

УДК 577.25

РАННЯЯ ИНДУКЦИЯ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОТРОФИНОВ И микроРНК В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕРВНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2021 А.А. Шмакова^{1,2}, К.Д. Рысенкова^{1,2}, О.И. Ивашкина^{3,4,5}, А.М. Груздева³,
П.С. Климович^{1,2}, В.С. Попов¹, К.А. Рубина¹, К.В. Анохин^{3,4},
В.А. Ткачук^{1,2}, Е.В. Семина^{1,2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192 Москва, Россия; электронная почта: e-semina@yandex.ru

² Институт экспериментальной кардиологии, НИИЦ Кардиологии
Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 121552 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Институт перспективных исследований мозга, 119192 Москва, Россия; электронная почта: k.anokhin@gmail.com

⁴ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина, 125315 Москва, Россия

⁵ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.11.2020

После доработки 21.06.2021

Принята к публикации 30.06.2021

Рецепторы нейротрофинов, взаимодействуя со своими лигандами, регулируют в головном мозге выживаемость нервных клеток, формирование нейронных связей и синаптическую пластичность. В данном исследовании был проведён анализ ранних изменений экспрессии генов рецепторов нейротрофинов *Ntrk1* (TrkA), *Ntrk2* (TrkB), *Ntrk3* (TrkC), *Ngfr* (p75NTR) и контролирующих их микроРНК в структурах головного мозга мыши после индукции судорожной нервной активности введением пентилентетразола. Полученные результаты показывают, что экспрессия *Ntrk3* и *Ngfr* возрастает в коре и гиппокампе через 1–3 ч после судорог, экспрессия *Ntrk2* возрастает в передней коре через 3–6 ч, а в гиппокампе наблюдается индукция экспрессии через 1 и 6 ч. При этом в передней и задней коре, но не в гиппокампе, повышается соотношение сигнальных белков Bcl-2/Bax, отражающее активацию анти-апоптотической сигнализации. Одновременно с этим в гиппокампе через 3 ч после введения пентилентетразола возрастает экспрессия микроРНК-9 и микроРНК-29а, предсказанной мишенью которых является мРНК *Ntrk3*. Таким образом, можно сделать вывод о том, что в состав раннего клеточного ответа на судорожную нервную активность в головном мозге входит активация экспрессии генов рецепторов *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr*, микроРНК-9 и микроРНК-29а, а также сигнальный путь с участием белков Bcl-2 и Bax, что может характеризовать их как важных посредников в регуляции адаптации и выживаемости нейронов в условиях генерализованной нервной активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рецепторы нейротрофинов TrkA, TrkB, TrkC, и p75NTR, микроРНК, микроРНК-9 и микроРНК-29а, гены раннего ответа, активация нейронов, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0320972521100080

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрофины и их рецепторы являются важными регуляторами пролиферации, дифференцировки и выживания нейрональных клеток

Принятые сокращения: BDNF – brain-derived neurotrophic factor, мозговой нейротрофический фактор; GO:BP – Gene ontology: biological processes, генная онтология: биологические процессы; NGF – фактор роста нервов; p75NTR – нейротрофиновый рецептор p75; PTZ – пентилентетразол; tPA – тканевой активатор плазминогена; Trk – тропомиозин-рецепторные киназы; uPAR – урокиназный рецептор.

* Адресат для корреспонденции.

в норме и при патологии. Помимо непосредственно трофической роли, нейротрофины и их рецепторы координируют нейритогенез, направленный рост нейритов, образование синаптических структур, высвобождение нейротрансмиттеров и синаптическую пластичность [1]. Внутриклеточная сигнализация нейротрофинов осуществляется за счёт связывания с рецепторами двух типов: низкоаффинного рецептора p75NTR (ген *Ngfr*), относящегося к семейству рецепторов, содержащих «домен смерти» (суперсемейство рецепторов факторов некроза опухоли TNFR); и высокоаффинных рецепторных тирозинкиназ (тропомиозин-рецепторные

киназы, Trk). В то время как p75NTR активируется всеми четырьмя нейротрофинами, рецепторы Trk более селективны к лигандам: фактор роста нервов (NGF) преимущественно связывается с TrkA (ген *Ntrk1*), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и нейротрофин-4/5 (NT-4/5) – с TrkB (ген *Ntrk2*), нейротрофин-3 (NT-3) – с TrkC (ген *Ntrk3*) [2]. Секретируемые пронеуротрофины имеют большую аффинность к рецептору p75NTR, чем зрелые формы [3]. Сигналинг нейротрофинов через p75NTR связан с индукцией апоптоза, а активация Trk, напротив, стимулирует выживание и дифференцировку нейронов [2, 4, 5]. Мембранная представленность рецепторов p75NTR и Trk может изменяться при возбуждении или повреждении нейрональных клеток [6–8], что координирует механизмы клеточного ответа и определяет функциональный эффект действия нейротрофинов.

Наши недавние исследования показали возможную связь экспрессии рецепторов нейротрофинов с функционированием урокиназной системы: CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут гена *Plaur*, кодирующего урокиназный рецептор (uPAR), снижал экспрессию полноразмерной формы рецептора TrkC и подавлял TrkC-зависимую внутриклеточную сигнализацию в клетках нейробластомы Neuro2a [9]. Урокиназная система является частью системы активаторов плазминогена, в состав которой входит урокиназа (uPA) и ее рецептор (uPAR), тканевой активатор плазминогена (tPA) и ингибиторы активаторов плазминогена (PAI-1 и PAI-2) [10]. В наших работах и в исследованиях других авторов была показана важная роль системы активаторов плазминогена в регуляции таких процессов в нервной системе, как формирование головного мозга в эмбриогенезе [11–13], регенерация периферических нервов [14–17], нейриогенез [18, 19], регуляция направленного роста аксонов [18, 20], ответ на генерализованные судороги и эпилептогенез [21–24], ответ на травмы и повреждения головного мозга [25–27].

Нами также было установлено, что в головном мозге взрослых животных экспрессия uPAR может регулироваться нервной активностью, уровни его мРНК многократно возрастают в ранние сроки после судорог, вызванных введением пентилентетразола; при этом *Plaur* функционирует в этих условиях в качестве непосредственного раннего гена [21]. Так как регуляция генов рецепторов нейротрофинов также изменяется под влиянием судорог [6–8, 28–30], изучение их экспрессии после генерализованной нервной активности в структурах мозга, где в это время была обнаружена активация гена *Plaur*, представляет большой интерес и может

способствовать более глубокому пониманию молекулярных и клеточных механизмов выживания и адаптивной пластичности нейронов в норме и при патологии.

В связи с этим целью данной работы было исследовать экспрессию генов рецепторов нейротрофинов *Ntrk1*, *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* в структурах головного мозга мышей на ранних сроках после вызванной введением пентилентетразола (PTZ) генерализованной нервной активности. Структуры головного мозга (передняя и задняя кора полушарий головного мозга и гиппокамп) и сроки анализа (1, 3 и 6 ч) были выбраны на основе наших предыдущих данных об индукции в этих условиях гена *Plaur* [21]. С помощью биоинформатического поиска нами также были найдены конкретные микроРНК, мишенями которых являются рецепторы нейротрофинов, и проверена зависимость их экспрессии от PTZ-индуцированной судорожной активности. Наконец, поскольку введение PTZ служит и моделью повреждения нейронов головного мозга [31, 32], мы провели оценку в исследованных структурах белков Вах и Bcl-2, как сигнальных посредников апоптоза. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в головном мозге на ранних сроках после введения PTZ происходит активация экспрессии генов рецепторов *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr*, микроРНК-9 и микроРНК-29а, а также активация сигнального пути с участием белков Bcl-2 и Вах, что может характеризовать их, как важных молекулярных посредников в регуляции выживаемости и адаптации нейронов в условиях генерализованной судорожной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с лабораторными животными и индукция генерализованных судорог. В исследовании были использованы взрослые самцы мышей C57BL/6J в возрасте 12–14 недель весом $28,2 \pm 3,7$ г, полученные из питомника ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия). Мышей содержали при стандартном 12-часовом цикле свет/темнота, постоянной температуре (22 ± 1 °C) и влажности (50–60%). Вода и еда были доступны без ограничений. Исследования планировали и проводили в соответствии с руководством PREPARE Guideline [33]. Всего было использовано 120 животных, которых распределяли в экспериментальные (1, 3, 6 ч) и контрольную (0 ч) группы случайным образом (по 4–6 мышей в группу). Генерализованные судороги вызывали введением PTZ («Sigma», США) внутрибрюшинно, как описано

ранее [34]. Доза PTZ составила 75 мг/кг массы тела, что вызывало максимальную (6 и выше баллов по модифицированной для мышей шкале Рацина [35]) выраженность судорог у большинства особей. Выделение мозга и дальнейший анализ полученных образцов проводили только у тех мышей, у которых наблюдались подобные максимальные выраженные судороги. Препарат растворяли в 0,9%-ном растворе NaCl. Мышей, которым вводили физиологический раствор, использовали в качестве контроля (0 ч). В качестве временных точек для анализа были выбраны 1, 3 и 6 ч после судорог, как наиболее релевантные для изучения раннего ответа, согласно нашим данным [21]. Мышей умерщвляли путём цервикальной дислокации через соответствующие промежутки времени после начала судорог, далее декапитировали и выделяли головной мозг. Передняя кора, задняя кора, гиппокамп и стриатум были выделены, как описано ранее [36]. В качестве передней коры выделяли отделы до уровня 0 относительно точки Брегма, в качестве задней – отделы от уровня –2 мм относительно точки Брегма, согласно стандартному стереотаксическому атласу мозга мыши [37]. Образцы быстро замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С до выделения РНК и белка.

Чтобы исключить влияние мРНК клеток крови в образцах мозга, мы собирали цельную кровь подопытных мышей через 3 и 6 ч после инъекции PTZ, а также контрольных мышей в аналогичные сроки. Для каждой временной точки в группу входили 4 мыши. Приблизительно 500 мкл мышинной крови отбирали методом кардинальной пункции с помощью инсулинового шприца на 1 мл, кровь немедленно помещали в пробирки на 15 мл, содержащие 5 мкл 0,5 М ЭДТА, и тщательно перемешивали с 2 мл реагента Trizol. Тотальную РНК выделяли методом, описанным ниже.

Культивирование эукариотических клеток. Первичная культура эндотелиальных клеток мыши была любезно предоставлена В.Ю. Сысоевой (лаборатория морфогенеза и репарации тканей, МГУ имени М.В. Ломоносова). Клетки культивировали в среде EGM-2 («Lonza», Швейцария). Для оценки влияния PTZ на экспрессию *Nirk1*, *Nirk2*, *Nirk3* и *Ngfr* клетки мышинного эндотелия инкубировали с PTZ в конечной концентрации 20 мМ [38, 39] в течение 1, 3 и 6 ч.

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли из замороженной ткани мозга, крови и эндотелиальных клеток с помощью реагента Trizol («Invitrogen», США) в соответствии с про-

токолом производителя. Количество тотальной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Качество тотальной РНК и представленность фракции малых РНК оценивали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. 1,5 мкг тотальной РНК подвергали обратной транскрипции с использованием олиго(dT) и случайных (dN)₁₀-праймеров с помощью набора MMLVRT («Евроген», Россия). ПЦР проводили с использованием qPCRmix-HS SYBR («Евроген») на приборе для ПЦР в реальном времени CFX96 («Bio-Rad», США). Используемые в работе праймеры кДНК мыши («Евроген») приведены в табл. 1 [9].

Условия проведения ПЦР включали предденатурацию при 95 °С 15 мин, далее 40 циклов амплификации (денатурация 15 с при 95 °С, отжиг с праймерами 15 с при 62 °С и элонгация 20 с при 72 °С). ПЦР для каждого образца проводили в дубликатах (технические повторности). Относительный уровень транскрипта рассчитывали с использованием метода 2^{–ΔΔCt} с геном β-актина в качестве гена сравнения, «гена домашнего хозяйства»; нормализацию проводили, принимая за единицу средний уровень каждого транскрипта в контроле (контрольные мыши без введения PTZ).

Анализ экспрессии зрелых микроРНК. Анализ экспрессии зрелых микроРНК проводили

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров (5'–3')
β-актин for	AGTGTGACGTTGACATCCGTA
β-актин rev	GCCAGAGCAGTAATCTCCTTCT
TrkA for	GCCTAACCATCGTGAAGAGTG
TrkA rev	CCAACGCATGGAGGACAGAT
TrkB for	TGGGACGTTGGGAATTTGGT
TrkB rev	AGTTGGCGCAAATGCACAG
TrkC for	AGCCACGTCAACCTGACTG
TrkC rev	CCTCGCTCGTCACGTTTAC
p75NTR for	ACCCTGCCTGGACAGTGTTA
p75NTR rev	AGAACACGAGTCCTGAGCCC
mmu-mir-128-3p for	AACAAGCAGTGAACCGGTCTCT
mmu-mir-29a-3p for	AACAAGTAGCACCATCTGA
mmu-mir-27a-3p for	AACAAGTCACAGTGGCTAAGT
mmu-mir-381-3p for	AACAAGACAAGGGCAAGCT
mmu-mir-9-5p for	AACAAGGGTTATCTAGCTGT
SNORD68 for	AACACGCTGATGACATTCTCCG

с помощью планшета «Mouse Neurological Development & Disease» ТМ («Qiagen», США), который позволяет анализировать 84 дифференциально экспрессируемых микроРНК в процессе развития нейронов или в ходе прогрессии неврологических заболеваний. Расположение анализируемых микроРНК на планшете представлено на рис. 1 в Приложении. В качестве матрицы использовали тотальную РНК из образцов ткани гиппокампа контрольной мыши и мыши через 3 ч после введения PTZ. Для обратной транскрипции использовали 2 мкг тотальной РНК и набор miScript II RT kit («Qiagen»). Условия проведения ПЦР включали предденатурацию при 95 °С 15 мин, далее 40 циклов амплификации (денатурация 15 с при 94 °С, отжиг с праймерами 15 с при 55 °С и элонгация 30 с при 70 °С). Относительный уровень транскрипта рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$, рассчитывая геометрическое среднее по четырём малым ядрышковым РНК, выступающим в качестве референсных (SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96).

Экспрессию выбранных микроРНК подтверждали дополнительно с помощью ПЦР в реальном времени. В качестве матрицы использовали тотальную РНК из образцов ткани гиппокампа 4-х контрольных мышей и 4-х мышей через 3 ч после введения PTZ. Обратную транскрипцию проводили, как описано ранее. Условия проведения ПЦР включали предденатурацию при 95 °С 15 мин, далее 40 циклов амплификации (денатурация 15 с при 94 °С, отжиг с праймерами 15 с при 51–58 °С в зависимости от пары праймеров и элонгация 30 с при 70 °С). Использованные в работе праймеры к микроРНК мыши («Евроген») приведены в табл. 1. В качестве обратных праймеров мы использовали коммерчески доступные праймеры 10x miScript universal primer из набора miScript SYBR® Green PCR Kit («Qiagen»). Относительный уровень транскрипта рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$, с SNORD68 в качестве референса; нормализацию проводили, принимая за единицу средний уровень каждого транскрипта в контроле.

Анализ обогащения мишеней deregulированных микроРНК проводился с использованием инструмента MIENTURNET (<http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/>) [40] (база данных miRTarBase, в которую включены экспериментально подтверждённые мишени микроРНК) с порогом минимального количества взаимодействий микроРНК–ген-мишень – 2 и порогом для скорректированного значения p (метод FDR) – 0,05. Анализ обогащения набора генов, являющихся мишенями минимум двух

deregulированных микроРНК по базе данных miRTarBase, по функциональной принадлежности (генная онтология биологические процессы (Gene ontology: biological processes, GO:BP) и пути KEGG (Киото энциклопедия генов и геномов)), проводился с использованием онлайн инструмента g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) [41]. Анализ обогащения по транскрипционным факторам осуществляли с использованием программы GSEA 4.1.0 [42] и базы данных, полученной из TransMiR v2.0 (<http://www.cuilab.cn/transmir>) [43]. Поиск микроРНК, регулирующих нейротрофины, рецепторы нейротрофинов, Bcl-2 и Bax, осуществляли по базам данных miRTarBase (<http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/>) [44], miRDB (<http://www.mirdb.org/mining.html>) [45] и TargetScanMouse (http://www.targetscan.org/mmu_72/) [46].

Приготовление лизатов ткани мозга, электрофорез в полиакриламидном геле и Вестерн-блоттинг. Ткань мозга лизировали в ледяном буфере для лизиса RIPA (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 0,5% дезоксихолата натрия, 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS, pH 7,4), содержащем коктейль ингибиторов протеаз («Thermo Fisher Scientific»). Для лизирования 10 мг ткани мозга использовали 100 мкл буфера RIPA. Ткань мозга гомогенизировали путём ручного измельчения холодным пестиком и пропускания 10 раз через иглу 27G инсулинового шприца. Лизаты инкубировали 20 мин на льду, периодически перемешивая, далее центрифугировали при +4 °С в течение 20 мин при 16 000 g. Супернатант переносили в новую предварительно охлажденную пробирку, осадок клеток выбрасывали. 5 мкл супернатанта, разведенного 1/1000, использовали для количественной оценки концентрации белка по методу Бредфорда («BioRad»), после чего образцы смешивали с равным объемом 2-кратного буфера Лэммли, содержащего 10% меркаптоэтанол, и нагревали при 95 °С в течение 10 мин. Белки (40 мкг/дорожка) разделяли в 10%-ном SDS-PAGE и переносили на PVDF-мембрану («GE Healthcare», США) в буфере для переноса (1,92 M Tris/глициновый буфер, 0,1% SDS, 20% метанол). Неспецифическое связывание блокировали в 5%-ном обезжиренном сухом молоке в фосфатно-солевом буфере PBS, («Sigma-Aldrich», США), содержащем 0,1% (v/v) Tween-20 при +4 °С в течение ночи. Мембраны инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре со следующими первичными антителами (все разведения 1/1000): мышинные анти-Bax («Santa Cruz», США) и мышинные анти-Bcl-2 («Santa Cruz»). Мембраны промывали PBS, содержащим 0,1% (v/v) Tween-20, и инкубировали с соответствующими вторичными антителами («Imtek»,

Россия), конъюгированными с пероксидазой, в разведении 1/10 000 при комнатной температуре в течение 1,5 ч с последующей промывкой в PBS, содержащем 0,1% (v/v) Tween-20. Белки визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Dura («Thermo Fisher Scientific») и системы ChemiDoc™ XRS+ («Bio-Rad»). Денситометрический анализ блотов проводили в ImageJ.

Статистический анализ. Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Непарный *t*-тест Стьюдента с нулевой гипотезой о равных средних в двух выборках использовался для сравнения данных между двумя группами. Различия между несколькими группами определяли, используя односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с нулевой гипотезой о равных средних между группами. Тест использует распределение Фишера–Снедекора (F-распределение), и когда значение F было критическим (уровень значимости $p < 0,05$), сравнения каждой экспериментальной группы с контролем дополнительно анализировали с использованием апостериорного теста Даннета для анализа множественных сравнений. В тексте приведены значения F, межгрупповое и внутригрупповое число степеней свободы и уровень значимости p апостериорных тестов. Сравнение экспрессии *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* в отделах головного мозга проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки (для сравнения нескольких групп). Соотношение Bcl-2/Bax сравнивали с помощью 2-way ANOVA с использованием апостериорного теста Холма–Сидака (для сравнения двух групп). Критическим уровнем значимости считали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Пространственный и временной профиль экспрессии мРНК *Ntrk1*, *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* в головном мозге мышей при индукции судорожной активности. Оценка экспрессии мРНК рецепторов нейротрофинов (TrkA, TrkB, TrkC, p75NTR) была проведена на ранних сроках после индукции судорог (1, 3 и 6 ч после введения PTZ), так как ранее на этой модели нами было показано, что пик ранней активации генов происходит через 3 ч после судорог [21].

Было обнаружено, что экспрессия мРНК *Ntrk2* существенно возрастает через 3 и 6 ч после введения PTZ в передней коре (рис. 1, а,

$F_{3,12} = 11,10$, $p = 0,0039$ и $p = 0,0113$ соответственно). В задней коре в исследуемых промежутках времени после индукции судорог уровень экспрессии *Ntrk2* не изменялся (рис. 1, б, $F_{3,13} = 2,027$). В гиппокампе наблюдалось двухфазное повышение мРНК *Ntrk2* через 1 и 6 ч после индукции судорожной активности (рис. 1, в, $F_{3,17} = 9,927$, $p = 0,0073$ и $p = 0,0028$ соответственно).

Было обнаружено, что экспрессия мРНК *Ntrk3* (TrkC) активировалась через 1, 3 и 6 ч после введения PTZ, при этом характер его активации различался в исследуемых областях мозга – передняя кора, задняя кора, гиппокамп (рис. 2). В передней коре и гиппокампе повышение мРНК *Ntrk3* наблюдалось через 3 ч после индукции судорожной активности (рис. 2, а, $F_{3,16} = 14,66$, $p = 0,0009$; рис. 2, в, $F_{3,17} = 14,36$, $p < 0,0001$ соответственно). В задней коре уровень экспрессии гена *Ntrk3* возрастал уже через 1 ч после индукции судорожной активности (рис. 2, б, $F_{3,17} = 10,24$, $p = 0,0017$ и $F_{3,16} = 3,439$, $p = 0,0334$ соответственно) и оставался повышенным спустя 3 ч ($p = 0,0014$ и $p = 0,0434$ соответственно) и 6 ч после судорог ($p = 0,0003$).

Экспрессия мРНК *Ngfr* (p75NTR) также была активирована в те же сроки в передней коре, задней коре и гиппокампе (рис. 3). Профиль экспрессии мРНК *Ngfr* различался между исследованными областями мозга. В передней коре и в гиппокампе экспрессия гена *Ngfr* индуцировалась через 3 ч после индукции судорожной активности (рис. 3, а, $F_{3,14} = 8,948$, $p = 0,0179$ и рис. 3, в, $F_{3,15} = 19,52$, $p < 0,0001$ соответственно). Ранняя активация наблюдалась в задней коре головного мозга через 1 ч после индукции судорожной активности (рис. 3, б, $F_{3,17} = 9,859$, $p = 0,0441$), экспрессия оставалась повышенной через 3 ч ($p = 0,0006$) и через 6 ч ($p = 0,0005$) после введения PTZ.

Значимых изменений в экспрессии мРНК *Ntrk1* (TrkA) в передней коре ($F_{3,16} = 0,3484$) и задней коре ($F_{3,17} = 3,839$, апостериорный тест Даннета $p > 0,05$) в течение 1–6 ч после индукции судорожной активности нейронов не наблюдалось (рис. 4). Экспрессия мРНК *Ntrk1* в гиппокампе была на нерепрезентативно низком уровне, в связи с чем данные не приводятся.

Чтобы подтвердить, что изменения в экспрессии генов *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* не обусловлены клетками крови и клетками сосудов головного мозга, а соответствуют ткани мозга, мы проанализировали уровень экспрессии тех же генов в крови и мышине эндотелии в соответствующие моменты времени. Экспрессия *Ntrk3* и *Ngfr* в крови мышей не изменялась через 3–6 ч

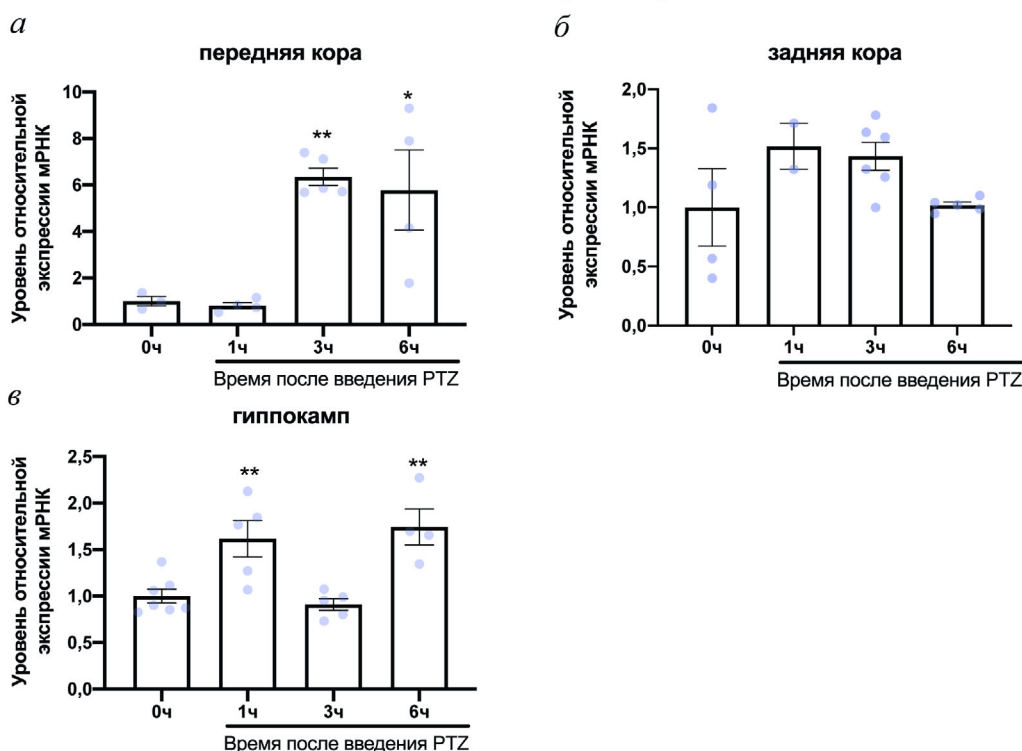
***Ntrk2* (TrkB)**

Рис. 1. Изменения экспрессии мРНК *Ntrk2* (TrkB) после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (а), в задней коре (б), в гиппокампе (в). 0 ч – контрольные мыши. ANOVA, апостериорный тест Даннета * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Данные представлены как среднее значение экспрессии \pm стандартная ошибка среднего (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

после PTZ-индуцированных судорог ($F_{2,9} = 1,036$ и $F_{2,10} = 3,701$, рис. 2, а и б соответственно в Приложении). Обработка первичной культуры клеток мышинного эндотелия PTZ также не влияла на экспрессию *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* (рис. 2, с–е соответственно в Приложении). В связи с этим мы имеем основания полагать, что увеличение экспрессии *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* происходит непосредственно в ткани мозга.

Таким образом, мы показали, что в достаточно короткие сроки (1–6 ч) после введения PTZ в передней, задней коре головного мозга и гиппокампе мышей индуцируется экспрессия генов рецепторов нейротрофинов *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr*, что отражает их участие в регуляции функционирования нервной ткани в ответ на стимулированную активность. Примечательно, что динамика изменения экспрессии рецепторов нейротрофинов различалась между исследуемыми отделами головного мозга: если в передней коре через 3–6 ч в большей степени происходила индукция *Ntrk2* (2-way ANOVA, 3 и 6 ч *Ntrk2* против *Ntrk3* и *Ntrk2* против *Ngfr*, $p < 0,0001$), описанной функцией которого является регуляция выживаемости, то в задней коре через 3–6 ч в боль-

шей степени происходила индукция *Ngfr*, регулирующего гибель (2-way ANOVA, 3 и 6 ч *Ntrk3* против *Ngfr* и *Ntrk2* против *Ngfr*, $p < 0,0001$) (рис. 5). В гиппокампе основная волна индукции экспрессии рецепторов нейротрофинов была короче и приходилась на 3 ч, где возрастала экспрессия как *Ntrk3*, так и *Ngfr* (2-way ANOVA, 3 ч *Ntrk3* против *Ntrk2* и *Ngfr* против *Ntrk2*, $p < 0,0001$). Чтобы понять, коррелируют ли наблюдаемые нами изменения экспрессии рецепторов нейротрофинов с соответствующей клеточной сигнализацией в разных отделах головного мозга в те же сроки (3 и 6 ч), мы далее провели анализ экспрессии белков Vcl-2 и Вах – внутриклеточных сигнальных эффекторов выживаемости и гибели клеток.

Оценка сигнального пути с участием белков апоптоза Vcl-2 и Вах в головном мозге после индукции судорожной активности. В процессах, опосредующих пластические реакции и выживаемость нейронов, внутриклеточная сигнализация через TrkB и TrkC сопряжена, в частности, с увеличением экспрессии анти-апоптотического белка Vcl-2 и/или увеличением соотношения Vcl-2/Вах [47–49]. Напротив, снижение

соотношения *Bcl-2/Vax* отражает запуск нейрональной гибели, что характерно для сигнализации p75NTR [50]. Поэтому далее мы оценили изменение содержания *Bcl-2* и его адаптерного про-апоптотического белка *Vax* в передней, задней коре и в гиппокампе через 3 и 6 ч после PTZ-индуцированных судорог (рис. 6). Через 3 ч после индукции экспрессия *Bcl-2* в трёх анализируемых отделах головного мозга практически не изменялась (рис. 6, а; рис. 3, а в Приложении). Экспрессия *Vax*, напротив, снижалась через 3 ч в передней и задней коре, но не в гиппокампе, по сравнению с контролем (рис. 6, а; рис. 3, а в Приложении). Через 6 ч после активации нейронов наблюдалась большая вариативность между образцами нервной ткани. Но в среднем экспрессия *Bcl-2* возрастала в передней и задней коре и практически не изменялась в гиппокампе; экспрессия *Vax* через 6 ч практически не изменялась в трёх анализируемых отделах головного мозга (рис. 6, в; рис. 3, б в Приложении).

Мы также проанализировали соотношение *Bcl-2/Vax*, которое может определять выживаемость клеток [48, 51, 52]. Оказалось, что это соотношение возрастает в передней и задней коре после индукции генерализованной судорожной активности (2-way ANOVA 0 ч, 3 ч: фактор времени $F_{1,8} = 36,73$; фактор зоны головного мозга $F_{2,8} = 31,58$; взаимодействие $F_{2,8} = 10,34$; тест Холма–Сидака 0 ч против 3 ч передняя кора $p = 0,0019$, задняя кора $p = 0,0019$, гиппокамп $p = 0,8777$), что отражает сдвиг к сигналу о «выживании», но практически не изменяется в гиппокампе (рис. 6, б и г).

Эти данные указывают на то, что прямой корреляции между экспрессией мРНК рецепторов нейротрофинов и сигнализацией выживаемости в ранние сроки не прослеживается. В передней коре происходит существенная и преимущественная индукция *Ntrk2*, что согласуется со значительным увеличением соотношения *Bcl-2/Vax*. В задней коре в большей степени возрастает экспрессия *Ngfr*, однако происходит

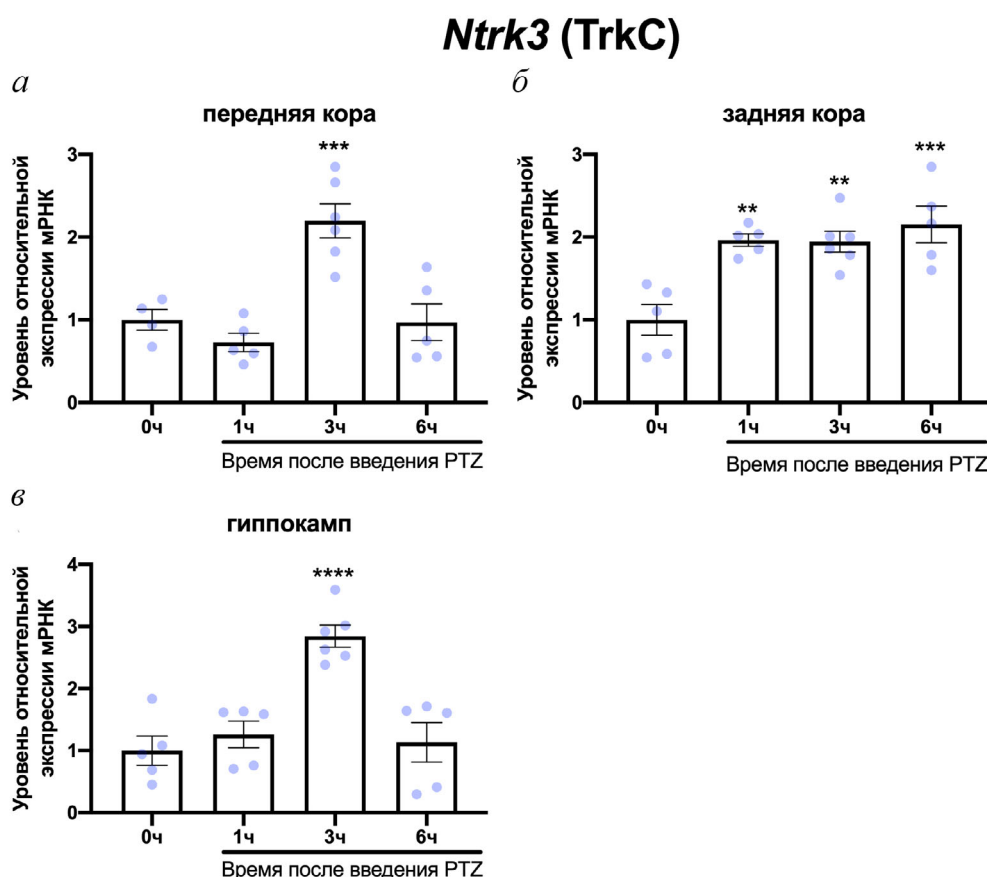


Рис. 2. Изменения экспрессии мРНК *Ntrk3* (TrkC) после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (а), в задней коре (б), в гиппокампе (в). 0 ч – контрольные мыши. ANOVA, апостериорный тест Даннета ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Данные представлены как среднее значение экспрессии \pm стандартная ошибка среднего (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

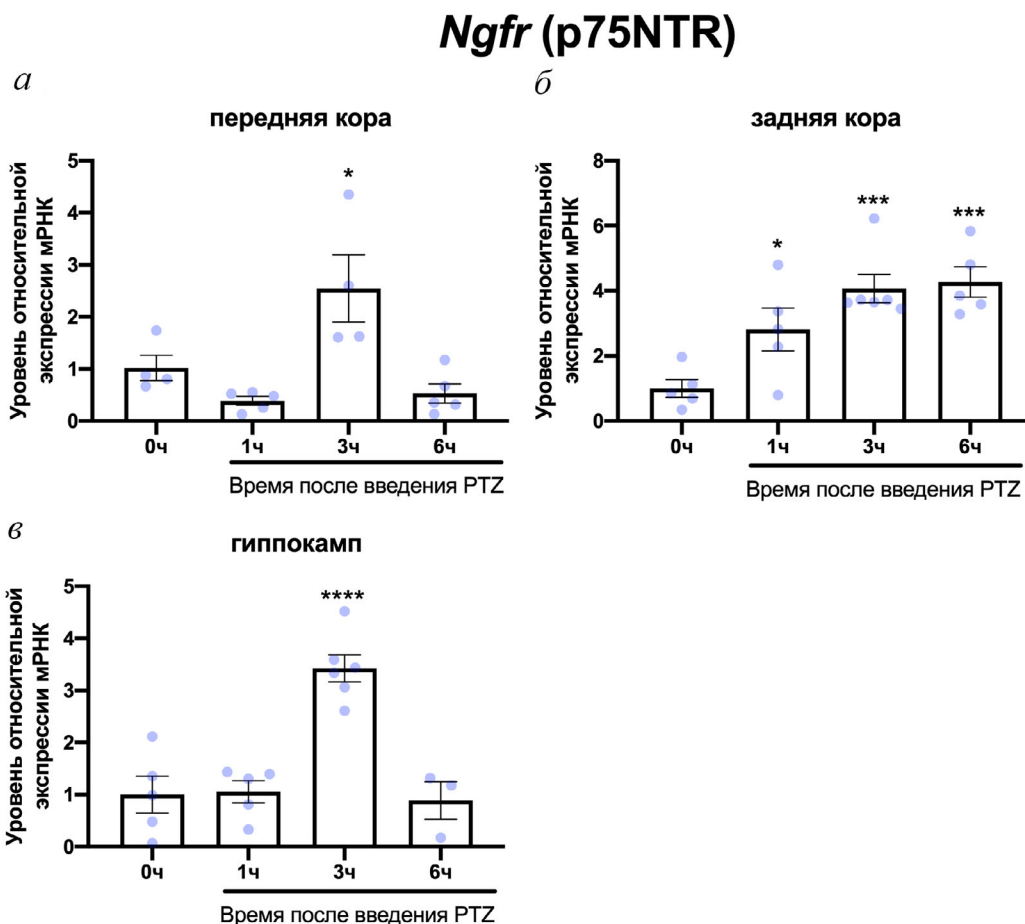


Рис. 3. Изменения экспрессии мРНК *Ngfr* (p75NTR) после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (а), в задней коре (б), в гиппокампе (в). 0 ч – контрольные мыши. ANOVA, апостериорный тест Даннета * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Данные представлены как среднее значение экспрессии \pm стандартная ошибка среднего (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

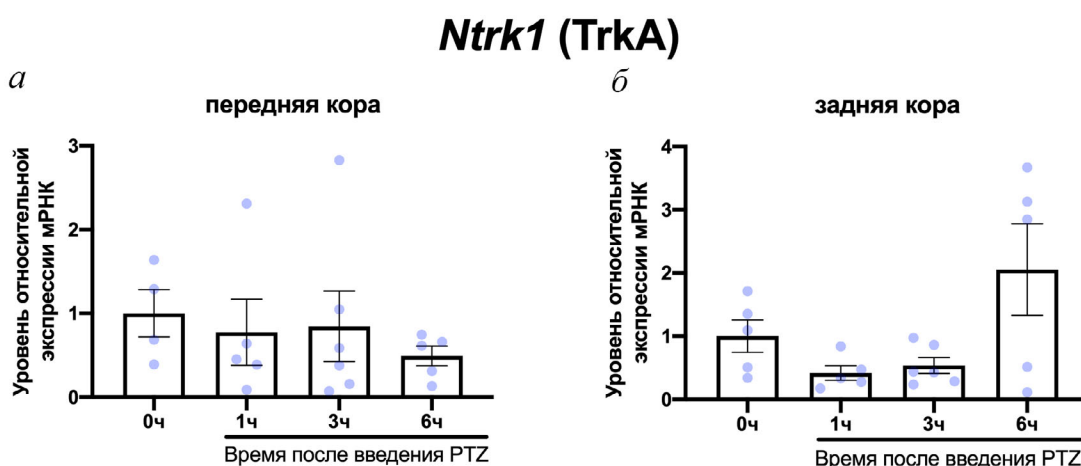


Рис. 4. Изменения экспрессии мРНК *Ntrk1* (TrkA) после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (а) и в задней коре (б). 0 ч – контрольные мыши. ANOVA, апостериорный тест Даннета, статистически значимых изменений не обнаружено. Данные представлены как среднее значение экспрессии \pm стандартная ошибка среднего (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

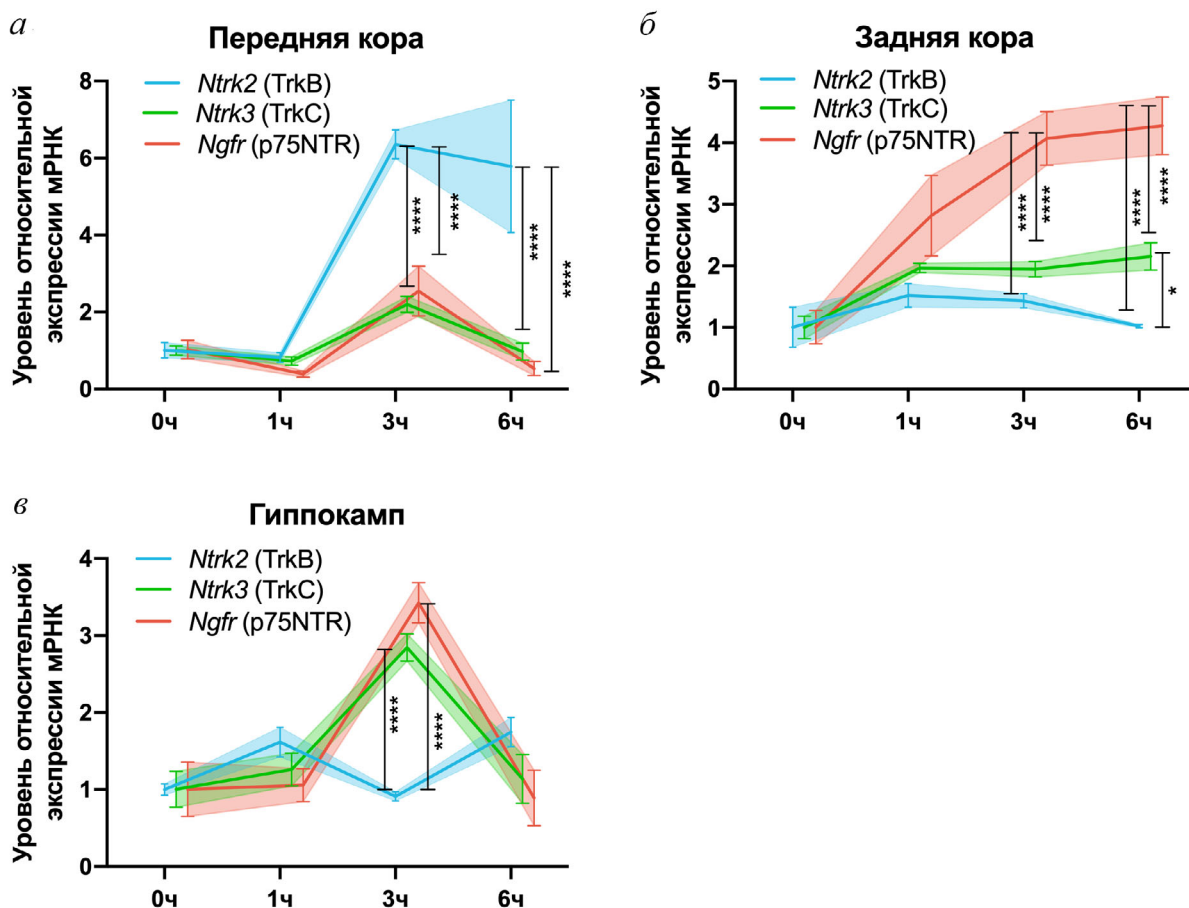


Рис. 5. Суммарные изменения экспрессии мРНК *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (а), в задней коре (б) и в гиппокампе (в). 0 ч – контрольные мыши. 2-way ANOVA, апостериорный тест Тьюки, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Данные представлены как среднее значение экспрессии \pm стандартная ошибка среднего (SEM)

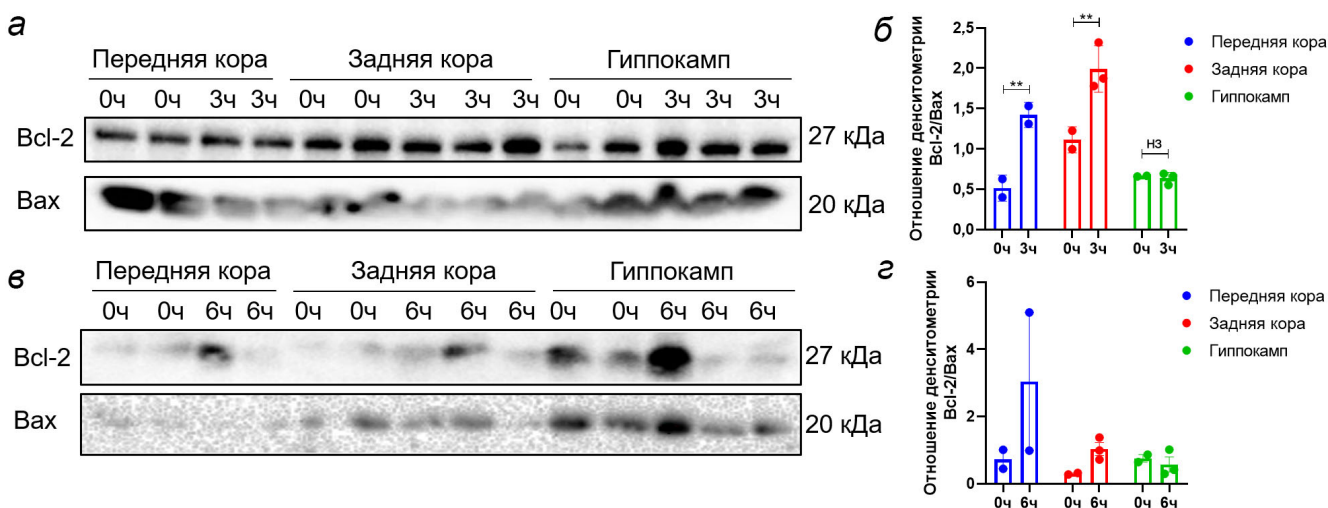


Рис. 6. Анализ изменения экспрессии Vcl-2 и Вах после индукции генерализованной судорожной активности. 0 ч – контрольные мыши. Анализ проводили методом Вестерн-блоттинга с использованием лизатов передней и задней коры и гиппокампа через 3 ч (а и б) и 6 ч (в и г) после индукции активации нейронов. б и г – Анализ отношения денситометрии экспрессии Vcl-2 к белку Вах в разных отделах головного мозга. На дорожку наносили одинаковое количество белка (40 мкг). 2-way ANOVA, апостериорный тест Холма–Сидака: нз – незначимо, ** $p < 0,01$

также увеличение экспрессии *Ntrk3*, который, предположительно, может быть функционально значимым и способствует активации соответствующего сигналинга, что выражается в повышении соотношения *Vcl-2/Vax*. Напротив, в гиппокампе через 3 ч одинаково индуцируются *Ntrk3* и *Ngfr*, но конечное соотношение *Vcl-2/Vax* не изменяется, что может говорить о том, что сигналы от *Ntrk3* и *Ngfr* «уравновешивают» друг друга, либо их индукция не является функционально значимой, либо в регуляцию клеточного ответа гиппокампа вовлечены другие механизмы. Так как известно, что микроРНК могут участвовать в пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов [53], в том числе генов рецепторов нейротрофинов [54], мы предположили, что в гиппокампе могут быть задействованы дополнительные механизмы регуляции нейронального ответа на возбуждение и повреждение, связанные с микроРНК. Поэтому далее мы проанализировали экспрессию микроРНК в норме и через 3 ч после судорожной активации нейронов в гиппокампе.

Оценка профиля экспрессии микроРНК в гиппокампе мышей при судорожной активности. Для анализа экспрессии микроРНК мы выбрали временной интервал 3 ч и зону гиппокампа, где наблюдалась значительная индукция экспрессии *Ntrk3* и *Ngfr*. Мы проанализировали экспрессию 84 микроРНК, наиболее изученных в контексте нейробиологии (рис. 1 в Приложении). Мы обнаружили, что через 3 ч после PTZ-индуцированной активации нейронов происходит индукция экспрессии основной части исследуемых микроРНК (рис. 7, а). Из 84 проанализированных микроРНК экспрессия 43 (51%) повышалась как минимум в 2 раза, и экспрессия только одной микроРНК снизилась более чем в 2 раза (рис. 7, б).

Анализ обогащения мишеней микроРНК выявил 105 генов, являющихся мишенями как минимум двух deregulированных микроРНК, и 64 гена, являющихся мишенями трёх и более deregulированных микроРНК (рис. 4 в Приложении). Анализ обогащения этих генов по функциональным и метаболическим характеристикам показал высокую представленность таких биологических процессов (GO:BP), как: сигнальный путь рецепторных тирозинкиназ, активируемых коллагеном; ангиогенез; организация внеклеточного матрикса; дифференцировка клеток; клеточный стресс-ответ на кислотные химические вещества. Анализ обогащения этих генов по KEGG-путям показал перепредставленность путей фокальной адгезии, взаимодействия рецепторов с внеклеточным матриксом, сигнального пути PI3K-Akt, сигнального пути

релаксина (рис. 7, в). Семейство релаксина включает разные активные сигнальные пептиды, синтезируемые в разных органах, в частности, релаксин-3 синтезируется в нейронах и модулирует стресс-ответ, метаболизм и поведенческие реакции [55].

Мы также проанализировали обогащение по транскрипционным факторам и выявили 22 потенциальных транскрипционных фактора, которые могут регулировать экспрессию микроРНК на раннем этапе нейрональной активности (рис. 7, г; рис. 5 в Приложении).

Известно, что микроРНК могут служить своеобразными буферами, уравновешивающими скачки активации транскрипции генов [56], поэтому их ранняя индукция при судорожной активности может быть важна для гомеостатического контроля экспрессии индуцируемых генов. В связи с этим мы предположили, что нейротрофины и рецепторы нейротрофинов, экспрессия которых возрастает через 1–3 ч и далее падает до первоначального уровня к 6 ч в гиппокампе после введения PTZ, могут быть мишенями этих микроРНК. В результате поиска в базах данных мишеней микроРНК мы обнаружили, что *TrkB* и *TrkC* могут быть мишенью 8 deregulированных микроРНК, *p75NTR* – 2 микроРНК, *NGF* – 3 микроРНК, *BDNF* – 6 микроРНК, *Vcl-2* – 5 микроРНК, *Vax* – 1 микроРНК (табл. 2). *TrkA*, нейротрофины *NT-3* и *NT-4/5* не были обнаружены в качестве мишеней индуцированных микроРНК. Таким образом, в гиппокампе ранняя волна индукции экспрессии генов *TrkB* (через 1 ч), *TrkC* и *p75NTR* (через 3 ч) коррелирует с индукцией ряда микроРНК, нацеленных на подавление этих генов, что может объяснять последующее снижение уровня транскрипции этих генов до их базовых значений и отсутствие значимого изменения соотношения *Vcl-2/Vax*. Это может отражать механизм «уравновешивания» генного ответа. Базы данных, являющиеся источником указанных взаимодействий микроРНК–мишень, и их предсказательные оценки указаны в таблице в Приложении.

Для подтверждения полученных результатов и нашей гипотезы о ко-индукции микроРНК и генов-мишеней, мы проанализировали в гиппокампе экспрессию микроРНК, мишенями которых могут быть *TrkB* (*mmu-miR-128-3p*), *TrkC* (*mmu-miR-29a-3p*, *mmu-miR-9-5p*, *mmu-miR-128-3p*, *mmu-miR-381-3p*) и *p75NTR* (*mmu-miR-128-3p*, *mmu-miR-27a-3p*) (рис. 8). Нами было обнаружено достоверное увеличение экспрессии *mmu-miR-29a-3p* ($t_6 = 3,599$, $p = 0,0114$, рис. 8, а) и *mmu-miR-9-5p* ($t_6 = 2,711$, $p = 0,0351$, рис. 8, б) в гиппокампе через 3 ч после

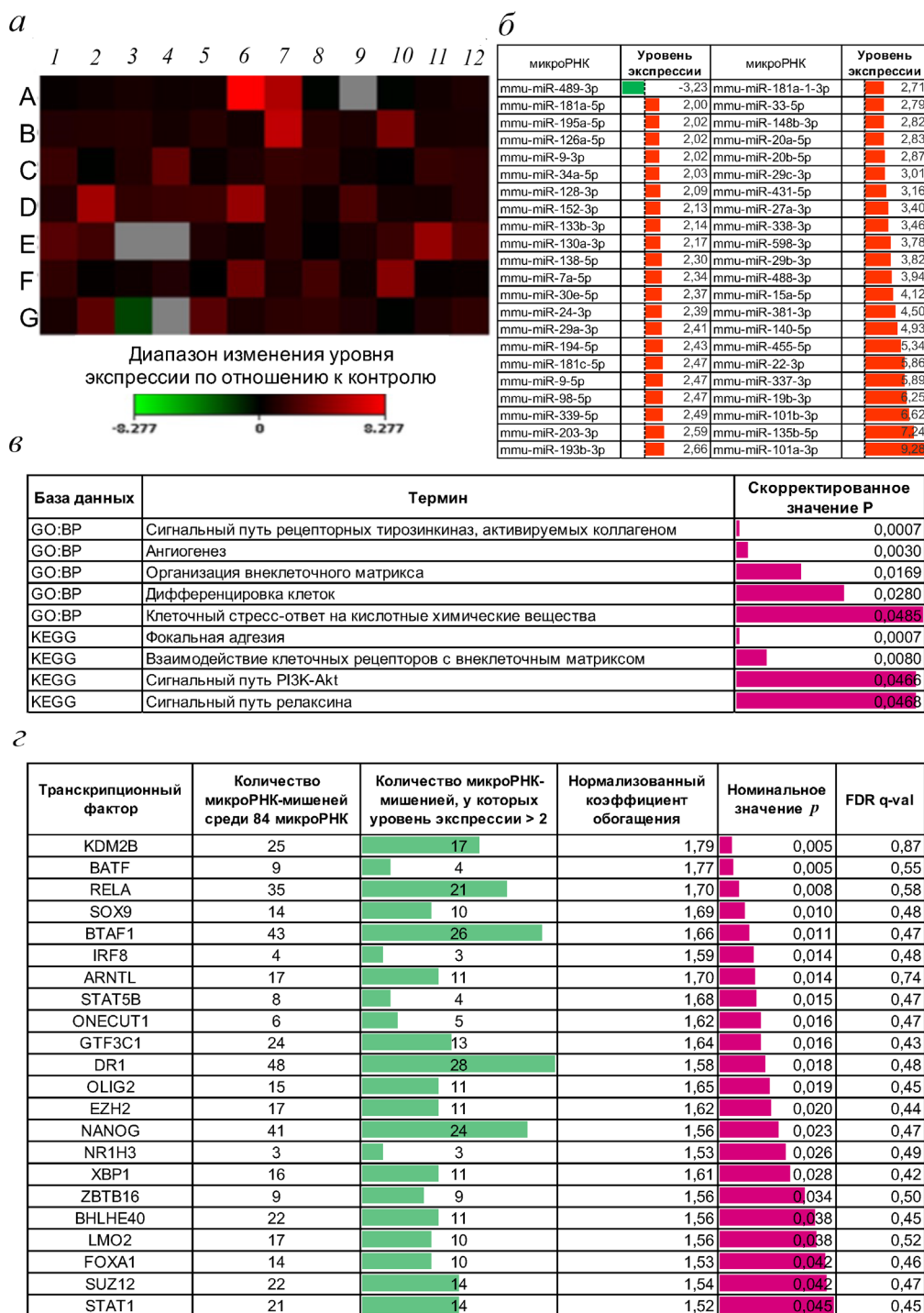


Рис. 7. Оценка изменения микроРНК в гиппокампе через 3 ч после индукции судорожной активности. Оценку уровня экспрессии проводили на планшете «Mouse Neurological Development & Disease» (№ MIMM-107ZA). **а** – Тепловая карта уровня экспрессии 84 микроРНК. Красным цветом обозначены микроРНК, экспрессия которых повысилась; зеленым цветом обозначены микроРНК, экспрессия которых снизилась; серым цветом обозначены микроРНК, экспрессия которых находится на предельно низком уровне как в экспериментальном, так и в контрольном образце ($St > 35$ цикла). Цветовая градация тепловой карты соответствует изменению уровня экспрессии микроРНК, выраженного как соотношение нормализованной экспрессии гена в экспериментальном образце к нормализованной экспрессии гена в контрольном образце ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). **б** – Список микроРНК, экспрессия которых изменялась более, чем в 2 раза. **в** – Анализ обогащения генов, являющихся мишенями как минимум двух deregulированных микроРНК, относящихся к генам, участвующим в регуляции функционального состояния и метаболизма клеток (генная онтология: биологические процессы (Gene ontology: biological processes, GO:BP) и к генам, участвующим в путях базы данных KEGG (Киото энциклопедия генов и геномов)). **г** – Анализ обогащения транскрипционных факторов, регулирующих микроРНК

Таблица 2. Гены-мишени для микроРНК, экспрессия которых увеличивается в гиппокампе не менее чем в 2 раза через 3 ч после введения PTZ

МикроРНК	Уровень увеличения экспрессии	TrkB <i>Ntrk2</i>	TrkC <i>Ntrk3</i>	p75NTR <i>Ngfr</i>	NGF <i>Ngf</i>	BDNF <i>Bdnf</i>	Bcl-2 <i>Bcl2</i>	Bax <i>Bax</i>
mmu-miR-101a-3p	9,28	+						
mmu-miR-135b-5p	7,24	+						
mmu-miR-19b-3p	6,25		+					
mmu-miR-22-3p	5,86	+						
mmu-miR-140-5p	4,93				+			
mmu-miR-381-3p	4,50		+			+		
mmu-miR-15a-5p	4,12					+	+	
mmu-miR-29b-3p	3,82		+					
mmu-miR-338-3p	3,46	+						
mmu-miR-27a-3p	3,40			+				+
mmu-miR-29c-3p	3,01		+					
mmu-miR-20b-5p	2,87		+					
mmu-miR-339-5p	2,49							
mmu-miR-9-5p	2,47		+					
mmu-miR-98-5p	2,47				+			
mmu-miR-29a-3p	2,41		+					
mmu-miR-24-3p	2,39	+						
mmu-miR-30e-5p	2,37				+	+	+	
mmu-miR-138-5p	2,30	+						
mmu-miR-128-3p	2,09	+	+	+				
mmu-miR-34a-5p	2,03					+	+	
mmu-miR-126a-5p	2,02					+		
mmu-miR-195a-5p	2,02					+	+	
mmu-miR-181a-5p	2,00	+					+	

Примечание. Знаком + обозначены микроРНК, регулирующие соответствующий ген. TrkA, нейротрофины NT-3 и NT-4/5 не были обнаружены в качестве мишеней индуцированных микроРНК. Поиск мишеней микроРНК осуществляли по базам данных miRTarBase, miRDB и TargetScan.

ле индукции судорог по сравнению с контролем. Мы также обнаружили тенденцию к увеличению экспрессии mmu-miR-128-3p ($t_6 = 1,463$, $p = 0,1939$, рис. 8, в) и mmu-miR-27a-3p ($t_6 = 1,818$, $p = 0,1189$, рис. 8, з), которая не была статистически значимой ввиду большого разброса экспрессии между животными. Мы не обнаружили значимых изменений в экспрессии mmu-miR-381-3p ($t_6 = 1,186$, $p = 0,2805$, рис. 8, д).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе был исследован транскрипционный ответ генов рецепторов нейротрофинов на PTZ-индуцированную судорожную активность в передней и задней коре и в

гиппокампе мозга мышей. Обнаружено, что экспрессия *Ntrk2* возрастает в передней коре через 3–6 ч, а в гиппокампе индукция экспрессии этого гена наблюдается через 1 и 6 ч; экспрессия *Ntrk3* и *Ngfr* возрастает во всех исследованных областях головного мозга через 3 ч, экспрессия *Ntrk1* значимо не изменяется. Такая ранняя индукция экспрессии *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* характеризует их как гены, входящие в волну раннего генного ответа на нейрональную активность, что, как правило, связано с вовлечением подобных генов в механизмы нейрональной пластичности [57].

Рецепторы нейротрофинов являются важным звеном патогенеза в развитии эпилепсии [58], однако их функциональная роль в нейронах при эпилептических состояниях неодно-

начна. Об изменении экспрессии рецепторов нейротрофинов после судорог неоднократно сообщалось ранее [6–8]. Активация рецепторов Trk связана с выживанием, дифференцировкой нейронов [4, 5] и снижением предрасположенности к судорогам [59, 60]. Напротив, активация низкоаффинного рецептора p75NTR вызывает апоптотическую гибель нейронов [4, 61] и может приводить к повышенной возбудимости нейронов, что обуславливает предрасположенность к судорогам [62]. Экспериментальные доказательства индукции экспрессии TrkC при генерализованной судорожной активности противоречивы: так, в зависимости от различных способов индукции судорог динамика экспрессии TrkC в зубчатой извилине гиппокампа может варьироваться в течение 2–12 ч [28–30]. Наши исследования показали, что экспрессия мРНК *Ntrk3* варьируется между отделами и через 3 ч после индукции судорог достигает максимальных значений в гиппокампе – в 3 раза больше по сравнению с интактным мозгом, при этом высокие значения *Ntrk3* наблюдаются в период 1–6 ч после индукции судорог. При этом в гиппокампе, в отличие от передней и задней коры, через 3 и 6 ч после индукции судорожной

активности не происходит изменения экспрессии и соотношения *Vcl-2/Vax*, определяющего выживаемость нейронов [51]. Не исключено, что такое различие может определять более высокую предрасположенность нейронов гиппокампа к гибели в результате судорожной активности по сравнению с корковыми нейронами [63, 64].

Падение экспрессии рецепторов нейротрофинов в гиппокампе до контрольных значений уже к шести часам после индукции судорог может указывать на то, что их экспрессия негативно регулируется микроРНК, мишенями которых они являются. Кроме того, отсутствие раннего запуска сигнала о «выживании» в гиппокампе может также быть связано с индукцией микроРНК, мишенями которых являются нейротрофины и их высокоаффинные рецепторы. Так как известно, что экспрессия генов нейротрофинового семейства может находиться под контролем микроРНК [54], то далее мы проанализировали экспрессию микроРНК в норме и через 3 ч после PTZ-индуцированной активации нейронов в гиппокампе.

При анализе экспрессии 84 микроРНК в гиппокампе через 3 ч после введения PTZ мы

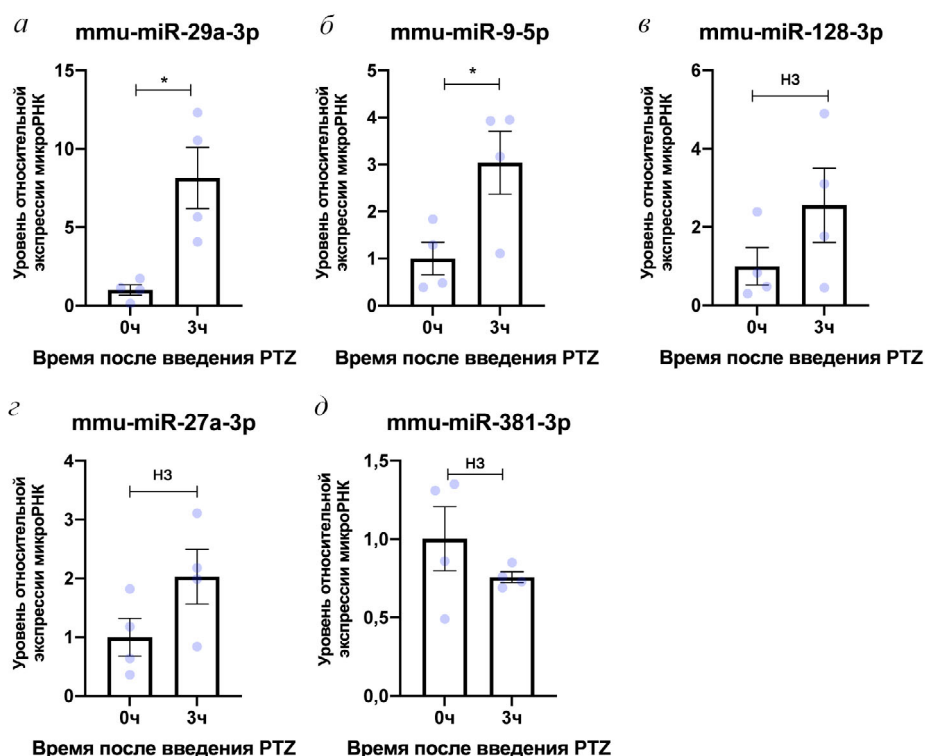


Рис. 8. Анализ экспрессии выбранных микроРНК после индукции генерализованной судорожной активности в гиппокампе. 0 ч – контрольные мыши. * $p < 0,05$, t -тест Стьюдента. Данные представлены как среднее значение экспрессии \pm стандартная ошибка среднее (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

наблюдала индукцию 43 микроРНК (повышение экспрессии как минимум в 2 раза), и экспрессия одной микроРНК снизилась более чем в 2 раза. Примечательно, что значимая индукция наблюдалась у двух микроРНК – *mmi-miR-29a-3p* и *mmi-miR-9-5p*. Для этих микроРНК описан целый ряд эффектов в нервной системе: известно изменение их экспрессии в ряде нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, хорей Гентингтона, боковой амиотрофической склероз и др.) [65–68], обсуждается возможность использования микроРНК-29a и микроРНК-9 в качестве биомаркёров некоторых патологий, например, болезни Альцгеймера [69]. Есть работы, указывающие на протективную функцию этих микроРНК в головном мозге: было показано, что экспрессия микроРНК-9 подавляет накопление белка прогерина в нейронах и снижает его токсический эффект при синдроме Гетчинсона–Гилфорда [70, 71], а потеря экспрессии микроРНК-29a в головном мозге мышей вызывает массивную апоптотическую гибель клеток в гиппокампе и мозжечке и выраженную атаксию [72]. При этом мишенями микроРНК-29 в нейронах могут быть как анти-апоптотические, так и про-апоптотические белки семейства *Bcl-2* [73]. На модели депрессии у крыс показано участие микроРНК-9 в снижении соотношения *Bcl-2/Bax* и апоптозе нейронов [74].

При судорогах описано изменение уровней целого ряда микроРНК [75, 76], тем не менее информация о микроРНК-29a и микроРНК-9 в контексте РТЗ-индуцированных судорог встречается редко. Изменение экспрессии *mmi-miR-29a-3p* (как увеличение, так и снижение) наблюдалось на модели судорог у мышей и крыс в сроки от 6 ч до 1 недели [76–78]. Повышение *mmi-miR-9-5p* было описано только через 3 дня после эпилептического статуса у мышей в зубчатой извилине [78]. Наши данные показывают, что индукция этих микроРНК может происходить в гораздо более ранние сроки (3 ч) после генерализованной судорожной активности, что указывает на их возможное участие в развитии раннего клеточного ответа на судороги и регуляции процессов нейрональной выживаемости.

Идентификация ранних транскрипционных факторов, отвечающих за индукцию микроРНК при нейрональной активации, требует дальнейшего изучения, т.к. классические ранние транскрипционные факторы *c-Fos*, *c-Jun*, *Egr-1* [79] не были перепредставлены в нашем анализе транскрипционных факторов. Ранняя индукция *mmi-miR-29a-3p* и *mmi-miR-9-5p* в ткани гиппокампа предполагает их возможное участие в

контроле над экспрессией индуцируемых генов (например, обнаруженной нами индукцией *Ntrk3*), что необходимо для тонкой балансировки процессов транскрипции. В работе Fiorenza et al. [80] было показано, что у мышей с индуцибельным нокаутом *Dicer* (нуклеаза, отвечающая за образование микроРНК) отмечаются большая подверженность индуцированным судорогам и нейродегенерация. Через 2 ч после судорог у *Dicer*-нокаутных мышей уровни мРНК непосредственных ранних генов были гораздо выше, чем у контрольных мышей, что подтверждает гипотезу о том, что ранняя экспрессия микроРНК в ответ на нейрональную активацию важна для «приглушения» транскрипционного ответа. Наблюдавшееся нами падение экспрессии рецепторов нейротрофинов в гиппокампе до контрольных значений уже к 6 ч после индукции судорог может относиться к такому случаю регуляции. Помимо этого, известно, что микроРНК могут вызывать репрессию трансляции своих мишеней [81], поэтому индукция микроРНК *mmi-miR-9-5p*, предсказанной мишенью которой является *tPA*, может объяснить ранее отмеченное нами отсутствие изменения экспрессии тканевого активатора плазминогена *tPA* на уровне белка при значительной индукции его на уровне мРНК [21].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что судорожная нервная активность способна запускать дифференциальную регуляцию генов рецепторов нейротрофинов и микроРНК, сцепленных с функциями выживания нейронов и их адаптацией к клеточному стрессу. При этом в клетках коры головного мозга, но не в гиппокампе, происходит запуск гомеостатических каскадов выживаемости с участием белков *Bcl-2* и *Bax*, что может обуславливать более высокий риск клеточной гибели у нейронов гиппокампа по сравнению с корой. В совокупности результаты нашего исследования привлекают большее внимание к регуляции экспрессии генов нейротрофиновых рецепторов и регуляторных микроРНК на ранних сроках после эпизодов нейрональной активации. При этом наблюдавшаяся нами индукция экспрессии *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* как в передней и задней коре, так и в гиппокампе, может говорить о том, что индукция экспрессии генов рецепторов нейротрофинов является достаточно универсальным ранним ответом на нейрональную активность в разных отделах головного мозга. Задачи, актуальные в этой области для последующего изучения, включают определение точных сроков начала транскрипции генов рецепторов нейротрофинов после активации нейронов и зависимость этой индукции от

de novo синтеза белка, т.е. соответствие этих генов критериям непосредственных ранних генов в данной ситуации [82–84]. Другим важным вопросом для будущих исследований будет соотношение регуляции нервной активностью генов нейротрофиновых рецепторов и генов самих нейротрофинов, для некоторых из которых показана индукция в роли непосредственных ранних генов [85, 86].

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2020-801).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Исследование было проведено в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Условия содержания животных и экспериментальные процедуры одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 10, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chao, M. V. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways, *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 299-309, doi: 10.1038/nrn1078.
- Mitre, M., Mariga, A., and Chao, M. V. (2017) Neurotrophin signalling: Novel insights into mechanisms and pathophysiology, *Clin. Sci.*, **131**, 13-23, doi: 10.1042/CS20160044.
- Teng, K. K., Felice, S., Kim, T., and Hempstead, B. L. (2010) Understanding proneurotrophin actions: recent advances and challenges, *Dev. Neurobiol.*, **70**, 350-359, doi: 10.1002/dneu.20768.
- Friedman, W. J. (2010) Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis, *Neuroscientist*, **16**, 244-252, doi: 10.1177/1073858409349903.
- Miller, F. D., and Kaplan, D. R. (2001) Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis, *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 1045-1053, doi: 10.1007/PL00000919.
- Unsain, N., Nuñez, N., Anastasia, A., and Mascó, D. H. (2008) Status epilepticus induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction, *Neuroscience*, **154**, 978-993, doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.038.
- Kandravicius, L., Hallak, J. E., Carlotti, C. G., Assirati, J. A., and Leite, J. P. (2014) Neurotrophin receptors expression in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with seizure type and surgical outcome, *Acta Neuropathol. Commun.*, **2**, 81, doi: 10.1186/s40478-014-0081-2.
- Conti, G., Gale, K., and Kondratyev, A. (2009) Immunohistochemical evaluation of the protein expression of nerve growth factor and its TrkA receptor in rat limbic regions following electroshock seizures, *Neurosci. Res.*, **65**, 201-209, doi: 10.1016/j.neures.2009.07.001.
- Rysenkova, K. D., Semina, E. V., Karagyaur, M. N., Shmakova, A. A., Dyikanov, D. T., et al. (2018) CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation, *Oncotarget*, **9**, 29414-29430, doi: 10.18632/oncotarget.25647.
- Yepes, M. (2018) The plasminogen activation system promotes neurorepair in the ischemic brain, *Curr. Drug Targets*, **20**, 953-959, doi: 10.2174/138945012066618121144550.
- Семина Е. В., Рубина К. А., Степанова В. В., Ткачук В. А. (2016) Участие рецептора урокиназы и его эндогенных лигандов в развитии головного мозга и формировании когнитивных функций, *Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова*, **102**, 881-903.
- Шмакова А. А., Балацкий А. В., Кулебякина М. А., Шауб Т., Карагяур М. Н., и др. (2021) Гиперэкспрессия гена рецептора урокиназы uPAR в головном мозгу мыши стимулирует миграцию нейронов в кору в эмбриогенезе, *Онтогенез*, **52**, 68-79, doi: 10.31857/S0475145021010067.
- Eagleson, K. L., Bonnin, A., and Levitt, P. (2005) Region- and age-specific deficits in γ -aminobutyric acidergic neuron development in the telencephalon of the uPAR^{-/-} mouse, *J. Compar. Neurol.*, **489**, 449-466, doi: 10.1002/cne.20647.
- Karagyaur, M., Dyikanov, D., Makarevich, P., Semina, E., Stambolsky, D., et al. (2015) Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration, *Biomed. Pharmacother.*, **74**, 63-70, doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.002.
- Klimovich, P. S., Semina, E. V., Karagyaur, M. N., Rysenkova, K. D., Sysoeva, V. Y., et al. (2020) Urokinase receptor regulates nerve regeneration through its interaction with $\alpha 5 \beta 1$ -integrin, *Biomed. Pharmacother.*, **125**, 110008, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110008.
- Karagyaur, M., Rostovtseva, A., Semina, E., Klimovich, P., Balabanyan, V., et al. (2020) A bicistronic plasmid encoding brain-derived neurotrophic factor and urokinase plasminogen activator stimulates peripheral nerve regeneration after injury, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **372**, 248-255, doi: 10.1124/JPET.119.261594.
- Merino, P., Diaz, A., Jeanneret, V., Wu, F., Torre, E., Cheng, L., and Yepes, M. (2017) Urokinase-type plasminogen activator (uPA) binding to the uPAR receptor (uPAR) promotes axonal regeneration in the central nervous system, *J. Biol. Chem.*, **292**, 2741-2753, doi: 10.1074/jbc.M116.761650.
- Semina, E., Rubina, K., Sysoeva, V., Rysenkova, K., Klimovich, P., et al. (2016) Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching, *Eur. J. Cell Biol.*, **95**, 295-310, doi: 10.1016/j.ejcb.2016.05.003.
- Rysenkova, K. D., Klimovich, P. S., Shmakova, A. A., Karagyaur, M. N., Ivanova, K. A., et al. (2020) Urokinase receptor deficiency results in EGFR-mediated failure to transmit signals for cell survival and neurite formation in mouse neuroblastoma cells, *Cell. Signalling*, **75**, 109741, doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109741.

20. Klimovich, P. S., and Semina, E. V. (2020) Mechanisms of participation of the urokinase receptor in directed axonal growth, *Mol. Biol.*, **54**, 89-98, doi: 10.1134/S0026893320010094.
21. Shmakova, A. A., Rubina, K. A., Rysenkova, K. D., Gruzdeva, A. M., Ivashkina, O. I., et al. (2020) Urokinase receptor and tissue plasminogen activator as immediate early genes in pentylenetetrazole-induced seizures in the mouse brain, *Eur. J. Neurosci.*, **51**, 1559-1572, doi: 10.1111/ejn.14584.
22. Shmakova, A. A., Rubina, K. A., Anokhin, K. V., Tkachuk, V. A., and Semina, E. V. (2019) The role of plasminogen activators in the pathogenesis of epilepsy, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 979-991, doi: 10.1134/S0006297919090013.
23. Yepes, M., Sandkvist, M., Coleman, T. A., Moore, E., Wu, J.-Y., et al. (2002) Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent, *J. Clin. Invest.*, **109**, 1571-1578, doi: 10.1172/JCI14308.
24. Ndoe-Ekane, X. E., and Pitkänen, A. (2013) Urokinase-type plasminogen activator receptor modulates epileptogenesis in mouse model of temporal lobe epilepsy, *Mol. Neurobiol.*, **47**, 914-937, doi: 10.1007/s12035-012-8386-2.
25. Merino, P., and Yepes, M. (2018) Urokinase-type plasminogen activator induces neurorepair in the ischemic brain, *J. Neurol. Exp. Neurosci.*, **4**, 24-29, doi: 10.17756/jnen.2018-039.
26. Yepes, M., and Lawrence, D. A. (2004) Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system, *Thromb. Haemost.*, **91**, 457-464, doi: 10.1160/TH03-12-0766.
27. Merino, P., Diaz, A., Manrique, L. G., Cheng, L., and Yepes, M. (2018) Urokinase-type plasminogen activator (uPA) promotes ezrin-mediated reorganization of the synaptic cytoskeleton in the ischemic brain, *J. Biol. Chem.*, **293**, 9234-9247, doi: 10.1074/jbc.RA118.002534.
28. Mudò, G., Salin, T., Condorelli, D. F., Jiang, X. H., Dell'Albani, P., et al. (1995) Seizures increase trkC mRNA expression in the dentate gyrus of rat hippocampus, *J. Mol. Neurosci.*, **6**, 11-22, doi: 10.1007/BF02736755.
29. Mudò, G., Jiang, X. H., Timmusk, T., Bindoni, M., and Belluardo, N. (1996) Change in neurotrophins and their receptor mRNAs in the rat forebrain after status epilepticus induced by pilocarpine, *Epilepsia*, **37**, 198-207, doi: 10.1111/j.1528-1157.1996.tb00012.x.
30. Ferencz, I., Kokaia, M., Keep, M., Elmer, E., Metsis, M., et al. (1997) Effects of cholinergic denervation on seizure development and neurotrophin messenger RNA regulation in rapid hippocampal kindling, *Neuroscience*, **80**, 389-399, doi: 10.1016/s0306-4522(97)00006-7.
31. Sheng, F., Chen, M., Tan, Y., Xiang, C., Zhang, M., et al. (2016) Protective effects of Otophyllolide N on Pentylenetetrazol-induced neuronal injury *in vitro* and *in vivo*, *Front. Pharmacol.*, **7**, 224, doi: 10.3389/fphar.2016.00224.
32. Ghadiri, T., Gorji, A., Vakilzadeh, G., Hajali, V., Khodaghali, F., and Sharifzadeh, M. (2020) Neuronal injury and death following focal mild brain injury: the role of network excitability and seizure, *Iranian J. Basic Med. Sci.*, **23**, 63-70, doi: 10.22038/IJBMS.2019.37558.8932.
33. Smith, A. J., Clutton, R. E., Lilley, E., Hansen, K. E. A., and Brattelid, T. (2018) PREPARE: guidelines for planning animal research and testing, *Lab. Animals*, **52**, 135-141, doi: 10.1177/0023677217724823.
34. Zhu, Y.-Y., Zhu-Ge, Z.-B., Wu, D.-C., Wang, S., Liu, L.-Y., et al. (2007) Carnosine inhibits pentylenetetrazol-induced seizures by histaminergic mechanisms in histidine decarboxylase knock-out mice, *Neurosci. Lett.*, **416**, 211-216, doi: 10.1016/J.NEULET.2007.01.075.
35. Van Erum, J., Van Dam, D., and De Deyn, P. P. (2019) PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale, *Epilepsy Behav.*, **95**, 51-55, doi: 10.1016/j.yebeh.2019.02.029.
36. Spijker, S. (2011) Dissection of rodent brain regions, *Neuroproteomics*, **2**, 13-26, doi: 10.1007/978-1-61779-111-6_1.
37. Franklin, K., and Paxinos, G. (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact – 3rd Edition*, Academic Press.
38. Zhang, S., Liang, F., Wang, B., Le, Y., and Wang, H. (2014) Elevated expression of pleiotrophin in pilocarpine-induced seizures of immature rats and in pentylenetetrazole-induced hippocampal astrocytes *in vitro*, *Acta Histochem.*, **116**, 415-420, doi: 10.1016/j.acthis.2013.09.003.
39. Kalantaripour, T. P., Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Najafipour, H., and Asadi-Shekaari, M. M. (2017) Apelin-13 protects rat primary cortical glia-neuron co-culture against pentylenetetrazole-induced toxicity, *Biomed. Pharmacother.*, **87**, 661-668, doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.131.
40. Licursi, V., Conte, F., Fiscon, G., and Paci, P. (2019) MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis, *BMC Bioinformatics*, **20**, 545, doi: 10.1186/s12859-019-3105-x.
41. Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., et al. (2019) G:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update), *Nucleic Acids Res.*, **47**, W191-W198, doi: 10.1093/nar/gkz369.
42. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., et al. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15545-15550, doi: 10.1073/pnas.0506580102.
43. Tong, Z., Cui, Q., Wang, J., and Zhou, Y. (2019) TransmiR v2.0: an updated transcription factor-microRNA regulation database, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D253-D258, doi: 10.1093/nar/gky1023.
44. Chou, C. H., Shrestha, S., Yang, C. D., Chang, N. W., Lin, Y. L., et al. (2018) MiRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D296-D302, doi: 10.1093/nar/gkx1067.
45. Chen, Y., and Wang, X. (2020) MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets, *Nucleic Acids Res.*, **48**, D127-D131, doi: 10.1093/nar/gkz757.
46. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., and Bartel, D. P. (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs, *eLife*, **4**, e05005, doi: 10.7554/eLife.05005.
47. Renton, J. P., Xu, N., Clark, J. J., and Hansen, M. R. (2010) Interaction of neurotrophin signaling with Bcl-2 localized to the mitochondria and endoplasmic reticulum on spiral ganglion neuron survival and neurite growth, *J. Neurosci. Res.*, **88**, 2239-2251, doi: 10.1002/jnr.22381.
48. Wu, C. H., Hung, T. H., Chen, C. C., Ke, C. H., Lee, C. Y., et al. (2014) Post-injury treatment with 7,8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, protects against experimental traumatic brain injury via PI3K/Akt signaling, *PLoS One*, **9**, 113397, doi: 10.1371/journal.pone.0113397.
49. Almeida, R. D., Manadas, B. J., Melo, C. V., Gomes, J. R., Mendes, C. S., et al. (2005) Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways, *Cell Death Differ.*, **12**, 1329-1343, doi: 10.1038/sj.cdd.4401662.
50. Casaccia-Bonnett, P., Kong, H., and Chao, M. V. (1998) Neurotrophins: the biological paradox of survival factors

- eliciting apoptosis, *Cell Death Differ.*, **5**, 357-364, doi: 10.1038/sj.cdd.4400377.
51. Vekrellis, K., McCarthy, M. J., Watson, A., Whitfield, J., Rubin, L. L., and Ham, J. (1997) Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system, *Development*, **124**, 1239-1249.
 52. Wu, C. H., Chen, C. C., Hung, T. H., Chuang, Y. C., Chao, M., et al. (2019) Activation of TrkB/Akt signaling by a TrkB receptor agonist improves long-term histological and functional outcomes in experimental intracerebral hemorrhage, *J. Biomed. Sci.*, **26**, doi: 10.1186/s12929-019-0543-8.
 53. Semina, E. V., Rysenkova, K. D., Troyanovskiy, K. E., Shmakova, A. A., and Rubina, K. A. (2021) MicroRNAs in cancer: from gene expression regulation to the metastatic niche reprogramming, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 785-799, doi: 10.1134/S0006297921070014.
 54. Shi, J. (2014) Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers, *Acta Pharmacol. Sinica*, **36**, 149-157, doi: 10.1038/aps.2014.135.
 55. Ma, S., Smith, C. M., Blasiak, A., and Gundlach, A. L. (2017) Distribution, physiology and pharmacology of relaxin-3/RXFP3 systems in brain, *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 1034-1048, doi: 10.1111/bph.13659.
 56. Ebert, M. S., and Sharp, P. A. (2012) Roles for MicroRNAs in conferring robustness to biological processes, *Cell*, **149**, 515-524, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.005.
 57. Sommerlandt, F. M. J., Brockmann, A., Rössler, W., and Spaethe, J. (2019) Immediate early genes in social insects: a tool to identify brain regions involved in complex behaviors and molecular processes underlying neuroplasticity, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 637-651, doi: 10.1007/s00018-018-2948-z.
 58. McNamara, J. O., Huang, Y. Z., and Leonard, A. S. (2006) Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis, *Sci. STKE*, **356**, re12, doi: 10.1126/stke.3562006re12.
 59. Holm, M. M., Nieto-Gonzalez, J. L., Vardya, I., Vaegter, C. B., Nykjaer, A., and Jensen, K. (2009) Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus, *J. Neurosci.*, **29**, 12412-12418, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2978-09.2009.
 60. Hilborn, M. D., Vaillancourt, R. R., and Rane, S. G. (1998) Growth factor receptor tyrosine kinases acutely regulate neuronal sodium channels through the src signaling pathway, *J. Neurosci.*, **18**, 590-600, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-02-00590.1998.
 61. Oh, J. D., Chartisathian, K., Chase, T. N., and Butcher, L. L. (2000) Overexpression of neurotrophin receptor p75 contributes to the excitotoxin-induced cholinergic neuronal death in rat basal forebrain, *Brain Res.*, **853**, 174-185, doi: 10.1016/S0006-8993(99)02054-5.
 62. Porcher, C., Medina, I., and Gaiarsa, J.-L. (2018) Mechanism of BDNF modulation in GABAergic synaptic transmission in healthy and disease brains, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 273, doi: 10.3389/fncel.2018.00273.
 63. Becker, A. J. (2018) Review: animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **44**, 112-129, doi: 10.1111/nan.12451.
 64. Bengzon, J., Mohapel, P., Ekdahl, C. T., and Lindvall, O. (2002) Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures, *Progr. Brain Res.*, **135**, 111-119, doi: 10.1016/S0079-6123(02)35011-8.
 65. Haramati, S., Chapnik, E., Sztainberg, Y., Eilam, R., Zwang, R., et al. (2010) miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 13111-13116, doi: 10.1073/pnas.1006151107.
 66. Cogswell, J. P., Ward, J., Taylor, I. A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., et al. (2008) Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways, *J. Alzheimer's Disease*, **14**, 27-41, doi: 10.3233/JAD-2008-14103.
 67. Buckley, N. J., Johnson, R., Zuccato, C., Bithell, A., and Cattaneo, E. (2010) The role of REST in transcriptional and epigenetic dysregulation in Huntington's disease, *Neurobiol. Disease*, **39**, 28-39, doi: 10.1016/j.nbd.2010.02.003.
 68. Rajgor, D. (2018) Macro roles for microRNAs in neurodegenerative diseases, *Noncoding RNA Res.*, **3**, 154-159, doi: 10.1016/j.ncrna.2018.07.001.
 69. Müller, M., Jäkel, L., Bruinsma, I. B., Claassen, J. A., Kuiperij, H. B., and Verbeek, M. M. (2016) MicroRNA-29a is a candidate biomarker for Alzheimer's disease in cell-free cerebrospinal fluid, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 2894-2899, doi: 10.1007/s12035-015-9156-8.
 70. Nissan, X., Blondel, S., Navarro, C., Maury, Y., Denis, C., et al. (2012) Unique preservation of neural cells in hutchinson-gilford progeria syndrome is due to the expression of the neural-specific miR-9 microRNA, *Cell Rep.*, **2**, 1-9, doi: 10.1016/j.celrep.2012.05.015.
 71. Jung, H. J., Coffinier, C., Choe, Y., Beigneux, A. P., Davies, B. S. J., et al. (2012) Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E423-E431, doi: 10.1073/pnas.1111780109.
 72. Roshan, R., Shridhar, S., Sarangdhar, M. A., Banik, A., Chawla, M., et al. (2014) Brain-specific knockdown of miR-29 results in neuronal cell death and ataxia in mice, *RNA*, **20**, 1287-1297, doi: 10.1261/rna.044008.113.
 73. Ouyang, Y. B., and Giffard, R. G. (2014) MicroRNAs affect BCL-2 family proteins in the setting of cerebral ischemia, *Neurochem. Int.*, **77**, 2-8, doi: 10.1016/j.neuint.2013.12.006.
 74. Xiao, P., Zhang, X., Li, Y., Ma, Z., Si, S., and Gao, X. (2019) miR-9 inhibition of neuronal apoptosis and expression levels of apoptosis genes Bcl-2 and Bax in depression model rats through Notch pathway, *Exp. Ther. Med.*, **19**, 551, doi: 10.3892/etm.2019.8228.
 75. Liu, X., Wu, Y., Huang, Q., Zou, D., Qin, W., and Chen, Z. (2015) Grouping pentylentetrazol-induced epileptic rats according to memory impairment and MicroRNA expression profiles in the hippocampus, *PLoS One*, **10**, e0126123, doi: 10.1371/journal.pone.0126123.
 76. Kretschmann, A., Danis, B., Andonovic, L., Abnaof, K., van Rikxoort, M., et al. (2015) Different microRNA profiles in chronic epilepsy versus acute seizure mouse models, *J. Mol. Neurosci.*, **55**, 466-479, doi: 10.1007/s12031-014-0368-6.
 77. Hu, K., Zhang, C., Long, L., Long, X., Feng, L., Li, Y., and Xiao, B. (2011) Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus, *Neurosci. Lett.*, **488**, 252-257, doi: 10.1016/j.neulet.2010.11.040.
 78. Schouten, M., Fratantoni, S. A., Hubens, C. J., Piersma, S. R., Pham, T. V., et al. (2015) MicroRNA-124 and -137 cooperativity controls caspase-3 activity through BCL2L13 in hippocampal neural stem cells, *Sci. Rep.*, **5**, 12448, doi: 10.1038/srep12448.
 79. Okuno, H. (2011) Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers, *Neurosci. Res.*, **69**, 175-186, doi: 10.1016/j.neures.2010.12.007.
 80. Fiorenza, A., Lopez-Atalaya, J. P., Rovira, V., Scandaglia, M., Geijo-Barrientos, E., and Barco, A. (2016) Blocking miRNA biogenesis in adult forebrain neurons enhances seizure susceptibility, fear memory, and food intake by increasing neuronal responsiveness, *Cerebral Cortex*, **26**, 1619-1633, doi: 10.1093/cercor/bhu332.
 81. Iwakawa, H. O., and Tomari, Y. (2015) The functions of MicroRNAs: mRNA decay and translational repression,

- Trends Cell Biol.*, **25**, 651-665, doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.011.
82. Bahrami, S., and Drabløs, F. (2016) Gene regulation in the immediate-early response process, *Adv. Biol. Regul.*, **62**, 37-49, doi: 10.1016/j.jbior.2016.05.001.
83. Flavell, S. W., and Greenberg, M. E. (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.*, **31**, 563-590, doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631.
84. Fowler, T., Sen, R., and Roy, A. L. (2011) Regulation of primary response genes, *Mol. Cell*, **44**, 348-360, doi: 10.1016/j.molcel.2011.09.014.
85. Wang, Y., Hameed, M. Q., Rakhade, S. N., Iglesias, A. H., Muller, P. A., et al. (2014) Hippocampal immediate early gene transcription in the rat fluid percussion traumatic brain injury model, *NeuroReport*, **25**, 954-959, doi: 10.1097/WNR.0000000000000219.
86. Lauterborn, J. C., Rivera, S., Stinis, C. T., Hayes, V. Y., Isackson, P. J., and Gall, C. M. (1996) Differential effects of protein synthesis inhibition on the activity-dependent expression of BDNF transcripts: evidence for immediate-early gene responses from specific promoters, *J. Neurosci.*, **16**, 7428-7436, doi: 10.1523/jneurosci.16-23-07428.1996.

EARLY INDUCTION OF NEUROTROPHIN RECEPTOR AND miRNA GENES IN MOUSE BRAIN AFTER PENTYLENETETRAZOLE-INDUCED NERVOUS ACTIVITY

A. A. Shmakova^{1,2}, K. D. Rysenkova^{1,2}, O. I. Ivashkina^{3,4,5}, A. M. Gruzdeva³, P. S. Klimovich^{1,2}, V. S. Popov¹, K. A. Rubina¹, K. V. Anokhin^{3,4}, V. A. Tkachuk^{1,2}, and E. V. Semina^{1,2*}

¹ Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119192 Moscow, Russia; E-mail: e-semina@yandex.ru

² Institute of Experimental Cardiology, National Cardiology Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia

³ Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University, 119192 Moscow, Russian Federation; E-mail: k.anokhin@gmail.com

⁴ Anokhin Research Institute of Normal Physiology, 125315 Moscow, Russian Federation

⁵ National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia

Neurotrophin receptors regulate neuronal survival, neural network formation, and synaptic plasticity in the brain *via* interaction with their ligands. In the present study we analyzed early changes in the expression of neurotrophin receptor genes *Ntrk1* (TrkA), *Ntrk2* (TrkB), *Ntrk3* (TrkC), *Ngfr* (p75NTR) and miRNAs that target them in mouse brain after the induction of seizure neural activity by pentyletetrazole injection. The obtained results indicate that the expression of *Ntrk3* and *Ngfr* is increased in the cortex and hippocampus 1-3 hours after seizures; *Ntrk2* expression is increased in the anterior cortex after 3-6 hours, and after 1 hour and 6 hours in the hippocampus. At the same time, in the anterior and posterior cortex, but not in the hippocampus, the ratio of signaling proteins Bcl-2 / Bax increases, reflecting the activation of anti-apoptotic signaling. We also detect the increase in the expression of miRNA-9 and miRNA-29a, which are predicted to target *Ntrk3*, in the hippocampus 3 hours after pentyletetrazole injection. Thus, it can be concluded that early cellular response to seizure neural activity in the brain includes the induction of *Ntrk2*, *Ntrk3*, *Ngfr*, miRNA-9 and miRNA-29a expression, as well as the activation of signaling pathways that involve Bcl-2 and Bax proteins, which may characterize them as important mediators in the regulation of neuronal adaptation and survival upon the induction of generalized neural activity.

Keywords: neurotrophin receptors TrkA, TrkB, TrkC, p75NTR, miRNAs, miRNA-9, miRNA-29a, early response genes, neuronal activation, apoptosis