

© Коллектив авторов, 2018
УДК 576.535.5 + 57.085.23

Лисина О.Ю.^{1,2}, Московцев А.А.^{1,3}, Кубатиев А.А.^{1,3}, Сурин А.М.^{1,4,5}

Динамика изменений морфологии нейрональной сети и развития митохондрий в механически поврежденной первичной культуре нейронов

¹ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН,
125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

² ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет» Министерства образования и науки РФ,
119454, г. Москва, Россия, просп. Вернадского, д. 78

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России,
125993, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

⁴ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России,
119991, г. Москва, Россия, Ломоносовский просп., д. 2, стр. 1

⁵ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России,
117997, г. Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Цель исследования. На модели первичной культуры нейронов изучить влияние повреждения (механическая травма) на: 1 — морфологию нейрональной сети и 2 — динамику образования митохондрий в процессе развития культуры. **Методика.** Развитие первичной культуры нейронов из мозжечка 7-дневных крыс регистрировали с интервалом 20 мин в течение 2,5 нед. со дня посева клеток с помощью системы прижизненной визуализации и анализа IncuCyte ZOOM, снабженной 20x объективом. Изображения сомы индивидуальных нейронов и развитие нейритов¹ записывали в проходящем свете. Образование митохондрий и генерацию в них электрического трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) отслеживали с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда TMRM (20 нМ), который непрерывно присутствовал в культуре с момента посадки. Механическую травму мозга моделировали нанесением царапины шириной ~1 мм по монослою клеток спустя 23 ч после посадки. **Результаты.** Морфологические изменения развивающейся первичной культуры нейронов (суммарная длина нейритов, относительная площадь сомы) характеризуются тремя фазами, отличающимися по кинетике и продолжительности. TMRM влиял на продолжительность и амплитуду фаз, не изменяя их количества. Митохондрии начинали развиваться на 4-е сут. после посадки культуры и увеличение их числа и рост $\Delta\Psi_m$ завершались после 10—14-х сут. развития культуры. **Заключение:** Фазы развития митохондрий соотносятся с тремя фазами морфологических изменений культуры в целом. Первые 2—3 сут. после посадки энергообеспечение нейрональной сети происходит, вероятно, за счет гликолиза, поскольку митохондрии не генерируют $\Delta\Psi_m$, достаточный для синтеза АТФ. Аксоны из неповрежденной области прорастают в поврежденную зону преимущественно в направлении нейронов, сохранившихся в зоне царапины.

Ключевые слова: первичная культура нейронов; мозжечок; митохондрии; митохондриальный потенциал; механическая травма; цейтраферная микроскопия.

Для цитирования: Лисина О.Ю., Московцев 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

Финансирование. Исследование поддержано грантами РФФИ 16-04-00792, РФФИ 15-04-01869, РФФИ 17-00-00106; РФФИ 17-15-01487.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают искреннюю благодарность Н.В. Кошелевой и Э.Р. Муслихову за ценные советы, полученные при подготовке статьи.

Поступила 12.12.2017

Для корреспонденции: Сурин Александр Михайлович, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли НИИОПП, e-mail: surin_am@mail.ru

¹ Нейриты — обобщенное название аксонов и дендритов; данный термин используется при описании незрелых и/или развивающихся нейронов, особенно нейронов в культуре, так как на раннем этапе невозможно отличить аксон от дендрита [1, 2].

Lisina O.Yu.^{1,2}, Moskovtsev A.A.^{1,3}, Kubatiev A.A.^{1,3}, Surin A.M.^{1,4,5}

Dynamics of changes in neuronal network morphology and development of mitochondria in mechanically damaged primary neuronal culture

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

² MIREA — Russian Technological University, Prospekt Vernadskogo 78, Moscow 119454, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russia

⁴ National Medical Research Center of Children's Health, Lomonosovskiy Prospekt 2/1, Moscow 119991, Russia

⁵ Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova Str. 1, Moscow 117997, Russia

The aim of the study was (1) to trace morphological changes in a primary neuronal culture during its development and compare these changes with morphological changes in a mechanically damaged culture, and (2) to elucidate the dynamics of mitochondrial formation in normal and damaged cultures. **Methods.** The development of a primary culture of neurons from the cerebellum of 7-day old rats was recorded at 20-min intervals for 2.5 weeks starting from the cell seeding day with a IncuCyte ZOOM's intravital imaging and analysis system equipped with 20x objective lenses. Images of individual neuronal soma and neurite development were recorded in transmitted light. Mitochondrial formation and generation of electrical transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) were monitored with a potential-sensitive fluorescent probe TMRM (20 nM), which was continuously present in the culture from the moment of seeding. Mechanical brain injury was modeled by applying an approximately one-mm wide scratch to the cell monolayer at 23 hours after plating. **Results.** Morphological changes in the developing primary neuronal culture (total length of neurites, relative area of soma) were characterized by three phases with different kinetics and duration. TMRM influenced the phase duration and amplitude without changing the number of phases. Mitochondria began developing on the fourth day after plating. Increases in their number and $\Delta\Psi_m$ were complete at 10—14 days of culture development. **Conclusion.** Phases of mitochondrial development were consistent with three phases of morphological changes in the entire culture. During the first 2—3 days following cell plating, the energy supply to the neuronal network was apparently provided by glycolysis since mitochondria did not generate an adequate $\Delta\Psi_m$ for ATP synthesis. Axons grow from the intact area into the injured zone mainly in the direction of survived neurons in the scratch zone.

Keywords: primary neuronal culture; cerebellum; mitochondria; mitochondrial potential; mechanical trauma; time-lapse microscopy.

For citation: Lisina O.Yu., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A., Surin A.M. Dynamics of changes in neuronal network morphology and development of mitochondria in mechanically damaged primary neuronal culture. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 11—23. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.11-23

For correspondence: Alexander M. Surin, Doctor of Biological Sciences, Major scientific researcher of the Laboratory of fundamental and applied problems of pain Institute of General pathology and pathophysiology Russian Academy of Sciences; Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315, Russia, e-mail: surin_am@mail.ru

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

Acknowledgments. The work was supported by grants of RFBR 17-00-00106, 16-04-00792, 15-04-01869 and grant of RSF 17-15-01487.

Information about authors:

Kubatiev A.A., <http://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 12.12.2017

Введение

Исследование механизмов гибели клеток в поврежденных участках первичных нейрональных культур давно и успешно применяется в качестве модели *in vitro* при изучении процессов, протекающих при хирургических операциях на мозге и механической травме головного или спинного мозга [1, 2]. Механическое повреждение первичных глиальных и нейро-глиальных культур вызывало гораздо большую гибель нейронов, чем глиальных клеток [3, 4], причем антагонист ионо-

тропных глутаматных рецепторов NMDA-типа МК-801 и ингибитор метаботропных глутаматных рецепторов MCPG оказывали нейропротекторное действие [3]. Аналогичный эффект вызывало ингибирование синтеза NMDA-рецепторов [4], свидетельствуя о значительном вкладе гиперстимуляции глутаматных рецепторов в гибель нейронов при механическом повреждении нейрональной сети.

Нанесение механической травмы использовали не только для выяснения механизмов гибели нейронов, оказавшихся в зоне повреждения, но также для изу-

чения репарации культуры после повреждения [5, 6]. В работе [5], выполненной с применением флуоресцентной и трансмиссионной оптической микроскопии, было показано, что положительно заряженные наночастицы могут служить средством доставки внутрь клеток химических веществ, влияющих на регенерацию поврежденной первичной культуры. Для исследования механизма репарации поврежденного мозга получали трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах фактор апоптоза *Parg-4*, первоначально обнаруженный в раковых клетках простаты и содержащий в своей структуре домен смерти [6]. По сравнению с культурами клеток из мышей дикого типа в нейро-глиальных культурах из трансгенных мышей наблюдалось более сильное падение митохондриального потенциала, большее образование свободных радикалов, а также более ранняя активацию каспазы-3.

При механических травмах спинного и головного мозга часто наблюдают бактериальное заражение зоны поражения [7]. В работе [7] было проверено может ли преколонизирование нейро-глиальных культур фрагментами стенки бактерии *E.coli*, основным компонентом которых является липополисахарид (ЛПС), повлиять на выживаемость клеток мозга. Преколонизирование механически травмированных культур с ЛПС значительно увеличивало уровень интерлейкина-10 и снижало гибель клеток по сравнению с поврежденными культурами, обработанными средой без ЛПС.

Механическое повреждение первичной культуры астроцитов из кортекса новорожденных крыс приводило к гиперпластичности, повышенной подвижности и увеличенному содержанию глиального фибриллярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein, GFAP) [8]. В поврежденной культуре астроциты приобретали реактивность и находились в состоянии, напоминающем процесс рубцевания, причем блокирование синтеза GFAP подавляло образование рубца [9]. Ингибирование с помощью антисмысловых олигонуклеотидов или лентивирусных конструкций синтеза GFAP или виментина в культурах, поврежденных царапиной, снижало реактивность астроцитов и скорость рубцевания [9]. Механическая травма (нанесение царапины) первичной культуры астроцитов зарастала медленнее, если ингибировали циклинзависимую киназу 5 [10]. Причиной более медленной репарации повреждения служит ингибирование реорганизации тубулина, локализации GFAP и уменьшение длины дендритов реактивных астроцитов в сторону царапины.

В цитированных выше исследованиях измерения интересующих параметров проводили не более чем в 3—4 временных точках, причем через несколько суток после посева культуры и нанесения механиче-

ского повреждения. В данной работе мы изучали динамику развития нейрональной сети в течение 2,5 нед., начиная с момента посева культуры.

Цель исследования. На модели первичной культуры нейронов изучить влияние повреждения (нанесение механической травмы) на: 1 — морфологию нейрональной сети и 2 — динамику образования митохондрий в процессе развития культуры

Методика

Эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. 2010), а также в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.

Первичные нейрональные культуры готовили из мозжечка самцов крыс Вистар (возраст 6—7 сут.), как описано в работе [11]. Суспензию клеток в нейро-базальной среде с добавлением 20 мМ KCl, 2% Supplement B-27 и 0,5 мМ L-глутамин, раскапывали в 24-луночный планшет, каждая лунка которого была предварительно покрыта полиэтиленгликолем и содержала 1,8 мл нейробазальной среды с указанными выше дополнительными компонентами. В лунки вносили по 0,2 мл суспензии — плотность посадки 3×10^5 клеток/лунку. Нейроны росли при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха и 100% влажности в течение ~2,5 нед. Механическую травму (царапина) наносили через 23 ч после посева культуры, когда образование нейритов находилось в самой начальной стадии. Выбор культуры нейронов мозжечка крысы, способной развиваться при низком содержании глии, и нанесение царапины в момент, когда нейрональная сеть еще не сформировалась, позволило выявить различные фазы развития нейрональной сети, стадии развития митохондрий в соме нейронов и особенности прорастания аксонов в зону механического повреждения.

Цейтраферную съемку нейрональной культуры в фазово-контрастном и флуоресцентном режимах осуществляли с интервалом 20 мин при помощи системы прижизненной визуализации и анализа IncuCyte ZOOM (Essen BioScience, США), оптический блок которой постоянно находился в CO₂-инкубаторе. При съемке использовали объектив 20x/NA = 0,7.

Для отслеживания изменений трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$) использовали флуоресцентный зонд TMRM (метилвый эфир тетраметилродамина, Invitrogen, США). В каждой

лунке велась запись изображений с интервалом 20 мин в четырех участках размером 0,63 X 0,85 мм, равноудаленных от центра и краев лунки.

Для анализа данных использовали следующие параметры:

1. Средняя суммарная длина нейритов в пересчете на единицу поверхности (Average Neurite Length, NL, мм/мм²); нейритами программа считает все объекты, поперечный размер которых равен 1 мкм;
2. Доля поверхности, занимаемая сомой индивидуальных нейронов или их кластеров, если программный модуль прибора не позволяет различить тела соседних нейронов как индивидуальные объекты (Cell-Body Cluster Area, CBA, мм²/мм²);
3. Число флуоресцирующих объектов на единицу поверхности (Average Object Count, OC, 1/мм²);
4. Средняя площадь флуоресцирующих объектов (Average Object Area, OA, мкм²).

Параметры NL и CBA подсчитывали при помощи программного модуля IncuCyte® NeuroTrack Software Module, а параметры OA и OC — при помощи Fluorescent Processing Software Module.

Результаты и обсуждение

Изменения морфологии неповрежденной нейрональной культуры

В изменениях морфологии нейрональной культуры по мере ее роста и развития обращает на себя внимание наличие четко различающихся фаз. Наиболее быстрая фаза роста нейритов начинается почти сразу после прикрепления клеток к дну лунки (рис. 1, А). В начальные 40—50 ч быстрый рост суммарной длины нейритов (NL) происходит практически линейно (рис. 1, Е). Затем наступает значительное замедление роста нейритов, которое проявляется в 4,4-крат-

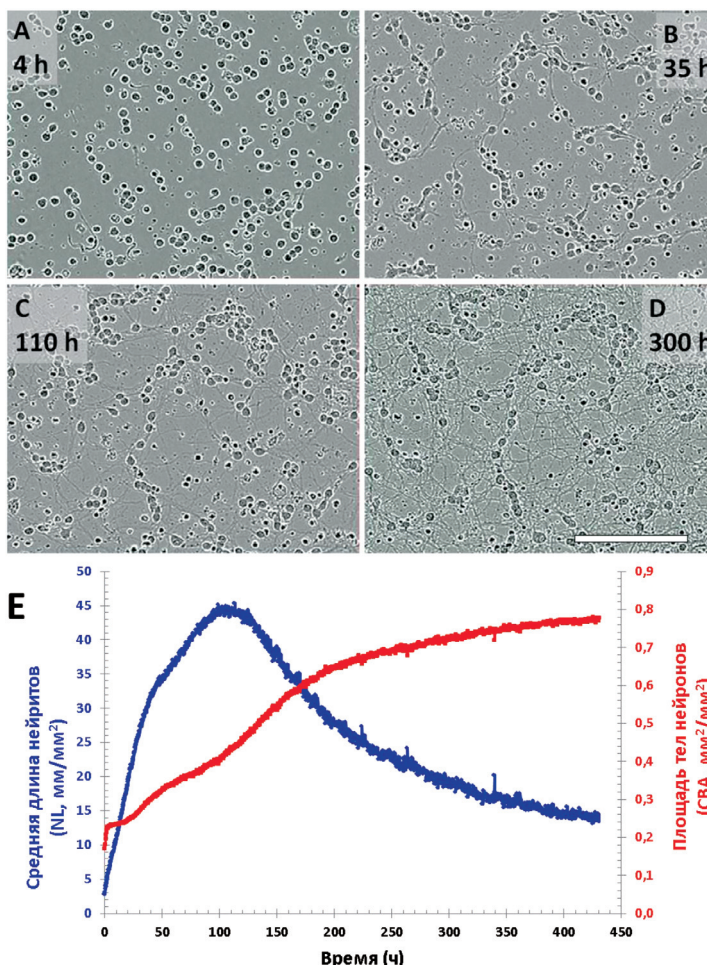


Рис. 1. Динамика изменений морфологии нейрональной сети по мере развития первичной культуры. Фазово-контрастные изображения (A-D) первичной культуры гранулярных нейронов мозжечка в разные сроки после посадки и графики (E) изменений суммарной длины нейритов (NL, синяя кривая, левая шкала ординат, мм/мм²) и относительной площади (CBA, красная кривая, правая шкала ординат, мм²/мм²), занимаемой телами нейронов и их кластерами. На панелях (A-D) числами указан возраст культуры (часы). Масштабная полоска соответствует 100 мкм.

ном снижении наклона кривой (участки 4—32 ч и 42—100 ч считали линейными). Сопоставление изображений, полученных на 30-м и 100-м ч, показывает, что в этом интервале NL увеличивается за счет развития коротких нейритов (возможно, дендритов) между телами нейронов (рис. 1, В, С). Максимальная NL достигается к 120—150 ч, после чего неожиданно наступает снижение длины нейритов (рис. 1, Е). Из сопоставления изображений на 150-м и 300-м ч (рис. 1, С, D) видно, что заметного разрушения нейритов не происходит, а снижение NL после 140—150-го ч наступает в результате объединения отдельных нейритов в пучки.

Таким образом, снижение длины нейритов является кажущимся и уменьшение параметра NL вызвано не фрагментацией нейритов, а тем, что программа анализа изображений считает нейритами только те объекты, поперечный размер которых равен 1 мкм. Объекты, чей диаметр превышает 1 мкм, рассматриваются уже не как нейриты, а как тела нейронов и/или их кластеров и учитываются в параметре СВА (рис. 1, Е).

Второй измеряемый параметр — относительная площадь, занимаемая сомой нейронов (СВА), как и суммарная длина нейритов, также характеризуется несколькими фазами, возникающими по мере роста и развития культуры. После завершения осаднения клеток и прикрепления к дну лунок (первые 4 ч) параметр СВА стабилизируется и остается постоянным до ~20 ч (рис. 1, Е). Наступающая затем фаза быстрого роста СВА отражает увеличение размера сомы нейронов. Отчасти это увеличение обусловлено ростом нейритов, размер которых возле места отхождения от сомы значительно больше 1 мкм и поэтому эти участки нейритов включены в параметр СВА. Вероятно, поэтому фаза быстрого увеличения суммарной площади сомы завершается практически тогда, когда завершается фаза быстрого роста суммарной длины нейритов (рис. 1, Е). Фаза медленного увеличения СВА наблюдается в интервале 60—120 ч, тогда же происходит и медленный рост параметра NL (рис. 1, Е). Такое совпадение времени медленных фаз роста NL и СВА согласуется с предположением о том, что рост СВА отражает процесс формирования нейритов на соме клеток.

В тот момент, когда график NL проходит через максимум (~120 ч), начинается завершающая фаза роста СВА (рис. 1, Е). Причина этого финального роста, очевидно, в том, что программа перестает распознавать объекты диаметром более 1 мкм как нейриты, и считает их телами нейронов или их кластерами. По этой же причине СВА достигает значения, которое при взгляде на изображение (рис. 1, D) представляется завышенным, поскольку суммарная пло-

щадь тел нейронов явно не занимает 80% от общей площади изображения. Однако, если в параметр СВА включены не только сома нейронов, но и собирающиеся в пучки нейриты, тогда такое высокое значение СВА становится допустимым. Собираению нейритов в пучки способствует небольшое перемещение нейронов и объединение их в кластеры, которое прослеживается по мере старения культуры.

Развитие митохондриальной сети в неповрежденной нейрональной культуре

В культивируемых нейронах, полученных из мозга новорожденных крыс, основными производителями АТФ для энергообеспечения внутриклеточных процессов считаются митохондрии [12—14]. Поэтому параллельно с измерениями изменений морфологии развивающейся культуры был выполнен мониторинг основной интегральной характеристики функционального состояния митохондрий — $\Delta\Psi_m$. Для этого использовали потенциал-чувствительный флуоресцентный зонд TMRM [15, 16].

В течение первых 3 сут. (до ~70-го ч) происходило накопление TMRM в клетках и в митохондриях. Сопоставление изображений, полученных в этот период, показывает, что паттерн распределения зонда немного меняется (рис. 2, А, В), что согласуется с отмеченным выше феноменом взаимного перемещения тел клеток. Эта подвижность тел не отражается на суммарной интенсивности флуоресценции и площади, занимаемой флуоресцирующими объектами на изображении (рис. 2, Е). По-видимому, в течение первых 3 сут. роста и развития культуры трансмембранный электрический потенциал как плазмалеммы, так и митохондрий, почти не изменяются, оставаясь низкими. На это указывает суммарная флуоресценция TMRM, которая не превышает 5% от максимальной интенсивности в конце 17-суточного периода наблюдения за культурой (рис. 2, Е). Почти постоянной и тоже низкой в течение первых 3 сут. остается также и площадь флуоресцирующих объектов (рис. 2, Е).

В интервале от 70 до 140 ч происходит быстрый рост интенсивности флуоресценции и начинается увеличение площади флуоресцирующих объектов (рис. 2, Е). Начало быстрого роста интенсивности сигнала TMRM примерно соответствует завершению фаз быстрого формирования нейритов и увеличения СВА (рис. 1, Е). Совмещение фазово-контрастных изображений с соответствующими флуоресцентными показывает, что в период 70—120 ч происходит быстрый захват TMRM митохондриями. Очевидно, между 3-ми и 5-ми сут. митохондрии начинают заметно наращивать $\Delta\Psi_m$. Не исключено, что также происходит значительное увеличение количества митохондрий в соме нейронов.

Быстрый рост интенсивности флуоресценции TMRM после 120-го ч замедлился, по-видимому, потому, что замедлился рост $\Delta\Psi_m$ и/или количества митохондрий в соме нейронов (рис. 2, E). Особенностью этой фазы является то, что митохондрии располагаются в цитозоле нейронов преимущественно вокруг ядра и возле мест отхождения нейритов от сомы, что является типичным для зрелой культуры [17].

Влияние TMRM на развитие нейрональной сети

Митохондриальный флуоресцентный зонд TMRM является положительно заряженной липофильной молекулой, способной диффундировать сквозь внутреннюю мембрану митохондрий и накапливаться в мат-

рикс пропорционально величине $\Delta\Psi_m$ и количеству митохондрий [15, 16, 18]. Необходимо отметить, что любой катион, проникающий сквозь мембрану, способен снижать $\Delta\Psi_m$ [19]. При продолжительной инкубации клеток с TMRM снижение $\Delta\Psi_m$ могло сказаться на развитии культуры, поэтому мы проверили влияние зонда на морфологию нейрональной сети. Добавка TMRM (20 нМ) не оказывала заметного влияния на NL в течение первых 2 сут. развития культуры (рис. 3, A). Дальнейшие изменения NL в лунках с добавлением TMRM напоминали изменения NL в контрольной культуре, но с задержкой по времени на 20—50 ч, вплоть до ~300-го ч. Далее кривые практически совпали (рис. 3, A). Многофазный характер параметра СВА также не изменился.

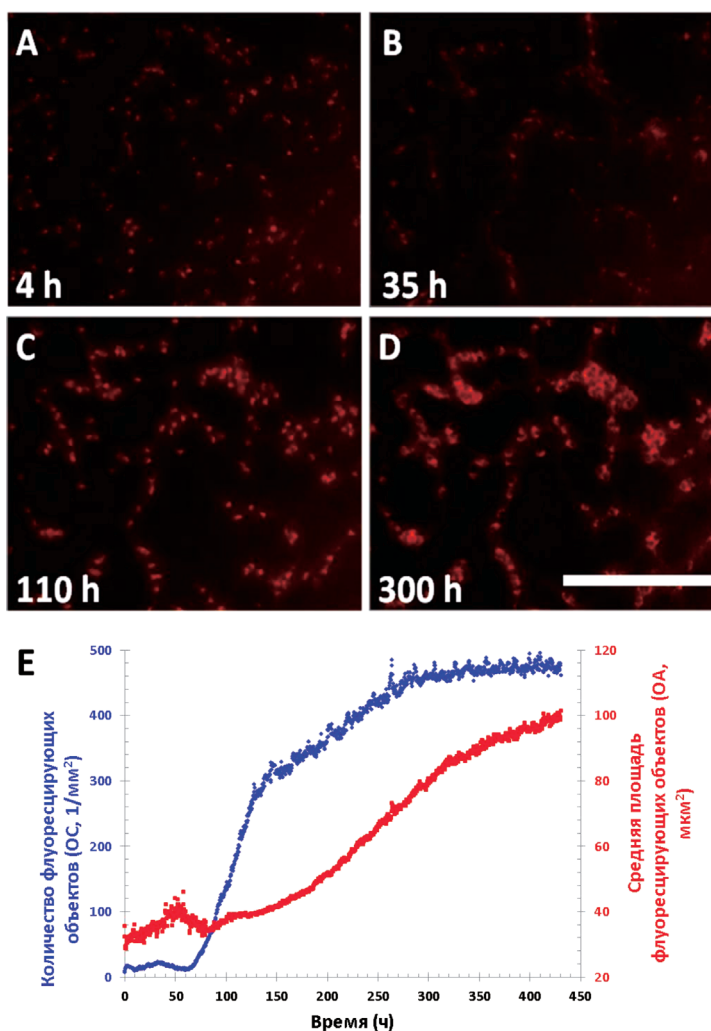


Рис. 2. Динамика накопления митохондриального зонда TMRM в первичной культуре гранулярных нейронов мозжечка. (A-D) Флуоресцентные изображения тех же самых участков культуры в те же моменты времени, которые представлены на рис. 1A-1D. (E) Графики изменения общего количества флуоресцирующих объектов на единицу поверхности (ОС, 1/мм², синяя кривая, левая ось ординат), и средняя площадь, занимаемая флуоресцирующими объектами (ОА, мкм², красная кривая, правая ось ординат). TMRM (20нМ) был добавлен одновременно с посадкой клеток в лунки. Объектив 20х/NA = 0,70; длины волн возбуждения и эмиссии соответственно 550 и 590 нм. Кривые являются средними значениями по 3 лункам 24-луночного планшета (12 изображений, n = 1000–2000 клеток). Масштабная полоска соответствует 100 мкм.

*Изменения морфологии нейрональной сети
и развития митохондрий
после механического повреждения культуры*

Царапина была проведена через 23 ч после посадки культуры, когда нейриты еще не сформировались или имели небольшую длину, достаточную для образования контактов только с ближайшими клетками. Прорастание длинных нейритов в зону царапины из неповрежденной области начиналось сразу после нанесения царапины и продолжалось в течение всего времени наблюдения.

Царапина, как и следовало ожидать, скачкообразно снижала параметры NL (рис. 4, А) и СВА (рис. 4, В). Кривая изменения СВА в травмированной культуре по очертанию повторяла изменения СВА в контрольной культуре, но проходила немного ниже (рис. 4, В). В травмированных культурах участок кривой, соответствующий объединению нейритов в пучки (6 и более суток со дня посадки), имел мень-

ший наклон, чем в контрольных культурах. Интересно, что присутствие TMRM в травмированной культуре дополнительно замедляло снижение NL после 160—180-го ч (рис. 4, С). Возможно, вызванное TMRM небольшое снижение $\Delta\Psi_m$ препятствовало объединению нейритов в пучки.

Из сопоставления флуоресцентных изображений контрольной и травмированной культур видно, что распределение митохондрий в сомах индивидуальных нейронов одинаково в обеих культурах (рис. 5, А; 5, В). Кривые изменения интенсивности сигналов TMRM, которые отражают изменения среднего размера флуоресцирующего объекта, практически совпадают в контрольной и поврежденной культурах (рис. 5, D, параметр OA). Эти данные показывают, что средний размер той части цитоплазмы, которую занимают митохондрии в теле нейронов, практически не отличается в нейронах контрольной и поврежденной культур.

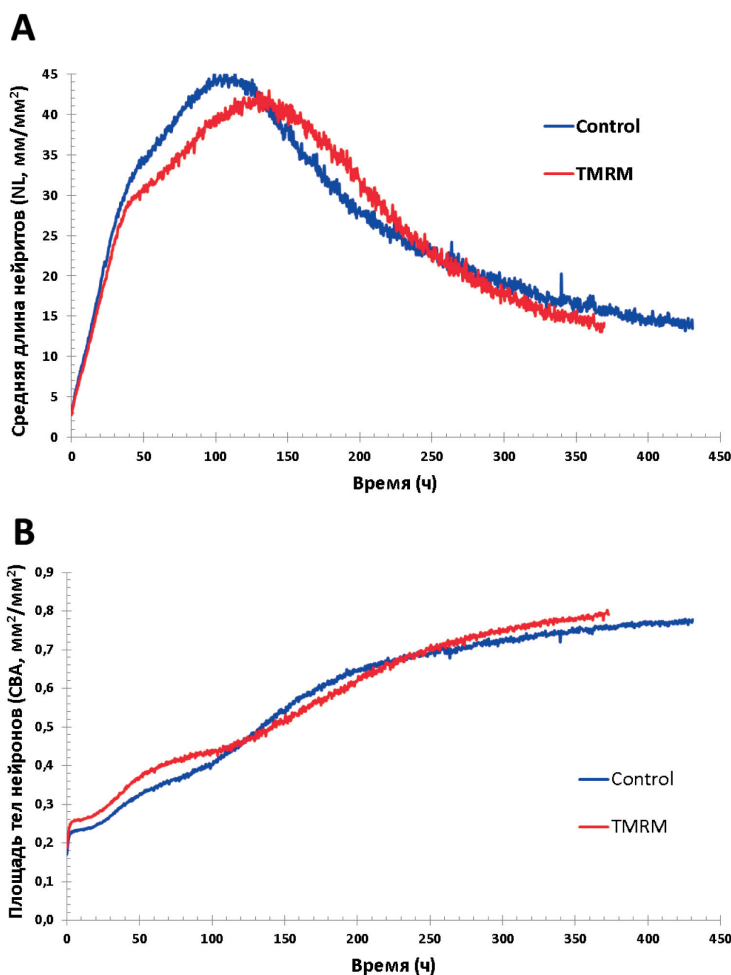


Рис. 3. Влияние TMRM на изменения морфологии нейрональной сети по мере развития первичной культуры. Обозначения осей и условия регистрации — как на рис. 1, Е.

Кривая среднего количества флуоресцирующих объектов на единицу поверхности (параметр ОС) в травмированной культуре повторяет по форме ОС контрольной культуры, но имеет меньшие значения (рис. 5, С). Более низкие значения параметра ОС поврежденной культуры обусловлены тем, что в зоне царапины мало уцелевших клеток (рис. 6), а митохондрии, находящиеся в нейритах, не учитываются из-за очень низкой интенсивности сигнала TMRM.

В зоне царапины удается обнаружить нейроны, которые не погибли и даже сохранили способность образовать нейриты. Некоторые из подобных нейронов обозначены наконечниками стрелок на рис. 6. Анализ цейтраферной съемки показывает, что нейриты таких «островных» нейронов формируются довольно быстро, но остаются относительно короткими, не достигая длины, достаточной для установления

контактов с другими нейронами в зоне царапины или с нейронами из неповрежденной области. Нейриты этой области (рис. 6), судя по длине, являются аксонами. Анализ записи царапин в различных лунках показывает, что в течение 300—400 ч эти аксоны могут полностью пересекать зону царапины, ширина которой $0,7 \pm 0,2$ мм ($n = 7$). Видеозапись также демонстрирует, что аксоны нейронов из неповрежденной области росли преимущественно в сторону тех нейронов в зоне царапины, которые имели собственные нейриты.

Анализ большого объема данных с использованием оптической микроскопии объектов, так называемый «high-content screening» [20, 21], все шире входит в практику, в том числе и для анализа нейрональных культур [22]. Для исследования динамики поведения культур клеток после повреждающего воздей-

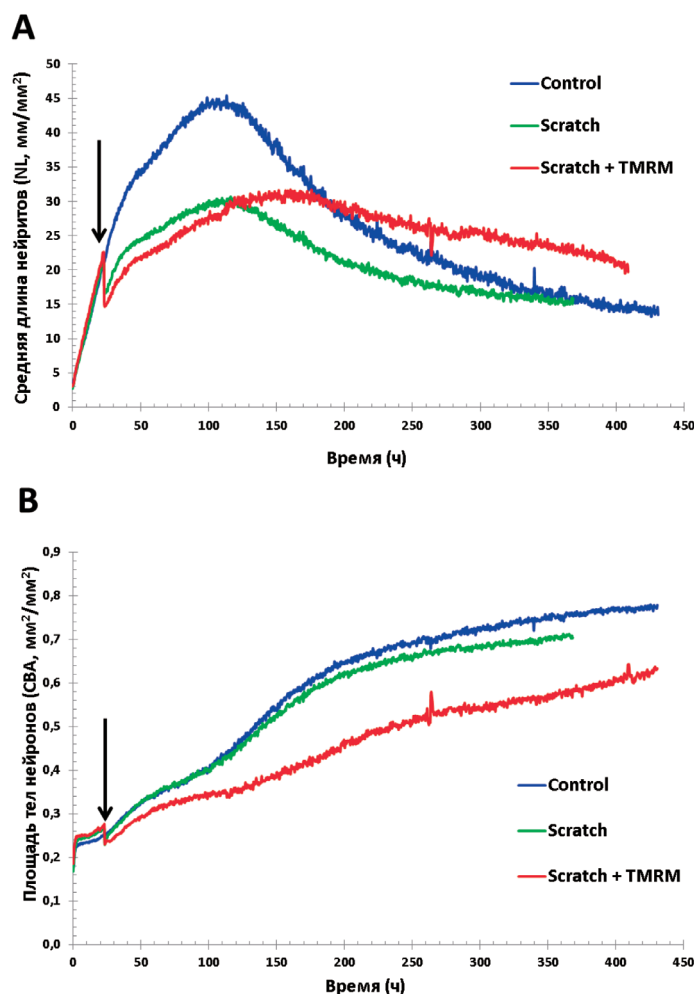


Рис. 4. Влияние царапины и митохондриального зонда TMRM на суммарную длину нейритов и относительную площадь сомы нейронов в механически поврежденной культуре по сравнению с контрольной. (А) Изменения суммарной длины нейритов в 1 мм² поверхности (NL) и (В) относительной площади сомы (CBA). Графики представляют данные, усредненные по 4 изображениям в 3—4 лунках. Стрелками отмечен момент нанесения царапины. Площадь царапины занимала 20—30% суммарной площади 4-х изображений. Условия регистрации те же, что на рис. 1.

ствия богатую информацию предоставляет цейтраферная (time-lapse) микроскопия [23, 24]. Однако этот подход не был использован, насколько нам известно, для исследования динамики роста и развития первичной нейрональной культуры. Наиболее интересными феноменами, обнаруженными в данной работе, являются:

1) многофазный характер изменения морфологии нейрональной сети в развивающейся первичной культуре;

2) динамика развития митохондрий в соме нейронов;

3) особенности заполнения зоны механического повреждения (царапины) аксонами.

Для исследования была выбрана первичная культура гранулярных клеток мозжечка, которая отличается высоким содержанием однотипных нейронов и низкой долей астроцитов (не более 10% от общего количества клеток; [25]). Благодаря этому, можно было получить фазово-контрастные изображения

нейронов и нейритов достаточно высокого качества и проследить развитие нейрональной сети.

В процессе роста нейритов можно выделить три фазы (рис. 1): фазу быстрого роста, которая длится первые 3 сут. развития культуры и является, очевидно, первой стадией установления межнейронных контактов. Не исключено, что именно эти нейриты становятся аксонами. На подобную возможность указывает то, что в это же время начинается распространение из неповрежденной зоны в направлении царапины нейритов, которые, судя по их длине, являются аксонами (рис. 6). Быстрая фаза роста нейритов сменяется фазой медленного роста и обусловлена, по-видимому, образованием более коротких, но многочисленных дендритов. Эта фаза завершается в культуре гранулярных нейронов мозжечка крысы на 6—8 сут. после посадки.

Неожиданным оказалось снижение NL, которое начиналось в это время (рис. 1). Сопоставление изображений показало, что во время этой 3-й фазы сни-

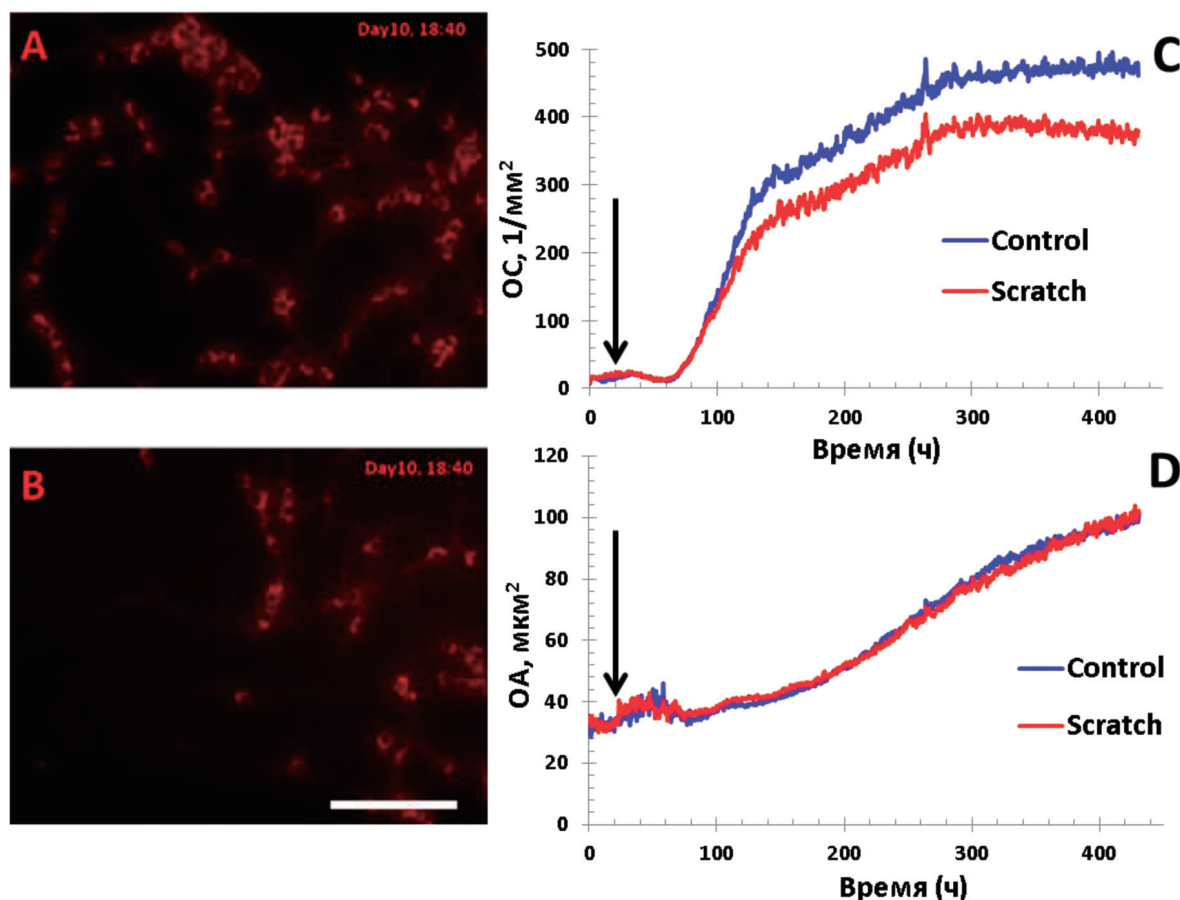


Рис. 5. Сигналы флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда TMRM в контрольной и механически поврежденной культурах. (А) Изображения контрольной и (В) поврежденной культуры. (С) Общее количество флуоресцирующих объектов на единицу поверхности (ОС, $1/\text{мм}^2$) и (D) средняя площадь флуоресцирующего объекта (ОА, $\mu\text{м}^2$). Кривые контрольных культур представлены синими линиями; кривые культур, механически поврежденных через 23 часа после посадки, представлены красными линиями. Момент нанесения царапины отмечен стрелками. Условия регистрации, те же что на рис. 2. Масштабная полоска соответствует 50 $\mu\text{м}$.

жение NL происходило не в результате уменьшения суммарной длины нейритов, а их объединения в пучки. Диаметр пучков превышал 1 мкм, и поэтому программа анализа изображений удаляла их из параметра NL, присоединяя к параметру СВА, который отражает площадь тел нейронов и их кластеров. Объединение нейритов в пучки наблюдали уже в ранних исследованиях первичных нейрональных культур с применением оптической микроскопии [26, 27].

Изменения СВА также имели 3-фазный характер, но были более монотонными по сравнению с изменениями NL и возрастали в течение всего времени наблюдения (рис. 1). Интервалы времени, когда происходила смена фаз, практически совпадали для кривых NL и СВА (рис. 1, E), указывая на тесную взаимосвязь длины нейритов с размерами и взаимным расположением тел нейронов. Сопоставление взаимного расположения сомы нейронов в разное время показывает, что тела нейронов заметно перемещались, особенно в первую неделю, когда нейриты активно росли (рис. 1, 2 и 5).

Развитие культуры требует высоких затрат энергии на синтез компонентов клетки и поддержание ионного гомеостаза. В нейронах основным производителем АТФ являются митохондрии, поэтому одновременно с изменением морфологических признаков нейронов, отслеживался рост $\Delta\Psi_m$, путем измерения накопления в нейронах митохондриального зонда TMRM [15, 16, 18].

Первые 3 сут. интенсивность флуоресценции TMRM составляла лишь ~5% от максимальной (рис. 2, E). Совмещение флуоресцентных и фазово-контрастных изображений показывает, что к ~70-му ч светится ~50% сомы. Вероятно, количество митохондрий в теле нейронов еще значительно ниже того, которое достигается в зрелой культуре (10 сут. и более). Очевидно, в первые 70 ч в клетке мало митохондрий и $\Delta\Psi_m$ еще недостаточно высок, чтобы обеспечить синтез АТФ на уровне, необходимом для развития нейрональной сети. Снабжение энергией этой фазы развития нейрональной сети по-

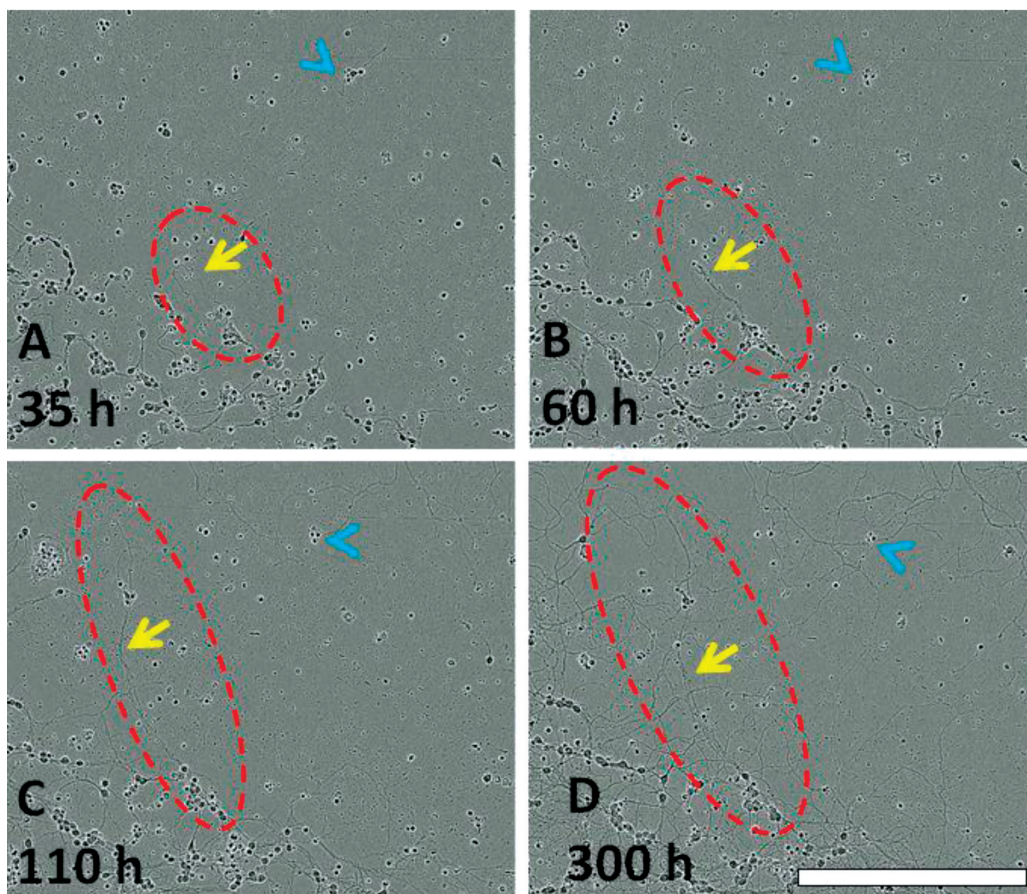


Рис. 6. Развитие нейритов (вероятнее всего, аксонов) в зоне царапины. Числа на изображениях указывают время регистрации изображения с момента посадки культуры. Наконечник стрелок (голубого цвета) указывает на нейроны в зоне царапины, которые сохранились при нанесении царапины и смогли образовать короткие нейриты. Стрелки (желтого цвета) указывают на растущие аксоны, принадлежащие нейронам на границе царапины. Масштабная полоска соответствует 100 мкм.

крявается, вероятно, за счет гликолиза. Обеспечение АТФ за счет гликолиза наблюдали в первичной нейрональной культуре, приготовленной из гиппокампа эмбрионов крысы [13].

Интенсивность сигнала TMRM начинала увеличиваться на 4-е сут., когда уже завершилась первая фаза роста СВА (рис. 1, Е). Несмотря на быстрый рост интенсивности флуоресценции TMRM, средняя площадь флуоресцирующих объектов увеличивалась незначительно (рис. 2, Е). Вероятно, в этот временной интервал (70—140 ч) происходил быстрый рост $\Delta\Psi_m$ без существенного увеличения количества митохондрий в соме нейронов. Затем в интервале 140—300 ч ситуация изменилась на противоположную — потенциал стал расти медленнее, а образование новых митохондрий и/или увеличение их среднего относительного размера (параметр ОА) ускорялось (рис. 2, Е). Начиная с ~300-го ч и до окончания эксперимента, интенсивность сигнала TMRM (параметр ОС) стабилизировалась на максимальном уровне, а ОА продолжал расти. Органеллы сосредоточивались в перинуклеарной зоне, а также в аксональных холмиках и возле мест отхождения дендритов от сомы (рис. 2, А — Д), завершая формирование типичной локализации митохондрий внутри тела нейрона [17, 28, 29].

Данные флуоресцентной микроскопии показывают, что низкие концентрации TMRM (20 нМ) позволяют получить новую информацию о развитии митохондрий в течение сотен часов непрерывного наблюдения за культурой. Однако необходимо учитывать, что все митохондриальные потенциал-чувствительные зонды являются положительно заряженными молекулами и, диффундируя из цитозоля в матрикс сквозь внутреннюю мембрану митохондрий, способны понижать $\Delta\Psi_m$ [19]. Поэтому мы проверили влияние TMRM на развитие нейрональной сети, сопоставив морфологию контрольных и окрашенных TMRM культур. Оказалось, что TMRM не влиял на 3-фазный характер кривых NL и СВА, но замедлял развитие сети нейритов, начиная с ~70-го ч (рис. 3, А). Эти данные свидетельствуют о том, что медленная фаза роста нейритов и объединение их в пучки может тормозиться даже при небольшом снижении $\Delta\Psi_m$, если оно длительное.

Первичные культуры нейронов неоднократно использовали в качестве модели при исследовании молекулярно-клеточных механизмов, развивающихся при травме нейрональной сети. Однако во всех известных нам случаях механическое повреждение наносили тогда, когда:

- 1) сеть уже полностью развилась;
- 2) динамику изменений регистрировали в 3—4 временных точках через несколько суток после травмы.

В данном исследовании царапина была нанесена через 23 ч после посева культуры, когда формирование сети нейритов было в самой начальной стадии и динамику развития контрольной и травмированной культур записывали с интервалом 20 мин в течение 2,5 нед. Выбор столь раннего этапа развития культуры для нанесения царапины обусловлен тем, что нас интересовало:

- 1) чувствительны ли выжившие клетки к последствиям гибели своих соседей на самых ранних этапах развития культуры, когда нейрональная сеть еще не сформировалась;
- 2) могут ли нейроны из неповрежденной области, еще не образовавшие синапсов с другими нейронами, перемещаться в поврежденную зону и формировать там нейрональную сеть.

Хотя кривая СВА травмированной культуры расположена ниже контрольной кривой, общий профиль кривых идентичен (рис. 4, В). Это указывает на то, что в неповрежденной зоне травмированной культуры нейроны развивались так же, как и в контрольной культуре. Об этом же свидетельствует и сопоставление флуоресцентных изображений и графиков контрольной и механически поврежденной культур (рис. 5). Средний размер флуоресцирующих объектов в контрольной и травмированной культурах не отличались на протяжении всего эксперимента (рис. 5, Д).

В зоне царапины удается обнаружить нейроны, которые не только не погибли, но и не утратили способность образовывать нейриты (рис. 6). Цейтраферная съемка демонстрирует, что некоторые из этих нейронов способны перемещаться на расстояния, в разы превышающие размер их сомы. Примечательно, что аксоны нейронов из пограничной с царапиной зоны устанавливают контакты прежде всего с теми нейронами в зоне царапины, которые имели собственные нейриты, пусть даже короткие. Возможно, что уцелевшие в зоне царапины нейроны или их нейриты выделяли «аттрактанты», которые привлекали аксоны из неповрежденной области. Таким «аттрактантом» может быть трансформирующий фактор роста TGF- β 1, авто- и паракринное влияние которого на регенерацию нейритов в механически травмированной первичной культуре нейронов было продемонстрировано в [30, 31].

В заключение отметим, что непрерывный оптический мониторинг позволяет получить уникальную информацию о разных стадиях развития нейрональной культуры. В настоящей работе отслеживали морфологические изменения культуры с помощью фазово-контрастных изображений и флуоресцентные сигналы потенциал-чувствительного митохондриального зонда TMRM. Это позволило связать различные фазы изменения морфологии нейрональной сети с накоплением митохондрий в соме нейронов и ростом $\Delta\Psi_m$.

References

1. Flynn K.C. The cytoskeleton and neurite initiation. *Bioarchitecture*. 2013; 3(4): 86-109.
2. Valtorta F. and Leoni C. Molecular mechanisms of neurite extension. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1999; 354 (1381): 387-94.
3. Mukhin A.G., Ivanova S.A., Knoblach S.M. and Faden A.I. New in vitro model of traumatic neuronal injury: evaluation of secondary injury and glutamate receptor-mediated neurotoxicity. *J. Neurotrauma*. 1997; 14(9): 651-63.
4. Mukhin A.G., Ivanova S.A., Allen J.W. and Faden A.I. Mechanical injury to neuronal/glial cultures in microplates: Role of NMDA receptors and pH in secondary neuronal cell death. *J. Neurosci. Res.* 1998; 51(6): 748-58.
5. Cui X., Liu R., Liu Z., Shen X., Wang Q. and Tan X. Cationic Poly-L-Lysine-Fe₂O₃/SiO₂ nanoparticles loaded with small interference RNA: Application to silencing gene expression in primary rat neurons. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014; 14(4): 2810-5.
6. Payette D.J., Xie J., Shirwany N. and Guo Q. Exacerbation of Apoptosis of Cortical Neurons Following Traumatic Brain Injury in Par-4 Transgenic Mice. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2008; 1(1): 44-56.
7. Bingham D., John C.M., Panter S.S. and Jarvis G.A. Post-injury treatment with lipopolysaccharide or lipooligosaccharide protects rat neuronal and glial cell cultures. *Brain Res. Bull.* 2011; 85(6): 403-9.
8. Yu A.C., Lee Y.L. and Eng L.F. Astrogliosis 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.
9. Desclaux M., Teigell M., Amar L., Vogel R., Gimenez y Ribotta M., Privat A. et al. A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth in vitro. *PLoS One*. 2009; 4(7): e6227.
10. He Y., Li H.L., Xie W.Y., Yang C.Z., Yu A.C.H. and Wang Y. The presence of active Cdk5 associated with p35 in astrocytes and its important role in process elongation of scratched astrocyte. *Glia*. 2007; 55(6): 573-83.
11. Khodorov B.I., Storozhevych T.P., Surin A.M., Yuryavichyus A.I., Sorokina E.G., Borodin A.V. et al. The leading role of mitochondrial depolarization in the mechanism of glutamate-induced disruptions in Ca²⁺ homeostasis. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2002; 32(5): 541-7.
12. Khodorov B.I., Mikhailova M.M., Bolshakov A.P., Surin A.M., Sorokina E.G., Rozhnev S.A. et al. Dramatic effect of glycolysis inhibition on the cerebellar granule cells bioenergetics. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2012; 6(2): 186-97.
13. Surin A.M., Khiroug S., Gorbacheva L.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G. and Khiroug L. Comparative analysis of cytosolic and mitochondrial ATP synthesis in embryonic and postnatal hippocampal neuronal cultures. *Front. Mol. Neurosci.* 2013; 5: 1-15.
14. Dumollard R., Carroll J., Duchon M.R., Campbell K. and Swann K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2009; 20(3): 346-53.
15. Nicholls D.G. and Ward M.W. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: Mortality and millivolts. *Trends in Neurosciences*. 2000; 23(4): 166-74.
16. Duchon M.R., Surin A. and Jacobson J. Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods Enzymol.* 2003; 361: 353-89.
17. Surin A.M., Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Boyarkin D.P., Lisina O.Yu., Gorbacheva L.R. et al. Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons. *Biokhimiya*. 2017; 82(6): 970-984. (in Russian)
18. Gereencser A.A., Chinopoulos C., Birket M.J., Jastroch M., Vitelli C., Nicholls D.G. et al. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J. Physiol.* 2012; 590 (12): 2845-71.
19. Trendeleva T.A., Rogov A.G., Cherepanov D.A., Sukhanova E.I., Il'yasova T.M., Severina I.I. et al. Interaction of tetraphenylphosphonium and dodecyltriphenylphosphonium with lipid membranes and mitochondria. *Biochem.* 2012; 77(9): 1021-8.
20. Dragunow M. High-content analysis in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008; 9(10): 779-88.
21. Mattiazzi Usaj M., Styles E.B., Verster A.J., Friesen H., Boone C. and Andrews B.J. High-Content Screening for Quantitative Cell Biology. *Trends in Cell Biology*. 2016; 26(8): 598-611.
22. Daub A., Sharma P. and Finkbeiner S. High-content screening of primary neurons: ready for prime time. *Current Opinion in Neurobiology*. 2009; 19(5): 537-43.
23. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro. *Kletochnyye tekhnologii v biologii i meditsine*. 2014; 3: 161-9. (in Russian)
24. Kosheleva N.V., Saburina I.N., Zurina I.M., Gorkun A.A., Borzenok S.A., Nikishin D.A. et al. The technology of obtaining multipotent spheroids from limbal mesenchymal stromal cells for reparation of injured eye tissues. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(4): 160-7. (in Russian)
25. Thangnipon W., Kingsbury A., Webb M. and Balazs R. Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Dev. Brain Res.* 1983; 11(2): 177-89.
26. Gallo V., Kingsbury A., Balazs R. and Jorgensen O.S. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 1987; 7(7): 2203-13.
27. Budd S.L. and Nicholls D.G. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca²⁺ homeostasis. *J. Neurochem.* 1996; 66(1): 403-11.
28. Sasaki S., Warita H., Abe K. and Iwata M. Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol.* 2005; 110(1): 48-56.
29. Popov V., Medvedev N.I., Davies H.A. and Stewart M.G. Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: A three-dimensional ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* 2005; 492(1): 50-65.
30. Knoferle J., Ramljak S., Koch J.C., Tonges L., Asif A.R., Michel U. et al. TGF-β 1 enhances neurite outgrowth via regulation of proteasome function and EFABP. *Neurobiol. Dis.* 2010; 38(3): 395-404.
31. Tonges L., Planchamp V., Koch J.C., Herdegen T., Bahr M. and Lingor P. JNK isoforms differentially regulate neurite growth and regeneration in dopaminergic neurons in vitro. *J. Mol. Neurosci.* 2011; 45(2): 284-93.

Сведения об авторах:

Лисина Оксана Юрьевна, аспирант МИРЭА — Российского технологического университета, науч. сотр. НИИОПП;

Московцев Алексей Александрович, кан. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО;

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, науч. руководитель НИИ общей патологии и патофизиологии, зав. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО;

Сурина Александр Михайлович, доктор биол. наук, и. о. зав. лаб. нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга «НМИЦ здоровья детей», гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли НИИОПП, e-mail: surin_am@mail.ru