

DOI: 10.7868/S0869813918060187

ЗНАЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО КАЛИЯ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

© Ю. Д. Степаненко, Т. В. Карелина, П. А. Абушик, Д. А. Сибаров

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
Email: dsibarov@gmail.com

Несмотря на то что культура зернистых клеток мозжечка является популярной экспериментальной моделью, ключевой функциональный элемент мозжечка, а именно клетка Пуркинье (КП), редко исследуется в культуре ткани. На данный момент существуют серьезные методологические разногласия, касающиеся состава среды, которая способствует выживанию КП и развитию морфологии, сходной с нейронами *in vivo*. В нашей работе при различных концентрациях внеклеточного калия развитие КП мозжечка крыс в первичной культуре ткани оценивали комбинацией прижизненного кальциевого имиджинга и иммуногистохимического окрашивания ткани на кальбиндин-28К как маркер КП. Исследование мозжечка крыс производилось на 7, 14, 21-й дни культивирования. Показано, что повышение уровня калия в среде стимулирует выживаемость КП, увеличение размеров сомы и развитие дендритного дерева КП. При этом КП демонстрируют собственные спонтанные осцилляции свободного кальция, характерные для взрослых КП.

Ключевые слова: клетка Пуркинье, мозжечок, первичная культура, нейроны.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 738—743. 2018

Yu. D. Stepanenko, T. V. Karelina, P. A. Abushik, D. A. Sibarov. EXTRACELLULAR POTASSIUM INFLUENCE PURKUNJE CELLS MATURATION IN PRIMARY CULTURE. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: dsibarov@gmail.com.

The primary culture of cerebellar granule cells is commonly used in experimental work. Regardless of that Purkinje cells (PC) playing the key role in cerebellar functioning are rarely studied in culture. Currently, substantial methodological disagreement exists concerning the composition of culture media supporting PC survival and differentiation to achieve adult morphology observed *in vivo*. Here using live cell calcium imaging and immunostaining for calbindin-28K (PC marker) we evaluate the development of PC in primary culture of cerebellar neurons at different potassium concentrations. Immunostaining was made at 7, 14 and 21 days *in vitro*. We show that elevated potassium favors PC survival and as well as soma growth and dendritic tree branching, which results in manifestation of spontaneous calcium oscillations resembling adult PC.

Key words: Purkinje cell, cerebellum, primary culture, neurons.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 738—743. 2018

Первичная культура нейронов представляет собой удобный объект для электрофизиологических и оптических методов исследования. Организация тел и отростков нейронов в плоскости при культивировании на стеклах предоставляет

минимум помех для прижизненной оптической регистрации активности нейронов, в частности кальциевого имиджинга. Несмотря на то что культура зернистых нейронов мозжечка является популярной экспериментальной моделью, ключевой функциональный элемент мозжечка, а именно клетка Пуркинье (КП), редко исследуется в культуре. Самыми многочисленными в первичной культуре мозжечка являются зернистые клетки [7], а доля клеток Пуркинье, являющихся единственным эфферентным элементом коры мозжечка, как правило, не превышает 1—2 % от общего числа нейронов мозжечка. На данный момент существуют серьезные методологические разногласия, касающиеся состава среды для культивирования КП, которая способствует их выживанию и формированию дендритного дерева, сходного с таковым у КП, развивающимся *in vivo*. По данным Р. Е. Hockberger и соавт. [7], этим требованиям отвечает среда с высоким содержанием KCl, тогда как у КП, культивируемых в среде с низким содержанием KCl, выживаемость была существенно ниже. В противоположность этой работе, М. Yuzaki и соавт. [14] указывают на существенное снижение выживших клеток Пуркинье, культивируемых в среде с высокой концентрацией калия.

Целью настоящего исследования была проверка предположения, что среда с высоким содержанием калия способствует росту и морфологическому созреванию КП. Для решения этой задачи проведен сравнительный анализ морфологии и особенностей генерации кальциевых спайков КП в первичной культуре нейронов мозжечка на 7, 14 и 21-й дни культивирования (*days in vitro*, DIV).

МЕТОДИКА

Приготовление первичной культуры нейронов мозжечка. Первичную культуру нейронов мозжечка крыс получали из мозжечков эмбрионов на 20—21-й день пренатального развития (E20—E21). Известно, что клетки Пуркинье из эмбрионального материала характеризуются хорошей выживаемостью в культуре [7]. С целью получения суспензии клеток мозжечка выделенную ткань помещали в раствор трипсина (0.04 мг/мл) на 15 мин, а затем клетки обрабатывали раствором ДНКазы (0.04 мг/мл, Sigma, США), ингибитором трипсина (0.4 мг/мл, Sigma, США) и фетальной сывороткой крупного рогатого скота (10 %, Gibco, США). После центрифугирования производили диссоциацию клеток путем пипетирования в питательной среде. Диспергированные клетки культивировали на обработанных поли-D-лизином 7 миллиметровых стеклах в среде Neurobasal (Gibco, США) с добавлением B27 (Gibco, США), L-глутамина (Gibco, США) и 20 либо 5 мМ KCl.

Иммуноцитохимическое исследование нейронов первичной культуры мозжечка. Иммуноцитохимическое исследование нейронов первичной культуры мозжечка крыс производили на DIV 7, 14 и 21. При подготовке к иммуноцитохимической реакции стекла с клетками фиксировали 4%-ным раствором формальдегида, после чего обрабатывали хлористым аммонием (0.54 мг/мл), Тритоном X-100 (0.2%-ный раствор) и глицином (15 мг/мл). Неспецифическое связывание антител блокировали, обрабатывая стекла с клетками 2%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина. Все растворы готовили на фосфатно-солевом буфере. Для маркирования клеток Пуркинье использовали первичные моноклональные антитела мышей к кальбиндину-D28k (Abcam, ab82812). Иммунопозитивную реакцию визуализировали с использованием вторичных антител козы против мыши, конъюгированных с флуорохромом Alexa 633 (Molecular Probes A21052, Life Technologies, США). Во избежание быстрого выгорания флуоресцентных красителей стекла, обработанные антителами, фиксировали на предметных стеклах клеем, содержащим соединение Mowiol (Sigma-Aldrich, Германия). Флуоресценцию иммунопозитивных нейронов регистрировали на конфокальном сканирующем микроскопе Leica SP5 MP (Leica Microsystems Inc., Германия), оснащенном иммерсионным объективом×63 (HCX APO CS 63×/1.4; Leica Mic-

gosystems, Inc., Германия). Возбуждение красителя Alexa 633 проводили лазером с длиной волны 633 нм. Обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения Leica LAS AF (Leica Microsystems Inc., Германия).

Определение относительных значений концентрации внутриклеточного кальция в субмикромольном диапазоне проводили с использованием флуоресцентного зонда Fluo-3 (Invitrogen, США). Флуорофор загружали в клетки в форме ацетоксиметилового эфира — AM (1 мкМ, 60 мин в темноте при 23—25 °С). Для расщепления эфирной группы Fluo-3 AM с образованием внутри клеток непроникающего через мембрану Fluo-3 проводили последующую инкубацию клеток в физиологическом растворе (мМ): 140 NaCl, 2.8 KCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES) на протяжении 15 мин. Флуориметрическое измерение проводили на инвертированном сканирующем конфокальном микроскопе Leica SP5 MP (Leica Microsystems, Германия) в перфузионной камере AC-PI-15 (Live Cell Instrument Inc.). Глутамат (100 мкМ) в смеси с глицином (30 мкМ) в качестве коагониста апплицировали на клетки с помощью быстрой локальной перфузии. Возбуждение флуорохрома Fluo-3 осуществляли светом аргонового лазера с длиной волны 488 нм. Эмиссию флуорохрома регистрировали в диапазоне 500—560 нм. Частота сканирования составляла 24 кадра (512 × 512 пикселей)/мин.

Количественное сравнение групп измерений проводили при помощи непарного однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с постобработкой Бонферрони. Различия групп считались статистически достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На DIV 7 в культуре, выращенной в среде с высоким содержанием KCl (20 мМ), встречались кальбиндин-позитивные клетки (рис. 1, *a*), у которых наблюдалось несколько толстых дендритов, отходящих по периметру от тела нейрона, однако ветвление дендритов встречалось редко. У некоторых кальбиндин-позитивных клеток идентифицировался длинный аксон (рис. 1, *a*). Зачастую кальбиндин-позитивные клетки были собраны в группы. На DIV 14 также встречались кальбиндин-позитивные клетки с сомами различной формы. При этом дендриты демонстрировали ветвление 1—2-го порядка. На DIV 21 наблюдали развитие характерного для взрослых КП дендритного дерева с одним апикальным дендритом с ветвлением 3—5-го порядка (рис. 1, *a*). При этом у КП идентифицировали единственный аксон длиной до 150 мкм. Размеры сом КП на DIV 7 (15 ± 0.4 мкм) достоверно отличались от размеров на DIV 14 (19 ± 0.7 мкм) и DIV 21 (19.6 ± 0.9 мкм), количество проанализированных клеток равно 40, однофакторный ANOVA, пост-тест Бонферрони, $p < 0.001$ (рис. 1, *b*). Достоверного увеличения размера тел КП с DIV 14 по 21 обнаружено не было.

В первичной культуре, выращенной в среде с низким содержанием KCl (5 мМ), было существенно меньше связей между нейронами и наблюдалось большое количество апоптотических клеток. На DIV 7 и 21 в данной культуре встречались кальбиндин-позитивные клетки. Однако на DIV 21 в этой культуре не было обнаружено нейронов с дендритным деревом, характерным для зрелых КП. Также между DIV 7 и DIV 21 не выявлено достоверного увеличения размеров тел нейронов, как это наблюдалось в среде с высоким содержанием калия. Размеры тел кальбиндин-позитивных клеток на DIV 7 и 21 составляли 12.7 ± 1.9 ($n = 4$) и 11.7 ± 3 мкм ($n = 24$) соответственно.

По характеру кальциевых ответов на аппликацию глутамата на DIV 21 (рис. 2) нейроны мозжечка в культуре разделились на две неравные группы. Большинство клеток (рис. 2, *a*) при аппликации глутамата демонстрировали многократный рост концентрации внутриклеточного кальция, который снижался со временем, но сохранялся на повышенном уровне длительное время. Небольшая группа нейронов (1—2 %) не отвечала увеличением содержания внутриклеточ-

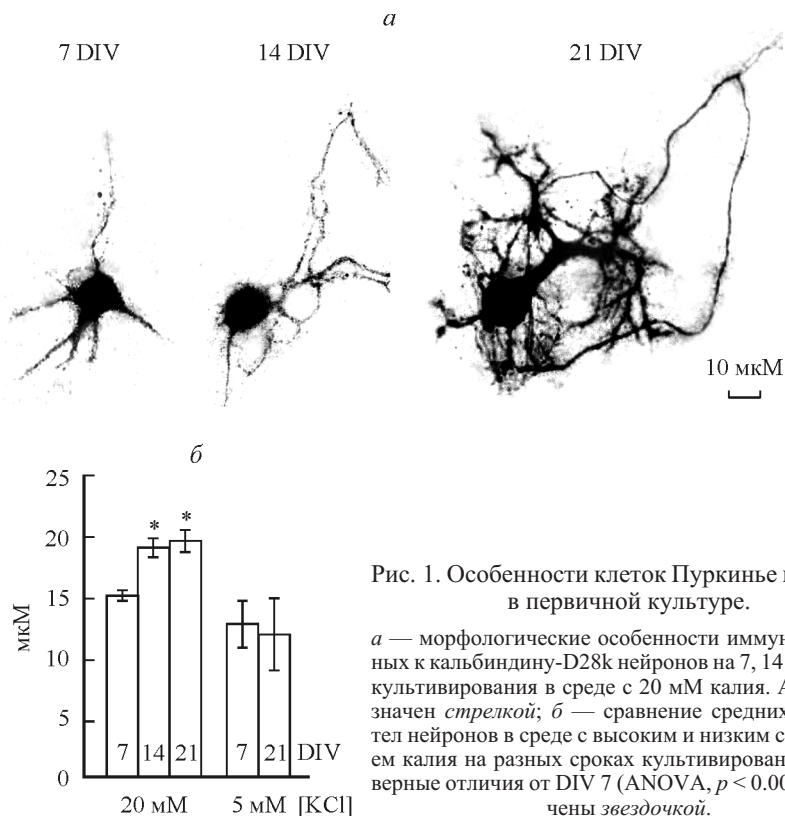


Рис. 1. Особенности клеток Пуркинью мозжечка в первичной культуре.

a — морфологические особенности иммунопозитивных к кальбиндину-D28k нейронов на 7, 14 и 21-й дни культивирования в среде с 20 мМ калия. Аксон обозначен стрелкой; *б* — сравнение средних размеров тел нейронов в среде с высоким и низким содержанием калия на разных сроках культивирования. Достоверные отличия от DIV 7 (ANOVA, $p < 0.001$) обозначены звездочкой.

ного кальция на аппликацию глутамата, однако демонстрировала периодические кальциевые спайки (рис. 2, б). Следует заметить, что спонтанная генерация кальциевых спайков нейронами была зарегистрирована только в культурах, выращенных в среде с высоким содержанием калия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культивирование КП в среде с высоким содержанием калия способствовало их выживаемости и развитию на протяжении всего срока поддержания культуры. Достоверный рост тела КП наблюдался до DIV 14. К DIV 21 у некоторых КП происходило разрастание дендритного дерева с несколькими порядками ветвления. К этому сроку в первичной культуре присутствовали как КП, имеющие морфологию, сходную с морфологией КП на данном сроке *in vivo*, так и КП с морфологией, свойственной нейронам на более ранних этапах развития, что свидетельствует о неравномерном созревании КП в культуре и запаздывании их морфологического развития относительно условий *in vivo*.

Известно, что *in vivo* на сроке P0 (0-й день постнатального развития) большинство КП имеет биполярную форму с одним апикальным дендритом. В течение первой постнатальной недели вокруг тела КП появляются и отмирают тонкие латеральные дендриты [2]; в это же время (P0—P9) наблюдается интенсивный рост сомы КП. К сроку P6 у большинства клеток Пуркинью формируются короткие перисоматические протрузии, отходящие во все стороны от тела нейрона [8, 13].

В наших экспериментах КП на DIV 7, культивируемые в среде с высоким содержанием калия, имели короткие дендриты с редкими ветвлениями. В период с

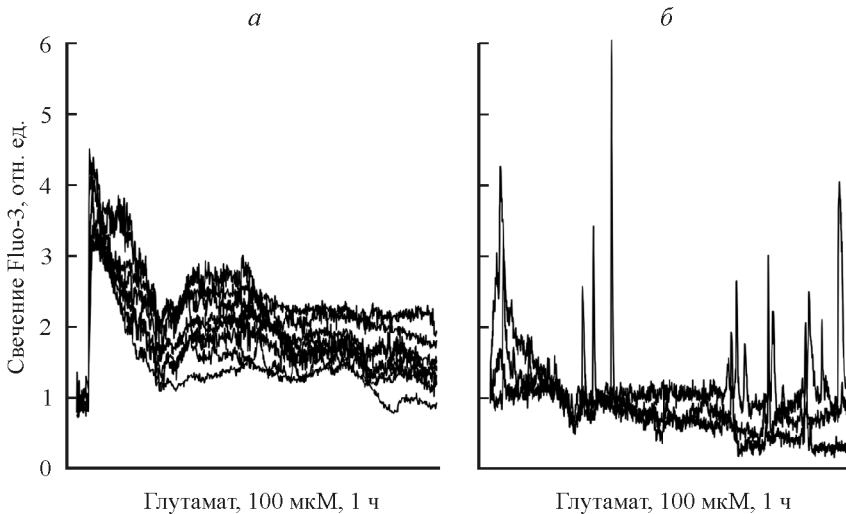


Рис. 2. Относительные изменения концентрации внутриклеточного кальция в нейронах мозжечка в культуре при аппликации глутамата.

а — типичный ответ большинства нейронов; *б* — клетки с собственной эпизодической спайковой активностью.

DIV 7 по DIV 14 происходил рост размеров тел КП (рис. 1, *б*), сопровождавшийся незначительным увеличением ветвления дендритного дерева. На DIV 21 размеры тел КП далее не увеличиваются, однако происходит значительное разрастание и усложнение дендритного дерева с появлением ветвления вплоть до 5-го порядка. Что касается аксона КП, то он формировался уже на DIV 7. Вероятно, на DIV 21 стадия созревания КП *in vitro* соответствует второй постнатальной неделе развития *in vivo*, когда беспорядочно расположенные тонкие соматические отростки отмирают и заменяются более толстыми дендритными ветвями (от одной до трех), расположенными на противоположном аксону полюсе. На завершающей стадии формирования дендритного дерева остается один основной дендрит, дающий латеральные ответвления [13]. Дальнейшее созревание КП *in vivo* выражается в дальнейшем росте дендритного дерева, которое у крыс достигает своих окончательных размеров к сроку P30 [3].

В культуре с низкой концентрацией калия размер тел кальбиндин-позитивных клеток не возрастал по мере увеличения срока культивирования (рис. 1, *б*). Кроме того, не наблюдалось роста и усложнения дендритного дерева.

Известно, что развитие дендритов КП *in vivo* до P7 идет нормально при отсутствии синаптических контактов с зернистыми клетками и лазающими волокнами [3] и определяется внутренними факторами, одним из которых является транскрипционный фактор ROR α [4]. Следующая стадия развития требует присутствия зернистых клеток, которые способствуют выживаемости КП и развитию разветвленного дендритного дерева [9]. Для созревания нейронов мозжечка *in vivo* требуется афферентная иннервация от других структур мозга, в частности коры и вестибулярных ядер. В культуре такой возбуждающий афферентный вход отсутствует, что затрудняет созревание КП. Принудительная деполяризация нейронов в среде с высоким содержанием калия повышает вероятность генерации зернистыми клетками и КП потенциалов действия, что обеспечивает выживаемость зернистых клеток [5] и усиливает рост общего числа синапсов по мере культивирования [12], это, вероятно, способствует развитию дендритного дерева КП.

Ранее нами было показано, что КП экспрессируют NMDA-рецепторы на DIV 7 [12], что необходимо для их выживания [14]. Однако в дальнейшем

к DIV 21 экспрессия NMDA-рецепторов КП значительно падает [12], в силу чего некоторые исследователи считают, что взрослые КП не экспрессируют NMDA-рецепторы вовсе. Это существенно ограничивает вход кальция в КП через NMDA-рецепторы. Кроме того, взрослые КП преимущественно экспрессируют кальций-непроницаемые AMPA-рецепторы [6]. В связи с этим вход кальция в КП определяется, главным образом, потенциал-чувствительными кальциевыми каналами, активируемыми при деполяризации. Это принципиально отличает КП от более многочисленных зернистых клеток, экспрессирующих кальций-проницаемые AMPA-рецепторы [11] и подтипы NMDA-рецепторов, высоко проницаемых для кальция [12]. КП в культуре демонстрируют спонтанную ритмическую генерацию потенциалов действия [1]. Таким образом, наблюдаемая нами в культуре небольшая фракция клеток, демонстрирующих спонтанную генерацию кальциевых спайков и не отвечающая повышением внутриклеточного кальция в ответ на аппликации глутамата, преимущественно соответствует КП.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290427-7. Иммуноцитохимический анализ поддержан грантом РФФИ № 16-04-00653.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Карелина Т. В., Степаненко Ю. Д., Абушик П. А., Сибаров Д. А., Антонов С. М. Влияние модуляторов кальций-активируемых калиевых каналов на активность клеток Пуркинье мозжечка крыс. *Acta Naturae*. 4(31) : 99—107. 2016.

[2] Armengol J. A., Sotelo C. Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in «in vitro» slices. *Dev. Brain Res.* 64 (1—2): 95—114. 1991.

[3] Berry M., Bradley P. The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Brain Res.* 112 (1): 1—35. 1976.

[4] Boukhtouche F., Doulazmi M., Frederic F., Dusart I., Brugg B., Mariani J. RORalpha, a pivotal nuclear receptor for Purkinje neuron survival and differentiation: from development to ageing. *Cerebellum*. 5(2) : 97—104. 2006.

[5] Fujikawa N., Tominaga-Yoshino K., Okabe M., Ogura A. Depolarization dependent survival of cultured mouse cerebellar granule neurons is strain-restrained. *Eur. J. Neurosci.* 12(5): 1838—1842. 2000.

[6] Hartmann J., Konnerth A. Determinants of postsynaptic Ca²⁺ signaling in Purkinje neurons. *Cell Calcium*. 37(5 spec. iss.) : 459—466. 2005.

[7] Hockberger P. E., Tseng H. Y., Connor J. A. Development of rat cerebellar Purkinje cells: electrophysiological properties following acute isolation and in long-term culture. *J. Neurosci.* 9(7) : 2258—2271. 1989.

[8] McKay B. E., Turner R. W. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J. Physiol.* 567(Pt 3) : 829—850. 2005.

[9] Morrison M. E., Mason C. A. Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling. *J. Neurosci.* 18(10) : 3563—3573. 1998.

[11] Savidge J. R., Bristow D. R. Distribution of Ca²⁺-permeable AMPA receptors among cultured rat cerebellar granule cells. *Neuroreport*. 8(8) : 1877—1882. 1997.

[12] Sibarov D. A., Stepanenko Yu. D., Silantiev I. V., Abushik P. A., Karelina T. V., Antonov S. M. Developmental changes of synaptic and extrasynaptic NMDA receptor expression in rat cerebellar neurons in vitro. *J. Mol. Neurosci.* 64(2) : 300—311. 2018.

[13] Sotelo C., Dusart I. Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje Cell dendrites. *Neuroscience*. 162(3) : 589—600. 2009.

[14] Yuzaki M., Forrest D., Verselis L. M., Sun S. C., Curran T., Connor J. A. Functional NMDA receptors are transiently active and support the survival of Purkinje cells in culture. *J. Neurosci.* 16(15) : 4651—4661. 1996.