

ПРЕДСКАЗАНИЕ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ АЛКОГОЛИЗМА ПУТЕМ ОБОГАЩЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ДАННЫМИ RNA-SEQ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

М.И. Айрапетов^{1,2}, С.О. Ереско^{1*}, П.Д. Шабанов¹¹Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;

*e-mail: eresco.sergei@yandex.ru

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, 194044, Санкт-Петербург, улица Академика Лебедева, 6Ж

Цель работы заключалась в предсказании мишеней для фармакологической коррекции алкоголизма путем обогащения биологических процессов транскрипционными данными постмортального материала дорсолатеральной префронтальной коры человека. Проанализированы данные RNA-seq 96 пациентов из открытой базы данных GEO. Дифференциальный анализ экспрессии выполнен методом DESeq2. Обогащение биологических процессов выполнено методом GSEA по базе данных GO:BP. Для идентификации фармакологических агентов применён анализ Connectivity Map. Был обнаружен 61 значимо дифференциально экспрессированный ген. Использование GSEA позволило выявить взаимосвязь изменений в экспрессии генов с биологическими процессами в организме. Анализ Connectivity Map идентифицировал три класса фармакологических агентов с потенциальным эффектом, корректирующим предсказанные изменения: ингибиторы JAK-киназ, ингибиторы АТФазы и антагонисты хемокиновых рецепторов.

Ключевые слова: хроническая алкогольная интоксикация; DLPFC; RNA-seq; DESeq2; GSEA; GO:BP; Connectivity Map; нейровоспаление; JAK-киназы

DOI: 10.18097/BMCRM00332

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ) – распространенная причина нейropsychиатрических расстройств [1-3]. Хроническое воздействие этанола индуцирует стойкие структурные и функциональные изменения в дорсолатеральной префронтальной коре (лат. *Dorsolateral prefrontal cortex*, DLPFC) – области мозга, ответственной за исполнительные функции, рабочую память и когнитивный контроль над импульсивным поведением [1-3]. Клинически эти изменения проявляются снижением когнитивной гибкости, нарушением рабочей памяти и ослаблением способности подавлять компульсивное поведение, связанное с непреодолимым желанием употребить алкогольную продукцию [1-4].

Одной из причин этой патологии является нейровоспаление, опосредованное активацией системы врождённого иммунитета [5-6]. Высвобождение аларминов, активация Toll-подобных рецепторов и повышение активности инфламмосомы NLRP3 (англ. *NLR family pyrin domain containing 3*) формируют самоподдерживающийся провоспалительный каскад, способствующий прогрессированию расстройства [7]. Параллельно нарушается целостность гематоэнцефалического барьера, что облегчает проникновение провоспалительных медиаторов из периферии [8].

Транскриптомный анализ постмортальной мозговой ткани является одним из инструментов изучения механизмов

нейropsychиатрических расстройств, позволяя оценивать изменения в мозге человека [9]. Недавно опубликованный датасет GSE253155, включающий 96 образцов DLPFC, предоставляет возможность для статистически мощного анализа и для решения новых фармакологических задач методами *in silico* анализа [10].

Цель данной работы заключалась в предсказании возможных мишеней для фармакологической коррекции алкоголизма путем обогащения биологических процессов транскрипционными данными из датасета GSE253155.

МЕТОДИКА

Источник данных

Использованы публично доступные данные из базы GEO (GSE253155) [10]. Датасет включал образцы bulk RNA-seq постмортальной ткани DLPFC от 96 пациентов: 48 с диагнозом «Расстройства, вызванные употреблением алкоголя» (англ. «*Alcohol use disorder*», AUD») по критериям DSM-5 и 48 контрольных образцов от пациентов без психиатрических расстройств. Для каждого образца доступны метаданные: возраст на момент смерти, постмортальный интервал (англ. *Post-Mortem Interval*, PMI), индекс целостности РНК (англ. *RNA Integrity Number*, RIN), пол, статус курения и наличие большого депрессивного расстройства.



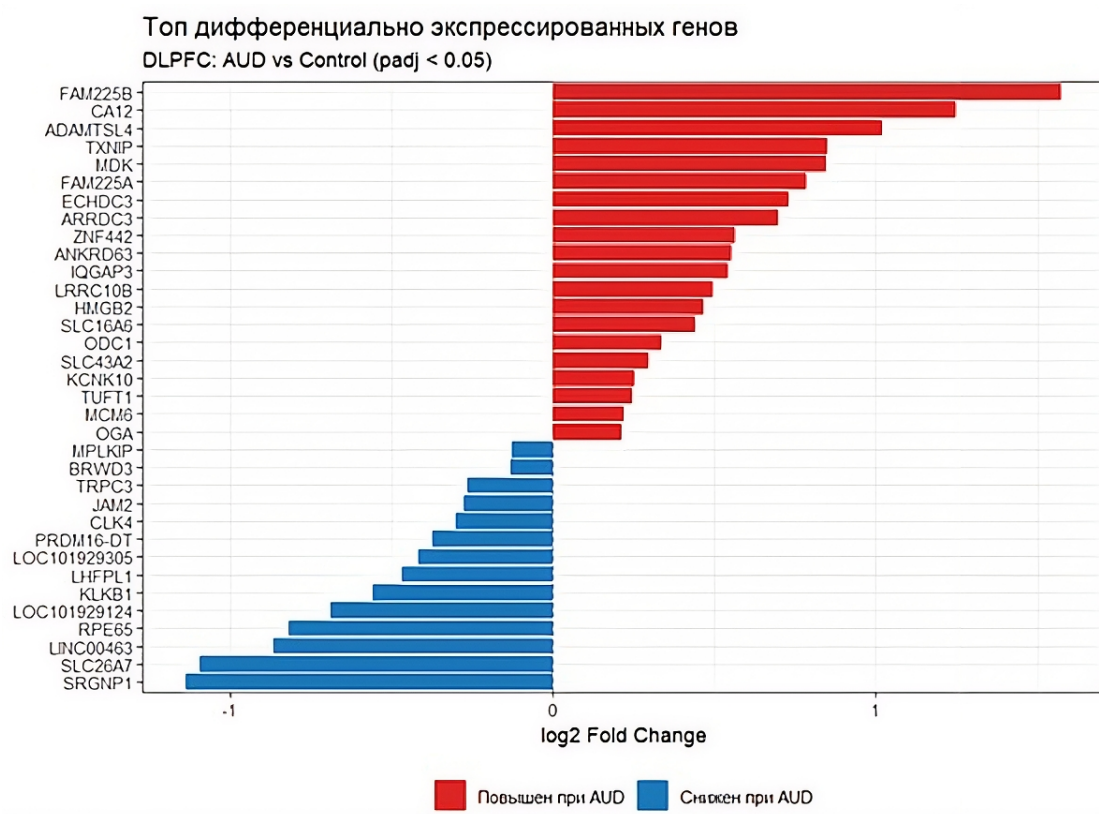


Рисунок 1. Топ дифференциально экспрессированных генов.

Предобработка

Анализ выполнен в среде R (v4.3). Метаданные образцов извлечены из файла серийной матрицы GSE253155_series_matrix.txt с использованием пакета GEOquery (v2.66). Матрица счётчиков загружена из файла counts.txt, содержащего необработанные значения числа ридов, картированных на каждый ген. Для корректного сопоставления идентификаторов образцов между матрицей счётчиков и метаданными выполнено очищение имён колонок от технических суффиксов. Итоговая выборка составила 96 образцов DLPFC. Предварительная фильтрация генов выполнена по порогу суммарного числа счётчиков: исключены гены с суммарным значением менее 10. После фильтрации осталось 25220 генов из исходных 38740.

Анализ дифференциальной экспрессии генов

Применён пакет DESeq2 (v1.38), основанный на модели отрицательного биномиального распределения, которая корректно описывает статистические свойства данных RNA-seq [11]. Нормализация счётчиков выполнена методом медианы отношений; оценка дисперсии – с применением эмпирического байесовского подхода. Дизайн модели включал статус AUD как основную переменную интереса и четыре ковариаты: пол, возраст на момент смерти, PMI и RIN. Включение данных ковариат обусловлено известным влиянием биологических и технических факторов на транскриптом постмортальной мозговой ткани. Статистическую значимость оценивали тестом Вальда; для коррекции на множественные сравнения применена процедура Бенджамини–Хохберга

(порог padj<0.05). Аннотация идентификаторов генов в формате Ensembl выполнена с помощью пакета org.Hs.eg.db.

Анализ обогащения биологических процессов

Применён метод GSEA (англ. *Gene Set Enrichment Analysis*) с использованием пакета clusterProfiler (v4.6) [12]. В качестве входного ранжированного списка использован полный набор генов, упорядоченных по убыванию статистики Вальда из DESeq2, которая учитывает одновременно как величину изменения экспрессии, так и его статистическую надёжность. Анализ проведён по базе данных GO:BP (Gene Ontology: Biological Process). Параметры анализа: минимальный размер генного набора – 10, максимальный – 500, метод коррекции – процедура Бенджамини–Хохберга, порог padj<0.05.

Анализ Connectivity Map (CMap анализ)

Транскриптомная сигнатура AUD, сформированная из 61 значимо дифференциально экспрессированного гена, была загружена в базу данных CLUE CMAP [13] с использованием пакета cmapR («Bioconductor»). Расчет нормализованного показателя связности (NCS) был выполнен на основе алгоритма сопоставления паттернов (pattern-matching), использующего модифицированную статистику обогащения (аналогичную GSEA), которая оценивает степень реверсии профиля экспрессии [13]. Отрицательные значения NCS указывают на потенциальное обращение сигнатуры AUD. Статистически значимыми считали классы с FDR<0.05 (англ. *False Discovery Rate*, FDR).

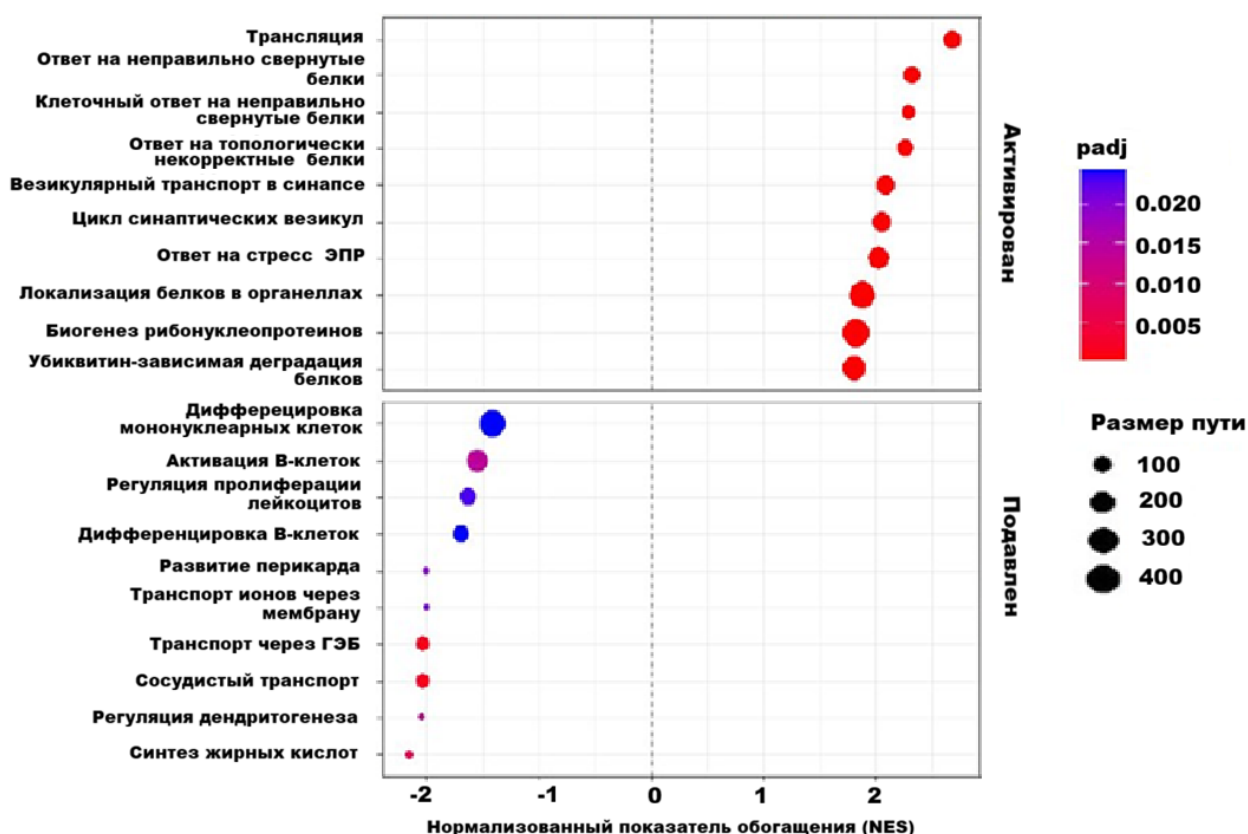


Рисунок 2. Результаты анализа по обогащению биологических процессов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ дифференциальной экспрессии генов

По результатам анализа 96 образцов DLPFC выявлен 61 значимо дифференциально экспрессированный ген (40 повышены, 21 снижен при AUD, $\text{padj} < 0.05$) (рис. 1). Распределение fold change умеренное ($|\log_2\text{FC}| < 3$), что типично для массового секвенирования PKN (bulk RNA-seq) постмортальной мозговой ткани.

Среди генов с повышенной экспрессией при AUD наибольшую статистическую значимость показали *Hmgb2* (*High-mobility group protein B2*) – ген ядерного белка-алармина, при высвобождении активирующего рецепторы врожденного иммунитета TLR4 (*Toll-like receptor 4*) и RAGE (*Receptor for advanced glycation end products*), а также *Txnip* (*Thioredoxin-binding protein*) – ген белка-ингибитора тиоредоксиновой антиоксидантной системы, активирующего инфламасому NLRP3 с последующим процессингом IL-1 β . Среди других значимо повышенных генов выявлены *arrdc3*, *cal2*, *odc1*. Среди генов со сниженной экспрессией наибольшую значимость показал *Jam2* (*Junctional adhesion molecule 2*) – ген белка плотных межклеточных контактов эндотелия, снижение экспрессии которого указывает на повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера. Также значимо снижена экспрессия генов *Clk4*, *Brwd3* и *Klkb1*.

Анализ обогащения биологических процессов

Применение метода GSEA позволило выявить значимое обогащение для ряда активированных и подавленных биологических процессов (рис. 2). Среди активированных

механизмов при AUD: цитоплазматическая трансляция (NES=2.68), ответ на неправильно свёрнутые белки (NES=2.43), стресс эндоплазматического ретикулума (NES=2.21), убиквитин-зависимая деградация белков и цикл синаптических везикул. По базе GO:BP активированы механизмы функционирования протеасом, митофагия, процессы нейродегенеративных заболеваний. Среди подавленных: транспорт через гематоэнцефалический барьер (NES=-2.18) и молекулярные механизмы развития дендритов (NES=-1.94).

СMap анализ

После фильтрации по $\text{FDR} < 0.05$ выявлено четыре значимых класса фармакологических агентов (табл. 1). Три класса с отрицательными значениями NCS потенциально обращают транскриптомную сигнатуру AUD: ингибиторы JAK-киназ (NCS=-2.23), ингибиторы АТФазы (NCS=-2.13) и антагонисты рецепторов хемокинов (NCS=-1.99). Ингибиторы белков теплового шока показали положительный NCS (+2.06),

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ интеграции транскриптомных данных при AUD в DLPFC с обогащением сведений по биологическим процессам позволил выделить участие трех важных молекулярных механизмов, которые могут быть изменены при AUD в DLPFC – активация путей нейровоспаления, протеотоксический стресс и нарушение барьерной функции мозга. Повышение экспрессии гена *Hmgb2* согласуется с данными о роли аларминовой сигнализации при AUD [5-7] – высвобождаясь из поврежденных клеток,

Таблица 1. Фармакологические классы препаратов по результатам анализа Connectivity Map.

Класс препаратов	NCS*	FDR**
Ингибиторы JAK-киназ	-2.23	<0.05
Ингибиторы АТФазы	-2.13	<0.05
Антагонисты рецепторов хемокинов	-1.99	<0.05
Ингибиторы белков теплового шока	+2.06	<0.05

Примечание. *NCS -Normalized connectivity score, нормализованный показатель связности. **FDR-False Discovery Rate, доля ложноположительных результатов.

HMGB2 связывается с TLR4 и RAGE, запуская NF-κB-опосредованный провоспалительный каскад. Повышение TXNIP, в свою очередь, активирует инфламасому NLRP3, замыкая петлю оксидативного стресса и нейровоспаления. Снижение JAM2 подтверждает концепцию нарушения гематоэнцефалического барьера при AUD [8], создавая условия для проникновения периферических провоспалительных медиаторов в паренхиму мозга. Примечательно, что классические маркеры TLR-сигналинга (TLR4, HMGB1, IL1B) не достигли индивидуальной статистической значимости. Это, по-видимому, объясняется клеточной гетерогенностью массового секвенирования РНК: микроглия, в которой преимущественно реализуется TLR-сигналинг, составляет менее 10% клеток DLPFC, и её сигнал размывается в общем транскриптом. Тем не менее на уровне биологических процессов метод GSEA выявил активацию иммунных каскадов, что косвенно подтверждает вовлечённость врождённого иммунитета. Активация протеасомных путей и стресса эндоплазматического ретикулаума, выявленная GSEA, согласуется с данными о накоплении повреждённых белков при хроническом воздействии алкоголя [14]. Перекрытие с процессами развития нейродегенеративных заболеваний (болезни Паркинсона и Альцгеймера) может указывать на общность молекулярных механизмов повреждения нейронов.

Среди фармакологических мишеней наибольший интерес представляют ингибиторы JAK-киназ с NCS=-2.23. Препараты этого класса блокирует JAK-STAT сигнализацию – ключевой путь передачи сигналов от провоспалительных цитокинов [15]. Существующие препараты (руксолитиниб, барицитиниб) одобрены для терапии аутоиммунных заболеваний и могут представлять интерес для репозиционирования при AUD. Антагонисты хемокиновых рецепторов (NCS=-1.99) также перспективны с учётом роли хемокиновой сигнализации в рекрутировании иммунных клеток в мозг [15]. Другим перспективным классом, выявленным в ходе CMap анализа, являются ингибиторы АТФаз (NCS=-2.13). Хроническое воздействие этанола известно своим нарушением ионного гомеостаза и функции лизосом, что напрямую связано с активностью различных АТФаз (например, Na⁺/K⁺-АТФазы и V-АТФазы, обеспечивающей закисление лизосом). Выявленный нами с помощью GSEA протеотоксический стресс и активация митофагии указывают на нарушение аутофагического клиренса при AUD. Ингибирование или модуляция активности АТФаз может влиять на лизосомальную деградацию и внутриклеточный транспорт, потенциально корректируя накопление повреждённых белков и восстанавливая клеточный протеостаз, что делает этот класс мишеней обоснованным для дальнейшего изучения в контексте нейропротекции при алкоголизме.

Стоит отметить, что массовое секвенирование РНК не позволяет разрешить клеточно-специфичные сигналы. CMap база L1000 содержит профили преимущественно раковых клеточных линий, что ограничивает прямую транслируемость результатов в нейрональный контекст. Кроме того, в модель дифференциального анализа (DESeq2) не были включены такие факторы, как статус курения и наличие большого депрессивного расстройства, которые известны своим влиянием на транскриптом мозга. Это было обусловлено высокой компланарностью данных факторов с диагнозом AUD в исследуемой когорте и необходимостью сохранения статистической мощности модели при объеме выборки 96 образцов. Учет этих коморбидных состояний требует проведения дальнейших исследований на более крупных независимых когортах. Выявленные фармакологические мишени требуют последующей экспериментальной валидации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В DLPFC при AUD выявлен 61 дифференциально экспрессированный ген, формирующий две функциональных группы: активация нейровоспаления и оксидативного стресса и нарушение гематоэнцефалического барьера. Метод GSEA выявил активацию процессов протеотоксического стресса и синаптической дисфункции CMap. Анализ идентифицировал ингибиторы JAK-киназ как наиболее перспективный класс для репозиционирования при AUD.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания FGWG-2025-0020 «Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях с целью создания новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС»

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. GBD 2021 Diseases and Injuries Collaborators. (2024). *Global burden of disease*. IHME.

2. Shabanov, P. D., & Kalishevich, S. Y. (1998). *Biologiya alkogolizma*. Lan, St. Petersburg, 272 p.
3. Shabanov, P. D. (2012). *Narkologiya: rukovodstvo dlya vrachey* GEOTAR-Media, Moscow, 832 p.
4. Nippert, K. E., Rowland, C. P., & Moorman, D. E. (2024). Alcohol, flexible behavior, and the prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, 250, 109920. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2024.109920
5. Airapetov, M. I., Eresko, S. O., Lebedev, A. A., Bychkov, E. R., & Shabanov, P. D. (2020). Role of toll-like receptors in the neuroimmunology of alcoholism. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 66(3), 208–215. DOI: 10.18097/PBMC20206603208
6. Crews, F. T., & Vetreno, R. P. (2016). Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology*, 233(9), 1543–1557. DOI: 10.1007/s00213-015-4116-7
7. Ye, J.-H., Zuo, W., Chaudhry, F., & Chinn, L. (2025). Neuroimmune mechanisms in alcohol use disorder: Microglial modulation and therapeutic horizons. *Psychoactives*, 4(3), Article 33. DOI: 10.3390/psychoactives4030033
8. Pascual, M., Montesinos, J., & Guerri, C. (2018). Neuroimmune signaling in alcohol use disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 177, 34–60. DOI: 10.1016/j.pbb.2018.12.007
9. Wu, C., Bendriem, R. M., Garamszegi, S. P., Shu, J., & Lee, C.-T. (2017). RNA sequencing in post-mortem human brains of neuropsychiatric disorders. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 71(10), 663–672. DOI: 10.1111/pcn.12550
10. Willis, C., White, J. D., Minto, M. S., Quach, B. C., Han, S., Tao, R., Shin, J. H., Johnson, E. O., & Hancock, D. B. (2024). Gene expression differences associated with alcohol use disorder in human brain. *Molecular Psychiatry*. Advance online publication. DOI: 10.1038/s41380-024-02777-1
11. Love, M. I., Huber, W., & Anders S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8
12. Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., Fu, X., Liu, S., Bo, X., & Yu, G. (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, 2(2), 100141. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100141
13. Subramanian, A., Narayan, R., Corsello, S. M., Peck, D. D., Natoli, T. E., Lu, X., Gould, J., Davis, J. F., Tubelli, A. A., Asiedu, J. K., Lahr, D. L., Hirschman, J. E., Liu, Z., Donahue, M., Julian, B., Khan, M., Wadden, D., Smith, I. C., Lam, D., . . . DeLuca, M. (2017). A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles. *Cell*, 171(6), 1437–1452. DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.049
14. Abernathy, K., Harris, R. A., & Mayfield, R. D. (2022). Alcohol use disorder: Neurobiology and therapeutics. *Biomedicine*, 10(5), 1192. DOI: 10.3390/biomedicine10051192
15. Kettlinsky, S. A., & Simbirtsev, A. S. (2008). Cytokines. Foliant, St. Petersburg, 552 p.

Поступила: 08.06.2026

После доработки: 08.09.2026

Принята к публикации: 11.09.2026

PREDICTION OF THERAPEUTIC TARGETS FOR PHARMACOLOGICAL INTERVENTION IN ALCOHOLISM THROUGH SIGNALING PATHWAY ENRICHMENT ANALYSIS OF PREFRONTAL CORTEX RNA-SEQ DATA

M.I. Airapetov^{1,2}, S. O. Eresko^{1*}, P.D. Shabanov¹

¹Institute of Experimental Medicine, 12 Akademika Pavlova str., St. Petersburg, 197376 Russia; *e-mail: eresko.sergei@yandex.ru

²S.M. Kirov Military Medical Academy, 6G Akademika Lebedeva str., St. Petersburg, 194044, Russia

The aim of this study was to predict targets for the pharmacological correction of alcoholism by enriching biological processes with transcriptional data from postmortem material of the human dorsolateral prefrontal cortex. RNA-seq data from 96 patients from the open GEO database was analyzed. Differential expression analysis was performed using the DESeq2 method. Enrichment of biological processes was performed using the GSEA method against the GO:BP database. Connectivity Map analysis was used to identify pharmacological agents. Sixty-one significantly differentially expressed genes were detected. Using GSEA, we identified the relationship between changes in gene expression and biological processes in the body. Connectivity Map analysis identified three pharmacological classes with a potential effect correcting the predicted changes: JAK kinase inhibitors, ATPase inhibitors, and chemokine receptor antagonists.

Key words: chronic alcohol intoxication; dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC); RNA-seq; DESeq2; Gene Set Enrichment Analysis (GSEA); Gene Ontology: Biological Process (GO:BP); Connectivity Map (CMap); neuroinflammation; JAK kinases

FUNDING

The study was conducted under state task FGWG-2025–0020, «Search for molecular targets for pharmacological intervention in addictive and neuroendocrine disorders with the aim of creating new pharmacologically active substances acting on CNS receptors».

Received: 08.06.2026, revised: 08.09.2026, accepted: 11.09.2026