

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА АСТРОГЛИИ ГИППОКАМПА У КРЫС С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К АУДИОГЕННЫМ СУДОРОГАМ

© 2023 г. Ю. С. Григорьева¹, А. А. Наумова¹, С. Д. Николаева¹, М. В. Глазова^{1,*}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: mglazova@iephb.ru

Поступила в редакцию 21.07.2023 г.

После доработки 19.09.2023 г.

Принята к публикации 02.10.2023 г.

Известно, что нарушения функций астроцитов могут приводить к изменению возбудимости нейронов и, как следствие, к развитию эпилепсии, однако данный вопрос требует дальнейшего изучения. Целью настоящей работы являлась оценка функционального состояния астроцитов гиппокампа у крыс линии Крушинского—Молодкиной (КМ) с наследственной предрасположенностью к рефлексорным аудиогенным судорогам. В экспериментах были использованы “наивные” взрослые животные с полностью сформированной судорожной готовностью. В качестве контроля использовали крыс материнской популяции Вистар. Полученные результаты не выявили различий в экспрессии астроцитарных белков GFAP, ALDH1L1 и NFIA, что свидетельствует об отсутствии в гиппокампе крыс КМ реактивного астроглиоза. Экспрессия SPARC и аквапорина 4 также не отличалась от контрольного уровня, указывая на отсутствие нарушений в астроцитарной регуляции синаптогенеза и водного транспорта. Анализ глиальных белков, отвечающих за обратный захват и метаболизм нейромедиаторов, выявил нормальный уровень экспрессии транспортера ГАМК GAT-3 и глутаминсинтетазы, однако содержание транспортеров глутамата EAAT1 и 2 было достоверно повышено, что свидетельствует о более активной утилизации синаптического глутамата. Кроме того, сниженная экспрессия гликолитического фермента альдолазы С в гиппокампе крыс КМ, вероятно, указывает на недостаточную активность метаболизма глюкозы. Таким образом, полученные данные выявили генетически детерминированные изменения функционального статуса астроцитов в гиппокампе крыс с наследственной рефлексорной эпилепсией.

Ключевые слова: астроциты, аудиогенные судороги, гиппокамп, крысы Крушинского—Молодкиной, эпилепсия

DOI: 10.31857/S0044452923060049, **EDN:** HUVEVO

ВВЕДЕНИЕ

Астроциты — это наиболее многочисленные глиальные клетки, которые представлены повсеместно в головном мозге и играют огромную роль в поддержании нормального функционирования нервной ткани [1]. Отростки астроцитов участвуют в образовании гематоэнцефалического барьера, контролирующего обмен веществ между кровью и нервной тканью [2, 3]. Эти клетки выполняют трофическую функцию, снабжая нейроны лактатом, метаболитом глюкозы и другими питательными веществами, а также поддерживают водно-солевой баланс внеклеточной жидкости [2, 4]. Более того, в настоящее время активно развивается концепция трипартитного синапса, который включает в себя не только пресинаптические и постсинаптические окончания нейронов, но и отростки астроцитов, поскольку эти глиальные клетки принимают активное участие в модуляции синаптической передачи [5]. В частности, в мембранах астроцитов экс-

прессируются транспортные системы, которые осуществляют обратный захват нейромедиаторов (глутамата, ГАМК, глицина) из синаптической щели [4, 5]. Далее молекулы медиаторов подвергаются в астроцитах метаболическим превращениям и могут служить источником для синтеза собственных сигнальных молекул (глиотрансмиттеров), в том числе АТФ, D-серина, глутамата, ГАМК [4]. В то же время нарушения астроцитарных функций могут сопровождать развитие многих заболеваний нервной системы, в том числе различных форм эпилепсии [2, 6, 7].

Одной из наиболее распространенных форм эпилептических расстройств является височная эпилепсия [8]. Установлено, что ключевой структурой, вовлеченной в генерализацию судорожной активности при височной эпилепсии, является гиппокамп [9]. У пациентов с фармакорезистентной височной эпилепсией в гиппокампе обычно наблюдается комплекс патологических измене-

ний, определяемый как склероз гиппокампа (мезиальный темпоральный склероз). В очагах склероза выявляются такие признаки, как гибель нейронов, разрастание кровеносных сосудов, реорганизация синапсов, а также реактивный астроглиоз [8, 10]. В свою очередь, для реактивных астроцитов характерны увеличение размера, усиленное ветвление отростков, повышение экспрессии глияльного фибриллярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein, GFAP) и продукции провоспалительных цитокинов, что приводит к гибели нейронов [8, 10–12]. Сходные изменения были выявлены также при моделировании височной эпилепсии у животных [7, 10].

С другой стороны, в настоящее время активно исследуются генетические аномалии, связанные с развитием эпилепсии. Интересно, что целый ряд выявленных мутаций и генетических полиморфизмов затрагивает гены, кодирующие ключевые белки астроцитов [10]. Например, показано, что мутации в гене *KCNJ10*, приводящие к снижению активности каналов Kir4.1, вызывают наследственный синдром EAST (Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness, Tubulopathy) [10]. Нуклеотидные вариации в генах *KCNJ10* и *AQP4* были выявлены у пациентов с височной эпилепсией и склерозом гиппокампа [10, 13]. У пациентов, имеющих мутации в гене, кодирующем глутаминсинтетазу, также наблюдались высокоинтенсивные судороги [14]. Хотя эти данные немногочисленны, они свидетельствуют о том, что нарушения глияльных функций могут являться не только следствием эпилептиформной активности, но и причиной эпилепсии наследственной этиологии.

Для изучения генетических нарушений, лежащих в основе развития эпилепсии, широко используются различные линии грызунов, как генетически модифицированные, так и с наследственной предрасположенностью к рефлекторным аудиогенным судорогам, в том числе крысы линии Крушинского–Молодкиной (КМ). Крысы КМ, выведенные путем селекции крыс Вистар, характеризуются стабильными клонико-тоническими припадками в ответ на звуковую стимуляцию [15]. При этом чувствительность к звуковой стимуляции у этих животных развивается в процессе постнатального онтогенеза и полностью формируется к 3-му месяцу жизни [15]. Таким образом, крысы КМ являются адекватной моделью наследственной рефлекторной эпилепсии у человека. В то же время повторные стимуляции судорог приводят к генерализации судорожной активности в мозге этих животных и к развитию у них височной эпилепсии [16, 17].

Наши предыдущие исследования выявили ряд генетически детерминированных изменений в гиппокампе крыс КМ, в том числе aberrантный нейрогенез [18] и аномалии глутаматергической трансмиссии [19], которые могут вносить вклад в

формирование гипервозбудимых нейронных сетей и развитие эпилепсии при аудиогенных стимуляциях. Целью данной работы являлся анализ наследственных нарушений функционального состояния астроглии гиппокампа взрослых крыс линии КМ по сравнению с крысами Вистар.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В экспериментах использовали взрослых (в возрасте 4–5 мес) “наивных” крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ) (Московский государственный университет, Россия), которые не подвергались стимуляциям аудиогенных судорог, но имели полностью сформированную судорожную готовность. Крысы Вистар (аутбредный сток ЭБК ИЭФБ РАН) соответствующего возраста были использованы в качестве контрольной группы. Крыс содержали по 4–5 животных в клетке в условиях 12-часового светового дня и свободного доступа к пище и воде. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с Директивой ЕС 86/609/ЕЕС по проведению экспериментов на животных и были одобрены комитетом по уходу и использованию животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (Протокол № 1-20/2023 от 26.01.2023 г. комиссии по биоэтике, утвержденной Приказом Директора ИЭФБ РАН № 8 от 24.01.2023 г.). Каждая экспериментальная группа включала 9 животных.

Крыс обеих экспериментальных групп быстро декапитировали, мозг извлекали и иссекали дорзальную часть гиппокампа. Гиппокампы пяти животных из каждой группы собирали для Вестерн-блот анализа, а гиппокампы остальных четырех — для анализа ПЦР в режиме реального времени.

Вестерн-блот анализ

Гиппокампы гомогенизировали в лизисном буфере (20 mM Tris pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА) при 4°C с добавлением ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich, #P8340) и фосфатаз (Roche, #04 906 837 001). Общее содержание белка в образцах определяли методом Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина (BSA) в качестве стандарта. Белки разделяли в 10- или 12%-ном полиакриламидном геле (10 мкг белка на каждую лунку) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, #1620112). Мембраны инкубировали в буферном растворе TBST (Tris buffer saline, 20% Tween-20), содержащем 5% обезжиренного молока, в течение 1 ч, а затем — в течение ночи при 4°C в растворе первичных антител (табл. 1). После этого мембраны инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (табл. 1), в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации специ-

Таблица 1. Антитела для Вестерн-блот анализа

Название реактива	Производитель	Артикул	Разведение
<i>Первичные антитела</i>			
Rabbit anti-GFAP concentrate	Invitrogen	180063	1:1000
Anti-Aldh1L1 Antibody, clone N103/39	Sigma-Aldrich	MABN495	1:1000
GABA T-3 Antibody (G-6)	SantaCruz Biotechnology	sc-376001	1:1000
NFIA Antibody	Novus Biologicals	NBP1-81407	1:1000
Aldolase C Antibody	Novus Biologicals	NBP1-90954	1:1000
EAAT1 (A-3) mouse monoclonal antibody	SantaCruz Biotechnology	sc-515839	1:1000
EAAT2/GLT1 rabbit polyclonal antibody	Novus Biologicals	NBP1-20136	1:1000
Glutamine Synthetase Antibody (CL3004)	Novus Biologicals	NBP2-46644	1:1000
SPARC Antibody	Novus Biologicals	NBP1-80972	1:1000
AQP4 mouse monoclonal antibody	Elabscience	E-AB-22025	1:1000
Actin mouse antibody	Abcam	ab3280	1:1000
<i>Вторичные антитела</i>			
Anti-rabbit IgG (whole molecule), peroxidase antibody produced in goat	Sigma-Aldrich	A0545	1:10000
Anti-Mouse IgG (whole molecule), peroxidase antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich	A9044	1:40000

фических белковых полос использовали хемилюминесцентную реакцию пероксидазы с субстратом SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, #34075), которую выявляли при помощи ChemiDoc MP Imaging System (#12003154, Bio-Rad). Оптическую плотность каждой белковой полосы оценивали количественно с помощью программного обеспечения ImageLab (версия 6.0; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Уровень специфического сигнала для каждого белка нормировали на сигнал актина.

Синтез кДНК и ПЦР в режиме реального времени

РНК выделяли из образцов гиппокампа с помощью реагента PureZOL™ (BioRad, #732-6890). Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра CLARIOstar Plus (BMG LABTECH) в соответствии со стандартной процедурой. Чистота образцов РНК проверялась путем подтверждения соотношения оптической плотности A260/A280 > 1.8.

Два мкг общей РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1622). Количественный анализ ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием набора реактивов 5x qPCR mix-HS SYBR (Evrogen, #PK147L) и амплификатора LightCycler 96 (Roche). Праймеры (табл. 2) были разработаны с помощью программы Primer-BLAST (NCBI, США). Параметры

ПЦР были следующими: начальная денатурация — один цикл при 95°C в течение 15 мин; 40 циклов денатурации, амплификации и количественной оценки (95°C в течение 15 с, 60°C в течение 30 с и 72°C в течение 5 с); кривая плавления — начало при 65°C и постепенное повышение до 95°C. Пороговые значения циклов были нормализованы относительно референсных генов *GAPDH* и *S18*.

Экспрессию в контрольных гиппокампах крыс Вистар оценивали как “1”. Относительную кратность экспрессии генов рассчитывали в Microsoft Excel методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результаты представлены в виде гистограмм. Каждое значение определяли на основе 3 независимых ПЦР-повторов для каждого образца кДНК.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили при помощи непараметрического U-теста Манна-Уитни с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., Сан-Диего, Калифорния). Все результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD). Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе был проведен комплексный анализ экспрессии белков, регулирующих функци-

Таблица 2. Праймеры для анализа ПЦР в режиме реального времени

Ген (Target gene)	Номер сиквенса (Accession number)	Прямой праймер (Left primer)	Обратный праймер (Right primer)
<i>Gfap</i> (GFAP)	NM_017009.2	gag-gct-aat-gac-tat-cgc-cg	cac-cgt-ctt-tac-cac-gat-gt
<i>Aldh1l1</i> (ALDH1L1)	NM_022547.2	att-tgc-tga-ctg-cga-cct-ca	cat-gat-ggg-ccc-aaa-gga-ct
<i>Nfia</i> (NFIA)	NM_012988.2	gca-gtt-atg-tat-tct-ccg-ct	gcg-gaa-tac-ctt-tga-aca-ag
<i>Aldoc</i> (AldoC)	NM_012497	atc-aac-cga-tgc-tca-ct-tcc	ctc-tgt-tca-gca-cgg-cta-tt
<i>Slc1a3</i> (GLAST/EAAT1)	NM_019225.2	acc-tgt-ttc-gga-atg-cct-tt	aga-ctg-gag-atg-atc-agg-gg
<i>Slc1a2</i> (GLT1/EAAT2)	NM_017215.3	aga-ggc-tgc-ccg-tta-aat-ac	ctc-gtc-gtt-ctt-ctt-ccc-ag
<i>Sparc</i> (SPARC)	NM_012656.2	tgg-tag-ttt-gga-ggt-agg-ca	ctg-ctg-gga-gtc-tgt-ttt-gt
<i>Aqp4</i> (AQP4)	NM_001317749.1	cca-cat-ctca-gag-aca-ctg-c	gtc-ctc-cta-gaa-gtg-ttg-cg
<i>Gapdh</i> (GAPDH)	NM_017008.4	tcc-ctc-aag-att-gtc-agc-aa	aga-tcc-aca-acg-gat-aca-tt
<i>Rps18</i> (S18)	NM_213557.1	cct-gcg-agt-act-caa-cac-ca	ctg-ctt-tcc-tca-aca-cca-ca

ональное состояние астроцитов гиппокампа. В первую очередь, мы оценили экспрессию GFAP и альдегиддегидрогеназы 1L1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member L1, ALDH1L1), которые являются ключевыми маркерами астроцитов различных популяций [20]. Полученные результаты показали повышенное содержание мРНК GFAP в гиппокампе крыс КМ (рис. 1a), однако экспрессия соответствующего белка не отличалась от контроля (рис. 2a, k). Содержание мРНК (рис. 1b) и белковая экспрессия (рис. 2b, k) ALDH1L1 в гиппокампе крыс КМ и Вистар также достоверно не различались.

Анализ экспрессии ядерного фактора I-A (nuclear factor I-A, NFIA), содержание которого повышается в реактивных астроцитах [21], также не выявил различий между крысами КМ и Вистар (рис. 1c; рис. 2c, k), что может свидетельствовать об отсутствии реактивного астроглиоза у “наивных” крыс КМ.

Далее мы проанализировали экспрессию альдолазы С, фермента аэробного гликолиза, который специфически экспрессируется в астроцитах [1]. Результаты показали, что при неизменном уровне экспрессии мРНК (рис. 1d) уровень белка в гиппокампе крыс КМ был значительно ниже, чем у крыс Вистар (рис. 2d, k), что указывает на наличие нарушений в регуляции метаболизма глюкозы.

Оценка экспрессии астроцитарных транспортеров показала, что уровень мРНК транспортеров возбуждающих аминокислот (excitatory amino acid transporters, EAAT) 1 и 2 не отличался между группами крыс (рис. 1e, f), однако содержание соответствующих белков было значительно выше в гиппокампе крыс КМ (рис. 2e, f, k). Поскольку основной молекулой, которую транспортируют EAAT, является глутамат [1], полученные данные свидетельствуют о более активном захвате глутамата астроцитами из синаптической щели. В то же время экспрессия астроцитарного транспортера ГАМК типа 3 (GABA transporter 3, GAT3) в гиппокампе крыс КМ не отличалась от контрольного уровня

(рис. 2g, k). Анализ экспрессии глутаминсинтетазы, астроцитарного фермента, превращающего глутамат в глутамин, также не выявил межлинейных различий (рис. 2h, k).

Еще одним специфическим маркером астроцитов является секреторный кислый белок, богатый цистеином (secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC), который ингибирует образование глутаматергических синапсов [22]. Наши результаты показали, что экспрессия SPARC в гиппокампе крыс КМ не отличалась от контроля (рис. 1g, рис. 2i, k), что указывает на отсутствие изменений в данной астроцитарной функции.

Ключевую роль в регуляции астроцитами водного баланса играет аквапорин 4 (aquaporin 4, AQP4), экспрессия которого значительно изменяется при развитии эпилепсии [23]. В то же время, мы не обнаружили изменений в уровне мРНК (рис. 1h) и белка (рис. 2g, k) AQP4 в гиппокампе аудиогенных крыс КМ по сравнению с контрольными крысами Вистар.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из основных маркеров функционального состояния астроцитов является GFAP, белок промежуточных филаментов, изменения экспрессии которого показаны при различных патологических состояниях ЦНС. В частности, при эпилепсии повышенное содержание GFAP характерно для реактивных астроцитов. Полученные нами данные показали, что у наивных крыс КМ по сравнению с крысами Вистар экспрессия мРНК GFAP была значительно выше, однако уровень белка не отличался. Вероятно, это противоречие может быть обусловлено нарушениями процессинга мРНК GFAP или ее деградации. Анализ другого широко используемого маркера астроцитов ALDH1L1 [24] также не выявил изменений его экспрессии у крыс КМ. Поскольку GFAP и ALDH1L1

являются маркерами различных популяций астроцитов [20], полученные данные свидетельствуют о схожести популяционного состава астроцитов в гиппокампе крыс Вистар и КМ.

Наряду с повышенным GFAP, реактивные астроциты экспрессируют также специфический фактор NFIA [21]. Наши данные не выявили различий в экспрессии NFIA в гиппокампе “наивных” крыс КМ по сравнению с крысами Вистар, что в комплексе с нормальной экспрессией GFAP говорит об отсутствии реактивного астроглиоза у крыс КМ, не подвергавшихся стимуляциям аудиогенных судорог. В то же время повышенное содержание мРНК GFAP в гиппокампе у “наивных” крыс КМ может вносить вклад в развитие реактивного астроглиоза при формировании височной эпилепсии в результате аудиогенного киндинга.

Кроме того, в гиппокампе крыс КМ мы выявили аномально низкий уровень экспрессии альдолазы С, одного из ключевых ферментов аэробного гликолиза. Известно, что основная роль в метаболизме глюкозы в нервной ткани принадлежит именно астроцитам, в то время как нейроны в качестве основного энергетического субстрата используют производимый астроцитами лактат [25]. Следовательно, недостаток альдолазы С в гиппокампе крыс КМ свидетельствует о снижении активности гликолиза в астроцитах, и, как следствие, выработки необходимого для нейронов лактата. С другой стороны, в различных патологических ситуациях активация гликолиза в нервной ткани может играть как позитивную, так и негативную роль. В частности, при эпилепсии активация гликолиза усугубляет тяжесть припадков, а ингибирование гликолиза рассматривается как один из перспективных подходов к лечению эпилептических расстройств [26, 27]. Таким образом, можно предположить, что низкий уровень гликолиза у “наивных” крыс КМ является одним из факторов, препятствующих проявлению спонтанных судорожных припадков.

Последние исследования также показали, что ферменты аэробного гликолиза могут выполнять функции транскрипционных факторов и протеинкиназ, а также регулировать стабильность мРНК [28, 29]. Более того, Staugaitis и соавт. показали, что на начальной стадии астроцитарной дифференцировки экспрессия альдолазы С начинается раньше, чем экспрессия GFAP [30]. Эти данные позволяют предположить, что снижение уровня гликолитических ферментов напрямую или косвенно влияет на процессинг или стабильность мРНК GFAP.

Астроциты играют важнейшую роль в регуляции синаптической передачи, участвуя в обратном захвате и метаболизме молекул нейротрансмиттеров. В частности, они являются главными клетками, которые осуществляют обратный захват возбуждающего медиатора глутамата из синаптической щели,

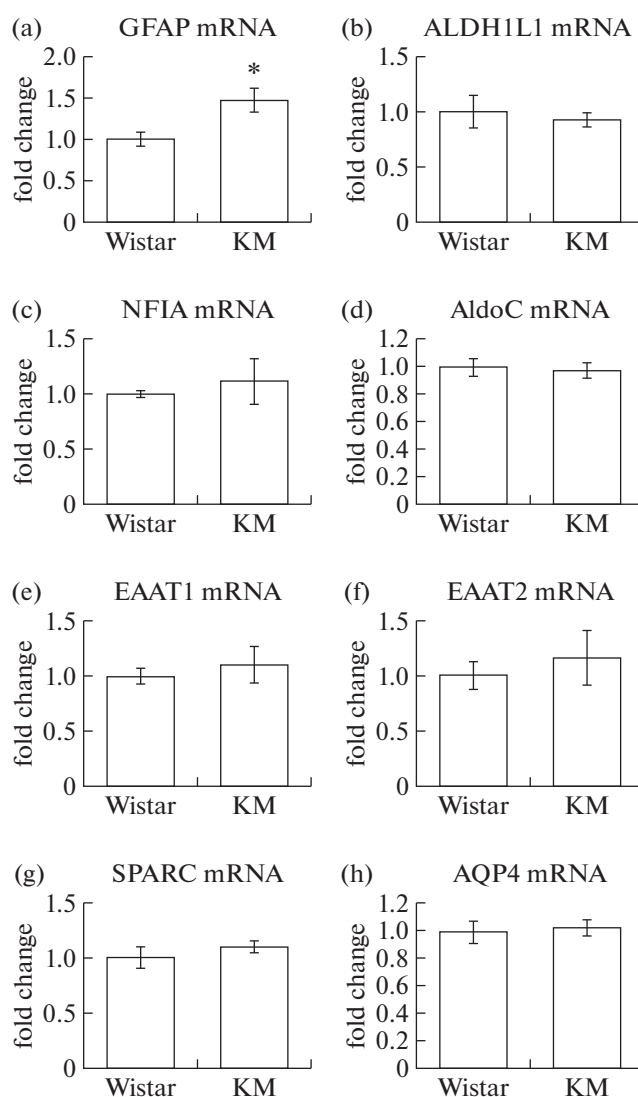


Рис. 1. ПЦР анализ в режиме реального времени экспрессии генов-маркеров астроцитов в гиппокампе “наивных” крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ) и крыс Вистар. (a) – GFAP mRNA; (b) – ALDH1L1 mRNA; (c) – NFIA mRNA; (d) – AldoC mRNA; (e) – EAAT1 mRNA; (f) – EAAT2 mRNA; (g) – SPARC mRNA; (h) – AQP4 mRNA. Данные представлены в виде кратности изменений $\pm$ стандартное отклонение. За “1” приняты значения уровня экспрессии исследованных генов в гиппокампе контрольных крыс Вистар. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ограничивая передачу возбуждающего сигнала на постсинаптическую мембрану и предохраняя нейроны от эксайтотоксичности [31]. В мембранах астроцитов экспрессируются два основных транспортера глутамата, EAAT1 (GLAST) и EAAT2 (GLT-1), которые переносят глутамат внутрь клетки вместе с ионами Na^+ и H^+ в обмен на ионы K^+ , причем около 90% обратного захвата глутамата в центральной нервной системе обеспечивает EAAT2 [31]. Известно, что для очагов эпилептической активности ха-

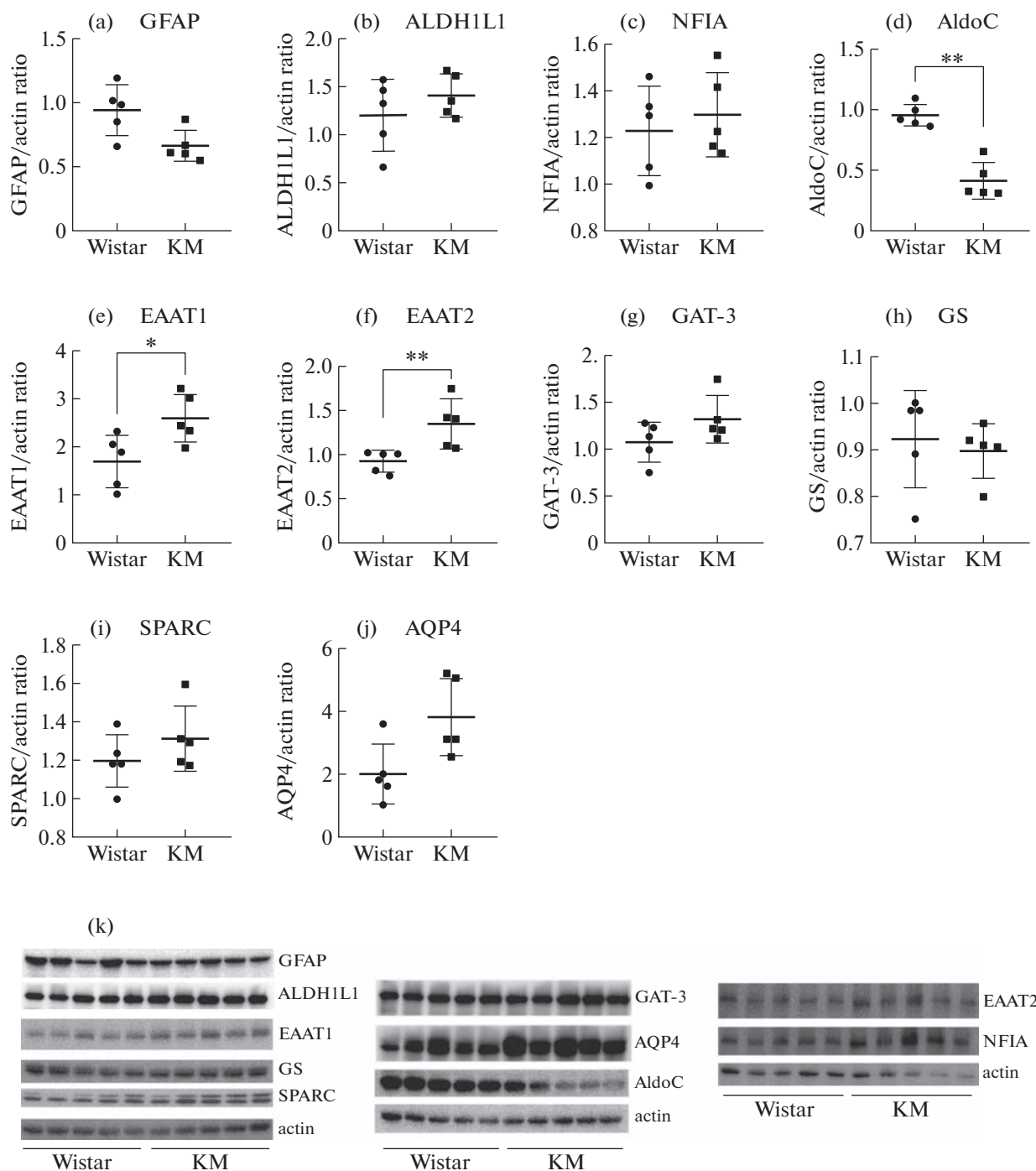


Рис. 2. Вестерн-блот анализ уровня экспрессии астроцитарных белков в гиппокампе “наивных” крыс KM и крыс Вистар. (a) – GFAP; (b) – ALDH1L1; (c) – NFIA; (d) – AldoC; (e) – EAAT1; (f) – EAAT2; (g) – GAT-3; (h) – GS; (i) – SPARC; (j) – AQP4. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем. $n = 5$ для каждой группы. (k) – репрезентативные изображения иммуноблотов белков интереса GFAP, ALDH1L1, NFIA, AldoC, EAAT1, EAAT2, GAT-3, GS, SPARC, AQP4 и actin в гиппокампе крыс KM и Вистар.

рактерна повышенная концентрация глутамата в межклеточном пространстве, которая может быть связана с дисфункцией EAAT1/2 и снижением их экспрессии [8, 32]. Действительно, было показано, что нокаутирование гена, кодирующе-

го EAAT2/GLT-1, у мышей вызывало спонтанные судороги и патологические изменения в гиппокампе, напоминающие гиппокампальный склероз [33]. Однако имеющиеся данные об экспрессии этих переносчиков у пациентов с височной эпи-

лепсией и склерозом гиппокампа противоречивы. Согласно некоторым данным, в гиппокампе наблюдается сниженная экспрессия EAAT2, в то время как экспрессия EAAT1, напротив, повышается [34]. Tessler и соавт. не выявили никаких изменений в экспрессии EAAT [35]. Другие исследователи сообщают о сниженной экспрессии обоих транспортеров [36, 37]. Таким образом, вопрос о регуляции работы транспортеров глутамата при височной эпилепсии до сих пор остается открытым. Полученные нами данные показали, что у “наивных” крыс КМ с полностью сформированной готовностью к аудиогенным припадкам наблюдается повышенный уровень EAAT1 и 2 в гиппокампе, что свидетельствует об активном удалении глутамата астроцитами из синаптической щели. При этом ранее мы также выявили сниженную экспрессию везикулярного транспортера глутамата 2 (VGLUT2) и ионотропных глутаматных рецепторов в гиппокампе этих животных [19]. Вероятно, в комплексе эти изменения препятствуют гипервозбуждению гиппокампа и возникновению у крыс КМ спонтанных судорог.

Помимо транспортеров глутамата, астроциты экспрессируют несколько белков-транспортеров ГАМК, обеспечивающих рециркуляцию ГАМК в пресинапсе, включая GAT-1, GAT-3 и бетаин-ГАМК-транспортер (BGT-1) [38, 39]. В отличие от GAT-1 и BGT-1, GAT-3 экспрессируется исключительно астроцитами и располагается преимущественно в астроглиальных отростках, модулируя тонические тормозные токи в постсинаптических клетках [38]. Наши данные не выявили различий в уровне экспрессии GAT-3 между “наивными” крысами КМ и крысами Вистар, что свидетельствует об отсутствии изменений транспорта ГАМК в астроцитах гиппокампа.

Глутамат, захваченный астроцитами из синаптической щели, далее метаболизируется при помощи специфического астроцитарного фермента глутаминсинтетазы с образованием глутамина [40]. Далее глутамин возвращается в нейроны, где используется для синтеза глутамата и ГАМК [41]. Таким образом, глутаминсинтетаза играет центральную роль в метаболизме возбуждающих и тормозных нейромедиаторов [42]. Наши данные не выявили изменений экспрессии глутаминсинтетазы в гиппокампе крыс КМ, что свидетельствует о нормальном уровне метаболизма глутамата и ГАМК.

Помимо регуляции процессов нейротрансмиссии, астроциты также контролируют образование, созревание и дегенерацию синапсов. В частности, такие секреторные белки астроцитов, как SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) и SPARCL1 (SPARC-like 1), регулируют формирование возбуждающих синапсов как в развивающемся, так и во взрослом мозге млекопитающих [22]. Так, SPARCL1 непосредственно стимулирует образова-

ние возбуждающих синапсов, в то время как SPARC специфически тормозит синаптогенную активность SPARCL1 [22]. Наши данные показали, что экспрессия SPARC в гиппокампе крыс КМ не изменяется по сравнению с крысами Вистар. Поскольку наши предыдущие данные указывают на снижение глутаматергической трансмиссии в гиппокампе крыс КМ [19], можно предположить наличие сопутствующих изменений в экспрессии SPARCL1, однако данный вопрос требует дальнейших исследований.

Одним из факторов, вызывающих гипервозбудимость нейронов, является нарушение водного баланса нервной ткани, в регуляции которого принимают участие водные каналы в мембранах глиальных клеток, образованные белками аквапоринов [23]. В частности, AQP4 экспрессируется в отростках астроцитов, контактирующих с кровеносными капиллярами или глутаматергическими синапсами. Показано, что у пациентов с височной эпилепсией и склерозом гиппокампа наблюдается снижение AQP4 в периваскулярном пространстве гиппокампа [43], а у мышей, нокаутных по гену *AQP4*, наблюдается нарушение буферизации K⁺ и, как следствие, повышенная продолжительность судорог, вызванных электрической стимуляцией [44]. В то же время в гиппокампе “наивных” крыс КМ мы не выявили отличий в экспрессии AQP4, что свидетельствует об отсутствии нарушений данной астроцитарной функции на фоне полностью сформированной судорожной готовности.

Таким образом, проведенное исследование выявило повышенную экспрессию транспортеров глутамата EAAT1 и 2 и сниженную экспрессию альдозазы С в астроцитах гиппокампа у “наивных” взрослых крыс КМ. С одной стороны, эти изменения указывают на активное удаление глутамата из синаптической щели и сниженную активность гликолиза, что может препятствовать развитию у крыс КМ спонтанных судорожных припадков. С другой стороны, сниженный уровень регулируемой альдозазой С метаболизма глюкозы может свидетельствовать о недостаточном снабжении нейронов гиппокампа необходимыми энергетическими субстратами.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-24-00342 <https://rscf.ru/project/23-24-00342/>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть работы была выполнена на оборудовании ЦКП ИЭФБ РАН (441590).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с Директивой ЕС 86/609/ЕЕС по проведе-

нию экспериментов на животных и были одобрены комитетом по уходу и использованию животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (Протокол № 1-20/2023 от 26.01.2023 г. комиссии по биоэтике, утвержденной Приказом Директора ИЭФБ РАН № 8 от 24.01.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ю.С.Г. — проведение экспериментов, сбор материала, проведение анализа Вестерн-блот; А.А.Н. — планирование экспериментов, обсуждение результатов, интерпретация данных; С.Д.Н. — проведение экспериментов, сбор материала, проведение анализа ПЦР; М.В.Г. — постановка задачи, планирование экспериментов, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verkhatsky A, Nedergaard M (2018) Physiology of astroglia. *Physiol Rev* 98: 239–389.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
2. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee J-M, Parpura V, Hol EM, Sofroniew M V, Verkhatsky A (2016) Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 131: 323–345.
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>
3. Kovács R, Heinemann U, Steinhäuser C (2012) Mechanisms underlying blood–brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: Role of astroglia. *Epilepsia* 53: 53–59.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03703.x>
4. Halassa MM, Haydon PG (2010) Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks Modulate Neuronal Activity and Behavior. *Annu Rev Physiol* 72: 335–355.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135843>
5. Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32: 421–431.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
6. Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7: 194–206.
<https://doi.org/10.1038/nrn1870>
7. Jabs R, Seifert G, Steinhäuser C (2008) Astrocytic function and its alteration in the epileptic brain. *Epilepsia* 49: 3–12.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01488.x>
8. Binder DK, Steinhäuser C (2006) Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia* 54: 358–368.
<https://doi.org/10.1002/glia.20394>
9. Sparks FT, Liao Z, Li W, Grosmark A, Soltesz I, Losonczy A (2020) Hippocampal adult-born granule cells drive network activity in a mouse model of chronic temporal lobe epilepsy. *Nat Commun* 2020 111 (11): 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19969-2>
10. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA (2013) Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 36: 174–184.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008>
11. Wetherington J, Serrano G, Dingledine R (2008) Astrocytes in the Epileptic Brain. *Neuron* 58: 168–178.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.002>
12. Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E1896–E1905.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1800165115>
13. Heuser K, Eid T, Lauritzen F, Thoren AE, Vindedal GF, Tauböll E, Gjerstad L, Spencer DD, Ottersen OP, Nagelhus EA, De Lanerolle NC (2012) Loss of perivascular kir4.1 potassium channels in the sclerotic hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 71: 814–825.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318267b5af>
14. Sandhu MRS, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Dhaher R, Deshpande K, Funaro MC, Lee T-SW, Zaveri HP, Eid T (2021) Astroglial Glutamine Synthetase and the Pathogenesis of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurol* 12: 665334.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.665334>
15. Poletaeva II, Surina NM, Kostina ZA, Perepelkina OV, Fedotova IB (2017) The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epilepsy Behav* 71: 130–141.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.072>
16. Kulikov AA, Naumova AA, Aleksandrova EP, Glazova MV, Chernigovskaya EV (2021) Audiogenic kindling stimulates aberrant neurogenesis, synaptopodin expression, and mossy fiber sprouting in the hippocampus of rats genetically prone to audiogenic seizures. *Epilepsy Behav* 125.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108445>
17. Kulikov AA, Naumova AA, Dorofeeva NA, Ivlev AP, Glazova MV, Chernigovskaya EV (2022) Dynamics of neurodegeneration in the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats correlates with the progression of limbic seizures. *Epilepsy Behav* 134.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2022.108846>
18. Kulikov AA, Dorofeeva NA, Naumova AA, Harbachova EL, Glazova MV, Chernigovskaya EV (2020) Impaired postnatal development of the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats genetically prone to audiogenic seizures. *Epilepsy Behav* 113.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107526>
19. Chernigovskaya EV, Korotkov AA, Dorofeeva NA, Gorbacheva EL, Kulikov AA, Glazova MV (2019) Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with overactivation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling. *Epilepsy Behav* 99.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106494>

20. *Matias I, Morgado J, Gomes FCA* (2019) Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci* 11: 59. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
21. *Laug D, Huang TW, Bosquez Huerta NA, Huang AYS, Sardar D, Ortiz-Guzman J, Carlson JC, Arenkiel BR, Kuo CT, Mohila CA, Glasgow SM, Lee HK, Deneen B* (2019) Nuclear factor I-A regulates diverse reactive astrocyte responses after CNS injury. *J Clin Invest* 129: 4408–4418. <https://doi.org/10.1172/JCI127492>
22. *Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, Feng A, Ozlu MI, Conatser LM, Chakraborty C, Workman G, Weaver M, Sage EH, Barres BA, Eroglu C* (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E440–E449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104977108>
23. *Binder DK, Nagelhus EA, Ottersen OP* (2012) Aquaporin-4 and epilepsy. *Glia* 60: 1203–1214. <https://doi.org/10.1002/glia.22317>
24. *Michalovicz LT, Kelly KA, Vashishtha S, Ben-Hamo R, Efroni S, Miller JV, Locker AR, Sullivan K, Broderick G, Miller DB, O'Callaghan JP* (2019) Astrocyte-specific transcriptome analysis using the ALDH1L1 bacTRAP mouse reveals novel biomarkers of astrogliosis in response to neurotoxicity. *J Neurochem* 150: 420–440. <https://doi.org/10.1111/jnc.14800>
25. *Beard E, Lengacher S, Dias S, Magistretti PJ, Finsterwald C* (2022) Astrocytes as Key Regulators of Brain Energy Metabolism: New Therapeutic Perspectives. *Front Physiol* 12: 2503. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.825816>
26. *Fei Y, Shi R, Song Z, Wu J* (2020) Metabolic Control of Epilepsy: A Promising Therapeutic Target for Epilepsy. *Front Neurol* 11: 592514. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.592514>
27. *Khatibi VA, Salimi M, Rahdar M, Rezaei M, Nazari M, Dehghan S, Davoudi S, Raoufy MR, Mirnajafi-Zadeh J, Javan M, Hosseinmardi N, Behzadi G, Janahmadi M* (2023) Glycolysis inhibition partially resets epilepsy-induced alterations in the dorsal hippocampus-basolateral amygdala circuit involved in anxiety-like behavior. *Sci Rep* 13: 6520. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33710-1>
28. *Cañete-Soler R, Reddy KS, Tolan DR, Zhai J* (2005) Aldolases A and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *J Neurosci* 25: 4353–4364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0885-05.2005>
29. *Slemmer JE, Haasdijk ED, Engel DC, Plesnila N, Weber JT* (2007) Aldolase C-positive cerebellar Purkinje cells are resistant to delayed death after cerebral trauma and AMPA-mediated excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 26: 649–656. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05708.x>
30. *Staugaitis SM, Zerlin M, Hawkes R, Levine JM, Goldman JE* (2001) Aldolase C/zebrin II expression in the neonatal rat forebrain reveals cellular heterogeneity with in the subventricular zone and early astrocyte differentiation. *J Neurosci* 21: 6195–6205. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-06195.2001>
31. *Magi S, Piccirillo S, Amoroso S, Lariccia V* (2019) Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs): Glutamate Transport and Beyond. *Int J Mol Sci* 20: 5674. <https://doi.org/10.3390/ijms20225674>
32. *Todd AC, Hardingham GE* (2020) The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 21: 9607. <https://doi.org/10.3390/ijms21249607>
33. *Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K* (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* (80) 276: 1699–1702. <https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1699>
34. *Mathern GW, Mendoza D, Lozada A, Pretorius JK, Dehnes Y, Danbolt NC, Nelson N, Leite JP, Chimelli L, Born DE, Sakamoto AC, Assirati JA, Fried I, Peacock WJ, Ojemann GA, Adelson PD* (1999) Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 52: 453–472. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.3.453>
35. *Tessler S, Danbolt NC, Faull RLM, Storm-Mathisen J, Emson PC* (1999) Expression of the glutamate transporters in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 88: 1083–1091. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00301-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00301-7)
36. *Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Rundén-Pran E, Lai JCK, Malthankar G V., Kim JH, Danbolt NC, Ottersen OP, De Lanerolle NC* (2004) Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: Possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 363: 28–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15166-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15166-5)
37. *Proper EA, Hoogland G, Kappen SM, Jansen GH, Rensen MGA, Schrama LH, Van Veelen CWM, Van Rijen PC, Van Nieuwenhuizen O, Gispén WH, De Graan PNE* (2002) Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 125: 32–43. <https://doi.org/10.1093/brain/awf001>
38. *Liu J, Feng X, Wang Y, Xia X, Zheng JC* (2022) Astrocytes: GABAergic and GABAergic Cells in the Brain. *Front Cell Neurosci* 16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.892497>
39. *Ishibashi M, Egawa K, Fukuda A* (2019) Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. *Int J Mol Sci* 20: 2964. <https://doi.org/10.3390/ijms20122964>
40. *Anlauf E, Derouiche A* (2013) Glutamine Synthetase as an Astrocytic Marker: Its Cell Type and Vesicle Localization. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00144>
41. *Eid T, Behar K, Dhaher R, Bumanglag A V., Lee T-SW* (2012) Roles of Glutamine Synthetase Inhibition in Epilepsy. *Neurochem Res* 37: 2339–2350. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0766-5>
42. *Bernstein H-G, Tausch A, Wagner R, Steiner J, Seeleke P, Walter M, Dobrowolny H, Bogerts B* (2013) Disruption of

Glutamate-Glutamine-GABA Cycle Significantly Impacts on Suicidal Behaviour: Survey of the Literature and Own Findings on Glutamine Synthetase. *CNS Neurol Disord – Drug Targets* 12: 900–913.
<https://doi.org/10.2174/18715273113129990091>

43. Lee TS, Eid T, Mane S, Kim JH, Spencer DD, Ottersen OP, de Lanerolle NC (2004) Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy.

Acta Neuropathol 108: 493–502.
<https://doi.org/10.1007/s00401-004-0910-7>

44. Binder DK, Yao X, Zador Z, Sick TJ, Verkman AS, Manley GT (2006) Increased seizure duration and slowed potassium kinetics in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Glia* 53: 631–636.
<https://doi.org/10.1002/glia.20318>

ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL STATE OF ASTROGLIA IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS GENETICALLY PRONE TO AUDIOGENIC SEIZURES

Y. S. Grigorieva^a, A. A. Naumova^a, S. D. Nikolaeva^a, and M. V. Glazova^{a, #}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: mglazova@iephb.ru*

It was shown that abnormalities in astrocyte functions can cause alterations in neuronal excitability and promote the development of epilepsy, however, this question claims further investigation. The aim of the present work was to analyze the functional state of astrocytes in the hippocampus of Krushinsky-Molodkina (KM) rats genetically predisposed to the reflex audiogenic seizures. Adult naïve animals with fully-established audiogenic sensitivity were recruited in our experiments. Rats of parental Wistar strain were used as a control. Obtained results revealed unchanged protein expression of such astocytic markers as GFAP, ALDH1L1, and NFIA suggesting the absence of the reactive astrogliosis in the hippocampus of KM rats. SPARC and aquaporin 4 expression also did not differ from the control indicating no violations in astroglia regulation of synaptogenesis and water balance. Analysis of glial proteins responsible for reuptake and metabolism of neurotransmitters revealed normal expression of GABA transporter GAT-3 and glutamine synthetase, while glutamate transporters EAAT1 and 2 were significantly elevated pointing on enhanced activity of glutamate removal from synapses. In addition, decreased expression of the key glycolytic enzyme aldolase C, probably, indicated insufficient activity of glucose metabolism in astrocytes. Thus, obtained data pointed on genetically determined alterations of astroglia functions in the hippocampus of rats with inherited reflex epilepsy.

Keywords: astrocytes, audiogenic seizures, hippocampus, Krushinsky-Molodkina rats, epilepsy