

УДК 577.352.4

Изменения концентрации внутриклеточного кальция и митохондриального потенциала в клетках первичной культуры коры головного мозга крысы при острой механической травме

Красильникова И.А.¹, Бакаева З.В.^{1,2}, Пинелис В.Г.¹, Лисина О.Ю.^{3,4}, Сурин А.М.^{1,3}

¹ Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 119991, Москва, Ломоносовский пр., д. 2, стр. 1

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет» Министерства образования и науки Российской Федерации. 119454, Москва, пр. Вернадского, д. 78

Актуальность. Моделирование *in vitro* травматического повреждения мозга помогает выявить патологические механизмы, ответственные за гибель клеток или их последующую дисфункцию в деталях, труднодоступных *in vivo*. **Цель.** Определить изменения внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) в первичной нейроглиальной культуре непосредственно в момент нанесения механической травмы. **Методы и материалы.** Методом флуоресцентной микроскопии отслеживали изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в первичной нейроглиальной культуре из коры головного мозга 1–2-дневных крыс. Возраст культуры в момент измерений 11–14 дней. **Результаты.** Обнаружено, что нейротравма вызывает скачок $[Ca^{2+}]_i$ и совпадающее с ним по времени резкое падение $\Delta\Psi_m$. Эти изменения затрагивали клетки, расположенные не далее 100 мкм от границы травмы. Блокирование ионотропных глутаматных рецепторов NMDA-типа с помощью МК-801 снижало в 8,5 раз долю нейронов, имевших высокий подъем $[Ca^{2+}]_i$. **Выводы.** Поступления Ca^{2+} в клетки при механическом повреждении первичной нейроглиальной культуры происходит преимущественно по NMDA-каналам и отчасти, вероятно, по АТФ-активируемым каналам.

Ключевые слова: мозг; травма; нейроглиальные культуры; глутамат; кальций; митохондрии.

Для цитирования: Красильникова И.А., Бакаева З.В., Пинелис В.Г., Лисина О.Ю., Сурин А.М. Изменения концентрации внутриклеточного кальция и митохондриального потенциала в клетках первичной культуры коры головного мозга крысы при острой механической травме. Патогенез. 2018; 16(3): 124–128

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.124-128

Для корреспонденции: Сурин Александр Михайлович, e-mail: surin_am@mail.ru

Финансирование. Исследование поддержано грантами РФФИ 17-00-00106, 16-04-00792, 18-015-00450. Контрольные эксперименты выполнены при поддержке гранта РНФ 17-15-01487.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 21.08.2018

Changes in intracellular calcium concentration and mitochondrial potential in primary cultures of rat brain cells in acute mechanical injury

Krasilnikova I.A.¹, Bakaeva Z.V.^{1,2}, Pinelis V.G.¹, Lisina O.Yu.^{3,4}, Surin A.M.^{1,3}

¹ National Medical Research Center of Children's Health, Lomonosovskiy Prospekt 2, Bldg. 1, Moscow 119991, Russian Federation

² Russian University of People's Friendship, Miklukho-Maklaya Str. 6, Moscow 117198, Russian Federation

³ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

⁴ Russian Technological University, Prospekt Vernadskogo 78, Moscow 119454, Russian Federation

Background. *In vitro* modeling of traumatic brain injury helps clarifying pathological mechanisms responsible for cell death or their subsequent dysfunction in detail, which is difficult to accomplish *in vivo*. **Aim.** To determine changes in intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) in a primary neuroglial culture during infliction of a mechanical injury (scratch). **Methods and materials.** Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and $\Delta\Psi_m$ in the primary neuroglial culture from the cerebral cortex of 1–2 day old rats were monitored using a fluorescence microscopy technique. Measurements were performed in 11–14-day old cultures. **Results.** Neurotrauma resulted in a sharp increase in $[Ca^{2+}]_i$ and a synchronous profound drop of $\Delta\Psi_m$. These changes affected cells located not farther than 100 μ m from the boundary of the injury. Inhibition of NMDA-type ionotropic glutamate receptors with MK-801 reduced by approximately 8.5 times the proportion of neurons, which indicated a high $[Ca^{2+}]_i$ rise. **Conclusion.** Ca^{2+} influx into cells during mechanical injury of the primary neuroglial culture occurs predominantly through NMDA-channels and perhaps partially through ATP-activated channels.

Keywords: brain; trauma; neuroglial cultures; glutamate; calcium; mitochondria.

For citation: Krasilnikova I.A., Bakaeva Z.V., Pinelis V.G., Lisina O.Yu., Surin A.M. [Changes in intracellular calcium concentration and mitochondrial potential in primary cultures of rat brain cells in acute mechanical injury]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(3): 124–128 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.124-128

For correspondence: Surin Alexander Mikhailovich, e-mail: surin_am@mail.ru

Funding. The work was supported by grants of RFBR 17-00-00106, 16-04-00792, 18-015-00450. Control experiments supported by grant of RSF17-15-01487.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 21.08.2018

Введение

Нанесение механических повреждений первичным нейрональным и смешанным нейроглиальным культурам и последующее исследование механизмов гибели клеток в поврежденных участках успешно применяют в качестве *in vitro* модели при изучении процессов, вызванных механической травмой головного или спинного мозга [1]. Первичная культура астроцитов из кортекса новорожденных крыс после нанесения механического повреждения демонстрировала поведение, напоминающее процесс рубцевания, — гиперпластичность, повышенную подвижность клеток и увеличенное содержание GFAP [2]. Механическое повреждение первичных глиальных и нейроглиальных культур вызывает гораздо большую гибель нейронов, чем глиальных клеток [3]. Антагонист ионотропных глутаматных рецепторов NMDA-типа МК-801 и метаботропных глутаматных рецепторов MCPG оказывали нейропротекторное действие. Такой же эффект вызывало ингибирование синтеза NMDA-рецепторов, свидетельствуя о значительном вкладе гиперстимуляции глутаматных рецепторов в гибель нейронов при механическом повреждении нейрональной сети [3]. Участие NMDA-рецепторов было обнаружено при механическом повреждении смешанной нейроглиальной культуры не только при царапании, но и в результате растяжения [4]. При этом наблюдали выделение Glu во внеклеточный буфер, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ и снижение $\Delta\Psi_m$. Таких изменений не было, если повреждение наносили в присутствии ингибитора NMDA-каналов МК-801.

Недавно мы показали, что изменения морфологии нейрональной сети и развитие митохондрий в первичной культуре гранулярных клеток мозжечка крысы чувствительны к механическому повреждению в течение 2 недель после нанесения царапины [5]. *Целью данного исследования* было изучение влияния механической нейротравмы *in vitro* (царапины) на Ca^{2+} гомеостаз и функциональное состояние митохондрий в культуре клеток коры головного мозга в сравнении с моделью глутаматной нейротоксичности на аналогичной культуре. В отличие от упомянутых выше исследований, изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ производили непосредственно в момент нанесения механической травмы. Это позволило показать неоднородность клеточных ответов и оценить расстояние, на которое распространяется рост $[Ca^{2+}]_i$ и падение $\Delta\Psi_m$.

Материалы и методы исследования

Первичные нейроглиальные культуры готовили из коры головного мозга 1–2-дневных крыс Вистар в соответствии с правилами гуманного отношения к животным, как описано в работе [6]. Возраст культуры в момент из-

мерений составлял 11–14 дней. Измерения выполнены с временным разрешением 1 кадр в 5 с. Культуру механически травмировали царапанием иглой, установленной в микроманипуляторе. Измерения выполнены в индивидуальных клетках (в нейронах и глии) с помощью флуоресцентно-микроскопической системы анализа изображения на основе микроскопа Olympus XI-70 (Япония), источника света Lambda 10-2 (Sutter Instruments, США), камеры CoolSnap HQ2 (Photometrics, США). Измерения концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_i$) и трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) производили непрерывно до и после нанесения царапины, используя низкофинный флуоресцентный Ca^{2+} индикатор Fura-FF и потенциал-чувствительный митохондриальный зонд Rh123. Измерения выполнены, как описано в статье [6] при температуре 27–29°C в солевом буфере (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 5 glucose, pH 7,4. Для отмывания Glu использовали номинально бескальциевый буфер, в котором Ca^{2+} заменен на EGTA (100 мкМ) и присутствовало 2 мМ Mg^{2+} .

Флуоресцентные зонды приобретены у Invitrogen (США), остальные реагенты куплены у Sigma (США).

Анализ полученных данных проводили с помощью программы Metafluor (Molecular Device, США), построение графиков и статистическую обработку проводили с помощью программ Excel и Prizm-6.

Результаты исследования

Флуоресцентные изображения участка первичной культуры клеток коры головного мозга крысы до нанесения царапины и через 10 с после царапины представлены на рис. 1 (А, Б). Видно, что скачок $[Ca^{2+}]_i$, вызванный царапиной, выше у тех клеток, которые расположены не далее ~100 мкм от царапины (рис. 1, Б; рис. 2, А). Графики изменения $\Delta\Psi_m$ демонстрируют синхронность роста $[Ca^{2+}]_i$ и деполяризации митохондрий (рис. 2, А, Г). Подобная синхронность $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ была многократно отмечена при действии токсических доз глутамата на культивируемые нейроны [7]. Флуоресцентные изображения неповрежденной культуры и графики изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ после добавления глутамата показаны соответственно на рис. 1 (В) и рис. 2 (В, Е).

Мы проверили, могут ли скачок $[Ca^{2+}]_i$ и резкое падение $\Delta\Psi_m$ при механическом повреждении культуры быть вызваны потоком Ca^{2+} по глутамат-управляемым NMDA-каналам. Для этого нанесение царапины провели в буфере, содержащем МК-801, неконкурентный ингибитор NMDA-рецепторов. В присутствии ингибитора (10 мкМ) доля клеток, в которых происходило сильное

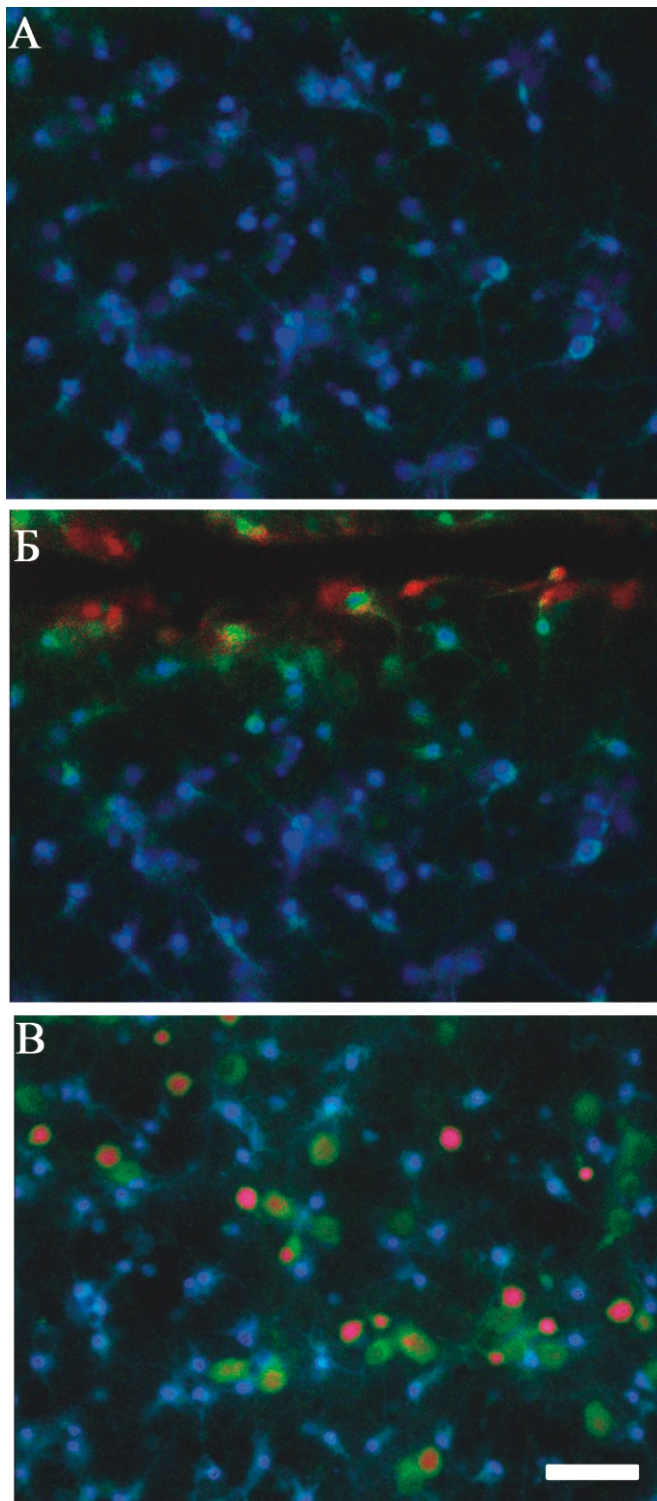


Рис. 1. Флуоресцентные изображения первичной культуры клеток коры головного мозга крысы до нанесения царапины (А), через 10 с после царапины (Б) и неповрежденной культуры через 60 с после добавления глутамата (В). Культуры нагружены низкоаффинным Ca^{2+} индикатором Fura-FF. Более высокой концентрации внутриклеточного Ca^{2+} соответствует более теплый цвет на изображении. Glu (100 мкМ) добавляли в безмагниевом буфере в присутствии глицина (10 мкМ). Масштабная полоска соответствует 50 мкм.

увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и значительное падение $\Delta\Psi_m$, уменьшилась в $8,5 \pm 1,5$ раза (4 эксперимента, 111 клеток; рис. 2, Б, Д). Однако часть клеток сохранила высокий подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и даже двухфазный характер подъема $[\text{Ca}^{2+}]_i$, несмотря на ингибирование NMDA-рецепторов. Сохранение значительных изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ у некоторых клеток при царапании в буфере с ингибитором обусловлено недостаточной концентрацией МК-801 и, соответственно, неполной блокадой Glu-управляемых NMDA-каналов, поскольку последующая добавка Glu не вызвала скачка $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и сильного падения $\Delta\Psi_m$ ни в одной клетке (рис. 2, Б, Д). Это полностью согласуется с представлением о том, что NMDA-каналы являются доминирующими путями поступления Ca^{2+} в клетку [7]. Очевидно, в культуре были клетки, в которых имелись высоко проводящие пути поступления Ca^{2+} в цитоплазму помимо NMDA-каналов и каналов, активируемых входом Ca^{2+} и Na^+ по Glu-управляемым каналам. Это предположение подтверждается тем, что в буфере, лишенном Ca^{2+} , изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ полностью отсутствовали (не показано).

Обсуждение

Основной находкой данной работы является обнаружение того, что значительный скачкообразный рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и синхронная сильная деполяризация митохондрий способны вызвать глутамат-управляемые NMDA-каналы, а также другие пока не идентифицированные механизмы. Этот вывод основан на том, что МК-801, селективный ингибитор NMDA-каналов, хотя и блокировал высокий скачок $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и сильное падение $\Delta\Psi_m$, но лишь у части нейронов, тогда как удаление из буфера Ca^{2+} отменяло большие изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ во всех клетках.

В зрелой нейроглиальной культуре длина аксонов может достигать сотен микрометров, тогда как длина дендритов астроцитов не превышает 20–30 мкм [8]. Относительно небольшое расстояние от границы царапины (не более ~100 мкм), в пределах которого происходил сильный рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и значительное падение $\Delta\Psi_m$ позволяет предположить, что часть клеток с такими изменениями $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ могла быть астроцитами. Небольшие изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ на удаленных от царапины расстояниях (≥ 100 мкм) свидетельствуют о том, что Ca^{2+} может поступать в нейроны из буфера в местах перерезания аксонов и/или дендритов, диффундируя по ним и вызывая небольшие изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в соме.

Клетки, разрушенные в зоне царапины, высвобождают в буфер содержимое. Из всех низкомолекулярных соединений в цитозоле в наибольшем количестве присутствуют Glu и АТФ (их концентрации достигают 3–10 мМ [9]). Поэтому даже после значительного (в 10–100 раз) разбавления Glu и АТФ при их высвобождении из разрушенных клеток в зоне царапины способны стимулировать соответствующие рецепторы на поверхности соседних неповрежденных клеток.

Таким образом, механическая травма вызывает сильные скачкообразные изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в клетках, близко расположенных к зоне повреждения. Эти изменения сопоставимы с вызываемыми нейротоксическими дозами глутамата [7]. У части нейронов эти изменения дей-

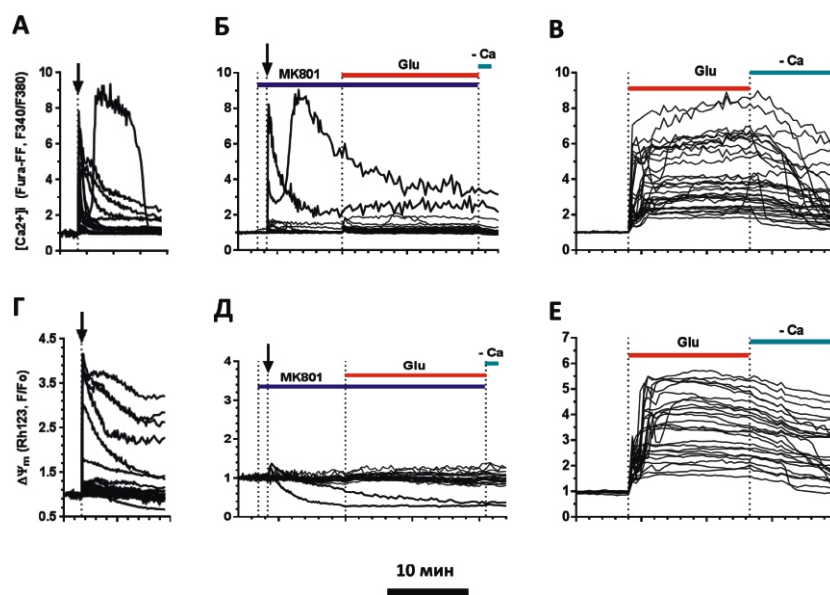


Рис. 2. Изменения концентрации Ca^{2+} (А–В) и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) (Г–Е), вызванные нанесением царапины (А, Б, Г, Д) и добавлением глутамата (Glu) (В, Е). Для определения вклада ионотропных глутаматных рецепторов в изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, в культуру предварительно добавляли ингибитор NMDA-каналов МК-801 (10мкМ) (Б, Д). Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ представлены как отношения сигналов флуоресцентного Ca^{2+} -индикатора Fura-FF, измеренных при возбуждении на 340 и 380 нм (F340/F380) и регистрации при 525 нм. В каждом нейроне отношение F340/F380 нормировано на исходную величину в состоянии покоя. Изменения $\Delta\Psi_m$ представлены как изменения сигнала потенциал-чувствительного зонда Rh123 (F), нормированные относительно величины в покоеющихся клетках (Fo). Рост сигнала Rh123 соответствует падению $\Delta\Psi_m$. Стрелкой отмечен момент нанесения царапины.

ствительно вызваны стимуляцией Glu-управляемых NMDA-рецепторов, тогда как у других клеток лигандом, вероятно, служит АТФ.

Список литературы

- Morrison B., Elkin B.S., Doll'e J.-P., Yarmush M.L. In Vitro Models of Traumatic Brain Injury. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2011; 13: 91-126. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124706
- Yu A.C., Lee Y.L., Eng L.F. Astroglial in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis. *J. Neurosci. Res.* 1993; 34(3): 295-303. DOI: 10.1002/jnr.490340306
- Mukhin A.G., Ivanova S.A., Allen J.W., Faden A.I. Mechanical injury to neuronal/glia cultures in microplates: role of NMDA receptors and pH in secondary neuronal cell death. *J. Neurosci. Res.* 1998; 51(6): 748-758. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19980315)51:6<748::AID-JNR8>3.0.CO;2-B
- Ahmed S.M., Weber J.T., Liang S., Willoughby K.A., Sitterding H.A., Rzigalinski B.A., Ellise A.F. NMDA receptor activation contributes to a portion of the decreased mitochondrial membrane potential and elevated intracellular free calcium in strain-injured neurons. *J. Neurotrauma.* 2002; 19: 1619-1629. DOI: 10.1089/089771502762300274
- Лисина О.Ю., Москвитцев А.А., Кубатиев А.А., Сурин А.М. Динамика изменений морфологии нейрональной сети и развития митохондрий в механически поврежденной первичной культуре нейронов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 11-23. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.11-23
- Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca^{2+} дизрегуляцией, митохондриальной деполаризацией и последующей гибелью нейронов. *Патогенез.* 2014; 12(4): 41-47.
- Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004; 86 (2): 279-351. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002
- Горбачева Л.Р., Помыткин И.А., Сурин А.М., Абрамов Е.А., Пинелис В.Г. Астроциты и их роль в патологии центра-

льной нервной системы. *Российский педиатрический журнал.* 2018; 21(1): 46-53. DOI: 10.18821/1560-9561-2018-21-1-46-53

9. Nicholls D., Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990; 11: 462-468.

References

- Morrison B., Elkin B.S., Doll'e J.-P., Yarmush M.L. In Vitro Models of Traumatic Brain Injury. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2011; 13: 91-126. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124706
- Yu A.C., Lee Y.L., Eng L.F. Astroglial in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis. *J. Neurosci. Res.* 1993; 34(3): 295-303. DOI: 10.1002/jnr.490340306
- Mukhin A.G., Ivanova S.A., Allen J.W., Faden A.I. Mechanical injury to neuronal/glia cultures in microplates: role of NMDA receptors and pH in secondary neuronal cell death. *J. Neurosci. Res.* 1998; 51(6): 748-758. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19980315)51:6<748::AID-JNR8>3.0.CO;2-B
- Ahmed S.M., Weber J.T., Liang S., Willoughby K.A., Sitterding H.A., Rzigalinski B.A., Ellise A.F. NMDA receptor activation contributes to a portion of the decreased mitochondrial membrane potential and elevated intracellular free calcium in strain-injured neurons. *J. Neurotrauma.* 2002; 19: 1619-1629. DOI: 10.1089/089771502762300274
- Lisina O.Yu., Moskvitsev A.A., Kubatiev A.A., Surin A.M. [Dynamics of changes in the morphology of the neuronal network and the development of mitochondria in the mechanically damaged primary culture of neurons]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy].* 2018; 62(2): 11-23. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.11-23 (in Russian)
- Surin A.M., Krasil'nikova I.A., Pinelis V.G., Hodorov B.I. [Investigation of the relationship between glutamate-induced delayed Ca^{2+} dysregulation, mitochondrial depolarization and the subsequent death of neurons]. *Patogenez [Pathogenesis].* 2014; 12(4): 41-47. (in Russian)
- Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004; 86 (2): 279-351. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002
- Gorbacheva L.R., Pomytkin I.A., Surin A.M., Abramov E.A., Pinelis V.G. [Astrocytes and their role in the pathology of the central nervous sys-

Сведения об авторах:

Красильникова Ирина Александровна — научный сотрудник лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Бакаева Занда Валериевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации; доцент кафедры нормальной физиологии Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Пинелис Всеволод Григорьевич — доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Лисина Оксана Юрьевна — научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; аспирант Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Сурин Александр Михайлович — доктор биологических наук, и.о. заведующего лабораторией нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»