

Хемотранскриптомный анализ указывает на нейротрофические и нейромодулирующие эффекты молекулы цитиколина

Торшин И.Ю.^{1,2}, Громова О.А.^{1,2}, Стаховская Л.В.³, Семенов В.А.⁴, Шукин И.А.³

¹Институт фармакоинформатики Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» Российской академии наук, Москва; ²Центр хранения и анализа больших данных Национального центра цифровой экономики ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва; ³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва; ⁴ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, Кемерово
¹Россия, 119333, Москва, ул. Вавилова, 44, корп. 2; ²Россия, 119192, Москва, Ломоносовский проспект, 27, корп. 1; ³Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1; ⁴Россия, 650029, Кемерово, ул. Ворошилова, 22а

Цель исследования — изучить влияние цитиколина (ЦТК) на транскрипцию генов.

Материал и методы. Хемотранскриптомный анализ молекулы ЦТК проводился на модели нейронов линии NPC.TAK при условии инкубации клеток с ЦТК в течение 24 ч.

Результаты и обсуждение. ЦТК дозозависимо влиял на транскрипцию 8838 из 12 716 аннотированных генов человека, преимущественно повышая транскрипцию генов, вовлеченных: 1) в метаболизм нейротрансмиттеров серотонина (n=36), дофамина (n=32), ГАМК (n=14), ацетилхолина (n=27); 2) в осуществление эффектов нейротрофических факторов (n=152), в том числе фактора роста нервов (n=11); 3) в поддержку сердечно-сосудистой системы (вазодилатация и электрическая активность сердца, всего 76 генов). ЦТК снижал транскрипцию генов, активность белков которых поддерживает воспаление (n=86) и деление клеток (n=656). ЦТК повышал экспрессию 60 генов, вовлеченных в переработку триглицеридов, и снижал экспрессию 51 гена, белки которых участвуют в метаболизме холестерина. ЦТК повышал транскрипцию генов, вовлеченных в отклик организма на различные препараты, в том числе противосудорожные препараты (n=20), дофаминергические агенты (n=19), антипсихотики (n=38), анксиолитики (n=21), седативные средства (n=22), антидепрессанты (n=35), анестетики (n=23), препараты для лечения деменции (n=11).

Заключение. Хемотранскриптомный анализ указал на положительное действие ЦТК на нейротрансмиссию, нейропротекцию, липидный профиль и повышение восприимчивости нейронов к действию других нейроактивных препаратов.

Ключевые слова: цитиколин; хемотранскриптомный анализ; нейропротекция; машинное обучение.

Контакты: Ольга Алексеевна Громова; unesco.gromova@gmail.com

Для ссылки: Торшин ИЮ, Громова ОА, Стаховская ЛВ и др. Хемотранскриптомный анализ указывает на нейротрофические и нейромодулирующие эффекты молекулы цитиколина. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2020;12(4):91–99. DOI: 10.14412/2074-2711-2020-4-91-99

Chemotranscriptome analysis indicates the neurotrophic and neuromodulator effects of a citicoline molecule

Torshin I. Yu.^{1,2}, Gromova O. A.^{1,2}, Stakhovskaya L. V.³, Semenov V. A.⁴, Shchukin I. A.³

¹Institute of Pharmacoinformatics, Federal Research Center «Informatics and Management», Russian Academy of Sciences, Moscow;

²Center for Big Data Storage and Analysis, National Center for Digital Economy, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow;

⁴Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russia, Kemerovo

¹44, Vavilov St., Build. 2, Moscow 119333, Russia; ²27, Lomonosovsky Prospect, Build. 1, Moscow 117997, Russia;

³1, Ostrovityanov St., Moscow 117997, Russia; ⁴22a, Voroshilov St., Kemerovo 650029, Russia

Objective: to investigate the effect of citicoline (CTC) on gene transcription.

Material and methods. Chemotranscriptome analysis of the CTC molecule was carried out on an NPC.TAK model, provided that the cells were incubated with CTC for 24 hours.

Results and discussion. CTC dose-dependently affected the transcription of 8,838 out of 12,716 annotated human genes, mainly by increasing the transcription of the genes involved: 1) in the neurotransmitter metabolism of serotonin (n=36), dopamine (n=32), GABA (n=14), and acetylcholine (n=27); 2) in showing the effects of neurotrophic factors (n=152), including nerve growth factor (n=11); 3) in maintaining the cardiovascular system (vasodilation and cardiac electrical activity; a total of 76 genes). CTC reduced the transcription of the genes, whose protein activity supported inflammation (n=86) and cell division (n=656). CTC elevated the expression of 60 genes involved in triglyceride processing and decreased the expression of 51 genes whose proteins were involved in cholesterol metabolism. CTC increased the transcription of the genes involved in the body's response to various drugs, including antiepileptic drugs (n=20), dopaminergic agents (n=19), antipsychotics (n=38), anxiolytics (n=21), sedatives (n=22), antidepressants (n=35), anesthetics (n=23), and anti-dementia drugs (n=11).

Conclusion. Chemotranscriptome analysis indicated the positive effect of CTC on neurotransmission, neuroprotection, lipid profile, and a higher neuronal susceptibility to other neuroactive drugs.

Keywords: citicoline; chemotranscriptome analysis; neuroprotection; machine learning.

Contact: Olga Alekseevna Gromova; unesco.gromova@gmail.com

For reference: Torshin IYu, Gromova OA, Stakhovskaya LV, et al. Chemotranscriptome analysis indicates the neurotrophic and neuromodulator effects of a citicoline molecule. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2020;12(4):91–99. DOI: 10.14412/2074-2711-2020-4-91-99

Цитиколин (ЦТК; цитидин 5'-дифосфохолин; Нейпилепт) относится к фармакологической группе ноотропных препаратов (АТХ N06ВХ06). ЦТК повышает плотность дофаминовых и ацетилхолиновых рецепторов, проявляя, в частности, холинергические свойства [1], способствует профилактике нарушений памяти [2] и, в сочетании с ингибиторами холинэстеразы, тормозит прогрессию деменции альцгеймеровского типа [3]. Долговременное применение ЦТК в виде препаратов для приема внутрь способствует восстановлению и поддержанию когнитивной функции у пациентов в период реабилитации после ишемического инсульта [4]. Биологические эффекты ЦТК обусловлены воздействием на синтез: 1) нейромедиатора ацетилхолина, 2) фосфатидилхолина, необходимого для внутриклеточной передачи сигнала от рецепторов нейротрансмиттеров, 3) S-аденозилметионина, который является донором метильных групп при эпигенетическом метилировании геномной ДНК [5].

С неврологической точки зрения особенно важны эффекты ЦТК в отношении холинергической нейротрансмиссии. Ацетилхолин (рис. 1) – нейротрансмиттер как периферической, так и центральной нервной системы (ЦНС), действие которого осуществляется посредством никотиновых рецепторов (ионных каналов) и мускариновых метаботропных рецепторов. Никотиновые рецепторы ацетилхолина расположены на мышечных клетках, в ЦНС и меняют проницаемость мембраны для ионов Na^+ , K^+ , Cl^- . Мускариновые рецепторы, находящиеся в центральной и периферической нервной системе, миокарде, легких, потовых железах и др., инициируют внутриклеточную передачу сигнала через G-белки. Активация никотиновых и мускариновых ре-

цепторов в ЦНС необходима для нейромодуляции активности синапсов различного типа. Глубокий дефицит ацетилхолина связан с ухудшением работы памяти при болезни Альцгеймера [6]. Посредством активации мускариновых рецепторов M1 в сосудистой системе ацетилхолин и холин повышают уровни оксида азота (NO) в плазме и нитритов в эритроцитах, способствуя вазодилатации [7] и нормализации свертываемости крови. ЦТК и S-аденозилметионин также могут влиять на уровни катехоламинов в крови [8].

Эффекты ацетилхолина, холина и ЦТК осуществляются посредством 48 белков протеома человека, участвующих в метаболизме, транспорте холина и в функционировании системы холинергических рецепторов [5]. Однако фармакологические эффекты любого лекарства зависят не только от воздействия на активность целевых белков в составе протеома (совокупность всех белков организма), но и от воздействия на транскриптом (совокупность всех мРНК транскриптов, синтезируемых в ходе экспрессии генома) [9]. В то же время для подавляющего большинства применяемых лекарственных средств данные об их воздействии на транскриптом отсутствуют.

Транскриптомные исследования ЦТК важны для расширения понимания временных рамок действия лекарства. Большинство лекарств взаимодействуют с конкретными целевыми белками и, модулируя их активность, оказывают непосредственное «тактическое» действие, как правило, достаточно быстрое (минуты или часы). В то же время воздействие препарата на транскрипцию генов обуславливает более долговременные его эффекты (часы или дни). Соответственно, воздействие лекарств на транскрипцию как бы подготавливает клетку к последующей активности посредством привнесения определенных «стратегических» изменений в транскрипцию всего генома.

Транскриптомные исследования лекарств *in vitro* требуют комплекса специального оборудования для анализа экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов, крайней аккуратности в выборе анализируемых клеточных культур [9], обработке получаемых данных, поэтому они весьма дорогостоящи. В то же время в базе данных GEO (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) накоплены результаты более чем 160 тыс. транскриптомных исследований (всего более 50 тыс. терабайт данных). С использованием новейших методов искусственного интеллекта для анализа «сверхбольших данных» (big data) в Институте фармакоинформатики при Федеральном исследовательском центре «Информатика и управление» РАН был разработан метод хемотранскриптомного анализа эффектов молекул [10, 11], основанный на современных методах машинного обучения [12–15].

В настоящей работе представлены результаты хемотранскриптомного исследования дозозависимых эффектов воздействия ЦТК на транскрипцию 12 716 аннотированных генов человека в клетках – предшественниках нейронов (клеточная линия NPC.TAK, стимуляция клеток ЦТК в 6 раз-

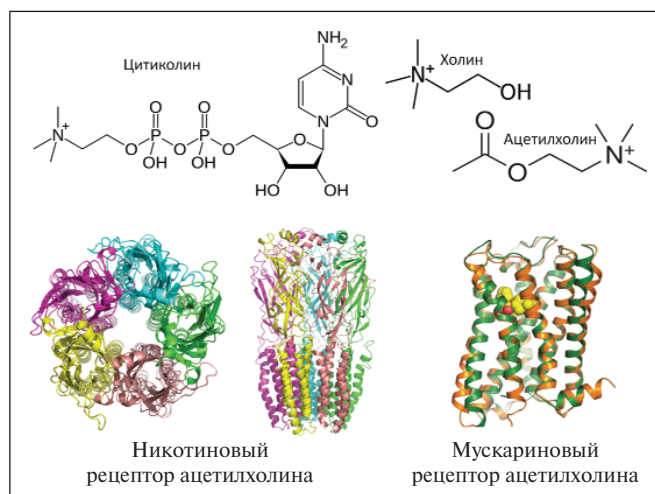


Рис. 1. Химические структуры ЦТК, холина, ацетилхолина и пространственные структуры рецепторов ацетилхолина'

Цветные рисунки к этой статье представлены на сайте журнала: npr.ima-press.net

личных концентрациях в течение 24 ч). В результате проведенного анализа установлены функциональные группы генов и конкретные гены, экспрессия которых дозозависимо и достоверно изменяется под воздействием ЦТК. Таким об-

разом, была получена комплексная картина возможных воздействий молекулы ЦТК на транскриптом человека и найдены новые, ранее неизвестные механизмы нейропротекторного, кардиопротекторного и других эффектов ЦТК.

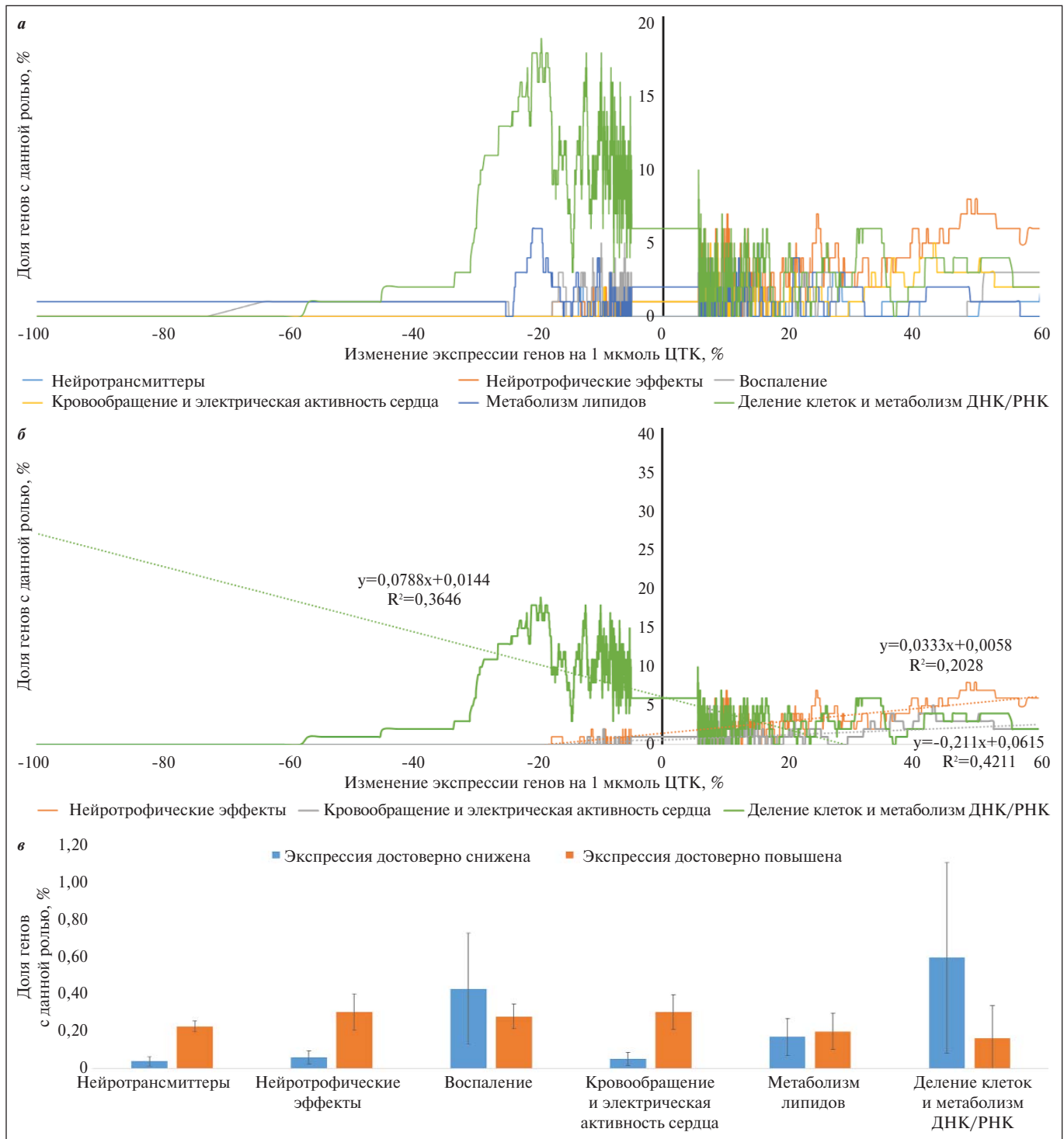


Рис. 2. Частота встречаемости генов каждой из шести функциональных групп, экспрессия которых дозозависимо изменяется при воздействии ЦТК на нейроны NPC. ТАК (по результатам хемотранскриптомного анализа). а – профили частоты встречаемости генов из шести функциональных групп; б – линейные аппроксимации профилей для наиболее выраженных зависимостей. Очевидны тенденции снижения экспрессии генов в группе «Деление клеток и метаболизм ДНК/РНК» и повышения экспрессии генов в группе «Нейротрофические эффекты»; в – попарное сравнение частот встречаемости генов шести функциональных групп

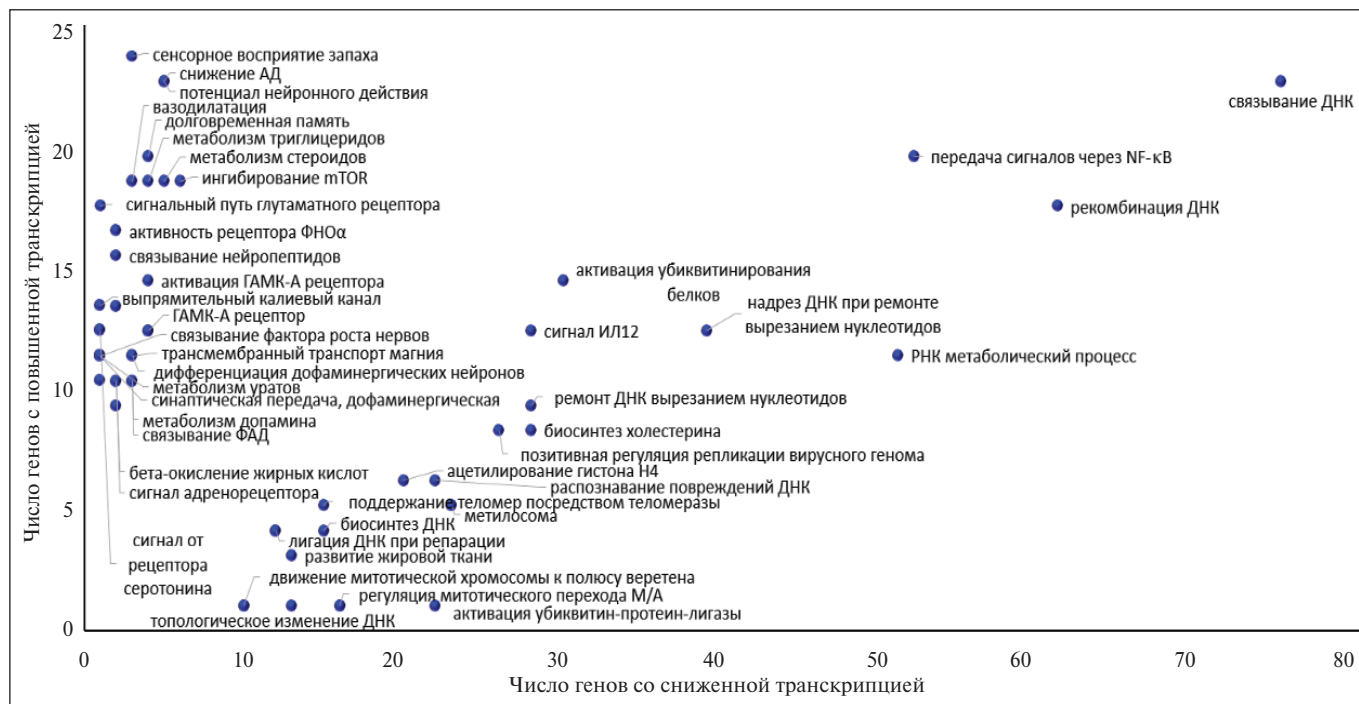


Рис. 3. Функциональные аннотации генов и изменения экспрессии генов, вызываемые ЦТК (действующее вещество препарата Нейпилент; по результатам хемотранскриптомного анализа). Приведены названия функциональных категорий по номенклатуре Gene Ontology (GO). АД – артериальное давление; ФНОα – фактор некроза опухоли α; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; ФАД – флавинадениндинуклеотид; ИЛ12 – интерлейкин 12; NF-κB – ядерный фактор каппа-В

Материал и методы. Результаты транскриптомных экспериментов в базе данных GEO представлены в виде таблиц, столбцам которых соответствуют гены, а строкам – какие-либо воздействия на клетку (например, те или иные молекулы). Элементами таблицы являются изменения экспрессии гена при соответствующем воздействии. Каждой таблице транскриптомного эксперимента сопоставлены: 1) тип клеток, для которых изучались изменения экспрессии, 2) интенсивность воздействия (прежде всего, концентрации

воздействующей молекулы) и 3) время воздействия (6 ч, 12 ч, 24 ч и т. д.). Изменения экспрессии оцениваются относительно контроля (как правило, диметилсульфоксид – ДМСО). Каждый столбец такой таблицы соответствует химической реакции «Ген_i → мРНК_i», в результате которой осуществляется синтез i-й молекулы мРНК_i, соответствующей i-му гену (Ген_i). Соответственно становится возможным применение теории хемографов [12, 13], методологии хемоинформационного [11] и хемореактного анализа [10,

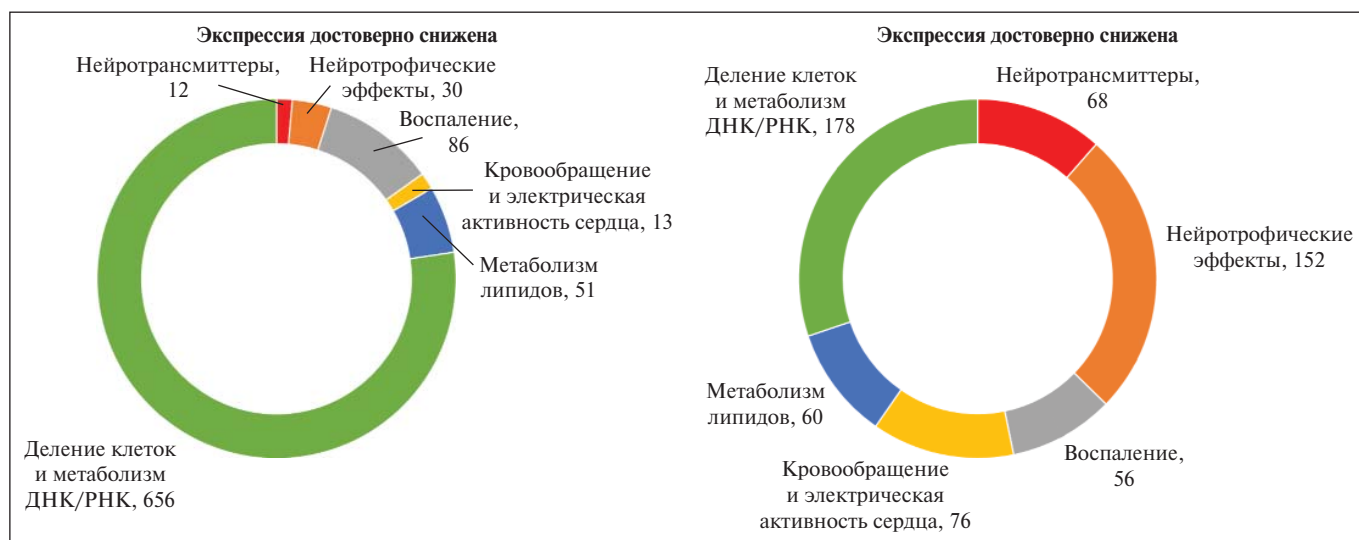


Рис. 4. Соотношения встречаемости функциональных групп генов со сниженной и с повышенной экспрессией при воздействии ЦТК на клетки нейронов линии NPC.TAK, 24 ч (по результатам хемотранскриптомного анализа)

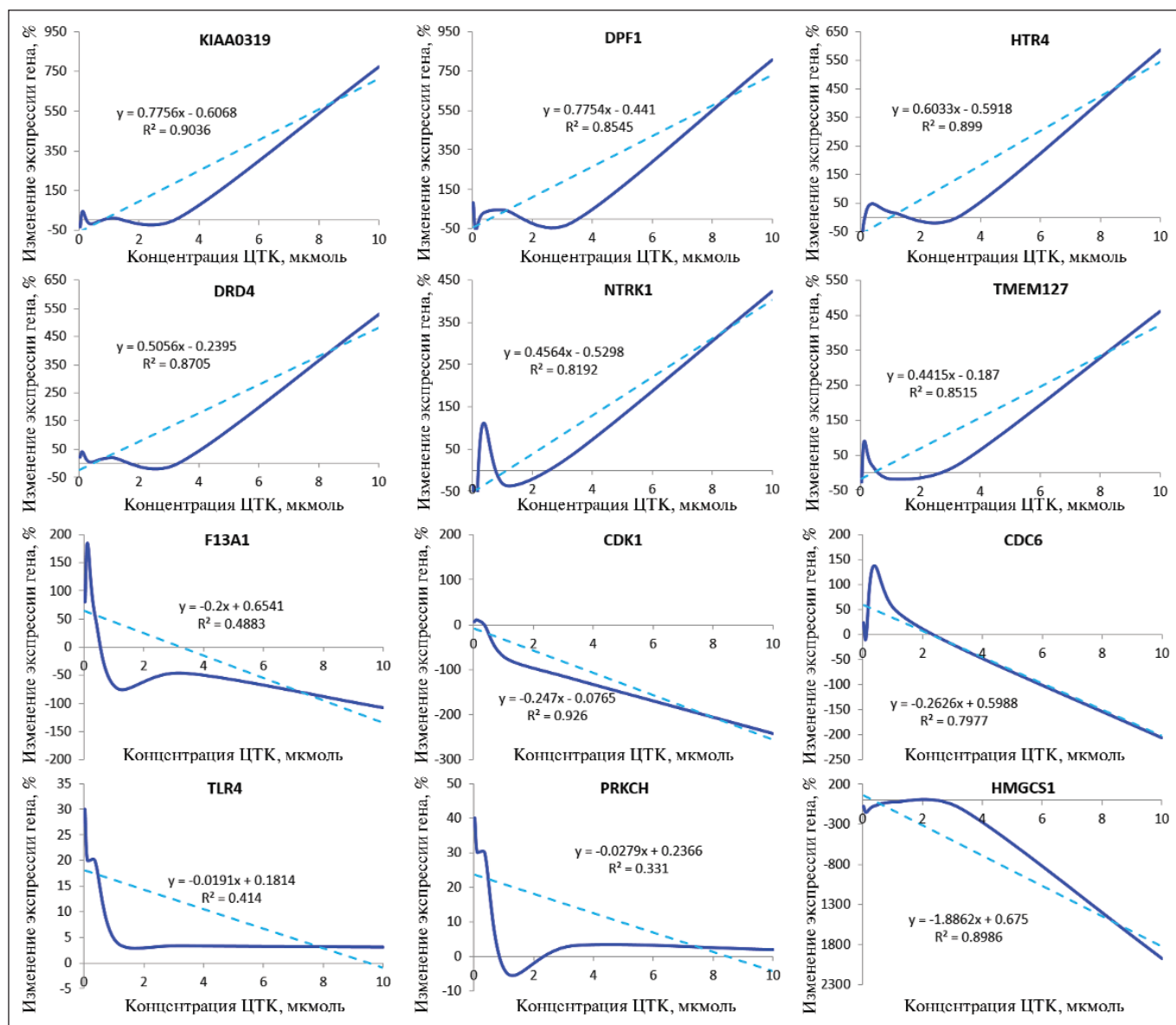


Рис. 5. Примеры дозозависимых изменений транскрипции отдельных генов при воздействии ЦТК

15] для осуществления хемотранскриптомного моделирования. Списки генов с достоверным повышением или снижением экспрессии, которые были получены в результате применения описанного выше хемотранскриптомного подхода, анализировались посредством метода функционального связывания [9].

Результаты. Хемотранскриптомный анализ эффектов молекулы ЦТК на транскриптом нейронов линии NPC.TAK (инкубация в течение 24 ч) показал достоверные дозозависимые эффекты ЦТК на транскрипцию 8838 из 12 700 аннотированных генов человека ($p < 0,05$, коэффициент корреляции $> 0,5$, изменение транскрипции $> 5\%$ на 1 мкмоль ЦТК). При этом экспрессия 6335 генов повысилась (далее мы будем обозначать список этих генов как «Список+»), а 2503 генов – снизилась («Список-»).

Системно-биологический анализ множества 8838 генов указал на комплекс различий в аннотациях генов из этих двух списков. Установлены различия в частоте встреча-

емости: 1) функциональных категорий генов/белков по номенклатуре GO (Gene Ontology); 2) ключевых слов в описаниях генов (данные UNIPROT); 3) небелковых кофакторов; 4) различных видов тканей; 5) элементов реактома (т. е. совокупности всех реакций) нейронов. Эти различия позволили сгруппировать достоверные отличия в транскрипции генов (описываемые 59 категориями GO) в 6 функциональных групп генов: «Нейротрансмиттеры» (изменения транскрипции 80 генов), «Нейротрофические эффекты» (182 гена), «Воспаление» (142 гена), «Кровообращение и электрическая активность сердца» (89 генов), «Метаболизм липидов» (111 генов), «Деление клеток и метаболизм ДНК/РНК» (834 гена). На рис. 2, а отражены профили частот встречаемости генов этих шести функциональных групп в зависимости от количественного изменения экспрессии (в расчете на 1 мкмоль ЦТК).

На рис. 3 отображено число генов, соответствующее 59 функциональным категориям генов. Анализ профилей

частот встречаемости генов шести функциональных групп (см. рис. 2) и данных рис. 3 позволяет утверждать, что ЦТК способствует преимущественному повышению транскрипции генов, вовлеченных: 1) в метаболизм различных нейротрансмиттеров (92 гена); 2) в осуществление эффектов нейротрофических факторов, в том числе фактора роста нервов (ФРН; 152 гена); 3) в поддержку сердечно-сосудистой системы (вазодилатация и электрическая активность сердца, всего 76 генов). ЦТК снижает экспрессию генов, вовлеченных в поддержание воспаления (86 генов) и деление клеток (656 генов).

Таким образом, гены, экспрессия которых дозозависимо повышается при воздействии ЦТК («Список+»), существенно отличаются по своим биологическим функциям от генов, экспрессия которых дозозависимо снижается («Список-»), на что наглядно указывают диаграммы соотношений функциональных групп генов (рис. 4, см. рис. 2). На рис. 5 приведены примеры дозозависимых изменений экспрессии отдельных генов под воздействием ЦТК.

Нами были применены и другие подходы к системно-биологическому анализу двух полученных списков генов с повышенной и со сниженной транскрипцией, которые подтверждают сделанные ранее выводы об общем транскриптомном эффекте ЦТК на нейроны. Например, анализ встречаемости белковых кофакторов показал, что ЦТК способствовал преимущественному повышению экспрессии

генов, кодирующих белки с такими кофакторами, как гем (34 гена; $p=0,04$), флаavin-аденин-динуклеотид (ФАД; 38 генов; $p=0,03$) и ион Mg^{2+} (232 гена; $p=0,046239$), которые играют важную роль в поддержании «клеточного дыхания» нейронов.

Анализ полученных списков генов с учетом данных по реактому (т. е. совокупности всех химических реакций в организме) подтвердил, что ЦТК приводит к повышению экспрессии генов, участвующих в метаболизме нейротрансмиттеров («Нейротрансмиттерные рецепторы и постсинаптическая передача сигнала», «Серотониновые рецепторы», «Дофаминовые рецепторы», « Na^+/Cl^- -зависимые транспортеры нейротрансмиттеров») и снижению экспрессии генов провоспалительного ответа («NIK-передача сигналов NF- κ B», «Передача сигналов ИЛ1», «Передача сигналов тромбосана через рецептор TP») и биосинтеза холестерина.

Крайне интересно отметить, что ЦТК повышал экспрессию генов, вовлеченных в отклик организма на препараты, используемые в неврологии и психиатрии (всего более 100 препаратов; отдельные примеры препаратов приведены в табл. 1). В целом, ЦТК повышал экспрессию генов, с белками которых взаимодействуют противозипелитические препараты (20 генов), дофаминергические агенты (19 генов), антипсихотики (38 генов), анксиолитики (21 ген), седативные средства (22 гена), антидепрессанты (35 генов), анестетики (23 гена), препараты для лече-

ния деменции (11 генов), а также бета-блокаторы (10 генов), антидиабетические средства (16 генов) и др. Повышение транскрипции этих групп генов позволяет предположить, что ЦТК может являться синергистом упоминаемых препаратов: ЦТК повышает экспрессию генов, вовлеченных в механизмы биологического ответа нейронов на препарат.

Анализ патологических состояний, которые формируются при нарушении функционирования генов, регулируемых ЦТК (табл. 2), указывает на дополнительные аспекты действия ЦТК на организм. Перечисленные в табл. 2 патологии (дислипидемия, гипертриглицеридемия, тромбоземболия, аутоиммунная патология, аутизм и др.) ассоциированы со снижением активности соответствующих белков. Если ЦТК повышает экспрессию этих генов, то это соответствует повышению уровней соответствующих белков и может препятствовать развитию данных заболеваний.

Обсуждение. Установленные изменения транскрипции позволяют сделать несколько важных выводов относительно транскриптомных эффектов ЦТК. Во-первых, хемотранскриптомный анализ показал, что ЦТК способствует систематическому повышению транскрипции генов, вовлеченных в метаболизм нейротрансмит-

Таблица 1. *Примеры влияния ЦТК на транскрипцию генов, вовлеченных в отклик организма на различные препараты*

Препарат	ATX	Описание	n+	n-	p
Кодеин	R05DA	Опиатный алкалоид, подавление кашля	8	2	0,057654
Сертиндол	N05AE	Производное индола для терапии шизофрении	10	2	0,020845
Трамадол	N02AX	Опиоид для обезболивания	10	2	0,020845
Дроксидофа	C01CA	Адренергический и дофаминергический агент	10	2	0,020845
Фенилбутазон	M02AA	Ингибитор ЦОГ1/2 для терапии артралгии	8	2	0,057654
Локсапин	N05AH	Диазепин, антагонист D2-дофаминовых рецепторов для терапии невралгии	22	3	0,000142
Леводофа	N04BA	ДОФА, агонист рецептора дофамина D ₃ для терапии болезни Паркинсона	11	1	0,003871
Темазепам	N05CD	Бензодиазепин, снотворное, положительный аллостерический модулятор ГАМК-рецептора	17	5	0,01043
Метарбитал	N03AA	Барбитурат для терапии эпилепсии, положительный аллостерический модулятор ГАМК-рецептора	15	4	0,011538
Палиперидон	N05AX	Антипсихотик для лечения аутизма, антагонист рецептора серотонина 5-HT _{2a}	16	3	0,002834
Топамирамат	N03AX	Противозипелитическое средство, блокатор α -субъединиц Na-канала для терапии ишемии мозга	15	6	0,049296
Вальпроевая кислота	N03AG	Противозипелитическое средство, ингибитор сукцинат полуальдегид дегидрогеназы	19	8	0,034022

Примечание. «n+» – число генов с повышенной транскрипцией; «n-» – число генов со сниженной транскрипцией (здесь и в табл. 2).

теров, в том числе серотонина (36 генов), ГАМК (14 генов), дофамина (32 генов), ацетилхолина (27 генов) и глутамата (17 генов). Снижение транскрипции генов в каждой из этих функциональных подгрупп было гораздо менее выраженным (от 1 до 6 генов).

При этом повышалась экспрессия не только рецепторов соответствующих нейротрансмиттеров, но и других генов, влияющих на процессы нейротрансмиссии: белки, вовлеченные в передачу сигналов, в метаболизм нейротрансмиттера и дифференциацию соответствующего типа нейронов (дофаминергических, серотонинергических и др.). Повышение транскрипции генов, задействованных в поддержании различных видов нейротрансмиссии, весьма важно для терапии деменции, так как при последней отмечается угасание практически всех типов нейротрансмиссии.

На примере генов, участвующих в холинергической нейротрансмиссии, рассмотрим комплексную транскрипционную регуляцию нейротрансмиттерной активности ЦТК. ЦТК повышает экспрессию мускаринового рецептора M5 (ген *CHRM5*, 12,9% на каждый 1 мкмоль ЦТК) и 7 типов субъединиц никотиновых рецепторов ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 9$, γ , δ ; 7–19% на 1 мкмоль), которые осуществляют широкий круг эффектов ацетилхолина в центральной и периферической нервной системе [16]. В то же время ЦТК снижал экспрессию только двух типов субъединиц никотиновых рецепторов ($\alpha 5$ и $\beta 1$, снижение на 8% на каждый 1 мкмоль).

ЦТК **повышал экспрессию генов белков – модуляторов ацетилхолиновой нейротрансмиссии**, в том числе белка ингибитора-3 холинэстеразы (ген *RIC3*; +7,3%) регулирующего экспрессию никотиновых рецепторов $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 3/\beta 2$, $\alpha 3/\beta 4$, $\alpha 4/\beta 2$, $\alpha 4/\beta 4$ на мембранах нейронов, белка CRELD2 (ген *CRELD2*; +11,0%) для транспорта рецептора ацетилхолина типа $\alpha 4/\beta 2$, белков – регуляторов активности никотиновых рецепторов (гены *LYPD1*, *LY6E*, *PSCA*; 6–9% на 1 мкмоль), белков – регуляторов мускариновых рецепторов (гены *RGS10*, *RASGRP2*, *ADCY2*; 9–12%) и белков – регуляторов кластеризации ацетилхолиновых рецепторов на постсинаптических мембранах нейронов (гены *MUSK* – 29%, *AGRN* – 7,6%) [17].

Дополнительно ЦТК **стимулировал повышение экспрессии генов биосинтеза и секреции ацетилхолина**, в том числе холин О-ацетилтрансферазы (ген *CHAT*; +22,3% на 1 мкмоль), катализирующей синтез ацетилхолина из ацетил-кофермента-А и холина в холинергических синапсах, ионного канала 18A3 (ген *SLC18A3*; +6,8%), необходимого для транспорта ацетилхолина в синаптические пузырьки и АДФ-зависимого фактора рибозилирования (ген *ARL2*; +7%), участвующего в кальций-зависимой секреции ацетилхолина [18]. Параллельно снижалась экспрессия гена ацетилхолинэстеразы (ген *ACHE*; -8,2% на 1 мкмоль), которая гидролизует ацетилхолин в синаптической щели, тем самым прекращая холинергическую нейротрансмиссию.

Описанные изменения экспрессии генов, участвующих в холинергической нейротрансмиссии, соответствуют нейропротекции, снижению апоптоза, улучшению мнестической функции (категория ГО «долговременная память» на рис. 3) при воздействии ЦТК. В экспериментах на различных типах клеток в культуре (в частности, на клетках сетчатки глаза в условиях глутаматного стресса) было показано антиапоптотическое и нейропротекторное действие ЦТК [19].

Во-вторых, ЦТК преимущественно **повышает экспрессию 152 генов, вовлеченных в осуществление нейропротекции и эффектов нейротрофических факторов** (прежде всего, ФРН). Например, ЦТК существенно повышает экспрессию основного рецептора ФРН – нейротрофической тирозинкиназы-1 (ген *NTRK1*; +45,6% на 1 мкмоль, см. далее) и ряда других молекул, взаимодействующих с ФРН (всего 11 генов). Кроме того, нейротрофической и нейропротекторной активности ЦТК соответствует повышение транскрипции генов, участвующих в ингибировании сигнального каскада mTOR (18 генов), в поддержке межклеточных контактов нейронов (10 генов) и потенциала действия нейронов (22 гена).

Для нейропротекции, осуществляемой при участии ЦТК, также важно снижение транскрипции 52 генов, вовлеченных в каскад передачи сигналов через провоспалительный фактор NF- κ B. Ингибирование каскада NF- κ B важно для торможения нейровоспаления (англ. neuroinflammation) и является перспективным направлением терапии нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера [20].

В-третьих, ЦТК стимулировал **снижение транскрипции генов, вовлеченных в деление клеток и в метаболизм ДНК/РНК**. Влияние ЦТК на соответствующее множество генов было наиболее масштабным: суммарно установлено изменение транскрипции 834 генов, причем транскрипция 656 из 834 генов достоверно снижалась. Данное множество генов поддерживает весьма широкий круг молекулярно-биологических процессов, взаимосвязанных с делением клеток: регуляция цикла клеточного деления (36 генов), биосинтез и репликация ДНК (более 100 генов в 15 функциональных категориях ГО), ремонт ДНК, в том числе посредством лигации ДНК (12 генов) и др.

Уменьшение экспрессии групп генов, участвующих в клеточном делении, соответствует переходу нейронов в состояние энергосбережения (так как процессы деления клеток весьма энергоемки и на их поддержание расходуется большая часть синтезируемого в клетке аденозинтрифосфата). Очевидно, что режим экономии аденозинтрифосфата способствует повышению энергообеспеченности нейронов в условиях воспалительного или оксидативного стресса. Иначе говоря, ЦТК способствует переходу клеток в состоя-

Таблица 2. Патологические состояния, ассоциированные с нарушениями функции генов, транскрипция которых изменяется под воздействием ЦТК

Патология	n+	n–	p
Дислипидемия	17	1	0,00016
Тромбоэмболия	14	1	0,000782
Автономная невропатия	11	1	0,003871
Тромбоэмболический инсульт	10	1	0,006626
Гипертриглицеридемия	14	4	0,018317
Аутоиммунная патология	44	13	3,83·10 ⁻⁵
Аутизм	23	10	0,023405

ние своего рода «стазиса», при котором выживаемость нейронов повышается.

В-четвертых, ЦТК стимулировал *повышение экспрессии генов различных функциональных групп, которые способствуют кардиопротекции*. К этим группам генов относились выпрямительные калиевые каналы (13 генов), активность которых принципиально важна для поддержания электрической активности сердца, гены белков трансмембранного переноса магния (11 генов), гены, способствующие вазодилатации и нормализации АД (22 гена). ЦТК модулировал экспрессию генов, вовлеченных в метаболизм липидов: повышал экспрессию 60 генов, вовлеченных в переработку триглицеридов, и снижал экспрессию 51 гена, белки которых участвуют в метаболизме холестерина. Описанные изменения экспрессии соответствуют желательным дополнительным эффектам ЦТК, которые могут быть весьма полезны в терапии коморбидной сердечно-сосудистой патологии (в первую очередь ишемической болезни сердца).

Приведенные на рис. 5 примеры иллюстрируют прежде всего транскриптомные механизмы нейротрофического, нейромодуляторного и нейропротекторного действия ЦТК. Например, ЦТК способствует повышению экспрессии гена *NTRK1* (+45,6% на 1 мкмоль), кодирующего нейротрофическую тирозинкиназу-1 TgkA — основной рецептор ФРН и нейротрофина-3, который поддерживает рост аксонов. Активируя TgkA, ФРН участвует в развитии и созревании центральной и периферической нервной системы посредством регуляции дифференцировки и выживания симпатических и центральных нейронов.

Нейромодуляторные эффекты ЦТК осуществляются, в частности, посредством повышения транскрипции гена *HTR4* (+60,3% на 1 мкмоль), кодирующего рецептор-4 серотонина, активность которого опосредуется G-белками, стимулирующими аденилатциклазу [21]. Повышение экспрессии гена *DRD4* (+50,6% на 1 мкмоль), кодирующего дофаминовый рецептор D4, важно для нейротрансмиссии в мезолимбической системе мозга, регулирующей эмоции и сложное поведение.

Для нейропротекции также важно снижение экспрессии генов воспалительного ответа. Снижение экспрессии гена *TLR4* (-63,8% на 1 мкмоль), кодирующего толл-подобный рецептор 4, тормозит активацию NF-κB, секрецию провоспалительных цитокинов и воспалительные реакции, запускаемые свободными жирными кислотами (пальмитат и др.). Снижение экспрессии гена *PRKCH*

(-72,7% на 1 мкмоль) протеинкиназы Cη важно для ингибирования сигнальных путей mTOR и NF-κB [22].

Нейропротекторное действие ЦТК на уровне транскриптома также может осуществляться посредством ингибирования экспрессии генов, кодирующих прокоагулянтные и проатеросклеротические белки. Например, ингибирование ЦТК транскрипции гена *HMGCS1* (-188,6% на 1 мкмоль) будет приводить к снижению уровней 3-гидрокси-3-метилглютарил-CoA-синтазы-1. Данный фермент участвует в метаболическом пути синтеза холестерина и является целевым белком статиновых препаратов.

Таким образом, хемотранскриптомный анализ ЦТК указал на характерные изменения транскрипции генов, способствующие нейропротекторному и нейротрофическому эффектам, повышению активности холинергической, серотонинергической, дофаминергической и других видов нейротрансмиссии, энергосбережению, противовоспалительному действию и кардиопротекции.

Заключение. В проведенном хемотранскриптомном исследовании установлены дозозависимые эффекты ЦТК на транскрипцию 8838 генов в нейронах линии NPC.TAK (инкубация клеток в течение 24 ч). Наиболее важным результатом исследования является то, что ЦТК повышал транскрипцию генов, важных для поддержки нейротрансмиссивной активности (ацетилхолин — 27 генов, серотонин — 36 генов, дофамин — 32 генов) и активности нейротрофических факторов (152 гена), в том числе ФРН. Стоит отметить, что ЦТК способствует повышению транскрипции генов, вовлеченных в процессы вазодилатации и поддержку электрической активности кардиомиоцитов (76 генов).

Важным результатом хемотранскриптомного анализа является повышение ЦТК транскрипции генов, вовлеченных в отклик организма на различные препараты, включая противоэпилептические препараты (20 генов), дофаминергические агенты (19 генов), антипсихотики (38 генов), анксиолитики (21 ген), седативные средства (22 гена), антидепрессанты (35 генов), анестетики (23 гена), препараты для лечения деменции (11 генов) и др.

Установленные транскриптомные эффекты позволяют утверждать, что ЦТК может использоваться как важный компонент адьювантной терапии в неврологии, в том числе для повышения восприимчивости нейронов к действию ряда лекарств. Последнее может позволить снизить дозировку «тяжелых» фармакологических средств и повысить безопасность фармакотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gimenez R, Raich J, Aguilar J. Changes in brain striatum dopamine and acetylcholine receptors induced by chronic CDP-choline treatment of aging mice. *Br J Pharmacol*. 1991 Nov;104(3):575-8. doi: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb12471.x
- Teather LA, Wurtman RJ. Dietary CDP-choline supplementation prevents memory impairment caused by impoverished environmental conditions in rats. *Learn Mem*. 2005 Jan-Feb;12(1):39-43. doi: 10.1101/lm.83905. Epub 2005 Jan 12.
- Gareri P, Castagna A, Cotroneo AM, et al. The Citicholinage Study: Citicoline Plus Cholinesterase Inhibitors in Aged Patients Affected with Alzheimer's Disease Study. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(2):557-65. doi: 10.3233/JAD-160808
- Alvarez-Sabin J, Ortega G, Jacas C, et al. Long-term treatment with citicoline may improve poststroke vascular cognitive impairment. *Cerebrovasc Dis*. 2013;35(2):146-54. doi: 10.1159/000346602. Epub 2013 Feb 7.
- Торшин ИЮ, Громова ОА. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. Москва: МЦНМО; 2012. 748 с. ISBN 978-5-4439-0051-3
- [Torshin IYu, Gromova OA. *Ekspertnyy analiz dannyykh v molekulyarnoy farmakologii* [Expert data analysis in molecular pharmacology]. Moscow: MTsNMO; 2012. 748 p. ISBN 978-5-4439-0051-3 (In Russ.).]
- Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology. 9th ed. McGraw-Hill Medical; 2003. ISBN 0-07-141092-9
- Carvalho FA, Mesquita R, Martins-Silva J, Saldanha C. Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels. *J Appl Toxicol*. 2004;24(6):419-27. doi: 10.1002/jat.993

8. Cansev M, Yilmaz MS, Ilcol YO, et al. Cardiovascular effects of CDP-choline and its metabolites: involvement of peripheral autonomic nervous system. *Eur J Pharmacol.* 2007;577(1-3):129-42. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.08.029
9. Torshin IYu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. NY (USA): Nova Biomedical Books; 2009. In «Bioinformatics in the Post-Genomic Era» series. ISBN 1-60692-217-0
10. Торшин ИЮ, Громова ОА, Наумов АВ, Ли́ла АМ. Хемотранскриптомный анализ молекулы глюкозамина сульфата в контексте постгеномной фармакологии. *РМЖ.* 2019;1(1):2-9. [Torshin IYu, Gromova OA, Naumov AV, Lila AM. Chemical transcriptome analysis of glucosamine sulfate molecule in the context of post-genomic pharmacology. *RMJ.* 2019;1(1):2-9 (In Russ.)].
11. Торшин ИЮ, Громова ОА, Фролова ДЕ и др. Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках-предшественниках нейронов прс и в опухолевых клетках MCF7 человека. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2018;(2):35-51. doi: 10.24411/2587-7836-2018-10013 [Torshin IYu, Gromova OA, Frolova DE, et al. Dose-dependent chemotranscriptomics analysis of the differential effects of vitamin D3 on gene expression in human neuronal progenitor cells NPC and in MCF7 tumor cells. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2018;(2):35-51. doi: 10.24411/2587-7836-2018-10013 (In Russ.)].
12. Torshin IYu, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. Part 1: Fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. *Pattern Recognit Image Anal.* 2014;24(1):11-23. doi: 10.1134/S1054661814010209
13. Torshin IYu, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. Part 2: Local completeness of invariants of chemographs in view of the combinatorial theory of solvability. *Pattern Recognit Image Anal.* 2014;24(2):196-208. doi: 10.1134/S1054661814020151
14. Torshin IYu. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. *Pattern Recognit Image Anal.* 2011;21(4):652-62. doi: 10.1134/S1054661811040171
15. Torshin IYu, Rudakov KV. On the procedures of generation of numerical features over partitions of sets of objects in the problem of predicting numerical target variables. *Pattern Recognit Image Anal.* 2019;29(4):654-67. doi: 10.1134/S1054661819040175
16. Shen XM, Okuno T, Milone M, et al. Mutations causing slow-channel myasthenia reveal that a valine ring in the channel pore of muscle AChR is optimized for stabilizing channel gating. *Hum Mutat.* 2016 Oct;37(10):1051-9. doi: 10.1002/humu.23043. Epub 2016 Aug 21.
17. Tan-Sindhunata MB, Mathijssen IB, Smit M, et al. Identification of a Dutch founder mutation in MUSK causing fetal akinesia deformation sequence. *Eur J Hum Genet.* 2015 Sep;23(9):1151-7. doi: 10.1038/ejhg.2014.273
18. Tian G, Thomas S, Cowan NJ. Effect of TBCD and its regulatory interactor Arl2 on tubulin and microtubule integrity. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2010 Nov;67(11):706-14. doi: 10.1002/cm.20480
19. Davinelli S, Chiosi F, Di Marco R, et al. Cytoprotective effects of citicoline and homotaurine against glutamate and high glucose neurotoxicity in primary cultured retinal cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:2825703. doi: 10.1155/2017/2825703. Epub 2017 Oct 15.
20. Jha NK, Jha SK, Kar R, et al. Nuclear factor-kappa β as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2019 Jul;150(2):113-37. doi: 10.1111/jnc.14687
21. Brattelid T, Kvingedal AM, Krobert KA, et al. Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT4 receptor splice variant, 5-HT4(i). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 Jun;369(6):616-28. doi: 10.1007/s00210-004-0919-4. Epub 2004 Apr 30.
22. Lee HK, Yeo S, Kim JS, et al. Protein kinase C- η and phospholipase D2 pathway regulates foam cell formation via regulator of G protein signaling 2. *Mol Pharmacol.* 2010 Sep;78(3):478-85. doi: 10.1124/mol.110.064394. Epub 2010 Jun 17.

Поступила/отрецензирована/принята к печати
Received/Reviewed/Accepted
17.05.2020/30.06.2020/8.07.2020

Заявление о конфликте интересов

Исследование выполнено по теме грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 20-07-00537 и № 19-07-00356. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

Торшин И.Ю. <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>
Громова О.А. <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>
Стаховская Л.В. <https://orcid.org/0000-0001-6325-923>

Conflict of Interest Statement

The investigation has been conducted under Russian Foundation for Basic Research Grants No. 20-07-00537 and No. 19-07-00356. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Семенов В.А. <https://orcid.org/0000-0001-8968-7459>
Шукин И.А. <https://orcid.org/0000-0002-6308-9706>