

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

НЕЙРОНАУКИ

DOI: 10.7868/S0869813918070043

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
ВАЗОПРЕССИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ
ГИПОТАЛАМУСА КРЫС, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ
К АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

© *Е. Л. Горбачёва, Е. В. Черниговская, М. В. Глазова,
Е. А. Лаврова, Л. С. Никитина*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: jengorbacheva@gmail.com

В работе была исследована роль ERK1/2 сигнального каскада в регуляции активности вазопрессинергических нейронов гипоталамуса у интактных крыс линии Крушинского—Молодкиной (КМ), а также в ходе и после судорожного припадка.

Не было выявлено различий в содержании фосфо-ERK1/2 киназ и фосфо-CREB в супраоптическом ядре (СОЯ) гипоталамуса у интактных крыс линии КМ и линии Вистар. Показано отсутствие различий в содержании мРНК вазопрессина и снижение содержания вазопрессин-нейрофизина II в нейронах гипоталамуса у крыс линии КМ по сравнению с крысами Вистар. Ранее нами был показан пониженный уровень секреции вазопрессина в кровь у интактных крыс линии КМ [1]. Полученные данные указывают на то, что нарушения в активности гипоталамо-гипофизарной системы у крыс линии КМ затрагивают преимущественно механизмы секреции нейrogормона, не влияя на активность ERK1/2-и/или CREB-зависимого пути регуляции экспрессии вазопрессина нейронами СОЯ.

Аудиогенный судорожный припадок у крыс КМ привел к снижению количества фосфо-CREB-иммунопозитивных ядер в СОЯ на клонико-тонической стадии. Количество фосфо-ERK1/2-иммунопозитивных клеток не отличалось от контроля. Через 1 ч после судорог количество фосфо-ERK1/2- и фосфо-CREB-иммунопозитивных ядер в СОЯ повышалось по сравнению с таковым на клонико-тонической стадии судорог. Активация ERK1/2/CREB-зависимой внутриклеточной сигнализации и повышение экспрессии белка cFos сопровождалось усилением транскрипции вазопрессина и повышением содержания нейрофизина II в нейронах СОЯ. Через 24 ч после припадка активность ERK1/2 сигнального каскада и белка cFos снижалась до контрольного уровня, что приводило к снижению уровня транскрипции вазопрессина также до контрольных значений. Таким образом, восстановление состояния вазопрессинергической системы (компенсаторный ресинтез) через 1 ч после аудиогенного припадка происходит ERK1/2/CREB-зависимым путем.

Ключевые слова: крысы линии Крушинского—Молодкиной, эпилепсия, вазопрессин, ERK1/2, CREB, SNAP25, cFos, аудиогенные судороги.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 8. С. 945—956. 2018

E. L. Gorbacheva, E. V. Chernigovskaya, M. V. Glazova, E. A. Lavrova, L. S. Nikitina.* MECHANISMS THE REGULATION OF HYPOTHALAMIC VASOPRESSINERGIC NEURONS IN RATS, PRONE TO AUDIOGENIC EPILEPSY. I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia; * e-mail: jengorbacheva@gmail.com.

In the present work we studied a role of ERK1/2 signaling cascade in the regulation of hypothalamic vasopressin (VP) neurons of audiogenic Krushinsky—Molodkina (KM) rats. We compared the functional state of VP neurons in the supraoptic nucleus (SON) of hypothalamus in naïve KM and control Wistar rats. Additionally, we analyzed how audiogenic seizure (AGS) effect on vasopressinergic system of KM rats.

Obtained data demonstrated that the activity of ERK1/2 and transcription factor CREB as well as the level of VP mRNA were equal in SON of both naïve KM rats and control Wistar rats. However, the level of neurophysin II in KM rats was decreased in comparison with Wistar rats. Earlier we also revealed reduced VP secretion rate in KM rats. Our data indicate that disturbance in the functioning of the hypothalamic-pituitary system mainly affect the mechanism of VP secretion and does not involve the ERK/CREB dependent regulation of VP expression in the magnocellular cells of SON.

Analysis of AGS expression showed that at clonus-tonus stages in the SON number of p-CREB positive nuclei of magnocellular cells was significantly decreased while number of p-ERK1/2 positive neurons was not changed in comparison with naïve KM rats. One hour after AGS number of both p-CREB positive nuclei and p-ERK1/2 cells was significantly increased in comparison with clonus-tonus stages. Activation of ERK/CREB pathway and an increase of cFos expression were accompanied with increasing of VP mRNA and neurophysin II level in the SON. 24 hours after AGS we observed decreasing of ERK1/2 and cFos activity that correlated with attenuation of VP transcription up to control levels. Thus after AGS, the recovery of VP-ergic system is mainly dependent on the activity of ERK/CREB signaling pathway.

Key words: Krushinsky—Molodkina rats, epilepsy, vasopressin, ERK1/2, CREB, SNAP25, cFos, audiogenic seizures.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 8. P. 945—956. 2018

На различных моделях эпилепсии показано, что вазопрессин в крови оказывает влияние на чувствительность животных к факторам, вызывающим судорожную активность. Так, крысы, у которых вазопрессин в циркуляции отсутствует (Brattleboro rat), по сравнению с крысами, характеризующимися нормальной секрецией вазопрессина (Long—Evans), демонстрируют более высокий порог возникновения судорог вследствие гипертермии [20], а также более медленное развитие эпилептической активности при киндлинге, вызванном электрической стимуляцией амигдалы [14]. А у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR, характеризующихся повышенной секрецией вазопрессина, электрическая стимуляция амигдалы приводит к более быстрому развитию эпилептической активности, чем у крыс материнской линии Wistar—Kyoto (WKY) [17].

По данным литературы, ERK1/2-киназы вовлечены в развитие многих патологических процессов в головном мозге, в том числе и эпилепсии. Показано, что активность ERK1/2-киназ повышается в гиппокампе и соматосенсорной коре в ходе судорожных припадков, вызванных пилокарпином, бидукулином [8], а также при электрошоковом воздействии [9, 19]. Более того, гиперэкспрессия конститутивно активной формы MEK киназы в мозге мышей приводит к появлению спонтанных эпилептических припадков, сопровождающихся миоклонусом передних конечностей [21].

Сравнительно немного известно о роли ERK1/2-киназ в реализации эпилептиформных судорог у животных, генетически предрасположенных к эпилептиформной активности. Ранее нами было показано, что крысы линии KM

характеризуются повышенной активностью ERK1/2-киназ в височной коре, черной субстанции, дорзальном стриатуме и нижних буграх четверохолмия по сравнению с нечувствительными к звуку крысами линии Вистар [2, 4, 11]. Аудиогенная стимуляция судорожного припадка приводит к повышению фосфорилирования ERK1/2 в гиппокампе и височной коре крыс линии КМ через десятки секунд после начала стимуляции [3]. И более того, инактивация ERK1/2-киназ фармакологическим ингибитором активности MEK киназ SL327 приводит к значительному снижению тяжести аудиогенных судорожных припадков вплоть до полной их отмены. Активность ERK1/2-киназ в нейросекреторных нейронах гипоталамуса на наследственных моделях эпилепсии у крыс не изучалась. Известно, что в регуляции секреторной активности вазопрессинергических нейронов в условиях осмотической нагрузки принимают участие ERK1/2-киназы [12, 22]. Зависимость экспрессии вазопрессина от активности ERK1/2-киназ показана также в экспериментах с применением ингибиторов ERK1/2-киназ [16, 24], в том числе в нейросекреторных нейронах гипоталамуса [6, 22]. Ранее нами была показана пониженная секреторная активность вазопрессинергических нейронов гипоталамуса крыс линии КМ по сравнению с крысами линии Вистар. Звуковая стимуляция привела к значительному выбросу вазопрессина в кровь на клонико-тонической стадии судорожного припадка у крыс линии КМ [1].

В данном исследовании мы провели сравнительный анализ активности ERK1/2-каскада и уровня синтеза вазопрессина в нейросекреторных нейронах гипоталамуса крыс, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии, а также оценили активность этих киназ в ходе аудиогенного судорожного припадка и на разных сроках после его окончания.

МЕТОДИКА

В работе использованы половозрелые самцы крыс линии Вистар ($n = 6$) и крыс линии КМ ($n = 21$) в возрасте 4.5—5 месяцев массой 500—600 г. Животные содержались в клетках по 4—5 особей и имели свободный доступ к пище и воде. Все процедуры проводились согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, и были одобрены этической комиссией ИЭФБ РАН.

Для оценки межлинейных различий в активности ERK1/2-киназ и содержании вазопрессина и мРНК вазопрессина в гипоталамусе были использованы интактные крысы инбредной линии КМ ($n = 5$) и крысы линии Вистар ($n = 6$). Забор головного мозга для последующих морфофункциональных исследований проводился с 14.00 до 15.00 ч. После декапитации были взяты кровь и мозг с гипофизом для дальнейшего анализа. Головной мозг с гипофизом фиксировали погружением в 4%-ный раствор параформальдегида на фосфатно-солевом буфере при температуре 4 °С в течение 7 дней. После инкубации в 20%-ном растворе сахарозы ткань замораживали и изготавливали серии чередующихся срезов гипоталамо-гипофизарной системы, сделанных во фронтальной плоскости, толщиной 8 мкм.

На втором этапе исследования оценили влияние аудиогенного судорожного припадка на активность ERK1/2-киназ, транскрипционного фактора CREB и содержание cFos, вазопрессина и мРНК вазопрессина в гипоталамусе крыс линии КМ. Аудиогенный судорожный припадок был вызван звуковым стимулом интенсивностью 50 Дб и частотой 10 кГц. В эксперименте были проана-

лизированы 4 группы крыс линии КМ: 1) интактные крысы ($n = 4$); 2) крысы на стадии клонико-тонических судорог ($n = 4$); 3) через 1 ч после аудиогенного судорожного припадка ($n = 4$); 4) через 24 ч после аудиогенного судорожного припадка ($n = 4$). Забор головного мозга и гипофиза, а также подготовка материала для проведения иммуногистохимического окрашивания проводились так же, как в первой серии экспериментов.

Метод гибридизации in situ. Метод гибридизации *in situ* использовали для выявления мРНК вазопрессина. Меченная дигоксигенином мРНК вазопрессина была синтезирована *in vitro* транскрипционной реакцией с использованием линеализированной ДНК плазмиды (1 мкг), содержащей мРНК вазопрессина, с помощью коммерческого набора, содержащего дигоксигенин-меченные нуклеотиды, согласно инструкции производителя (Boehringer Mannheim, Германия). Гибридизацию проводили согласно принятой методике [15]. Срезы ацетилюровали в растворе ангидрида уксусной кислоты (0.25 %), содержащем 0.1 М триэтанолamina, дегидратировали в этиловом спирте и инкубировали в течение 12 ч при температуре 50 °С в гибридизационном растворе, содержащем меченную дигоксигенином рибопробу к мРНК вазопрессина. Затем срезы промывали в смеси хлорида и цитрата натрия (SSC) и формамида. Для визуализации мРНК вазопрессина, меченного дигоксигенином, срезы инкубировали с антителами к дигоксигенину (в разведении 1:250 на блокирующем растворе). Затем на срезы наносили раствор, содержащий NBT (nitro blue tetrazolium chloride) и BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) и оставляли инкубироваться в темноте во влажных камерах при комнатной температуре до проявления реакции. Для остановки реакции срезы промывали в буфере (100 мМ TRIS-HCl, 1 мМ EDTA, pH 9.5) в течение 15 мин и после дополнительной промывки в воде заключали в мовиол.

Иммуногистохимический анализ. Иммуногистохимический анализ был проведен стрептавидин-биотиновым методом по стандартному протоколу. Срезы инкубировали в растворе первичных антител против фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; 1:200, Cell Signaling Technology, № 4376), фосфо-CREB (Ser133; 1:600, Upstate № 05-807), cFos (1:1000, Calbiochem № PC38), SNAP25 (1:500, Chemicon № MAB331) и нейрофизина II (1:1000; PS 41, любезно предоставленных Dr. Harold Gainer, NIH, Bethesda, США) [7] в течение 18 ч при 24 °С (фосфо-ERK1/2, фосфо-CREB) или в течение 48 ч при 4 °С (cFos, нейрофизин II). Далее следовала инкубация с биотинилированными вторичными антителами против иммуноглобулинов G кролика или мыши (BA-1000 или BA-9200, Vector Laboratories, Inc.), разведенными 1:500 и с конъюгатом стрептавидина и пероксидазы хрена (S2438, Sigma-Aldrich) в разведении 1:700 в течение часа каждая. Для визуализации экзогенной пероксидазы хрена срезы инкубировали в растворе 3.3'-диаминобензидаина (0.05 %) и перекиси водорода (0.01 %) в течение 5 мин. После этого препараты обезвоживали путем проведения по спиртам восходящей концентрации и ксилолу и заключали. Все препараты серии были обработаны параллельно. Для оценки специфичности иммунного окрашивания в каждом случае делали отрицательный контроль (выполнение иммуногистохимической реакции без первичных антител), результатом чего было отсутствие иммунного окрашивания. Анализ производили с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Imager A1.

Морфометрический анализ препаратов. Оценка содержания фосфо-ERK1/2, фосфо-CREB, cFos, нейрофизина II и мРНК вазопрессина в нейронах гипоталамуса и SNAP25 в волокнах нейрогипофиза производилась на основании измерения оптической плотности иммунореактивного вещества и подсчета количества иммуномеченных клеток с помощью программного обеспе-

чения ВидеоТест. Данные были выражены в условных единицах оптической плотности или числом иммуномеченных клеток.

Статистический анализ данных. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Сравнение независимых выборок проводили с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни (Mann—Whitney U-test) или непараметрического теста Краскела—Уоллиса (Kruskal—Wallis test) с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Межлинейные различия. Фосфо-ERK1/2 и фосфо-CREB были выявлены в нейронах гипоталамуса с помощью иммуногистохимического метода. Оптическая плотность фосфо-ERK1/2-иммунореактивного вещества в СОЯ крыс линии КМ (0.127 ± 0.010) не отличалась от крыс линии Вистар (0.129 ± 0.020). При подсчете количества фосфо-ERK1/2-иммунопозитивных клеток (Вистар 13.5 ± 4 и КМ 12.5 ± 3) и фосфо-CREB-иммунопозитивных ядер (Вистар 56.3 ± 11 и КМ 61.3 ± 9) в нейронах СОЯ мы не выявили достоверных различий между крысами линии Вистар и крысами линии КМ. Полученные данные указывают на то, что активность ERK1/2 и/или CREB опосредованной регуляции активности нейросекреторных нейронов гипоталамуса не различается у крыс линий Вистар и КМ.

Содержание мРНК вазопрессина в нейронах СОЯ было оценено с помощью метода гибридизации *in situ*. Мы не выявили различий по оптической плотности метки (Вистар 0.136 ± 0.040 и КМ 0.128 ± 0.020) и количеству меченых клеток у крыс линии Вистар (90.1 ± 10) и крыс линии КМ (98.3 ± 9). Отсутствие достоверных различий в содержании мРНК вазопрессина в СОЯ гипоталамуса крыс линии Вистар и крыс линии КМ свидетельствует о схожем базальном уровне транскрипции вазопрессина в нейронах гипоталамуса крыс исследованных линий. Полученные нами данные об отсутствии различий в транскрипции вазопрессина совпадают с данными об отсутствии различий в активности ERK1/2-киназ и CREB.

Для оценки содержания и распределения вазопрессина в нейронах гипоталамо-гипофизарной системы был выявлен вазопрессин-нейрофизин II с помощью иммуногистохимического анализа. В СОЯ крыс линии КМ средняя оптическая плотность метки в нейронах ниже (рис. 1), чем у крыс линии Вистар. В задней доле гипофиза у крыс линий Вистар (0.096 ± 0.012) и КМ (0.105 ± 0.011) содержание фосфо-ERK1/2-киназ не отличалось. Однако ранее было показано накопление вазопрессин-нейрофизин II-иммунореактивного вещества в задней доле гипофиза крыс линии КМ на фоне пониженной концентрации вазопрессина в крови у этих животных [1], что позволяет предположить нарушение секреции вазопрессина из задней доли гипофиза на фоне неизменной транскрипции. Для того чтобы проверить это предположение, мы также проанализировали содержание SNAP25 в волокнах нейрогипофиза крыс линий Вистар и КМ. У крыс линии КМ содержание SNAP25 в волокнах нейрогипофиза было выше, чем у крыс линии Вистар (рис. 2).

Влияние судорожного припадка. На клонико-тонической стадии судорожного припадка количество фосфо-CREB-иммунопозитивных ядер в нейронах СОЯ было снижено (рис. 3, А), а количество фосфо-ERK1/2-иммунопозитивных клеток не изменялось по сравнению с контрольными животными (рис. 3, Б). Через 1 ч после аудиогенного припадка количество фосфо-ERK1/2-им-

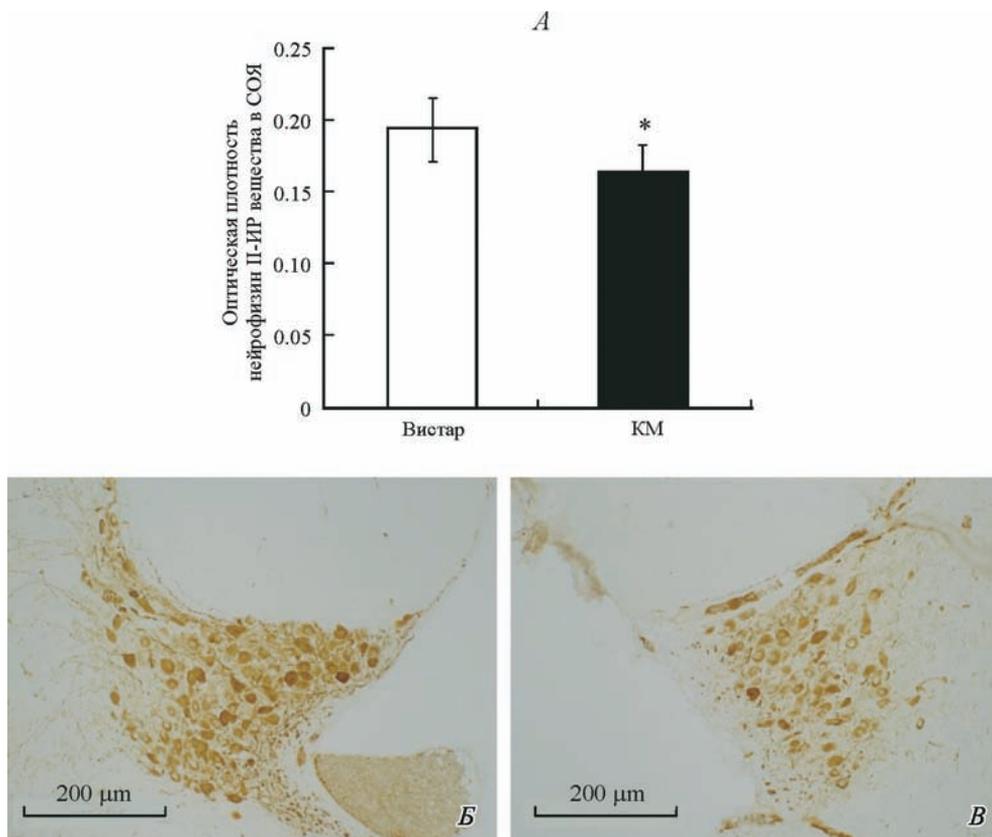


Рис. 1. Супраоптическое ядро гипоталамуса intactных крыс линий Вистар и КМ.

A — оптическая плотность нейрофизин II-иммунореактивного вещества. *Белые столбики* — крысы линии Вистар; *темные столбики* — intactные крысы линии КМ. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. * $p < 0.05$ — статистически достоверные различия между линиями крыс. Нейрофизин II-иммунопозитивные клетки в супраоптическом ядре крыс линии Вистар (*Б*) и линии КМ (*Б'*).

мунопозитивных клеток в СОЯ было выше, чем в контроле (рис. 3, *Б*). Количество фосфо-CREB-иммунопозитивных ядер через 1 ч после судорог не отличалось от такового в контрольной группе, однако достоверно возросло по сравнению с таковым на стадии клонико-тонических судорог (рис. 3, *А*). Через 24 ч после припадка активность ERK1/2-киназа в нейронах СОЯ восстанавливалась до уровня контроля (рис. 3, *Б*). При этом количество фосфо-CREB-иммунопозитивных ядер в нейронах СОЯ увеличивалось еще значительно (рис. 3, *А*). Полученные данные свидетельствуют о том, что активация ERK1/2 сигнального пути запускается после завершения судорожного припадка и приводит к увеличению активности транскрипционного фактора CREB.

Количество cFos-иммунопозитивных ядер в нейронах СОЯ крыс линии КМ на клонико-тонической стадии судорожного припадка не отличалось от значений в контроле (рис. 3, *Б*). Через 1 ч после припадка количество cFos-иммунопозитивных ядер в нейронах СОЯ крыс линии КМ превышало значения в контроле и на клонико-тонической стадии припадка, а через 24 ч снижалось до контрольных значений (рис. 3, *Б*). В СОЯ гипоталамуса крыс линии

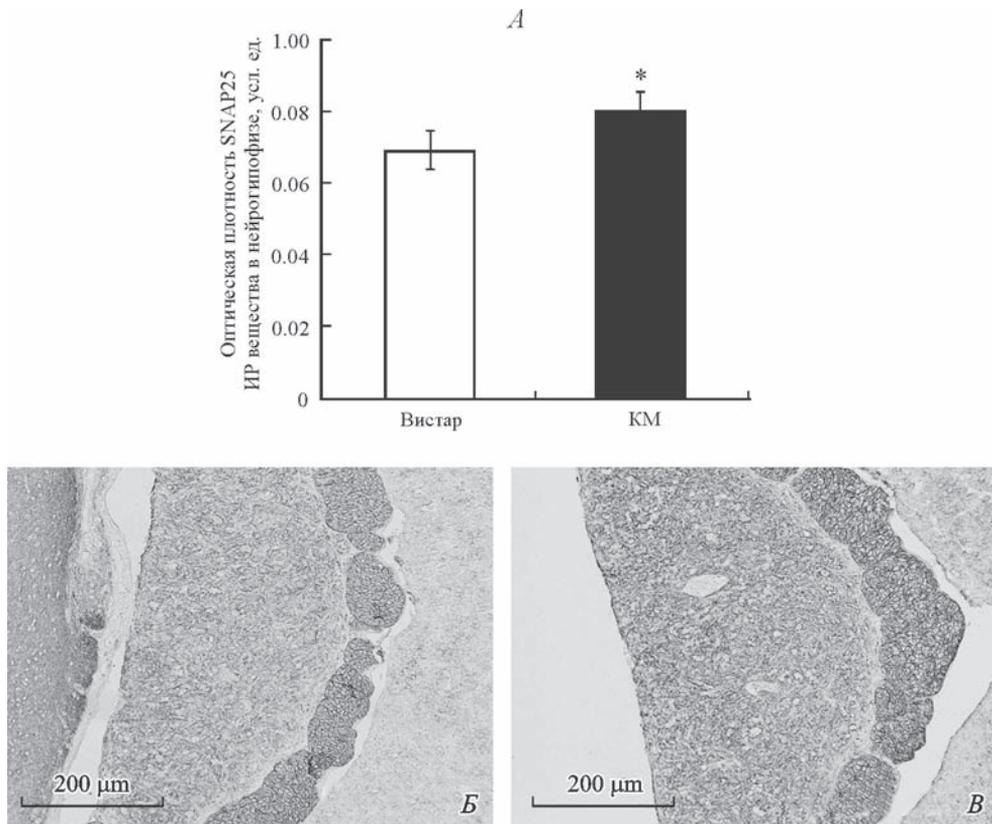


Рис. 2. Задняя доля гипофиза intactных крыс линий Вистар и KM.

A — оптическая плотность SNAP25-иммунореактивного вещества. *Белые столбики* — крысы линии Вистар; *темные столбики* — intactные крысы линии KM. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. * $p < 0.05$ — статистически достоверные различия между линиями крыс. Иммуногистохимическое выявление SNAP25 в задней доле гипофиза крыс линии Вистар (*B*) и линии KM (*B*).

KM оптическая плотность мРНК вазопрессина на клонико-тонической стадии припадка была понижена, а через 1 ч после припадка возвращалась к контрольным значениям, при этом значительно превышала значения, характерные для клонико-тонической стадии (рис. 4, *A*). Мы не выявили различий в оптической плотности вазопрессин-нейрофизин II-иммунопозитивного вещества в СОЯ на клонико-тонической стадии припадка (рис. 4, *B*). Однако через 1 ч после окончания припадка содержание вазопрессина в СОЯ возрастало. Динамика содержания мРНК вазопрессина и нейрофизина II в нейронах СОЯ хорошо согласуется с динамикой фосфорилирования ERK1/2-киназ и транскрипционного фактора CREB, а также с содержанием белка cFos.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования активности ERK1/2-зависимой регуляции нейросекреторных нейронов гипоталамуса на генетических моделях эпилепсии ранее не проводились. Целью данной работы была оценка активности киназ ERK1/2-каска-

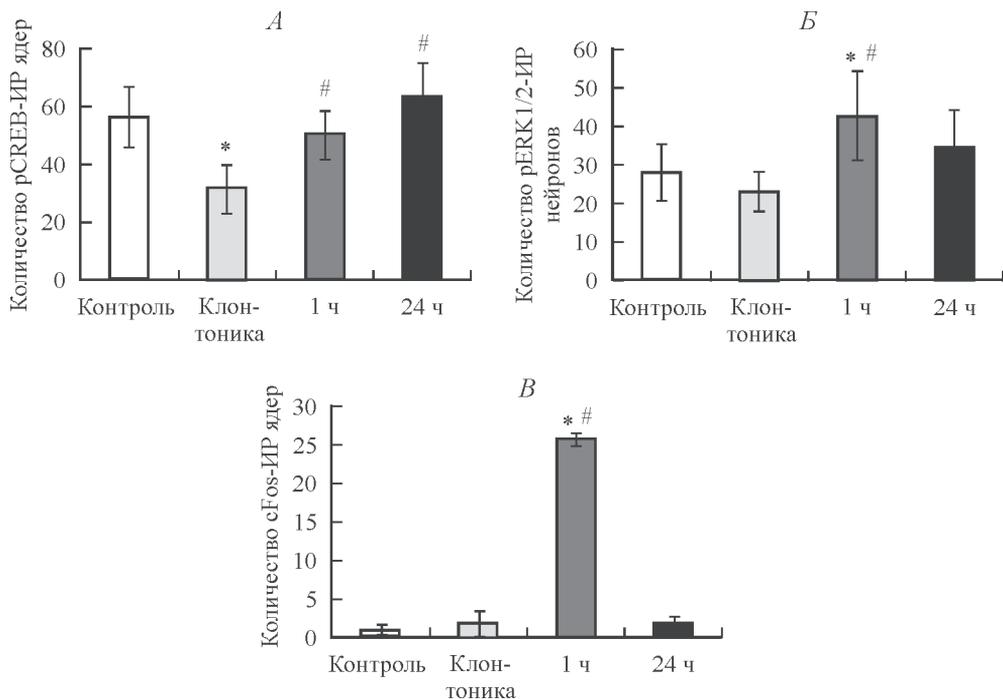


Рис. 3. Супраоптическое ядро гипоталамуса интактных крыс линии КМ, подвергнутых звуковой стимуляции.

A — число фосфо-CREB-иммунопозитивных клеток у контрольных крыс (контроль), на клонико-тонической стадии судорожного припадка (клон-тоника), через 1 час (1 ч) после окончания судорожного припадка; *B* — число фосфо-ERK1/2-иммунопозитивных клеток у контрольных крыс (контроль), на клонико-тонической стадии судорожного припадка (клон-тоника), через 24 часа (24 ч) после окончания судорожного припадка; *B* — число cFos-иммунопозитивных клеток у контрольных крыс (контроль), на клонико-тонической стадии судорожного припадка (клон-тоника), через 1 ч (1 ч) и через 24 ч (24 ч) после окончания судорожного припадка. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. * Достоверность различий по сравнению с контрольной группой крыс при $p < 0.05$; # достоверность различий по сравнению с группой крыс на клонико-тонической стадии судорожного припадка.

да в нейросекреторных нейронах гипоталамуса интактных крыс линии КМ, а также в ходе и после судорожного припадка.

Мы не выявили межлинейных различий в содержании фосфо-ERK1/2-киназ ни в СОЯ, ни в задней доле гипофиза у крыс линий КМ и Вистар. Одной из мишеней ERK1/2-каскада является транскрипционный фактор CREB [10], активность которого регулируется путем фосфорилирования CREB по Ser 133. Оценка активности транскрипционного фактора CREB, фосфорилированного по Ser 133, в нейронах СОЯ показала отсутствие межлинейных различий в количестве фосфо-CREB-иммунореактивных ядер. Ранее была показана важная роль ERK1/2/CREB в регуляции транскрипции вазопрессина [6, 24]. Мы не выявили различий в уровне транскрипции вазопрессина в СОЯ крыс линий Вистар и КМ. Полученные данные указывают на то, что активность ERK1/2 и/или CREB опосредованной регуляции активности нейросекреторных нейронов гипоталамуса не различается у крыс исследованных линий. Пониженный уровень нейрофизина II в нейронах СОЯ крыс линии КМ по сравнению с нечувствительными к звуку крысами линии Вистар в совокупности с показанным у них ранее накоплением нейрофизина II в нейрогипофизе и снижением

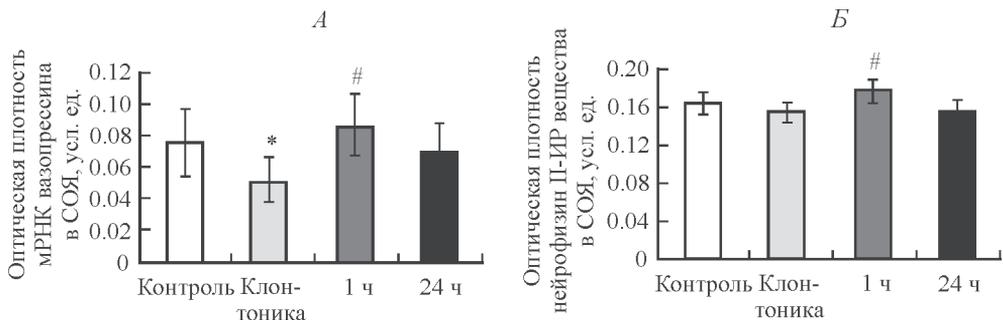


Рис. 4. Супраоптическое ядро гипоталамуса интактных крыс линии КМ, подвергнутых звуковой стимуляции.

A — оптическая плотность мРНК вазопрессина в СОЯ у контрольных крыс (контроль), на клонико-тонической стадии судорожного припадка (клон-тоника), через 1 и 24 ч после окончания судорожного припадка; *B* — оптическая плотность нейрофизин-II иммунореактивного вещества в СОЯ у контрольных крыс (контроль), на клонико-тонической стадии судорожного припадка (клон-тоника), через 1 и 24 ч после окончания судорожного припадка. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. * Достоверность различий по сравнению с контрольной группой крыс при $p < 0.05$; # достоверность различий по сравнению с группой крыс на клонико-тонической стадии судорожного припадка.

уровня вазопрессина в периферической крови [1] указывает на то, что у этих крыс происходит торможение секреции вазопрессина за счет снижения интенсивности экзоцитоза содержимого нейросекреторных гранул в задней доле гипофиза. На нарушение реализации экзоцитоза указывает также повышенное содержание одного из белков SNARE комплекса SNAP25 в нейрогипофизе крыс линии КМ по сравнению с крысами линии Вистар, так как было показано, что низкое содержание SNAP25 коррелирует с усилением экзоцитоза [13, 22, 23].

Полученные данные указывают на то, что ERK1/2- и/или CREB-зависимые пути регуляции экспрессии вазопрессина нейросекреторными нейронами СОЯ у крыс линий КМ и Вистар не различаются. При этом выявленные нарушения в активности гипоталамо-гипофизарной системы у крыс линии КМ затрагивают преимущественно механизмы секреции нейрогормонов.

Мы не выявили различий в содержании фосфо-ERK1/2-киназ в гипоталамо-гипофизарной системе крыс линии КМ на клонико-тонической стадии судорожного припадка. Однако уже через 1 ч после припадка количество фосфо-ERK1/2-иммунопозитивных клеток, а также содержание фосфо-ERK1/2-киназы повысилось в нейронах СОЯ. Через 24 ч после судорожного припадка содержание фосфо-ERK1/2 в нейронах СОЯ было также повышено по сравнению с контрольными значениями. Различий в содержании фосфо-ERK1/2-киназ в задней доле гипофиза у крыс линии КМ в ходе и после завершения судорожного припадка выявлено не было. При этом количество фосфо-CREB-иммунопозитивных ядер в нейронах СОЯ значительно снизилось на клонико-тонической стадии судорожного припадка. Через 1 и 24 ч после судорожного припадка количество фосфо-CREB-иммунопозитивных ядер достоверно возросло до контрольных значений, что позволило предположить активацию транскрипции вазопрессина после окончания судорожного припадка.

В пользу этого предположения свидетельствует повышение количества cFos-иммуномеченных ядер в нейронах СОЯ через 1 ч после припадка. Продукт гена раннего ответа cFos часто используется как маркер активации клет-

ки. В нейросекреторных нейронах гипоталамуса показана стимул-специфичная экспрессия cFos [18]. Хотя, по данным литературы, сравнение динамики экспрессии вазопрессина и содержания cFos-белка в нейронах гипоталамуса указывает на то, что cFos регулирует экспрессию вазопрессина, но не является фактором ее индукции [5].

И действительно, мы показали, что секреция вазопрессина в кровь на клонико-тонической стадии судорожного припадка [1] происходит на фоне снижения содержания мРНК вазопрессина в СОЯ. Через 1 и 24 ч после завершения судорожного припадка происходит восстановление уровня транскрипции, что может быть вызвано активацией ERK1/2-сигнального каскада и повышением экспрессии cFos. Таким образом, повышение активности ERK1/2-зависимого пути, участвующего в регуляции синтеза вазопрессина [6], через 1 и 24 ч после судорожного припадка хорошо согласуется с повышением уровня вазопрессина в нейронах СОЯ до контрольных значений. Мы предполагаем, что повышение активности ERK1/2-киназ в нейронах гипоталамуса определяет скорее компенсаторный ресинтез вазопрессина после выброса нейрогормона в кровь, чем сама его секрецию.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в отличие от нейронов черной субстанции гиппокампа и височной коры, демонстрирующих повышенный по сравнению с крысами Вистар уровень фосфо-ERK1/2 у крыс линии КМ [2, 4, 11], нарушение регуляции секреции вазопрессина нейронами гипоталамуса у крыс линии КМ в норме не зависит от ERK1/2-сигнального каскада. И более того, аудиогенная стимуляция судорожного припадка, приводящая к повышению фосфорилирования ERK1/2 в гиппокампе и височной коре крыс линии КМ через десятки секунд после начала стимуляции [3], несмотря на генерализованный характер возбуждения, не приводит к повышению содержания фосфо-ERK1/2-киназ в телах и аксонах нейросекреторных нейронов гипоталамуса в ходе судорожного припадка.

Полученные данные указывают на то, что нарушения в регуляции базальной активности гипоталамо-гипофизарной системы у крыс линии КМ затрагивают преимущественно механизмы секреции нейрогормонов, не влияя на активность ERK1/2- и/или CREB-зависимого пути регуляции экспрессии вазопрессина нейросекреторными нейронами СОЯ. Судорожный припадок приводит к выбросу вазопрессина, а восстановление состояния вазопрессинергической системы после судорожного припадка (компенсаторный ресинтез) происходит, по-видимому, ERK1/2/CREB-зависимым путем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-34-00882) и гос. задания по теме № АААА-А18-118012290371-3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Горбачёва Е. Л., Гагарская А. С., Черниговская Е. В., Глазова М. В., Никитина Л. С. Исследование секреции вазопрессина у крыс линии Крушинского—Молодкиной в норме и в ходе судорожного припадка. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 101(12): 1347—1354. 2015.

[2] Дорофеева Н. А., Глазова М. В., Худик К. А., Никитина Л. С., Кириллова О. Д., Черниговская Е. В. Сравнительный анализ nigro-стриатной системы крыс Вистар и крыс с повышенной судорожной готовностью. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 51(3): 204—213. 2015.

[3] Коротков А. А., Глазова М. В., Никитина Л. С., Дорофеева Н. А., Кириллова О. Д., Черниговская Е. В. Роль ERK1/2 киназ в молекулярных механизмах регуляции глутамат- и

ГАМКергических нейронов в ходе развития судорожных припадков у крыс линии Крушинского—Молодкиной. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 101(10): 1135—1149. 2015.

[4] Черниговская Е. В., Лебедеко О. О., Ниденфюр А. В., Никитина Л. С., Глазова М. В. Анализ киназ ERK1/2 в нижних буграх четверохолмия в постнатальном онтогенезе у крыс с повышенной судорожной готовностью. Докл. АН. 476(1): 296—298. 2017.

[5] Arima H., Baler R., Aguilera G. Fos proteins are not prerequisite for osmotic induction of vasopressin transcription in supraoptic nucleus of rats. Neurosci. letters. 486(1): 5—9. 2010.

[6] Arima H., House S. B., Gainer H., Aguilera G. Neuronal activity is required for the circadian rhythm of vasopressin gene transcription in the suprachiasmatic nucleus in vitro. Endocrinology. 143(11): 4165—4171. 2002.

[7] Ben-Barak Y., Russell J. T., Whitnall M. H., Ozato K., Gainer H. Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system. I. Production and characterization of monoclonal antibodies. J. Neurosci. 5(1): 81—97. 1985.

[8] Berkeley J. L., Decker M. J., Levey A. I. The role of muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in pilocarpine-induced seizures. J. Neurochem. 82(1): 192—201. 2002.

[9] Bhat R. V., Engber T. M., Finn J. P., Koury E. J., Contreras P. C., Miller M. S., Dionne C. A., Walton K. M. Region-specific targets of p42/p44MAPK signaling in rat brain. J. Neurochem. 70(2): 558—571. 1998.

[10] Cammarota M., Bevilacqua L. R., Dunkley P. R., Rostas J. A. Angiotensin II promotes the phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) at Ser133 through an ERK1/2-dependent mechanism. J. Neurochem. 79(6): 1122—1128. 2001.

[11] Chernigovskaya E. V., Korotkov A. A., Nikitina L. S., Dorofeeva N. A., Glazova M. V. The expression and distribution of seizure-related and synaptic proteins in the insular cortex of rats genetically prone to audiogenic seizures. Neurol. Res. 37(12): 1108—1117. 2015.

[12] Dine J., Ducourneau V. R., Fenelon V. S., Fossat P., Amadio A., Eder M., Israel J. M., Oliet S. H., Voisin D. L. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in forebrain neurons contributes to osmoregulatory mechanisms. J. Physiol. 592(7): 1637—1654. 2014.

[13] Eisenhofer G., Huynh T. T., Elkahloun A., Morris J. C., Bratslavsky G., Linehan W. M., Zhuang Z., Balgley B. M., Lee C. S., Mannelli M., Lenders J. W., Bornstein S. R., Pacak K. Differential expression of the regulated catecholamine secretory pathway in different hereditary forms of pheochromocytoma. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 295(5): 1223—1233. 2008.

[14] Gillis B. J., Cain D. P. Amygdala and pyriform cortex kindling in vasopressin deficient rats (Brattleboro strain). Brain Res. 271(2): 375—378. 1983.

[15] Glasgow E., Kusano K., Chin H., Mezey E., Young W. S., Gainer H. Single cell reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of rat supraoptic magnocellular neurons: neuropeptide phenotypes and high voltage-gated calcium channel subtypes. Endocrinology. 140(11): 5391—5401. 1999.

[16] Grassi D., Ghorbanpoor S., Acaz-Fonseca E., Ruiz-Palmero I., Garcia-Segura L. M. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates arginine-vasopressin gene expression in human female neuroblastoma cells through G protein-coupled estrogen receptor and ERK signaling. Endocrinology. 156(10): 3706—3716. 2015.

[17] Greenwood R. S., Meeker R., Sullivan H., Hayward J. N. Kindling in spontaneous hypertensive rats. Brain Res. 495(1): 58—65. 1989.

[18] Hoffman G. E., Smith M. S., Verbalis J. G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol. 14(3): 173—213. 1993.

[19] Kang U. G., Hong K. S., Jung H. Y., Kim Y. S., Seong Y. S., Yang Y. C., Park J. B. Activation and tyrosine phosphorylation of 44-kDa mitogen-activated protein kinase (MAPK) induced by electroconvulsive shock in rat hippocampus. J. Neurochem. 63(5): 1979—1982. 1994.

[20] Kasting N. W., Veale W. L., Cooper K. E., Lederis K. Vasopressin may mediate febrile convulsions. Brain Res. 213(2): 327—333. 1981.

[21] Nateri S., Raivich G., Gebhardt C., Costa C., Naumann H., Vreugdenhil M., Makwana M., Brandner S., Adams R., Jefferys J. G., Kann O., Behrens A. ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. EMBO J. 26(23): 4891—4901. 2007.

[22] Nikitina L. S., Dorofeeva N. A., Kirillova O. D., Korotkov A. A., Glazova M. V., Chernigovskaya E. V. Role of the ERK signaling pathway in regulating vasopressin secretion in dehydrated rats. *Biotech. Histochem.* 89(3): 199—208. 2014.

[23] Sorensen J. B., Matti U., Wei S. H., Nehring R. B., Voets T., Ashery U., Binz T., Neher E., Rettig J. The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(3): 1627—1632. 2002.

[24] Yoshida M., Iwasaki Y., Asai M., Takayasu S., Taguchi T., Itoi K., Hashimoto K., Oiso Y. Identification of a functional AP1 element in the rat vasopressin gene promoter. *Endocrinology.* 147(6): 2850—2863. 2006.

Поступила 17 V 2018