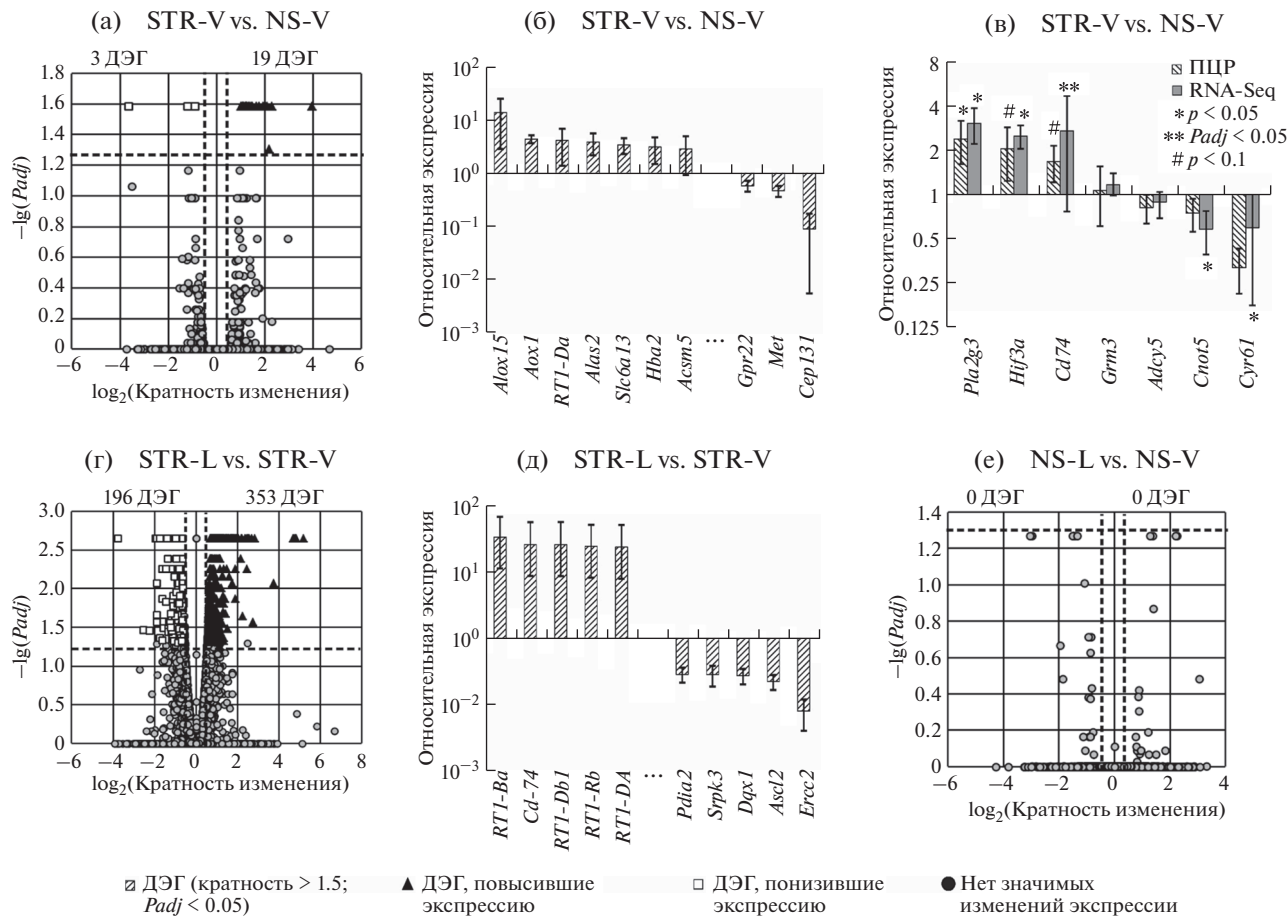


Рис. 2. RNA-Seq-анализ влияния острого стресса и селанка на транскриптом гиппокампа крыс. Графики “Volcano-plot” иллюстрируют различия в экспрессии мРНК между группами STR-V и NS-V (а), STR-L и STR-V (г), NS-L и NS-V (е). Гены, повысившие и понизившие экспрессию (кратность >1.50 и *Padj* < 0.05), – черные треугольники и белые квадраты соответственно. Гены, не изменившие экспрессию (кратность ≤1.50 или *Padj* ≥ 0.05), – серые кружки. Показано по 10 генов, продемонстрировавших наибольшее кратное изменение экспрессии в сравнении STR-V vs. NS-V (б) и STR-L vs. STR-V (д). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Представлены результаты проверки результатов RNA-Seq с помощью ПЦР в реальном времени (в). Показаны данные для сравнения STR-V vs. NS-V.

NS-V для проверки результатов RNA-Seq на расширенной выборке животных (рис. 2в). Результаты ПЦР в реальном времени адекватно соответствовали результатам RNA-Seq.

RNA-Seq-анализ влияния селанка на транскриптом гиппокампа стрессированных и контрольных крыс

Сравнение групп STR-L vs. STR-V, отражающее действие селанка на транскриптом гиппокампа крыс в условиях стресса, показало значимое изменение экспрессии суммарно 549 генов. График “volcano plot”, иллюстрирующий различия в экспрессии мРНК между группами STR-L и STR-V, показан на рис. 2г. Большая часть ДЭГ в данном сравнении (353 ДЭГ) повысила уровень экспрессии, причем гены *RT1-Ba*, *Cd74*, *RT1-Db1*, *RT1-Bb* и *RT1-Da* более чем в 25 раз (рис. 2д). Также были 196 ДЭГ (*Srp3k3*, *Dqx1*, *Ascl2*, *Ercc2*), сни-

живших уровень своих мРНК в сравнении STR-L vs. STR-V (рис. 2д).

Важно отметить, что не было выявлено ни одного ДЭГ, значимо изменившего уровень мРНК в сравнении NS-L vs. NS-V, отражающем действие селанка на транскриптом гиппокампа крыс в нормальных внестрессовых условиях (рис. 2е).

Анализ результатов RNA-Seq в различных группах сравнения

На следующем этапе провели сравнение спектров ДЭГ, изменивших уровень мРНК при остром стрессогенном воздействии (STR-V vs. NS-V), а также при действии селанка при стрессе (STR-L vs. STR-V). На рис. 3а в форме диаграммы Венна показаны 13 перекрывающихся генов, которые значимо изменили уровень своей экспрессии (кратность > 1.5 раза, *Padj* < 0.05) в области

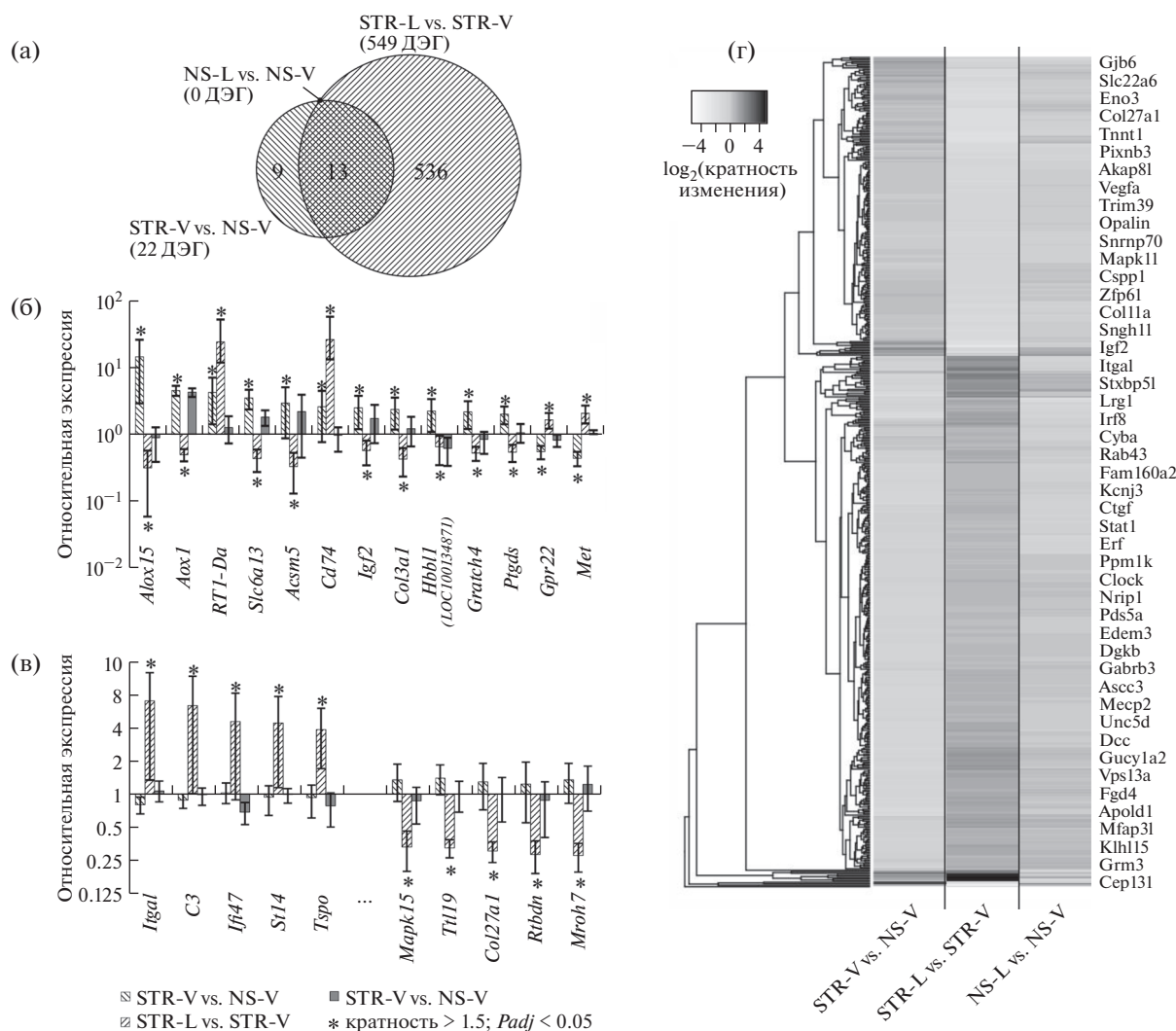


Рис. 3. Сравнение результатов RNA-Seq, полученных в гиппокампе стрессированных и нестрессированных крыс и после введения селанка. Диаграмма Венна иллюстрирует результаты, полученные для трех парных сравнений STR-V vs. NS-V, STR-L vs. STR-V и NS-L vs. NS-V (а). Числа в пересечении различных наборов генов на диаграмме Венна указывают количество ДЭГ. Величины относительной экспрессии для ДЭГ, которые перекрываются между двумя парными сравнениями STR-V vs. NS-V и STR-L vs. STR-V (б). Показаны 10 генов, продемонстрировавших наибольшее кратное изменение экспрессии в сравнении STR-L vs. STR-V (в). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Иерархический кластерный анализ всех ДЭГ в трех парных сравнениях STR-V vs. NS-V, STR-L vs. STR-V и NS-L vs. NS-V. Каждый столбец – группа сравнения, а каждая строка – ген, черные полосы – максимальное повышение, а белые – максимальное снижение относительной экспрессии.

гиппокампа крыс как в результате стрессогенного воздействия, так и в ответ на введение селанка перед стрессом относительно стрессированных животных, получавших растворитель. Величины изменения экспрессии данных генов показаны на рис. 3б. Только два гена *RT1-Da* и *Cd74*, кодирующие белки главного комплекса гистосовместимости (ГКГ), сонаправленно повысили уровень мРНК как в STR-V vs. NS-V, так и в STR-L vs. STR-V. Другие 11 генов (*Alox15*, *Aox1*, *Slc6a13*, *Acsm5*, *Igf2*, *Col3a1*, *Hbb11* (*LOC100134871*), *Gratch4*, *Ptgsd*, *Gpr22* и *Met*) при введении селанка

изменили уровень экспрессии в направлении, противоположном влиянию самого стресса.

Были выявлены девять генов (*Alas2*, *Hba2*, *Hba1*, *Col1a1*, *Rnase4*, *Mt2A*, *Gjb6*, *Gpd1*, *Cep131*), которые изменили экспрессию только при стрессе, преимущественно (кроме *Cep131*) повысив ее. При этом наибольшее число ДЭГ (536) относилось к категории уникальных для воздействия селанка при стрессе. Они лежали на диаграмме Венна (рис. 3а) в сегменте STR-L vs. STR-V, но не перекрывались с ДЭГ в STR-V vs. NS-V. Топ 10 генов из их числа по кратности изменения экспрессии представлен на рис. 3в. Среди них гены *Igal*,

C3, *Ifi47*, *St14*, *Tspo*, повысившие экспрессию, и гены *Mapk15*, *Ttll9*, *Col27a1*, *Rtbdn*, *Mroh7*, понизившие экспрессию в ответ на введение селанка перед стрессом относительно стрессированных животных.

Результаты иерархического кластерного анализа всех генов, изменивших экспрессию при стрессе (STR-V vs. NS-V), под действием селанка при стрессе (STR-L vs. STR-V), а также величины кратности изменений экспрессии данных генов при введении селанка в норме (NS-L vs. NS-V) проиллюстрированы на рис. 3г. Видно, что влияние селанка на экспрессию генов наиболее выражено, причем пептид вызывает компенсацию профиля экспрессии генов, нарушенного действием стресса. Выраженность влияния селанка в норме на экспрессию генов наименьшая из рассматриваемых сравнений.

Функциональные аннотации ДЭГ, связанных с влиянием острого стресса и селанка при стрессе

Списки ДЭГ от групп сравнения STR-V vs. NS-V и STR-L vs. STR-V обрабатывали в программе анализа функционального обогащения DAVID v2021. Для 22 ДЭГ, выявленных при стрессе, не было значимых ассоциаций ни с одним сигнальным путем ($P_{adj} < 0.05$, где P_{adj} – вероятность получения ложноположительного результата с поправкой Бенджамини–Хохберга) в сравнении STR-V vs. NS-V. Другой инструмент GSEA, который предоставляет информацию об обогащении с использованием более мягкого статистического подхода ($FDR q < 0.05$), выявил 22 пути, аннотированных в терминах баз данных KEGG PATHWAYS (KP) и REACTOME PATHWAYS (RP), связанных с ДЭГ для STR-V vs. NS-V. Наибольшей значимостью обладали пути связывания лигандов рецепторами-мусорщиками (“scavenger receptors”) и сигнализации с участием тирозинкиназных рецепторов.

ДЭГ, выявленные как связанные с влиянием селанка при стрессе в сравнении STR-L vs. STR-V, показали значимые ассоциации с 50 сигнальными путями по данным DAVID v2021. В их числе были как пути, относящиеся к системе иммунитета (Phagosome, MAPK signaling pathway, Cell adhesion molecules и др.), так и нейросигнализации (Neuronal System, Glutamatergic synapse, Dopaminergic synapse, Calcium signaling pathway).

Топ пяти путей по уровню значимости в сравнении STR-L vs. STR-V приведены на рис. 4а. Они включали в себя Leishmaniasis, Cell adhesion molecules, Antigen processing and presentation, Human T-cell leukemia virus 1 infection и Viral myocarditis, аннотированные в терминах KP и прежде всего относящиеся к иммунному и воспалительному ответу клеток. Отметим, что большинство

ДЭГ, связанных с перечисленными путями, увеличили свою экспрессию под влиянием селанка в условиях стресса.

На рис. 4б представлена генная сеть, характеризующая влияние селанка на транскриптом гиппокампа крыс в условиях стресса. На ней изображены гены, белковые продукты которых участвуют в функционировании сигнальных путей, относящихся к пяти наиболее значимым для сравнения STR-L vs. STR-V. В сети участвуют 41 ДЭГ, 38 из которых (*RT1-Ba*, *Cd74*, *RT1-Db1* и др.) повысили и только три (*Mapk11*, *Map3k7* и *Myh6*) снизили уровень мРНК в STR-L vs. STR-V. Наибольшее количество генов связано с функционированием путей Human T-cell leukemia virus 1 infection и Cell adhesion molecules – 21 и 19 ДЭГ соответственно. Гены *RT1-Ba*, *RT1-Db1*, *RT1-Bb*, *RT1-Da*, *RT1-Db2*, относящиеся к активности ГКГ, участвуют в функционировании всех пяти представленных путей, в то время как 26 генов ассоциированы только с каким-то одним путем: гены *Tspo*, *Xiap*, *Cdc27*, *Adcy1*, *Aif2*, *Crtcl*, *Nrp1* – с Human T-cell leukemia virus 1 infection; гены *C3*, *Ptgs2*, *Cyba*, *Ncf1*, *Stat1*, *Mapk11*, *Map3k7* – Leishmaniasis; гены *Igfb8*, *Ncam2*, *Sltirk4*, *Sltirk2*, *Esam*, *Selpgl*, *Cntn1*, *Cldn5* – с Cell adhesion molecules; гены *Cd74*, *Tap1* – с Antigen processing and presentation; гены *Rac2*, *Myh6* – с Viral myocarditis.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что острый стресс вызывает как кратковременные, так и отдаленные поведенческие, нейрохимические и структурные изменения, в основе которых могут лежать различные механизмы [24, 25]. Длительность изменений, вызванных острым стрессом, составляет от нескольких часов до нескольких суток [26, 27]. Предполагается, что вызванные стрессом нарушения поведения включают в себя пластические изменения в центральной нервной системе, для развития которых может потребоваться некоторое время [2].

В представленной работе оценивали изменения поведения крыс в тесте ПКЛ через 1.5 ч после завершения стрессогенного воздействия. Тест основан на врожденном избегании грызунами открытого освещенного пространства, что приводит к уменьшению исследования этой области в том случае, когда им доступна затемненная и менее опасная зона [28]. В проведенных экспериментах крысы всех групп больше времени проводили в закрытых рукавах лабиринта, избегая открытых отсеков (открытых рукавов и центра лабиринта). Использование стрессогенное воздействие приводило к снижению времени, проведенного в закрытом отсеке, при этом не было зарегистрировано статистически значимого изменения общепринятых показателей уровня тре-

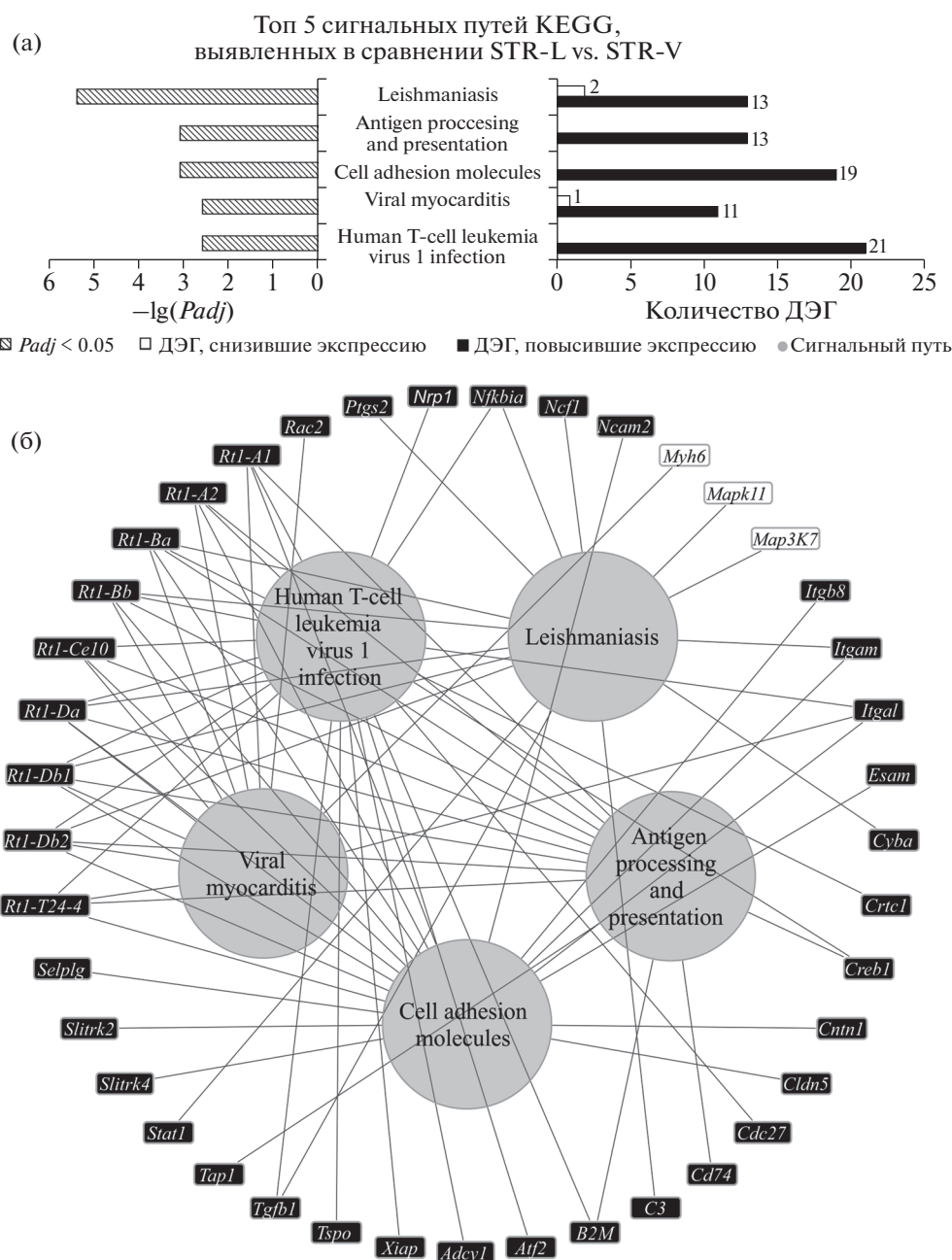


Рис. 4. Анализ функциональных аннотаций ДЭГ, связанных с влиянием острого стресса и селанка при стрессе. Показаны пять наиболее значимых сигнальных путей KEGG, связанных с ДЭГ, в сравнении STR-L vs. STR-V (а). Для каждого сигнального пути показано число генов, повысивших и понизивших экспрессию, приведены соответствующие значения $Padj$. Представлена функциональная сеть ассоциации генов с сигнальными путями из числа пяти наиболее значимых и представленных на рис. а (б). Для анализа были выбраны только те ДЭГ, которые изменили уровни мРНК в сравнении STR-L vs. STR-V, и те пути, которые значимо связаны с этими ДЭГ. Узлы обозначают гены. Каждая линия, соединяющая узлы, указывает на участие белкового продукта соответствующего гена в функционировании сигнального пути.

возможности — числа заходов и времени на открытых рукавах. Также не было отмечено изменения показателя исследовательской активности — числа свешиваний с открытых рукавов лабиринта. В исследованиях [18] также не было выявлено изменения показателей тревожности крыс, перенесших

аналогичное воздействие, через 4 ч после завершения стресса. Характер вызванных стрессом изменений поведения крыс как через 1.5, так и через 4 ч после иммобилизационного стресса свидетельствовал об усиленной мотивации избегания и гиперактивности животных [29].

Введение селанка животным, не подвергавшимся стрессорному воздействию, не приводило к изменению поведения в тесте ПКЛ через 3 ч после инъекции. В группе крыс, получавших инъекцию селанка перед стрессогенным воздействием, отмечалось увеличение времени в открытых рукавах, числа заходов и свешиваний с открытых рукавов лабиринта как по сравнению с нестрессированными животными, так и относительно крыс, перенесших стрессогенное воздействие. Характер отмеченных изменений свидетельствует о том, что введение селанка приводит к снижению тревожности и увеличению исследовательской активности у крыс, перенесших острый иммобилизационный стресс, но не влияет на поведение животных в норме.

В работе с помощью RNA-Seq получены спектры ДЭГ, связанные с действием острого иммобилизационного стресса и пептида селанк в гиппокампе крыс. Метод ПЦР в реальном времени позволил оценить изменения уровня экспрессии отдельных генов на расширенной выборке животных и получить согласованные с RNA-Seq результаты. Показано, что острый стресс вызывает изменение уровня мРНК у 22 генов в гиппокампе крыс через 2 ч после стресса. Результаты транскриптомного анализа сравнивали с полученными ранее в условиях аналогичной модели стресса, когда изменения уровня мРНК генов изучали спустя более длительное время после стресса — через 4.5 ч [18]. Результаты заметно различались. Через 4.5 ч было зафиксировано изменение экспрессии значительно большего числа (1359) генов, связанных с регуляцией биогенеза и метаболизма РНК и белка, а также нейромедиаторных систем клетки [18]. Выявленные через 2 ч после стресса 22 ДЭГ были прежде всего связаны модуляцией активности рецепторов-мусорщиков (“scavenger receptors”) и сигнализации с участием тирозинкиназных рецепторов. Ген *Pla2g3*, кодирующий фосфолипазу A2 группы III, обнаружили в качестве ДЭГ с помощью RNA-Seq и ПЦР в реальном времени как через 2 ч после стресса в данной работе, так и через 4.5 ч после стресса [18]. В [30] было показано, что вариации числа копий гена *Pla2g3* связаны с естественным и искусственным отбором при адаптации к экстремальному климату. Изменение экспрессии гена *Pla2g3* также было зарегистрировано при изучении влияния повышенного уровня глюкокортикоидов на транскриптом гиппокампа мыши. Экспрессия этого гена изменялась как при введении экзогенного кортикостерона, так и в ответ на действие стрессирующего фактора [31]. По нашим данным экспрессия *Pla2g3* стабильно повышается как через 2, так и 4.5 ч после стресса и может характеризовать общие черты стрессовых реакций в гиппокампе крыс.

Молекулярно-генетический эффект селанка изучали, вводя пептид крысам как в отсутствие стрессовой нагрузки, так и подвергая их острому иммобилизационному стрессу через 30 мин после инъекции. У крыс в отсутствие стресса значимого изменения экспрессии генов в гиппокампе через 3.5 ч после инъекции селанка по сравнению с действием растворителя не наблюдалось. Вместе с тем 549 генов, прежде всего связанных с системами процессинга и презентации антигенов и передачи нервного импульса, значимо изменили экспрессию при действии селанка в условиях стресса. Важно отметить, что 13 из 22 генов, выявленных как ДЭГ через 2 ч после острого иммобилизационного стресса, изменили экспрессию также при действии селанка при стрессе, причем пептид преимущественно приводил к снижению экспрессии тех генов, которые повысили экспрессию под действием стресса (*Gpatch4*, *Aox1*, *Alox15*, *LOC100134871* (*Hbb*), *Acsn5*, *Slc6a13*, *Igf2*, *Col3a1*, *Ptgsd*). Таким образом, через 2 ч после стресса селанк действительно может регулировать процессы, вызванные стрессом, на молекулярно-генетическом уровне, но вместе с тем обладает значительной активностью в отношении 536 генов, уровень экспрессии которых не затрагивается влиянием стресса. Функциональные аннотации этих генов связаны с системой иммунитета и нейросигнализации. Ранее было показано, что селанк обладает выраженной иммуностропной активностью и способен индуцировать секрецию интерферонов, оказывать противовирусное действие [32]. При рассмотрении наиболее значимых функциональных аннотаций генов обнаружили сигнальные пути клеточной адгезии, функционирования Т-клеток, процессинга и презентации антигена. Генами, кодирующими белки, вовлеченными в работу всех этих путей, были *RT1-Ba*, *RT1-Db1*, *RT1-Bb*, *RT1-Da*, *RT1-Db2*, относящиеся к активности ГКГ. Уровень экспрессии данных генов был повышен в ответ на введение селанка при стрессе через 3.5 ч после инъекции. Отметим, что ранее не было зафиксировано влияния стресса на экспрессию данных генов через 4.5 ч после стресса [18]. В то же время ген *RT1-Bb* был выявлен как ДЭГ у крыс Спрэг–Дуули в ответ на тепловой стресс [33], ген *RT1-EC12*, также принадлежащий к семейству генов ГКГ класса II, был связан с индивидуальными различиями в тревожности у генетически гетерогенных крыс NIN-HS [34]. Дифференциальная экспрессия генов семейства ГКГ класса II была выявлена ранее [35] в условиях ишемического повреждения тканей головного мозга и в ответ на введение пептидов — производных адренокортикотропного гормона (АКТГ) — через 4.5 ч после обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии у крыс. Указанные пептиды, так же как и селанк, включают в свой состав фрагмент PGP, характеризующийся

высокой стабильностью в организме животного. Вероятно, этот фрагмент способен частично предопределять активность содержащих его пептидов. Это подтверждают полученные в [35, 36] результаты сравнения влияния АКТГ(4–7)РРР и АКТГ(6–9)РРР, а также АКТГ(4–7)РРР и РРР на экспрессию генов в мозге крыс в условиях ишемии. Сравнение эффекта селанка через 2 ч и эффектов АКТГ(4–7)РРР и АКТГ(6–9)РРР через 4.5 ч после стресса выявило 79 генов, которые изменили экспрессию как под действием селанка, так и хотя бы одного из производных АКТГ. Среди ДЭГ были *Zdhhc21*, *Uhmkl*, *Rpl36a*, *Rpl39*, *Rpl22l1*, относящиеся к регулированию транскрипции и трансляции, которые сопоставленно повысили экспрессию под действием всех пептидов при стрессе. Вместе с тем сотни генов, которые не относятся к перекрывающимся, могут характеризовать индивидуальные свойства пептидов, отражать особенности структуры каждого из соединений. В частности, влияние селанка на экспрессию генов *RT1-Ba*, *RT1-Db1*, *RT1-Bb*, *RT1-Da*, *RT1-Db2*, которое не выявлено для производных АКТГ при стрессе, может быть связано с активностью другого фрагмента селанка — тафтина — его природного аналога, регуляторного пептида, происходящего из тяжелой цепи иммуноглобулина G и обладающего иммуномодулирующими свойствами.

Ранее предлагали модель, описывающую воздействие пептидов на транскриптом клеток мозга, находящегося одновременно в состоянии стрессовой реакции. Основана она на том, что сигнал, поступающий от рецептора, с которым ортостерически связываются медиаторы или гормоны стресса, модифицируется за счет дополнительного аллостерического связывания пептида с рецепторами мембраны. Результирующий сигнал вызывает соответствующий ответ транскриптома, частично совпадающий с таковым в условиях одного стресса и частично оказывающийся специфическим для пептида [18]. Обнаруженная дифференциальная экспрессия множества генов, вызванная влиянием селанка, но не связанная с ответом самого стресса, несколько нарушает линейность представлений о том, что пептид может модулировать только те сигналы, которые клетка получает от ортостерических взаимодействий с эффекторами (медиаторами стрессовых реакций). Объяснением может быть наличие собственных ортостерических сайтов связывания пептида с рецепторами, а также большая сложность в регуляции ответа транскриптома. Отметим, что в данной работе изучали ответ транскриптома после воздействия селанка при стрессе, оценивая изменения только уровня кодирующих белок мРНК. Однако известно, что в клетке функционирует множество РНК разных типов, обеспечивающих процессы регуляции экспрессии генов. В их числе

могут быть короткие некодирующие РНК — микроРНК, которые способны образовывать дуплекс микроРНК–мРНК, направляющий деградацию мРНК или репрессию ее трансляции [37]. Большое внимание уделяется и новому классу РНК циклической природы [38, 39]. Эти РНК обладают повышенной стабильностью и тканеспецифической экспрессией, что делает их особенно интересными объектами, в том числе для прикладных и трансляционных исследований [40–42]. Функционально циклические РНК (циклоРНК) способны к образованию дуплекса микроРНК–циклоРНК наравне с мРНК, что позволяет им влиять на микроРНК-опосредованную репрессию мРНК [43–45]. С учетом многообразия регуляторных свойств РНК разных типов механизм воздействия селанка на транскриптом нервных клеток может быть крайне нелинейным и требует дальнейшего изучения методами функциональной геномики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что селанк в ранние часы после острого стресса может регулировать вызванные стрессом процессы на молекулярно-генетическом уровне, не оказывая влияния на геномную активность во внестрессовых условиях. Однако наличие специфического ответа пептида, не связанного с ответом самого стресса, указывает на более сложный механизм его действия. Рассчитываем, что дальнейшие исследования роли некодирующих РНК в регуляции экспрессии генов позволят сформировать более глубокое понимание природы и пространственно-временной регуляции активности пептида в мозге в норме и при стрессе.

Работа выполнена в рамках Тематического плана НИОКР НИЦ “Курчатовский институт” 5Ф.5.9 с использованием оборудования ресурсных центров, а также при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00268-П, биоинформатическая обработка данных).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Domingues M., Casaril A.M., Birmann P.T. et al. // Behav. Brain Res. 2019. V. 366. P. 96. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.021>
2. Padovan C.M., Guimarães F.S. // Brazilian J. Med. Biol. Res. 2000. V. 33. № 1. P. 79. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000100011>
3. Haider S., Naqvi F., Batool Z. et al. // Brain Res. Bull. 2015. V. 115. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.04.001>
4. Floriou-Servou A., von Ziegler L., Stalder L. et al. // Biol. Psychiatry. 2018. V. 84. № 7. P. 531. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.02.003>

5. Gouveia M.K., Miguel T.T., Busnardo C. et al. // Neuropharmacology. 2016. V. 101. P. 379.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.018>
6. Feske S.K. // Am. J. Med. 2021. V. 134. № 12. P. 1457.
<https://doi.org/10.1016/J.AMJMED.2021.07.027>
7. Ашмарин И.П., Королева С.В. // Вестн. РАН. 2002. № 6. С. 40.
8. Медведев В.Э., Терещенко О.Н., Израелян А.Ю. и др. // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2014. Т. 114. № 7. С. 17.
9. Vyunova T., Andreeva L., Shevchenko K. et al. // Protein Pept. Lett. 2018. V. 25. № 10. P. 914.
<https://doi.org/10.2174/0929866525666180925144642>
10. Dergunova L.V., Filippenkov I.B., Limborska S.A. et al. // Med. Res. Rev. 2021. V. 41. № 2. P. 754.
<https://doi.org/10.1002/med.21704>
11. Dergunova L.V., Filippenkov I.B., Limborska S.A. et al. // Genes (Basel). 2023. V. 14. № 5. P. 953.
<https://doi.org/10.3390/genes14050953>
12. Zhao Y.F., Ren W.J., Zhang Y. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 3. P. 35163829.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031904>
13. Roszkowski M., Manuella F., Von Ziegler L. et al. // Neuropharmacology. 2016. V. 107. P. 329.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.046>
14. Bozas E., Tritos N., Phillipidis H. et al. // Cell. Mol. Neurobiol. 1997. V. 17. № 2. P. 157.
<https://doi.org/10.1023/a:1026309727518>
15. Volkova A., Shadrina M., Kolomin T. et al. // Front. Pharmacol. 2016. V. 7. P. 31.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00031>
16. Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М. и др. // Изв. РАН. Сер. Биол. 2018. № 4. С. 431.
<https://doi.org/10.1134/s0002332918040045>
17. Kozlovskii I.I., Danchev N.D. // Neurosci. Behav. Physiol. 2003. V. 33. № 7. P. 639.
<https://doi.org/10.1023/a:1024444321191>
18. Filippenkov I.B., Stavchansky V.V., Glazova N.Y. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 18. P. 34576218.
<https://doi.org/10.3390/ijms221810054>
19. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A. et al. // Clin. Chem. 2009. V. 55. № 4. P. 611.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
20. Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. // Nat. Protoc. 2009. V. 4. № 1. P. 44.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
21. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. V. 102. № 43. P. 15545.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
22. Babicki S., Arndt D., Marcu A. et al. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № W1. P. W147-53.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>
23. Shannon P., Markiel A., Ozier O. et al. // Genome Res. 2003. V. 13. № 11. P. 2498.
<https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
24. Tillage R.P., Foster S.L., Lustberg D. et al. // Neuropsychopharmacology. 2021. V. 46. № 8. P. 1535.
<https://doi.org/10.1038/s41386-021-01011-8>
25. Musazzi L., Tornese P., Sala N. et al. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 30050444.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00758>
26. Busnardo C., Crestani C.C., Scopinho A.A. et al. // Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry. 2019. V. 90. P. 16.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.11.001>
27. Chakraborty P., Chattarji S. // Neurobiol. Stress. 2019. V. 10. P. 31193585.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100168>
28. Cancela L.M., Bregonzio C., Molina V.A. // Brain Res. Bull. 1995. V. 36. № 3. P. 209.
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)00185-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)00185-4)
29. Carissimi A., Martinez D., Kim L.J. et al. // Rev. Bras. Psiquiatr. 2018. V. 40. № 4. P. 376.
<https://doi.org/10.1590/1516-4446-2017-2310>
30. Salehian-Dehkordi H., Huang J.H., Pirany N. et al. // Genes (Basel). 2023. V. 14. № 6. P. 37372436.
<https://doi.org/10.3390/genes14061256>
31. Jaszczuk A., Stankiewicz A.M., Goscik J. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 3. P. 36769150.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032828>
32. Ершов Ф.И., Учакин П.Н., Учакина О.Н. и др. // Вопросы вирусологии. 2009. Т. 54. № 5. С. 19.
33. Dou J., Cánovas A., Brito L.F. et al. // Front. Genet. 2021. V. 12. P. 33897767.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.651979>
34. Díaz-Morán S., Palència M., Mont-Cardona C. et al. // Behav. Brain Res. 2013. V. 257. P. 129.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.041>
35. Filippenkov I.B., Remizova J.A., Stavchansky V.V. et al. // Genes (Basel). 2023. V. 14. № 7. P. 1382.
<https://doi.org/10.3390/genes14071382>
36. Stavchansky V.V., Filippenkov I.B., Remizova J.A. et al. // Genes (Basel). 2022. V. 13. № 12. P. 2380.
<https://doi.org/10.3390/genes13122380>
37. Bartel D.P. // Cell. 2009. V. 136. № 2. P. 215.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
38. Filippenkov I.B., Kalinichenko E.O., Limborska S.A. et al. // Neurogenetics. 2017. V. 18. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s10048-016-0490-4>
39. Filippenkov I.B., Sudarkina O.Y., Limborska S.A. et al. // RNA Biol. 2015. V. 12. № 9. P. 1030.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1076611>
40. Liu Z., Zhou Y., Xia J. // Biomed. Pharmacother. 2022. V. 156. P. 113845.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113845>
41. Dergunova L.V., Vinogradina M.A., Filippenkov I.B. et al. // Curr. Issues Mol. Biol. 2023. V. 45. № 8. P. 6682.
<https://doi.org/10.3390/cimb45080422>
42. Filippenkov I.B., Stavchansky V.V., Denisova A.E. et al. // Genes (Basel). 2021. V. 12. № 12. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/genes12121870>
43. Hansen T.B., Jensen T.I., Clausen B.H. et al. // Nature. 2013. V. 495. № 7441. P. 384.
<https://doi.org/10.1038/nature11993>
44. Piwecka M., Glažar P., Hernandez-Miranda L.R. et al. // Science. 2017. V. 357. № 6357. P. eaam8526.
<https://doi.org/10.1126/science.aam8526>
45. Zhang Z., He J., Wang B. // Cell Cycle. Cell Cycle. 2021. V. 20. № 9. P. 914.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1909885>