

ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК МОЗГА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА

© 2024 И.Б. Филиппенков^{1*}, Н.Ю. Глазова^{1,2}, Е.А. Себенцова^{1,2}, В.В. Ставчанский¹, Л.А. Андреева¹, Н.Ф. Мясоедов¹, Н.Г. Левицкая^{1,2}, С.А. Лимборская¹, Л.В. Дергунова¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия; электронная почта: filippenkov-ib.img@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.07.2024

После доработки 23.08.2024

Принята к публикации 02.09.2024

Синтетические пептиды обладают широким спектром клинических эффектов. Особый интерес представляют пептиды на основе аденокортикотропного гормона (АКТГ) как в качестве уже используемых, так и потенциальных препаратов для предотвращения последствий широкого круга патологических и стрессовых состояний, включая ишемию головного мозга. Однако требуется изучить их влияние на клетки мозга в нормальных физиологических условиях, в том числе для понимания рисков их применения. В работе мы использовали высокопроизводительное секвенирование РНК (RNA-Seq) для выявления дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в лобной коре интактных крыс, получающих внутрибрюшинное введение АКТГ-подобных пептидов АКТГ(4–7)PGP (семакс) и АКТГ(6–9)PGP или физиологический раствор. Через 22,5 ч после первого введения семакса и АКТГ(6–9)PGP мы выявили 258 и 228 ДЭГ соответственно с порогом $> 1,5$ и $P_{adj} < 0,05$. Были выявлены метаболические пути, характеризующие как общее, так и специфическое влияние каждого из пептидов на транскриптом. Оба пептида преимущественно вызвали снижение экспрессии генов, связанных с иммунной системой. Одновременно при сравнении эффектов АКТГ(6–9)PGP относительно семакса были выявлены ДЭГ, которые характеризовали основные различия эффектов пептидов. Эти гены, в основном снизившие свою экспрессию, были ассоциированы с системами нейросигнализации и регуляции ионных каналов. Наши данные показывают, как различия в структуре производных АКТГ связаны с изменением транскриптома клеток мозга после воздействия данных родственных пептидов. Результаты свидетельствуют о том, что при изучении влияния регуляторных пептидов на транскриптом при патологии необходимо учитывать их действие в нормальных физиологических условиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АКТГ-подобные пептиды, RNA-Seq, транскриптом, экспрессия генов, генные сети.

DOI: 10.31857/S0320972524090094 EDN: JJQNJG

ВВЕДЕНИЕ

Пептиды представляют собой уникальный класс фармацевтически значимых соединений с высокой биосовместимостью, низкой иммуногенностью, мягким действием и минимальными побочными эффектами [1–5]. В частности, большое внимание привлекают пептиды на основе аденокортикотропного гормона (АКТГ) для

создания нейропротективных препаратов [6–9]. Известно, что α -меланоцитстимулирующий гормон (α -МСГ), аминокислотная последовательность которого соответствует последовательности фрагмента АКТГ (1–13), оказывает выраженное противовоспалительное, нейрогенное и нейропротекторное действие на моделях ишемического инсульта [10, 11]. На основе фрагментов АКТГ удалось создать пептиды полностью свободные от гормональной активности. Так, синтетический пептид АКТГ(4–7)PGP (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro),

* Адресат для корреспонденции.

известный как семакс, уже применяется для лечения широкого круга патологических и стрессовых состояний, включая острый ишемический инсульт, в качестве нейропротекторного препарата, обладающего терапевтическим эффектом без развития лекарственной зависимости или синдрома отмены [12]. Семакс способен проходить через гематоэнцефалический барьер, в том числе при внутривенном введении [13]. Использование С-концевого трипептида Pro-Gly-Pro (PGP) в структуре семакса увеличивает продолжительность его действия по сравнению с исходным фрагментом АКТГ(4–7). Семакс оказывает ноотропное действие, стимулируя процессы обучения, внимания и формирования памяти [14]. Кроме того, семакс был успешно использован при лечении сосудистых, токсико-аллергических и воспалительных заболеваний зрительного нерва параллельно с основной нейротрофической и противовоспалительной терапией [15]. Аналог семакса, синтетический пептид АКТГ(6–9)PGP (His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro), также обладает ноотропными эффектами, в особенности влияя на процессы обучения [16–18]. Более того, этот пептид повышал жизнеспособность культивируемых корковых нейронов [18] и защищал клетки линии SH-SY5Y от пероксидной и цианидной цитотоксичности [19]. В настоящее время АКТГ(6–9)PGP проходит доклинические испытания и, на наш взгляд, имеет большие перспективы клинического использования.

В последние годы транскриптомика стала эффективным подходом для изучения механизмов патологических процессов при различных заболеваниях и поиска молекулярных мишеней для их медикаментозного лечения. Полногеномные методы анализа транскриптома, включая микрочипы и высокопроизводительное секвенирование РНК (RNA-Seq), дают сведения об экспрессии отдельных генов и позволяют идентифицировать сигнальные пути, нарушение которых приводит к развитию многих заболеваний. Существует множество примеров использования транскриптомики для изучения механизмов действия ряда пептидов, в том числе орексина-А [20], VR-10 [21], семаглутида [22], имеющих значение для медицины. Нами ранее с помощью полногеномного анализа также было изучено влияние семакса на транскриптом мозга крыс в условиях моделей церебральной ишемии [23–25]. В одном

из последних исследований мы изучили влияние двух АКТГ-подобных пептидов – семакса и АКТГ(6–9)PGP – на транскриптом мозга через 4,5 ч после обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии (tMCAO) у крыс [26]. Данные пептиды представляют собой гибриды фрагментов АКТГ и глипролина Pro-Gly-Pro. В их структуру входили перекрывающиеся участки аминокислотной последовательности (рис. 1, а). Для анализа нами был выбран участок фронтальной коры, который содержал как здоровую ткань, так и способные к восстановлению клетки пенумбры (рис. 1, б). Мы показали, что как семакс, так и АКТГ(6–9)PGP могут частично предотвращать изменения в профилях экспрессии генов нейросигнализации и иммунной системы, нарушенных действием ишемии через 4,5 ч после tMCAO. При этом было выявлено и различное действие пептидов в отношении преимущественно генов иммунной системы [26]. Таким образом, в результате проделанной работы мы выявили сходство и различие эффектов АКТГ-подобных пептидов на транскриптом в ранние часы после экспериментальной ишемии в зависимости от их структуры.

В настоящем исследовании впервые была поставлена цель изучить влияние родственных АКТГ-подобных пептидов на транскриптом клеток фронтальной коры мозга крыс в условиях физиологической нормы, в том числе для понимания рисков их использования. С помощью RNA-Seq мы проанализировали изменения профиля экспрессии генов участка фронтальной коры крыс после трехкратного внутрибрюшинного введения семакса и АКТГ(6–9)PGP. Был выявлен общий эффект снижения экспрессии генов иммунной системы под действием семакса и АКТГ(6–9)PGP в участке фронтальной коры у крыс, что может лежать в основе иммуномодулирующего и нейропротективного эффектов данных пептидов. Также были выяснены специфические эффекты для каждого из пептидов на транскриптом, прежде всего, относящиеся к активности генов систем нейросигнализации и регуляции ионных каналов. Спрогнозирована генная сеть, иллюстрирующая вовлеченность метаболических систем клетки в проявление влияния АКТГ-подобных пептидов на клетки мозга. Таким образом, полученные данные показывают, как различия в структуре родственных пептидов связаны с молекулярно-

Принятые сокращения: ДЭГ – дифференциально экспрессируемые гены; КП1–КП4 – кластеры путей, характеризующих эффекты пептидов; *Gapdh* – ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы; NA – «норма + АКТГ(6–9)PGP»; NS – «норма + семакс»; NV – «норма + физраствор»; *Padj* – значение вероятности *p*, скорректированное с поправкой Бенджамини–Хохберга; PGP – Pro-Gly-Pro; pMCAO – необратимая окклюзия средней мозговой артерии; RIN – показатель целостности РНК (RNA integrity number); RNA-Seq – высокопроизводительное секвенирование РНК; *Rpl3* – ген 60S-рибосомного белка L3; tMCAO – обратимая окклюзия средней мозговой артерии; АКТГ – адренкортикотропный гормон; АКТГ(4–7)PGP – Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, семакс; АКТГ(6–9)PGP – His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro.

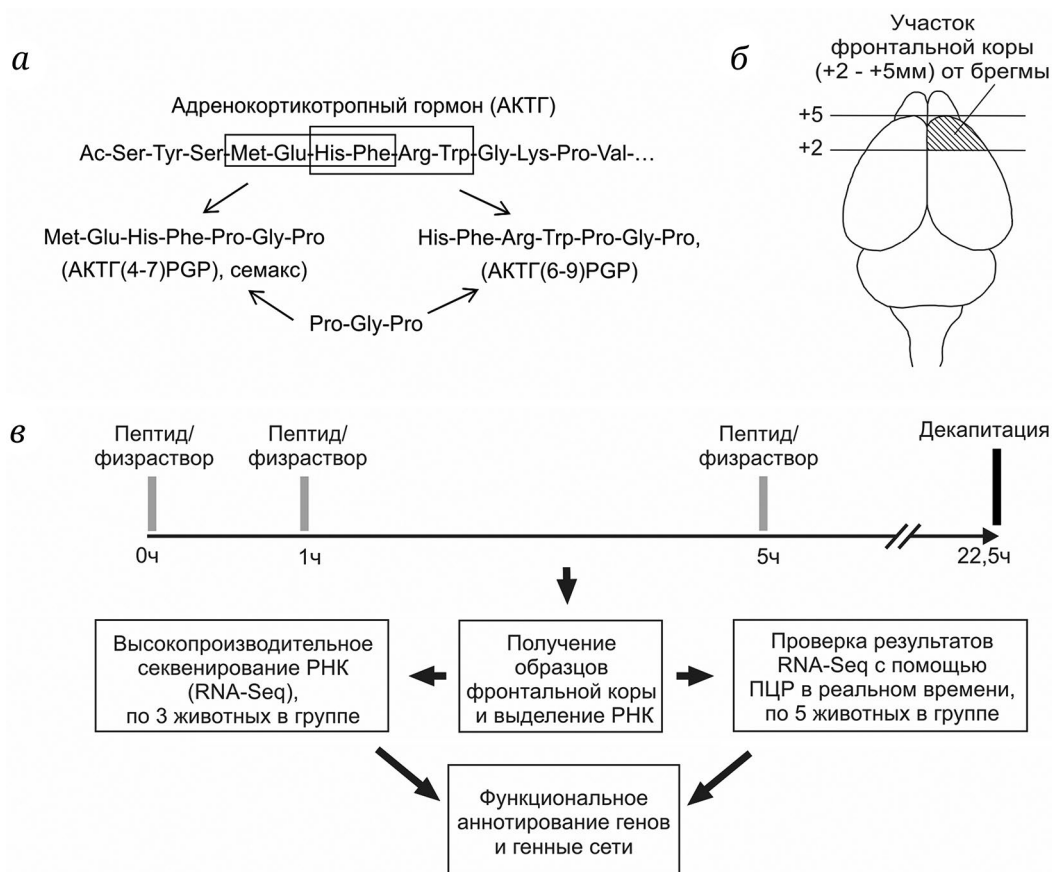


Рис. 1. Структура пептидов АКТГ(4–7)PGP (семакс) и АКТГ(6–9)PGP (а). Схематическое изображение среза мозга крысы с указанием штриховкой локализации участка лобной коры, взятого для секвенирования РНК (б). Схема исследования (в)

генетическими механизмами их действия в мозге в нормальных физиологических условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Белых 2-месячных самцов крыс Wistar массой 200–250 г содержали при 12-часовом цикле смены дня и ночи при температуре 22–24 °С со свободным доступом к пище и воде. Животные были случайным образом разделены на три группы: «норма + физраствор» (NV); «норма + семакс» (NS); «норма + АКТГ(6–9)PGP» (NA). Каждая группа включала по 5 животных. Схема исследования представлена на рис. 1, в.

Пептиды и их введение. АКТГ(4–7)PGP (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, семакс) и АКТГ(6–9)PGP (His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro) были синтезированы в Лаборатории молекулярной фармакологии пептидов НИЦ «Курчатовский институт».

Все животные получали трехразовые внутрибрюшинные инъекции пептидов (100 мкг на 1 кг массы животного) или физиологического раствора с интервалами в 1 ч и 4 ч. Объем разовой инъекции составлял 100 мкл на 100 г массы

животного. Физиологический раствор вводили в эквивалентном объеме в соответствующие сроки. Время, дозировка и способ введения пептидов были выбраны на основе предыдущих исследований [23–25, 27–30]. Животных выводили из эксперимента методом декапитации через 22,5 ч после первой инъекции.

Получение ткани. Из мозга крыс была извлечена область фронтальной коры (участок +2)–(+5) мм от брегмы), соответствующая области, содержащей жизнеспособные клетки и клетки с ишемическим повреждением у животных, подвергнутых tMCAO, как описано ранее [26]. На рис. 1, б показано схематическое изображение среза мозга с указанием локализации участка лобной коры, взятого для секвенирования РНК. Образцы данной ткани помещали в раствор RNAlater на 24 ч при 0 °С, а затем хранили при –70 °С.

Получение РНК. Из полученных образцов участка фронтальной коры крыс была выделена тотальная РНК при помощи реагента Trizol («Invitrogen» и «Thermo Fisher Scientific», США), согласно рекомендации производителя. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой 1 («Thermo Fisher Scientific») в присутствии ингибитора

Таблица 1. Характеристика праймеров для ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательность праймеров (5'-3'): прямой (F), обратный (R)	RefSeq	Длина (п.н.)	E ± SE
<i>Rt1-Da</i>	F: AGATGCCAATGTGATTCCAGAGGT R: ACAAACAACCCGAGAACA	NM_001008847	360	1,93 ± 0,03
<i>Rt1-Db1</i>	F: TCTGCTCTGTGAGTGACTTCTA R: GAAGTCCAGTCTCCATTT	NM_001008884	119	2,07 ± 0,06
<i>Rt1-Ba</i>	F: TGTGGAGGTCAAGACGACATT R: AAAGCAGATGAGGGTGT	NM_001008831	344	1,92 ± 0,03
<i>Cxcl13</i>	F: TCTACTGGCCATCTGCCTCC R: TAATACTTCTGCTTCGGACAAAT	NM_001017496	257	1,99 ± 0,05
<i>Cxcl9</i>	F: AGTCCGTTGCTCTATTCTCTCA R: TCTTTTGCTTTTCTTTTGGCT	NM_145672	294	2,03 ± 0,11
<i>Fos</i>	F: TGAAGAGGAAGAGAAACGGAGA R: ACTCTGGGGTGGTAGCCTCA	NM_022197.2	302	1,89 ± 0
<i>Drd1</i>	F: CATAGAGACGGTGAGCATTA R: TGTGTGTGACAGGTTGGAT	NM_012546	251	1,96 ± 0
<i>Drd2</i>	F: CCAGGATTGCCAAGTTCTT R: TTGACGGCACTGTTGACATA	NM_012547	262	1,95 ± 0
<i>Gapdh</i>	F: ACTTACCCACGGCAAGTTCAACG R: GTAGACTCCACGACATACTCAGCAC	NM_017008.4	148	2,01 ± 0,03
<i>Rpl3</i>	F: ATGGGTCCTTGGGCTTCTTG R: CACAATACCCACAACCACCA	NM_198753.2	239	1,90 ± 0,03

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

РНКаз RiboLock RNase Inhibitor («Thermo Fisher Scientific») в соответствии с рекомендациями производителя. Качество и количество выделенной тотальной РНК проверяли на приборе BioAnalyser с помощью RNA 6000 Nano Kit («Agilent», США). Показатель целостности РНК (RNA integrity number, RIN) был не менее 9.

Полногеномное секвенирование РНК (RNA-Seq). Фракцию полиА 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 на приборе Qubit 2.0 («Thermo Fisher Scientific»). Распределение длин фрагментов библиотеки проводили при помощи набора Agilent High Sensitivity DNA Kit («Agilent»). RNA-Seq проводили на приборе HiSeq1500 («Illumina», США) с генерацией не менее 10 млн коротких чтений длиной 1 × 50 нуклеотидов. Для RNA-Seq каждая группа (NV, NS и NA) включала по 3 животных (рис. 1, в).

Обработка результатов RNA-Seq. Для картирования и подсчета количества прочтений были использованы программы Tophat и Cufflinks. Уровень экспрессии генов рассчитывался как число фрагментов на килобазу, отнесенное на миллион прочтений (fragments per kilobase per million reads, FPKM) с использованием программы Cuffdiff. Дифференциально экспрессированными генами (ДЭГ) считались только те гены, которые изменили уровень своей экспрессии больше чем в 1,5 раза. Значимыми считались различия, имеющие значение вероятности *p* (*t*-тест), скорректированное с поправкой Бенджамини–Хохберга (*Padj*) < 0,05.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК). Синтез 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», Литва) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа мРНК использовали праймеры Oligo(dT)₁₈.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Синтезированная кДНК была использована в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красите-

лем SYBR Green I («Евроген», Россия). Праймеры были подобраны с помощью Oligo Analyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) и синтезированы компанией «Евроген» (табл. 1). Амплификацию кДНК проводили на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR System («Applied Biosystems», США), как описано ранее [16]. Каждая группа включала по 5 животных (рис. 1, в).

Обработка результатов ПЦР в реальном времени. Каждый образец кДНК анализировали трижды. Из трех повторных измерений было рассчитано среднее значение порогового цикла (Ct). Уровень мРНК гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*Gapdh*) и гена 60S-рибосомного белка L3 (*Rpl3*) был использован для нормализации результатов ПЦР. Одиночные пики на кривых плавления свидетельствовали, что при амплификации с каждой парой используемых праймеров синтезировался единственный продукт ПЦР. Расчеты были проведены с использованием Relative Expression Software Tool (REST) 2005 software [31]. Для оценки содержания исследуемых мРНК относительно мРНК генов сравнения была использована формула:

$$E^{Ct(\text{ref})} / E^{Ct(\text{tar})}, \quad (1)$$

где E – эффективность ПЦР-реакции; Ct(tar) – средняя величина порогового цикла амплификации (Ct) для исследуемых РНК; $E^{Ct(\text{ref})}$ – среднее геометрическое E^{Ct} для мРНК генов сравнения (*Gapdh* и *Rpl3*).

Эффективности ПЦР оценивали с использованием амплификации серии стандартных разведений кДНК. Значения эффективностей для всех реакций ПЦР находились в пределах 1,89–2,07 (табл. 1). При сравнении групп данных между собой статистически значимыми считались различия со значением вероятности $p < 0,05$ (two-sided Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test). Дополнительную обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Excel.

Анализ функциональных аннотаций генов. Программы для аннотации, визуализации и интегрированного обнаружения (DAVID v2021) [32] и для анализа обогащения наборов генов (GSEA) [33] использовались при аннотировании 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).

Иерархический кластерный анализ. Иерархический кластерный анализ ДЭГ проводился с использованием Heatmaper [34].

Генные сети. Программное обеспечение Cytoscape 3.9.2 использовалось для визуализации регуляторной сети [35].

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 были депонированы в базу данных Sequence Read Archive под кодом доступа PRJNA1086759 (<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA1086759?reviewer=fbc3pamv9qhevsbek8nug5oh75>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

RNA-Seq-анализ влияния АКТГ-подобных пептидов на транскриптом участка фронтальной коры крыс. В результате RNA-Seq были получены данные об изменении уровня мРНК под действием семакса и АКТГ(6–9)PGP для 17 367 генов крысы. Графики «volcano-plot» иллюстрируют различия в экспрессии мРНК между группами NS относительно (vs.) NV (рис. 2, а) и NA vs. NV (рис. 2, б). Мы обнаружили 258 ДЭГ (кратность $> 1,5$; $Padj < 0,05$) под действием семакса в группе NS vs. NV. Из них 105 генов (*Lefty2*, *Bc1*, *Pisma8*, *ErbB4*, *Kcnh5* и др.) повысили уровень экспрессии и 153 гена понизили его (*Cyp4a8*, *Nphs1*, *Prlr*, *Trim31*, *Cd247* и др.). Величины дифференциальной экспрессии перечисленных генов представлены на рис. 2, в. Также мы обнаружили 228 ДЭГ под действием АКТГ(6–9)PGP в группе NA vs. NV. Из них 44 гена, в том числе *Lefty2*, *Bc1*, *Pisma8*, *Morf411*, *Cdc6*, повысили уровень экспрессии и 184 гена, включая *Mis18a*, *Plac8*, *Nphs1*, *Prlr*, *Cd247*, понизили его. Величины дифференциальной экспрессии перечисленных выше генов представлены на рис. 2, г.

Для проверки результатов RNA-Seq на расширенной выборке животных мы использовали ПЦР в реальном времени. В анализ были взяты гены, изменившие экспрессию в соответствии с критерием отбора $Padj < 0,05$ (*Cxcl9*, *Cxcl13*, *Rt1-Ba*, *Rt1-Da*, *Rt1-Db1*) и $p < 0,05$ (*Fos*, *Drd1*, *Drd2*) в сравнении NS vs. NV. Результаты ПЦР в реальном времени адекватно соответствовали результатам RNA-Seq и проиллюстрированы на рис. П1 в Приложении 1.

Сравнение результатов RNA-Seq в экспериментах с введением семакса и АКТГ(6–9)PGP крысам. На следующем этапе нами было проведено сравнение спектров ДЭГ, изменивших уровень мРНК под действием семакса (NS vs. NV) и АКТГ(6–9)PGP (NA vs. NV) в участке фронтальной коры крыс. На рис. 3, а в форме диаграммы Венна показан 161 ДЭГ, обнаруженные в обоих сравнениях. Все гены сопоставлено изменили уровень как в ответ на семакс, так и АКТГ(6–9)PGP в участке фронтальной коры крыс. На диаграммах Венна

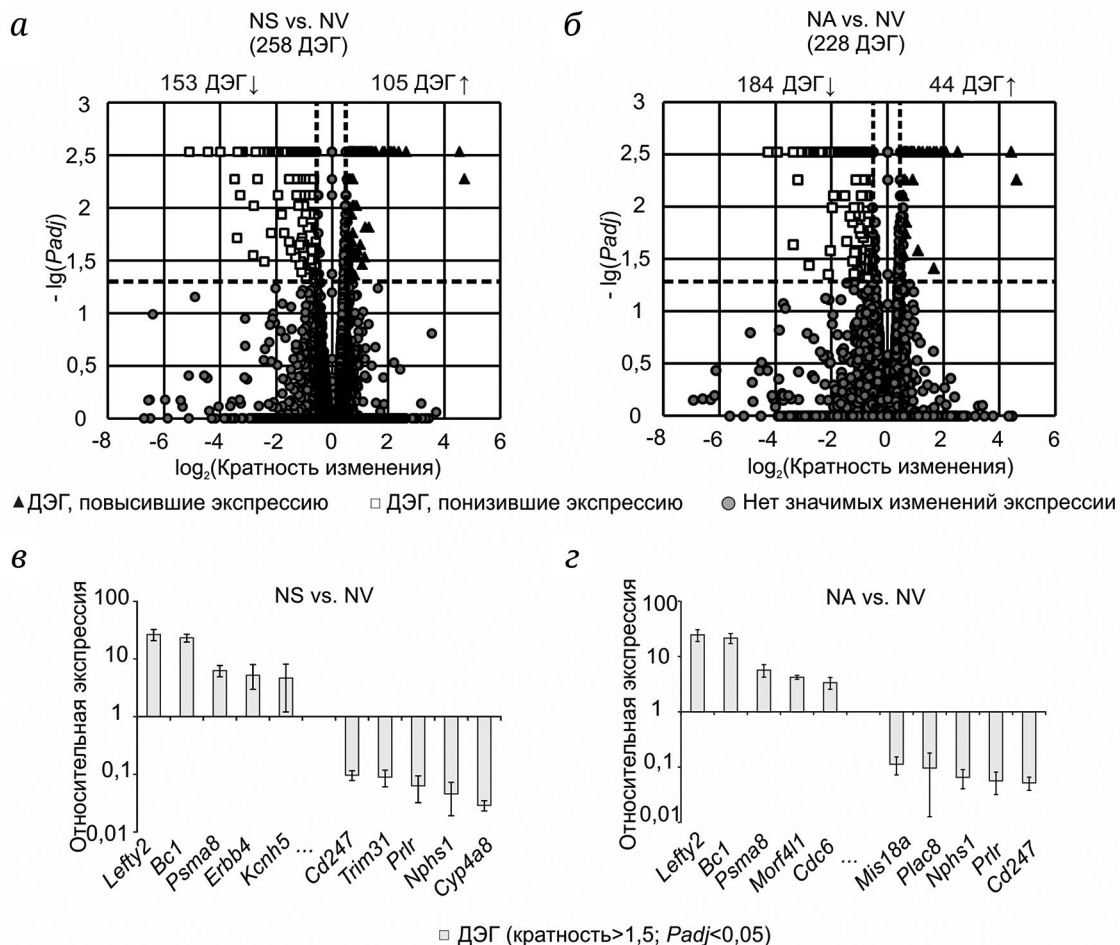


Рис. 2. RNA-Seq-анализ влияния семакса и АКТГ(6–9)PGP на транскриптом участка фронтальной коры крыс. Графики «volcano-plot» иллюстрируют различия в экспрессии мРНК между группами «норма + семакс» (NS) и «норма + физраствор» (NV) (а), а также «норма + АКТГ(6–9)PGP» (NA) и «норма + физраствор» (NV) (б). Представлено по 10 ДЭГ, которые продемонстрировали наибольшее кратное изменение экспрессии в сравнениях NS vs. NV (в) и NA vs. NV (г). В каждую группу сравнения входило по 3 животных. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего

показаны ДЭГ, только повысившие (рис. 3, б) и только понизившие (рис. 3, в) уровень мРНК в изучаемых группах сравнения. Так, в числе повысивших экспрессию ДЭГ в обеих группах сравнения с максимальной кратностью изменений выявлены, в частности, гены *Lefty2*, *Bc1*, *Psma8*, *Morf4l1*, *Slc1a2*, а в числе понизивших экспрессию – *Cd247*, *Trnm31*, *Prlr*, *Nphs1*, *Plac8*, *Mx2* (рис. 3, г).

Были выявлены также гены, которые изменили экспрессию в ответ на введение только одного из пептидов. Для семакса было 97 таких генов (рис. 3, а), в первые 10 генов с максимальной кратностью изменений вошли гены *ErbB4*, *Kcnh5*, *Lnpep*, *Fzd3*, *Casna1e* из числа повысивших и *Nek8*, *Sla*, *Fos*, *Klhl14*, *Gzmb* из числа понизивших экспрессию в NS vs. NV (рис. 3, д). Для АКТГ(6–9)PGP – 67 генов, которые были в числе изменивших экспрессию в сравнении NA vs. NV, но не входили в число ДЭГ в сравнении NS vs. NV (рис. 3, а). Среди них гены *Nr4a2*, *Etaa1*, *Strn3*, *Cnr2*, *Ifit2*, *Eif4ebp3*,

Trh, *Eya2*, *Cd68*, *Ifi35* были в числе первых 10 генов с максимальной кратностью изменений экспрессии в NA vs. NV (рис. 3, е).

Сравнение результатов RNA-Seq в экспериментах с введением АКТГ(6–9)PGP крысам относительно действия семакса. В условиях эксперимента в участке фронтальной коры крыс после введения АКТГ(6–9)PGP по сравнению с группой животных, получавшей семакс (NA vs. NS), мы выявили 36 ДЭГ (3 повысивших и 33 снизивших экспрессию). График «volcano plot» иллюстрирует различия в экспрессии мРНК между группами NA и NS (рис. 4, а). Отдельно 10 генов (*Cacng8*, *Fos*, *Arc*, *Slc1a2*, *Lmbrd2*, *Fzd3*, *Slc9a7*, *Kcnh5*, *Lnpep*, *ErbB4*) с максимальной кратностью изменений экспрессии в сравнении NA vs. NS показаны на рис. 4, б.

Величины дифференциальной экспрессии всех ДЭГ, выявленных при действии изучаемых пептидов в NS vs. NV, NA vs. NV и NA vs. NS, представлены в табл. П1 в Приложении 2. Результаты

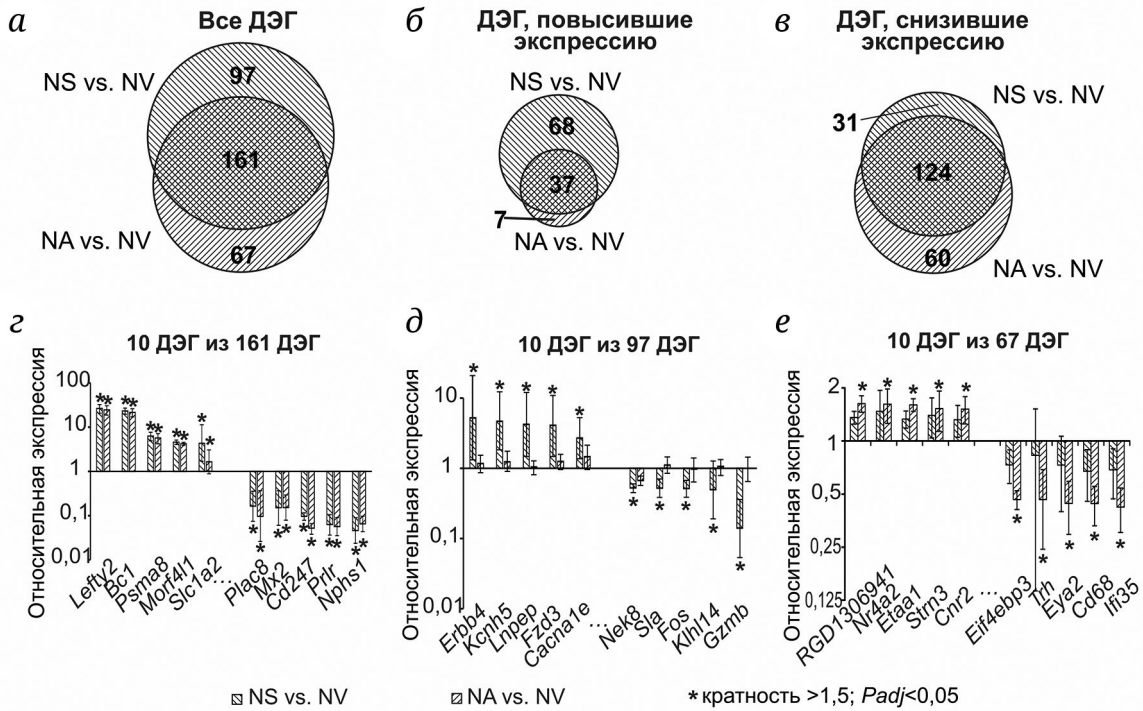


Рис. 3. Сравнение результатов RNA-Seq в экспериментах с введением секса и АКТГ(6–9)PGP. Диаграммы Венна (а–в) иллюстрируют результаты, полученные для двух попарных сравнений «норма + секс» (NS) vs. «норма + физраствор» (NV) и «норма + АКТГ(6–9)PGP» (NA) vs. «норма + физраствор» (NV): для всех ДЭГ (а), только для повысивших экспрессию (б) и только для понизивших экспрессию (в). Числа в пересечении различных наборов генов на диаграмме Венна указывают количество ДЭГ (кратность > 1,5; Padj < 0,05) по данным RNA-Seq. Показаны величины относительной экспрессии для 10 генов из каждого сегмента на диаграмме Венна (панель а): гены с наибольшим кратным изменением экспрессии в NS vs. NV и лежат в пределах пересечения наборов ДЭГ (г); ДЭГ с наибольшим кратным изменением экспрессии в NS vs. NV, но не являющиеся ДЭГ в NA vs. NV (д); ДЭГ с наибольшим кратным изменением экспрессии в NA vs. NV, но не являющиеся ДЭГ в NS vs. NV (е). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего

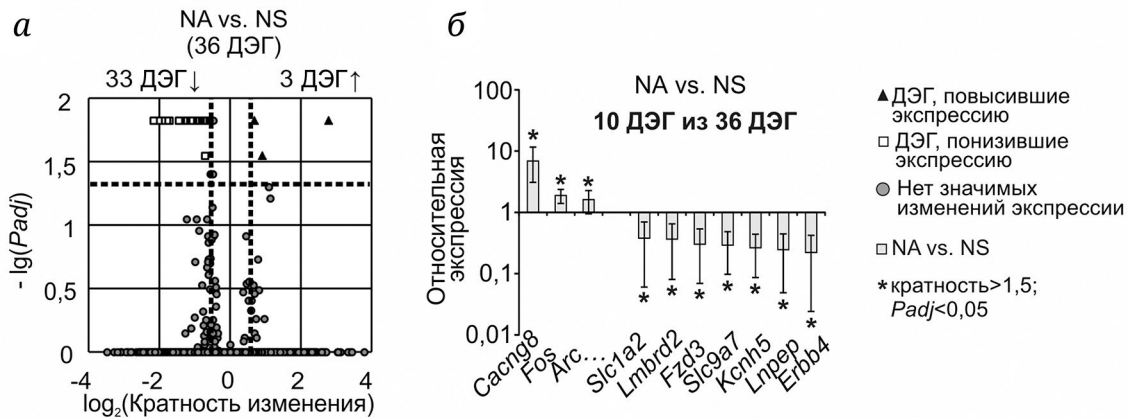


Рис. 4. Сравнение результатов RNA-Seq в экспериментах с введением АКТГ(6–9)PGP относительно действия секса. График «volcano-plot» иллюстрирует различия в экспрессии мРНК между группами «норма + АКТГ(6–9)PGP» (NA) и «норма + секс» (NS) (а). Представлены 10 генов, которые продемонстрировали наибольшее кратное изменение экспрессии в сравнении NA vs. NS (кратность > 1,5; Padj < 0,05) по данным RNA-Seq (б)

иерархического кластерного анализа этих генов проиллюстрированы на рис. П2 в Приложении 1, выражая как общие, так и специфические черты действия каждого из пептидов на транскриптом участка фронтальной коры крыс.

Функциональные аннотации ДЭГ, связанных с влиянием АКТГ-подобных пептидов. Списки ДЭГ, полученные на предыдущем этапе, были обработаны нами в программе анализа функционального обогащения DAVID v2021. Было выяв-

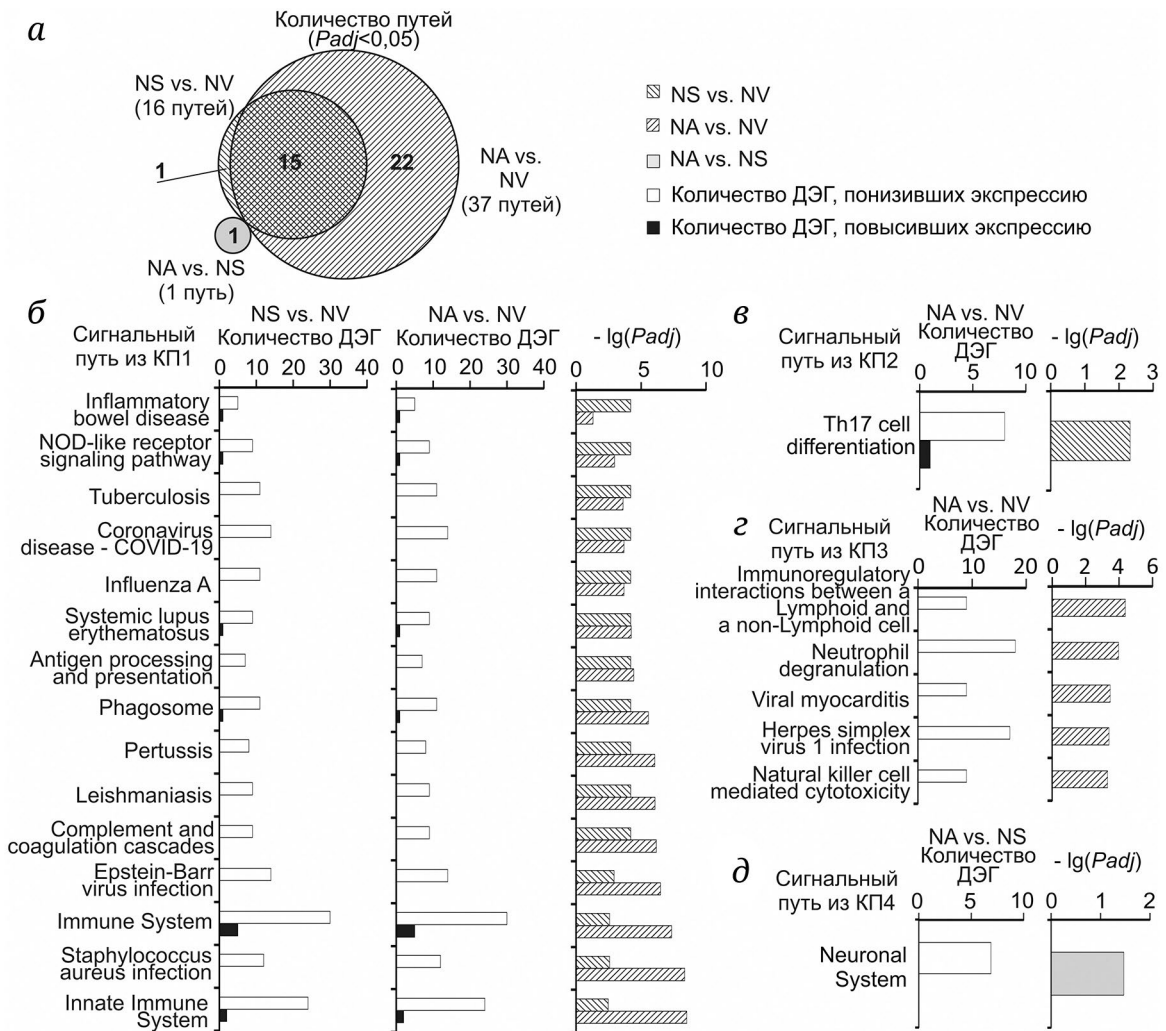


Рис. 5. Сигнальные пути, связанные с влиянием семакса и АКТГ(6–9)PGP на транскриптом участка фронтальной коры крыс. Анализ проводился с помощью программы DAVID v2021. Схематическое сравнение аннотаций (путей), связанных с ДЭГ, полученных в трех парных сравнениях NS vs. NV, NA vs. NV и NA vs. NS в форме диаграммы Венна (а). Количество аннотаций указано цифрами в сегментах диаграммы. Показаны сигнальные пути, лежащие в сегментах на диаграмме Венна: общие для сравнений NS vs. NV и NA vs. NV (б), а также специфичные для сравнений NS vs. NV (в), NA vs. NV (г) и NA vs. NS (д). На панелях (б), (в) и (д) показаны все пути, лежащие в соответствующем сегменте на диаграмме Венна, а на панели (г) – только 5 из 22 путей с минимальной величиной P_{adj} (значение p , скорректированное с использованием процедуры Бенджамини–Хохберга) в NA vs. NV. Для каждого пути представлены значения P_{adj} , а также количество повысивших и понизивших экспрессию генов в соответствующем попарном сравнении. Для анализа были выбраны только ДЭГ и пути с $P_{adj} < 0,05$. В каждую группу сравнения входило по 3 животных. Inflammatory bowel disease – воспалительное заболевание кишечника; NOD-like receptor signaling pathway – сигнальный путь NOD-подобного рецептора; Tuberculosis – туберкулез; Coronavirus disease – COVID-19 (коронавирусная болезнь); Influenza A – грипп А; Systemic lupus erythematosus – системная красная волчанка; Antigen processing and presentation – обработка и презентация антигена; Phagosome – фагосома; Pertussis – коклюш; Leishmaniasis – лейшманиоз; Complement and coagulation cascades – каскады комплемента и коагуляции; Epstein-Barr virus infection – инфекция вируса Эпштейна–Барр; Immune System – иммунная система; Staphylococcus aureus infection – инфекция золотистого стафилококка; Innate Immune System – врожденная иммунная система; Th17 cell differentiation – дифференцировка клеток Т-хелперов 17; Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell – иммунорегуляторные взаимодействия между лимфоидными и нелимфоидными клетками; Neutrophil degranulation – дегрануляция нейтрофилов; Viral myocarditis – вирусный миокардит; Herpes simplex virus 1 infection – инфекция вируса простого герпеса 1; Natural killer cell mediated cytotoxicity – цитотоксичность, опосредованная естественными клетками-киллерами; Neuronal System – нейронная система

лено 1, 16 и 37 сигнальных путей, аннотированных в терминах баз данных KEGG PATHWAYS и REACTOME PATHWAYS и ассоциированных с ДЭГ в

группах сравнения NA vs. NS, NS vs. NV и NA vs. NV соответственно (рис. 5, а). Так, в группе сравнения NS vs. NV наибольшей значимостью обладали

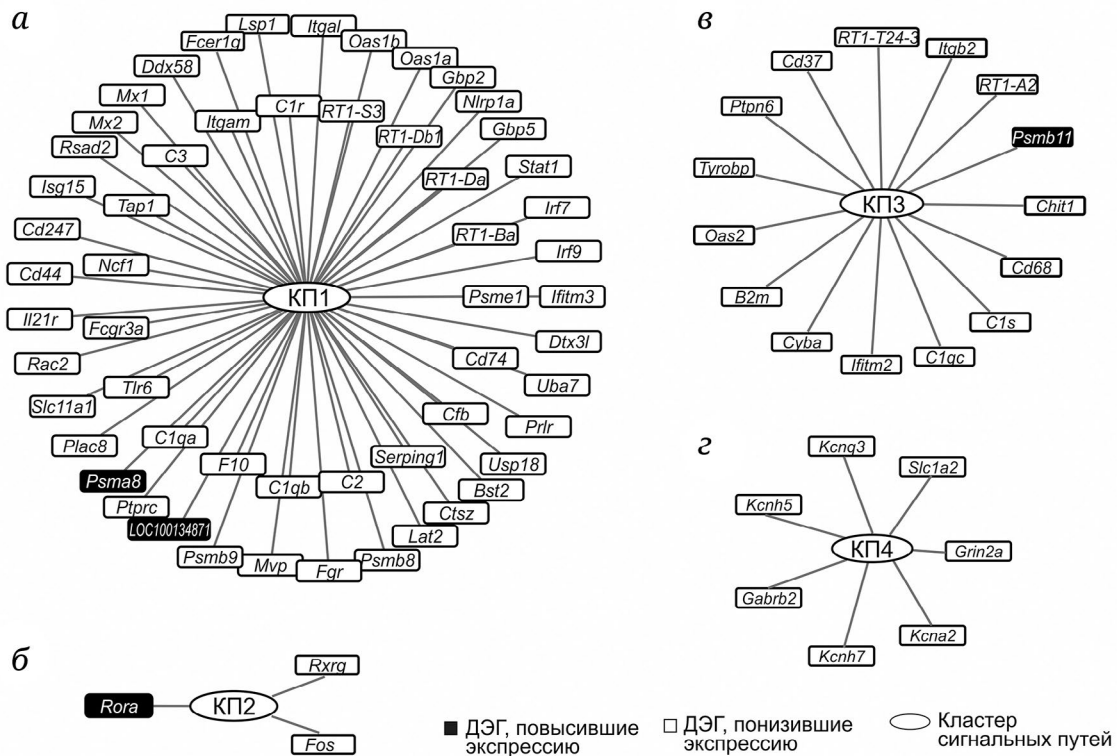


Рис. 6. Сети, отражающие общие и специфичные эффекты семакса и АКТГ(6–9)PGP на транскриптом участка фронтальной коры крыс. Показаны только гены, которые изменили экспрессию под действием как семакса, так и АКТГ(6–9)PGP (NS vs. NV и NA vs. NV) (а); только под действием семакса (NS vs. NV), но не АКТГ(6–9)PGP (NA vs. NV) (б); только под действием АКТГ(6–9)PGP (NA vs. NV), но не семакса (NS vs. NV) (в); под действием АКТГ(6–9)PGP относительно семакса (NA vs. NS) (г). Данные группы генов (а–г) вовлечены в презентацию КП1–КП4 соответственно. На схемах гены представлены в прямоугольных блоках, окрашенных в соответствии с дифференциальной экспрессией генов в группах сравнения – NS vs. NV (а и б), NA vs. NV (в), NA vs. NS (г). Пути обозначены белыми овалами. Линии, соединяющие гены и пути, указывают на участие белковых продуктов генов в функционировании пути. Программа DAVID v2021 использовалась для аннотирования функций ДЭГ в терминах путей из баз данных KEGG и REACTOME. Сеть была построена с использованием Cytoscape 3.9.2

пути, связанные с иммунным и воспалительным ответом, включая путь системы комплемента и коагуляции (Complement and coagulation cascades). В число наиболее значимых сигнальных путей в группе сравнения NA vs. NV были системы комплемента и коагуляции, врожденная иммунная система (Innate Immune System), иммунная система (Immune System), также системы, связанные с иммунной. Все перечисленные пути были связаны преимущественно с понизившими экспрессию ДЭГ как в сравнении NS vs. NV, так и в NA vs. NV и входили в 15 путей, являющихся общими для действия обоих пептидов (рис. 5, а и б). Эти пути, характеризующие общее влияние семакса и АКТГ(6–9)PGP на транскриптом участка фронтальной коры крыс, были обозначены нами как первый кластер путей (КП1).

Семакс в группе сравнения NS vs. NV был связан с модуляцией активности пути клеточной дифференцировки Т-хелперов 17 (Th17 cell differentiation). Этот путь не был выявлен в случае АКТГ(6–9)PGP в сравнении NA vs. NV (рис. 5, а и в)

и был отнесен нами ко второму кластеру путей (КП2). Вместе с тем специфичными для действия АКТГ(6–9)PGP были 22 пути (рис. 5, а) – третий кластер путей (КП3). Среди них дегрануляция нейтрофилов (Neutrophil degranulation), вирусный миокардит (Viral myocarditis) и цитотоксичность, опосредованная естественными клетками-киллерами (Natural killer cell mediated cytotoxicity) были в числе 5 путей с максимальной значимостью ассоциации (рис. 5, г).

При изучении влияния АКТГ(6–9)PGP в сравнении с семаксом (NA vs. NS) была выявлена ассоциация ДЭГ с путем нейронной системы (Neuronal System), отнесенным нами к четвертому кластеру путей (КП4) (рис. 5, а и д). Другой инструмент, GSEA, который предоставляет информацию об обогащении с использованием более мягкого статистического подхода (FDR, $q < 0,05$), в сравнении NA vs. NS выявил 7 путей, прежде всего, связанных с активностью систем передачи нервного импульса – нейронная система, потенциалзависимые калиевые каналы (Voltage gated Potassium

channels), передача через химические синапсы (Transmission across Chemical Synapses) и другие.

Генные сети, характеризующие общее и специфическое влияние АКТГ-подобных пептидов на транскриптом участка фронтальной коры крыс. На рис. 6 представлены генные сети, характеризующие вовлеченность генов в презентацию сигнальных путей, отнесенных нами к кластерам путей, характеризующих эффекты пептидов (КП1–КП4) в соответствии с диаграммой Венна (рис 5, а). В презентации этих путей участвовало 98 генов, которые изменили экспрессию хотя бы в одной из групп сравнения (NS vs. NV, NA vs. NV, NA vs. NS).

КП1 характеризовал общие эффекты семакса и АКТГ(6–9)PGP (рис. 6, а). В кластер вошли 56 генов, которые изменили экспрессию как под действием семакса, так и АКТГ(6–9)PGP, причем изменение экспрессии этих генов в сравнениях NS vs. NV и NA vs. NV было сонаправлено. Гены преимущественно понизили экспрессию под действием пептидов (рис. 6, а). В сеть, связанную с КП1, вошло большинство генов (*Cd247*, *RT1-Ba*, *RT1-Da*, *RT1-Db1*, *Stat1* и др.), которые кодировали белки, участвующие в презентации путей из нескольких кластеров. Вместе с тем были и гены, связанные только с одним из кластеров путей. Из них было 13 генов (*Cfb*, *F10*, *Gbp2*, *Gbp5*, *Isg15*, *Lat2*, *Lsp1*, *Ncf1*, *Nlrp1a*, *Prlr*, *Tlr6*, *Usp18*), которые участвовали только в презентации путей из КП1.

КП2 включал только один путь клеточной дифференцировки Т-хелперов 17, отражая специфические эффекты семакса. В презентации пути участвовало 3 гена (*Rxrg*, *Fos* и *Rora*), из которых только ген *Rora* повысил, а остальные снизили экспрессию в NS vs. NV, не изменив при этом экспрессию в сравнении NA vs. NV (рис. 6, б). Ген *Rxrg*, кодирующий гамма-рецептор ретиноида X, был к тому же единственным геном, связанным с путями только внутри КП2.

КП3 характеризовал специфические эффекты АКТГ(6–9)PGP (рис. 6, в). В кластер вошли 15 генов (*Psmb11*, *RT1-A2*, *Itgb2*, *RT1-T24-3*, *Cd37*, *Ptpn6*, *Tyrobp*, *Oas2*, *B2m*, *Syba*, *Ifitm2*, *C1qc*, *C1s*, *Cd68*, *Chit1*), которые изменили экспрессию в NA vs. NV, но не в NS vs. NV (рис. 6, в). Среди них гены *Spn* и *Cd37* участвовали только во взаимодействиях внутри КП3.

КП4 также характеризовал уникальное влияние АКТГ(6–9)PGP при использовании семакса в качестве пептида сравнения (рис. 6, г). Путь нейронной системы, составляющий КП4, был ассоциирован с 7 генами (*Slc1a2*, *Grin2a*, *Gabbr2*, *Kcna2*, *Kcna3*, *Kcnh7* и *Kcnh5*), которые снизили экспрессию в NA vs. NS (рис. 6, г). Все эти гены (кроме *Grin2a*) были вовлечены только во внутрикластерные взаимодействия в КП4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе с помощью RNA-Seq было изучено влияние двух синтетических АКТГ-подобных пептидов – семакса и АКТГ(6–9)PGP – на транскриптом участка фронтальной коры мозга крыс через 22,5 ч после трехкратного внутрибрюшинного введения. Ранее при изучении влияния данных пептидов на транскриптом гиппокампа через 6 ч после однократного внутрибрюшинного введения крысам мы не наблюдали значимой дифференциальной экспрессии генов [16]. По всей видимости, текущий результат выявления более двух сотен ДЭГ, помимо различий, связанных со специфическими особенностями гиппокампа и лобной коры, вызван как большим количеством введенных пептидов, так и большим временем, прошедшим после их введения. В настоящем исследовании гены, экспрессия которых изменилась в ответ на воздействие пептидов на интактных животных, были кластеризованы по функциональным группам метаболических путей. Оба пептида вызывали преимущественное снижение экспрессии генов, связанных с иммунной системой. Презентацию кластера общих эффектов пептидов (КП1) обеспечивали, прежде всего, гены, кодирующие компоненты главного комплекса гистосовместимости и системы комплемента (*RT1-Ba*, *RT1-Da*, *RT1-Db1*, *RT1-S3*, *C1qa*, *C1r*, *C3*). Как известно, нейропептиды играют существенную роль в регуляции и модулировании иммунного ответа. Среди них такие пептиды, как тахикинины, кальцитонин-ген-связанный пептид, вазоактивный интестинальный полипептид, гипофизарный аденилатциклаза-активирующий полипептид, урокортин, адреномедуллин, соматостатин, кортистатин, грелин, галанин и опиоидные пептиды, в том числе имеющие значение в медицине [36]. Семакс и АКТГ(6–9)PGP характеризуются, прежде всего, как пептиды с нейропротективными эффектами в отношении событий ишемического инсульта и неврологических нарушений [12, 18]. Ранее мы определили, что семакс в мозге крыс модулирует экспрессию генов, кодирующих белки иммунного ответа и медиаторы воспаления в условиях моделей ишемического инсульта – необратимой (рМСаО) и обратимой (тМСаО) фокальной ишемии [23, 24, 37]. Так, под действием семакса с помощью RNA-Seq нами было выявлено подавление экспрессии генов *Il1b*, *Il6*, *Tnfa* и *Cxcl2* через 24 ч после тМСаО в подкорковых структурах мозга, содержащих очаг повреждения [23, 37]. Также с помощью микрочипов мы выявили снижение экспрессии генов (*C2*, *Cd68*, *RT1-Db1*, *RT1-Ba*, *RT1-A1*, *RT1-CE15*) через 3 ч после рМСаО в лобной коре поврежденного левого полушария крыс под действием семакса [24]. Как показано нами в настоящем исследовании,

многие из перечисленных генов также снижают экспрессию под действием семакса в норме. Интересные результаты были получены нами ранее при изучении влияния семакса и АКТГ(6–9)PGR на транскриптом участка фронтальной коры через 4,5 ч после tMCAO у крыс [26]. Было показано, что пептиды влияют на экспрессию генов иммунной системы, но каждый со своими особенностями. Пептид АКТГ(6–9)PGR преимущественно оказывал компенсаторное действие на экспрессию генов иммунной системы, предотвращая соответствующее влияние ишемии. В то же время отмечалось гетерогенное влияние семакса на экспрессию генов иммунной системы – на одни гены семакс оказывал влияние, противоположное действию ишемии, а на другие – влияние, сонаправленное эффекту самой ишемии [26]. При сравнении транскриптомных профилей генов участка фронтальной коры крыс, полученных через 4,5 ч после tMCAO, и в настоящем исследовании мы заметили только единичные общие гены, модулирование активности которых вызывали пептиды как при ишемии, так и в норме. Обращают на себя внимание 8 генов (*RT1-Ba*, *RT1-Da*, *RT1-Db1*, *Xkr6*, *Clk2*, *Cd74*, *C3*, *Trdn*), которые изменили экспрессию под действием обоих пептидов как в норме, так и при ишемии. Также было обнаружено несколько генов (*Rac2*, *Doc2g*, *Prkd3*, *Pkn3*, *Dnajb14*, *Dlx2*, *Drd2*, *Cdhr1*, *Calb2* и др.), которые изменили экспрессию только при действии одного из пептидов, но как в норме, так и при ишемии. При этом общие гены преимущественно относятся к группе снизивших экспрессию под действием пептидов.

В настоящем исследовании, помимо общего эффекта семакса и АКТГ(6–9)PGR, мы выделили еще 3 кластера сигнальных путей, отражающих специфическое влияние каждого из пептидов. Следует отметить, что были найдены гены, которые участвуют в презентации только путей, относящихся к конкретному кластеру и, вероятно, смогут составлять набор транскриптомных маркеров эффектов пептидов. Семакс в норме влиял на экспрессию генов пути дифференциации Th17, который составлял КП2. Это путь не был выявлен в группе с введением АКТГ(6–9)PGR. Данный путь определяет процесс контроля воспалительных реакций и пластичности иммунной системы [38, 39]. Действие некоторых соединений также приводит к модуляции активности данного пути. Было показано, что блокирование образования клеток Th17 с помощью введения белка V7-N4.Ig эффективно подавляет развитие сахарного диабета у мышей [40]. Кроме того, флувоксамин ингибирует поляризацию и функцию Th1 и Th17, подавляя гликолиз, замедляя аутоиммунное прогрессирование при диабете 1-го типа [41]. Следует отметить, что путь клеточной дифференцировки

T-хелперов 17 был также в числе специфичных для семакса при изучении его влияния на транскриптом участка фронтальной коры через 4,5 ч после tMCAO [26]. В этой связи не исключено, что одними из уникальных мишеней действия семакса могут быть рецепторы V7-N4, регулирующие T-клеточный иммунитет.

Мы показали, что в норме АКТГ(6–9)PGR оказывал влияние на целый спектр из 22 путей, связанных с иммунитетом, на которые семакс не влиял. Среди них пути дегрануляции нейтрофилов, вирусного миокардита, цитотоксичность, опосредованная естественными клетками-киллерами, формирующие КП3. Следует отметить, что АКТГ(6–9)PGR через 4,5 ч после tMCAO вызывал изменения экспрессии генов, связанных с активностью только 4 путей [26]. Кроме того, при сравнении группы с введением АКТГ(6–9)PGR с группой крыс, получавших инъекцию семакса, мы обнаружили 36 генов, которые значительно изменили экспрессию. Эти гены были ассоциированы с активностью систем нейросигнализации, формируя кластер нейронная система (КП4). Только 5 из данных генов (*Slc1a2*, *Phc3*, *Rc3h2*, *Gabrb2*, *Kcna2*) были ДЭГ также и через 4,5 ч после tMCAO в соответствующей группе сравнения, причем сонаправлено снизив экспрессию в обоих случаях. Влияние пептидов, в том числе синтетического происхождения, на активность системы нейросигнализации показано во многочисленных исследованиях [42–48]. Так, пептиды R1-Пер и PP2A-Пер ингибируют взаимодействие рецепторов γ -аминомасляной кислоты с ферментами, участвующими в их фосфорилировании [42, 43]. Нами было показано, что в подкорковых структурах мозга через 24 ч после tMCAO семакс активирует экспрессию генов *Cplx2*, *Chrm1*, *Gabra5*, *Gria3*, *Neurod6*, *Ptk2b*, связанных с передачей нервного импульса [23, 49]. Такой эффект семакса мог быть связан с PGR-фрагментом на его C-конце, так как в соответствующем эксперименте сам пептид PGR значимо повышал экспрессию гена *Gabra5* и при этом не вызывал значимых изменений экспрессии генов кластера нейросигнализации относительно действия семакса [49]. В настоящей работе мы показали различную реакцию генов нейросигнализации на введение пептидов, отличающихся последовательностью АКТГ-фрагмента. В частности, АКТГ(4–5) (Met-Glu) присутствовал только в семаксе, а АКТГ(8–9) (Arg-Trp) присутствовал только в пептиде АКТГ(6–9)PGR. Поэтому проявление специфичных для семакса и АКТГ(6–9)PGR эффектов, как в норме, так и в условиях ишемии, может быть обусловлено уникальными последовательностями из АКТГ в их структурах.

Вопрос о том, как именно семакс и АКТГ(6–9)PGR передают свой эффект на уровень геномной

активности остается во многом не решенным. Рассматривают модель, в которой пептиды или их метаболиты взаимодействуют с аллостерическими сайтами на мембранных рецепторах и обеспечивают передачу сигнала в ядро по системе сигнальных путей, влияя на экспрессию тех или иных генов [50, 51]. Изучение влияния пептидов на экспрессию генов на уровне мРНК дает лишь часть сведений об их молекулярно-генетических эффектах. Важным является изучение роли некодирующих РНК (микроРНК, длинных некодирующих РНК, циклических РНК), а также белков, обеспечивающих процессы регуляции экспрессии генов. Мы полагаем, что дальнейший интегративный молекулярно-генетический и протеомный функциональный анализ в клетках мозга позволит установить регуляторные аспекты, определяющие активность пептидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые изучено влияние двух нейропептидов, производных АКТИВ, – семакса и АКТИВ(6–9)PGR, отличающихся деталями структуры, на транскриптом клеток мозга у интактных животных. В результате были выявлены гены и метаболические системы, которые характеризуют как общие, так и специфические эффекты пептидов. Полученные результаты способствуют выяснению зависимости нейропротективных эффектов АКТИВ-подобных пептидов от их структуры и должны учитываться при изучении их влияния при патологии.

Вклад авторов. И.Б. Филиппенков, Н.Ю. Глазова, Е.А. Себенцова, Н.Г. Левицкая, Л.В. Дергунова – планирование экспериментов; И.Б. Филиппенков, Н.Ю. Глазова, Е.А. Себенцова, В.В. Ставчанский, Л.А. Андреева – постановка экспериментов; И.Б. Филиппенков – написание манускрипта; Н.Г. Левицкая, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова – редактирование манускрипта; С.А. Лимборская, Н.Ф. Мясоедов, Л.В. Дергунова – концептуализация и руководство исследованием.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Тематического плана НИОКР НИЦ «Курчатовский институт» 5Ф.5.9 (биоинформатическая обработка данных), а также при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-14-00027; анализ экспрессии генов).

Благодарности. В работе использовали оборудование ресурсных центров НИЦ «Курчатовский институт» и МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы благодарят А.Э. Голубович за помощь в обработке данных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. 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.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee, A. C. L., Harris, J. L., Khanna, K. K., and Hong, J. H. (2019) A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2383, <https://doi.org/10.3390/ijms20102383>.
2. Apostolopoulos, V., Bojarska, J., Chai, T. T., Elnagdy, S., Kaczmarek, K., Matsoukas, J., New, R., Parang, K., Lopez, O. P., Parhiz, H., Perera, C. O., Pickholz, M., Remko, M., Saviano, M., Skwarczynski, M., Tang, Y., Wolf, W. M., Yoshiya, T., Zabrocki, J., Zielenkiewicz, P., AlKhazindar, M., Barriga, V., Kelaidonis, K., Sarasia, E. M., and Toth, I. (2021) A global review on short peptides: frontiers and perspectives, *Molecules.*, **26**, 430, <https://doi.org/10.3390/molecules26020430>.
3. Lubell, W. D. (2022) Peptide-based drug development, *Biomedicines*, **10**, 2037, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10082037>.
4. Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R., and Fu, C. (2022) Therapeutic peptides: current applications and future directions, *Signal. Transduct. Target. Ther.*, **7**, 48, <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>.
5. Deigin, V. I., Poluektova, E. A., Beniashvili, A. G., Kozin, S. A., and Poluektov, Y. M. (2022) Development of peptide biopharmaceuticals in Russia, *Pharmaceutics*, **14**, 716, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040716>.
6. Starowicz, K., and Przewłocka, B. (2003) The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception, *Life Sci.*, **73**, 823-847, [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00349-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00349-7).
7. Adan, R. A. H., and Gispen, W. H. (1997) Brain melanocortin receptors: from cloning to function, *Peptides*, **18**, 1279-1287, [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(97\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(97)00078-8).
8. Catania, A., Gatti, S., Colombo, G., and Lipton, J. M. (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation, *Pharmacol. Rev.*, **56**, 1-29, <https://doi.org/10.1124/pr.56.1.1>.

9. Cone, R. D. (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system, *Nat. Neurosci.*, **8**, 571-578, <https://doi.org/10.1038/nn1455>.
10. Giuliani, D., Minutoli, L., Ottani, A., Spaccapelo, L., Bitto, A., Galantucci, M., Altavilla, D., Squadrito, F., and Guarini, S. (2012) Melanocortins as potential therapeutic agents in severe hypoxic conditions, *Front. Neuroendocrinol.*, **33**, 179-193, <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.04.001>.
11. Wikberg, J. (2001) Melanocortin receptors: new opportunities in drug discovery, *Exp. Opin. Ther. Patents*, **11**, 61, <https://doi.org/10.1517/13543776.11.1.61>.
12. Гусев Е. И., Мартынов М. Ю., Костенко Е. В., Петрова Л. В., Бобырёва С. Н. (2018) Эффективность семакса при лечении больных на разных стадиях ишемического инсульта, *Журн. Неврол. Психиатр.*, **3**, 61-68.
13. Potaman, V. N., Alfeeva, L. Y., Kamensky, A. A., Levitzkaya, N. G., and Nezavibatko, V. N. (1991) N-terminal degradation of ACTH(4-10) and its synthetic analog semax by the rat blood enzymes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 741-746, [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80247-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80247-5).
14. Agapova, T. Y., Agniullin, Y. V., Shadrina, M. I., Shram, S. I., Slominsky, P. A., Lymborska, S. A., and Myasoedov, N. F. (2007) Neurotrophin gene expression in rat brain under the action of Semax, an analogue of ACTH 4-10, *Neurosci. Lett.*, **417**, 201-205, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.02.042>.
15. Полунин Г. С., Нуриева С. М., Баяндин Д. Л., Шеремет Н. Л., Андреева Л. А. (2000) Определение терапевтической эффективности нового отечественного препарата «семакс» при заболеваниях зрительного нерва, *Вестник Офтальмол.*, **116**, 15-18.
16. Filippenkov, I. B., Stavchansky, V. V., Glazova, N. Y., Sebentsova, E. A., Remizova, J. A., Valieva, L. V., Levitskaya, N. G., Myasoedov, N. F., Limborska, S. A., and Dergunova, L. V. (2021) Antistress action of melanocortin derivatives associated with correction of gene expression patterns in the hippocampus of male rats following acute stress, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 34576218, <https://doi.org/10.3390/ijms221810054>.
17. Vorvul, A. O., Bobyntsev, I. I., Medvedeva, O. A., Mukhina, A. Y., Svishcheva, M. V., Azarova, I. E., Andreeva, L. A., and Myasoedov, N. F. (2022) ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro ameliorates anxiety-like and depressive-like behaviour and gut mucosal microbiota composition in rats under conditions of chronic restraint stress, *Neuropeptides*, **93**, 35487169, <https://doi.org/10.1016/j.npep.2022.102247>.
18. Бакаева З. В., Сурин А. М., Лизунова Н. В., Згодова А. Е., Красильникова И. А., Фисенко А. П., Фролов Д. А., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф., Пинелис В. Г. (2020) Нейропротекторный потенциал пептидов HFRWPGP (ACTH6-9PGP), KKRRPGP, PYRRP в культивируемых корковых нейронах при глутаматной эксайтотоксичности, *Докл. Росс. Акад. Наук Науки о Жизни*, **491**, 62-66, <https://doi.org/10.31857/S2686738920020067>.
19. Akimov, M. G., Fomina-Ageeva, E. V., Dudina, P. V., Andreeva, L. A., Myasoyedov, N. F., and Bezuglov, V. V. (2021) ACTH(6-9)PGP peptide protects SH-SY5Y cells from H₂O₂, tert-butyl hydroperoxide, and cyanide cytotoxicity via stimulation of proliferation and induction of prosurvival-related genes, *Molecules*, **26**, 1878, <https://doi.org/10.3390/molecules26071878>.
20. Wang, C.-M., Pan, Y.-Y., Liu, M.-H., Cheng, B.-H., Bai, B., and Chen, J. (2017) RNA-seq expression profiling of rat MCAO model following reperfusion Orexin-A, *Oncotarget*, **8**, 113066-113081, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22995>.
21. Tian, R., Deng, A., Pang, X., Chen, Y., Gao, Y., Liu, H., and Hu, Z. (2022) VR-10 polypeptide interacts with CD36 to induce cell apoptosis and autophagy in choroid-retinal endothelial cells: identification of VR-10 as putative novel therapeutic agent for choroid neovascularization (CNV) treatment, *Peptides*, **157**, 170868, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170868>.
22. Zhang, Q., Liu, C., Shi, R., Zhou, S., Shan, H., Deng, L., Chen, T., Guo, Y., Zhang, Z., Yang, G. Y., Wang, Y., and Tang, Y. (2022) Blocking C3d⁺/GFAP⁺ A1 astrocyte conversion with semaglutide attenuates blood-brain barrier disruption in mice after ischemic stroke, *Aging Dis.*, **13**, 943-959, <https://doi.org/10.14336/AD.2021.1029>.
23. Filippenkov, I. B., Stavchansky, V. V., Denisova, A. E., Yuzhakov, V. V., Sevan'kaeva, L. E., Sudarkina, O. Y., Dmitrieva, V. G., Gubsky, L. V., Myasoedov, N. F., Limborska, S. A., and Dergunova, L. V. (2022) Novel insights into the protective properties of ACTH₍₄₋₇₎PGP (Semax) peptide at the transcriptome level following cerebral ischaemia-reperfusion in rats, *Genes (Basel)*, **11**, 681, <https://doi.org/10.3390/genes11060681>.
24. Medvedeva, E. V., Dmitrieva, V. G., Povarova, O. V., Limborska, S. A., Skvortsova, V. I., Myasoedov, N. F., and Dergunova, L. V. (2014) The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: genome-wide transcriptional analysis, *BMC Genomics*, **15**, 228, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-228>.
25. Medvedeva, E. V., Dmitrieva, V. G., Limborska, S. A., Myasoedov, N. F., and Dergunova, L. V. (2017) Semax, an analog of ACTH₍₄₋₇₎, regulates expression of immune response genes during ischemic brain injury in rats, *Mol. Genet. Genomics*, **292**, 635-653, <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1297-1>.
26. Filippenkov, I. B., Remizova, J. A., Stavchansky, V. V., Denisova, A. E., Gubsky, L. V., Myasoedov, N. F., Limborska, S. A., and Dergunova, L. V. (2023) Synthetic adrenocorticotrophic peptides modulate the expression pattern of

- immune genes in rat brain following the early post-stroke period, *Genes (Basel)*, **14**, 1382, <https://doi.org/10.3390/genes14071382>.
27. Ashmarin, I., Nezavibatko, V., Levitskaya, N., Koshelev, V., and Kamensky, A. (1995) Design and investigation of an ACTH(4-10) analog lacking D-amino acids and hydrophobic radicals, *Neurosci. Res. Commun.*, **16**, 105-112.
 28. Miasoedova, N. F., Skvortsova, V. I., Nasonov, E. L., Zhuravleva, E. I., Grivennikov, I. A., Arsen'eva, E. L., and Sukhanov, I. I. (1999) Investigation of mechanisms of neuro-protective effect of semax in acute period of ischemic stroke [in Russian], *Zhurn. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova*, **99**, 15-19.
 29. Медведева Е. В., Дмитриева В. Г., Поварова О. В., Лимборская С. А., Скворцова В. И., Мясоедов Н. Ф., Дергунова Л. В. (2014) Трипептид PRO-GLY-PRO влияет на транскриптом коры головного мозга крыс в условиях фокальной ишемии, *Мол. Биол.*, **48**, 277, <https://doi.org/10.7868/S0026898414020128>.
 30. Шубина Т. А., Григорьева М. Е., Ляпина Л. А., Оберган Т. Ю., Мясоедов Н. Ф., Андреева Л. А. (2014) Гипогликемическая и противосвертывающая активность тетрапептида PRO-GLY-PRO-LEU при гиперхолестеринемии, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **158**, 35-39.
 31. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.*, **55**, 611-622, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
 32. Huang, D. W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.*, **4**, 44-57, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
 33. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15545-15550, <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.
 34. Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., and Wishart, D. S. (2016) Heatmapper: web-enabled heat mapping for all, *Nucleic Acids Res.*, **44**, W147-W153, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>.
 35. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003) Cytoscape: a software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.*, **13**, 2498-2504, <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
 36. Pintér, E., Pozsgai, G., Hajna, Z., Helyes, Z., and Szolcsányi, J. (2014) Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **77**, 5-20, <https://doi.org/10.1111/bcp.12097>.
 37. Дергунова Л. В., Дмитриева В. Г., Филиппенков И. Б., Ставчанский В. В., Денисова А. Е., Южаков В. В., Севанькаева Л. Е., Валиева Л. В., Сударкина О. Ю., Губский Л. В., Мясоедов Н. Ф., Лимборская С. А. (2021) Пептидный препарат АКТГ(4-7)PGP (семакс) подавляет транскрипцию генов провоспалительных медиаторов, индуцированную обратимой ишемией мозга крыс, *Мол. Биол.*, **55**, 402-411, <https://doi.org/10.31857/S0026898421010043>.
 38. Bhaumik, S., and Basu, R. (2017) Cellular and molecular dynamics of Th17 differentiation and its developmental plasticity in the intestinal immune response, *Front. Immunol.*, **8**, 254, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00254>.
 39. Zhou, L., Chong, M. M. W., and Littman, D. R. (2009) Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation, *Immunity*, **30**, 646-655, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.001>.
 40. Lee, I. F., Wang, X., Hao, J., Akhoundsadegh, N., Chen, L., Liu, L., Langermann, S., Ou, D., and Warnock, G. L. (2013) B7-H4.Ig inhibits the development of Type 1 diabetes by regulating Th17 cells in NOD mice, *Cell Immunol.*, **282**, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.03.005>.
 41. Zou, Y., Zhang, J., Sun, F., Xu, Q., Chen, L., Luo, X., Wang, T., Zhou, Q., Zhang, S., Xiong, F., Kong, W., Yang, P., Yu, Q., Liu, S., and Wang, C. Y. (2024) Fluvoxamine inhibits Th1 and Th17 polarization and function by repressing glycolysis to attenuate autoimmune progression in type 1 diabetes, *Mol. Med.*, **30**, 23, <https://doi.org/10.1186/s10020-024-00791-1>.
 42. Balakrishnan, K., Hleihil, M., Bhat, M.A., Ganley, R. P., Vaas, M., Klohs, J., Zeilhofer, H. U., and Benke, D. (2022) Targeting the interaction of GABA_B receptors with CaMKII with an interfering peptide restores receptor expression after cerebral ischemia and inhibits progressive neuronal death in mouse brain cells and slices, *Brain Pathol.*, **33**, e13099, <https://doi.org/10.1111/bpa.13099>.
 43. Hleihil, M., Balakrishnan, K., and Benke, D. (2022) Protein phosphatase 2A regulation of GABA_B receptors normalizes ischemia-induced aberrant receptor trafficking and provides neuroprotection, *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 1015906, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1015906>.
 44. Chen, M., Zhang, X., Fan, J., Sun, H., Yao, Q., Shi, J., Qu, H., Du, S., Cheng, Y., Ma, S., Zhang, M., and Zhan, S. (2021) Dynorphin A (1-8) inhibits oxidative stress and apoptosis in MCAO rats, affording neuroprotection through NMDA receptor and κ-opioid receptor channels, *Neuropeptides*, **89**, 34298371, <https://doi.org/10.1016/j.npep.2021.102182>.

45. Paul, S., and Candelario-Jalil, E. (2021) Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies, *Exp. Neurol.*, **335**, 113518, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113518>.
46. Ballarin, B., and Tymianski, M. (2018) Discovery and development of NA-1 for the treatment of acute ischemic stroke, *Acta. Pharmacol. Sin.*, **39**, 661-668, <https://doi.org/10.1038/aps.2018.5>.
47. Malyshev, A. V., Sukhanova, I. A., Ushakova, V. M., Zorkina, Y. A., Abramova, O. V., Morozova, A. Y., Zubkov, E. A., Mitkin, N. A., Pavshintsev, V. V., Doronin, I. I., Gedzun, V. R., Babkin, G. A., Sanchez, S. A., Baker, M. D., and Haile, C. N. (2022) Peptide LCGA-17 attenuates behavioral and neurochemical deficits in rodent models of PTSD and depression, *Pharmaceuticals (Basel)*, **15**, 462, <https://doi.org/10.3390/ph15040462>.
48. Shibato, J., Takenoya, F., Yamashita, M., Gupta, R., Min, C. W., Kim, S. T., Kimura, A., Takasaki, I., Hori, M., Shioda, S., and Rakwal, R. (2023) OMICS analyses unraveling related gene and protein-driven molecular mechanisms underlying PACAP 38-induced neurite outgrowth in PC12 cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 4169, <https://doi.org/10.3390/ijms24044169>.
49. Stavchansky, V. V., Filippenkov, I. B., Remizova, J. A., Denisova, A. E., Mozgovoy, I. V., Gubsky, L. V., Myasoedov, N. F., Andreeva, L. A., Limborska, S. A., and Dergunova, L. V. (2022) Insight into glyproline peptides' activity through the modulation of the inflammatory and neurosignaling genetic response following cerebral ischemia-reperfusion, *Genes (Basel)*, **13**, 2380, <https://doi.org/10.3390/genes13122380>.
50. Dergunova, L. V., Filippenkov, I. B., Limborska, S. A., and Myasoedov, N. F. (2023) Neuroprotective peptides and new strategies for ischemic stroke drug discoveries, *Genes (Basel)*, **14**, 953, <https://doi.org/10.3390/genes14050953>.
51. Mannes, M., Martin, C., Menet, C., and Ballet, S. (2022) Wandering beyond small molecules: peptides as allosteric protein modulators, *Trends Pharmacol. Sci.*, **43**, 406-423, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.10.011>.

CHANGES OF TRANSCRIPTOMIC ACTIVITY IN RAT BRAIN CELLS UNDER THE INFLUENCE OF SYNTHETIC ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE-LIKE PEPTIDES

**I. B. Filippenkov^{1*}, N. Y. Glazova^{1,2}, E. A. Sebentsova^{1,2}, V. V. Stavchansky¹,
L. A. Andreeva¹, N. F. Myasoedov¹, N. G. Levitskaya^{1,2},
S. A. Limborska¹, and L. V. Dergunova¹**

¹ National Research Centre "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia; e-mail: filippenkov-ib.img@yandex.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Synthetic peptides have a wide range of clinical effects. Of particular interest are peptides based on adrenocorticotrophic hormone (ACTH) both as already used and as potential drugs for preventing the consequences of cerebral ischemia. However, it is necessary to study the peptide influence on brain cells under normal physiological conditions, including understanding the risks of their use. Here, we used high-throughput RNA sequencing (RNA-Seq) to identify differentially expressed genes (DEGs) in the frontal cortex of rats receiving intraperitoneal administration of ACTH-like peptides ACTH(4-7)PGP (Semax) and ACTH(6-9)PGP or saline. We identified 258 and 228 DEGs, respectively, with a threshold of > 1.5 and $P_{adj} < 0.05$ at 22.5 hours after the first administration of Semax and ACTH(6-9)PGP. Metabolic pathways, characterizing both the general and specific effects of peptides on the transcriptome were identified. Both peptides predominantly caused a decrease in the expression of genes associated with the immune system. At the same time, when comparing the effects of ACTH(6-9)PGP relative to Semax, DEGs were identified that characterized the main differences in the effects of the peptides. These genes were mostly downregulated and associated with neurosignaling systems and regulation of ion channels and characterized differences in the effects of peptides. Our data show how differences in the structure of ACTH derivatives are associated with changes in the brain cell transcriptome following exposure to these related peptides. Furthermore, our results evident that when studying the influence of regulatory peptides on the transcriptome in pathological conditions, it is necessary to take into account their actions under normal physiological conditions.

Keywords: ACTH-like peptides, RNA-Seq, transcriptome, gene expression, gene networks