

*На правах рукописи*

КАСЯН Анастасия Павловна

**СИНТЕТИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОРНЫЙ ПЕПТИД СЕЛАНК  
КАК МОДУЛЯТОР ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ БЕЛКОВ  
ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ, НЕЙРОРЕЦЕПЦИИ  
И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В НЕРВНЫХ КЛЕТКАХ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной генетики наследственных болезней Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук.

Научный руководитель:

**Сломинский Пётр Андреевич**  
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

**Носиков Валерий Вячеславович**  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий Лабораторией постгеномных  
молекулярно-генетических исследований  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института биохимической физики  
им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

**Пинелис Всеволод Григорьевич**  
доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий Лабораторией клеточных и  
молекулярных технологий Федерального  
государственного автономного научного учреждения  
«Национальный медицинский исследовательский  
центр здоровья детей» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г. в \_\_\_ часов \_\_\_ минут на заседании Диссертационного совета Д 002.235.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32 и на сайте ИМБ РАН [www.eimb.ru](http://www.eimb.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат химических наук

**Крицын Анатолий Михайлович**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования и степень её разработанности**

Психоневрологические заболевания, такие как тревожные расстройства и депрессии, представляют в настоящее время серьезную проблему для современного человечества. До недавнего времени в лечении подобных заболеваний широко использовались классические препаратыベンзодиазепинового ряда, которые являются аллостерическими модуляторами ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов и способны усиливать действие основного тормозного медиатора ЦНС – ГАМК. Несмотря на то, что эти препараты оказывают мощное анксиолитическое действие при различных тревожных расстройствах,ベンзодиазепины имеют ярко выраженные побочные эффекты.

В связи с этим одним из перспективных направлений фармакологии является разработка и использование лекарственных препаратов на основе природных регуляторных пептидов, которые оказывают направленное воздействие на организм, но при этом практически не имеют побочных эффектов. К числу таких препаратов относится селанк – синтетический аналог тафтцина (короткого фрагмента Thr-Lys-Pro-Arg тяжелой цепи иммуноглобулина G человека), удлиненного с С-концевой части молекулы трипептидом Pro-Gly-Pro для повышения метаболической стабильности и продолжительности действия пептида. Пептид селанк оказывает выраженное противотревожное действие на организм, обладает иммуномодулирующим действием, а также положительно влияет на формирование памяти и процессы обучения. Но, несмотря на наличие столь широкой биологической активности, механизм действия селанка до сих пор остается недостаточно изученным.

Показано, что анксиолитический эффект селанка сопоставим с эффектом низких доз классическихベンзодиазепиновых транквилизаторов, и, кроме того, введение селанка в комбинации сベンзодиазепинами усиливает их действие и уменьшает выраженность побочных эффектов. Можно предположить, что в основе молекулярного механизма действия селанка может лежать его способность модулировать работу ГАМКергической системы на разных уровнях, в том числе на уровне транскриптома. Ранее было показано, что однократное и курсовое введение селанка приводит к изменению уровня мРНК генов, кодирующих белки, вовлеченные в поддержание ионного гомеостаза клетки, формирование потенциала действия и передачу нервного импульса, а также генов хемокинов, цитокинов и их рецепторов. Тем не менее, до настоящего времени исследований влияния селанка на изменения транскрипционного паттерна генов, напрямую связанных с функционированием ГАМК-зависимых процессов, не проводилось.

## **Цель и задачи**

**Целью** данной работы является анализ роли изменения экспрессии генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, нейрорецепцией и передачей сигналов в нервных клетках, в механизме действия селанка при различных физиологических условиях.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценка влияния курсового введения селанка, диазепама и их комбинации на уровень тревожности крыс в условиях хронического умеренного непредсказуемого стресса и при его отсутствии.

2. Анализ изменения экспрессии генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, нейрорецепцией и передачей сигналов в нервных клетках, в лобной коре крыс спустя 1 и 3 ч после однократного введения селанка и ГАМК с использованием ПЦР-панели. Отбор генов для дальнейшего анализа.

3. Детальный анализ экспрессии отобранных генов в лобной коре крыс через 1 и 3 ч после однократного введения селанка, оланzapина и их комбинации.

4. Оценка влияния курсового введения селанка, диазепама и их комбинации на изменение экспрессии отобранных генов в лобной коре и гиппокампе крыс в условиях хронического умеренного непредсказуемого стресса и при его отсутствии.

5. Анализ влияния селанка, ГАМК, оланzapина и трёх комбинаций данных веществ (селанк и ГАМК; селанк и оланзапин; селанк, ГАМК и оланзапин) на изменение экспрессии генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, нейрорецепцию и передачу сигналов в нервных клетках, в культуре клеток нейробластомы человека IMR-32 с использованием ПЦР-панели.

## **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы**

В данной диссертационной работе впервые было проанализировано действие, оказываемое селанком, оланзапином, диазепамом и их комбинациями на изменение экспрессии генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, нейрорецепцию и передачу сигналов в нервных клетках, в лобной коре и гиппокампе крыс и в культуре клеток нейробластомы человека IMR-32. Показано, что при однократном введении действие селанка на уровень мРНК данных генов в лобной коре крыс через 1 ч после введения в значительной степени совпадает с действием ГАМК на этом же временном интервале, однако через 3 ч данное сходство не наблюдается. Кроме того, при анализе изменения экспрессии генов *Adcy7*, *Cx3cl1*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb3*,

*Gabre, Gabrq, Hcrt, Slc6a1* и *Slc6a11*, отобранных по результатам анализа ПЦР-панели, был выявлен тканеспецифичный характер действия селанка на экспрессию данных генов в мозге крыс, а также обнаружено отличие влияния селанка от действия на уровень мРНК исследуемых генов, которое оказывают диазепам и оланзапин. Впервые было показано, что селанк не изменяет экспрессию генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, в культуре клеток нейробластомы человека IMR-32, однако введение пептида совместно с ГАМК или оланзапином приводит к изменению действия, оказываемого ГАМК или оланзапином на экспрессию исследуемых генов при индивидуальном введении данных веществ, соответственно.

В ходе работы также впервые был проведен анализ влияния курсового введения селанка, диазепама и их комбинации на уровень тревожности крыс как при отсутствии стрессовых воздействий, так и в условиях хронического умеренного непредсказуемого стресса. При совместном введении селанка с диазепамом была выявлена эффективность снижения повышенного уровня тревожности животных в условиях стресса, что позволяет предположить наличие у селанка способности потенцировать эффекты бензодиазепиновых препаратов. Это дает основания предложить данный пептид для усиления действия классических транквилизаторов, и таким образом уменьшить дозы вводимых бензодиазепинов и снизить выраженность побочных эффектов.

Таким образом, полученные результаты позволяют расширить представления о механизме действия синтетического регуляторного пептида селанка на уровне транскрипции генов, а также выявить новые аспекты противотревожного действия селанка.

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

1. Не обнаружено влияния пептида селанка на уровень мРНК генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, нейрорецепцией и передачей сигналов в нервных клетках, в клетках линии IMR-32, экспрессирующих функциональные ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы.

2. В лобной коре мозга крыс при интраназальном введении селанка выявлены изменения в уровне мРНК генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, нейрорецепцией и передачей сигналов в нервных клетках. Показано, что действие селанка на уровень мРНК исследуемых генов в лобной коре крыс через 1 ч после однократного введения в значительной степени совпадает с действием ГАМК, а через 3 ч влияние селанка и ГАМК на экспрессию генов в большинстве случаев не совпадает.

3. При курсовом введении селанка обнаружено снижение уровня тревожности крыс как в условиях минимальных стрессовых воздействий, так и

в условиях хронического умеренного непредсказуемого стресса. Эффект селанка при хроническом умеренном непредсказуемом стрессе выявлен только при совместном введении с диазепамом.

4. Обнаружено отличие влияния селанка на экспрессию генов *Adcy7*, *Cx3cl1*, *Gabra6*, *Gabbr1*, *Gabbr3*, *Gabre*, *Gabrq*, *Hcrt*, *Slc6a1* и *Slc6a11*, отобранных по результатам анализа ПЦР-панели, в мозге крыс от действия на экспрессию данных генов, которое оказывают диазепам и оланzapин. Выявлена зависимость данного влияния от физиологического состояния животного (нормальное состояние или состояние хронического умеренного непредсказуемого стресса).

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

Основные результаты диссертационной работы были представлены на XXVI Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (10-14 февраля 2014 г., Москва); VII Съезде Российского общества медицинских генетиков (19-23 мая 2015 г., Санкт-Петербург); VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (12-17 июля 2015 г., Новосибирск); II Научной конференции «Физиологическая активность регуляторных пептидов» (18 сентября 2015 г., Москва); V Съезде биохимиков России и V Съезде физиологов СНГ (4-9 октября 2016 г., Сочи); XXIII Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (18-22 сентября 2017 г., Воронеж). Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседании Ученого совета ИМГ РАН 28 сентября 2017 г.

Цели, поставленные в работе, достигнуты, результаты приведенных в работе экспериментов грамотно интерпретированы, и сделанные в работе выводы обоснованы, их достоверность не вызывает сомнений.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных журналах и 6 материалов научных конференций и симпозиумов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 172 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы, список использованных сокращений и список использованной литературы. Список литературы состоит из 320 источников, среди которых 66 источников отечественной и 254 источника зарубежной литературы. Материал диссертации иллюстрирован 9 таблицами и 23 рисунками.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

На первом этапе исследования проводили анализ влияния селанка и ГАМК на экспрессию генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, в лобной коре крыс. В эксперименте использовали самцов крыс линии Вистар со средней массой 200 г., содержавшихся в виварии со свободным доступом к воде и пище и 12-и часовым циклом освещения. Всех крыс (n=30) разделили на 3 группы: контрольную и 2 экспериментальных – с однократным интраназальным введением раствора селанка (300 мкг/кг веса) или ГАМК (300 мкг/кг веса). Через 1 или 3 ч животных всех групп декапитировали и проводили диссекцию лобной коры. Тотальную РНК выделяли с использованием набора RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, Германия).

На втором этапе исследования проводили оценку влияния селанка, ГАМК, оланzapина и их комбинаций на экспрессию генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, в культуре клеток нейробластомы человека IMR-32. Клетки IMR-32 были получены из американской коллекции типовых культур (ATCC) (LGC Standards Sp. z.o.o., Польша). Клетки помещали в 6-луночные планшеты (Corning, Нидерланды) с культуральной средой и добавляли физиологический раствор (50 мкл), раствор селанка, ГАМК, оланzapина, растворы селанка и ГАМК, селанка и оланzapина или селанка, ГАМК и оланzapина (по 1 нмоль на лунку каждого вещества), после чего клетки инкубировали с реагентами в течение 1 ч. После инкубации клетки лизировали с использованием реагента TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, США). Тотальную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции и набора RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, Германия).

Анализ экспрессии генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, на первом и втором этапах исследования проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием панелей RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array (Qiagen, Германия), которые содержали праймеры для 84 генов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) и пакета сертифицированных прикладных статистических программ Statistica 8.0.

На третьем этапе исследования анализировали влияние селанка, оланzapина и их комбинации на экспрессию генов *Adcy7*, *Cx3cl1*, *Gabra6*, *Gabbr1*, *Gabbr3*, *Gabre*, *Gabrq*, *Hcrt*, *Slc6a1* и *Slc6a11* в лобной коре крыс. В эксперименте использовали самцов крыс линии Вистар со средней массой 400 г., содержавшихся в стандартных условиях вивария. Всех крыс (n=40)

разделили на 4 группы: контрольную и 3 экспериментальных – с однократным введением раствора селанка (300 мкг/кг веса), оланзапина (3 мг/кг веса) или совместным введением растворов селанка и оланзапина. Через 1 и 3 ч крыс декапитировали и проводили диссекцию лобной коры. Тотальную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента TRIzol® (Invitrogen, США) и набора RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Германия).

На четвертом этапе исследования проводили анализ влияния курсового введения селанка, диазепама и их комбинации на уровень тревожности крыс и на изменение экспрессии генов *Adcy7*, *Cx3cl1*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb3*, *Gabre*, *Gabrq*, *Hcrt*, *Slc6a1* и *Slc6a11* в лобной коре и гиппокампе крыс в условиях хронического умеренного непредсказуемого стресса и при его отсутствии. В эксперименте использовали самцов крыс линии Вистар со средней массой 400 г., содержащихся в стандартных условиях вивария. Все крысы (n=48) были разделены на 2 группы: животные одной группы на протяжении 14 дней находились в стандартных условиях содержания, животные другой группы подвергались хроническому умеренному непредсказуемому стрессу (ХУНС). Использовались следующие виды стрессорных воздействий: пищевая депривация, водная депривация, наклон клетки на 45°, вынужденное плавание при 12°C, инверсия светового дня, влажная подстилка. Измерение показателей поведения животных проводилось дважды с помощью теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Животным из обеих групп на протяжении 14 дней ежедневно (один раз в сутки) вводили исследуемые вещества. Каждая из групп была разделена на 4 подгруппы: контрольную и 3 экспериментальных – с введением раствора селанка (300 мкг/кг веса), диазепама (2 мг/кг веса) или совместным введением растворов селанка и диазепама. Спустя сутки после последнего введения исследуемых соединений крыс декапитировали и проводили диссекцию лобной коры и гиппокампа. Тотальную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента TRIzol® (Invitrogen, США) и набора RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Германия).

Анализ экспрессии генов *Adcy7*, *Cx3cl1*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb3*, *Gabre*, *Gabrq*, *Hcrt*, *Slc6a1*, *Slc6a11*, а также генов сравнения (*Tfrc* и *Tspo*), на третьем и четвертом этапах исследования проводили методом ПЦР в реальном времени. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Relative Expression Software Tool 384 (REST-384<sup>©</sup>) v.2. Статистическую обработку полученных значений показателей поведения на четвертом этапе исследования осуществляли в программе Statistica 8.0 с использованием непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок и критерия Манна-Уитни для независимых выборок.

## Результаты исследования

### **Анализ влияния курсового введения селанка, диазепама и их комбинации на уровень тревожности крыс в условиях хронического умеренного непредсказуемого стресса и при его отсутствии**

Оценка уровня тревожности показала, что даже в отсутствии хронического умеренного непредсказуемого стресса (ХУНС) курсовое введение исследуемых веществ привело к увеличению тревожности животных, при этом при индивидуальном введении селанка повышение уровня тревожности было наименее выраженным (Табл. 1). И в случае использования диазепама, и в случае применения комбинации селанка с диазепамом, повышенный уровень тревожности практически не отличался от такового при курсовом введении физиологического раствора.

**Таблица 1.** Показатели поведения крыс, не подвергавшихся ХУНС, в ПКЛ до и после курсового введения исследуемых веществ.

	Вводимое вещество	Физраствор	Селанк	Диазепам	Селанк + диазепам
		Ме (25%-75%)	Ме (25%-75%)	Ме (25%-75%)	Ме (25%-75%)
Показатели тревожности					
<b>1</b>	До	48,9 (42,5-109,7)	40,2 (16-68,2)	51,4 (20-87)	42,3 (18-78,4)
	После	<b>10,8*</b> (0-30,3)	12,2 (0-23,9)	<b>9*</b> (0-14,5)	<b>7,8*</b> (0-16,6)
<b>2</b>	До	97,5 (59,3-109,6)	124,9 (96,7-149,2)	99,7 (75,9-117,3)	102 (66,7-132,4)
	После	<b>152,3*</b> (135,3-167,8)	147,7 (127,8-172,2)	<b>133,7*</b> (113,3-177,2)	<b>162,8*</b> (147,4-170,9)
<b>3</b>	До	8 (7-11)	7 (3-9)	10 (6-11)	8 (4-10)
	После	<b>2*</b> (0-6)	5 (3-9)	2 (0-6)	2,5 (1-4)
Показатели двигательной активности					
<b>4</b>	До	34 (20-49)	36 (19-42)	32 (23-53)	37,5 (35-42)
	После	14 (11-57)	30 (17-42)	15,5 (9-21)	<b>14,5*</b> (12-21)
<b>5</b>	До	8 (7-9)	9,5 (8-13)	7,5 (5-10)	6,5 (6-10)
	После	5 (3-10)	9,5 (9-10)	6,5 (5-8)	6,5 (5-8)

*Примечание.* Ме, медиана; 1, время пребывания в открытых рукавах лабиринта, с; 2, время пребывания в закрытых рукавах лабиринта, с; 3, количество свешиваний с открытых рукавов; 4, количество пересеченных квадратов; 5, количество вертикальных стоек.\* $p < 0.05$ , сравнение показателей до и после курсового введения исследуемых веществ.

В условиях ХУНС как при курсовом введении селанка, так и при курсовом введении диазепама уровень тревожности подопытных крыс снизился по сравнению с уровнем тревожности животных, получавших физиологический раствор (Табл. 2). В тоже время при курсовом введении комбинации селанка с диазепамом уровень тревожности не отличался от такового до ХУНС, а его отличие от уровня тревожности животных группы контроля, получавших физиологический раствор, было статистически значимым.

**Таблица 2.** Показатели поведения крыс, подвергавшихся ХУНС, в ПКЛ до и после стрессового воздействия и курсового введения веществ.

	Вводимое вещество	Физраствор	Селанк	Диазепам	Селанк + диазепам
Показатель поведения	Ме (25%-75%)	Ме (25%-75%)	Ме (25%-75%)	Ме (25%-75%)	Ме (25%-75%)
Показатели тревожности					
1	До	62,4 (48,7-125,1)	64,7 (41,7-79,4)	56,7 (48,5-137,8)	72,6 (56,7-84,1)
	После	<b>4,6*</b> (0-17,8)	<b>15,5*</b> (7-26,6)	<b>26,9*</b> (8,5-47,7)	<b>40,8<sup>#</sup></b> (25,3-57,5)
2	До	78,2 (42,3-113,3)	104,7 (57,3-120,6)	99,1 (34,2-108,1)	72,9 (65,5-99,2)
	После	<b>164,3*</b> (150,1-175,5)	<b>139,9*</b> (133,2-162,7)	<b>130,3*</b> (90,4-169)	<b>83<sup>#</sup></b> (63,4-135,8)
3	До	8,5 (4-12)	9 (3-13)	10,5 (5-13)	8 (3-16)
	После	<b>1,5*</b> (0-4)	<b>4,5</b> (3-6)	<b>6</b> (2-9)	<b>9</b> (8-10)
Показатели двигательной активности					
4	До	23 (23-47)	39 (33-59)	25,5 (14-36)	40,5 (23-49)
	После	27 (21-34)	22 (15-30)	16,5 (12-26)	25 (22-38)
5	До	8,5 (6-12)	6,5 (5-10)	7 (5-12)	7 (6-12)
	После	5 (4-8)	5,5 (3-8)	7 (5-10)	5 (3-7)

*Примечание.* Ме, медиана; 1, время пребывания в открытых рукавах лабиринта, с; 2, время пребывания в закрытых рукавах лабиринта, с; 3, количество свешиваний с открытых рукавов; 4, количество пересеченных квадратов; 5, количество вертикальных стоек. \* $p < 0.05$ , сравнение показателей до и после стрессорного воздействия и курсового введения исследуемых веществ; <sup>#</sup> $p < 0.05$ , сравнение показателей животных с соответствующими показателями животных группы контроля.

Полученные результаты подтверждают схожесть спектров действия селанка и диазепама, а также указывают на то, что в условиях стресса в присутствии селанка выраженность анксиолитического действия диазепама

существенно возрастает. Можно предположить, что использование совместной терапии селанком и диазепамом позволит снизить дозы вводимого бензодиазепинового препарата и тем самым ослабить его нежелательные эффекты.

### **Анализ влияния селанка и ГАМК на изменение экспрессии генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, в лобной коре крыс**

В ходе сравнения действия селанка и ГАМК на экспрессию генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, нейрорецепцией и передачей сигналов в нервных клетках, было показано, что спустя 1 ч после введения исследуемых соединений наблюдалось изменение уровня мРНК 45 из 84 исследуемых генов. При этом больше чем для половины генов (а именно, 25: *Abat, Adcy7, Adora1, Bcl2l1, Cacna1a, Cacna1b, Cx3cl1, Drd3, Drd5, Gabrb3, Gabre, Gabrq, HcRt, Hcrtr2, Htr3a, Mus, Npffr1, Nsf, P2rx7, Prlhr, Slc32a1, Slc38a1, Slc6a1, Slc6a11* и *Slc8a3*) наблюдалось изменение уровня мРНК как после введения селанка, так и после введения ГАМК. Уровень мРНК 4 генов (*Drd1a, Drd2, Ptgs2* и *Slc6a13*) изменился исключительно после введения селанка, а 16 генов (*Aldh5a1, Birc3, Birc5, Ccnd1, Egr1, Gabbr1, Gabra1, Gabrb1, Gabrd, Gabrg3, Gad1, Glul, Htr1b, Jun, Junb* и *Slc6a12*) – исключительно после введения ГАМК (Рис. 1).



**Рисунок 1.** Соотношение общего количества изменивших экспрессию генов через 1 и 3 ч после введения селанка или ГАМК (диаграмма Венна). В расчетах использовались только гены со статистически значимым изменением уровня мРНК в 1,5 раза и более.

Для большинства генов, изменивших экспрессию через 1 ч после введения каждого из исследуемых соединений, наблюдалось снижение уровня мРНК. Для 23 генов отмечено статистически значимое падение уровня мРНК после введения селанка и ГАМК, особенно выраженное для трёх генов – *Gabre* (в 20 и 16,7 раза, соответственно), *Gabrq* (в 20 раз) и *Hcrt* (в 25 и 50 раз, соответственно). И только для двух генов после введения каждого из

исследуемых соединений было отмечено повышение уровня мРНК. Так, уровень мРНК гена *Drd3* вырос в 3,4 раза после введения селанка и в 2 раза после введения ГАМК, а уровень мРНК гена *Gabrb3* увеличился в 1,6 и 2,1 раза, соответственно.

Следует отметить, что для 11 из 16 генов, изменивших экспрессию спустя 1 ч только после введения ГАМК, было показано статистически значимое снижение уровня мРНК, особенно выраженное для генов *Junb* и *Gabrd* (в 2,8 и 2,7 раза, соответственно). Для 5 генов (*Birc5*, *Gabra1*, *Gabrb1*, *Gabrg3* и *Glul*) наблюдалось повышение уровня мРНК не более чем в 2 раза по сравнению с контрольной группой. В то же время гены, изменившие экспрессию спустя 1 ч исключительно после введения селанка, характеризовались повышением уровня мРНК, но не более чем в 2 раза. Так, уровень мРНК генов *Drd2* и *Ptgs2* вырос в 1,6 раза, в то время как для генов *Drd1a* и *Slc6a13* был отмечен двукратный рост уровня мРНК.

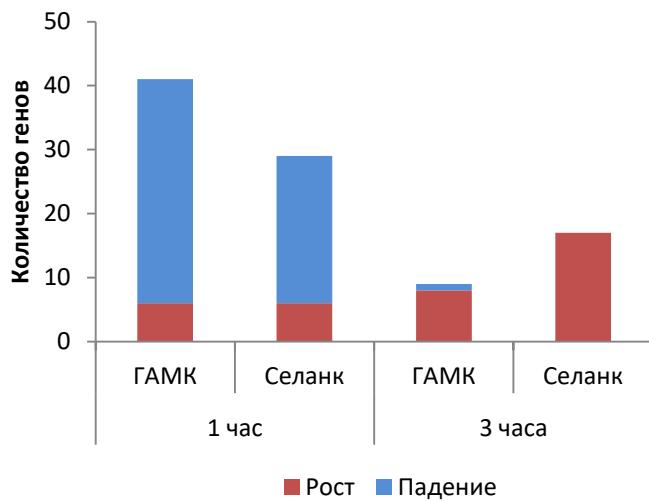
Спустя 3 ч после введения селанка и ГАМК наблюдается иная картина по сравнению с изменениями, наблюдаемыми на более раннем временном интервале. Было показано изменение экспрессии лишь 22 генов, при этом уровень мРНК 13 генов (*Abat*, *Adcy7*, *Ccnd1*, *Drd5*, *Gabre*, *Gabrq*, *Hcrtr*, *Htr3a*, *Prlhr*, *Slc32a1*, *Slc6a1*, *Slc6a11* и *Slc8a3*) изменился исключительно после введения селанка, 5 генов (*Cx3cl1*, *Drd1a*, *Drd3*, *Gabra6* и *Junb*) – исключительно после введения ГАМК, и только для 4 генов (*Adora2a*, *Htr1b*, *Myc* и *Npffr1*) наблюдалось изменение уровня мРНК после введения каждого из исследуемых соединений (Рис. 1). При этом все гены, за исключением гена *Drd3*, характеризовались повышением уровня мРНК. Уровень мРНК гена *Drd3* снизился в 1,8 раза в ответ на введение ГАМК.

Через 3 ч после введения селанка, как и через 1 ч, наиболее выраженное изменение экспрессии наблюдалось для генов *Hcrtr*, *Gabre* и *Gabrq*. Уровень мРНК данных генов спустя 3 ч вырос в 128,3, 16,1 и 13,3 раза, соответственно. Значительным изменением экспрессии спустя 3 ч после введения ГАМК характеризовался только ген *Gabra6*, уровень мРНК которого вырос в 7,6 раза.

Кроме того, для генов, достоверно изменивших уровень мРНК под действием исследуемых соединений, был проведен корреляционный анализ. В результате была выявлена положительная корреляция между изменениями экспрессии генов через 1 ч после введения селанка и ГАМК, которая составила  $r = 0,86$  ( $p \leq 0,05$ ). При этом спустя 3 ч после введения селанка и ГАМК полученная корреляция была отрицательной ( $r = -0,39$ ;  $p \leq 0,05$ ).

Наличие большого количества генов, изменивших уровень мРНК через 1 ч после введения ГАМК, может говорить о возникновении быстрых эффектов, обусловленных связыванием ГАМК с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами. При

этом отсутствие значительных изменений спустя 3 ч после введения ГАМК может быть связано с постепенным снижением активности основных элементов ГАМКергической системы и активацией второй волны каскадных процессов, косвенно воздействующих на тормозные процессы в ЦНС. В то же время для селанка, по сравнению с ГАМК, к 3 ч не наблюдается столь существенного снижения количества изменивших экспрессию генов (Рис. 2). Это может указывать на то, что селанк активирует различные альтернативные процессы, вызывающие отсроченные изменения в экспрессии некоторых генов, которые напрямую не связаны с работой ГАМКергической системы, но в то же время способствуют активации тех или иных генов, вовлечённых в её работу.



**Рисунок 2.** Количество генов, изменивших уровень мРНК, в зависимости от направления изменений экспрессии через 1 и 3 ч после введения селанка или ГАМК. В расчетах использовались только гены со статистически значимым изменением уровня мРНК в 1,5 раза и более.

Следует отметить, что селанк оказал влияние лишь на один из генов, кодирующих основные субъединицы ГАМК<sub>A</sub>-рецептора, – экспрессия гена *Gabbr3*, кодирующего  $\beta_3$ -субъединицу, выросла через 1 ч после введения селанка. Данная субъединица играет важную роль в эмбриональном нейрогенезе и развитии нейронов в головном мозге млекопитающих (Tanaka et al., 2012). В то же время для генов, которые кодируют  $\epsilon$  и  $\theta$  субъединицы, входящие в состав альтернативных, менее распространенных подтипов ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, наблюдается значительное снижение экспрессии спустя час как после введения селанка, так и после введения ГАМК, и существенный рост через 3 ч после введения селанка.

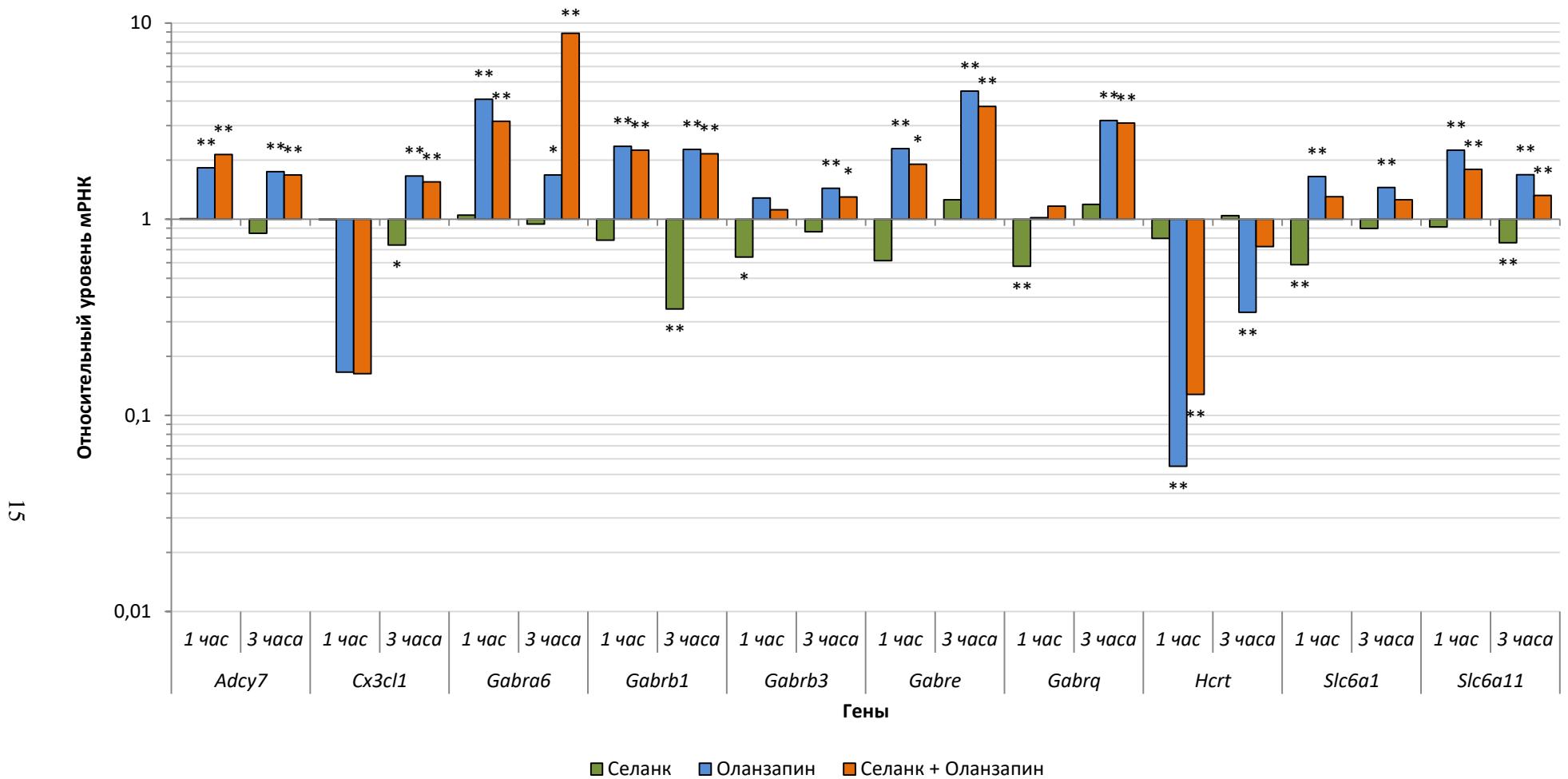
Помимо изменения экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК-рецепторов, также было отмечено изменение уровня мРНК генов, которые кодируют транспортные молекулы, участвующие в переносе различных

нейромедиаторов. Так, было показано, что через 1 ч после введения каждого из исследуемых соединений наблюдалось снижение уровня мРНК четырёх транспортеров: *Slc32a1*, *Slc38a1*, *Slc6a1* и *Slc6a11*. Гены *Slc6a1* и *Slc6a11* кодируют два основных переносчика ГАМК: GAT1 и GAT3, соответственно, которые в зависимости от концентрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  осуществляют удаление ГАМК из синаптической щели и являются основными мишениями действия антikonвульсантов и релаксантов (Madsen et al., 2010). Изменения уровня мРНК данных генов могут быть связаны с оптимизацией работы ГАМКергической системы за счет усиления тормозящего действия ГАМК путём увеличения продолжительности нахождения свободного лиганда в синаптической щели. Действие селанка на экспрессию данных генов позволяет говорить о его способности также влиять на время нахождения ГАМК в синаптической щели, тем самым усиливая тормозные процессы в ЦНС.

**Анализ влияния селанка, оланzapина, диазепама, комбинации селанка и оланzapина, комбинации селанка и диазепама на изменение экспрессии генов *Adcy7*, *Cx3cl1*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb3*, *Gabre*, *Gabrq*, *Hcrt*, *Slc6a1* и *Slc6a11* в лобной коре и гиппокампе крыс**

Для дальнейшего исследования были отобраны 10 генов: *Adcy7* – ген, кодирующий аденилатциклазу 7; *Cx3cl1* – ген, кодирующий фракталкин; *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb3*, *Gabre*, *Gabrq* – гены, кодирующие  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\epsilon$  и  $\theta$ -субъединицы ГАМК<sub>A</sub>-рецептора, соответственно; *Hcrt* – ген, кодирующий предшественник орексинов; и *Slc6a1* и *Slc6a11* – гены переносчиков ГАМК.

Была проведена оценка влияния селанка, оланзапина, являющегося атипичным безодиазапином, и их комбинации на изменение экспрессии данных генов в лобной коре крыс через 1 и 3 ч после однократного введения исследуемых веществ. Было показано, что как через 1, так и через 3 ч после введения селанка наблюдалось исключительно снижение уровня мРНК отобранных генов (Рис. 3). Спустя 1 ч после введения селанка гены *Gabrb3*, *Gabrq* и *Slc6a1* характеризовались снижением экспрессии не более чем в 2 раза по сравнению с контрольной группой. Через 3 ч после введения селанка наиболее выраженное изменение экспрессии было показано для гена *Gabrb1*, уровень мРНК которого снизился в 2,9 раза. Как после введения оланзапина, так и после введения комбинации селанка с оланзапином, все исследуемые гены, за исключением гена *Hcrt*, характеризовались повышением уровня мРНК, при этом для 5 генов (*Adcy7*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabre* и *Slc6a11*) статистически значимое повышение экспрессии наблюдалось как через 1, так и через 3 ч. Наиболее выраженным ростом уровня мРНК (в 8,9 раза) характеризовался ген *Gabra6* через 3 ч после введения комбинации соединений. Для гена *Hcrt* было

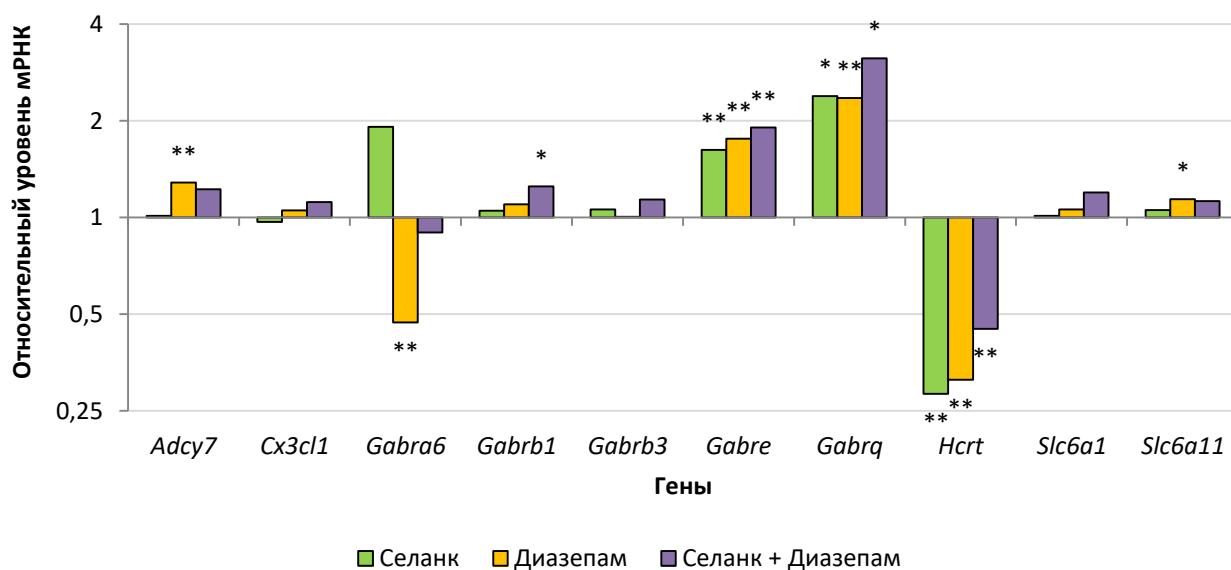


**Рисунок 3.** Относительный уровень мРНК генов *Adcy7*, *Cx3cl1*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb3*, *Gabre*, *Gabrq*, *Hcrt*, *Slc6a1* и *Slc6a11* в лобной коре крыс через 1 и 3 ч после введения селанка, оланзапина и их комбинации. Уровень мРНК генов в контрольной группе принят за единицу. Данные представлены в логарифмической шкале. Статистическая значимость различий с данными контрольной группы обозначена: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

показано существенное снижение уровня мРНК в 16,7 раза через 1 ч после введения оланзапина и в 7,7 раза после введения комбинации соединений. При совместном введении соединений изменения экспрессии практически всех генов становятся менее выраженным, чем после введения только оланзапина.

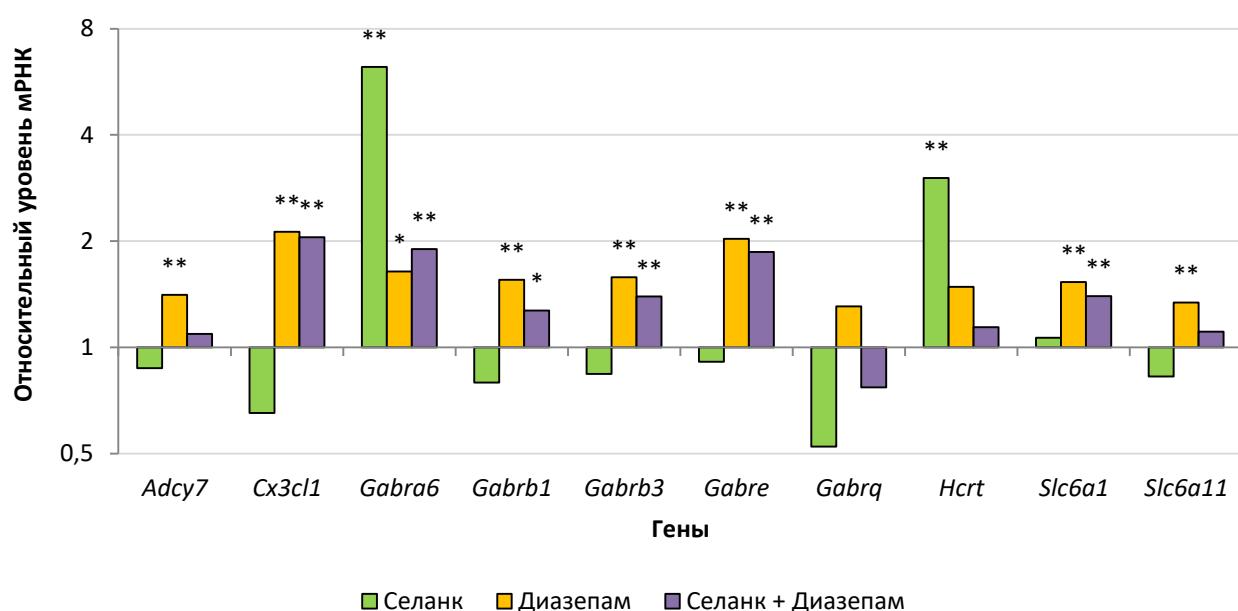
На следующем этапе исследования была проведена оценка влияния курсового введения селанка, диазепама и их комбинации на изменение экспрессии отобранных генов в лобной коре и гиппокампе крыс в условиях ХУНС и при его отсутствии. Анализ изменения уровня мРНК отобранных генов показал, что курсовое введение селанка, диазепама или их комбинации практически не оказали влияния на уровень мРНК исследуемых генов в лобной коре крыс как в отсутствии ХУНС, так и при его наличии. Только для гена *Gabrq* было показано изменение уровня мРНК более чем 1,5 раза: экспрессия данного гена выросла в 1,8 раза в ответ на курсовое введение селанка в условиях ХУНС.

В гиппокампе изменения экспрессии генов, наблюдаемые после курсового введения исследуемых веществ как в отсутствии ХУНС, так и при его наличии, являлись более выраженным по сравнению с изменениями, наблюдаемыми в лобной коре. После курсового введения исследуемых веществ в отсутствии ХУНС наиболее выраженное изменение экспрессии наблюдалось для генов *Gabre*, *Gabrq* и *Hcrt*, экспрессия которых изменилась односторонне после введения каждого из исследуемых соединений (Рис. 4).



**Рисунок 4.** Относительный уровень мРНК исследуемых генов в гиппокампе крыс после курсового введения селанка, диазепама и их комбинации. Уровень мРНК генов в контрольной группе принят за единицу. Данные представлены в логарифмической шкале. Статистическая значимость различий с данными контрольной группы обозначена: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

После курсового введения селанка в условиях ХУНС изменением экспрессии характеризовались только два гена: уровень мРНК гена *Hcrt* вырос в 3 раза, а уровень мРНК гена *Gabra6* – в 6,2 раза (Рис. 5). Изменение уровня мРНК гена *Gabra6* является наиболее выраженным, и, кроме того, данный ген – единственный, экспрессия которого изменилась в ответ на курсовое введение каждого из исследуемых соединений. Помимо гена *Gabra6*, ростом уровня мРНК как после курсового введения диазепама, так и после введения комбинации селанка с диазепамом, характеризовалось еще 5 генов: *Cx3cl1*, *Gabrb1*, *Gabrb3*, *Gabre* и *Slc6a1*, при этом повышение экспрессии более чем в 2 раза наблюдалось только для гена *Cx3cl1*.



**Рисунок 5.** Относительный уровень мРНК исследуемых генов в гиппокампе крыс после курсового введения селанка, диазепама и их комбинаций в условиях ХУНС. Уровень мРНК генов в контрольной группе принят за единицу. Данные представлены в логарифмической шкале. Статистическая значимость различий с данными контрольной группы обозначена: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

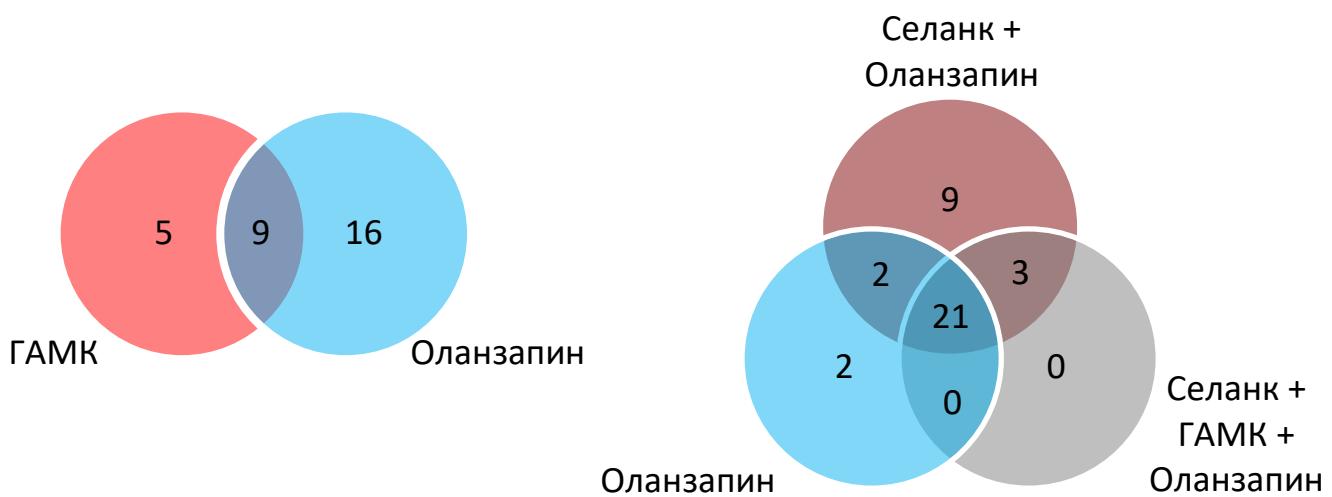
Полученные данные указывают на то, что введение селанка, оланzapина, диазепама и их комбинаций приводит к разнонаправленному изменению уровня мРНК отобранных генов в разных отделах мозга крыс, что может быть связано с длительностью введения исследуемых веществ и с тканеспецифичной экспрессией отобранных генов, а также зависеть от физиологического состояния животного.

## **Анализ влияния селанка, ГАМК, оланzapина и их комбинаций на изменение экспрессии генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, в культуре клеток нейробластомы человека IMR-32**

Для подтверждения гипотезы о способности селанка модулировать работу ГАМКергической системы была проведена оценка изменения экспрессии генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, в культуре клеток нейробластомы человека IMR-32 в ответ на действие селанка, ГАМК, оланzapина и трёх комбинаций данных веществ (селанка и ГАМК; селанка и оланzapина; селанка, ГАМК и оланzapина). Культура клеток нейробластомы IMR-32 была выбрана для исследования в связи с тем, что данные клетки экспрессируют функциональные ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы.

После инкубации клеток IMR-32 с ГАМК наблюдалось изменение экспрессии 14 из 84 исследуемых генов, при этом большая часть (а именно, 11 генов) характеризовалась падением уровня мРНК. Для трех генов было показано повышение уровня мРНК: уровень мРНК гена *GABRG2* вырос в 1,7 раза, в то время как для генов *GABRA5* и *GNAQ* был отмечен рост уровня мРНК в 1,6 раза. Инкубация культуры клеток с оланзапином привела к изменению экспрессии 25 генов, при этом для 21 генов было показано снижение уровня мРНК, особенно выраженное для трех генов – *CSF2* (в 4,5 раза), *FOS* (в 3 раза) и *JUNB* (в 5,3 раза). Для 4 генов (*GABRA5*, *GABRG2*, *GNAQ* и *SNCA*) наблюдалось повышение экспрессии не более чем в 2 раза по сравнению с контрольной линией клеток. Следует отметить, что под действием селанка не было выявлено никаких изменений уровня мРНК исследуемых генов в данной культуре клеток (Рис. 6).

После инкубации клеток IMR-32 одновременно с селанком и ГАМК статистически значимым изменением экспрессии характеризовался только один ген *JUNB*, уровень мРНК которого снизился в 1,7 раза. Тогда как после инкубации культуры клеток с селанком и оланзапином наблюдается изменение уровня мРНК наибольшего количества генов среди всех исследуемых воздействий на данную культуру клеток: было показано статистически значимое изменение экспрессии 35 генов. Снижением уровня мРНК характеризовалось 29 генов, при этом для 10 генов (*ADORA2A*, *CSF2*, *CX3CL1*, *DRD3*, *FOS*, *GABBR1*, *JUNB*, *MMP10*, *NPFFR1* и *SLC32A1*) наблюдалось падение экспрессии в 3 и более раз. Уровень мРНК 6 генов (*BIRC2*, *GABRA5*, *GABRG2*, *GNAQ*, *ODC1* и *SNCA*) вырос в ответ на инкубацию с селанком и оланзапином. Инкубация культуры клеток одновременно с селанком, ГАМК и оланзапином привела к изменению экспрессии 24 генов, из которых 18 генов

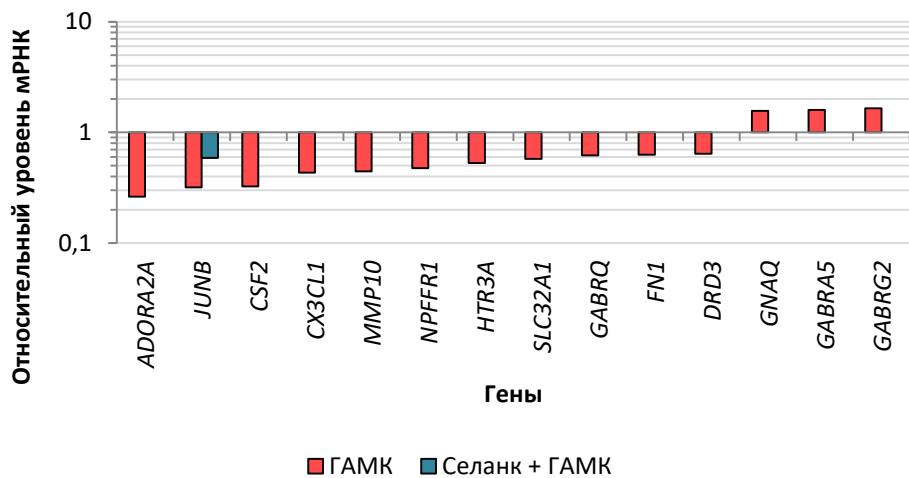


**Рисунок 6.** Соотношение общего количества изменивших экспрессию генов после введения ГАМК или оланzapина (слева), и оланzapина, комбинации селанка и оланzapина или комбинации селанка, ГАМК и оланzapина (справа) (диаграмма Венна). В расчетах использовались только гены со статистически значимым изменением уровня мРНК в 1,5 раза и более.

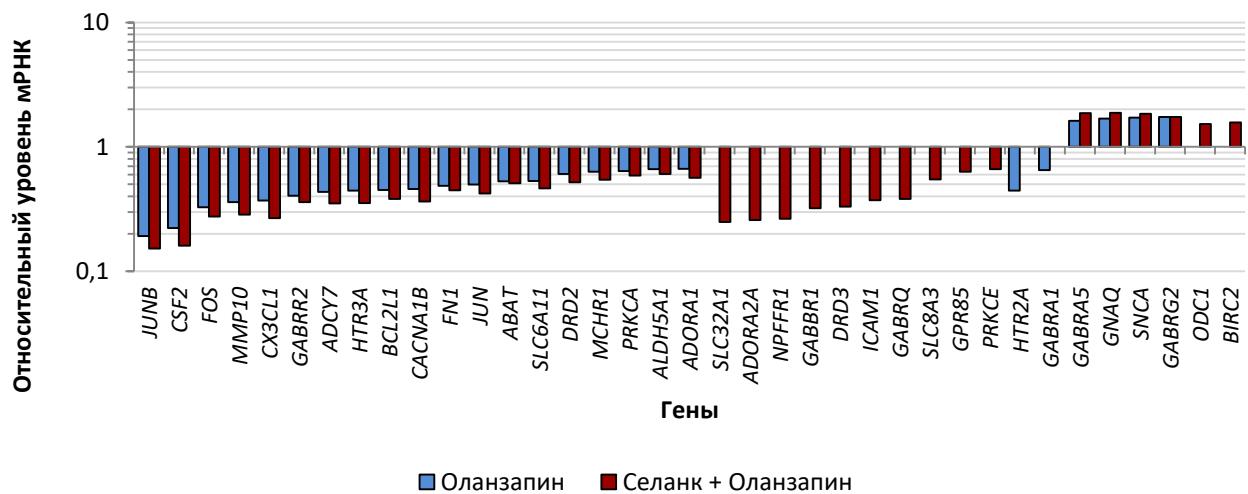
характеризовалось снижением уровня мРНК. Для 6 генов, экспрессия которых выросла после инкубации с селанком и оланзапином, после инкубации с селанком, ГАМК и оланзапином также наблюдалось повышение уровня мРНК.

Известно, что взаимодействие аллостерических модуляторов с ГАМК<sub>A</sub>-рецептором определяется субъединичным составом данного рецептора. В настоящее время субъединичный состав ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, представленных в культуре клеток нейробластомы IMR-32, точно не определен, и на данный момент подтверждена экспрессия только  $\alpha_3$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  и  $\gamma_2$ -субъединиц (Sapp et al., 2000). Можно предположить, что в клетках линии IMR-32 функционируют подтипы ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, разнообразие комбинаций субъединиц в которых сильно ограничено, и, таким образом, отсутствие каких-либо изменений уровня мРНК исследуемых генов после инкубации клеток с селанком может быть обусловлено специфическим субъединичным составом рецепторов, представленных в культуре клеток IMR-32.

Несмотря на то, что под действием селанка не происходит статистически значимого изменения экспрессии исследуемых генов, совместное действие селанка и ГАМК приводит к практически полному подавлению изменений экспрессии генов, изменивших уровень мРНК под действием ГАМК (Рис. 7). В то же время, при применении селанка совместно с оланзапином наблюдается изменение экспрессии большего количества генов, чем после инкубации клеток непосредственно с оланзапином. И, кроме того, изменения уровня мРНК становятся более выраженным (Рис. 8).



**Рисунок 7.** Относительное изменение экспрессии генов в культуре клеток IMR-32 после инкубации с ГАМК и после инкубации с селанком и ГАМК. На рисунке представлены только гены со статистически значимым изменением уровня мРНК в 1,5 раза и более. Уровень мРНК генов в контрольной группе принят за единицу. Данные представлены в логарифмической шкале.



**Рисунок 8.** Относительное изменение экспрессии генов в культуре клеток IMR-32 после инкубации с оланзапином и после инкубации с селанком и оланзапином. На рисунке представлены только гены со статистически значимым изменением уровня мРНК в 1,5 раза и более. Уровень мРНК генов в контрольной группе принят за единицу. Данные представлены в логарифмической шкале.

Таким образом, несмотря на то, что действие селанка в исследуемой культуре клеток, вероятно, опосредовано механизмами, не относящимися к прямому взаимодействию с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, пептид способен влиять на выраженность действия ГАМК и оланзапина на экспрессию исследуемых генов.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В данной работе для выявления новых аспектов противотревожного действия синтетического регуляторного пептида селанка было проведено изучение влияния курсового введения селанка на уровень тревожности крыс, а также проанализировано действие, оказываемое селанком на изменение экспрессии генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, нейрорецепцию и передачу сигналов в нервных клетках, в некоторых тканях мозга крыс и культуре клеток нейробластомы человека IMR-32.

Оценка влияния курсового введения селанка, диазепама и их комбинации на уровень тревожности крыс в условиях ХУНС и при его отсутствии показала, что даже в отсутствии стресса курсовое введение любого из исследуемых веществ привело к увеличению тревожности животных, то есть само по себе являлось легким стрессорным воздействием, однако при введении селанка повышение уровня тревожности являлось наименее выраженным. Также было показано, что в условиях ХУНС наиболее эффективное снижение повышенного уровня тревожности, вызванного стрессовыми воздействиями, наблюдалось при курсовом введении комбинации селанка с диазепамом. Таким образом, выбор оптимальной схемы введения противотревожных средств будет определяться уровнем стрессогенных воздействий, однако селанк в любом случае способен оказывать противотревожное действие: или сам по себе, или в сочетании с известными анксиолитиками.

Анализ изменения уровня мРНК 84 генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, нейрорецепцией и передачей сигналов в нервных клетках, в лобной коре крыс после однократного введения селанка и ГАМК показал, что действие селанка на экспрессию исследуемых генов в лобной коре крыс через час после введения в значительной степени совпадает с действием ГАМК, тогда как спустя 3 часа влияние селанка и ГАМК в большинстве случаев различается. Введение селанка практически не повлияло на уровень мРНК генов, кодирующих наиболее часто встречающиеся субединицы ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, однако привело к изменению экспрессии генов, кодирующих переносчики ГАМК и ионные каналы, а также субединицы, которые входят в состав альтернативных, менее распространенных подтипов ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Наличие схожего действия с ГАМК может говорить о том, что частично механизм действия селанка реализуется через модуляцию работы ГАМКергической системы, однако наличие значительных различий в экспрессии некоторых генов говорит о наличии у селанка оригинального действия, косвенно связанного с работой ГАМКергической системы.

Оценка изменения экспрессии генов *Adcy7*, *Cx3cl1*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb3*, *Gabre*, *Gabrq*, *Hcrt*, *Slc6a1* и *Slc6a11*, отобранных по результатам анализа ПЦР-панели, в лобной коре крыс через 1 и 3 ч после однократного введения селанка, оланzapина и их комбинации, показала, что введение пептида приводит к снижению уровня мРНК генов *Gabrb3*, *Gabrq* и *Slc6a1* (через 1 ч после введения), а также гена *Gabrb1* (через 3 ч после введения). Было отмечено однонаправленное изменение уровня мРНК исследуемых генов после введения оланzapина и комбинации селанка с оланзапином, при этом экспрессия практически всех генов выросла на обоих временных интервалах. Наиболее значительное повышение экспрессии наблюдалось для гена *Gabra6*. Таким образом, влияние селанка на уровень мРНК отобранных генов является невыраженным и отличается от действия, которое оказывают оланзапин и комбинация селанка с оланзапином.

Экспрессионный анализ отобранных генов в лобной коре и гиппокампе крыс после курсового введения селанка, диазепама и их комбинации в условиях ХУНС и при его отсутствии показал, что ни одно из данных соединений не оказалось влияния на уровень мРНК исследуемых генов в лобной коре крыс. Исключением является ген *Gabrq*, экспрессия которого выросла после курсового введения селанка в условиях ХУНС. Изменения экспрессии отобранных генов в гиппокампе являются более выражеными. У животных, которые не подвергались стрессу, уровень мРНК генов *Gabre*, *Gabrq* и *Hcrt*, изменился односторонне после введения каждого из исследуемых соединений. В условиях ХУНС все изменившие экспрессию гены характеризовались ростом уровня мРНК. После курсового введения селанка рост экспрессии наблюдался только для двух генов: *Gabra6* и *Hcrt*. Курсовое введение диазепама и комбинации селанка с диазепамом оказалось более выраженное действие на уровень мРНК отобранных генов, при этом наблюдалось повышение уровня мРНК большинства отобранных генов. Таким образом, при курсовом введении селанка, диазепама и их комбинации выраженность изменений экспрессии отобранных генов носит тканеспецифичный характер, а также зависит от физиологического состояния животного.

При анализе изменений экспрессии 84 генов, вовлеченных в функционирование ГАМКергической системы, в культуре клеток нейробластомы человека IMR-32 после инкубации с селанком, ГАМК, оланзапином и тремя комбинациями данных веществ, под действием селанка каких-либо изменений уровня мРНК исследуемых генов выявлено не было. Кроме того, было показано, что совместное применение селанка с ГАМК привело к изменению уровня мРНК существенно меньшего количества генов,

чем применение только ГАМК, и, наоборот, при инкубации клеток одновременно с селанком и оланзапином наблюдалось изменение экспрессии большего количества генов, чем после инкубации непосредственно с оланзапином. Эти данные позволяют предположить, что, возможно, селанк не оказывает непосредственного действия на экспрессию исследуемых генов из-за субъединичного состава ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, представленных в культуре клеток IMR-32, однако пептид способен влиять на выраженность действия ГАМК и оланзапина на уровень мРНК генов, связанных с работой ГАМКергической системы.

## ВЫВОДЫ

1. В экспрессирующих функциональные ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы клетках линии IMR-32 пептид селанк, в отличие от ГАМК, не оказывает влияния на уровень мРНК генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, нейрорецепцией и передачей сигналов в нервных клетках. Это указывает на отсутствие прямого действия селанка на ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, представленные в данной культуре клеток.

2. В лобной коре мозга крыс интраназальное введение селанка вызывает изменения в экспрессии генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, нейрорецепцией и передачей сигналов в нервных клетках. Действие селанка на уровень мРНК исследуемых генов в лобной коре крыс через 1 ч после однократного введения в значительной степени совпадает с действием ГАМК (коэффициент корреляции 0,86,  $p \leq 0,05$ ), тогда как через 3 ч после однократного введения влияние селанка и ГАМК на экспрессию генов в большинстве случаев не совпадает (коэффициент корреляции -0,39,  $p \leq 0,05$ ).

3. Курсовое введение селанка снижает уровень тревожности крыс, как в условиях минимальных стрессовых воздействий (интраназальное введение пептида), так и в условиях хронического умеренного непредсказуемого стресса. Эффект селанка при хроническом умеренном непредсказуемом стрессе проявляется только при совместном введении с диазепамом.

4. Влияние селанка на экспрессию генов *Adcy7*, *Cx3cl1*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb3*, *Gabre*, *Gabrq*, *Hcrt*, *Slc6a1* и *Slc6a11*, отобранных по результатам анализа ПЦР-панели, в мозге крыс отличается от действия на экспрессию данных генов, оказываемого классическим (диазепам) или атипичным (оланзапин)ベンзодиазепинами, и зависит от физиологического состояния животного (нормальное состояние или состояние хронического умеренного непредсказуемого стресса).

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Публикации в рецензируемых журналах**

1. T. Kolomin, M. Morozova, A. Volkova (A. Kasian), M. Shadrina, L. Andreeva, P. Slominsky, S. Limborska, N. Myasoedov. The temporary dynamics of inflammation-related genes expression under tuftsin analog Selank action. *Molecular Immunology*, 2014, Vol. 58, №1, p. 50–55.
2. A. Volkova (A. Kasian), M. Shadrina, T. Kolomin, L. Andreeva, S. Limborska, N. Myasoedov, P. Slominsky. Selank administration affects the expression of some genes involved in GABAergic neurotransmission. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, Vol. 7, Article 31.
3. A. Kasian (A. Volkova), T. Kolomin, L. Andreeva, E. Bondarenko, N. Myasoedov, P. Slominsky, M. Shadrina. Peptide Selank enhances the effect of diazepam in reducing anxiety in unpredictable chronic mild stress conditions in rats. *Behavioural Neurology*, 2017, Vol. 2017, Article ID 5091027.
4. E. Filatova, A. Kasian (A. Volkova), T. Kolomin, E. Rybalkina, A. Alieva, L. Andreeva, S. Limborska, N. Myasoedov, G. Pavlova, P. Slominsky, M. Shadrina. GABA, Selank, and olanzapine affect the expression of genes involved in GABAergic neurotransmission in IMR-32 cells. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, Vol. 8, Article 89.

### **Тезисы конференций**

1. Волкова А.П. (Касян А.П.), Коломин Т.А., Шадрина М.И., Сломинский П.А., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. Изучение изменений в экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию работы ГАМКергической системы, под действием селанка. Сборник материалов XXVI Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», г. Москва, 10-14 февраля 2014 г., с. 123.
2. Волкова А.П. (Касян А.П.), Коломин Т.А., Шадрина М.И., Сломинский П.А., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. Изучение изменений в экспрессии генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, под действием селанка. Материалы VII Съезда Российского общества медицинских генетиков, г. Санкт-Петербург, 19-23 мая 2015 г. Медицинская генетика, Т. 14, №2 (152), с. 37.
3. Волкова А.П. (Касян А.П.), Коломин Т.А., Шадрина М.И., Сломинский П.А., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. Изучение изменений в экспрессии генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, под действием селанка. Материалы VII Российского симпозиума «Белки и пептиды», г. Новосибирск, 12-17 июля 2015 г., с. 372.

4. Волкова А.П. (Касян А.П.), Коломин Т.А., Шадрина М.И., Сломинский П.А., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. Изучение изменений в экспрессии генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы, под действием селанка. Материалы II Научной конференции «Физиологическая активность регуляторных пептидов», г. Москва, 18 сентября 2015 г., с. 21.

5. Волкова А.П. (Касян А.П.), Шадрина М.И., Коломин Т.А., Андреева Л.А., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф., Сломинский П.А. Влияние селанка на экспрессию генов, связанных с функционированием ГАМКергической системы. Научные труды V Съезда биохимиков России и V Съезда физиологов СНГ, г. Сочи, 4-9 октября 2016 г., том 2, с. 142.

6. Касян А.П. (Волкова А.П.), Коломин Т.А., Андреева Л.А., Бондаренко Е.А., Мясоедов Н.Ф., Сломинский П.А., Шадрина М.И. Пептид селанк усиливает эффект диазепама в снижении тревожности у крыс в условиях хронического умеренного непредсказуемого стресса. Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова, г. Воронеж, 18-22 сентября 2017 г., с. 1132-1133.