

---

ОБЩАЯ  
БИОЛОГИЯ

---

УДК 612.82...,575.15

## ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ КРЫС К АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ ПОСЛЕ СОДЕРЖАНИЯ НА МЕТИЛОБОГАЩЕННОЙ ДИЕТЕ В ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

© 2014 г. Н. М. Сурина, В. В. Ашапкин, И. Б. Мерцалов, О. В. Перепелкина,  
И. Б. Федотова, Г. В. Павлова, И. И. Полетаева

Представлено академиком Г.П. Георгиевым 31.07.2013 г.

Поступило 06.08.2013 г.

DOI: 10.7868/S0869565214050296

В настоящее время установлено существование генетической предрасположенности к формированию судорожных состояний [5]. Современные знания об эпигенетическом регулировании процессов формирования ЦНС и функционирования мозга позволяют подойти к исследованию его роли в становлении эпилептогенеза [3]. В экспериментах на животных роль метилирования ДНК в эпилептогенезе исследовали преимущественно при провокации судорог введением в гиппокамп каиновой кислоты [1]. В этой работе была показана сопряженность снижения тяжести судорог и повышения уровня метилирования ряда генов. Однако роль метилирования ДНК в модуляции судорожных припадков другого генеза не была изучена.

В настоящей работе оценили влияние модуляции уровня метилирования ДНК в пренатальном и раннем постнатальном онтогенезе на интенсивность аудиогенных судорожных припадков (АСП) у крыс двух линий, которые были селектированы на отсутствие АСП (линия “0”) и на их высокую интенсивность (линия “4”). Эти линии происходят из популяции гибридов крыс инбредной линии Крушинского–Молодкиной (КМ, с высокой предрасположенностью к АСП) и крыс Вистар, отобранных из большой группы на отсутствие АСП. Изменение метилирования ДНК производили введением диеты, содержащей обогащенные метильными группами соединения (далее МОД – метилобогатая диета), а также веще-

ства, способствующие их усвоению [4]. На 1 кг пищи крысы получали 15 г холина, 15 г бетаина, 7.5 г L-метионина, 15 мг фолиевой кислоты, 1.5 мг витамина B<sub>12</sub> и 150 мг ZnSO<sub>4</sub>. Эти добавки самкам крыс двух указанных линий начинали давать за 7 дней до спаривания и продолжали на протяжении всей беременности и в течение 7 дней после родов. Контрольные крысы получали такую же пищу, но без данных соединений. Детенышей этих самок (суммарно 67 животных), ранее (в 28-дневном возрасте) рассажённых по полу в клетки по 3–4 особи в каждой, тестировали на наличие АСП в возрасте 3 и 4.5 мес. Экспериментальная процедура соответствовала биоэтическим стандартам Евросоюза (ЕС-2010) и была одобрена Комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова.

Интенсивность АСП в ответ на действие звука (звонок, 120 дБ) оценивали в условных баллах, с градациями от “0” (отсутствие АСП) до “4” (интенсивные тонические судороги всей мускулатуры). По окончании экспериментов с АСП крыс умерщвляли эфирным наркозом, декапитировали и из ткани целого мозга выделяли ДНК фенольным методом. С помощью зависимой от метилирования ДНК ПЦР исследовали уровни метилирования группы генов, выбор которых был продиктован результатами обширного исследования, проведенного с помощью другой модели судорожного состояния [1]. В каждом гене выбирали участок длиной 200–400 нуклеотидов, содержащий от одного до пяти участков узнавания эндонуклеазами рестрикции HpaII и MspI. Праймеры для амплификации выбранных участков конструировали с помощью онлайн-сервиса Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) и синтезировали в компании “Евроген” (Москва). Количество ДНК-мишени после расщепления каждой из рестриктаз измеряли с помощью ПЦР с регистрацией в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green (набор qPCR-HS

---

Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

Научно-исследовательский институт  
физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Московского государственного университета  
им. М.В. Ломоносова

Институт биологии гена  
Российской Академии наук, Москва

**Таблица 1.** Влияние МОД на параметры АСП у крыс, контрастных по индукции аудиогенной эпилепсии линий

| Линия | Группа, число животных | Интенсивность судорог (условные баллы) в 3 мес | Интенсивность судорог (условные баллы) в 4.5 мес | ЛП припадка в 3 мес | ЛП припадка в 4.5 мес |
|-------|------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| “0”   | МОД, 18                | 1.76 ± 0.41                                    | 2.03 ± 0.32*                                     | 49.83 ± 12.21       | 44.66 ± 9.34          |
|       | Контр, 11              | 2.59 ± 0.51                                    | 3.09 ± 0.41                                      | 28.09 ± 15.62       | 17.18 ± 11.95         |
| “4”   | МОД, 11                | 3.09 ± 0.51                                    | 3.23 ± 0.26                                      | 24.45 ± 15.62       | 24.36 ± 11.95         |
|       | Контр, 27              | 2.76 ± 0.32                                    | 3.85 ± 0.26                                      | 35.33 ± 9.97        | 8.81 ± 7.63           |

\* Достоверно отличается от показателя контрольной группы; ЛП – латентный период.

**Таблица 2.** Уровень метилирования (%) ряда генов в ткани мозга в контроле и при МОД

| Ген            | Продукт гена                                                   | Группа животных, уровень метилирования |          |               |          |
|----------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------|---------------|----------|
|                |                                                                | “4”, контроль                          | “4”, МОД | “0”, контроль | “0”, МОД |
| <i>Cpne6</i>   | copine VI (neuro-nal) phosphatidylserine binding               | 35                                     | 50       | 30            | нм       |
| <i>Gtf2i</i>   | general transcription factor II I                              | нм                                     | 40       | 30            | 32       |
| <i>Hmga2</i>   | high mobility group AT-hook 2chromo-somal architecture protein | нм                                     | 10       | 10            | 10       |
| <i>Hspa1b</i>  | heat shock 70kD protein 1B                                     | 20                                     | 20       | 20            | 20       |
| <i>Ira4</i>    | interferon regulatory factor 4                                 | нм                                     | нм       | нм            | нм       |
| <i>Mta1</i>    | metastasis associated 1                                        | нм                                     | нм       | нм            | нм       |
| <i>Phc2</i>    | polyhomeotic homolog 2                                         | 30                                     | 20       | 10            | 10       |
| <i>Scrt1</i>   | scratch homolog 1, zinc finger protein                         | 50                                     | 30       | 30            | 35       |
| <i>Sfmbt2</i>  | Scm-like with four mbt domains                                 | 60                                     | 60       | 70            | 80       |
| <i>Tcfap2e</i> | transcription factor AP-2 epsilon                              | 40                                     | 40       | 40            | 40       |

Примечание: нм – отсутствие метилирования.

SYBR+ROX компании “Евроген”, Москва) на амплификаторе ДТ-322 (“ДНК-Технология”).

Тестирование АСП крыс. Трехфакторный ANOVA (факторы: линия, пол, воздействие) не выявил достоверного влияния фактора “пол” ( $F_{1-66} = 0.8816$ ,  $p = 0.351593$ ), и данные по самцам и самкам каждой из групп были суммированы. Двухфакторный ANOVA с последующим анализом *post hoc* (LSD по Фишеру) для среднего балла АСП в возрасте 3 мес не выявил достоверного влияния факторов “линия” и “воздействие” (возможно, в связи с малым размером выборок).

Двухфакторный ANOVA данных по АСП, полученных в возрасте 4.5 мес (табл. 1), обнаружил достоверное влияние на интенсивность припадка обоих факторов (линия –  $F = 7.5912$ ,  $p = 0.007659$  и воздействие –  $F_{1-66} = 5.6260$ ,  $p = 0.020764$ ). Критерий *post hoc* LSD (по Фишеру) показал достоверные различия только между группами МОД и контроль в линии “0”. Латентный период начала припадка был длиннее у крыс экспериментальных групп обеих линий (т.е. после МОД) по сравнению с контролем, обнаруживая по данным

двухфакторного ANOVA достоверное влияние фактора “воздействие” ( $F_{1-66} = 4.29$ ,  $p = 0.042338$ ).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об однонаправленном влиянии МОД на предрасположенность крыс обеих линий к АСП, которое выразилось в снижении интенсивности судорог и увеличении латентного периода их начала. Доля животных, у которых не было обнаружено судорожного припадка в ответ на звук, у линии “0” составила 33.3% (при 18.2% в контроле), тогда как у линии “4” она не изменилась (18.2 и 18.5% соответственно).

Изменения уровня метилирования участков ДНК. Оценка уровня метилирования в мозге крыс исследованных групп (табл. 2) была получена для группы генов, выбранных по следующему критерию. В исследовании, посвященном анализу уровня метилирования генома у мышей после эпилептического статуса [1], сравнивали изменения этого показателя в условиях, когда эпилептический статус был снижен после индукции “кондиционирующих” однократных судорог (т.е. при развитии “толерантности к эпилеп-

сии”). Оказалось, что при менее интенсивных судорогах у большой группы проанализированных генов уровень метилирования был повышен. Метилирование ряда генов этой группы оценили в настоящей работе. В числе генов, выбранных для анализа, были, в частности, *Ira4*, *Mta1*, *Hspa1b* и *Tcfap2e* (табл. 2), уровень метилирования которых в настоящем эксперименте был одинаковым у крыс всех групп, и МОД не влияла на их статус. Интересно отметить, что в этой группе был и ген *Hspa1b* (его продукт — heat shock protein 90D), хотя ранее [5] было показано, что введение в мозг крысам линии КМ белка теплового шока 70 kD, ослабляет интенсивность АСП. Для ряда других генов были обнаружены и межлинейные различия, и изменение уровня метилирования при МОД (табл. 2).

Ген *Cpneb* (продукт — copine VI (neuronal) phosphatidylserine binding) — кодирует белок, обеспечивающий кальцийзависимое связывание фосфолипидов в ассоциации с мембранами. Этот ген часто бывает амплифицирован при злокачественных новообразованиях [6]. Его метилирование в группе МОД у линии “4” было выше, чем в контроле, тогда как у линии “0” в группе МОД оно было ниже, чем в контроле. Ген *Scrl1* кодирует белок с цинковыми пальцами, продукт которого (scratch homolog 1, zinc finger protein SCRATCH1) участвует в ряде процессов эмбриогенеза и его гомологи представлены практически во всех таксонах [7]. У линии “4” метилирование этого гена было снижено при МОД, тогда как у линии “0” в контроле оно было ниже, чем у “4”, но несколько повысилось при МОД.

Ген *general transcription factor II I* был по-разному метилирован у контрольных крыс линий “0” и “4”. МОД несколько усилила его метилирование у “4”, но почти не изменила у “0”. Продукт этого гена участвует в сигнальных путях, активных в раннем эмбриогенезе [8].

Как видно из табл. 2, большинство генов, уровень метилирования которых был проанализирован, не обнаруживают такой картины изменений, которая совпадала бы с “паттерном” сдвигов в предрасположенности к АЭС. Ген *Sfmbt2* (продукт *Scm-like with four mbt domains*) [9] не составляет, в целом, исключения. По нашим данным он был сильно метилирован в контроле (60 и 70% соответственно, табл. 2), его метилирование не изменилось при МОД у линии “4”, но несколько снизилось в линии “0”. Его влияния непосредственно на функцию ЦНС не описано, однако в продукте этого гена имеются участки с повторами, связанными со злокачественными опухолями мозга. Полагают, что его функция в норме, по всей видимости, связана с узнаванием антигенов.

Таким образом, в настоящей работе продемонстрированы изменения в предрасположенности к аудиогенной эпилепсии у крыс как следствие поступления в развивающийся организм животного

богатых метильными группами соединений, усиливающих метилирование ДНК. У крыс обеих генетических групп (линии “4” и “0”) произошло снижение интенсивности судорожных припадков, несмотря на то, что данные линии селекционируются как на высокие значения этого признака (линия “4”), так и на его отсутствие (линия “0”).

Изменение интенсивности данного генетически детерминированного признака (судорожные припадки в ответ на звук) как результат изменения метилирования ДНК в период пренатального и раннего постнатального развития продемонстрировано впервые. Следует также отметить, что обнаруженное изменение уровня метилирования выбранных для анализа некоторых генов подтверждает эффективность МОД как метода усиления метилирования ДНК.

Полученные данные показывают также высокую сложность фенотипического проявления повышенной судорожной готовности. Те гены, метилирование которых было усилено при ослаблении судорог в модели с судорогами, индуцированными введением каиновой кислоты в гиппокамп [1], не обнаружили содружественных изменений в уровне метилирования при МОД в случае аудиогенных судорожных припадков. В то же время полученные результаты представляются важными, поскольку впервые указывают на возможность модуляции интенсивности судорожных состояний у крыс при содержании на обогащенной метильными группами диете (МОД) в период пренатального развития и раннего постнатального онтогенеза.

Работа частично поддержана РФФИ, проекты 09–04–00481 и 12–04–00360.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller-Delaney S.F.C., Das S., Sano T., Jimenez-Mateos E.M., Bryan K., Buckley P.G., Stallings R.L., Henshall D.C. // J. Neurosci. 2012. V. 32. № 5. P. 1577–1588.
2. EPICURE Consortium; EMIN et Consortium // Hum. Mol. Genet. 2012. V. 21. № 24. P. 5359–5372.
3. Kobow K., Blümcke I. // Epilepsia. 2011. V. 52. Suppl. 4. P. 15–19.
4. Прасолова Л.А., Трут Л.Н., Оськина И.Н., Гулевич Р.Г., Плюснина И.З., Всеволодов Е.Б., Латыпов И.Ф. // Генетика. 2006. Т. 42. № 1. С. 78–83.
5. Худик К.А., Пастухов Ю.Ф., Гужова И.В. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2011. Т. 97. № 11. С. 1237–1246.
6. Nakayama T., Yaoi T., Kuwajima G., Yoshie O., Sakata T. // FEBS Lett. 1999. V. 453. № 1/2. P. 77–80.
7. Bastid J., Bouchet B.P., Ciancia C., Pourchet J., Audouyoud C., Grelier G., Puisieux A., Ansieau S. // Oncol. Rept. 2010. V. 23. № 2. P. 523–529.
8. Bayarsaihan D., Makeyev A.V., Enkhmandakh B.J. // Cell. Biochem. 2012. V. 113. № 10. P. 3056–3060.
9. Lee K., Na W., Maeng J.H., Wu H., Ju B.G. // J. Biosci. 2013. V. 38. № 1. P. 105–112.