

ДУБЫНИНА Елена Вячеславовна

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В
ГИППОКАМПЕ КРЫСЫ АЛЬФА-МЕЛАНКОРТИНОМ И ЕГО
АНАЛОГАМИ**

03.00.13 - физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2009.

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной генетики соматических клеток
Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики Института молекулярной
генетики РАН.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: кандидат биологических наук

Олег Валентинович Долотов

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор биологических наук, профессор

Раиса Александровна Данилова

доктор биологических наук

Наталья Александровна Крупина

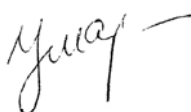
ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Учреждение Российской академии наук Институт
Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Защита диссертации состоится " 21 " декабря 2009 года в 15 ч 30 мин на заседании
диссертационного совета Д501.001.93 при Московском государственном
университете им. М.В. Ломоносова по адресу Москва, 119992, Ленинские горы,
МГУ, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ
им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан " 21 " ноября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,



доктор биологических наук

Б. А. УМАРОВА

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Центральная нервная система (ЦНС) чрезвычайно сложна как на молекулярном и клеточном, так и на структурно-функциональном уровне организации. В число задач, решаемых ЦНС, входит управление движениями, сенсорными и гомеостатическими процессами, многогранными проявлениями высшей нервной деятельности. Успехи современной нейробиологии позволили накопить значительное количество информации о таких важнейших функциях ЦНС, как обучение и память. Однако их молекулярные основы остаются в значительной мере неясными. Основным свойством нервной системы, обеспечивающим эти процессы, является ее пластичность, изучение которой позволит лучше понять механизмы интеграции высших функций мозга. Все процессы, происходящие в нервной системе, направляются на молекулярном уровне целым комплексом веществ-регуляторов. Их поиск, определение способа и области их влияния на пластичность, развитие и регенерацию нервной системы является одной из основных задач нейробиологии.

Неотъемлемой частью современной жизни является такое явление, как стресс - неспецифическая реакция организма на экстремальное воздействие, физическое или психологическое. Согласно концепции общего адаптационного синдрома, умеренное воздействие стрессогенного фактора может повышать защитный потенциал организма в ответ на действие не только данного, но и любого другого повреждающего агента. К адаптациям при стрессе относятся повышение уровня генерализованной активации организма ("*arousal*"), фокусировка внимания и улучшение памяти, а также стресс-вызванная анальгезия. Однако при таких нарушениях, как генетические заболевания, биогенные или абиогенные повреждения ЦНС, а также слишком резко и драматично меняющиеся внешние условия, центральная нервная система теряет свою способность к адаптации. Нарушения адаптационных функций лежат в основе множества патологических состояний ЦНС, среди которых можно назвать депрессию, хронический стресс и психические заболевания. Изучение физиологии стресса и связанных с ней молекулярных реакций, в частности, в ЦНС, является важнейшей задачей современной биологии и медицины, поскольку только понимание механизмов возникновения и развития заболеваний поможет найти по-настоящему действенные способы их лечения.

Показано, что при стрессе наряду с увеличением концентрации в крови адренокортикотропного гормона (АКТГ) происходит увеличение уровня альфа-

меланокортина (альфа-меланотропин, альфа-меланоцитстимулирующий гормон - α -МСГ). Роль этого представителя пептидного семейства меланокортинов (МК) в осуществлении стрессорных реакций организма до конца не выяснена и представляется крайне интересной в свете ряда его функциональных особенностей. Пептиды семейства меланокортинов способны оказывать нейропротекторные эффекты и вызывать регенерацию нервной ткани (Strand, 1999). Кроме того, в многочисленных исследованиях у МК была выявлена способность стимулировать внимание, обучение и формирование памяти (Stratton and Kastin, 1975). Таким образом, эти пептиды обладают одновременно нейропротекторными и ноотропными свойствами. Однако механизмы их действия на нервную систему до сих пор во многом остаются неясными. Одним из возможных путей развития эффектов МК является их влияние на уровни экспрессии в ЦНС нейротрофических факторов – мощных регуляторов как выживания и дифференцировки нейронов, так и когнитивных функций.

Изучение механизмов нейропротекторного действия меланокортинов является актуальным и фундаментально значимым для понимания молекулярно-биологических процессов, лежащих в основе поддержания нормального функционирования ЦНС в неблагоприятных условиях, в частности, при стрессе.

Цель и задачи исследования.

Целью данной работы являлось изучение механизмов нейропротекторных и когнитивных эффектов α -МСГ и его аналогов, включая исследование влияния данных соединений на экспрессию в гиппокампе крысы ряда нейротрофических факторов.

Основные задачи исследования состояли в следующем:

- изучить изменения уровня α -МСГ в плазме крови крысы в условиях острого стресса, вызванного принудительным плаванием
- изучить влияние меланокортинов на уровень активации транскрипционного фактора CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*) в гиппокампе крысы
- изучить влияние меланокортинов на уровни нейротрофинов (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor* и NGF, *nerve growth factor*) в гиппокампе крысы *in vivo*
- изучить влияние меланокортинов на уровни экспрессии нейротрофических факторов BDNF и VEGF (*vascular endothelial growth factor*) в клетках гиппокампа крысы *in vitro*

- оценить вовлеченность меланокортинового рецептора 4-го подтипа MC4R в осуществление эффектов представителей семейства меланокортинов на уровне BDNF и VEGF в клетках гиппокампа крысы *in vitro*

Научная новизна и практическая значимость работы.

В представляемой работе было впервые показано, что эндогенный меланокортин α -МСГ способен оказывать влияние на экспрессию BDNF в гиппокампе крысы *in vivo*, и получены данные в пользу участия транскрипционного фактора CREB в осуществлении этого влияния. Впервые изучено изменение уровня BDNF в первичной культуре нейронов гиппокампа крысы, а также изменение уровней нейротрофических факторов BDNF и VEGF в первичной культуре астроцитов гиппокампа крысы под действием представителей семейства меланокортинов. Получены данные об участии MC4R в реализации этого эффекта. Впервые получены данные о динамике изменения уровня α -МСГ в плазме крови крысы при остром стрессе, вызванном принудительным плаванием.

Результаты исследования представляют научно-практический интерес в связи с тем, что регуляция экспрессии нейротрофинов и их рецепторов в мозге рассматривается как один из перспективных путей воздействия на ряд патологических состояний ЦНС, связанных с дегенерацией и гибелью нейронов, в том числе обусловленных таким негативным, и в то же время широко распространенным в современной жизни, явлением, как дистресс. Известные к настоящему времени соединения, которые могут рассматриваться в качестве кандидатов на роль регуляторов экспрессии нейротрофинов в мозге, например, антидепрессанты, обладают существенными побочными эффектами, что ограничивает их применение.

Данные о влиянии МК на экспрессию нейротрофических факторов в гиппокампе крысы позволяют предложить возможный механизм наблюдаемых ноотропных и нейропротекторных эффектов этих соединений, что может быть использовано для разработки новых пептидных фармакологических средств, а также для расширения спектра показаний и противопоказаний использования уже известных лекарственных форм. В частности, данные об участии Семакса в регуляции экспрессии нейротрофинов могут предоставить дополнительную информацию для дальнейших клинических исследований лекарственного препарата "Семакс". Доказательства вовлеченности MC4R в регуляцию экспрессии нейротрофических

факторов в мозге позволяют вести поиск новых ноотропных и нейропротекторных препаратов среди соединений - агонистов указанного типа рецепторов.

Апробация работы.

Материалы диссертационной работы были представлены автором на Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Пушино, Россия, 2007), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, Россия, 2008), конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург, Россия, 2008), Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, Россия, 2009), а также на семинарах ОВКМГ Института молекулярной генетики РАН и межлабораторных семинарах, совместных с ОХФАВ Института молекулярной генетики РАН. В завершённом виде результаты диссертационной работы были представлены на заседании Ученого совета Института молекулярной генетики РАН 02 ноября 2009 г.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для соискателей ученых степеней и тезисы 6 докладов в материалах российских конференций.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включает 2 таблицы и 32 рисунка. Библиография включает 359 названий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты на культурах астроцитов и нейронов гиппокампа крысы.

Культуры астроцитов и нейронов гиппокампа крысы. Первичную культуру клеток астроцитов получали согласно стандартной методике (Cole and de Vellis, 1989). Использовали крыс линии Sprague-Dowly возраста 1-3 дня. Выделенные гиппокампы механически диссоциировали на отдельные клетки. Полученную клеточную суспензию засеивали на обработанные поли-L-лизином пластиковые чашки Петри в среде с сывороткой и комплексом добавок. Для экспериментов использовали полученные после третьего пересева клетки, достигшие монослоя в лунках пластикового культурального планшета. Первичную культуру нейронов гиппокампа получали из 16–18-дневных эмбрионов крыс линии Sprague-Dowly по стандартной методике (Hefti F., 1989). Выделенные гиппокампы механически диссоциировали на отдельные клетки. Полученную клеточную суспензию засеивали на обработанные поли-L-лизином пластиковые планшеты в бессывороточной среде с комплексом добавок. Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °С.

Проведение эксперимента. В ходе эксперимента в соответствующие лунки планшета с культурой нейронов или астроцитов вносили растворы в PBS (фосфатно-солевом буфере) тестируемых соединений: α-МСГ (Sigma, США) и Семакса (синтезирован в ИМГ РАН) в объеме 10 мкл на лунку (нейроны) или 50 мкл на лунку (астроциты) до указанных конечных концентраций, и HS028 (Sigma, США) в объеме 1 мкл на лунку (нейроны) или 5 мкл на лунку (астроциты) до концентрации 10⁻⁹ моль/л. В качестве контроля вводили равный объем PBS. Планшет помещали в CO₂ инкубатор, 37 °С. Через указанные промежутки времени отбирали культуральную среду, клетки промывали холодным (4 °С) PBS и вносили в лунки экстракционный буфер (в случае последующего выделения белка) или Rneasy Lysis Buffer (в случае последующего выделения РНК).

МТТ-тест на количество живых клеток. В лунки 96-луночного культурального планшета с клетками вносили МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н тетразолиум бромид, ICN, США) до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Инкубировали 3 часа при 37 °С. Отбирали из лунок культуральную среду и вносили по 25 мкл DMSO на лунку. Инкубировали 20 мин при комнатной температуре на шейкере. С использованием планшетного спектрофотометра Metertech Σ960 определяли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 600 нм, являющуюся величиной, прямо пропорциональной количеству живых клеток в лунке.

Определение уровней мРНК исследуемых генов в культурах астроцитов и нейронов гиппокампа крысы методом ПЦР. Оценку уровня мРНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Полученные относительные количества продуктов для BDNF и VEGF нормализовали по относительному количеству продукта для GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа). Тотальную РНК выделяли из образцов с помощью фенол-хлороформной экстракции с использованием реактива RneqGold TriFast (RneqLabs, Германия) в соответствии с методикой и рекомендациями производителя. Полученную РНК обрабатывали в соответствии с методикой производителя ДНКазой I (Fermentas, Литва). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV)-обратной транскриптазы. Оценку уровней мРНК исследуемых генов проводили методом полуколичественной ПЦР с использованием набора реагентов фирмы "Силекс" (Россия) в соответствии с методикой и рекомендациями производителя в амплификаторе "Терцик" (ДНК-Технология, Россия). ПЦР проводили согласно следующей схеме (Табл. 1):

Таблица 1. Условия проведения амплификации

режим	температура	время	число циклов
начальная	50 °С	2 мин	1
денатурация	95 °С	5 мин	1
денатурация	95 °С	45 сек	29-39
отжиг праймеров	64-68 °С	1 мин	
элонгация	72 °С	1 мин	
завершающая элонгация	72 °С	10 мин	1

Для каждой использованной пары праймеров были предварительно подобраны условия ПЦР: оптимальная температура отжига праймеров и оптимальное количество циклов амплификации (соответствующее экспоненциальному росту кривой амплификации) (см. табл. 2).

Продукты разделяли электрофоретически с визуализацией с помощью бромистого этидия. Калибровочную кривую получали введением в реакцию кДНК известных относительных концентраций. С помощью системы AlphaImager2000 (Alpha Innotech Corporation) определяли интенсивность свечения в УФ-свете соответствующего продукта. Затем, с использованием программного обеспечения

производителя получали значения исходных относительных количеств соответствующих кДНК, и проводили их нормализацию относительно GAPDH.

Таблица 2. Последовательности использованных в работе праймеров и условия ПЦР.

ген	последовательности праймеров (прямой и обратный)	длина продукта	число циклов	температура отжига
GAPDH	5'-TCCATGACAACCTTTGGCATTGTGG-3' 5'-GTTGCTGTTGAAGTCGCAGGAGAC-3'	376 пн	29	66 °С
BDNF	5'-CACAGCGGCAGATAAAAAGA-3' 5'-CGGCAACAACCACAAGATT-3'	527 пн	39	64 °С
MC ₄ R	5'-AGTCTCTGGGGAAGGGGCA-3' 5'-CAACTGATGATGATCCCCGAC-3'	422 пн	38	64 °С
VEGF	5'-TGCACCCACGACAGAAGGGGA-3' 5'-TCACCGCCTTGGCTTGTCACA-3'	567 пн 495 пн 435 пн 363 пн	36	68 °С

Определение уровней белка BDNF в культурах нейронов гиппокампа крысы методом иммуноферментного анализа. По истечении времени инкубации с тестируемыми соединениями, из лунок планшетов отбирали культуральную среду, клетки промывали холодным (4 °С) PBS, помещали планшет на лед и вносили в каждую лунку модифицированный экстракционный буфер (Pollock et al., 2001). После 4-х кратного замораживания (-70 °С) – оттаивания (25 °С) планшет выдерживали на шейкере в течение 1 часа (4 °С), а затем помещали на тающий лед. После пипетирования содержимого каждой лунки, образцы переносили в микропробирки “эппендорф”. Центрифугировали 120 мин при 16000 g (4 °С), супернатант переносили в новые пробирки и исследовали методом иммуноферментного анализа с использованием набора BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega, USA) и автоматического промывателя планшетов ПП2 428 (Иммедтех, Россия), следуя рекомендациям производителя. Оптическую плотность в лунках определяли с использованием планшетного спектрофотометра Metertech Σ960 при длине волны 450 нм. Исходя из прямой пропорциональности между величиной оптической плотности и концентрацией BDNF в стандартных образцах, вычисляли концентрацию BDNF в исследуемых образцах.

Эксперименты на животных *in vivo*.

Животные. В экспериментах использовали самцов крыс линии Wistar массой 250-300 г, полученных из питомника лабораторных животных “Пушино”. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище и 12-ти часовым циклом освещения. Были созданы все условия для минимизации

стрессирования животных. В каждой клетке находилось по 6 животных, среди которых были представители как контрольных, так и экспериментальных групп. Для всех крыс была проведена 21-дневная адаптация к условиям эксперимента (ежедневный хэндлинг в течение 1-2 минут).

Проведение эксперимента. Растворы α -МСГ (Sigma, США), Семакса и Меланотана II (Sigma, США) в 0,9% хлорида натрия вводили однократно внутривентриально в дозе 100 мкг/кг, 50 мкг/кг и 60 мкг/кг массы тела животного соответственно. Контрольным животным вводили эквивалентный объем 0,9% хлорида натрия. Через указанные промежутки времени крыс декапитировали, и сразу после этого на льду выделяли исследуемые отделы мозга. Ткань замораживали на сухом льду и хранили при -70°C .

Определение уровней CREB и pCREB в гиппокампе методом иммуноблоттинга. Для получения белковых экстрактов ткань взвешивали, помещали в раствор, содержащий 50 мМ ТрисHCl (pH 8,0), 150 мМ NaCl, 1% NP40, 1 мМ PMSF, 1 мМ аprotинина, 20 мкМ леупептина, 0,1 мМ ванадата натрия и гомогенизировали при 4°C с помощью политрона. Гомогенаты центрифугировали 30 мин при 16000g (4°C), переносили супернатант в новые пробирки и хранили при -70°C . Концентрацию белка в образцах определяли с помощью модифицированного метода Лоури .

Оценку уровня pCREB и тотального CREB в гиппокампе крысы осуществляли методом Western-иммуноблоттинга. Проводили электрофорез белков в системе Лэммли в 5% (концентрирующем) и 12% (разделяющем) полиакриламидном геле. Образцы белковых экстрактов смешивали с буфером, содержащим 0,125 М Трис-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% глицерина, 0,005% бромфенолового синего и 10% β -меркаптоэтанола, кипятили 5 мин на водяной бане, остужали на тающем льду, и вносили образцы в лунки геля. Затем проводили электрофоретический перенос белков с геля на PVDF-мембрану. Мембрану инкубировали в течение 1 часа на шейкере при комнатной температуре в буфере TBS, содержащем 3% БСА. Далее мембрану обрабатывали моноклональными антителами, (Mouse anti-CREB monoclonal antibodies (Chemicon, США), разведение 1:5000 в буфере TBS; Mouse anti-phospho-CREB (Ser133) monoclonal antibodies (Upstate, США), разведение 1:3000 в буфере TBS) в течение ночи на шейкере при температуре 4°C , а затем раствором, содержащим конъюгат пероксидазы хрена с антителами козы к иммуноглобулинам мыши (ИМТЕК, Россия) в разведении 1:10000 в течение 2 часов на шейкере при комнатной

температуре. Далее мембрану 1 мин инкубировали в свежеприготовленном растворе, содержащем люминол (ECL, Amersham Biosciences, США), заворачивали в пленку SaranWrap и помещали в фотокассету. Обработанную вышеописанным образом мембрану 10-20 мин выдерживали с синечувствительной рентгеновской пленкой Retina XBM, которую затем проявляли и сканировали. Результаты обрабатывались с помощью программы Alpha Imager (оценка относительной оптической плотности) и Sigma Plot (математические вычисления и построение графиков).

Определение уровней белка BDNF и NGF в гиппокампе крысы методом иммуноферментного анализа. Гомогенизацию образцов ткани проводили на льду в полистирольных пробирках. Образцы взвешивали, помещали в пробирки и, из расчета на вес (20 мкл буфера на 1 мг ткани), добавляли модифицированный экстракционный буфер (Pollock et al., 2001). Образцы ткани измельчали с помощью пипетирования, затем гомогенизировали политроном. Полученные с помощью двух последовательных центрифугирований (каждое по 60 мин при 16000 g (4°C)) экстракты хранили при -70 °C. Определение уровня BDNF и NGF в полученных экстрактах проводили с использованием наборов “BDNF Emax” и “NGF Emax” (Promega, США) и автоматического промывателя планшетов ПП2 428 (Иммедтех, Россия) следуя рекомендациям производителя.

Принудительное плавание и получение образцов плазмы крови. В эксперименте были использованы 33 самца. Для моделирования острого стресса использовался метод Порсолта (Porsolt et al., 1977) с модификациями. Животных помещали в пластиковый бак, наполненный водой (24-25°C). Контролем служили животные, помещенные на соответствующее количество времени в сухой пластиковый бак. Было выделено 10 экспериментальных групп: интактные животные; крысы, плававшие в течение 5 мин или 15 мин и декапитированные непосредственно после плавания; крысы, плававшие в течение 15 мин и декапитированные через 15, 90 мин или 24 часа после плавания; контрольные крысы, помещенные в сухой бак на 5 мин или 15 мин и декапитированные немедленно после извлечения из бака; контрольные крысы, помещенные в сухой бак на 15 мин и декапитированные через 15 мин или через 24 часа после извлечения из бака.

После декапитации, кровь собирали в полипропиленовые пробирки с цитратным буфером (соотношение объемов крови и буфера 6:1), содержащим 2 mM PMSF, 10 мкг/мл апротинина, 10 мкг/мл леупептина, и центрифугировали при 6000 g в течение 20 мин (4°C). Полученную плазму, визуально (с использованием светового микроскопа) проверяли на отсутствие клеток крови, замораживали и хранили при -

70°C. Концентрацию белка в образцах определяли с помощью модифицированного метода Лоури.

Определение уровней АКТГ и α -МСГ в образцах плазмы крови с помощью иммуноферментного анализа. Определение уровней АКТГ и α -МСГ в образцах плазмы крови проводили с использованием наборов “АСТН” и “Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone” (Phoenix Pharmaceuticals, США) и автоматического промывателя планшетов ПП2 428 (Иммедтех, Россия), следуя методике и рекомендациям производителя. С помощью планшетного спектрофотометра Metertech Σ 960 измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм в лунках, соответствующих калибровке по АКТГ или α -МСГ и определяемым образцам. Исходя из обратной пропорциональности между величиной оптической плотности и концентрацией АКТГ или α -МСГ в стандартах, вычисляли концентрацию АКТГ или α -МСГ в определяемых образцах.

Статистическая оценка результатов.

Результаты обрабатывались с помощью программ Jandel Scientific SigmaPlot и "STATISTICA for Windows" (версия 6.01). Достоверности различий групповых средних оценивались с помощью непараметрических критериев (тест Манна-Уитни) и дисперсионного анализа (one-way ANOVA). На графиках представлены средние значения групп с учетом стандартной ошибки среднего (Mean \pm SEM), n – объемы групп. Обозначения уровней значимости различий групповых средних: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. В случае определения уровня АКТГ и α -МСГ в плазме крови крыс: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.005$ - обозначения уровней значимости различий групповых средних принудительно плававших животных и интактных животных, # - $p < 0.05$, ## - $p < 0.01$ - обозначения уровней значимости различий групповых средних принудительно плававших животных и животных из соответствующей контрольной группы. Корреляция между групповыми средними в пределах одной выборки оценивалась с помощью непараметрических критериев (подсчет коэффициента Спирмана и коэффициента Кендалла).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

α -МСГ обнаружен в различных отделах головного мозга (Eskay et al., 1979). Показана его способность оказывать нейропротекторное и нейротрофическое воздействие (Strand, 1999), а также влиять на когнитивные функции экспериментальных животных (Stratton and Kastin, 1975). С другой стороны показано, что при ряде видов стресса уровень α -МСГ в крови и тканях головного мозга изменяется (Carr et al., 1990). К настоящему моменту остается не до конца ясным, какова роль α -МСГ в развитии стрессорной реакции, однако накоплен ряд доказательств в пользу тесной связи увеличения уровня в крови этого пептида с адаптацией организма к стрессирующему фактору. Так было показано, что уровень α -МСГ в плазме крови крыс возрастает, при таких видах острого стресса, как иммобилизация (Khorram et al., 1985) и неизбежные удары электрического тока (Van Wimersma Greidanus et al., 1981), а так же при хроническом стрессе, вызванном пятидневным содержанием животного в клетке, на дно которой налита вода (Ogawa et al., 2009).

К настоящему моменту не было исследовано, как влияет на уровень α -МСГ в плазме крови крысы принудительное плавание – широко используемая модель стресса, для которой описано изменение нейрохимических, физиологических и поведенческих реакций организма.

Влияние острого стресса, вызванного принудительным плаванием, на уровни α -МСГ и АКТГ в плазме крови крысы. АКТГ является одним из классических маркеров стресса, широко используемым как в клинической практике, так и в лабораторных исследованиях. Показано, что под действием принудительного плавания уровень АКТГ в плазме крови крысы повышается (Ma et al., 2005).

В наших экспериментах с помощью иммуноферментного анализа определяли уровни АКТГ и α -МСГ в плазме крови крыс, подвергшихся принудительному плаванию, а также крыс контрольной группы и интактных животных.

Уровень АКТГ у интактных крыс составил 430 ± 81 пг/мл (график не представлен). Пятиминутное принудительное плавание вызвало статистически значимое ($p < 0,01$) увеличение уровня АКТГ в плазме крови (940 ± 88 пг/мл). После 15-минутного принудительного плавания уровень АКТГ в плазме крови крыс составил 7000 ± 1000 пг/мл, в 16 раз превышая уровень АКТГ в плазме крови интактных крыс ($p < 0,001$), и в 10 раз - уровень АКТГ в плазме крови контрольной

группы (695 ± 21 пг/мл, $p < 0,001$). Таким образом, мы показали, что использованная нами экспериментальная парадигма – принудительное плавание – действительно является ситуацией, в которой животное испытывает стресс.

В ситуации принудительного плавания у животных изменялся уровень α -МСГ в плазме крови (рис. 1). У интактных крыс концентрация α -МСГ в плазме составила 370 ± 82 пг/мл, а у крыс, подвергнутых пятиминутному принудительному плаванию 730 ± 81 пг/мл ($p < 0,01$). Однако статистически значимых отличий от физиологического контроля (600 ± 176 пг/мл) выявлено не было. После 15-ти минутного плавания уровень α -МСГ составил 1560 ± 56 пг/мл, был повышен более чем в 4 раза по сравнению с интактными крысами ($p < 0,01$) и статистически значимо ($p < 0,01$) отличался от соответствующей контрольной группы (740 ± 260 пг/мл). Через 15 минут после принудительного плавания уровень α -МСГ оставался повышенным ($p < 0,01$) по сравнению с интактными животными, его уровень составил 720 ± 106 пг/мл и статистически значимо ($p < 0,05$) отличался от соответствующей контрольной группы (550 ± 150 пг/мл). Через 90 мин и через 24 часа после принудительного плавания уровни α -МСГ в плазме крови крыс составляли 490 ± 46 пг/мл и 427 ± 70 пг/мл, соответственно. Уровень α -МСГ через 24 ч после принудительного плавания не отличался от уровня пептида в плазме крови соответствующей контрольной группы и интактных животных. Следовательно, за 24 часа уровень α -МСГ возвращается к исходному.

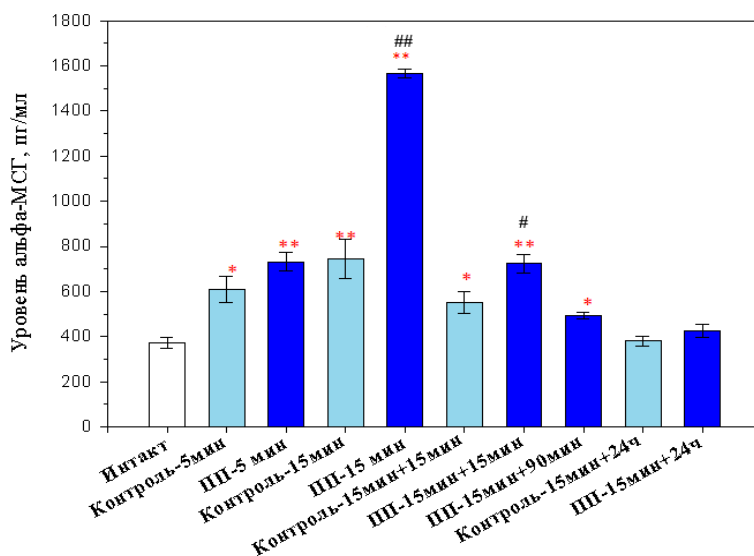


Рисунок 1. Влияние острого стресса на уровень α -МСГ в плазме крови крысы. ПП – принудительное плавание.

На рисунке 2 представлен график совместного изменения уровней АКТГ и α -МСГ под действием острого стресса, вызванного принудительным плаванием. Выявлена положительная корреляция между изменением уровней АКТГ и α -МСГ в плазме крови крыс, подвергнутых пятиминутному и пятнадцатиминутному принудительному плаванию, а также в плазме крови плававших 15 мин крыс через 15 мин, 90 мин и 24 часа после плавания (критерий Спирмена: $p = 0,0018$, критерий Кендалла: $p = 0,0021$). Корреляция между изменениями уровней АКТГ и α -МСГ в группе контрольных крыс статистически незначима (для критерия Спирмена и критерия Кендалла $p > 0,1$).

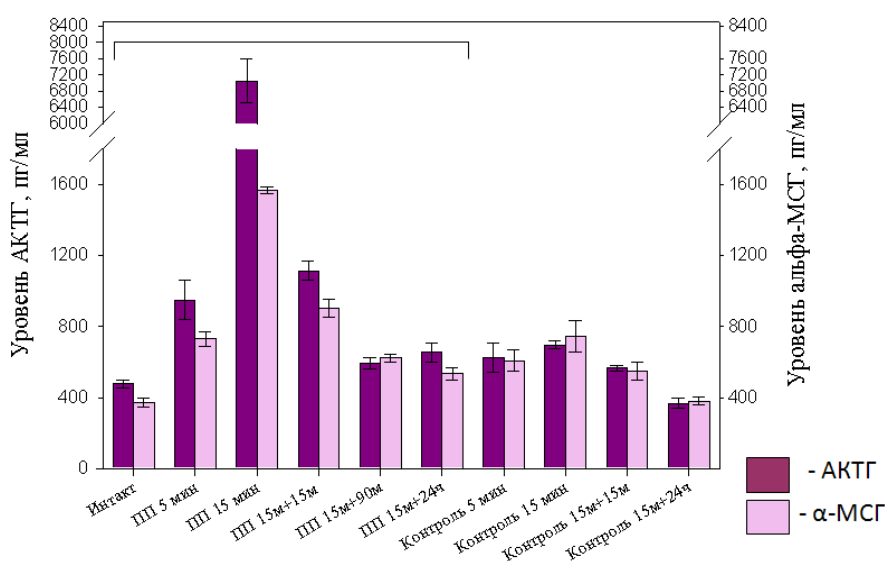


Рисунок 2. Влияние острого стресса на уровни АКТГ и α -МСГ в плазме крови крыс.

До настоящего момента не вполне понятно, опосредована ли корреляция между изменениями уровней АКТГ и α -МСГ в плазме крови исключительно влиянием общего для них активатора секреции (кортикотропин-рилизинг-гормон), или между этими гормонами существуют непосредственные взаимодействия. Было показано, что на фоне действия дексаметазона, блокирующего секрецию кортикотрофов (клеток, секретирующих АКТГ) передней доли гипофиза, секреция α -МСГ, вызванная иммобилизационным стрессом, не изменялась. Аналогично, на фоне действия бромкриптина, селективно блокирующего секрецию меланотрофов промежуточной доли гипофиза, секреция АКТГ под действием иммобилизационного или эфирного стрессов не изменялась (Kjaer et al., 1995). Исходя из этого, весьма вероятно, что

секреция гормонов происходит независимо друг от друга, а корреляция изменения их уровней связана исключительно с действием КРГ на кортикотрофы и меланотрофы.

Принято считать, что однократное принудительное плавание увеличивает время иммобилизации при повторном плавании через 24 часа. Существует достаточно доказательств того, что «приобретенная» иммобилизация есть адаптация к стрессогенным условиям (De Pablo et al., 1989), (West, 1990) в большей степени, чем, поведение отчаяния (Porsolt et al., 1977). Гиппокамп играет важную роль в развитии «приобретенной» иммобилизации (Korte et al., 1996). Показано, что стресс, вызванный однократным пятнадцатиминутным принудительным плаванием, аналогичным тому, что в наших экспериментах приводило к увеличению уровня α -МСГ в плазме крови крыс, приводит к увеличению уровня активации транскрипционного фактора CREB в гиппокампе крыс (Bilang-Bleuel et al., 2002). Фактор CREB необходим для транскрипции многих генов, экспрессия которых ассоциирована с процессами обучения и памяти, поэтому фосфорилирование CREB, вызванное принудительным плаванием может являться одним из механизмов, посредством которых острый стресс активирует процессы запоминания и формирования условных рефлексов.

Авторы статьи (Bilang-Bleuel et al., 2002) предполагают, что влияние острого стресса, вызванного принудительным плаванием, на уровень фосфорилирования CREB опосредуется глюкокортикоидами. Однако другие исследователи считают, что увеличение уровня кортикостерона необходимо, но не достаточно для улучшения обучения, вызванного стрессом (Shors, 2001). Показано, что и другие гормоны стресса, в частности КРГ, способны влиять на уровень активации CREB в различных отделах мозга, в том числе и в гиппокампе (Bayatti et al., 2005). Вопрос о том, способен ли α -МСГ оказывать влияние на активацию CREB в тканях головного мозга остается малоизученным. Тем не менее в недавних исследованиях было выявлено, что внутрижелудочковое введение α -меланокортина приводит к увеличению уровня pCREB в нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса (Sarkar et al., 2002).

В свете вышеизложенных литературных данных и полученных нами результатов об увеличении уровня α -МСГ в плазме крови крыс, подвергшихся острому стрессу, вызванному принудительным плаванием, мы сочли важным проверить, способен ли α -МСГ оказывать влияние на активацию CREB в гиппокампе крысы. Для проверки этой гипотезы нами были проведены эксперименты с использованием внутрибрюшинного введения меланокортинов.

Влияние α -МСГ и Семакса на уровень pCREB в гиппокампе крысы *in vivo*.

В современной литературе практически отсутствуют данные о фармакодинамике α -МСГ. Исходя из соотношения между количествами введенного внутривенно и обнаруживаемого в плазме крови крысы биологически активного пептида PGR (Ashmarin et al., 2008), в дальнейших экспериментах для внутривенного введения мы использовали дозу α -МСГ 100 мкг/кг массы тела, как приводящая к соизмеримому с вызванным острым стрессом изменению уровня α -МСГ в плазме крови крысы.

Через 20 минут после внутривенного введения крысам α -МСГ в дозе 100 мкг/кг уровень фосфорилированного CREB в гиппокампе возрастает почти в 3 раза по сравнению с контролем (рис. 3). Этот эффект сохраняется через 40 минут после введения. Через 1 час после введения α -МСГ эффект не наблюдается.

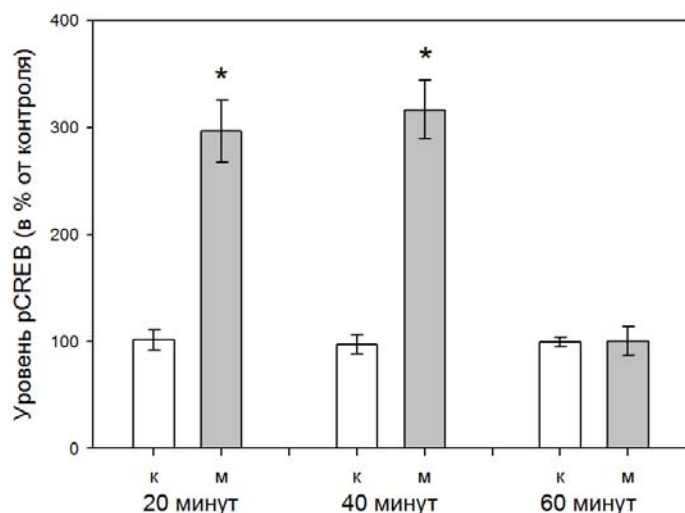


Рисунок 3. Влияние α -МСГ на уровень pCREB в гиппокампе крысы через 20, 40 и 60 минут после внутривенного введения пептида. к – контроль, м - α -МСГ (100 мкг/кг)

Полученные данные хорошо согласуются с описанным выше влиянием острого стресса, вызванного принудительным плаванием, на фосфорилирование CREB. Исходя из результатов нашего эксперимента, α -МСГ может быть одним из факторов, ответственных за активацию CREB-зависимой транскрипции генов при остром стрессе.

В отдельной серии экспериментов мы показали, что синтетический аналог АКТГ₄₋₁₀ Семакс при введении в эквимольном количестве (57 нмоль/кг, 50 мкг/кг) также увеличивает уровень фосфорилирования CREB (график не представлен). Уровень pCREB в гиппокампе через 1 час после введения Семакса в дозе 50 мкг/кг веса тела превышает контрольные значения в 2,5 раза.

Фосфорилирование CREB является ключевым событием при активации транскрипции многих генов, ответственных за нормальное развитие и

функционирование нервной системы. Белковые продукты этих генов, в числе прочего, выполняют нейротрофические и нейропротекторные функции, участвуют в процессах формирования памяти. В этой связи полученные нами данные об увеличении уровня pCREB в гиппокампе крысы под действием α -МСГ и Семакса представляются крайне важными для понимания механизмов влияния этих пептидов на ЦНС.

Влияние α -МСГ, Семакса и Меланотана II на уровень BDNF и NGF в гиппокампе крысы *in vivo*. В свете того, что внутрибрюшинное введение меланокортинов приводит к увеличению уровня pCREB, представлялось целесообразным проверить, влияют ли МК на экспрессию CREB-зависимых генов, в качестве объекта исследований были выбраны гены нейротрофинов BDNF и NGF.

α -МСГ в дозе 100 мкг/кг веса тела не оказывает влияния на уровень белка BDNF в гиппокампе крысы *in vivo* через 1,5 часа и 3 часа после внутрибрюшинного введения пептида (рис. 4). Однако через 24 часа уровень BDNF в гиппокампе животных, которым вводили α -МСГ в 1,8 раза превышал таковой у контрольных животных. Средний уровень BDNF в контроле составлял: 1,5 часа - 17,40 пг/мг, 3 часа - 16,62 пг/мг, 24 часа - 13,88 пг/мг веса ткани.

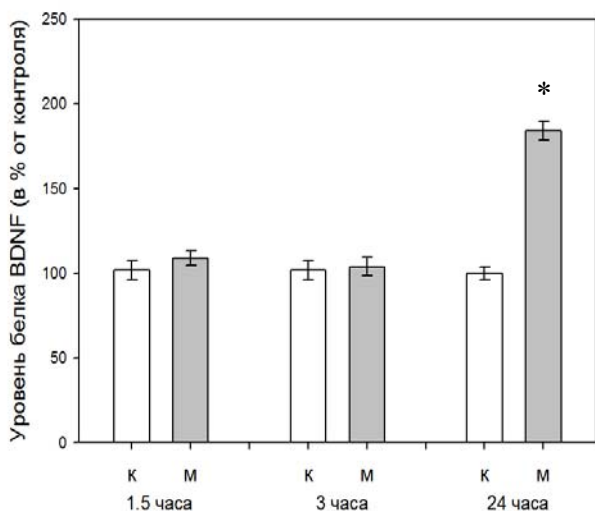


Рисунок 4. Влияние α -МСГ на уровень BDNF в гиппокампе крысы через 1,5 часа, 3 часа и 24 часа после внутрибрюшинного введения пептида. К- контроль, м - α -МСГ(100 мкг/кг)

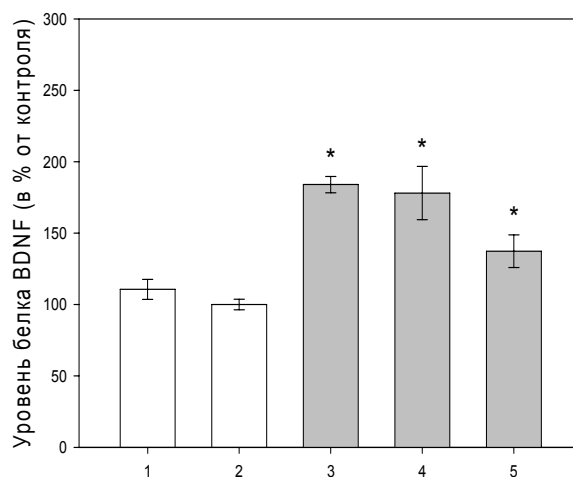


Рисунок 5. Влияние α -МСГ, Семакса и Меланотана II на уровень BDNF в гиппокампе крысы через 24 часа после внутрибрюшинного введения пептида. 1 - интактные животные, 2 - контроль, 3- α -МСГ(100 мкг/кг), 4 - Меланотан II (60 мкг/кг), 5 - Семакс (50 мкг/кг)

Представляет интерес изучение влияния на уровень BDNF в гиппокампе не только эндогенного меланокортина - α -МСГ, но и синтетических МК, таких как

Семакс и Меланотан II (МТII). Исходя из полученных данных о динамике влияния α -МСГ на уровень белка BDNF в гиппокампе крысы, для исследования соответствующего эффекта этих соединений была выбрана временная точка 24 часа после внутрибрюшинного введения препарата (введение осуществлялось в эквимолярных дозах – 57 нмоль/кг). Под действием Семакса уровень BDNF в гиппокампе возрастает почти в 1,4 раза по сравнению с контролем, а под действием МТII – в 1,8 раза (рис. 5). Таким образом, эффект МТII – синтетического агониста 3-го и 4-го типов меланокортиновых рецепторов – сравним с эффектом эндогенного агониста α -МСГ. Это свидетельствует о том, что α -МСГ осуществляет воздействие на экспрессию белка BDNF через один или оба эти типа рецепторов. Величины K_i α -МСГ для MC3R и MC4R составляют $7 \cdot 10^{-9}$ М и $6 \cdot 10^{-8}$ М, соответственно. Величины K_i Меланотана II для MC3R и MC4R составляют $7 \cdot 10^{-8}$ М и $6 \cdot 10^{-9}$ М, соответственно (Schioth et al., 2002).

В данном эксперименте мы использовали дополнительную контрольную группу – интактных животных. Уровень белка BDNF в гиппокампе интактных животных и животных контрольной группы, которым вместо препарата вводили физраствор, практически не отличался (рис. 5). Это свидетельствует о том, что процедура эксперимента сама по себе не оказывала влияния на уровень экспрессии BDNF в гиппокампе.

Учитывая полученные данные по изменению экспрессии белка BDNF в гиппокампе крысы под действием α -МСГ, Семакса и МТII представлялось интересным исследовать уровень другого нейротрофина – NGF. Ни один из препаратов не оказал статистически значимого эффекта на уровень NGF в гиппокампе крысы (график не представлен). Средний уровень NGF в контроле составлял 10,3 пг/мг веса ткани. Несмотря на то, что как BDNF, так и NGF относятся к семейству нейротрофинов, а также являются CREB-зависимыми, неоднократно показано, что один и тот же фактор может оказывать неодинаковое влияние на экспрессию этих белков.

В свете полученных данных по влиянию МК на экспрессию нейротрофинов в гиппокампе крысы *in vivo* мы сочли целесообразным исследование на моделях *in vitro* таких моментов, как зависимость эффекта от вводимой дозы препарата и от времени его действия, а также вовлеченность определенного подтипа МС рецепторов в осуществление исследуемых нами эффектов меланокортинов. Такие эксперименты мы провели на первичных культурах нейронов и астроцитов, полученных из гиппокампа крыс.

Влияние α -МСГ и Семакса на уровень белка BDNF в первичной культуре нейронов гиппокампа крысы. α -МСГ и Семакс в дозе 1 нМ не оказывают влияния на уровень белка BDNF в культуре нейронов гиппокапа крысы через 3 часа и через 6 часов после введения пептида (рис. 6). Однако через 24 часа уровень BDNF возрастает под действием α -МСГ в 1,5 раза по сравнению с контролем, а под действием Семакса - в 1,7 раза (рис. 6). Средний уровень BDNF в контроле составлял: 9,61 пг/100 тысяч клеток.

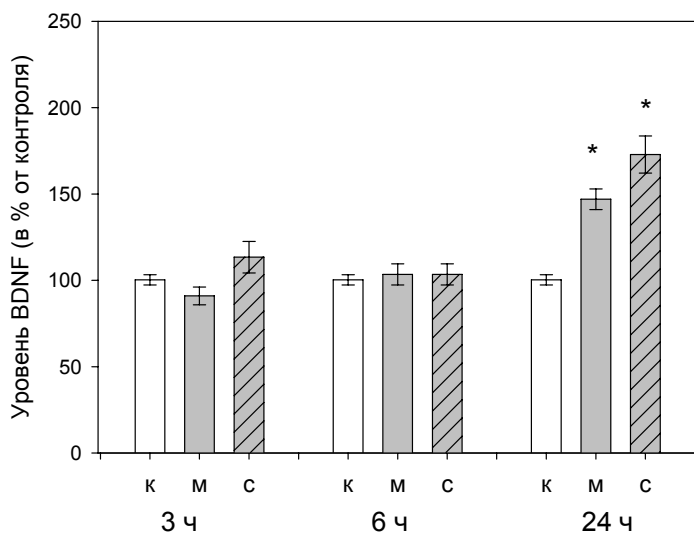


Рисунок 6. Влияние α -МСГ и Семакса на уровень BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы через 3 часа, 6 часов и 24 часа после введения.

к – контроль, м - α -МСГ (1нМ), с - Семакс (1нМ)

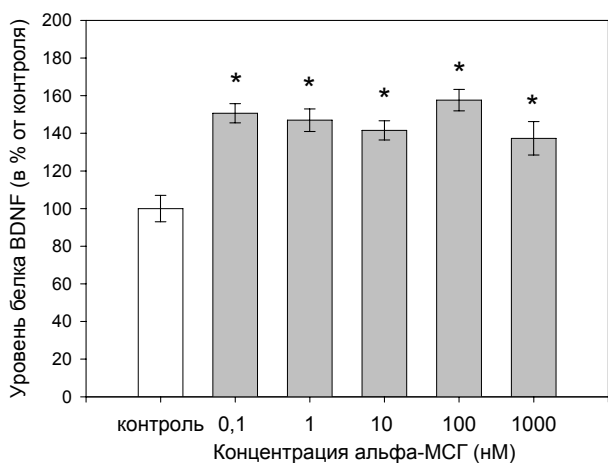


Рисунок 7. Влияние различных концентраций α -МСГ на уровень BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы через 24 часа после введения пептида.

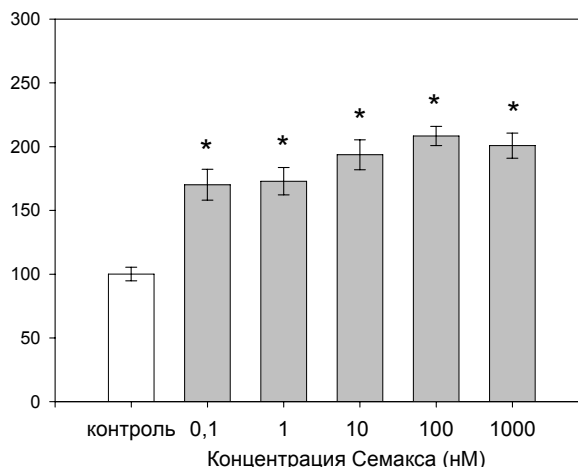


Рисунок 8. Влияние различных концентраций Семакса на уровень BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы через 24 часа после введения пептида.

Исходя из полученных данных по временной динамике эффекта исследуемых пептидов на уровень BDNF, мы выполнили серию экспериментов по выявлению зависимости величины эффекта от дозы α -МСГ и Семакса через 24 часа после введения. В культуральную среду добавляли пептиды до конечных концентраций 0,1

– 1000 нМ. Этот диапазон концентраций был выбран в связи с тем, что ранее (Grivennikov et al., 2008) было показано, что Семакс в концентрации 100 нМ оказывает нейропротекторное воздействие на холинергические нейроны базальных ядер переднего мозга крысы. Все вышеуказанные концентрации α -МСГ приводили к увеличению уровня BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы примерно в 1,5 раза по сравнению с контролем (рис. 7). Статистически значимых различий между величинами эффектов разных доз выявлено не было. Различные дозы Семакса приводили к увеличению уровня BDNF в 1,7-2 раза по сравнению с контролем (рис. 8). Наибольший эффект достигался при концентрации Семакса 100 нМ. Однако и в этом случае статистически значимых различий между величинами эффектов разных доз выявлено не было. Средний уровень BDNF в контроле составлял: 9,61 пг/100 тысяч клеток.

Вовлеченность MC4R в реализацию влияния α -МСГ и Семакса на уровень BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы. К настоящему моменту описано пять типов меланокортиновых рецепторов. В ЦНС преимущественно экспрессируются два из них: MC3R и MC4R. Показано, что нейропротекторное действие при повреждении спинного мозга в большей степени оказывают агонисты MC4R (Sharma, 2005). Синтетический аналог меланокортинов NDP-MSH ($[Nle^4, d-Phe^7]$ α -MSH) проявлял нейропротекторные свойства при глобальной ишемии мозга у песчанок, улучшал обучение и консолидацию памяти в тесте «водный лабиринт Морриса». Эти эффекты предотвращались предварительным введением селективного антагониста MC4R – HS024 (Giuliani et al., 2006). Кроме того, в исследованиях, связанных с меланокортино-лептиновой системой и контролем веса тела, выявлена связь между BDNF и MC4R (Xu et al., 2003a). В свете имеющихся данных нам представилось наиболее важным изучить вклад в осуществление эффектов α -МСГ и Семакса на экспрессию BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы именно 4-го подтипа меланокортиновых рецепторов.

Прежде чем приступить к исследованию вовлеченности MC4R в реализацию эффекта МК на экспрессию нейротрофинов, мы проверили, экспрессируется ли этот подтип меланокортиновых рецепторов в культивируемых клетках гиппокампа крысы. Было обнаружено, что мРНК для MC4R присутствует в первичных культурах как нейронов, так и астроцитов гиппокампа крысы.

Для оценки вовлеченности MC4R в осуществление влияния α -МСГ и Семакса на уровень BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы использовали селективный антагонист этого типа рецепторов – HS028.

Средний уровень BDNF в контроле составлял: 10,21 пг/100 тысяч клеток. α -МСГ в концентрации 1 нМ увеличивал уровень BDNF в 1,4 раза по сравнению с контролем (рис. 9). Предварительное добавление HS028 предотвращало это увеличение. Уровень белка BDNF через 24 часа после введения HS028 (в том числе и в присутствии α -МСГ) был снижен по сравнению с контрольным ($p < 0,05$). Возможно, это объясняется тем, что в культуре нейронов гиппокампа крысы происходит фоновая экспрессия меланокортинов, агонистов MC4R, регулирующих экспрессию BDNF, и блокирование MC4R снижает этот базальный уровень BDNF.

Аналогичная картина наблюдалась для Семакса (рис. 10). Семакс в концентрации 1 нМ увеличивал уровень BDNF в 1,8 раза по сравнению с контролем. Предварительное добавление HS028 предотвращало это увеличение. Уровень белка BDNF через 24 часа после введения HS028 в присутствии Семакса был снижен по сравнению с контрольным ($p < 0,05$).

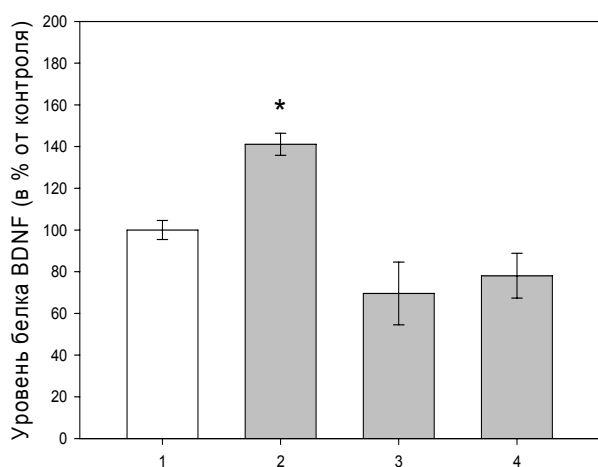


Рисунок 9. Предотвращение влияния α -МСГ на уровень BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы (24 часа после введения пептида) предварительным введением HS028. 1 – контроль, 2 - α -МСГ (1нМ), 3 - α -МСГ (1нМ)+HS028 (1нМ), 4 - HS028 (1нМ).

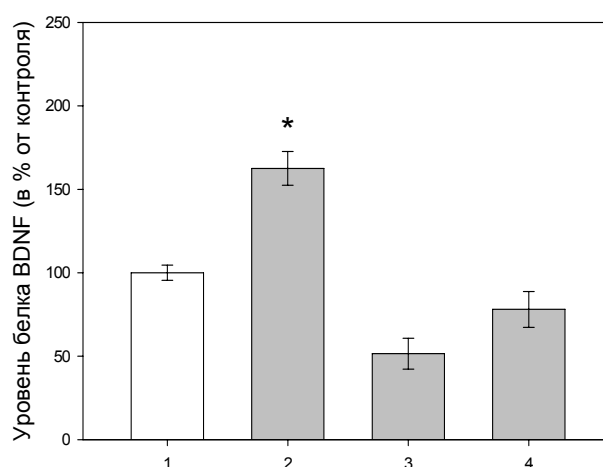


Рисунок 10. Предотвращение влияния Семакса на уровень BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы (24 часа после введения пептида) предварительным введением HS028. 1 – контроль, 2 - Семакс (1нМ), 3 - Семакс (1нМ)+HS028 (1нМ), 4 - HS028 (1нМ).

Чтобы проверить, не связано ли различие в определяемых уровнях BDNF с изменением количества живых нейронов в культуре, была проведена оценка количества живых клеток с помощью МТТ-теста. Через 24 часа после введения

пептидов и антагониста HS028 не было обнаружено существенных различий в количестве живых клеток (график не представлен). Таким образом, ни α -МСГ (1нМ), ни Семакс (1нМ), ни HS028 (1нМ) в течение суток не оказывали влияния на выживаемость нейронов гиппокампа крысы.

Влияние меланокортинов на экспрессию мРНК BDNF в культуре астроцитов гиппокампа крысы. Вовлеченность MC4R. Глиальные клетки, в частности астроциты, являются, наряду с нейронами, важнейшим компонентом нервной ткани. Значительное количество трофических факторов (в том числе нейротрофинов) синтезируется именно астроцитами. В связи с этим мы провели ряд экспериментов с целью выяснить, оказывают ли меланокортины влияние на экспрессию BDNF в культивируемых астроцитах гиппокампа крысы.

При инкубации астроцитов гиппокампа крысы в течение 1 часа с α -МСГ в концентрации 1 нМ происходило пятикратное увеличение количества мРНК для BDNF (рис. 11). Семакс в той же концентрации увеличивал экспрессию BDNF на уровне мРНК в 3 раза.

Обнаруженная способность меланокортинов увеличивать экспрессию нейротрофина BDNF в гиппокампе крысы на моделях *in vivo* и *in vitro* может являться одной из стадий нейропротекторных эффектов, описанных в литературе для этих пептидов. При таких патологических состояниях мозга, как травма и инсульт, непосредственно вокруг некротического очага поражения формируется обширная область нейронов, подвергающихся апоптозу (программированной клеточной гибели) (Linnik et al., 1993). Однако гибель клеток в этом случае обратима и на начальных стадиях может быть остановлена, в частности, с помощью нейротрофинов. Создание повышенных концентраций нейротрофинов в областях мозга с развивающейся апоптотической гибелью нейронов, считается одним из перспективных подходов к терапии нейродегенеративных заболеваний, последствий инсульта и других повреждений мозга (Lindsay, 1994). Показано, что α -МСГ и Семакс проявляют ярко выраженные нейропротекторные свойства при включении их в противоинсультную терапию (Гусев и др., 1999; Forslin et al., 2006). По-видимому, подобный эффект меланокортинов может быть отражением их способности увеличивать уровень BDNF в некоторых отделах мозга, прежде всего, в гиппокампе. Наряду с быстрым воздействием МК на пораженный участок мозга, способность этого класса пептидов увеличивать экспрессию BDNF может приводить и к более долговременным

эффектам (например, к усилению нейрогенеза в гиппокампе взрослых млекопитающих). Ноотропное действие МК также может быть связано с их влиянием на экспрессию BDNF в гиппокампе (отделе мозга, играющем ключевую роль в обработке информации и формировании памяти), поскольку в настоящее время неоднократно показано участие нейротрофинов (главным образом BDNF) в когнитивных процессах (Linnarsson et al., 1997).

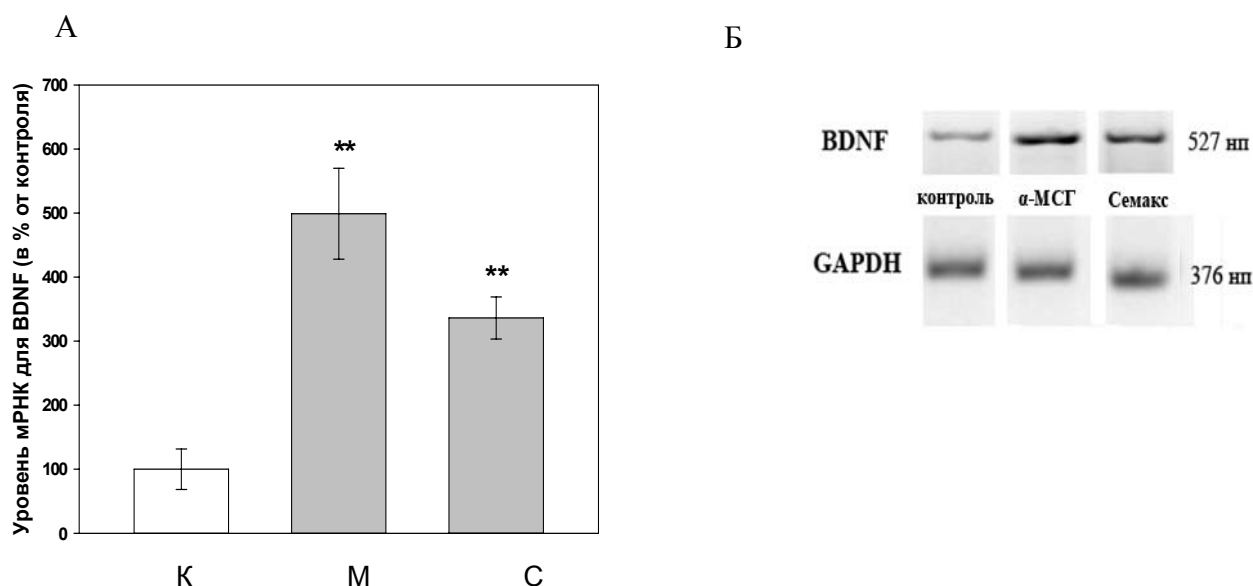


Рисунок 11. Влияние α -МСГ(1нМ) и Семакса(1нМ) на уровень мРНК BDNF в культуре астроцитов гиппокампа крысы (1 час после введения пептида). А - оценка экспрессии BDNF мРНК, Б – э/ф разделение продуктов амплификации. к – контроль, м - α -МСГ (1нМ), с - Семакс (1нМ)

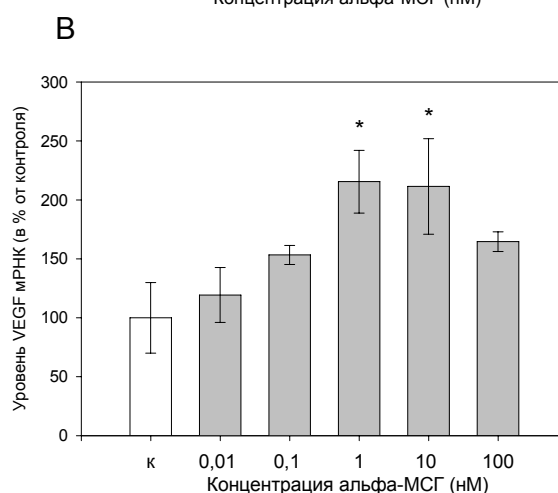
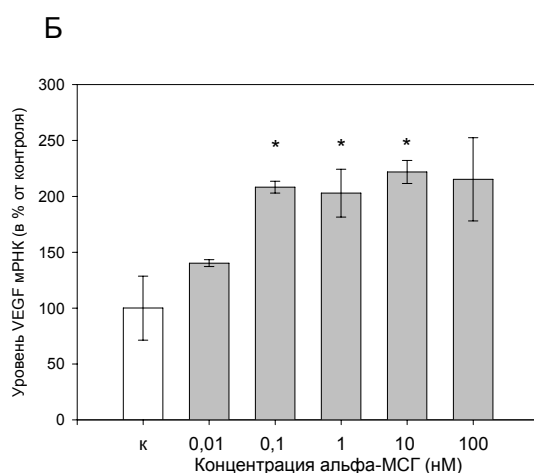
Известно, что стрессогенные факторы, посредством глюкокортикоидов (в частности, кортизола) вызывают снижение экспрессии BDNF в гиппокампе (Duman et al., 1997). В настоящее время этот факт рассматривается как возможная причина нарушения процессов формирования памяти, обучения, нейрогенеза и развития состояния депрессии вследствие стресса. Согласно полученным нами результатам, а так же по данным литературны, секреция и синтез α -МСГ увеличивается при стрессогенных воздействиях на организм. Наша гипотеза состоит в том, что возможная роль меланокортинов заключается в компенсирующем влиянии на экспрессию BDNF в гиппокампе в ситуации стресса: повышение уровня АКТГ вызывает увеличение секреции глюкокортикоидов и снижение экспрессии BDNF, а меланокортины, могут в определенной мере компенсировать это негативное изменение. Подтвердить это предположение можно лишь в дальнейших экспериментах по изучению влияния эндогенных меланокортинов на экспрессию BDNF в мозге и воздействия этого феномена на процессы обучения и формирования

памяти.

Влияние α -МСГ на экспрессию мРНК VEGF в культуре астроцитов гиппокампа крысы; роль MC4R. Поскольку было обнаружено, что уровень фосфорилированного CREB увеличивается под действием меланокортинов, представлялось интересным исследовать их влияние на экспрессию другого CREB-зависимого гена – фактора нейрогенеза и нейротрофического фактора VEGF.



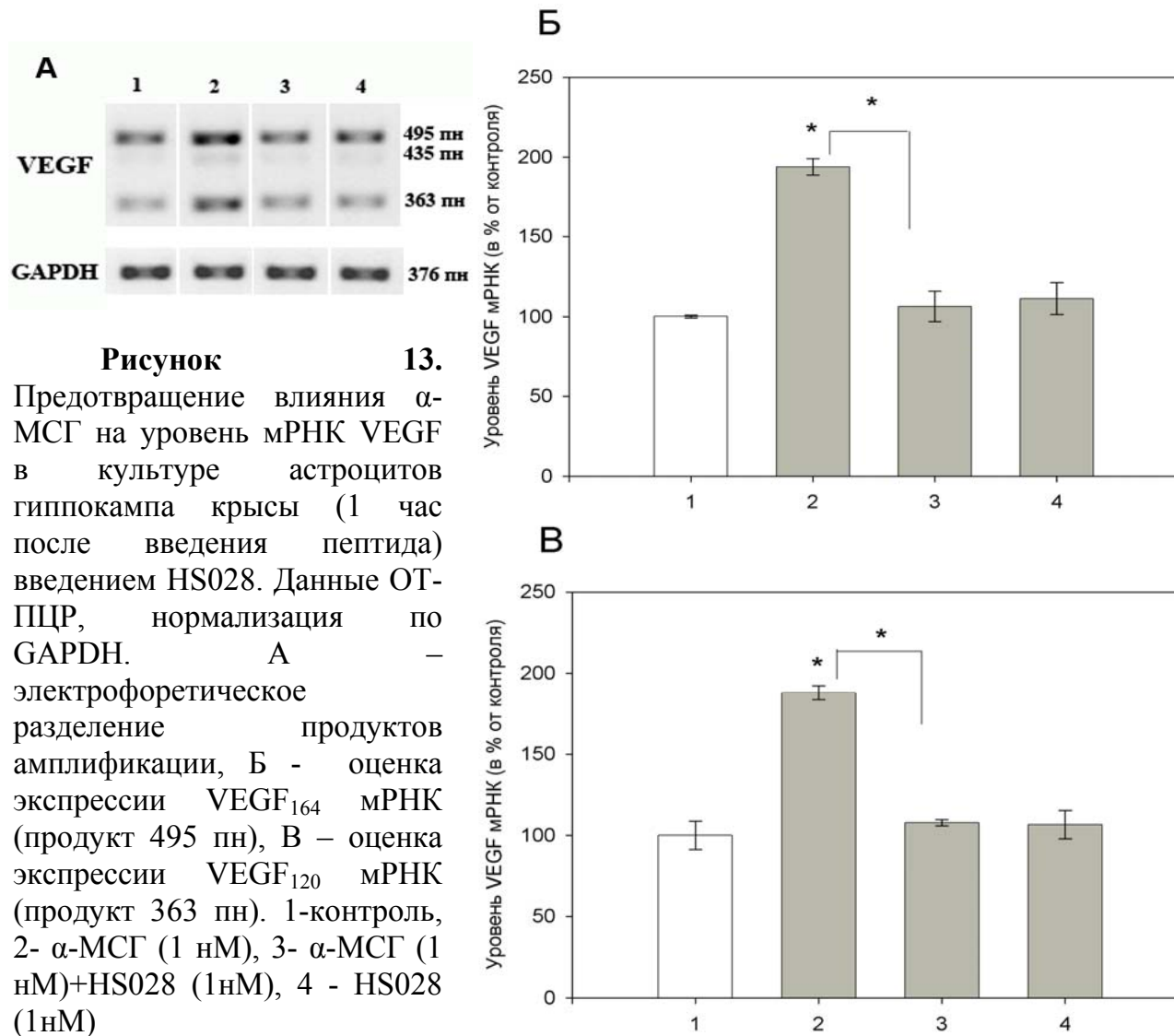
Рисунок 12. Влияние α -МСГ на уровень VEGF мРНК в культуре астроцитов гиппокампа крысы через 1 час после введения. А – э/ф разделение продуктов амплификации, Б – оценка экспрессии VEGF₁₆₄ мРНК (продукт 495 пн), В – оценка экспрессии VEGF₁₂₀ мРНК (продукт 363 пн). к-контроль.



Через 1 час после введения α -МСГ в культуральную среду в конечных концентрациях 0.1, 1 и 10 нМ наблюдается двукратное статистически значимое увеличение уровня мРНК для VEGF₁₆₄ в культивируемых астроцитах гиппокампа крысы (рис. 12Б). Для изоформы VEGF₁₂₀ дозовая зависимость имеет выраженный колоколообразный характер. Максимальная и статистически значимая двукратная стимуляция экспрессии VEGF₁₂₀ достигается при введении α -МСГ в концентрациях 1 и 10 нМ (рис. 12В).

При одновременном с α -МСГ (1 нМ) введении в культуральную среду HS028 (1 нМ), селективного антагониста меланокортиновых рецепторов подтипа MC4R (HS028) через 1 час после введения уровень экспрессии VEGF мРНК для изоформ

VEGF₁₆₄ и VEGF₁₂₀ оставался на уровне контроля и статистически значимо отличается от уровня экспрессии VEGF мРНК при введении α-МСГ в концентрации 1 нМ (рис. 13). Таким образом, введение HS028 в эквимолярной концентрации предотвращало эффект α-МСГ. При этом введение только HS028 в концентрации 1 нМ не влияло на уровень VEGF мРНК.



Роль VEGF в функционировании ЦНС недостаточно изучена, однако в настоящее время очевидно, что этот фактор ангиогенеза оказывает прямое влияние на нейроны и глию, стимулируя их рост, выживание и дифференцировку (Carmeliet and Storkebaum, 2002), обладает нейропротекторными свойствами (Matsuzaki et al., 2001), и является важным фактором нейрогенеза во взрослом гиппокампе, стимулируя пролиферацию предшественников нейронов (Jin et al., 2002). Таким образом, стимуляция продукции VEGF в клетках гиппокампа, в частности, в астроцитах, может приводить к защите гиппокампальных нейронов при повреждениях мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами показано, что природный меланокортин α -МСГ и синтетический МК Семакс способны регулировать как уровень активации CREB – важного транскрипционного фактора, связанного с функционированием нервной системы, так и уровень экспрессии CREB-зависимых нейротрофических факторов и факторов нейрогенеза BDNF и VEGF в клетках гиппокампа крысы в моделях *in vitro* и *in vivo*. Получены доказательства того, что это влияние осуществляется через 4-й подтип меланокортиновых рецепторов. Накопленные к настоящему времени данные указывают на важную роль CREB, BDNF и VEGF в регуляции функций гиппокампа в норме и при патологиях ЦНС, таких как повреждения мозга и депрессивные состояния. Эти факторы играют важную роль в когнитивных процессах и вовлечены в процессы формирования памяти. Повышение уровня α -МСГ в крови при остром стрессе может влиять на уровни pCREB, BDNF и VEGF в гиппокампе и, таким образом, вносить вклад в адаптацию организма к стрессорным ситуациям, в том числе, стимулируя когнитивные функции.

Представленные в работе данные указывают на возможность реализации нейропротекторных и когнитивных эффектов α -МСГ и его аналогов путем стимуляции продукции в клетках мозга ростовых/нейротрофических факторов. В совокупности, они расширяют представление о механизмах действия представителей пептидного семейства меланокортинов и их функциях в организме.

ВЫВОДЫ

1. Острый стресс, вызванный принудительным плаванием, приводит к увеличению уровня α -МСГ в плазме крови крысы, положительно коррелирующему с увеличением уровня АКТГ.
2. α -МСГ и Семакс при внутрибрюшинном введении увеличивают уровень активации транскрипционного фактора CREB и уровень нейротрофина BDNF в гиппокампе крысы.
3. α -МСГ и Семакс увеличивают уровни мРНК и белка BDNF в клетках гиппокампа крысы *in vitro*.
4. α -МСГ увеличивает уровень мРНК ростового фактора VEGF в астроцитах гиппокампа крысы *in vitro*.
5. Синтетический агонист меланокортиновых рецепторов третьего и четвертого подтипов Меланотан II при внутрибрюшинном введении увеличивает уровень BDNF в гиппокампе крысы.
6. Селективный антагонист меланокортиновых рецепторов четвертого подтипа HS028 предотвращает вызванную исследованными меланокортинами стимуляцию экспрессии BDNF и VEGF в клетках гиппокампа крысы *in vitro*.
7. Полученные данные указывают на возможность осуществления нейропротекторных и когнитивных функций α -МСГ и его аналогов путем стимуляции продукции в клетках гиппокампа ряда ростовых/нейротрофических факторов, а также на вовлеченность меланокортиновых рецепторов четвертого подтипа MC4R в реализацию обнаруженных эффектов.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Dolotov O.V., Karpenko E.A., Inozemtseva L.S., Seredenina T.S., Levitskaya N.G., Rozyczka J., **Dubynina E.V.**, Novosadova E.V., Andreeva L.A., Alfeeva L.Y., Kamensky A.A., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F., Engele J. Semax, an analog of ACTH(4-10) with cognitive effects, regulates BDNF and trkB expression in the rat hippocampus. *Brain Res.*, 2006, v. 1117, №1, p. 54-60.
2. **Дубынина Е.В.**, Долотов О.В. Транскрипционный фактор CREB и процессы формирования памяти. *Нейрохимия*, 2009, т.26, №3, с.181-190.
3. **Дубынина Е.В.**, Иноземцева Л.С., Марков Д.Д., Яценко К.А., Долотов О.В., Гривенников И.А. Альфа-меланоцитстимулирующий гормон увеличивает экспрессию фактора роста сосудистого эндотелия в астроцитах гиппокампа крысы *in vitro*. *Нейрохимия*, 2009, т.26, №4, с.297-301.
4. Фирстова Ю.Ю., Долотов О.В., Кондрахин Е.А., **Дубынина Е.В.**, Гривенников И.А., Ковалев Г.И. Влияние ноотропных препаратов на уровень BDNF в гиппокампе и коре мозга мышей с различной эффективностью исследовательского поведения. *Экспер. и клин. фармакол.*, 2009, т.72, №6, с. 3-6.
5. **Дубынина Е.В.**, Иноземцева Л.С., Долотов О.В., Гривенников И.А. Меланокортины стимулируют CREB-зависимую экспрессию нейротрофических факторов в гиппокампе крысы. Сборник тезисов российского симпозиума «Белки и пептиды», Пушкино, 2007, с. 69.
6. **Дубынина Е.В.**, Иноземцева Л.С., Яценко К.А., Долотов О.В., Гривенников И.А. Меланокортины Семакс и альфа-МСГ стимулируют экспрессию нейротрофических факторов в астроцитах гиппокампа крысы *in vitro*. Сборник тезисов конференции «IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов», Новосибирск, 2008, с.398
7. Долотов О.В., **Дубынина Е.В.**, Иноземцева Л.С., Гривенников И.А. Молекулярные механизмы когнитивных и нейропротекторных эффектов меланокортинов. Сборник тезисов конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», Санкт-Петербург 2008, с.42.
8. **Дубынина Е.В.**, Иноземцева Л.С., Марков Д.Д., Долотов О.В., Гривенников И.А. Активация меланокортинами альфа-МСГ и Семакс экспрессии нейротрофических факторов в культуре астроцитов гиппокампа крысы. Сборник тезисов конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», Санкт-Петербург, 2008, с. 48.
9. Гривенников И.А., Долотов О.В., **Дубынина Е.В.**, Иноземцева Л.С., Марков Д.Д., Яценко К.А., Мясоедов Н.Ф. Меланокортины в ЦНС: функции и возможные механизмы действия. Сборник тезисов российского симпозиума «Белки и пептиды», Казань, 2009, с. 49
10. Иноземцева Л.С., **Дубынина Е.В.**, Яценко К.А., Марков Д.Д., Долотов О.В., Гривенников И.А. Изменение уровня α -меланокортина и нейротрофического фактора мозга (BDNF) в плазме крови крысы в условиях острого стресса. Сборник тезисов российского симпозиума «Белки и пептиды», Казань, 2009, с. 198.