

Динамика морфофункционального развития нейронной сети в диссоциированной культуре клеток коры головного мозга крысы

Е.Е. Генрихс¹, О.П. Александрова¹, Е.В. Стельмашук¹, С.В. Новикова¹, Д.Н. Воронков¹, Н.К. Исаев^{1,2}, Л.Г. Хаспеков¹

¹ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия;

²ФГБОУ «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Введение. Исследование морфофункционального развития нейронов в диссоциированной культуре клеток головного мозга с использованием современных клеточных технологий является актуальной задачей экспериментальной неврологии, решение которой необходимо для успешного моделирования *in vitro* острых и хронических форм церебральной патологии.

Цель работы — морфофункциональное исследование *in vitro* динамики дифференцировки нейронов коры головного мозга крыс с использованием комплекса методов иммуноцитохимического, флуоресцентного и электрофизиологического анализа.

Материалы и методы. Исследована степень дифференцировки культур на 3–4-е и 10–11-е сутки культивирования *in vitro*, определяемая по интенсивности экспрессии белка PSA-NCAM и уровню кальциевой перегрузки нейронов под влиянием глутамата, в сопоставлении с показателями функциональной активности нейронной сети, культивированной на мультиэлектродной матрице, и их изменениями при гиперстимуляции глутаматных рецепторов.

Результаты. Для зрелых нейронов (10–11 сут культивирования) характерны значительное повышение концентрации внутриклеточного кальция, вызываемое глутаматом, отсутствие в них околядерных скоплений PSA-NCAM, обнаруживаемых лишь в незрелых клетках (3–4 сут культивирования), торможение глутаматом пачечной активности нейронной сети, сформированной к 10–11-м суткам *in vitro*, при отсутствии его влияния на генерацию одиночных потенциалов действия. В то же время экзогенный селективный агонист одного из подтипов глутаматных рецепторов — каинат полностью блокировал спонтанную активность зрелых нейронов.

Заключение. К 10–11-м суткам культивирования *in vitro* нейроны новой коры крыс достигают уровня дифференцировки, необходимого для моделирования церебральных патологических состояний. К этому сроку процесс нарушения функционирования нейронной сети, сформированной на мультиэлектродной матрице, при гиперактивации глутаматных рецепторов носит многоуровневый характер: при эксайтотоксическом повреждении под влиянием глутамата избирательно нарушается пачечная активность нейронов, а при более выраженной цитотоксичности, вызываемой каинатом, спонтанная биоэлектрическая активность блокируется полностью.

Ключевые слова: культивированные нейроны, белок PSA-NCAM, глутаматные рецепторы, внутриклеточная концентрация кальция, мультиэлектродная система, спонтанная биоэлектрическая активность.

Адрес для корреспонденции: 105064, Москва, пер. Обуха, д. 5, стр. 2, ФГБНУ НЦН. E-mail: khaspekleon@mail.ru. Хаспеков Л.Г.

Для цитирования: Генрихс Е.Е., Александрова О.П., Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Воронков Д.Н., Исаев Н.К., Хаспеков Л.Г. Динамика морфофункционального развития нейронной сети в диссоциированной культуре клеток коры головного мозга крысы. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2019; 13(4): 38–45.

DOI: 10.25692/ACEN.2019.4.6

Changes in the morphofunctional development of the neuronal network in a dissociated cell culture of rat cerebral cortical neurons

Elizaveta E. Genrikhs¹, Olga P. Aleksandrova¹, Elena V. Stelmashuk¹, Svetlana V. Novikova¹,
Dmitriy N. Voronkov¹, Nikolay K. Isaev^{1,2}, Leonid G. Khaspekov¹

¹Research Center of Neurology, Moscow, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Introduction. Study of the morphofunctional neuronal development in a dissociated cerebrocortical cell culture, using modern cell technologies, is a priority in experimental neurology, which is required for successful *in vitro* modelling of acute and chronic forms of cerebral pathology.

Study aim. A morphofunctional study of the *in vitro* changes in neuronal differentiation of rat cerebral cortical neurons, using a range of analysis methods, including immunohistochemistry, fluorescence, and electrophysiology.

Materials and methods. We investigated the degree of culture differentiation on day 3–4 and day 10–11 of *in vitro* cultivation, measured by the intensity of the PSA-NCAM protein expression and the level of neuronal glutamate-induced calcium overload. That was then compared with the functional activity of the neuronal network cultivated on a microelectrode array, and with changes of the neuronal network's activity in response to glutamate receptor overstimulation.

Results. A significant glutamate-induced increase of the intracellular calcium concentration was typical for mature neurons (day 10–11 of cultivation), along with a lack of PSA-NCAM paranuclear accumulation, which was only found in immature cells (day 3–4 of cultivation). There was a glutamate suppression of the neuronal network burst activity, formed *in vitro* by day 10–11, with had no effect on the generation of single action potentials. At the same time, kainate, the exogenous selective agonist of the one of the glutamate subtypes, completely blocked spontaneous activity of the mature neurons.

Conclusion. Neocortical rat neurons reach the differentiation level necessary for the modelling of the cerebral pathologies by day 10–11 of *in vitro* cultivation. At this point, the process of disruption of the microelectrode array cultivated neuronal network by the glutamate receptor overactivation, has become multilayered: excitotoxic glutamate-induced damage produces selective disruption of neuronal burst activity, and with the greater cytotoxicity caused by kainate, spontaneous bioelectrical activity is completely blocked.

Keywords: cultivated neurons, PSA-NCAM protein, glutamate receptors, intracellular calcium concentration, multielectrode system, spontaneous bioelectrical activity.

For correspondence: 105064, Russia, Moscow, Obukha per., 5, build. 2. Research Center of Neurology. E-mail: khaspekleon@mail.ru. Khaspekov L.G.

For citation: Genrikhs E.E., Aleksandrova O.P., Stelmashuk E.V., Novikova S.V., Voronkov D.N., Isaev N.K., Khaspekov L.G. [Changes in the morphofunctional development of the neuronal network in a dissociated cell culture of rat cerebral cortical neurons]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2019; 13(4): 38–45. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2019.4.6

Введение

Гиперактивация глутаматных рецепторов (ГР) играет чрезвычайно важную роль в развитии таких патологических состояний головного мозга, как гипоксия/ишемия, черепно-мозговая травма, хронические нейродегенеративные заболевания и др. Для моделирования этих состояний *in vitro* широко используются культуры клеток и ткани новой коры, содержащей нейроны с высокой плотностью ГР, эффект гиперактивации которых зависит от степени дифференцировки нейронов. Так, при гипоксии/ишемии мозга новорожденных крыс апоптотическая гибель нейронов происходит при участии апоптозиндуцирующего фактора, тогда как у взрослых животных она развивается по пути, опосредуемому активацией каспаз [1]. Незрелые нейроны *in vitro* более чувствительны к ацидозу и действию стрептозотина, тогда как зрелые — к гиперстимуляции ионотропных ГР [2, 3]. Поскольку эмбриональные клетки новой коры, помещаемые в условия культивирования на стадии нейробластов, проходят основные этапы дифференцировки *in vitro*, необходима детальная характеристика этого процесса, позволяющая сопоставить результаты, полученные на моделях *in vivo* и *in vitro*, и осуществить адекватное моделирование церебральной патологии, для чего требуется достаточно высокий уровень дифференцировки культивируемых нейронов. Определить его позволяют иммуоцитохимическое выявление белкового маркера незрелых нейронов (PSA-NCAM) [4], степень повышения внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) под влиянием глутамата [5] и результаты исследования динамики спонтанной биоэлектрической активности нейронной сети, которая формируется клетками новой коры, культивируемыми в мультиэлектродной матрице (МЭМ) [6, 7].

Целью работы было исследование *in vitro* уровня дифференцировки нейронов коры головного мозга крыс, определяемого по интенсивности экспрессии белка PSA-NCAM и степени кальциевой перегрузки клеток под влиянием глутамата, в сопоставлении с показателями функциональной активности нейронной сети и их изменениями при гиперстимуляции ГР.

тамата, в сопоставлении с показателями функциональной активности нейронной сети и их изменениями при гиперстимуляции ГР.

Материалы и методы

Получение первичных диссоциированных культур клеток коры головного мозга крыс

Работа выполнена на первичных культурах клеток, полученных методом ферментно-механической диссоциации ткани коры полушарий мозга 17–18-дневных эмбрионов крыс Вистар [8]. Обращение и экспериментальные процедуры с животными выполнялись в соответствии с директивами Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований. Экспериментальные протоколы были одобрены этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 2-5/16). Производили дислокацию позвонков шейного отдела наркотизированных эфиром беременных крыс, операционное поле обрабатывали 2% раствором йода, стерильными инструментами (хирургический пинцет и ножницы) срезали кожу с живота, вскрывали брюшину, аккуратно иссекали рога матки с эмбрионами и переносили их в стерильную чашку Петри (диаметр 90 мм). Извлеченных из матки животного 17–18-суточных эмбрионов промывали стерильным буферным раствором (PBS, pH 7,4, «Invitrogen»), декапитуировали. Под бинокулярной лупой при помощи стерильных микропинцетов снимали кожу, раздвигали в стороны от центра кости черепной коробки и извлекали головной мозг. Выделенный мозг помещали в свежую порцию бессывороточной среды и с помощью пинцетов сначала удаляли оболочку, а затем выделяли полушария мозга.

Кору отделяли пинцетами от остальной ткани мозга, отсекая гиппокамп. Для приготовления культур выделенную измельченную кору инкубировали 15 мин при 37°C в растворе 0,05% трипсина и 0,02% ЭДТА («Invitrogen»), триж-

ды промывали PBS pH 7,4 и диссоциировали механически многократным пипетированием в среде для культивирования [9]. После осаждения центрифугированием клетки ресуспендировали в питательной среде, содержащей 90% минимальной среды Игла на солях Эрла, 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин и 10 мМ буфера HEPES, pH 7,2–7,4. Количество клеток в 1 мл суспензии подсчитывали на автоматическом счетчике клеток («Invitrogen»).

В экспериментах по определению выживаемости культур использовали 96-луночные планшеты («Costar»), покрытые водным раствором полиэтиленimina («Sigma») в концентрации 0,5 мг/мл, в каждую лунку которых вносили по 100 мкл суспензии, содержащей 2×10^6 клеток/мл. Для иммуноцитохимического анализа такой же объем суспензии наносили на покровные стекла, помещенные в чашки Петри (40 мм), а для определения внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) использовали конфокальные чашки со стеклянным дном («MakTekcorporation»), покрытые полиэтилениминим, в которые также вносили 100 мкл суспензии. Через 1 ч в чашки добавляли по 1 мл питательной среды. Суспензию клеток помещали на МЭМ, покрытые водным раствором полиэтиленimina («Sigma») в концентрации 0,5 мг/мл. На каждую матрицу наносили по 30 мкл суспензии, содержащей 10×10^6 клеток/мл, а после их адгезии к поверхности матрицы добавляли 1 мл питательной среды [10].

Матрицы, планшеты, покровные стекла и конфокальные чашки помещали в CO_2 -инкубатор («Nuair», 5% CO_2 , 95% воздуха) при 36,5°C и относительной влажности 98%. Прижизненное наблюдение проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии, используя инвертированный микроскоп «Olympus SKX41». Во избежание глиоза для подавления пролиферации глиальных клеток к культурам на 5–7-е сутки культивирования добавляли арабинозинмоноцитозид (0,1 мкМ).

Регистрация биоэлектрической активности с помощью МЭМ

МЭМ представляет собой чашку со стеклянным дном на пластиковой подложке (рис. 1, А). Зона с электродами окружена стеклянным кольцом диаметром 24 мм и высотой 6 мм. В центр стеклянного основания матрицы смонтировано 60 круглых микроэлектродов (59 регистрирующих и один электрод сравнения, рис. 1, В) диаметром 30 мкм. Изменения электрического поля регистрируются электродами МЭМ в виде внеклеточного импульса (потенциала действия, ПД, рис. 1, С, D).

Спонтанную активность нейронной сети на МЭМ регистрировали в течение 5 мин в мультиэлектродной системе «MEA2100-System» («Multi Channel Systems», Германия) ежедневно с 1-х по 11-е сутки культивирования *in vitro*, а при выполнении экспериментов по гиперстимуляции ГР — предварительно, сразу после добавления агонистов, через 1 ч и 24 ч. Для анализа полученных данных использовали программу «MC-Rack» («Multi Channel Systems»), которая позволяет визуализировать временное распределение ПД на каждом регистрирующем электроде (рис. 1, D) и автоматически выдает массив цифровых значений, включающий такие параметры, как количество и частота ПД, процент ПД, входящих в пачку, и др. [10]. За пачечную активность нейронной сети принимали последовательность из как минимум 5–6 импульсов со сравнительно коротким ин-

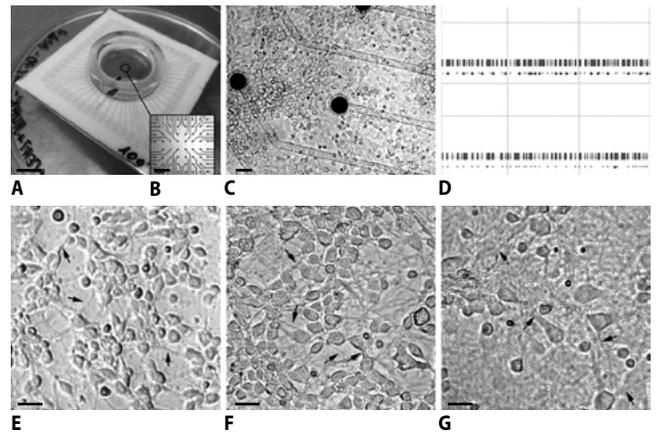


Рис. 1. Использование МЭМ в исследованиях на диссоциированных культурах коры головного мозга 17–18-дневных эмбрионов крысы. А — внешний вид МЭМ; В — электроды МЭМ под микроскопом при малом увеличении ($\times 4$); С — зрелая культура коры головного мозга крысы на электродах МЭМ; D — последовательности зарегистрированных за 5 мин 2 электродами ПД и пачечной активности культуры клеток коры на 10-е сутки культивирования *in vitro*, где вертикальный штрих — ПД, точки под группой штрихов — обозначение пачки. E, F, G — развитие диссоциированной культуры: светлое поле, 1, 4 и 10 сут культивирования *in vitro* соответственно. Стрелки — отростки клеток. Масштабный отрезок: 10 мм (А), 500 мкм (В), 20 мкм (С, E–G)

Fig. 1. The use of a multi-electrode system in studies on dissociated cortical cultures of 17–18-day-old rat embryos.

A — external view of the multi-electrode array (MEA); B — MEA-electrodes under the microscope at low magnification ($\times 4$); C — mature rat cortical culture on MEA-electrodes; D — action potential and burst activity sequences of the cortical cell culture, recorded over 5 minutes by 2 electrodes on day 10 of the *in vitro* cultivation, where the vertical line is the action potential and the dots above a group of the lines indicate the burst. E, F, G — dissociated culture development: light field, day 1, 4 and 10 of *in vitro* cultivation, respectively. Arrows — cell processes. Scale bar: 10 mm (A), 500 μ (B), 20 μ (C, E–G)

тервалом следования (до 50 мс). Цифровые значения параметров, полученных из программы, обрабатывали статистически и представляли в виде диаграмм.

Токсическое воздействие на культуры агонистами ГР

Гиперактивацию ГР инициировали добавлением на 24 ч в питательную среду их агонистов — глутамата или каинамата до конечной концентрации 0,5 мМ на 3-и и 10-е сутки. Оценку выживаемости нейронов проводили по метаболизму клетками тетразолиевого красителя (МТТ-тест, «Sigma») [11]. Оптическую плотность в контрольных культурах принимали за 100%, выживаемость экспериментальных культур выражали в процентах относительно контроля.

Иммуноцитохимическое исследование

Культуры фиксировали 24 ч в нейтральном 4% формалине. Экспрессию и локализацию кислого глиофибрилярного белка (GFAP) оценивали при помощи поликлональных кроличьих антител («Sigma»), а маркеров незрелых нейронов (PSA-NCAM и DCX) — при помощи моноклональных мышиных антител («Invitrogen») [12]. Для выявления связанных первичных антител использовали, соответственно, антитела козы к иммуноглобулину кролика, меченные флуорохромом CF488 («Sigma»), и ослиные антитела против антител мыши, конъюгированные с CF555 или CF488 («Sigma»). Ядра клеток окрашивали DAPI. Окрашивание выполняли по протоколам производителей реактивов.

Препараты заключали в среду FluoroShield («Sigma») и исследовали под флуоресцентным микроскопом («Nikon Eclipse»).

Определение $[Ca^{2+}]_i$

Клетки нагружали 0,005 мМ Fluo-4 AM («Molecular Probes») в течение 30 мин при $36,5 \pm 0,5^\circ C$ с последующей трехкратной промывкой сбалансированным солевым раствором, содержащим (в мМ): NaCl (154), KCl (5), $CaCl_2$ (2,3), $MgCl_2$ (1), $NaHCO_3$ (3,6), Na_2HPO_4 (0,35), глюкоза (5,6), HEPES (10), pH 7,3. Для визуализации клеток использовали инвертированный конфокальный микроскоп «Olympus IX71» с объективом $\times 40$. Флуоресценцию Fluo-4 возбуждали синим лазером «OBIS» с длиной волны 488 нм, управляемым программой «Coherent Connection 3», эмиссию регистрировали при 530 нм цифровой камерой PPS-GF40. Серию изображений получали в автоматическом режиме с интервалом 30 с. Через 4,5 мин от начала записи добавляли глутамат и продолжали фиксировать изображения в течение следующих 10 мин. Измерение интенсивности флуоресценции в отдельных клетках ($n=12$) проводили на каждом кадре серии изображений в программе «ImageJ» [13, 14].

Статистический анализ

В экспериментах по выживаемости использовано по 9 независимых культур на точку, иммуноцитохимия выполнена на шести 4-дневных и шести 10-дневных культурах из 2 независимых экспериментов, измерение $[Ca^{2+}]_i$ проведено в 12 клетках на точку из 4 экспериментов, развитие активности и действие глутамата и контроля к нему изучено на 10 МЭМ, каината — на 3 МЭМ, причем на каждой не менее 10 электродов регистрировали спонтанную биоэлектрическую активность.

Распределение значений переменных носило нормальный характер. Для статистического анализа использовали тест ANOVA с поправкой Dunnett и двухсторонний *t*-тест. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее с ошибкой среднего ($M \pm SEM$).

Результаты

Полученные после диссоциации клетки коры головного мозга крыс имели округлую форму и в течение часа прикреплялись к субстрату, после чего начинался рост отростков, которые к 3–4-м суткам культивирования формировали связи с соседними клетками и их отростками. Сформированная сеть в дальнейшем уплотнялась, достигая более высокой степени развития, однако на 10-е сутки культивирования морфологически незначительно отличалась от 4-дневных культур (рис. 1, E–G). Следовательно, морфологическая сформированность нейронной сети диссоциированной культуры является необходимым, но не достаточным признаком зрелости культуры.

В культурах иммуноцитохимически выявляли нейрональный белок клеточной адгезии (PSA-NCAM), который относится к иммуноглобулиновому суперсемейству и является маркером незрелых нейронов. Заметной динамики экспрессии этого белка на разных сроках культивирования не наблюдалось, но его локализация и степень конгломерации изменялись. Если в 3–4-суточных культурах крупные скопления PSA-NCAM выявлялись в области ядер клеток,

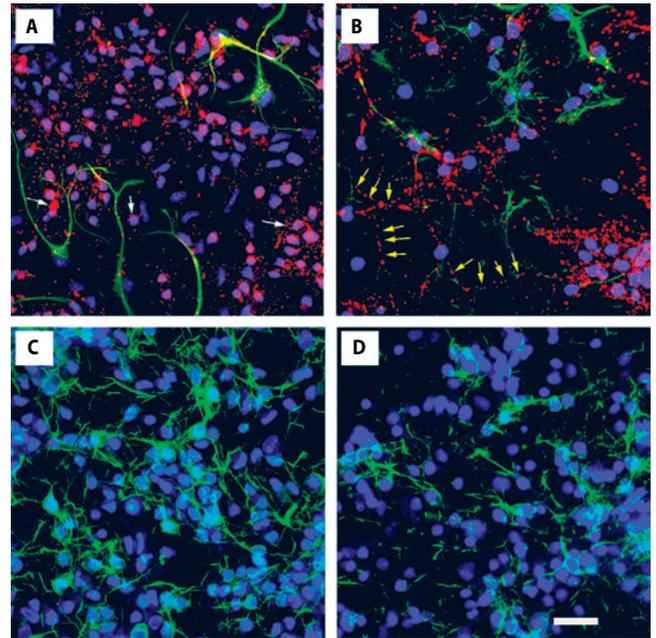


Рис. 2. Иммуноцитохимическое определение степени дифференцировки культивированных нейронов коры головного мозга крыс по уровню экспрессии белка PSA-NCAM (A, B) и даблкортина (C, D). A, C — 4-е сутки культивирования; B, D — 10-е. Синим цветом окрашены ядра клеток (DAPI), зеленым — GFAP, красным — маркер незрелых нейронов белок PSA-NCAM. Белые стрелки на A — перинуклеарная локализация метки, желтые стрелки на B — локализация метки в отростках. Масштабный отрезок — 25 мкм

Fig. 2. Immunohistochemical analysis of the degree of differentiation of the cultivated rat cerebral cortical neurons based on the level of PSA-NCAM (A, B) and doublecortin (C, D) expression. A, C — day 4 of cultivation; B, D — day 10. Cell nuclei are stained with blue (DAPI), glial fibrillary acidic protein (GFAP) is stained with green, and the immature neuron marker PSA-NCAM is stained in red. White arrows on A — perinuclear marker location, yellow arrows on B — marker location in the processes. Scale bar — 25 μ

то в 10-суточных этот белок в виде мелких гранул локализовался преимущественно на отростках. Колокализации PSA-NCAM с GFAP-окрашенными астроцитами не обнаруживалось (рис. 2, A, B). При окрашивании на даблкортин (DCX — другой маркерный белок незрелых нейронов) DCX-позитивные клетки обнаруживались на обоих сроках культивирования, однако экспрессия DCX была визуально ниже в 10-дневных культурах (рис 2, C, D). Несмотря на демонстративность иммуноцитохимического метода определения зрелости культуры, он также не дает однозначного результата и не является параметром, достаточным для полной характеристики нейронной сети.

Определение чувствительности нейронов к действию глутамата (0,5 мМ) по изменению $[Ca^{2+}]_i$, регистрируемой с помощью специфического флуоресцентного зонда Fluo-4, показало более значительное усиление флуоресценции под влиянием нейромедиатора в 10-суточных культурах по сравнению с 3–4-суточными (рис. 3).

При культивировании на МЭМ к 4-м суткам на большинстве электродов регистрировалась спонтанная биоэлектрическая активность нейронов, в основном в виде одиночных ПД, которая становилась почти в 3 раза интенсивнее к 10-м суткам ($p < 0,05$; $n=13$). К этому сроку около $38 \pm 6\%$ ПД группировались в пачки, генерация которых прекращалась в первые 5 мин после воздействия 0,5 мМ глутамата и не возобновля-

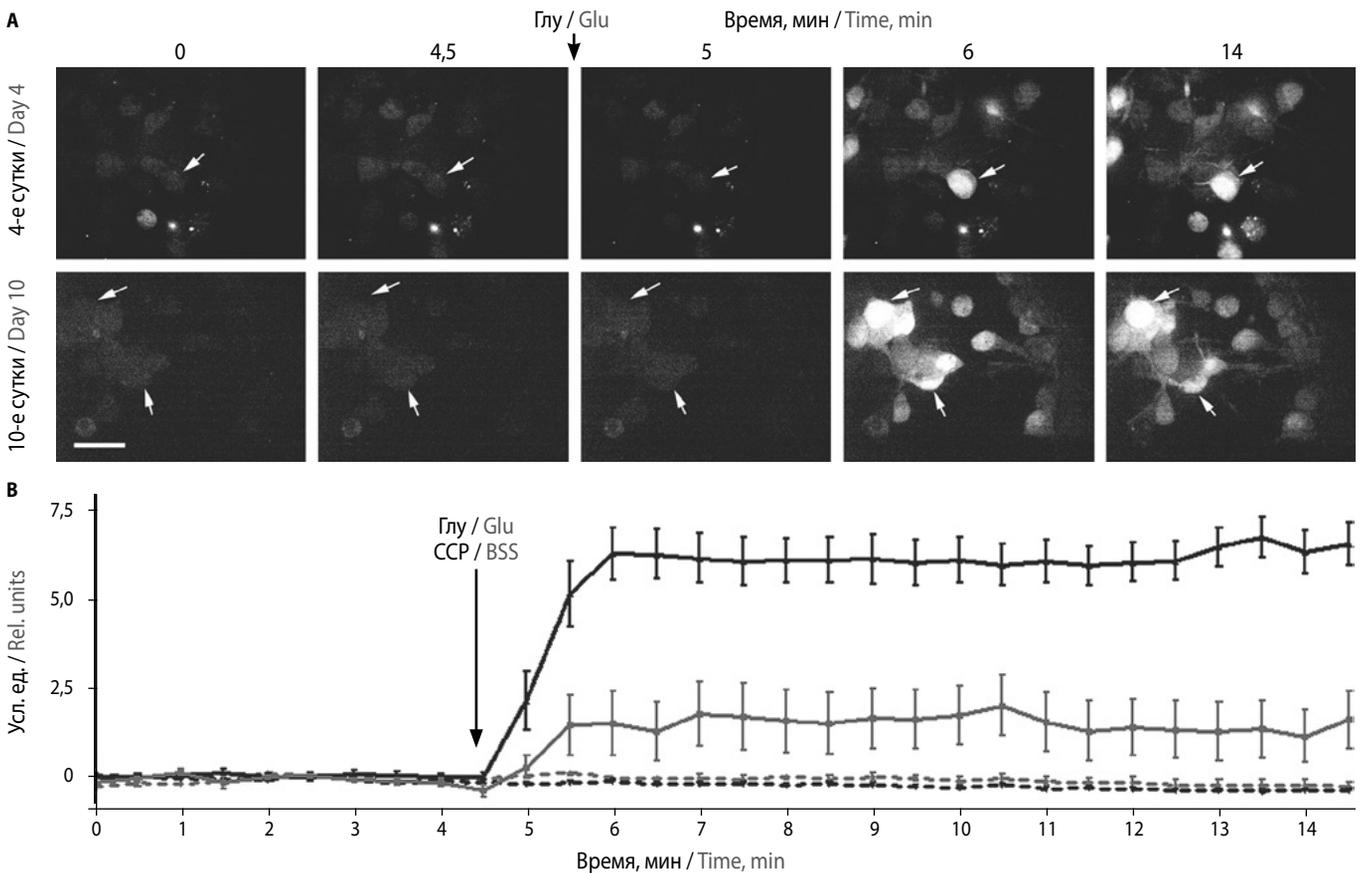


Рис. 3. Действие глутамата (0,5 мМ) на изменения $[Ca^{2+}]_i$, регистрируемой по интенсивности флюоресценции Fluo-4, в 4- и 10-суточных культурах коры головного мозга крыс.

A — несколько кадров из серии фотографий, полученных с помощью конфокального микроскопа, одного и того же поля зрения в 4-суточных (верхний ряд) и 10-суточных (нижний ряд) культурах. Белые стрелки указывают на одну и ту же клетку. Масштабный отрезок 30 мкм. Момент добавления глутамата (Глу) указан стрелкой. B — изменение интенсивности флюоресценции отдельных нейронов через каждые 30 с. Черная кривая — при добавлении 0,5 мМ глутамата (Глу) к 10-суточным культурам ($n=12$), серая — к 4-суточным культурам ($n=12$). Черная и серая пунктирные кривые — при добавлении сбалансированного солевого раствора (ССР) к 10-и 4-суточным культурам соответственно (для каждой $n=12$)

Fig. 3. Glutamate activity (0.5 mM) in response to changes in the intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), based on Fluo-4 fluorescence intensity in 4-day and 10-day rat cerebral cortex cultures.

A — several images from a series of photographs obtained using a confocal microscope with the same field of view in 4-day (top row) and 10-day (bottom row) cultures. The white arrows indicate the same cell. Scale bar 30 μ . The moment of glutamate (Glu) addition is shown with a black arrow above the photographs. B — changes in the fluorescence intensity of individual neurons, shown in 30 second intervals. Black curve — the addition of 0.5 mM of glutamate (Glu) to 10-day cultures ($n=12$), gray curve — to 4-day cultures ($n=12$). Black and gray dashed curves — the addition of a balanced salt solution (BSS) to 10-day and 4-day cultures, respectively ($n=12$ for each one). The moment of glutamate or BSS addition is marked with a red arrow

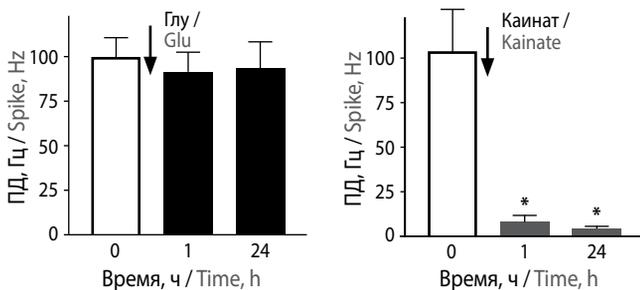


Рис. 4. Изменение спонтанной биоэлектрической активности нейронов под влиянием глутамата (Глу, 0,5 мМ; А) и каината (0,5 мМ; В) в диссоциированной культуре клеток коры головного мозга крысы на 10-е сутки культивирования в МЭМ.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Fig. 4. Measurement of spontaneous bioelectrical neuronal activity caused by glutamate (Glu, 0.5 mM; A) and kainate (0.5 mM; B) in a dissociated cell culture of rat cerebral cortical neurons on day 10 of cultivation on the MEM. * $p < 0.05$ compared with control

лась ни через 1, ни через 24 ч. При этом характер следования одиночных ПД не изменялся как через 5 мин, так и через 1–24 ч после экспозиции глутамата (рис. 4, А), тогда как каинат в концентрации 0,5 мМ в те же сроки *in vitro* в первые 5 мин ингибировал не только сетевую пачечную активность, но и генерацию одиночных ПД, которая не восстанавливалась ни через 1, ни через 24 ч (рис. 4, В).

Оценка выживаемости нейронов (МТТ-тест) на 11-е сутки показала, что через 24 ч после добавления в среду 0,5 мМ глутамата в культурах коры головного мозга крыс выживает $86 \pm 4\%$ клеток ($n=20$), а при добавлении каината — $69 \pm 4\%$ клеток ($n=8$) ($p < 0,05$).

Обсуждение

Существующие в настоящее время методики культивирования различных структур мозга различаются по сложности выполнения, а также по составу и стоимости используемых

сред. С начала 1980-х гг. для исследования морфофункционального развития и моделирования повреждений нейронов головного мозга использовались первичные диссоциированные нейроглиальные культуры клеток и органотипические культуры ткани новой коры [15–19]. Преимущество органотипических тканевых культур (эксплантатов) перед монослойными культурами заключается в сохранности межнейронных связей и биоэлектрической активности нативных нейронных сетей [20]. Однако прижизненная морфологическая оценка эксплантатов затруднена, тогда как живые монослойные клеточные культуры легко доступны для визуального исследования. В процессе культивирования в них активно формируются межнейронные связи [21] и функциональная активность, регистрируемая по изменению $[Ca^{2+}]_i$ или методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) [22, 23]. Кроме того, использование МЭМ [24] позволяет длительно и неинвазивно изучать динамику спонтанной биоэлектрической активности нейронов, представленную в виде одиночных ПД и/или сетевой пачечной активности, т.е. определенной последовательности нескольких ПД, регистрируемых одновременно несколькими электродами [25].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что с 3–4-х по 10–11-е сутки культивирования происходит процесс активной дифференцировки культур. На это указывает формирование связей между соседними клетками, исчезновение из тел нейронов в зрелых (10–11 сут) культурах белка клеточной адгезии из суперсемейства иммуноглобулинов (PSA-NCAM), который, будучи маркером незрелых нейронов *in vivo* и *in vitro* [26, 27], обнаруживался в них на 3–4-е сутки. Кроме того, у нейронов в 10-суточных культурах повышение $[Ca^{2+}]_i$ при действии глутамата было выражено намного сильнее, чем в 3–4-суточных. Наряду с этим спонтанная биоэлектрическая активность нейронов к 10–11-м суткам значительно усложнялась, приобретая характер последовательных высокочастотных ПД, организованных в виде пачек, чередующихся с интервалами, во время которых обнаруживались одиночные ПД. Эти результаты согласуются с данными литературы, показавшими прогрессивное усиление сетевой активности в виде пачек ПД, формирующихся с 5-х по 12-е сутки развития в культуре клеток коры головного мозга на МЭМ [28, 29].

Одним из основных показателей нейробиохимической зрелости глутаматцептивных нейронов является их чувствитель-

ность к действию агонистов ГР [30]. В наших опытах на ее увеличение в 10-суточной культуре указывает быстрое и необратимое прекращение под влиянием глутамата пачечной активности, сопровождающееся гибелью до 15% нейронов, что свидетельствует о нарушении сформировавшейся системы синаптической передачи возбуждения в нейронной сети и может быть одним из механизмов повреждения головного мозга в патологических условиях, даже при сохранности исходного уровня генерации отдельных ПД. С другой стороны, более выраженное цитотоксическое воздействие каината (гибель свыше 30% нейронов) прямо коррелировало с более глубоким ингибированием спонтанной биоэлектрической активности. Такие различия в цитотоксических эффектах глутамата и каината могут быть обусловлены тем, что первый является эндогенным агонистом ГР и может захватываться нервными и глиальными клетками, вовлекаясь в нормальный метаболизм, а второй, агонист каинатного подтипа ГР, не являющийся естественным метаболитом в нервной ткани, не метаболизируется клетками и поэтому оказывает более выраженный цитотоксический эффект.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что к 10–11-м суткам культивирования нейроны новой коры эмбрионов крыс достигают высокой степени дифференцировки, которая необходима для моделирования патологических состояний головного мозга и отличается исчезновением в телах нейронов специфического маркера незрелых клеток (PSA-NCAM), более выраженной кальциевой перегрузкой нейронов под воздействием глутамата и более высоким уровнем их сетевой спонтанной биоэлектрической активности. Такую культуру можно использовать как высокочувствительную тест-систему для токсикологических и фармакологических исследований. Кроме того, на основании полученных данных можно предположить, что процесс нарушения нормального функционирования сформированной нейронной сети при гиперактивации ГР носит многоуровневый характер, когда при менее значительном эксайтотоксическом повреждении нейронов нарушается только пачечная активность, а при более выраженном спонтанная биоэлектрическая активность необратимо прекращается.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare that there is no conflict of interest.**

Список литературы

1. Zhu C., Qiu L., Wang X. et al. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 2003; 86: 306–317. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01832.x. PMID: 12871572.
2. Стельмашук Е.В., Беляева Е.А., Исаев Н.К. Влияние ацидоза, окислительного стресса и глутаматной токсичности на жизнеспособность клеток-зерен в зрелых и незрелых клеточных культурах. *Нейрохимия* 2006; 23: 131–135. DOI: 10.1134/S1819712407010084.
3. Han Y., Zhu H., Zhao Y. et al. The effect of acute glutamate treatment on the functional connectivity and network topology of cortical cultures. *Med Eng Phys* 2019; 71: 91–97. DOI: 10.1016/j.medengphys.2019.07.007. PMID: 31311692.
4. Westphal N., Loers G., Lutz D. et al. Generation and intracellular trafficking of a polysialic acid-carrying fragment of the neural cell adhesion molecule NCAM to the cell nucleus. *Sci Rep* 2017; 7: 8622. DOI: 10.1038/s41598-017-09468-8. PMID: 28819302.
5. Nicholls D.G., Brand M.D., Gerencser A.A. Mitochondrial bioenergetics and neuronal survival modelled in primary neuronal culture and isolated nerve terminals. *J Neurosci Res* 2007; 85: 3206–3212. DOI: 10.1007/s10863-014-9573-9. PMID: 25172197.
6. Keller J.M., Frega M. Past, present, and future of neuronal models *in vitro*. *Adv Neurobiol* 2019; 22: 3–17. DOI: 10.1007/978-3-030-11135-9_1. PMID: 31073930.

References

1. Zhu C., Qiu L., Wang X. et al. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 2003; 86: 306–317. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01832.x. PMID: 12871572.
2. Stelmashuk E.V., Belyaeva E.A., Isaev N.K. Effect of acidosis, oxidative stress, and glutamate toxicity on the survival of mature and immature cultured cerebellar granule cells. *Neurochem J* 2007; 1: 66–69. DOI: 10.1134/S1819712407010084.
3. Han Y., Zhu H., Zhao Y. et al. The effect of acute glutamate treatment on the functional connectivity and network topology of cortical cultures. *Med Eng Phys* 2019; 71: 91–97. DOI: 10.1016/j.medengphys.2019.07.007. PMID: 31311692.
4. Westphal N., Loers G., Lutz D. et al. Generation and intracellular trafficking of a polysialic acid-carrying fragment of the neural cell adhesion molecule NCAM to the cell nucleus. *Sci Rep* 2017; 7: 8622. DOI: 10.1038/s41598-017-09468-8. PMID: 28819302.
5. Nicholls D.G., Brand M.D., Gerencser A.A. Mitochondrial bioenergetics and neuronal survival modelled in primary neuronal culture and isolated nerve terminals. *J Neurosci Res* 2007; 85: 3206–3212. DOI: 10.1007/s10863-014-9573-9. PMID: 25172197.
6. Keller J.M., Frega M. Past, present, and future of neuronal models *in vitro*. *Adv Neurobiol* 2019; 22: 3–17. DOI: 10.1007/978-3-030-11135-9_1. PMID: 31073930.

7. Мухина И.В., Хаспеков Л.Г. Новые технологии в экспериментальной нейробиологии: нейронные сети на мультиэлектродной матрице. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2010; 4(2): 44–51.
8. Hilgenberg L.G., Smith M.A. Preparation of dissociated mouse cortical neuron cultures. *J Vis Exp* 2007; (10): 562. DOI: 10.3791/562. PMID: 18989405.
9. Лоzier Е.Р., Джанибекова А.И., Стельмашук Е.В. и др. Глюкозная депривация потенцирует токсичность уабаина и глутамата в кортикальных нейронах различных сроков культивирования. *Нейрохимия* 2009; 26: 232–236. DOI: 10.1134/S1819712409030088.
10. Kapkaeva M.R., Popova O.V., Kondratenko R.V. et al. Effects of copper on viability and functional properties of hippocampal neurons *in vitro*. *Exp Toxicol Pathol* 2017; 69: 259–264. DOI: 10.1016/j.etp.2017.01.011. PMID: 28189473.
11. Isaev N.K., Stelmashook E.V., Ruscher K. et al. Menadione reduces rotenone-induced cell death in cerebellar granule neurons. *Neuroreport* 2004; 15: 2227–2231. DOI: 10.1097/00001756-200410050-00017. PMID: 15371739.
12. Воронков Д.Н., Ставровская А.В., Стельмашук Е.В. и др. Нейродегенеративные изменения в головном мозге крыс при моделировании болезни Альцгеймера введением стрептозотцина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2018; 166(12): 762–766. DOI: 10.1007/s10517-019-04442-y. PMID: 31028587.
13. Gee K.R., Brown K.A., Chen W.N. et al. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium* 2000; 27(2): 97–106. DOI: 10.1054/ceca.1999.0095. PMID: 10756976.
14. Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Амелкина Г.А. и др. Ацидоз и 5-(N-этил-N-изопропил)амилорид (EIPA) снижают цинк/каинатную токсичность в культурах зернистых нейронов мозжечка крыс. *Биохимия* 2015; 80(8): 1282–1288. DOI: 10.1134/S000629791508012X. PMID: 26547075.
15. Dichter M.A. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res* 1978; 149: 279–293. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90476-6. PMID: 27283.
16. Goldberg M.P., Choi D.W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 1993; 13: 3510–3524. PMID: 8101871.
17. Dawson V.L., Kizushi V.M., Huang P.L. et al. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 1996; 16: 2479–2487. PMID: 8786424.
18. Voigt T., Baier H., Dolabela de Lima A. Synchronization of neuronal activity promotes survival of individual rat neocortical neurons in early development. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 990–999. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01449.x. PMID: 9182951.
19. Shirakawa H., Katsuki H., Kume T. et al. Aminoglutethimide prevents excitotoxic and ischemic injuries in cortical neurons. *Br J Pharmacol* 2006; 147(7): 729–736. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706636. PMID: 16474421.
20. Johnson H.A., Buonomano D.V. Development and plasticity of spontaneous activity and Up states in cortical organotypic slices. *J Neurosci* 2007; 27(22): 5915–5925. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0447-07.2007. PMID: 17537962.
21. van Huizen F., Romijn H.J., Habets A.M., van den Hooff P. Accelerated neural network formation in rat cerebral cortex cultures chronically disinhibited with picrotoxin. *Exp Neurol* 1987; 97: 280–288. DOI: 10.1016/0014-4886(87)90089-6. PMID: 3609212.
22. Tojima T., Ito E. Bimodal effects of acetylcholine on synchronized calcium oscillation in rat cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 2000; 287: 179–182. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)01149-6. PMID: 10863024.
23. Schonfeld-Dado E., Fishbein I., Segal M. Degeneration of cultured cortical neurons following prolonged inactivation: molecular mechanisms. *J Neurochem* 2009; 110: 1203–1213. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06204.x. PMID: 19508430.
24. Tateno T., Jimbo Y., Robinson H.P. Spatio-temporal cholinergic modulation in cultured networks of rat cortical neurons: spontaneous activity. *Neuroscience* 2005; 134: 425–437. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.04.049. PMID: 15993003.
25. Charlesworth P., Cotterill E., Morton A. et al. Quantitative differences in developmental profiles of spontaneous activity in cortical and hippocampal cultures. *Neural Dev* 2015; 10: 1–10. DOI: 10.1186/s13064-014-0028-0. PMID: 25626996.
26. Rubio A., Belles M., Belenguer G. et al. Characterization and isolation of immature neurons of the adult mouse piriform cortex. *Dev Neurobiol* 2016; 76: 748–763. DOI: 10.1002/dneu.22357. PMID: 26487449.
27. Isaev N.K., Genrikhs E.E., Voronkov D.N. et al. Streptozotocin toxicity *in vitro* depends on maturity of neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2018; 340: 99–104. DOI: 10.1016/j.taap.2018.04.024. PMID: 29684395.
28. Martinoia S., Bonzano L., Chiappalone M. et al. *In vitro* cortical neuronal networks as a new high-sensitive system for biosensing applications. *Biosens Bioelectron* 2005; 20(10): 2071–2078. DOI: 10.1016/j.bios.2004.09.012. PMID: 15741077.
29. Cotterill E., Hall D., Wallace K. et al. Characterization of early cortical neural network development in multiwell microelectrode array plates. *J Biomol Screen* 2016; 21: 510–519. DOI: 10.1177/1087057116640520. PMID: 27028607.
30. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Arch* 2010; 460: 525–542. DOI: 10.1007/s00424-010-0809-1. PMID: 20229265.
7. Mukhina I.V., Khaspekov L.G. [New technologies in experimental neurobiology: neuronal networks on multielectrode array]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2010; 4(2): 44–51. (In Russ.)
8. Hilgenberg L.G., Smith M.A. Preparation of dissociated mouse cortical neuron cultures. *J Vis Exp* 2007; (10): 562. DOI: 10.3791/562. PMID: 18989405.
9. Lozier E.R., Dzhanibekova A.I., Stelmashuk E.V. et al. Glucose deprivation potentiates toxicity of ouabain and glutamate in cortical neurons cultured for different time periods. *Neurochem J* 2009; 3: 202–206. DOI: 10.1134/S1819712409030088.
10. Kapkaeva M.R., Popova O.V., Kondratenko R.V. et al. Effects of copper on viability and functional properties of hippocampal neurons *in vitro*. *Exp Toxicol Pathol* 2017; 69: 259–264. DOI: 10.1016/j.etp.2017.01.011. PMID: 28189473.
11. Isaev N.K., Stelmashook E.V., Ruscher K. et al. Menadione reduces rotenone-induced cell death in cerebellar granule neurons. *Neuroreport* 2004; 15: 2227–2231. DOI: 10.1097/00001756-200410050-00017. PMID: 15371739.
12. Voronkov D.N., Stavrovskaya A.V., Stelmashook E.V. et al. Neurodegenerative changes in rat brain in streptozotocin model of Alzheimer's disease. *Bull Exp Biol Med* 2019; 166: 793–796. DOI: 10.1007/s10517-019-04442-y. PMID: 31028587.
13. Gee K.R., Brown K.A., Chen W.N. et al. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium* 2000; 27(2): 97–106. DOI: 10.1054/ceca.1999.0095. PMID: 10756976.
14. Stelmashuk E.V., Novikova S.V., Amel'kina G.A. et al. The mechanism of the neurocytotoxic effect of the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) in the rat cerebellum culture neuronal granule neurons. *Neurochem J* 2014; 8: 121–124.
15. Dichter M.A. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res* 1978; 149: 279–293. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90476-6. PMID: 27283.
16. Goldberg M.P., Choi D.W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 1993; 13: 3510–3524. PMID: 8101871.
17. Dawson V.L., Kizushi V.M., Huang P.L. et al. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 1996; 16: 2479–2487. PMID: 8786424.
18. Voigt T., Baier H., Dolabela de Lima A. Synchronization of neuronal activity promotes survival of individual rat neocortical neurons in early development. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 990–999. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01449.x. PMID: 9182951.
19. Shirakawa H., Katsuki H., Kume T. et al. Aminoglutethimide prevents excitotoxic and ischemic injuries in cortical neurons. *Br J Pharmacol* 2006; 147(7): 729–736. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706636. PMID: 16474421.
20. Johnson H.A., Buonomano D.V. Development and plasticity of spontaneous activity and Up states in cortical organotypic slices. *J Neurosci* 2007; 27(22): 5915–5925. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0447-07.2007. PMID: 17537962.
21. van Huizen F., Romijn H.J., Habets A.M., van den Hooff P. Accelerated neural network formation in rat cerebral cortex cultures chronically disinhibited with picrotoxin. *Exp Neurol* 1987; 97: 280–288. DOI: 10.1016/0014-4886(87)90089-6. PMID: 3609212.
22. Tojima T., Ito E. Bimodal effects of acetylcholine on synchronized calcium oscillation in rat cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 2000; 287: 179–182. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)01149-6. PMID: 10863024.
23. Schonfeld-Dado E., Fishbein I., Segal M. Degeneration of cultured cortical neurons following prolonged inactivation: molecular mechanisms. *J Neurochem* 2009; 110: 1203–1213. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06204.x. PMID: 19508430.
24. Tateno T., Jimbo Y., Robinson H.P. Spatio-temporal cholinergic modulation in cultured networks of rat cortical neurons: spontaneous activity. *Neuroscience* 2005; 134: 425–437. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.04.049. PMID: 15993003.
25. Charlesworth P., Cotterill E., Morton A. et al. Quantitative differences in developmental profiles of spontaneous activity in cortical and hippocampal cultures. *Neural Dev* 2015; 10: 1–10. DOI: 10.1186/s13064-014-0028-0. PMID: 25626996.
26. Rubio A., Belles M., Belenguer G. et al. Characterization and isolation of immature neurons of the adult mouse piriform cortex. *Dev Neurobiol* 2016; 76: 748–763. DOI: 10.1002/dneu.22357. PMID: 26487449.
27. Isaev N.K., Genrikhs E.E., Voronkov D.N. et al. Streptozotocin toxicity *in vitro* depends on maturity of neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2018; 340: 99–104. DOI: 10.1016/j.taap.2018.04.024. PMID: 29684395.
28. Martinoia S., Bonzano L., Chiappalone M. et al. *In vitro* cortical neuronal networks as a new high-sensitive system for biosensing applications. *Biosens Bioelectron* 2005; 20(10): 2071–2078. DOI: 10.1016/j.bios.2004.09.012. PMID: 15741077.
29. Cotterill E., Hall D., Wallace K. et al. Characterization of early cortical neural network development in multiwell microelectrode array plates. *J Biomol Screen* 2016; 21: 510–519. DOI: 10.1177/1087057116640520. PMID: 27028607.
30. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Arch* 2010; 460: 525–542. DOI: 10.1007/s00424-010-0809-1. PMID: 20229265.

Поступила 17.07.2019
Принята в печать 11.10.2019

Received 17.07.2019
Accepted 11.10.2019

Информация об авторах: Генрихс Елизавета Евгеньевна – к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальной нейроцитологии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;
Александрова Ольга Петровна – к.б.н., н.с. лаб. экспериментальной нейроцитологии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;
Стельмашук Елена Викторовна – д.б.н., в.н.с. лаб. экспериментальной нейроцитологии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;
Новикова Светлана Викторовна – м.н.с. лаб. экспериментальной нейроцитологии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;
Воронков Дмитрий Николаевич – к.б.н., с.н.с. лаб. функциональной морфохимии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;
Исаев Николай Константинович – д.б.н., в.н.с. лаб. экспериментальной нейроцитологии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия; доцент каф. клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
Хаспеков Леонид Георгиевич – д.б.н., зав. лабораторией Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия.

Information about the authors: Elizaveta E. Genrikhs, PhD (Boil.), senior researcher, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia;
Olga P. Aleksandrova, PhD (Boil.), researcher, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia;
Elena V. Stelmashuk – D. Sci (Biol.), leading researcher, Department of Brain Research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia;
Svetlana V. Novikova – junior researcher, Department of Brain Research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia;
Dmitriy N. Voronkov – PhD (Boil.), senior researcher, Department of Brain Research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia;
Nikolay K. Isaev, D. Sci (Biol), leading researcher, Department of Brain Research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, and Department of Cell Biology and Histology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;
Leonid G. Khaspekov – D. Sci (Biol.), Head of Laboratory of Experimental Neurocytology, Department of Brain Research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia.