

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТочНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

**АНАЛИЗ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫС
ЛИНИИ КРУШИНСКОГО—МОЛОДКИНОЙ, ГЕНЕТИЧЕСКИ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К АУДИОГЕННЫМ СУДОРОГАМ**

© В. Б. Сапарова,^{1,2} Д. В. Зосен,^{1,3} Е. В. Наслузова,^{1,4}
А. С. Березовская,^{1,4} В. Т. Бахтеева,¹ Е. Л. Горбачева,¹
Е. В. Черниговская,¹ М. В. Глазова¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: mglazova@iephb.ru

² Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики,
Санкт-Петербург, Россия

³ Biocenter Oulu, Lab. Developmental Biology & InfoTech,
University Oulu, Finland

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

На сегодняшний день известно, что при эпилепсии наблюдаются нарушения процессов нейрогенеза. Выявлен ряд генов, мутации в которых сопряжены с развитием наследственных форм эпилепсии, при этом некоторые из этих генов вовлечены в контроль пролиферации и дифференцировки нейрональных стволовых клеток (НСК). На основании этих данных нами была выдвинута гипотеза о том, что развитие aberrантного нейрогенеза может быть генетически детерминировано и являться причиной развития эпилепсии генетической этиологии.

Работа проводилась *in vitro* на НСК, изолированных из гиппокампа крыс линии Крушинского—Молодкиной (КМ) на 14—17-й день постнатального развития. Крысы инбредной линии КМ, селектированные на основе линии Вистар, генетически предрасположены к аудиогенным судорогам и являются моделью аудиогенной эпилепсии. В качестве контроля использовали НСК гиппокампа крыс линии Вистар. Культуры клеток инкубировали в течение 10 дней в среде с добавлением ретиноидной кислоты для стимуляции дифференцировки. Для оценки уровня пролиферации НСК в среду добавлялся бромдезоксисуридин (BrdU).

Полученные результаты показали, что уровень пролиферации НСК крыс линии КМ значительно снижен по сравнению с НСК крыс Вистар и соответственно НСК КМ дифференцировались быстрее. Анализ направленности дифференцировки показал, что НСК крыс КМ преимущественно дифференцируются в глутаматергические и катехоламинергические нейроны.

Полученные данные свидетельствуют о том, что повышенный уровень созревания глутаматергических нейронов в гиппокампе крыс линии КМ генетически детерминирован и может являться одним из основных факторов, обуславливающих развитие эпилептиформной активности у этих крыс.

Ключевые слова: эпилепсия, крысы линии Крушинского—Молодкиной, гиппокамп, нейрональные стволовые клетки, нейрональная дифференцировка.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 2. С. 226—237. 2018

V. B. Saparova,^{1,2} *D. V. Zosen*,^{1,3} *E. V. Nasluzova*,^{1,4} *A. S. Berezovskaya*,^{1,4} *V. T. Bachtseva*,¹ *E. L. Gorbacheva*,¹ *E. V. Chernigovskaya*,¹ *M. V. Glazova*.¹ ANALYSIS THE NEURAL STEM CELLS OF KRUSHINSKY—MOLODKINA RATS GENETICALLY PRONE TO AUDIOGENIC SEIZURE. ¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: mglazova@iephb.ru; ² ITMO University, St. Petersburg, Russia; ³ Biocenter Oulu, Lab. Developmental Biology & InfoTech, University Oulu, Finland; ⁴ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia.

Today it is known that epilepsy can cause the alterations in hippocampal neurogenesis. On the other hand, some genes associated with epilepsy are also involved in the regulation of the proliferation and differentiation of neuronal stem cells (NSC). These data allow us to assume that aberrant neurogenesis can be genetically determined and be one of the reason of hereditary epilepsy development.

The work was carried out in vitro on NSC isolated from the hippocampus of Krushinsky—Molodkina (KM) rats at the 14—17 days of postnatal development. Inbred KM rats selected from the Wistar line are genetically determined to audiogenic seizures and used as a model of audiogenic epilepsy. NSC isolated from the hippocampus of Wistar rats were used as a control. The cells were incubated for 10 days in a medium supplemented with retinoic acid to stimulate differentiation. Bromodeoxyuridine (BrdU) was added to evaluate the proliferation level.

The results showed that the proliferation level of NSC KM was significantly lower in comparison with the NSC of Wistar rats and accordingly NSC KM differentiate faster. The analysis of differentiation fate showed that NSCs of KM rats differentiate mainly into catecholaminergic and glutamatergic neurons.

Thus, the increased level of glutamatergic neurons maturation in the hippocampus of KM rats is genetically determined and can be one of the main factors that are responsible for the development of epileptiform activity in these rats.

Key words: epilepsy, Krushinsky—Molodkina rats, hippocampus, neural stem cells, neuronal differentiation.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 2. P. 226—237. 2018

Нейрогенез — сложный многоступенчатый процесс, включающий пролиферацию нейрональных стволовых клеток (НСК), миграцию, дифференцировку и интеграцию новообразованных клеток в функциональные сети головного мозга. На сегодняшний день известно, что нейрогенез характерен не только для эмбрионального развития, но продолжается также в особых нейрогенных зонах мозга млекопитающих в постнатальном периоде. Среди факторов, изменяющих нейрогенную активность мозга, выделяют некоторые патологические состояния, в частности эпилепсию. На различных моделях эпилепсии показано, что судорожная активность (кратковременная или при развитии эпилептического статуса) стимулирует пролиферацию клеток в гранулярном слое зубчатой извилины [15]. Часть этих клеток дифференцируются в гранулярные клетки и успешно встраиваются в гранулярный слой зубчатой извилины, восстанавливая тормозную активность и ингибируя возбуждающие сигналы [5]. Также показано, что новообразованные клетки мигрируют в зону хилуса. Эти эктопические гранулярные глутаматергические клетки хилуса характеризуются постоянно повышенной активностью и синхронизируются с пирамидными клетками СА3 области гиппокампа, что может вносить вклад в развитие спонтанной судорожной активности [14, 18]. С другой стороны, имеются данные о том, что судорожная активность приводит к массовой гибели ГАМКергических интернейронов гиппокампа и, как следствие, к снижению тормозной синаптической передачи на гранулярные клетки гиппокампа [3].

Также проводятся исследования, направленные на выявление генетических аномалий, связанных с развитием эпилепсии. На сегодняшний день выявлен ряд

генов, мутации в которых сопряжены с развитием эпилепсии [11]. Интересно, что некоторые из этих генов, кодирующие натриевые, калиевые и кальциевые каналы, *synapsin I-III*, никотиновые и ацетилхолиновые рецепторы и рецепторы ГАМК также вовлечены в контроль пролиферации и дифференцировки НСК [1, 8, 10, 13, 21]. На основании этих данных нами была выдвинута гипотеза о том, что развитие aberrантного нейрогенеза может быть генетически детерминировано и являться причиной развития эпилепсии генетической этиологии.

В данной работе была проведена оценка пролиферативной активности и направленности дифференцировки взрослых нейрональных стволовых клеток (НСК), изолированных из гиппокампа крыс линии Крушинского—Молодкиной (КМ), которые генетически предрасположены к аудиогенным судорогам.

МЕТОДИКА

Работа проводилась *in vitro* на первичной культуре клеток, выделенных из гиппокампа крыс Крушинского—Молодкиной или Вистар (контроль). Известно, что у грызунов нейрогенная зона гиппокампа — субгранулярная зона зубчатой извилины и соответственно НСК взрослых животных, полностью формируется только к 14-му дню постнатального развития [12]. На основании этих данных НСК выделяли на 14-й день постнатального развития. В эксперименте было задействовано 8 животных (по 4 для экспериментальной и контрольной групп).

Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободным доступом к еде. Все эксперименты были одобрены этической комиссией ИЭФБ РАН им. И. М. Сеченова. В работе были соблюдены международные принципы по защите лабораторных животных (Guide for the care and use of laboratory animals) Национального института здоровья США.

Культуры НСК гиппокампа. Все манипуляции проводились в стерильных условиях ламинара. Крысы декапитировались, гиппокампы крыс иссекались и помещались в охлажденную (+4 °С) среду Хэнкса (BioloT). Выделенные гиппокампы механически измельчались до однородной массы с помощью скальпеля, а затем инкубировались в растворе Трипсин/EDTA в течение 30 мин при температуре 37 °С. Клетки осаждались центрифугированием 1000 об/мин в течение 10 мин. Полученные клетки инкубировали в смеси сред DMEM и F12 в соотношении 1:1 (Gibco; Sigma) с добавлением 10 % лошадиной сыворотки (Gibco), 8 % сыворотки плодов коровы (Sigma), добавки B27 (Gibco) и пенициллин/стрептомицин. Клетки инкубировали на планшетах, покрытых коллагеном IV типа (Roche). Среда обновлялась каждые 2 дня (на 3, 5, 7 и 9-й день инкубации). Для стимуляции нейрональной дифференцировки, на 5-й и 7-й день в среду добавлялась ретиноевая кислота (Sigma). Для оценки пролиферативного потенциала, в среду добавлялся бромдезоксифуридин (BrdU) на 1—3-й день для первой и на 7—9-й день для второй экспериментальной группы.

На 10-й день инкубации клетки собирались для дальнейшего иммуноцитохимического и Вестерн-блот анализа.

Имуноцитохимический анализ НСК. После инкубации покровные стекла с НСК фиксировали 4%-ным раствором формалина. Иммуноцитохимический анализ проводился по стандартной методике; после блокирования неспецифического связывания в 5%-ном растворе нормальной сыворотки козы на PBS/0.3 % Тритона X-100 клетки инкубировали с антителами против белков: Sox2 (1:1000); Nestin (1:200); MAP-2 (1:200); GFAP (1:250) (Neural Stem Cell Characterization Kit, Millipore, # SCR019); Doublecortin (1:400; Cell signaling, #4604); VGLUT2 (1:300; Millipore, #MAB5504); тирозингидроксилаза (TH) (1:1000; Abcam, #ab6211); NeuN (1:500, Cell signaling, #12943); BrdU (Roche, #11170376001). Для выявления связывания использовали антитела к иммуноглобулину кролика Alexa Fluor 568 (1:1000; Invitrogen, #762708) или к иммуноглобулину мыши

Alexa Fluor 488 (1:1000; Invitrogen, #913909). Для окраски ядер добавлялся DAPI (1:2000; Sigma-Aldrich, #28718-90-3).

Морфофункциональный анализ. Подсчет клеток производили в программе ImageJ по микрофотографиям, полученным с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 В. Общее число клеток оценивалось по клеточным ядрам, окрашенным DAPI. Культура характеризовалась количеством клеток, включивших специфические маркеры, относительно общего числа. Также производился подсчет клеток с ядерной и цитоплазматической окраской на Sox2. Кроме того, функциональное состояние клеток оценивалось по колокализации определенных маркеров (Sox2/Nestin; MAP-2/GFAP; BrdU/GFAP; BrdU/TH; BrdU/NeuN).

Вестерн-блот анализ. Клеточные культуры лизировали добавлением горячего 3х SDS буфера (на 100 мл: Tris-HCl — 2.42 г, pH 6.7; SDS 6 % — 6 г; Glycerin 15 % — 15 мл; Bromphenolblue 3 мг и 10 % B-mercaptoethanol) из расчета 100 мкл буфера на 3.5 см² (площадь одной лунки 6-и луночного планшета). Затем лизат собирали в пробирки и инкубировали в течение 10 мин при +95° и далее хранили при температуре –20 °С.

Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE). Далее белковые фракции переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Великобритания). Затем мембраны инкубировались в 3%-ном растворе обезжиренного сухого молока на TBS-T буфере (0.1M ТРИС/НСl буфер, pH 7.6), содержащий 0.15 M NaCl и 0.1 % Tween-20 и инкубировали в растворе первых антител против GAD67 (1:10 000; Millipore, MAB5406) или GAPDH (1:10 000; Abcam, ab8245) в течение ночи при 4 °С. После промывок в TBS-T мембраны помещали во вторые антитела: против иммуноглобулина кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:8000; Sigma-Aldrich) или против иммуноглобулина G мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:50 000; Sigma-Aldrich) в TBS-T. Для визуализации результатов использовали ECL plus-систему (Amersham).

Денситометрический анализ количества белка был осуществлен после сканирования пленок, полученных в результате как минимум трех разных иммуноблоттингов, с помощью программы ImageJ. Уровень серого специфических бендов был скорректирован по фоновому сигналу и нормирован по уровню актина, выявляемого для определения общего количества белка в пробах. Также в анализе учитывалась площадь специфических бендов.

Статистический анализ результатов. Полученные результаты оценивались по *t*-критерию Стьюдента с использованием коммерческой программы Microsoft Excel 2013. Также статистический анализ проводился в программе GraphPad Prism 7 с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего (SEM). Достоверными считались отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка уровня пролиферации. Уровень пролиферации оценивался по количеству клеток, включивших BrdU, добавленный в культуры на 1—3-й или 7—9-й дни инкубации (рис. 1, А). Экспериментальные группы сравнивались между собой и с соответствующими группами клеток крыс Вистар.

Количество клеток крыс линии Вистар, включивших BrdU, в группах с различными сроками введения оказался одинаковым и соответствующим уровню 35—40 %, что свидетельствует о стабильной скорости пролиферации НСК крыс линии Вистар в течение 1—10 дней в условиях *in vitro* (рис. 1, Б). Для экспериментальной группы клеток крыс линии КМ с введением BrdU на 1—3 день инкубации различий с НСК крыс Вистар обнаружено не было. Однако мы показали резкое снижение количества делящихся НСК крыс КМ с введением BrdU

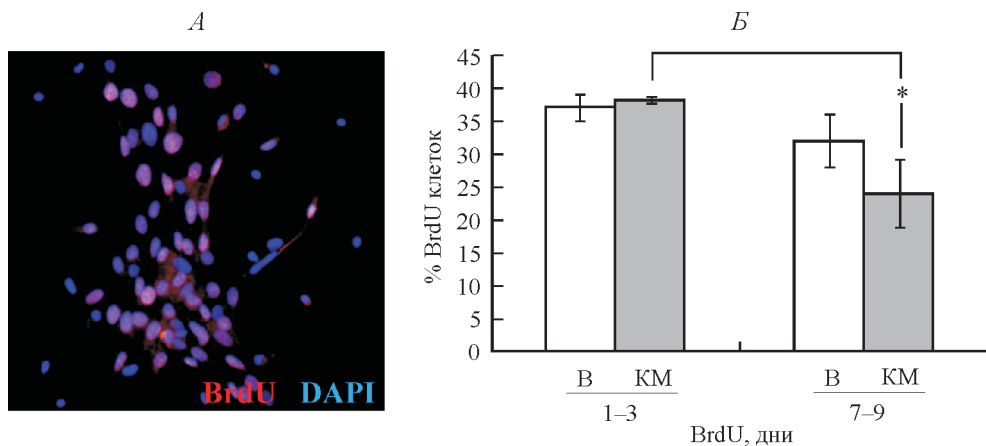


Рис. 1. Анализ уровня пролиферации.

A — иммунофлуоресцентное выявление BrdU (красное) в НСК крыс линии Вистар через 10 дней инкубации при введении BrdU с 1-го по 3-й день. Ядра клеток окрашены DAPI (синие); *Б* — процент BrdU-иммунопозитивных клеток \pm SEM. По оси абсцисс — дни введения BrdU в культуру; по оси ординат — количество иммунопозитивных клеток, %. * $p < 0.05$ относительно группы с введением на 1—3-й день. В — клетки крыс линии Вистар. КМ — клетки крыс линии КМ.

в последние дни инкубации относительно группы с введением в первые дни (рис. 1, Б).

Анализ числа НСК в культурах. Для выявления НСК в культуре было проведено иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител против транскрипционного фактора Sox2 и нейрофиламента Nestin, синтезирующихся в плюрипотентных клетках нейрональной линии (рис. 2, А, Б), а также белка doublecortin (DCX), характерного для незрелых клеток-предшественниц (рис. 2, В). Подсчет иммунопозитивных клеток показал, что в культуре НСК крыс линии КМ количество клеток с ядерной локализацией Sox2 и DCX-иммунопозитивных клеток был достоверно ниже по сравнению с культурой НСК крыс линии Вистар (рис. 2, Г).

Анализ направленности и скорости дифференцировки клеток по нейрональному или глиальному пути. Известно, что в начале процесса дифференцировки нейрональные клетки-предшественники характеризуются коэкспрессией как глиального маркера GFAP, так и нейронального MAP2 [17]. Для оценки незрелых клеток было подсчитано количество клеток, экспрессирующих оба маркера. Результаты показали, что клетки крыс линии КМ характеризуются достоверно меньшим количеством GFAP/MAP-иммунопозитивных клеток по отношению к общему числу иммунопозитивных клеток в культуре (рис. 3, А, Б). При этом относительный процент дифференцированных клеток, экспрессирующих только GFAP или только MAP2, превосходит таковой для клеток крыс Вистар в 2 раза (рис. 3, А, Б). Полученные результаты свидетельствуют о более высокой скорости дифференцировки НСК КМ по сравнению с НСК крыс Вистар.

При анализе скорости дифференцировки глиальных клеток оценивалась колокализация GFAP- и BrdU-иммунопозитивного окрашивания относительно всех BrdU-иммунопозитивных клеток (рис. 4, А, Б). В начале инкубации количество дифференцированных GFAP позитивных глиальных клеток не различалось между группами и составляло примерно 55 % от всех клеток, прошедших клеточный цикл (рис. 4, Б). При введении BrdU на 7—9-й день инкубации относительное количество GFAP-иммунопозитивных клеток крыс линии КМ значительно снижалось (рис. 4, Б). Представленные результаты говорят о дифференцировке НСК

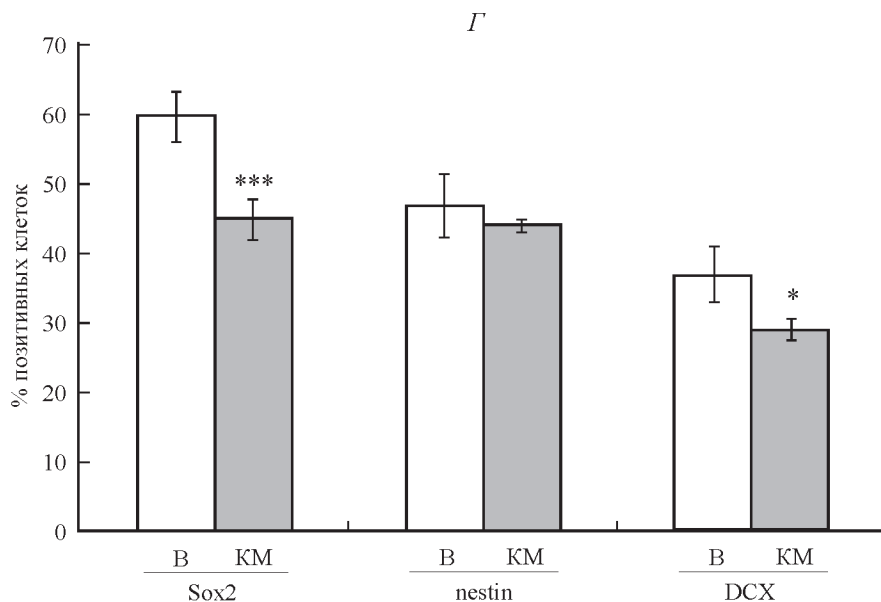
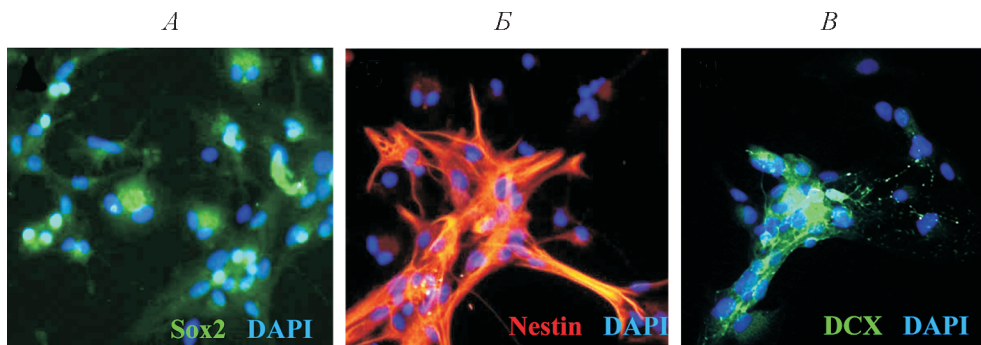


Рис. 2. Оценка уровня экспрессии маркеров стволовых клеток.

A—B — иммунофлуоресцентное выявление Sox2 (*A*), Nestin (*B*) и DCX (Doublecortin) (*B*) в НСК крыс линии Вистар через 10 дней инкубации; *Г* — процент Sox2-, Nestin- и Doublecortin-иммунопозитивных клеток ± SEM. По оси абсцисс — маркеры НСК; по оси ординат — количество иммунопозитивных клеток в процентах. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ относительно контроля.

крыс КМ по глиальному пути преимущественно до 7-го дня инкубации в условиях *in vitro*.

Анализ количества новообразованных нейронов проводился сходным образом. Оценивалась колокализация NeuN- и BrdU-иммунопозитивного окрашивания относительно всех BrdU-иммунопозитивных клеток (рис. 4, *B*).

Высокий на начальных стадиях инкубации процент NeuN-иммунопозитивных клеток снижался более чем на 30 % к ее концу (рис. 4, *Г*), достоверных различий между группами выявлено не было. Полученные данные свидетельствуют об относительно более ранней дифференцировке НСК по нейрональному пути в условиях *in vitro*.

Анализ направленности нейрональной дифференцировки. Катехоламинергические нейроны. В качестве маркера катехоламинергических нейронов использовались антитела против тирозингидроксилазы (ТН) (рис. 5, *A*).

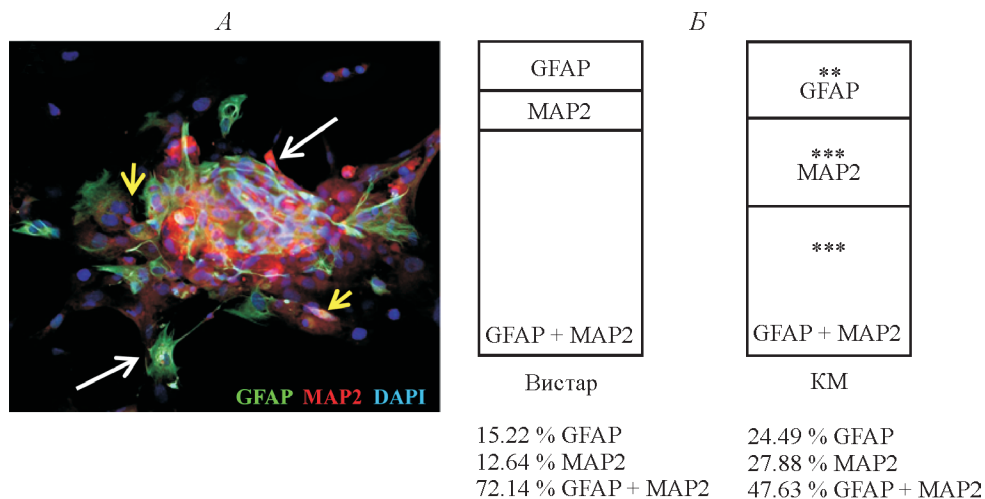


Рис. 3. Оценка нейрональной и глиальной дифференцировки.

А — иммунофлуоресцентное выявление MAP2 позитивных нейронов (красное) и/или GFAP позитивных астроцитов (зеленое) в НСК крыс линии Вистар через 10 дней инкубации. Ядра клеток окрашены DAPI (синие). Стрелками указаны клетки, позитивные только на MAP2 или только на GFAP. Наконечником стрелки указаны клетки позитивные на оба маркера; Б — процентное соотношение клеток в культурах клеток крыс линий КМ и Вистар, продуцирующих нейрональные (MAP2) и глиальные (GFAP) маркеры. На графиках представлен процент GFAP-, MAP2- и GFAP/MAP2-иммунопозитивных клеток относительно общего количества иммунопозитивных клеток в культуре. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$ относительно контроля.

Культуры клеток крыс линий КМ и Вистар были практически идентичны по относительному количеству ТН-иммунопозитивных клеток на первых днях инкубации, о чем свидетельствует одинаковое количества ТН-клеток, включивших BrdU, который добавляли в культуры с 1-го по 3-й день инкубации. Однако к 7-му дню в условиях *in vitro* наблюдаются достоверные отличия. При добавлении BrdU с 7-го по 9-й дни инкубации в культуре НСК крыс Вистар происходит значительное снижение количества ТН-позитивных клеток (рис. 5, Б). НСК КМ, напротив, показывают рост числа ТН/BrdU-иммунопозитивных клеток (рис. 5, Б). Следовательно, развитие катехоламинергических нейронов у крыс Вистар заканчивается раньше, чем у крыс КМ.

Глутаматергические нейроны. Количество глутаматергических нейронов в культуре оценивалось иммуноцитохимически по выявлению везикулярного переносчика глутамата-2 (VGLUT2) (рис. 5, В). Результаты показали, что через 10 дней инкубации количество VGLUT2-иммунопозитивных клеток в культуре НСК крыс КМ было значительно выше, чем в НСК крыс линии Вистар (рис. 5, Г).

Экспрессия ГАМК. Уровень экспрессии ГАМК определяли с помощью Вестерн-блот анализа по относительному количеству фермента глутаматдекарбоксилазы-67 (GAD67).

Полученные результаты показали, что после 10 дней инкубации *in vitro* в культурах клеток крыс линий Вистар и КМ различий в уровне экспрессии GAD67 обнаружено не было (рис. 5, Д).

Таким образом, в культуре НСК крыс КМ наблюдалась повышенная продукция глутаматергических (возбуждающих) нейронов без компенсаторного повышения активности дифференцировки ГАМКергических (тормозных) нейронов.

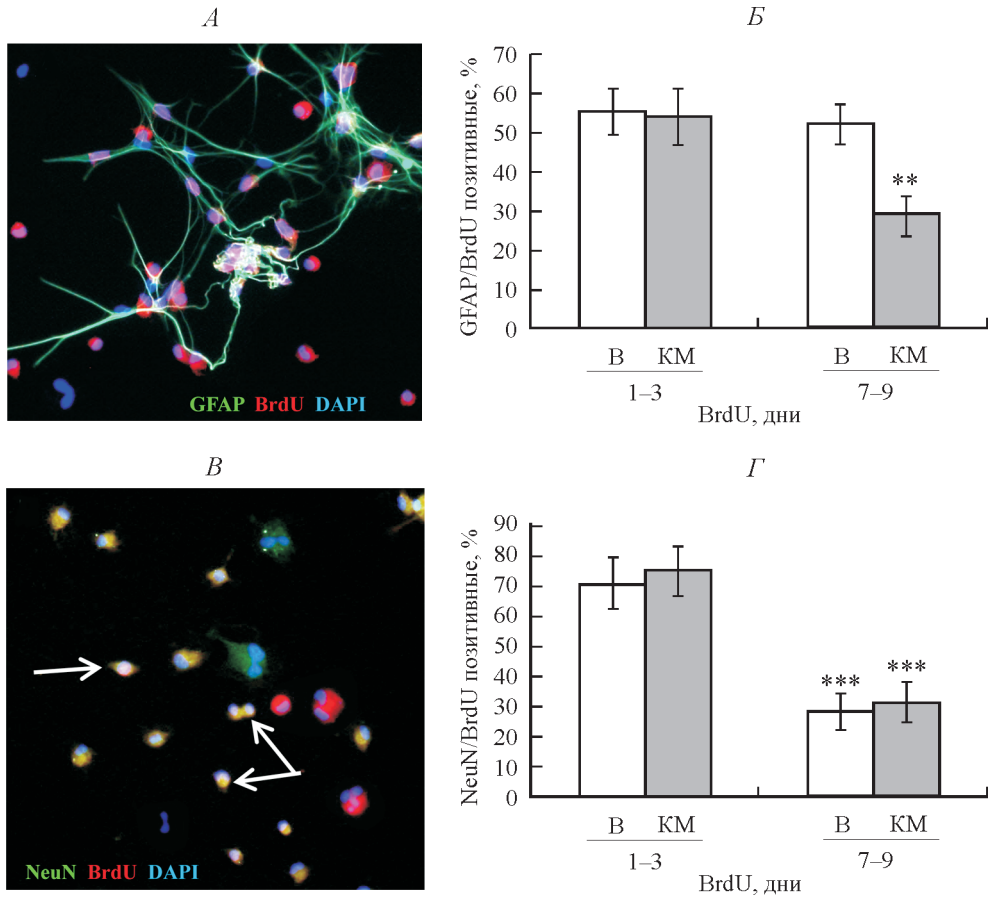


Рис. 4. Анализ уровня глиальной и нейрональной дифференцировки на разных сроках инкубации.

A — иммунофлуоресцентное выявление GFAP (зеленое) и BrdU (красное) в НСК крыс линии Вистар через 10 дней инкубации при добавлении BrdU с 1-й по 3-й день инкубации. Ядра клеток окрашены DAPI (синие); *B* — процент GFAP/BrdU-иммунопозитивных клеток \pm SEM. По оси абсцисс — дни введения BrdU в культуру; по оси ординат — количество клеток с колокализацией иммуноцитохимического окрашивания на GFAP и BrdU, %. ** С достоверностью $p < 0.005$ относительно группы с введением BrdU на 1—3-й день; *B* — иммунофлуоресцентное выявление MAP2 (зеленое) и BrdU (красное) в НСК крыс линии Вистар через 10 дней инкубации при добавлении BrdU с 1-го по 3-й день инкубации. Ядра клеток окрашены DAPI (синие). Стрелками указаны клетки, позитивные на MAP2 и BrdU; *Г* — процент NeuN/BrdU-иммунопозитивных клеток \pm SEM. По оси абсцисс — дни введения BrdU в культуру; по оси ординат — количество клеток с колокализацией иммуноцитохимического окрашивания на NeuN и BrdU, %. Показано отличие от соответствующих данных для групп с 1—3-м днем введения. *** $p < 0.001$.

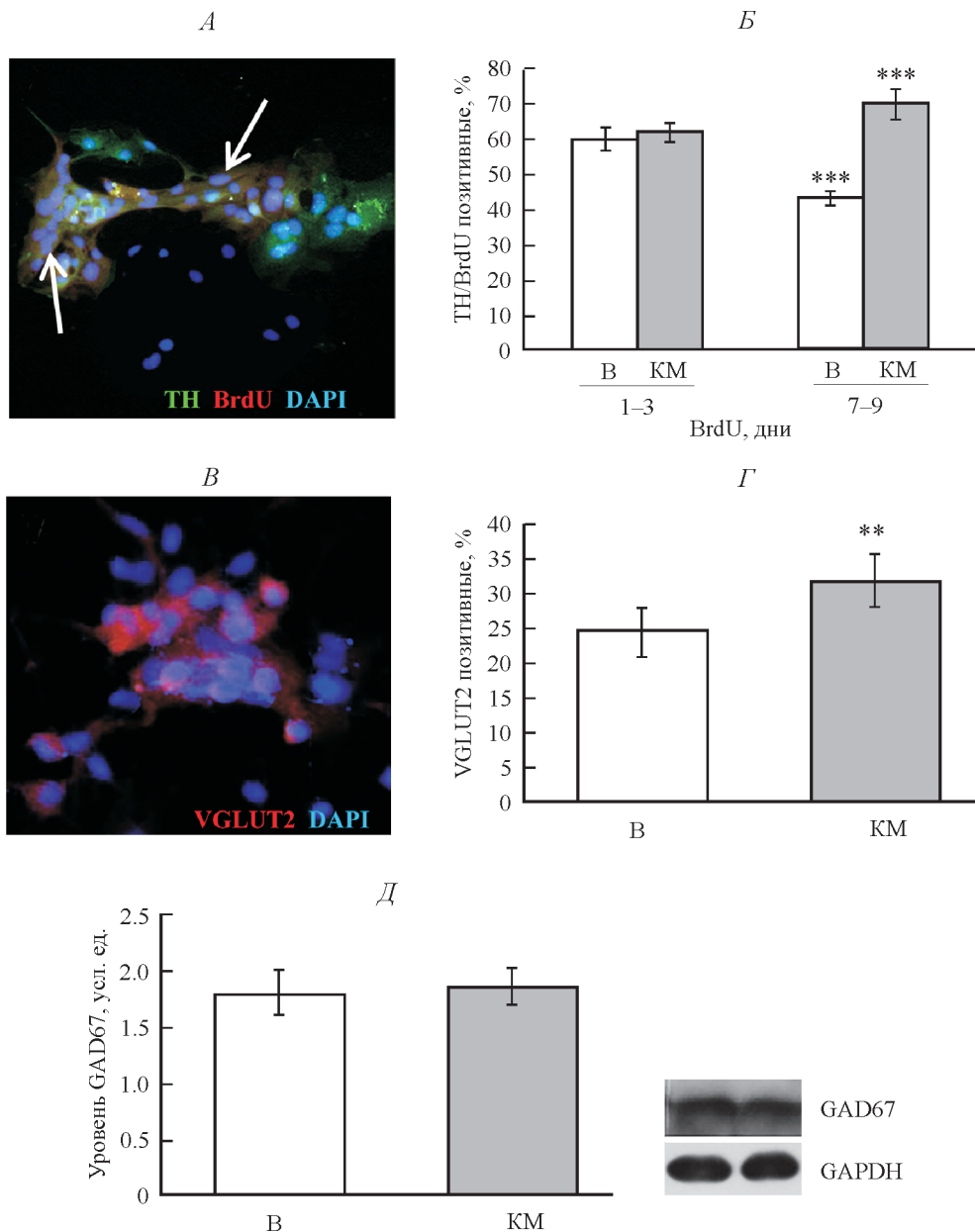


Рис. 5. Анализ типов нейронов в культурах НСК.

А — иммунофлуоресцентное выявление TH (зеленое) и BrdU (красное) в НСК крыс линии KM через 10 дней инкубации при добавлении BrdU с 7-го по 9-й день инкубации. Ядра клеток окрашены DAPI (синие). Стрелками указаны клетки, позитивные на TH и BrdU; *Б* — процент TH/BrdU-иммунопозитивных клеток \pm SEM. По оси абсцисс — дни введения BrdU в культуру; по оси ординат — количество клеток с колокализацией иммуноцитохимического окрашивания на TH и BrdU, %. Показано отличие от соответствующих данных для групп с 1—3-м днем введения. *** $p < 0.001$; *В* — иммунофлуоресцентное выявление VGLUT2 (красное) в НСК Вистар через 10 дней инкубации. Ядра клеток окрашены DAPI (синие); *Г* — процентное соотношение клеток в культурах клеток крыс линий KM и Вистар, синтезирующих VGLUT2. На графиках представлен процент VGLUT2-иммунопозитивных клеток \pm SEM. ** $p < 0.005$; *Д* — содержание GAD67 в НСК крыс линии Вистар и KM. Относительное количество белка GAD67 оценивалось методом Вестерн-блоттинга, нормировка количества белка в пробе производилась по GAPDH. Средняя оптическая плотность выражена в условных единицах \pm SEM.

Sox2, известный в качестве маркера плюрипотентных стволовых клеток организма, является ключевым транскрипционным фактором, поддерживающим самообновление НСК [16]. Ингибирование Sox2 останавливает клеточный цикл и запускает нейрональную дифференцировку. Функционально активный Sox2 локализуется в ядре клеток, транслокацию белка в цитоплазму связывают с потерей функциональности Sox2 и его последующей деградацией [2]. В ходе обработки полученных данных было подсчитано число Sox2-иммунопозитивных клеток с локализацией фактора в ядре, цитоплазме и одновременно в ядре и цитоплазме клетки. Показанное нами сниженное процентное содержание Sox2-позитивных клеток в НСК крыс линии КМ относительно НСК крыс Вистар свидетельствует об изначально меньшем количестве плюрипотентных клеток в первичной культуре, выделенной из гиппокампа крыс КМ.

Известно, что Sox2 регулирует продукцию нейронального промежуточного филламента Nestin, который в свою очередь является маркером стволовых клеток нейрональной линии [7, 19]. Однако в нашей работе достоверной разницы в количестве Nestin-иммунопозитивных клеток в культуре НСК крыс КМ и Вистар выявлено не было.

Третьим важным маркером незрелых клеток-предшественниц является ассоциированный с микротрубочками белок Doublecortin (DCX). Кроме того, DCX напрямую связан с миграцией клеток, а также с ростом и ветвлением нейритов [6]. Показанное нами достоверное снижение числа DCX-позитивных клеток в культуре НСК крыс КМ говорит о сниженном количестве способных к миграции клеток-предшественниц в культуре. Таким образом, можно заключить, что первичная культура, выделенная из гиппокампа крыс линии КМ, характеризуется меньшим количеством стволовых клеток первых трех стадий развития НСК.

Важной характеристикой нейрогенеза взрослого мозга является тип конечно дифференцированных новообразованных клеток, в связи с этим нами было проанализировано процентное соотношение глио- и нейрогенеза в культурах клеток крыс линии КМ и Вистар. Белки MAP2 и GFAP являются общепризнанными маркерами взрослых нейронов и глиальных клеток соответственно, колокализация обоих маркеров характерна для клеток, еще не вступивших в стадию терминальной дифференцировки [17]. Мы показали двукратное увеличение относительного процента терминально дифференцированных нейронов и глиальных клеток в культуре НСК крыс линии КМ, при этом процент клеток с колокализацией маркеров достоверно снизился относительно культуры НСК крыс Вистар. Полученные данные говорят о более быстрой дифференцировке НСК крыс КМ, что подтверждается также общим снижением продукции клетками Sox2.

BrdU встраивается в ДНК клетки в S-фазу клеточного цикла и служит широко распространенным маркером митотически активных клеток. Показанное нами значительное снижение количества BrdU-иммунопозитивных клеток в культуре клеток крыс КМ на 7—9-й дни инкубации свидетельствует о прекращении деления НСК крыс КМ в указанные сроки и переходе к стадии дифференцировки. При введении BrdU с 1-го по 3-й день инкубации различий с культурой клеток крыс Вистар выявлено не было.

Двойное иммуноцитохимическое мечение BrdU/NeuN показало снижение продукции нейронов в последние дни инкубации в обеих (крыс линии КМ и Вистар) культурах клеток. Анализ колокализации BrdU/GFAP в культуре НСК крыс КМ показал идентичные результаты: образование клеток нейроглии снижается к 7—9-му дню инкубации по сравнению с 1—3-м днем. Суммируя полученные данные, можно заключить, что в условиях *in vitro* дифференцировка НСК крыс линии КМ начинается раньше и происходит в более сжатые сроки, чем дифференцировка НСК крыс Вистар.

Для интеграции новообразованных нейронов в существующие функциональные сети мозга ключевыми являются синтезируемые клеткой нейромедиаторы, такие как глутамат и ГАМК. Следует отметить, что развитие судорожных состояний у животных вообще и у крыс линии КМ в частности связывают как раз с рассогласованием процессов возбуждения и торможения головного мозга [20]. При этом также следует отметить, что синтез катехоламинов, в норме характерный лишь для малого количества клеток гиппокампа, может возрастать при различных стрессорных воздействиях и при патологиях [4, 9].

Наши данные показали увеличение количества новообразованных VGLUT2-иммунопозитивных нейронов в культуре клеток крыс линии Вистар, однако разницы в относительном уровне GAD67 между культурами выявлено не было, что говорит об увеличенной продукции возбуждающих глутаматергических нейронов в НСК крыс КМ без компенсаторного увеличения продукция тормозных ГАМКергических нейронов. Анализ дифференцировки катехоламинергических нейронов показал интересные различия: в норме снижающееся к концу инкубации число новообразованных катехоламинергических клеток значительно повышается в культуре НСК крыс КМ, что подтверждает данные об активации синтеза катехоламинов клетками при патологиях.

Таким образом, мы показали, что НСК крыс КМ характеризуются меньшей пролиферативной активностью и быстрее дифференцируются преимущественно в глутаматергические и катехоламинергические нейроны. Таким образом, наши данные, полученные в экспериментах *in vitro*, свидетельствуют, что повышенный уровень созревания глутаматергических нейронов в гиппокампе крыс линии КМ генетически детерминирован и может являться одним из основных факторов, обуславливающих развитие эпилептиформной активности у этих крыс.

Данная работа поддержана фондом РФФИ (грант № 16-04-00777), гос. заданием по теме «Физиологические и биохимические механизмы гомеостаза и их эволюция» и частично выполнена в ЦКП № 441590.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Bai R., Gao G., Xing Y., Xue H. Two outward potassium current types are expressed during the neural differentiation of neural stem cells. *Neural. Regen. Res.* 8 (28): 2656—2665. 2013.
- [2] Baltus G. A., Kowalski M. P., Zhai H., Tutter A. V., Quinn D., Wall D., Kadam S. Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells.* 27 (9): 2175—2184. 2009.
- [3] Bonislawski D. P., Schwarzbach E. P., Cohen A. S. Brain injury impairs dentate gyrus inhibitory efficacy. *Neurobiol. Dis.* 25 (1): 163—169. 2007.
- [4] Borgkvist A., Malmlof T., Feltmann K., Lindskog M., Schilstrom B. Dopamine in the hippocampus is cleared by the norepinephrine transporter. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15 (4): 531—540. 2012.
- [5] Jakubs K., Nanobashvili A., Bonde S., Ekdahl C. T., Kokaia Z., Kokai M., Lindvall O. Environment matters: synaptic properties of neurons born in the epileptic adult brain develop to reduce excitability. *Neuron.* 52 (6): 1047—1059. 2006.
- [6] Jin J., Suzuki H., Hirai S., Mikoshiba M., Ohshima T. JNK phosphorylates Ser332 of and regulates its function in neurite extension and neuronal migration. *Dev. Neurobiol.* 70 (14): 929—942. 2010.
- [7] Jin Z., Liu L., Bian W., Chen Y., Xu G., Cheng L., Jing N. Different transcription factors regulate nestin gene expression during P19 cell neural differentiation and central nervous system development. *J. Biol. Chem.* 284 (12): 8160—8173. 2009.
- [8] Kao H. T., Li P., Chao H. M., Janoschka S., Pham K., Feng J., McEwen B. S., Greenberg P., Pieribone V. A., Porton B. Early involvement of synapsin III in neural progenitor cell development in the adult hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 507 (6): 1860—1870. 2008.
- [9] McNamara C. G., Dupret D. Two sources of dopamine for the hippocampus. *Trends Neurosci.* 40 (7): 383—384. 2017.

- [10] *Morgan P. J., Hubner R., Rolfs A., Frech M. F.* Spontaneous calcium transients in human neural progenitor cells mediated by transient receptor potential channels. *Stem Cells Dev.* 22 (18): 2477—2486. 2013.
- [11] *Myers C. T., Mefford H. C.* Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Med.* 7: 91. 2015.
- [12] *Nicola Z., Fabel K., Kempermann G.* Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front Neuroanat.* 9: 53. 2015.
- [13] *Pallotto M., Deprez F.* Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABAA-receptors. *Front Cell. Neurosci.* 8: 166. 2014.
- [14] *Parent J. M., Elliott R. C., Pleasure S. J., Barbaro N. M., Lowenstein D. H.* Aberrant seizure-neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 59 (1): 81—91. 2006.
- [15] *Parent J. M., Kron M. M.* Neurogenesis and epilepsy. In: Jasper's basic mechanisms of the epilepsies. J. L. Noebels (eds). Bethesda (MD). 2012.
- [16] *Pevny L. H., Nicolis S. K.* Sox2 roles in neural stem cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42 (3): 421—424. 2010.
- [17] *Rosser A. E., P. Tyers P., ter Borg M., Dunnett S. B., Svendsen C. N.* Co-expression of MAP-2 and GFAP in cells developing from rat EGF responsive precursor cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 98 (2): 291—295. 1997.
- [18] *Scharfman H. E., Goodman J. H., Sollas A. L.* Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J. Neurosci.* 20 (16): 6144—6158. 2000.
- [19] *Tanaka S., Kamachi Y., Tanouch A., Hamada H., Jing N., Kondoh H.* Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Mol. Cell. Biol.* 24 (20): 8834—8846. 2004.
- [20] *Werner F. M., Covenas R.* Review: Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy in a multi-neurotransmitter system: How to improve the antiepileptic effect? *Epilepsy Behav.* 71 (Pt. B): 124—129. 2017.
- [21] *Yasuda T., Adams D. J.* Physiological roles of ion channels in adult neural stem cells and their progeny. *J. Neurochem.* 114 (4): 946—959. 2010.

Поступила 30 XI 2017