

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГЛЮКОЗНОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ НЕЙРОННОЙ СЕТИ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ГИППОКАМПА НА МУЛЬТИЭЛЕКТРОДНОЙ МАТРИЦЕ

УДК 576/.577:616.8.001.6

Поступила 14.12.2010 г.



М.В. Ведунова, к.б.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ НИИ ПФМ¹;

С.А. Коротченко, аспирант²;

А.Н. Балашова, студентка²;

А.О. Исакова, студентка¹;

Л.Г. Хаспеков, д.м.н., зав. лабораторией³;

В.Б. Казанцев, д.ф.-м.н., зав. лабораторией⁴;

И.В. Мухина, д.б.н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова, зав. ЦНИЛ НИИ ПФМ¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского —

Национальный исследовательский университет, Н. Новгород;

³Научный центр неврологии РАМН, Москва;

⁴Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород

Изучено влияние кратковременной глюкозной депривации на функционирование нейронной сети первичной культуры гиппокампа, развивающейся в течение 32 дней на мультиэлектродной матрице MED64 (ф. Alpha MED Sciences, Япония), в раннем и отдаленном периодах после депривации. Показано, что кратковременная глюкозная депривация (20 мин) повышает биоэлектрическую активность нейронной сети первичной культуры гиппокампа, запуская при этом каскад метаболических реакций, приводящих в дальнейшем к гибели части функционально активных нейронов. В отдаленном периоде происходит упрощение функциональной структуры нейронной сети при сохранении узловых управляющих единиц. Кратковременная глюкозная депривация создает эффект метаболического прекодиционирования, который в отдаленном периоде препятствует необратимым морфофункциональным повреждениям нейронной сети во время более длительной глюкозной депривации.

Ключевые слова: гиппокамп, диссоциированная культура, глюкозная депривация, прекодиционирование, мультиэлектродная матрица.

English

The effect of a short-term glucose deprivation on neuron net functioning of hippocampus primary culture on a multi-electrode matrix

M.V. Vedunova, PhD, Senior Research Worker, SRI CSRL of the APM¹;

S.A. Korotchenko, Postgraduate²;

A.N. Balashova, Student²;

A.O. Isakova, Student¹;

L.G. Khaspekov, D.Med.Sc., Head of the Laboratory³;

Для контактов: Ведунова Мария Валерьевна, тел. раб. 8(831)465-46-43, тел. моб. +7 915-937-55-55; e-mail: MVedunova@yandex.ru.

V.B. Kazantsev, D.Phys.-Math.Sc., Head of the Laboratory⁴;

I.V. Mukhina, D.Bio.Sc., Professor, Head of the N.Y. Belenkov Normal Physiology Department, Head of SRI CSRL of the APM¹

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, N. Novgorod;

²N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University — National Research University, N. Novgorod;

³Scientific Neurology Centre of RAMS, Moscow;

⁴Institute of Applied Physics of the RAS, N. Novgorod

There has been studied the effect of a short-term glucose deprivation on neuron net functioning of hippocampus primary culture developing within 32 days on a multi-electrode matrix MED64 (Alpha MED Sciences Company, Japan) in an early and remote periods after deprivation. A short-term glucose deprivation (20 min) has been shown to result in the increase of electrobiological activity of neuron net of hippocampus primary culture, with the cascade of metabolic reactions being activated leading to the death of functional neuron thereafter. In a remote period the simplification of a functional structure of neuron net occurs, with node control units being preserved. A short-term glucose deprivation creates an effect of metabolic preconditioning that in a remote period prevents a neuron net from permanent morphofunctional damages during the longer glucose deprivation.

Key words: hippocampus, dissociated culture, glucose deprivation, preconditioning, multi-electrode matrix.

Изучение механизмов нейропротекции к повреждающим факторам ишемии/реперфузии является важной проблемой не только современной неврологии, но и нейробиологии в целом. Среди различных методов нейропротекции выделяют фармакологические методы и preconditioning.

Preconditioning является эффективным способом повышения резистентности клеток к ишемическому/реперфузионному повреждению. Данный феномен был описан впервые в 1986 г. А. Schurr с соавт. для ткани мозга [1], С.Е. Murry с соавт. — для ткани сердца [2]. Для preconditioning, эффект которого сохранялся в течение 2—3 дней, использовался кратковременный период аноксии. Механизм preconditioning остается неясным до сих пор, хотя литературные данные свидетельствуют о вовлечении в него мембраносвязанных рецепторов, внутриклеточных киназ, ионных каналов, в частности митохондриального K_{ATP} -канала, стресс-белков, свободных радикалов кислорода и различных форм NO-синтазы [3—5].

Последние исследования показали, что не только ишемическое, но и химическое/метаболическое preconditioning может являться защитным фактором и повышать толерантность тканей к повреждениям при ишемии/реперфузии [6, 7]. Так, кратковременная глюкозная депривация (ГД) — 3, 6 и 9 ч — может выступать в качестве preconditioning и защищать клетки коры головного мозга от повреждающих факторов, действующих во время длительной ишемии головного мозга, таких как гипоксия, перекисное окисление липидов, дефицит энергетических субстратов [8]. В числе возможных протекторных механизмов следует отметить сохранение уровня митохондриального мембранного потенциала, уменьшение продукции свободных радикалов при одновременном повышении содержания глутатиона, снижение концентрации внутриклеточного кальция. В результате метаболического preconditioning выживаемость нейронов коры в течение суток при воздействии в последующем кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности или оксидативного стресса увеличивается по сравнению с контролем (33%) почти в три раза (81%).

Несмотря на известные положительные результаты метаболического preconditioning в короткие сроки наблюдения (до трех дней), последствия ГД в отдаленном периоде не выяснены.

Цель исследования — изучение влияния кратковременной глюкозной депривации на функционирование нейронной сети первичной культуры гиппокампа в раннем и отдаленном периодах после воздействия.

Материалы и методы. Использованы первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов белых беспородных мышей линии СВА. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации» и были согласованы с Этическим комитетом при НижГМА. Диссоцирование клеток достигалось путем обработки ткани гиппокампа 0,25% трипсином. Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде Neurobasal™ (ф. Invitrogen, США) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (ф. Invitrogen, США), глутамином (ф. Invitrogen, США), эмбриональной телячьей сывороткой (ф. ПанЭко, Москва) и культивировали, согласно разработанному протоколу [9], на мультиэлектродной матрице системы MED64 (ф. Alpha MED Sciences, Япония) в течение 32 дней *in vitro* (DIV). Предварительно матрицу стерилизовали УФ-облучением и обрабатывали полиэтиленгликолем, служившим опорным субстратом для культивируемых клеток. Исходная плотность культуры на матрице составляла 2000 кл./мм². Жизнеспособность культур поддерживалась в CO₂-инкубаторе при температуре 35,5°C, в газовой смеси, содержащей 95% воздуха и 5% CO₂. Для количественной обработки и анализа полученных данных использовался набор программного обеспечения Conductor™ (ф. Alpha MED Sciences, Япония), а также пакет прикладных программ Matlab.

Метаболические показатели (содержание глюкозы, лактата, общего белка) определялись в культуральной среде с помощью диагностических наборов Vital Diagnostic, содержание окислительно-модифицированных белков исследовалось по методу Е.Е. Дубининой [10].

Кратковременную ГД (20 мин) проводили на 12-й день культивирования путем полной замены культуральной среды на раствор Рингера без глюкозы. Для поддержания осмолярности раствора использовали сахарозу. После окончания ГД раствор Рингера заменили на культуральную питательную среду с глюкозой. Контролем служили культуры, в которых среду заменяли на раствор Рингера, содержащий глюкозу.

Параметры, характеризующие ответную реакцию первичной культуры гиппокампа на ГД, регистрировали через 30 и 60 мин, на 1-е и 6-е сутки после ГД. На 6-е сутки проводили повторную, более длительную (в течение 120 мин) ГД с дальнейшим восстановлением исходного состава культуральной среды и регистрацией функциональной активности в течение последующих 16 сут.

Результаты исследования статистически обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Micro-

soft Excel и Biostat. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Установлено, что кратковременная ГД вызывает усиление биоэлектрической активности нейронов (рис. 1). Паттерн спонтанной активности, регистрируемый мультиэлектродной матрицей, изменялся за счет увеличения количества сетевых пачек в минуту и сокращения их длительности. Количество спайков в пачке оставалось неизменным. После ГД в сети сохранялся высокий уровень активности, обусловленный главным образом повышением количества спайков в пачке. Через 3 сут высокий уровень активности также сохранялся, количество сетевых, более продолжительных пачек было больше, чем в контроле, хотя число спайков в пачке не отличалось от исходного (рис. 2).

Таким образом, 20-минутное снижение доставки глюкозы как энергетического субстрата оказывало

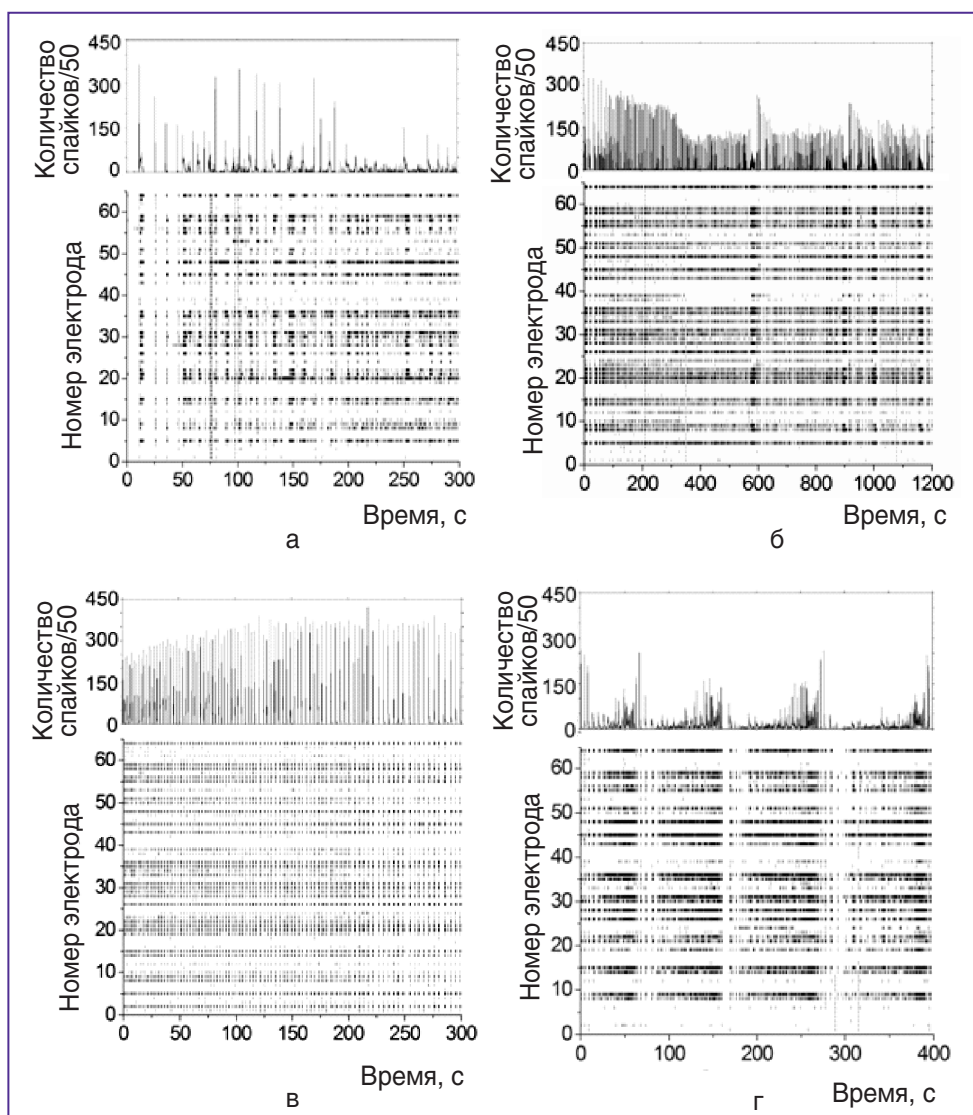


Рис. 1. Растровые диаграммы спонтанной активности нейронной сети первичной культуры гиппокампа (нижние графики) и количество спайков за 50 мс (верхние графики), 12 DIV: а — до ГД; б — через 20 мин ГД;

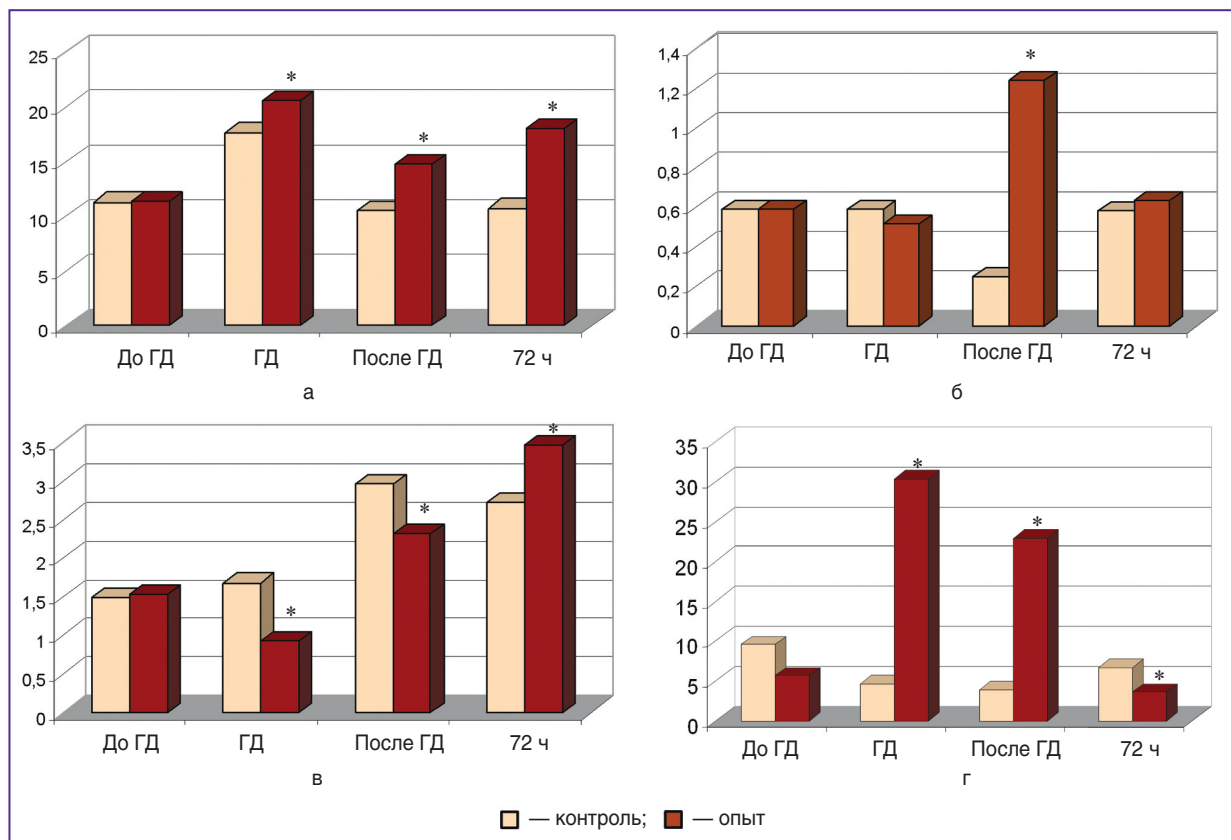


Рис. 2. Динамика изменения спонтанной электрической активности первичной культуры гиппокампа при воздействии кратковременной ГД (20 мин): а — количество сетевых пачек импульсов в минуту; б — количество внеклеточных потенциалов (спайков) в сетевой пачке; в — продолжительность пачек; г — длительность межпачечного интервала. Здесь «После ГД» — через 30 мин после окончания ГД, «72 ч» — через 72 ч после окончания ГД. * — статистическая значимость различий с контролем, $p < 0,05$

возбуждающее действие на нейронную сеть, изменяя паттерн ее активности.

Современные представления о работе клеток головного мозга основываются на том, что недостаток глюкозы приводит к нарушению процессов передачи и получения сигналов сразу после истощения запасов внутриклеточного АТФ. Считается, что запасов гликогена как внутреннего источника глюкозы, которые составляют примерно 1% от общего пула гликогена, хватает лишь на 5—7 мин активной работы мозга. Однако нами не зафиксировано снижения биоэлектрической активности на протяжении 20 мин полной ГД. Повышенная активность и изменение паттерна сетевой пачки обусловлены, вероятно, усиленным высвобождением возбуждающего нейротрансмиттера глутамата из пресинаптических терминалей пирамидных нейронов в составе сети первичной культуры гиппокампа. Усиление высвобождения глутамата может происходить вследствие стимуляции экзоцитоза повышенной концентрацией внутриклеточного кальция $[Ca^{2+}]_i$ в пресинаптических терминалях в результате выброса из внутриклеточных депо, в частности из митохондрий. Известно, что ГД приводит к падению мембранного потенциала митохондрий за счет ингибирования K_{ATP} -каналов и, как следствие, к снижению аккумулирующей способности митохондрий и усилению выброса Ca^{2+} в цитоплазму [11]. Сохранение повышенной биоэлектрической активности

в течение 3 сут после ГД свидетельствовало, вероятно, о продолжающейся гиперактивации глутаматных рецепторов. Известно, что данный механизм может являться критическим фактором развития эксайтотоксичности, опосредуемой повышением уровня внутриклеточного кальция и запуском каскада патологических реакций, приводящих к гибели нейронов [12].

О запуске этого каскада свидетельствовали изменения уровней лактата и окислительно-модифицированных белков (см. таблицу) в культуральной среде. Так, в 1-е сутки после ГД выделение лактата в среду снижалось по сравнению с контролем в 2 раза на фоне незначительного повышения потребления глюкозы клетками, что могло быть обусловлено продолжающимся субстратным дефицитом и нарушением сбалансированного пути обмена субстратами между астроцитами и нейронами [13].

При исследовании окислительной модификации белков обнаружено достоверное увеличение количества 2,4-динитрофенилгидрозонов, регистрируемых на длинах волн 363 и 370 нм, что говорит об активации процессов свободно-радикального окисления белков вследствие окислительного стресса, развивающегося после 20-минутной ГД. Обнаружена обратная корреляционная зависимость между количеством продуктов окислительной модификации белков и концентрацией лактата в среде культивирования ($r = -0,589$). Таким образом,

Концентрация глюкозы, лактата и содержание продуктов окислительной модификации белков через сутки после 20-минутной ГД

Серии	Продукты окислительной модификации белков, усл. ед.		Концентрация лактата, ммоль/л	Концентрация глюкозы, ммоль/л
	$\lambda=363$ нм	$\lambda=370$ нм		
Контроль	92,58±28,15	152,74±38,43	12,50±1,36	19,50±1,01
ГД	290,38±45,32*	299,96±52,28*	5,46±0,34*	16,50±1,34*

* — различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$.

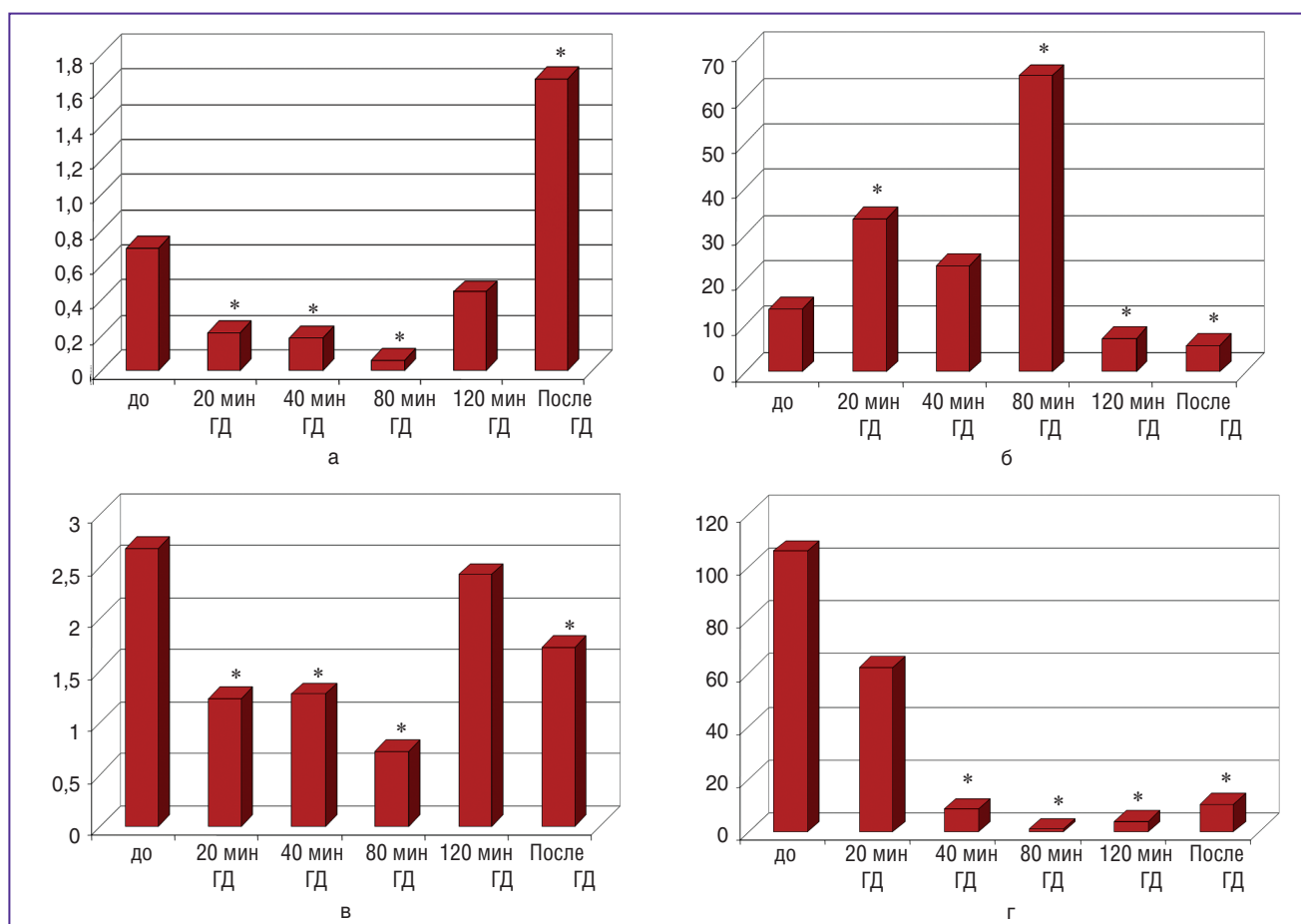


Рис. 3. Динамика изменения спонтанной активности первичной культуры гиппокампа в условиях долговременной ГД (120 мин): а — среднее количество пачек импульсов в минуту; б — среднее количество спайков в пачке; в — средняя продолжительность пачек; г — длительность межпачечного интервала. «После ГД» — через 30 мин после окончания ГД. * — статистическая значимость различий с исходным уровнем, $p < 0,05$

процесс восстановления метаболической активности клеток после ГД обратно пропорционален количеству белков, подверженных окислительной деструкции.

Активация свободно-радикального окисления в условиях достаточного поступления кислорода может быть следствием как нарушения процессов дыхания в митохондриях, так и чрезмерного накопления свободного кальция в цитоплазме нейронов и глии [14]. Процесс субстратного голодания в условиях адекватного кислородного снабжения связан, как правило, с нарушением окислительного фосфорилирования и истощением запасов НАДН⁺ и НАДФН⁺, которые являются необходимыми коферментами для работы ферментных (в том числе антиоксидантных) систем.

Через 6 сут основные биоэлектрические показатели активности нейронной сети оставались в пределах исходных значений, за исключением длительности сетевых пачек. Более длительные пачки можно объяснить усложнением паттерна активности в связи с показанной ранее продолжающейся дифференцировкой нейронов и синаптических межнейронных связей в сети в процессе культивирования [9].

Повторная, более длительная (120 мин) ГД через 6 сут выявила практически те же закономерности изменения пачечной активности, что и 20-минутная ГД (рис. 3).

Количество сетевых пачек в минуту повышалось последовательно до 80-й минуты ГД в 6 раз при укор-

чении длительности пачек. Однако количество импульсов в пачке снижалось, тогда как изменения данного показателя при первом эпизоде кратковременной ГД отсутствовали.

К 120-й минуте ГД количество пачек, их длительность и число спайков в пачке возвращались к исходным значениям. Замена раствора на питательную среду, так же, как и при кратковременной ГД, вызывала повышение числа спайков в сетевой пачке.

Таким образом, более длительная повторная ГД обеспечивала усиление биоэлектрической активности нейронной сети со сходной динамикой параметров сетевой активности во время первого кратковременного воздействия ГД, что свидетельствовало, вероятно, о сохранении основных структурно-функциональных единиц сети нейронов после эпизодов дефицита глюкозы.

Для доказательства данного предположения были изучены корреляционные связи между импульсами в сетевой пачке, отражающие функциональные взаимосвязи между нейронами в сети, с использованием нового метода анализа многоканальных импульсных последовательностей, генерируемых нейросетями с априорно неизвестной топологией связей. Метод основан на построении направленного корреляционного графа, описывающего повторяющиеся пространственно-временные импульсные последовательности (рис. 4). Вершинами графа являются элементы сети (нейроны), задействованные в генерации наблюдаемого паттерна активности. Ребра графа отображают активные межэлементные связи с определенной временной задержкой, априорно неизвестной и детектируемой по пикам локальной кросс-корреляционной функции. Наличие статистически достоверных связей определяется по

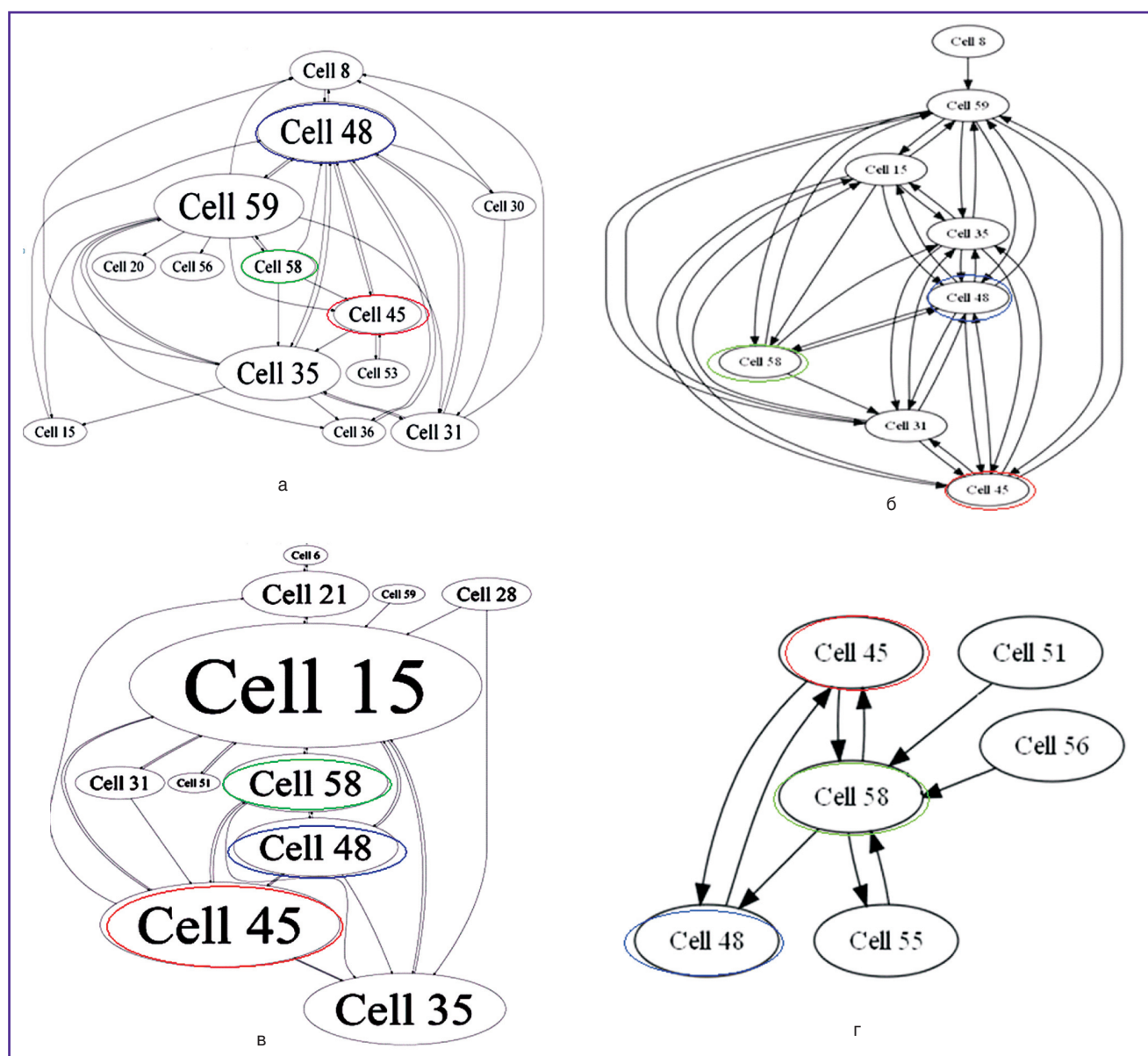


Рис. 4. Графическое отображение корреляционной взаимосвязи нейронов в сети гиппокампа: а — контроль; б — после кратковременной ГД; в — через 72 ч после кратковременной ГД; г — после долговременной ГД

возможности существования для каждого из событий сигнала-источника на определенной задержке. Пороговое значение этой возможности рассчитывается как вероятность случайных совпадений из анализа суррогатных данных. Корреляционные графы позволяют определить характерные особенности функциональной архитектуры исследуемых сетей, включая: 1) ключевые элементы, «распределители» (англ. *hubs*) активности; 2) замкнутые циклы передачи возбуждения в сети и 3) характерные временные масштабы пространственно-временных паттернов активности.

Изучение внутренней структуры пачки спайков в общем паттерне активности нейронной сети с помощью метода корреляционных графов выявило значительное упрощение структуры взаимосвязей между клетками при сохранении основных центральных нейронов-распределителей, которые поддерживали общесетевую функциональную морфологию сети.

Вероятно, наиболее слабые звенья нейронной сети при недостатке доступных субстратов окисления в условиях ГД элиминировали, в то время как наиболее устойчивые к стрессу нейроны продолжали активно функционировать и поддерживать структуру сети за счет пластических перестроек.

Морфологическое исследование культур клеток гиппокампа показало, что на 3—6-е сутки после и кратковременной, и долговременной ГД количество погибших нейронов возрастает. В контроле число таких клеток составило 0,7% от их общего числа, в то время как в культурах, подвергнутых кратковременной ГД, — 4%. Увеличение количества погибших клеток после долговременной ГД, по сравнению с кратковременной, статистически не значимо ($p > 0,05$) и составляет в среднем 6% от общего числа клеток.

Заключение. Кратковременная глюкозная депривация повышает биоэлектрическую активность нейронной сети первичной культуры гиппокампа, запуская при этом каскад метаболических реакций, приводящих в дальнейшем к гибели части функционально активных нейронов. Патологические реакции в нейронной сети развиваются на протяжении 6 сут после глюкозной депривации и приводят к упрощению ее функциональной структуры при сохранении узловых управляющих единиц.

Методами корреляционного анализа показано, что глюкозная депривация вызывает снижение количества функциональных взаимосвязей между нейронами, что может быть причиной нарушения когнитивных функций мозга *in vivo* при изменении метаболизма глюкозы в условиях ее недостаточной доставки к клеткам. Кратковременная глюкозная депривация нейронной сети создает эффект метаболического прекондicionирования, которое в отдаленном периоде препятствует необратимым морфофункциональным повреждениям нейронов во время более длительной глюкозной депривации.

Работа поддержана грантами РФФИ (09-04-12254, 09-04-12304-офи-м, 09-04-97090-офи-м, 08-04-12213-

офи) и аналитической ведомственной целевой программой Министерства образования и науки РФ 2.1.1/6223.

Литература

1. Schurr A., Reid K.H., Tseng M.T., West C., Rigor B.M. Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Res* 1986; 374: 244—248.
2. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124—1136.
3. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000; 87: 972—983.
4. Busija D.W., Lacza Z., Rajapakse N., Shimizu K., Kis B., Bari F., Domoki F., Horiguchi T. Targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels — a novel approach to neuroprotection. *Brain Res Rev* 2004; 46: 282—294.
5. Hausenloy D., Wynne A., Duchon M., Yellon D. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates pre-conditioning-induced protection. *Circulation* 2004; 109: 1714—1717.
6. Horiguchi T., Kis B., Rajapakse N., Shimizu K., Busija D.W. Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels is a trigger of 3-nitropropionic acid-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2003; 34: 1015—1020.
7. Kis B., Rajapakse N.C., Snipes J.A., Nagy K., Horiguchi T., Busija D.W. Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons. *J Neurochem* 2003; 87: 969—980.
8. Gaspar T., Kis B., Snipes J.A., Lenzser G., Mayanagi K., Bari F., Busija D.W. Transient glucose and amino acid deprivation induces delayed preconditioning in cultured rat cortical neurons. *J Neurochem* 2006; 98: 555—565.
9. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г., Захаров Ю.Н., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., Корягина Е.А. Мультиэлектродные матрицы — новые возможности в исследовании пластичности нейронной сети. *Соврем технол мед* 2009; 1: 8—15.
10. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопросы медицинской химии* 1995; 41(1): 24—26.
11. Kahlert S., Zundorf G., Reiser G. Glutamate-mediated influx of extracellular Ca^{2+} is coupled with reactive oxygen species generation in cultured hippocampal neurons but not in astrocytes. *J Neurosci Res* 2005; 79: 262—271.
12. Stelmashook E.V., Lozier E.R., Goryacheva E.S., Mergenthaler P., Novikova S.V., Zorov D.B., Isaev N.K. Glutamine-mediated protection from neuronal cell death depends on mitochondrial activity. *Neurosci Letters* 2010; 482(2): 151—155.
13. Simpson A., Carruthers A., Vannucci S. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Cereb Blood Flow Meta* 2007; 27(11): 1766—1791.
14. Qi J., Hong Z., Xin H., Zhu Y.Z. Neuroprotective effects of leonurine on ischemia/reperfusion-induced mitochondrial dysfunctions in rat cerebral cortex. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(12): 1958—1964.