

РОЛЬ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ В КАЛЬЦИЕВОЙ АКТИВНОСТИ АСТРОЦИТОВ ГИППОКАМПА КРЫС РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

УДК 535.33+57.086.8:611.813.14:599.323.4

Поступила 30.04.2015 г.



А.В. Лебедева, младший научный сотрудник Нижегородского нейронаучного центра Института биологии и биомедицины;

Ю.В. Дембицкая, младший научный сотрудник Нижегородского нейронаучного центра Института биологии и биомедицины;

А.С. Пимашкин, к.ф.-м.н., ассистент кафедры нейродинамики и нейробиологии Института биологии и биомедицины;

З.Д. Журавлева, аспирант кафедры нейродинамики и нейробиологии Института биологии и биомедицины;

Е.А. Шишкова, студент кафедры нейродинамики и нейробиологии Института биологии и биомедицины;

А.В. Семьянов, д.б.н., директор Института биологии и биомедицины

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

Цель исследования — изучить функциональную активность астроглии в срезах гиппокампа крыс разного постнатального развития при моделировании метаболических изменений мозга.

Материалы и методы. Исследования проводили на переживающих срезах гиппокампа крыс линии Wistar трех возрастных групп: 5–10 дней, 10–20 дней и более 20 дней постнатального развития животного с использованием метода функционального кальциевого имиджинга.

Результаты. Установлено, что на ранних стадиях развития для нормальной кальциевой активности астроглии необходимо наличие специфических энергетических субстратов. Изменение метаболического состояния мозга при понижении температурного уровня не оказывает значительного влияния на кальциевую активность астроцитов во всех исследуемых периодах постнатального развития.

Заключение. Исследование кальциевой динамики астроцитов в разные периоды постнатального развития может служить методом оценки функциональной активности глиальных систем при моделировании метаболических нарушений мозга.

Ключевые слова: астроцит; кальциевые ответы астроцитов; специфические энергетические субстраты.

English

The Role of Energy Substrates in Astrocyte Calcium Activity of Rat Hippocampus in Early Postnatal Ontogenesis

A.V. Lebedeva, Junior Researcher, Nizhny Novgorod Neuroscience Center, Institute of Biology and Biomedicine;

Y.V. Dembitskaya, Junior Researcher, Nizhny Novgorod Neuroscience Center, Institute of Biology and Biomedicine;

A.S. Pimashkin, PhD, Assistant, Department of Neurodynamics and Neurobiology, Institute of Biology and Biomedicine;

Z.D. Zhuravleva, PhD Student, Department of Neurodynamics and Neurobiology, Institute of Biology and Biomedicine;

E.A. Shishkova, Student, Department of Neurodynamics and Neurobiology, Institute of Biology and Biomedicine;

A.V. Semyanov, DSc, Director, Institute of Biology and Biomedicine

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

The aim of the investigation was to study the astroglia functional activity in hippocampal slices of the rat at different postnatal development stages by modeling metabolic changes in the brain.

Materials and Methods. The study was carried out on hippocampal slices of Wistar rats of three age groups: postnatal days 5–10, 10–20, and more than 20 days of animal postnatal development using a functional calcium imaging method.

Results. In early developmental stages, normal astroglial calcium activity was found to require additional energy substrates. Changing the brain metabolic state at low temperature had no significant effect on astrocyte calcium activity in all postnatal periods under study.

Conclusion. The study of astrocyte calcium dynamics in different periods of postnatal development can be used as a method to assess functional activity of glial systems when modeling brain metabolic disorders.

Key words: astrocyte; calcium responses; specific energy substrates.

Для контактов: Лебедева Альбина Владимировна, e-mail: lebedeva@neuro.nnov.ru

Астроглия — самый многочисленный тип глиальных клеток — выполняет ряд важных функций в мозге. Астроциты участвуют в буферизации ионов калия, регулируют локальный кровоток, вызывая при этом вазоконстрикцию или вазодилатацию, в них экспрессируются трофические факторы, влияющие на рост нейронов и формирование новых синапсов. Важную роль астроциты играют в питании нейронов, поставляя им глюкозу и другие вещества, которые могут служить энергетическими субстратами для нейронов [1]. Они также служат основным депо гликогена в мозге [2].

Астроциты являются электрически неактивными клетками, но имеют свою сигнальную систему, представленную генерацией кальциевых ответов, длительность которых может составлять несколько секунд [3]. Недавние исследования [4] показали, что астроциты играют немаловажную роль и в формировании памяти посредством поставки лактата к нейронам. При активной работе нейронов и при некоторых патологиях нервной системы в астроцитах интенсивно происходит синтез лактата, который служит источником энергии для нейронов. Поскольку нейрональная активность зависит от доступности энергетических субстратов, этот процесс также может рассматриваться как механизм регуляции астроцитами функционирования нейронов [5].

Лактат и пируват являются основными энергетическими субстратами в развивающемся мозге, а также во взрослом мозге, когда уровень глюкозы ограничен [6]. Кроме того, показано [7], что в качестве энергетического субстрата в мозге молодых животных могут выступать кетоновые тела. Они представляют собой группу органических соединений, являющихся промежуточными продуктами жирового, углеводного и белкового обмена, — ацетоуксусная кислота (ацетоацетат), β -оксимасляная кислота (β -оксibuтират или D-3-гидроксибутират) и ацетон. В молоке крысы содержится большое количество жирных кислот, при расщеплении которых образуются кетоновые тела. По всей видимости, они оказывают влияние на активность нейронов в раннем постнатальном развитии [8]. Однако возрастные изменения кальциевой активности в астроцитах, а также влияние метаболических изменений мозга остаются недостаточно изученными.

Цель исследования — изучить влияние метаболических изменений мозга, таких как возраст постнатального развития животного, температурные условия и наличие специфических энергетических субстратов, на функциональную (кальциевую) активность астроцитов в гиппокампе крыс.

Материалы и методы. В работе использованы перезживающие срезы гиппокампа крыс линии Wistar трех возрастных групп: 5–10 дней, 10–20 дней и более 20 дней постнатального развития животного. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, указанным в приказе Минздрава России №267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации». Исследование проведено в соответствии

с принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), и одобрено Этическим комитетом Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Животные были анестезированы эфиром и декапитированы, затем мозг закреплялся в специальной камере, заполненной модифицированным раствором Рингера при температуре, близкой к 0°C. Раствор постоянно насыщался карбогеном (5% CO₂ + 95% O₂). Состав раствора (в ммоль): NaCl — 124,0; KCl — 2,5; MgSO₄ — 8,48; NaH₂PO₄ — 1,24; NaHCO₃ — 26,2; CaCl₂ — 0,5; D-Glucose — 11,0. Приготовление срезов гиппокампа толщиной 350 мкм осуществляли с помощью вибратора Microm (Германия). До переноса в камеру срезы хранили в растворе с повышенным содержанием ионов магния, ослабляющего последствия резки. В состав раствора входили (в ммоль): NaCl — 124,0; KCl — 2,5; MgSO₄ — 1,3; NaH₂PO₄ — 1,0; NaHCO₃ — 26,2; CaCl₂ — 1,0; MgCl₂ — 1,6; D-Glucose — 11,0. Температуру раствора устанавливали в зависимости от условий эксперимента («комнатная» — 22–24°C или «близкая к физиологической» — 32–34°C). Регистрацию кальциевой динамики в астроцитах осуществляли с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 510 (Германия). В качестве флуоресцентных красителей использовали кальциевый индикатор Oregon Green 488 (0,7 мкмоль) и специфичный маркер астроцитов Sulforhodamine 101 (5 мкмоль). Изменения интенсивности флуоресценции кальциевого индикатора, регистрируемые покадровыми записями (1 кадр в секунду в течение 20 мин), использовали для измерения кальциевой активности в астроцитах. Для количественной оценки кальциевой динамики учитывали два параметра: длительность и частоту кальциевых сигналов. Данные параметры анализировали с помощью специально разработанного программного пакета Astroman. Поскольку амплитуда флуоресцентных сигналов является комплексным параметром, зависящим не только от концентрации кальция, но и от концентрации красителя, а также от мощности излучения лазера, достигающего клетки в глубине ткани, этот параметр не учитывался в оценке кальциевой динамики в астроцитах. Значения представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, n — число срезов. Достоверность статистических различий выборок проверяли с помощью непараметрического теста Манна–Уитни.

Результаты

Кальциевая активность астроцитов в процессе постнатального развития. Частота и длительность кальциевых сигналов были изучены в астроцитах трех возрастных групп крыс (рис. 1, а). Наименьшая частота кальциевых событий наблюдалась у тестовой группы животных в возрасте до 10 дней и составляла $0,153 \pm 0,009$ событий/мин (рис. 1, б). У животных более позднего развития (10–20 дней постнатального развития) частота событий увеличивалась до $0,244 \pm 0,040$ со-

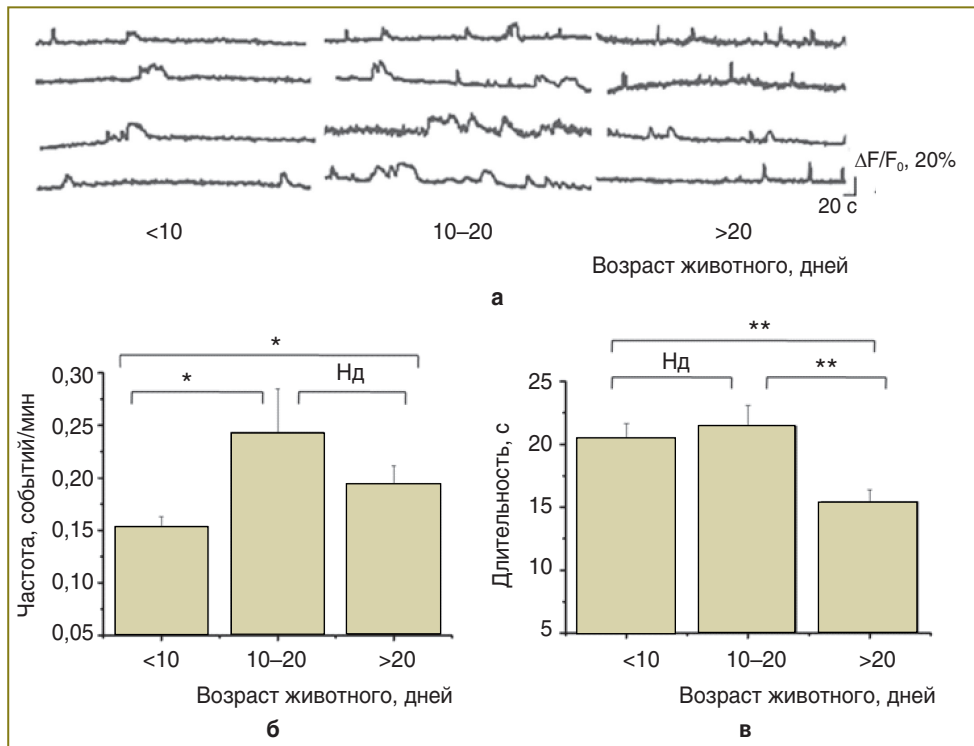


Рис. 1. Спонтанная кальциевая активность в астроцитах в процессе постнатального развития: а — оригинальные записи кальциевых событий отдельных четырех астроцитов в разных срезах в трех возрастных группах животных, наименьшая частота событий наблюдается у животных в возрастной группе до 10 дней постнатального развития; б — средняя частота кальциевых событий в минуту в астроцитах гиппокампа крыс; в — средняя длительность кальциевых событий, к 20-му дню постнатального развития происходит статистически значимое уменьшение длительности кальциевых ответов в астроцитах. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$, Нд — отсутствие достоверности

быйтий/мин ($p = 0,05$ при сравнении с тестовой группой до 10 дней постнатального развития, тест Манна–Уитни) и далее статистически значимо не изменялась. У возрастной группы животных более 20 дней постнатального развития средняя частота кальциевых событий составила $0,194 \pm 0,017$ событий/мин ($p = 0,01$ при сравнении с возрастной группой животных до 10 дней и $p = 0,007$ при сравнении с группой животных в возрасте 10–20 дней, тест Манна–Уитни).

Средняя длительность кальциевых событий составила $20,48 \pm 1,15$ с у тестовой группы животных до 10 дней постнатального периода и $21,45 \pm 1,66$ с — у животных от 10 до 20 дней ($p = 0,1$ при сравнении с тестовой группой животных до 10 дней, тест Манна–Уитни), но к периоду более 20 дней уменьшалась до $15,43 \pm 0,91$ с ($p = 0,008$ при сравнении с тестовой группой животных до 10 дней и $p = 0,008$ при сравнении с группой 10–20 дней постнатального развития, тест Манна–Уитни) (рис. 1, в).

Влияние температурных условий на спонтанную кальциевую динамику в астроцитах. Одним из вероятных механизмов изменения кальциевых событий в астроцитах при развитии мозга является изменение метаболической активности клеток. Изменение уровня метаболической активности в срезах может быть

достигнуто при изменении температуры. Мы сравнили кальциевую динамику в астроцитах при температуре, близкой к физиологической ($32-34^\circ\text{C}$), с событиями при комнатной температуре ($22-24^\circ\text{C}$). Такое изменение температуры приводит к существенному снижению спонтанных синаптических событий. Однако оказалось, что данные температурные условия не влияют ни на частоту, ни на длительность кальциевых ответов в астроцитах ни в одной возрастной группе (рис. 2). Этот результат оказался неожиданным, так как традиционно считалось, что изменение уровня нейрональной активности служит сигналом для активации астроцитов. Возможно, что базовый уровень активности астроцитов в срезах является спонтанным и не зависит от нейрональной активности, так как температурное снижение нейрональной активности не оказывает влияния на кальциевую динамику в астроцитах.

Влияние специфических энергетических субстратов на частоту кальциевых событий в астроцитах у животных в раннем постнатальном развитии. Данную часть исследования проводили путем изменения во внеклеточном растворе энергетических субстратов. В качестве контроля использовали раствор с глюкозой. При этом глюкоза не является основным субстратом в развивающемся мозге [9]. Мы предполо-

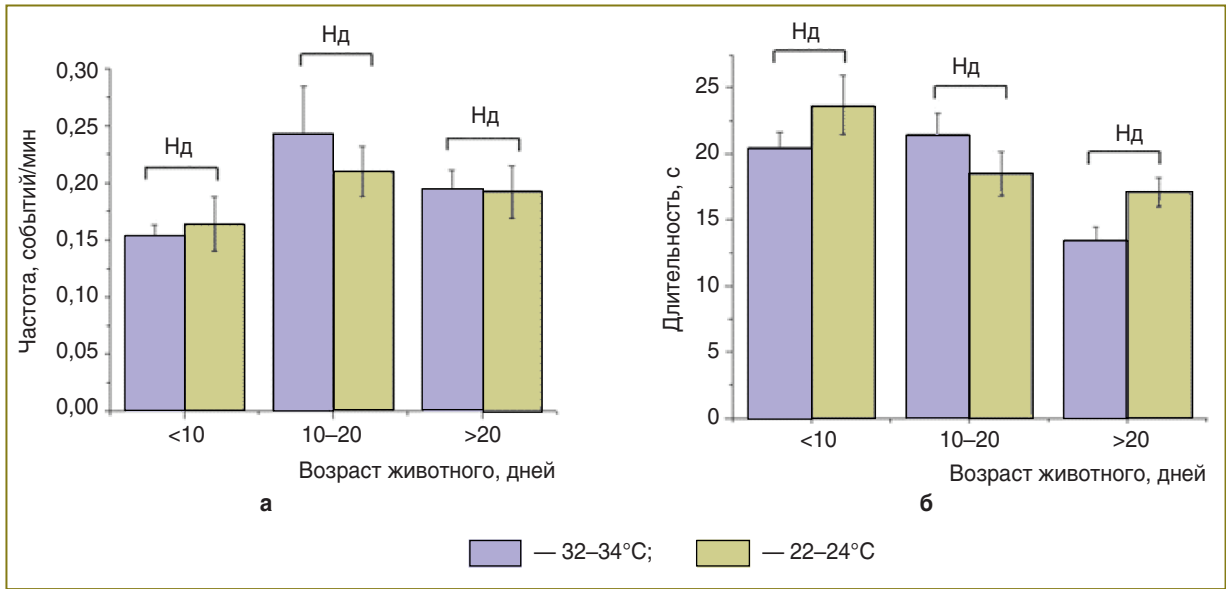


Рис. 2. Температурные условия не оказывают влияния на спонтанную кальциевую динамику астроцитов: частота (а) и длительность (б) кальциевых событий астроцитов при двух температурных условиях. Оба параметра не изменяются, о чем свидетельствует отсутствие достоверности между выборками (Nd)

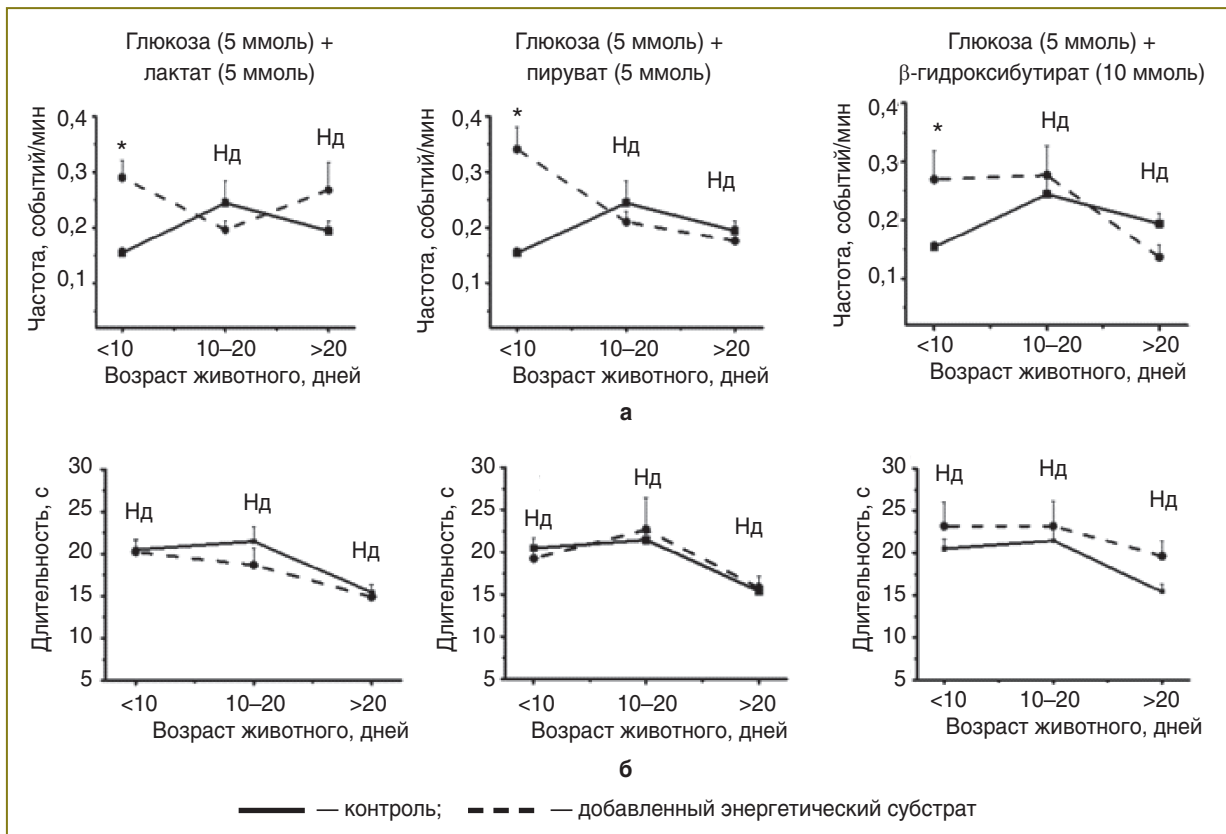


Рис. 3. Специфические энергетические субстраты увеличивают частоту кальциевых событий в астроцитах у животных в раннем постнатальном развитии: а — частота кальциевых событий в астроцитах при добавлении специфических энергетических субстратов (лактата, пирувата, β-гидроксibuтирата); у животных в возрастной группе до 10 дней происходит статистически значимое увеличение частоты кальциевых событий в астроцитах; б — длительность кальциевых ответов в астроцитах при добавлении специфических энергетических субстратов статистически значимо не изменяется, но сохраняется возраст-зависимое снижение длительности ответов к 20-му дню постнатального периода. Nd — отсутствие достоверности; * — $p < 0,05$

жили, что энергетические субстраты, используемые мозгом во время кормления материнским молоком, могут оказывать влияние на кальциевую активность в астроцитах. Для исследования частоты и длительности кальциевых событий в астроцитах в дополнение к глюкозе добавляли разные энергетические субстраты: контроль — глюкоза (10 ммоль); глюкоза (5 ммоль) + лактат (5 ммоль); глюкоза (5 ммоль) + пируват (5 ммоль); глюкоза (5 ммоль) + β -гидроксипируват (10 ммоль) (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют, что специфические энергетические субстраты статистически значимо увеличивают частоту кальциевых событий в астроцитах у животных в возрастной группе до 10 дней постнатального развития, но достоверно не изменяют исследуемые параметры кальциевой динамики астроцитов в последующих двух тестовых группах животных.

Обсуждение. В развивающемся мозге многие процессы способны оказывать влияние на активность астроцитов. Изменения кальциевой активности астроцита могут быть обусловлены разными уровнями экспрессии рецепторов и транспортеров в постнатальном развитии, изменением морфологии самого астроцита [10]. Наши данные свидетельствуют, что у животных до 10 дней постнатального развития частота кальциевых событий определяется не только периодом развития животного, но и поступлением в мозг специфических энергетических субстратов из материнского молока (пирувата, лактата, β -гидроксипирувата). Если срезы от таких животных перфузировать раствором на основе глюкозы (энергетический субстрат, не характерный для этого возраста), то частота кальциевых событий в астроцитах снижается. Добавление специфических энергетических субстратов увеличивает частоту кальциевых событий до уровня, характерного для более взрослых животных. Таким образом, для нормального функционирования мозга, в частности астроцитов, на ранних стадиях постнатального развития необходимо наличие энергетических субстратов, поступающих с материнским молоком. Это очень важно, потому что именно астроциты поставляют питательные вещества к нейронам и вследствие этого регулируют их активность. Таким образом, питание материнским молоком необходимо в этот период жизни для поддержания необходимого уровня астроцитарной активности и, вследствие этого, доставки питания к нейронам. Эти данные могут обосновать необходимость материнского молока для нормального развития головного мозга на ранних этапах.

Следует также отметить, что к 20-му дню постнатального развития происходит уменьшение длительности кальциевых событий. По всей вероятности, к этому периоду в клетках уже сформированы основные системы утилизации ионов кальция, что может послужить причиной такого уменьшения. Изменения параметров кальциевых ответов в астроцитах могут быть связаны с изменениями метаболизма в них. В этом случае понижение общего уровня метаболизма в мозге при снижении температуры должно оказывать влияние на кальциевую активность в астроцитах. Однако сниже-

ние температуры срезов от близкой к физиологической до комнатной не оказало влияния на кальциевую динамику в астроцитах. Кинетика многих биохимических реакций изменяется при повышении или понижении температуры. Так, например, ферменты, катализирующие большинство биохимических реакций, обладают термоллабильностью — изменением своей активности при колебаниях температуры. При определенных оптимальных значениях температура может влиять на скорость образования фермент-субстратного комплекса, вызывая ее увеличение. Это пример одной из многих других температурно-зависимых реакций, которые оказывают влияние на метаболические реакции в клетке. Однако такие изменения происходят в диапазоне микросекунд. Длительность кальциевых сигналов регистрируется в диапазоне секунд и, возможно, именно из-за значительного различия временных шкал существенных изменений в кальциевой динамике астроцитов не наблюдается.

Регуляция активности астроцитов метаболическими процессами мозга является одним из важных вопросов в нейробиологии, который не изучен в достаточном объеме. Уже ясно, что специфические энергетические субстраты, необходимые клеткам мозга на ранних стадиях постнатального развития, должны присутствовать в питательных средах, поэтому так важно контролировать наличие таких энергетических субстратов в детском питании. Если младенцев очень рано перевести с материнского молока на искусственное питание, возможно снижение активности астроцитов, в результате чего может замедлиться развитие всего мозга.

Метаболизм мозга на более поздних стадиях постнатального развития (более 10 дней) практически не зависит от добавления специфических энергетических субстратов. Поэтому при голодании и физических нагрузках, которые также приводят к повышению в мозге кетоновых тел, активность астроцитов не должна меняться. Наши данные тоже могут пролить свет на события, происходящие в мозге при понижении температуры. Астроциты при этом выступают в роли регуляторов нормального функционирования мозга, не меняя динамики параметров основной сигнальной системы. Это важно учитывать при исследованиях процессов переохлаждения человека и в трансплантологии.

Заключение. Кальциевая динамика астроцитов в разные периоды постнатального развития может служить методом оценки функциональной активности глиальных систем при моделировании метаболических нарушений мозга.

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы «Уникальная научная установка для исследования информационных процессов в головном мозге с использованием методов оптогенетики», уникальный идентификатор проекта RFMEFI59114X0004, соглашение о предоставлении субсидии от 01.12.2014 №14.591.21.0004 между Министерством образования и науки РФ и ННГУ с

использованием оборудования уникальной научной установки.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Parri H.R., Crunelli V. The role of Ca²⁺ in the generation of spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations. *Neuroscience* 2003; 120(4): 979–992, [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00379-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00379-8).
2. Brown A.M., Ransom B.R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 2007; 55(12): 1263–1271, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20557>.
3. Nett W.J., Oloff S.H., McCarthy K.D. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiology* 2002; 87(1): 528–537.
4. Newman L.A., Korol D.L., Gold P.E. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One* 2011; 6(12): e28427, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028427>.
5. Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol* 2004; 558(Pt 1): 5–30, <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058701>.
6. Schurr A. Hippocampal slices and their electrophysiology in the study of brain energy metabolism. In: *Electrophysiology — from plants to heart*. Edited by Saeed Oraii. InTech; 2012, p. 51–82, <http://dx.doi.org/10.5772/27992>.
7. Cotter D.G., d'Avignon D.A., Wentz A.E., Weber M.L., Crawford P.A. Obligate role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis. *J Biol Chem* 2011; 286(9): 6902–6910, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.192369>.
8. Ivanov A., Mukhtarov M., Bregestovski P., Zilberter Y. Lactate effectively covers energy demands during neuronal network activity in neonatal hippocampal slices. *Front Neuroenergetics* 2011; 3: 2, <http://dx.doi.org/10.3389/fnene.2011.00002>.
9. Morken T.S., Brekke E., Håberg A., Widerøe M., Brubakk A.M., Sonnewald U. Neuron-astrocyte interactions, pyruvate carboxylation and the pentose phosphate pathway in the neonatal rat brain. *Neurochem Res* 2014; 39(3): 556–569, <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-013-1014-3>.
10. Barker A.J., Ullian E.M. New roles for astrocytes in developing synaptic circuits. *Commun Integr Biol* 2008; 1(2): 207–211, <http://dx.doi.org/10.4161/cib.1.2.7284>.