

МЕЛАНОКОРТИНОВАЯ СИСТЕМА МОЗГА КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К АУДИОГЕННЫМ СУДОРОГАМ

© 2024 г. И. В. Романова¹, *, А. Л. Михрина², С. И. Ватаев¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²The Hebrew University Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2024 г.

После доработки 30.07.2024 г.

Принята к публикации 01.08.2024 г.

Исследование проведено на самцах 4-месячного возраста крысы линии Крушинского–Молодкиной (КМ), генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам, и не чувствительных к воздействию звука крысах Wistar. У крыс КМ в гипоталамусе с помощью ПЦР в реальном времени выявлено повышение уровня мРНК AgRP (в 4 раза) и меланокортиновых рецепторов MC4R (в 2.4 раза) по сравнению с крысами Wistar. Отличий в уровне мРНК проопиомеланокортина не было выявлено. Результаты иммуногистохимического анализа свидетельствуют о повышенном уровне оптической плотности AgRP(83-132), MC3R и MC4R в структурах гипоталамуса у крыс КМ по сравнению с крысами Wistar. В дорзальном гиппокампе у крыс КМ так же выявлено статистически достоверное увеличение уровня MC3R (методом Вестерн-блоттинга) и MC4R (методом иммуногистохимии) по сравнению с крысами Wistar. Полученные результаты обсуждаются в связи с выявленным дозозависимым блокирующим эффектом SHU9119 – неселективного блокатора MC3R/MC4R на судорожную активность у крыс КМ.

Ключевые слова: гипоталамус, эпилепсия, проопиомеланокортина, меланокортиновые рецепторы, SHU9119

DOI: 10.31857/S1027813324040101, **EDN:** EGGFUM

ВВЕДЕНИЕ

Меланокортиновые пептиды (альфа-, бета- и гамма-MSH, ACTH) образуются из общей молекулы-предшественника про-опиомеланокортина (POMC) [1, 2]. У млекопитающих в головном мозге самые большие популяции POMC-нейронов локализованы в аркуатном ядре гипоталамуса (arcuate nucleus - ARC) и ядрах одиночного тракта [2], однако POMC-продуцирующие нейроны выявлены в гиппокампе, коре больших полушарий, среднем мозге [3–5]. В головном мозге млекопитающих эффекты меланокортиновых пептидов (прежде всего альфа-MSH) опосредуются в основном меланокортиновыми рецепторами 3-го и 4-го типов (MC3R и MC4R) [3]. В ARC также расположены нейроны, в которых вырабатывается agouti related peptide/agouti gene related protein (AgRP) – эндогенный антагонист MC3R и MC4R [6]. Таким образом, POMC, MC3R, MC4R и AgRP образуют меланокортиновую систему, работа которой зависит от функционирования различных ее компонентов.

Меланокортиновая система гипоталамуса наиболее изучена в связи с ее участием в регуляции пищевого поведения и энергетического баланса организма: показано, что производные POMC и AgRP являются факторами, контролирующими аппетит [7, 8]. Нокаут гена *Mc4r* у мышей приводил к изменению углеводно-жирового обмена и ожирению [9], а химическая блокада MC3R и MC4R – к увеличению потребления пищи и гиперфагии [10]. Известно, что метаболические нарушения, в частности ожирение, часто сопровождаются психическими расстройствами, такими как депрессия и тревожность [11], в связи с чем можно предположить вовлеченность меланокортиновой системы мозга в патогенез этих заболеваний. Данные о том, что меланокортиновая система участвует в регуляции дофаминергической системы мозга [12–16], дисфункция которой отмечается при различных психических расстройствах [17, 18], также свидетельствует в пользу этого предположения.

Эпилепсия – тяжелое неврологическое заболевание, которое широко распространено в современном обществе. Причины этого заболевания

могут быть различными, однако они приводят к нарушению баланса возбуждающих и тормозных процессов в головном мозге, а основными факторами, вызывающими судорожные припадки, являются ГАМК и глутамат [19, 20], в связи с чем фармакологические подходы, направленные на борьбу с эпилепсией, были связаны с воздействием именно на эти нейротрансмиттерные системы [21]. При эпилепсии в мозге наблюдается нарушения работы и других нейротрансмиттерных систем, в частности, дофаминергической [22]. Однако в литературе высказывается мнение о вовлечении и пептидергических систем мозга в патогенез эпилепсии [23–25], которые, возможно, также могут рассматриваться как потенциальные фармакологические мишени для коррекции этого заболевания.

Крысы линии Крушинского–Молодкиной (КМ) являются модельным объектом для изучения височной эпилепсии. Они характеризуются генетической предрасположенностью к судорожной активности, которая развивается на звуковые воздействия в возрасте 3-х месяцев [26] и проявляется в виде одно- или двухфазных генерализованных клонико-тонических судорожных припадков продолжительностью 1.5–2.5 мин [27, 28]. У крыс КМ выявлен повышенный уровень дофамина в мозге [29, 30], а также показано, что дофаминергические нейроны среднего мозга, контролирующие двигательную активность, вовлечены в развертывание судорог [31]. Гиппокамп является структурой мозга, которая вовлечена в патогенез судорожной активности при различных формах височной эпилепсии. После эпилептических припадков в гиппокампе происходят деструктивные изменения, что приводит к когнитивным нарушениям (в частности, к нарушению памяти), которые являются сопутствующей патологией при эпилепсии [32]. У крыс КМ показано, что повторяющиеся судорожные припадки приводят к гибели нейронов гиппокампа [33]. У крыс КМ также описаны изменения поведенческих реакций, в частности снижение локомоторной и исследовательской активности, повышенный уровень тревожности [34], а также отмечается аутичные особенности поведения на зоосоциальное взаимодействие [35].

Приведенные данные позволяют предположить изменения в меланокортиковой системе мозга у крыс КМ и вовлеченность этой системы в развитие судорожной активности. Целью настоящего исследования было оценить ключевые составляющие меланокортиковой системы (POMC, AgRP, MC3R и MC4R) в гипоталамусе и гиппокампе на фоне развития судорожной активности у крыс КМ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании были использованы 4-х месячные крысы (200–220 г) дочерней аутбредной

популяции линии КМ, из популяции, которая поддерживается в виварии ИЭФБ РАН [28]. Ранее характеристики эпилептической активности этих животных были подробно описаны [30]. У крыс КМ в 3-х месячном возрасте были подтверждены двухфазные генерализованные клонико-тонические судорожные припадки в ответ на звуковое воздействие (синусоидальный тон частотой 8 кГц, интенсивность 90 дБ).

Анализ судорожной активности. Предварительно крыс КМ проверяли на способность реагировать судорожными реакциями на звуковой стимул (синусоидальный тон частотой 8 кГц, интенсивность 90 дБ). Проводили видеозапись судорог и регистрацию актограммы животного. По достижении максимальной стадии судорожного припадка (обычно в пределах 2 минут) звук отключали. Интенсивность судорожных реакций оценивали в баллах в соответствии со шкалой, описанной ранее [36]: 0 – отсутствие реакции, 1 – двигательное возбуждение без судорожного припадка (пробежка или дикий бег), 2 – начальное двигательное возбуждение, сменяемое тормозной паузой и далее второй волной двигательной активности с выраженным клоническими судорогами без падения животного на бок, 3 – генерализованная стадия, отличающаяся по интенсивности от вышеописанной тем, что вторая волна двигательной активности, завершается падением животного на бок и клонико-тоническими судорогами с экстензией конечностей и хвоста, 4 – начальное двигательное возбуждение сразу же без тормозной паузы переходит в генерализованные клонико-тонические судороги. Для дальнейших исследований отбирали высоковозбудимых крыс, реагировавших на звук генерализованными клонико-тоническими судорожными припадками интенсивностью 3 или 4 балла. Контролем для крыс КМ в нашем эксперименте были взяты нечувствительные к действию указанной звуковой стимуляции 4-х месячные самцы крыс Wistar. Отобранных животных содержали в индивидуальных клетках в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде и использовали в экспериментах через 2 дня после тестирования.

Приготовление проб. Эксперименты проводили в утренние часы. После внутрибрюшинного наркоза хлорал гидратом (400 мг/кг) крыс декапитировали, мозг извлекали из черепа и немедленно замораживали в сухом льду или фиксировали погружением в 4%-ный забуференный раствор параформальдегида (рН 7.4) для иммуногистохимических исследований. Из замороженного мозга (при -15°C) вырезали область гипоталамуса (для молекулярных исследований) и область дорзального гиппокампа (для анализа уровня белка) согласно атласу мозга крысы [38].

Анализ экспрессии генов. Ткань гипоталамуса погружали в TRI-reagent (Invitrogen, США), согласно

инструкции производителя, выделяли тотальную РНК, которую использовали для приготовления обратной транскрипции (ОТ) и анализа уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени, протокол ранее был подробно описан [30, 38]. Для реакций использовали прямой (F – forward) и обратный (R – reverse) праймеры, синтезированные фирмой Евроген (Evrogen, Россия), характеристики которых представлены в табл. 1. Амплификацию проводили в растворе (общий объем 25 мкл), который содержал 10 нг ОТ-продукта, по 0.4 мкМ F- и R-праймеров и реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. Реакции проводили в 96-луночных планшетах (в триплетах) с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США) согласно стандартному протоколу (Applied BioSystems, США). Результаты анализировали с помощью метода $\Delta\Delta Ct$ и программ 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения относительного количества мРНК в группе “КМ” ($n = 10$) нормировали по их значениям в группе “Wistar” ($n = 8–9$), данные представлены в условных единицах (у. е.).

Вестерн-блоттинг. Из области дорзального гипокампа крыс КМ ($n = 6$) и Вистар ($n = 6$) были приготовлены пробы для определения уровня белков методом Вестерн-блоттинг согласно методике, подробно описанной ранее [39]. Мембранны инкубировали в течение ночи (при 4°C) в первичных антителах: кролика к MC3R (Sigma; Mr = 36 кДа) в разведении 1:500. Антитела разводили в блокирующем растворе (5% обезжиренное сухое молоко, разведенное на TRIS-буфере с 0.1% Tween-20, pH 7.4). Также для инкубации использовали

вторичные IgG козы против кролика, коньюгированные с пероксидазой хрена (Sigma; 1:10000). Уровень контрольного белка в пробе определяли на тех же мембранных после стриппинга. Были использованы первичные антитела мыши к GAPDH (BioLegend; 1:2000; Mr = 37 кДа) и вторичные IgG козы против мыши, коньюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США, 1:20000). Для визуализации хемифлуоресцентного сигнала использовали реагент ECL-Prime и чувствительную фотопленку (Amersham, Великобритания).

Иммуногистохимический анализ. Для иммуногистохимических исследований из фиксированного и замороженного мозга крыс КМ ($n = 5$) и Wistar ($n = 5$) из области гипоталамуса и гиппокампа с помощью криостата (Leica CM-1510, Германия) были изготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов толщиной 20 мкм, которые использовали для иммуногистохимических реакций, протокол ранее описан [30]. Для иммуномечения использовали первичные антитела мыши к POMC (Abcam; 1 : 1000), кролика к AgRP(83–132) (PhoenixPeptide Inc.; 1 : 500), к MC3R (Sigma; 1 : 500), к MC4R (MyBioSource, 1 : 300). Также были использованы коньюгированные с биотином IgG козы против мыши и против кролика (Vector Labs. Inc.; 1 : 600) и комплекс стрептавидин-пероксидаза (Sigma; 1 : 1000). Визуализацию проводили с помощью 0.05%-го раствора диаминобензидина (Sigma) с 0.015% перекиси водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой и после стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло в прозрачную среду Bio-Maunt (Bio-optica, Италия). Специфичность реакций проверяли с помощью реакций без первичных антител.

Таблица 1. Последовательность использованных в работе праймеров

Ген	Положение	Последовательность	NCBI номер
<i>Pomc</i>	F	AGGACCTCACCAACGGAAAG	NM_013556.2
	R	GTCAAGGGCTGTTCATCTCC	
<i>AgRP</i>	F	TGAAGAAGACAGCAGCAGACC	NM_009377.2
	R	TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC	
<i>Mc3r</i>	F	CAGCACATGGATAATATCTCGACTCT	NM_009209.3
	R	GGCAATGGCCAGGAGGTT	
<i>Mc4r</i>	F	TGGGTGTCATAAGCCTGTTGG	NM_008078.2
	R	GCGTCCGTGTCGTACTG	
<i>*Gapdh</i>	F	GTGTT CCTACCCCAATGTATCC	NM_008077.4
	R	GATGTCATCATACTGGCAGGTT	

* – ген *Gapdh* (glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase) был использован в качестве контрольного.

Изображения структур получали в проходящем свете с помощью микроскопа Carl Zeiss Imager A1 (Германия) со встроенной видеокамерой AxioCam 712, программного обеспечения для захвата изображения Zen 3.4. (blue edition). У каждого животного для каждой иммуногистохимической реакции было сделано 5–6 снимков. С помощью программы Image J на каждом снимке оценивали оптическую плотность POMC, MC3R или MC4R в 10–12 нейронах ARC или гиппокампа, уровень AgRP оценивали в иммунопозитивных отростках на стандартной площади ARC. Данные представлены в у. е.

Введение крысам КМ неселективного блокатора MC3/4R (SHU 9119, Швейцария). Непосредственно перед началом исследований проводили фоновый тест на действие звука. Крысам внутримышечно вводили 0.5 мл воды для инъекций и через 30 мин вызывали аудиогенный судорожный припадок, измеряя латентный период и интенсивность реакции. Эти параметры припадка принимали в качестве контрольных. Блокатор растворяли в PBS (рН 7.4) и вводили внутримышечно (0.5 мл) в дозе 30 мкг/кг ($n = 9$) или 40 мкг/кг ($n = 18$) спустя 2 дня после фонового тестирования. Через определённый интервал времени (30 мин, 1, 2, 3, 4 и 24 ч) после введения предъявляли звуковой сигнал. Оценивали изменения параметров аудиогенных судорожных реакций на звук по сравнению с контрольными.

Статистический анализ проведен с помощью пакета программ GraphPad Prism 10.2 и IBM SPSS Statistica 23.0. Проверку на нормальности осуществляли с помощью теста Шапиро–Уилка. Анализ результатов ПЦР проведен с помощью парного t-критерия для независимых выборок. Результаты Вестерн-блоттинга и иммуногистохимического исследования оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Для сравнения частот судорог в разные временные периоды после введения препарата применяли Q-критерий Кохрена. Изменения интенсивности припадка анализировали с помощью критерия χ^2 Фридмана для повторных планов (с апостриорными сравнениями с помощью Т-критерия Вилкоксона с поправкой Бонферрони). Латентные периоды развития судорог (у животных, которые их имели) сравнивали с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (применение повторных планов в данном случае было невозможно, так как число крыс, у которых судороги были выявлены, варьировало в различные временные периоды). Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$. Данные представлены как среднее и стандартные ошибки, либо как медианы с интерквартильными размахами, n – количество животных в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты ПЦР в реальном времени демонстрируют (рис. 1), что в гипоталамусе крыс КМ по сравнению с крысами Wistar отсутствуют отличия между уровнем экспрессии *Pomc* ($t = 0.45$; $p = 0.63$). При этом у крыс КМ выявлено увеличение уровня мРНК AgRP (в 4 раза, $t = 4.69$, $p < 0.05$), мРНК MC3R (в 1.7 раз, $t = 1.79$, $p = 0.07$) и MC4R (в 2.4 раза, $t = 4.03$, $p < 0.05$) по сравнению с соответствующим показателем у крысы Wistar (рис. 1).

Анализ иммуногистохимических реакций на препаратах мозга не выявил достоверных отличий оптической плотности POMC в нейронах ARC между крысами Wistar ($M = 0.46$ (0.43; 0.50)) и КМ ($M = 0.48$ (0.39; 0.49), $U = 11.5$, $p = 0.8$), количественный анализ представлен на рис. 2. Оптическая плотность AgRP в области ARC у крыс Wistar была меньше, чем у крыс КМ ($M = 0.08$ (0.06; 0.10) и $M = 0.18$ (0.16; 0.18), $U = 0$, $p < 0.05$; рис. 2, 3). Визуально более интенсивный уровень AgRP у крыс КМ отмечали в иммунопозитивных отростках и в других структурах гипоталамуса, в частности в паравентрикулярном ядре.

В нейронах ARC оптическая плотность MC3R у крыс Wistar была меньше, чем у КМ (соответственно $M = 0.43$ (0.36; 0.48) и $M = 0.55$ (0.54; 0.63), $U = 0$, $p < 0.05$; рис. 2, 4). Оптическая плотность MC4R в ARC у крыс Wistar также была меньше, чем у КМ (соответственно $M = 0.19$ (0.16; 0.21) и $M = 0.28$ (0.24; 0.30), $U = 0$, $p < 0.05$; рис. 2). Визуально более интенсивная иммуногистохимическая реакция к MC3R и MC4R наблюдалась в нейронах других структур гипоталамуса, в частности в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах.

Таким образом, представленные данные демонстрируют, что в гипоталамусе у крыс КМ по сравнению с крысами Wistar при отсутствии изменения

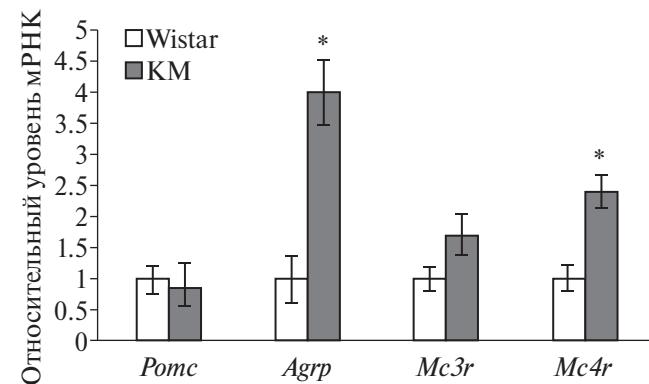


Рис. 1. Анализ экспрессии генов, кодирующих POMC, AgRP, MC3R и MC4R в гипоталамусе крысы Wistar ($n = 8$ –9) и КМ ($n = 10$), данные представлены в условных единицах. Обозначения: * – статистически достоверные отличия от группы Wistar ($p < 0.05$), t-критерий Стьюдента.

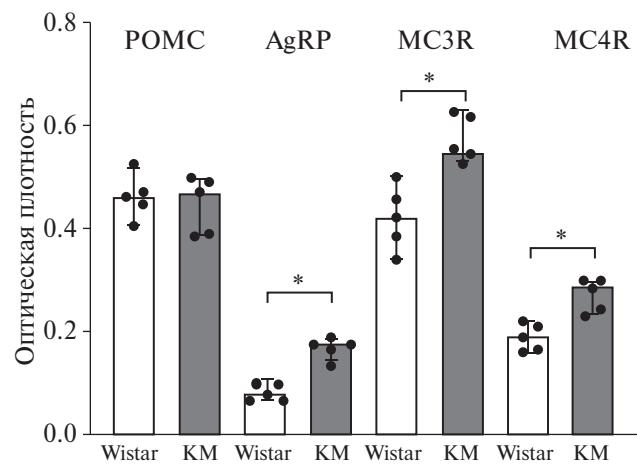


Рис. 2. Анализ уровня POMC, AgRP, MC3R и MC4R в аркуатном ядре гипоталамуса крысы Wistar ($n = 5$) и KM ($n = 5$). * – достоверность отличий группы KM от соответствующей группы Wistar ($p < 0.05$) (U-критерий Манна-Уитни). Результаты представлены как медиана с интерквартильными размахами в условных единицах.

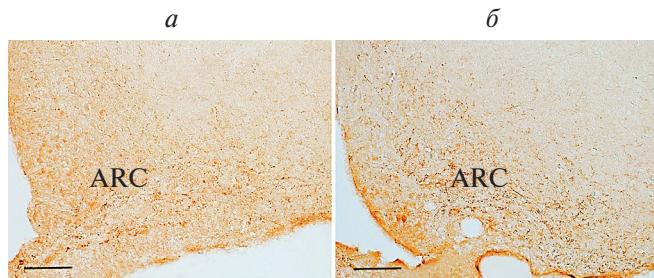


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция к AgRP в аркуатном ядре (ARC) гипоталамуса крысы Wistar (а) и KM (б). Масштаб 100 мкм.

экспрессии гена *Pomc* и, соответственно, уровня кодируемого им белка, отмечено увеличение уровня экспрессии генов и белков меланокортиновых рецепторов.

В гиппокампе анализ уровня белка, проведенный с помощью Вестерн-блоттинга, демонстрирует более высокий уровень MC3R у крыс KM ($M = 0.90$ (0.78; 0.97) по сравнению с крысами Wistar ($M = 0.73$ (0.63; 0.81) $U = 4.5$, $p < 0.05$, рис. 5). При использовании антител к MC4R методом Вестерн блоттинг получилася слабая реакция, поэтому оценили уровень этого белка в гиппокампе с помощью иммуногистохимического метода. Полученные результаты демонстрируют более высокий уровень оптической плотности MC4R у крыс KM по сравнению с крысами Wistar в поле CA1 (соответственно $M = 0.16$ (0.14; 0.20) и $M = 0.11$ (0.09; 0.12), $U = 0$, $p < 0.05$) и в поле CA3 гиппокампа, где в телях нейронов

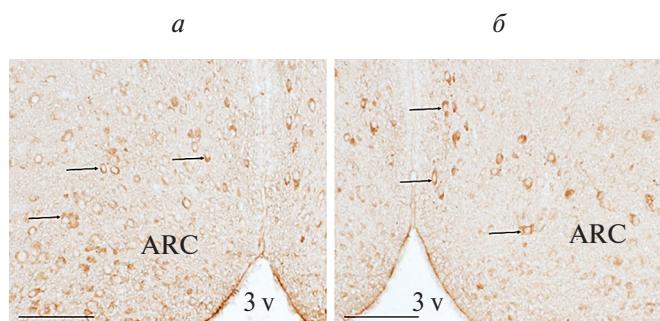


Рис. 4. Иммуногистохимическая реакция к MC3R в аркуатном ядре (ARC) гипоталамуса крысы Wistar (а) и KM (б). Стрелки указывают на тела иммунопозитивных нейронов, 3 v – третий желудочек мозга. Масштаб 100 мкм.

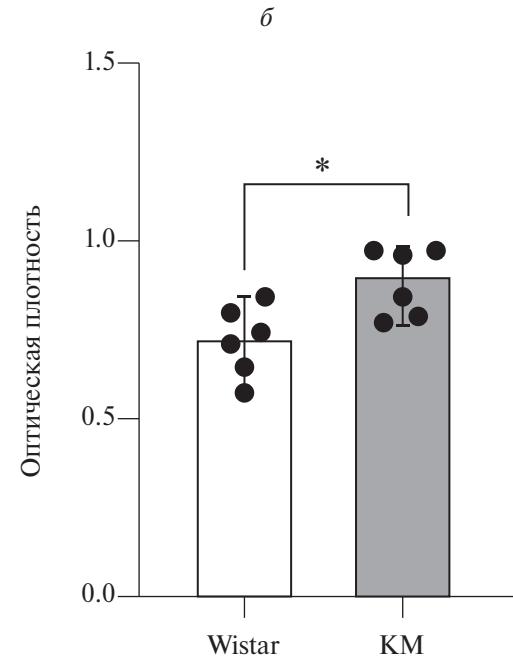


Рис. 5. Результаты Вестерн-блоттинга демонстрируют: а – уровень белка MC3R и контрольного белка GAPDH в дорзальном гиппокампе крысы Wistar ($n = 6$) и KM ($n = 6$), б – статистический анализ данных, которые представлены как медиана с интерквартильными размахами в условных единицах, * – достоверность отличий ($p < 0.05$), U-критерий Манна-Уитни.

наблюдается наиболее интенсивная реакция к MC4R ($M = 0.22$ (0.20; 0.24) и $M = 0.15$ (0.21; 0.23), $U = 0$, $p < 0.05$; рис. 6), а также и в отростках.

Таким образом полученные данные свидетельствуют о более высоком уровне белков MC3R и MC4R не только в структурах гипоталамуса, но и в гиппокампе – структуре мозга, которая у крыс KM вовлечена в патогенез эпилептической активности. Эти данные стали предпосылкой для исследования возможности влияния синтетического блокатора MC3R/MC4R на развитие судорожной активности.

Внутримышечное введение крысам KM SHU 9119. Через 30 мин после введения препарата в дозе 30 мкг/кг крысы реагировали на звуковое воздействие развитием полноценного судорожного припадка. После введения крысам препарата в дозе 40 мкг/кг тестирование аудиосигналом проводили

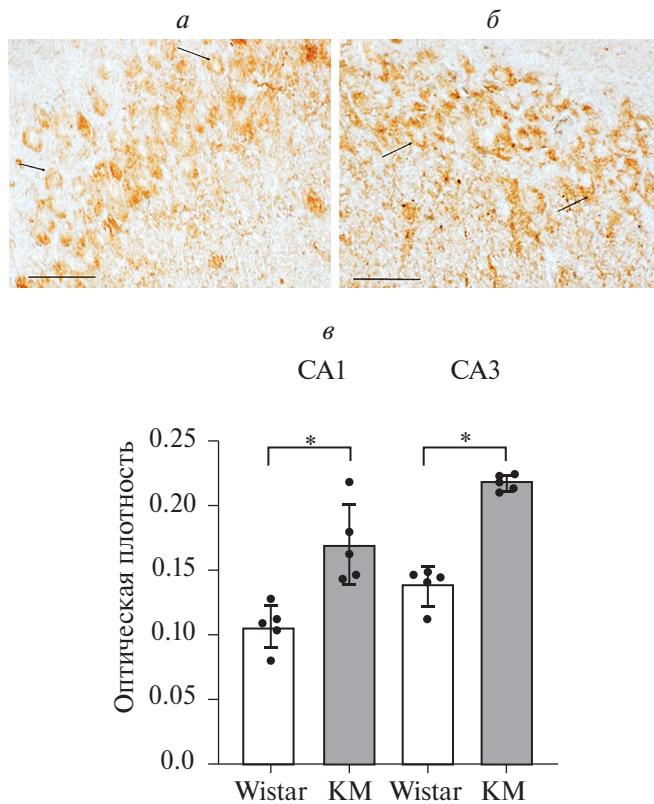


Рис. 6. Иммуногистохимическая реакция к MC4R в поле CA3 гиппокампа крысы Wistar (а), KM (б) и результат статистического анализа (в) оптической плотности MC4R в нейронах поля CA1 и CA3 гиппокампа. На микрофотографиях (а, б) стрелки указывают на перикарий иммунопозитивных нейронов, масштаб 100 мкм. На графике (в) данные представлены как медиана (M) с интерквартильными размахами в условных единицах, * – достоверность отличия ($p < 0.05$), между соответствующими группами, $n = 5$ в каждой группе, U-критерий Манна-Уитни. Рис.

через различные временные промежутки после инъекции. Через 30 мин из 18 экспериментальных крыс припадок фиксировали у 13 животных (72%), через 1 ч – у 13 (72%), 2 ч – у 11 (67%), 3 ч – у 9 (50%), 4 ч – у 6 (33%), через 24 ч – у 10 (56%) крыс (рис. 7а), изменения частоты судорог достоверны ($Q = 21.4$; $p = 0.002$, рис. 7а).

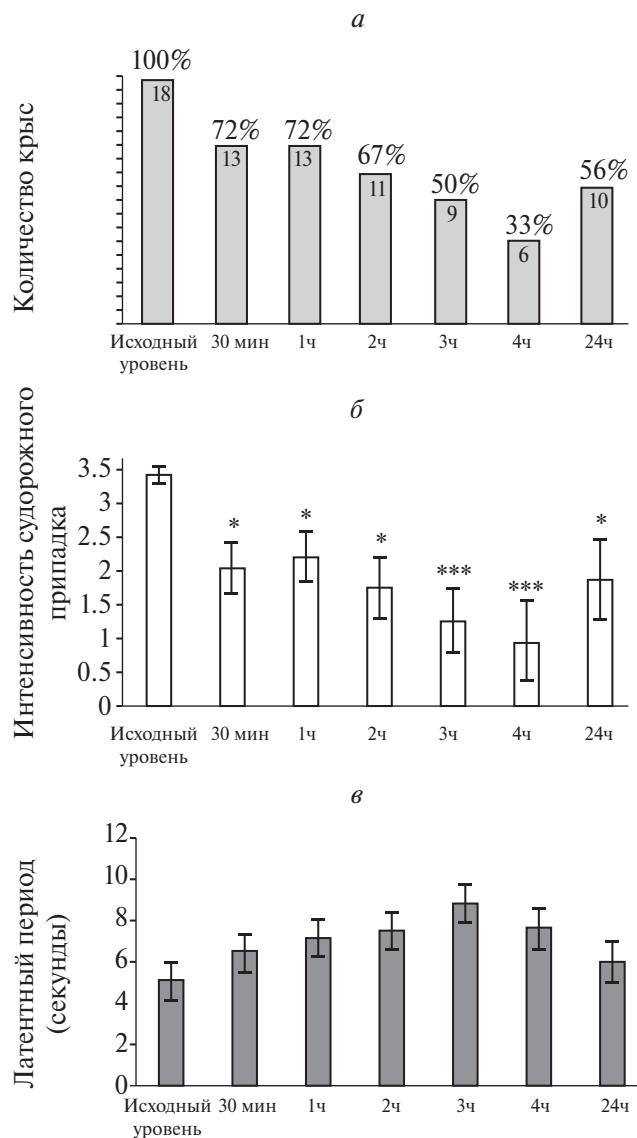


Рис. 7. Результаты введения крысам KM SHU9119 – неселективного блокатора MC3R/MC4R. а – количество крыс в каждой группе (цифры на столбце), у которых выявлены судороги после введения препарата (в % относительно исходного уровня 100%); б – изменение интенсивности судорожного припадка (в баллах) у этих крыс, достоверность отличия от исходного уровня (T -критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони): * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.0001$; в – изменение латентного периода (в секундах) у этих крыс.

В контролльном уровне интенсивность припадка составляла 3.4 ± 0.3 балла, после введения препарата она снижалась: через 30 мин до 2.3 ± 0.3 баллов, 1 ч – до 2.7 ± 0.3 баллов, 2 ч – до 2.7 ± 0.3 , 3 ч – до 2.6 ± 0.3 , 4 ч – до 2.8 ± 0.5 баллов, а через 24 ч составляла 3.4 ± 0.3 балла. Результаты статистического анализа свидетельствуют о том, что значение изменения интенсивности судорог достоверны (критерий Фридмана $\chi^2_t = 36.4$; $p < 0.05$). Апостериорные сравнения, проведенные с помощью Т-критерия Вилкоксона с поправкой Бонферрони, выявили достоверное снижение интенсивности судорог на всех исследованных сроках после введения препарата (рис. 7б).

У животных, у которых после введения препарата судорожный припадок развивался, отмечено увеличение его латентного периода по сравнению с контролльным уровнем, однако из-за небольшого количества крыс, у которых выявлены судороги, различия недостоверны ($H = 3.5$; $p = 0.6$; рис. 7в).

Таким образом, полученные данные демонстрируют дозозависимый противосудорожный эффект SHU 9119, максимальное проявление которого наблюдалось через 3 и 4 ч после введения препарата.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные демонстрируют, что в гипоталамусе крыс КМ при отсутствии по сравнению с крысами Вистар изменений уровня экспрессии гена *Pomc* и кодируемого им белка, происходит увеличение экспрессии генов и уровня белков меланокортиновых рецепторов в нейронах. Полученные данные могут свидетельствовать о повышении чувствительность клеток-мишеней к продуктам РОМС, в частности альфа-MSH – основному агонисту меланокортиновых рецепторов в мозге млекопитающих [2]. Следует отметить, что MC3R экспрессируются и в самих РОМС-продуцирующих нейронах ARC, что позволяет их рассматривать как ауторецепторы [6].

В гипоталамусе крыс КМ наблюдается увеличение экспрессии гена *AgRP* и уровня его белка – эндогенного антагониста MC3R/MC4R в мозге, что, по-видимому, можно рассматривать как обратную реакцию на увеличение уровня MC3/MC4R. Таким образом, у крыс КМ в меланокортиновой системе отмечается дисбаланс между уровнем предшественника агониста и эндогенного антагониста MC3/MC4R, что, очевидно, отражается и на функционировании клеток-мишеней из-за нарушения в них меланокортиновой передачи. Мы провели анализ экспрессии *Pomc* и его белка в гипоталамусе. Однако наши собственные наблюдения, как и данные других авторов, свидетельствуют об экспрессии РОМС в различных структурах мозга, в том числе и в гиппокампе [3–5], уровень которой мы не оценивали.

Ранее в экспериментах *in vivo* и *in vitro* выявлен тормозный эффект AgRP на дофаминергические нейроны мозга [14, 40]. Однако у крыс КМ на фоне высокого уровня AgRP отмечено не уменьшение, а повышение уровня дофамина в мозге [29, 30], что может быть следствием нарушения интегративных взаимодействий между меланокортиновой и другими системами мозга, в частности орексинергической [30], вовлеченными в контроль дофаминергической системы. Известно, что в нейронах ARC AgRP колокализован с ГАМК [41, 42] и участвует в регуляции его выведения через пресинаптическое торможение, что, очевидно, приводит к уменьшению выведения ГАМК. При этом MC3/MC4R экспрессируются как в дофамин-, так и в ГАМК-нейронах [43], что свидетельствует об участии MC3/MC4R в регуляции баланса дофамин-ГАМК, который, очевидно, крыс КМ нарушен. Однако не понятно, изменяется ли у крыс КМ выведение самого AgRP на фоне его повышенной экспрессии, так как использование его аналога SHU 9119 – химического блокатора MC3/MC4R приводило к уменьшению судорожной активности у крыс КМ, что, по-видимому, свидетельствует о недостатке эндогенного антагониста.

Блокатор SHU 9119 использовался при изучении пищевого поведения как при внутрижелудочковом способе введения, так и при внутрибрюшинном и внутримышечном. Показано, что он связывается только с трансмембранным доменом MC3R/MC4R, в отличии от AgRP, который взаимодействует и с внеклеточным доменом этого рецептора, действуя как обратный агонист [10, 44, 45]. Эффект SHU 9119 зависел от дозы препарата и максимально проявлялся через 3–4 часа после его введения, что согласуется с периодом проявления максимального эффекта AgRP [14, 40].

Полученные данные демонстрируют изменения компонентов меланокортиновой системы в мозге крыс при генетически обусловленной височнной эпилепсии, а химическая блокада меланокортиновых рецепторов приводит к уменьшению судорожной активности, что подтверждает вовлеченность этой системы в патогенез данной формы эпилепсии. Полученные данные согласуются с результатами, демонстрирующими противосудорожный эффект АСТН [24] – продукта РОМС, который также может быть агонистом меланокортиновых рецепторов. Однако осталось невыясненным, чем отличались крысы КМ, у которых при предъявлении звука после введения препарата судороги не возникали, от тех крыс КМ, у которых судороги все же развивались. У последних, однако, отмечено статистически значимое снижение интенсивности судорожного припадка и тенденция к увеличению латентного периода наступления судорог. Возможно, что у этих крыс более высокая доза препарата могла бы быть эффективной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важнейшая функция меланокортиновой системы гипоталамуса – контроль энергетического баланса организма. Однако получено много фактов, демонстрирующих ее более широкое модуляторное влияние на другие “непищевые” функции мозга, вовлеченность в контроль нейронных путей, которые их регулируют как в процессе развития организма, так и во взрослом возрасте [16]. Это, очевидно, определяет психические нарушения как сопутствующую патологию при метаболических расстройствах. Эпилептическая активность приводит к гибели нейронов мозга [46], что также можно рассматривать как следствие нарушения их энергетического баланса при нарушениях в меланокортиновой передаче, что свидетельствует в пользу предположения об энергетической природе нейродегенеративных процессов [47].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все экспериментальные процедуры соответствовали положениям Animal Welfare act (2006) и European Communities Council Directive 1986 (2010/63/EEC), а также правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.” Дизайн исследования одобрен Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Протокол 5/2019 от 23.05.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gantz I., Fong T.M.* // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003. V. 284. P. 468–474.
2. *Cone R.D.* // Nat. Neurosci. 2005. V. 8. № 5. P. 571–578.
3. *Chen J., Yang W.* // Med. Sci. Sports Exerc. 2000. V. 32. № 5. P. 954–957.
4. *Shen Y., Tian M., Zheng Y., Gong F., Fu A.K.Y., Ip N.Y.* // Cell Rep. 2016. V. 17. P. 1819–1831.
5. *Romanova I.V., Mikhailova E.V., Mikhлина А.Л., Shpakov A.O.* // Anat. Rec. (Hoboken). 2023. V. 306. № 9. P. 2388–2399.
6. *Bagnol D., Lu X.Y., Kaelin C.B., Day H.E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G.S., Watson S.J.* // J Neurosci. 1999. V. 19. P. 1–7.
7. *Marks D.L., Cone R.D.* // Recent Prog. Horm. Res. 2001. V. 56. P. 359–375.
8. *Schwartz M.W., Morton G.J.* // Nature. 2002. V. 418. P. 595–597.
9. *Stutz A.M., Staszkiewicz J., Ptitsyn A., Argyropoulos G.* // Obesity. 2007. V. 15. № 3. P. 607–615.
10. *Sutton G.M., Josephine Babin M., Gu X., Hruby V.J., Butler A.A* // Peptides. 2008. V. 29. № 1. P. 104–111.
11. *Xia G., Han Y., Meng F., He Y., Srisai D., Farias M., Dang M., Palmiter R.D., Xu Y., Wu Q.* // Mol. Psychiatry. 2021. V. 26. № 7. P. 2837–2853.
12. *Dietrich M.O., Bober J., Ferreira J.G., Tellez L.A., Mineur Y.S., Souza D.O., Gao X.B., Picciotto M.R., Araújo I., Liu Z.W., Horvath T.L.* // Nat. Neurosci. 2012. V. 15. № 8. P. 1108–1110.
13. *Lippert R.N., Ellacott K.L.J., Cone R.D.* // Endocrinol. 2014. V. 155. № 5. P. 1718–1727.
14. *Mikhлина A.Л., Romanova I.V.* // Neurosci. Behav. Physiol. 2015. V. 45. № 5. P. 536–541.
15. *Roseberry A.G., Stuhrmana K., Dunigana A.I.* // Neurosci. Biobehav. Reviews. 2015. V. 56. P. 15–25.
16. *Stutz B., Waterson M.J., Šestan-Peša M., Dietrich. M.O., Škarica M., Šestan N., Racz B., Magyar A., Sotonyi P., Liu Z.W., Gao X.B., Matyas F., Stoiljkovic M., Horvath T.L.* // Mol. Psychiatry. 2022. V. 27. № 10. P. 3951–3960.
17. *Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R.* // Pharmacol. Rev. 2011. V. 63. P. 182–217.
18. *Baik J.H.* // Front. Neural. Circuits. 2013. V.7. P. 152.
19. *Weaver D.F., Pohlmann-Eden B.* // Epilepsia. 2013. V. 54 (S.2). P. 80–85.
20. *Zaitsev A.V., Khazipov R.* // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. 12415.
21. *Akyuz E., Polat A.K., Eroglu E., Kullu I.* // Life Sci. 2021. V. 265. 118826.
22. *Juliá-Palacios N., Molina-Anguita C., Sigatulina Bondarenko M., Cortès-Saladelafont E., Aparicio J., Cuadras D., Horvath G., Fons C., Artuch R., García-Cazorla Á.* // Dev. Med. Child. Neurol. 2022. V. 64. № 7. P. 915–923.
23. *Dobolyi A., Kékesi K.A., Juhász G., Székely A.D., Lovas G., Kovács Z.* // Curr. Med. Chem. 2014. V. 21. № 6. P. 764–87.
24. *Clynen E., Swijsten A., Raijmakers M., Hoogland G., Rigo J.M.* // Mol. Neurobiol. 2014. V. 50. № 2. P. 626–46.
25. *Janković S.M., Đešević M.* // Expert. Rev. Neurother. 2022. V. 22. № 2. P.129–143.
26. *Семиокхина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И.* // Журн. высш. Нерв. деят-ти. 2006. Т. 56 (3). С. 298–316. [Semiokhina A.F., Fedotova I.B., Poletaeva I.I. // Zh. Vyssh. Nerv. Deyat-ti. V. 56. № 3. P. 298–316. (In Russ.)]

27. Poletaeva I.I., Surina N.M., Kostina Z.A., Perepelkina O.V., Fedotova I.B. // *Epilepsy Behav.* 2017. V. 71 (Pt B). P. 130–141.
28. Ватаев С.И. // Росс. Физиол. журн. им ИМ Сеченова. 2019. Т. 105. № 6. С. 667–679. [Vataev S.I. // *Russ. J. Physiol.* 2019. V. 105. № 6. P. 667–679. (In Russ.)]
29. Сорокин А.Я., Кудрин В.С., Клодт П.М., Туомисто Л., Полетаева И.И., Раевский К.С. // Генетика. 2004. Т. 40. № 6. С. 846–849.
30. Morina I.Y., Mikhrina A.L., Mikhailova E.V., Vataev S.I., Hismatullina Z.R., Romanova I.V. // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022. V. 58. P. 1961–1972.
31. Faingold C.L. // *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* / Ed. Noebels J.L. et al.: Natl Center Biotechnol Informat (US). 4th edition. 2012.
32. Helmstaedter C., Witt J.A. // *Seizure.* 2017. V. 49. P. 83–9.
33. Kulikov A.A., Naumova A.A., Dorofeeva N.A., Ivlev A.P., Glazova M.V., Chernigovskaya E.V. // *Epilepsy Behav.* 2022. V. 134. 108846.
34. Surina N.M., Poletaeva I.I., Fedotova I.B., Kalinina T.S., Volkova A.V., Malikova L.A., Rayevsky K.S. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. Т. 151. № 1. С. 47–50.
35. Rebik A.A., Riga V.D., Smirnov K.S., Sysoeva O.V., Midzyanovskaya I.S. // *J Pers. Med.* 2022. V. 12. № 12. 2062.
36. Ватаев С.И., Жабко Е.П., Лукомская Н.Я., Оганесян Г.А., Магазаник Л.Г. // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2009. Т. 95. № 8. С. 802–812. [Vataev S.I., Zhabko E.P., Lukomskaya N.Y., Oganesyan G.A., Magazanik L.G. *Russ. J. Physiol.* 95(8): 802–812. 2009. (In Russ.).]
37. Paxinos G.T., Watson Ch. // *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* / Fourth Edition. Academic Press, San Diego, California, USA, 1998. Int. Standard Book Number: 0-12-547617-5.
38. Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L., Sukhov I.B., Mikhailova E.V., Shpakov A.O. // *Neurochem. Res.* 2018. V. 43. № 4. P. 821–837.
39. Zaitsev A.V., Malkin S.L., Postnikova T.Y., Smolensky I.V., Zubareva O.E., Romanova I.V., Zakharova M.V., Karyakin V.B., Zavyalov V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 23. 5852.
40. Mikhrina A.L., Saveljeva L.O., Alekseeva O.S., Romanova I.V. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2020. V. 50. № 3. P. 367–373.
41. Tong Q., Ye Ch-P., Jones J.E., Elmquist J.K., Lowell B.B. // *Nat. Neurosci.* 2008. V. 11. № 9. P. 998–1000.
42. Douglass A.M., Resch J.M., Madara J.C., Kucukdereli H., Yizhar O., Grama A., Yamagata M., Yang Z., Lowell B.B. // *Nature.* 2023. V. 620. № 7972. P. 154–162.
43. Михрина А.Л., Чернышев М.В., Михайлова Е.В., Савельева Л.О., Романова И.В. // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2018. Т. 104. № 7. С. 769–779.
44. Chai B.X., Neubig R.R., Millhauser G.L., Thompson D.A., Jackson P.J., Barsh GS., Dickinson C.J., Li J.Y., Lai Y.M., Gantz I. // *Peptides.* 2003. V. 24. P. 603–609.
45. Chen M., Celik A., Georgeson K.E., Harmon C.M., Yang Y. // *Regul. Peptides.* 2006. V. 136. P. 40–49.
46. Rho J.M., Boison D. // *Nat. Rev. Neurol.* 2022. V. 18. № 6. P. 333–347.
47. Blass J.P. // *J. Neurosci. Res.* 2001. V. 66. № 5. P. 851–856.

Analysis of the Melanocortin Brain System of a Krushinsky–Molodkina Rats with Genetic Predisposition to Audiogenic Seizures

I. V. Romanova¹, A. L. Mikhrina², and S. I. Vataev¹

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

²The Hebrew University Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

The study was conducted on 4-month-old male rats of the Krushinsky–Molodkina (KM) line, genetically predisposed to audiogenic seizures, and Wistar rats, which are not sensitive to the effects of sound. In KM rats real-time PCR revealed an increase in the level of AgRP mRNA (4-fold, $p<0.05$) and melanocortin receptors MC4R (2.4-fold, $p<0.05$) in the hypothalamus vs. Wistar rats. No differences in the level of proopiomelanocortin mRNA were detected. The results of immunohistochemical analysis indicate an increased ($p<0.05$) level of optical density of AgRP, MC3R and MC4R in the hypothalamic structures of KM rats vs. Wistar rats. In the dorsal hippocampus a statistically significant increase in the level of MC3R (by Western blotting) and MC4R (by immunohistochemistry) was also detected in KM rats vs. Wistar rats. The obtained results are discussed in connection with the revealed blocking dose-dependent effect of SHU9119, a non-selective MC3R/MC4R inhibitor, on seizure activity in KM rats.

Keywords: *hypothalamus, epilepsy, proopiomelanocortin, melanocortin receptors, SHU9119*