

УДК 577.352.4

ИНСУЛИН СПОСОБСТВУЕТ НОРМАЛИЗАЦИИ ИОННОГО ГОМЕОСТАЗА И СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ КУЛЬТУРЫ НЕЙРОНОВ МОЗГА

© 2021 г. И. А. Красильникова^{a, *}, И. А. Помыткин^b, В. Г. Пинелис^a, А. М. Сурина^{a, c}

^aНациональный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России,
Москва, 119296 Россия

^bПервый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 119991 Россия

^cНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии,
Москва, 125315 Россия

*e-mail: Irinakrs181@gmail.com

Поступила в редакцию 11.04.2021 г.

После доработки 31.05.2021 г.

Принята к публикации 31.05.2021 г.

Механическое повреждение первичной нейрональной культуры служит удобной *in vitro* моделью для изучения молекулярно-клеточных механизмов, задействованных в распространении очага повреждения при механической травме мозга. В данной работе исследованы изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) в ответ на механическое повреждение первичной культуры корковых нейронов крысы. Быстрое (в течение 1–2 с) нанесение повреждения нейрональной сети в форме полосы $\sim 3 \times 0.1$ мм вызывало скачкообразный рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^+]_i$ и резкое падение $\Delta\Psi_m$. В ~78% клеток, отреагировавших на травму культуры, происходило плавное восстановление указанных параметров до базального уровня. В остальных 22% возникала вторая фаза подъема $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (отсроченная кальциевая дисрегуляция, ОКД), синхронная с сильным падением $\Delta\Psi_m$. В таких клетках $[\text{Na}^+]_i$ оставалась на уровне высокого плато. Добавление инсулина (100 нМ) за 5 мин до нанесения механического повреждения уменьшало долю нейронов, имевших ОКД и устойчивое повышение $[\text{Na}^+]_i$. Таким образом, наличие инсулина способствует нормализации Ca^{2+} - и Na^+ -гомеостаза и функционирования митохондрий, нарушенных при моделировании механической травмы мозга *in vitro*.

Ключевые слова: механическое повреждение мозга *in vitro*, глутаматная эксайтотоксичность, отсроченная кальциевая дисрегуляция, инсулин

DOI: 10.31857/S0233475521060062

ВВЕДЕНИЕ

Травматическое повреждение мозга является серьезной клинической проблемой, приводящей к смерти, развитию длительной потере трудоспособности и инвалидизации. Моделирование травматического повреждения мозга *in vitro* успешно используют для выяснения каскада молекулярных механизмов, приводящих к вторичному повреждению мозга, а также для поиска веществ, обладающих нейропротекторными свойствами [1–3]. Одним из лидирующих факторов гибели нейронов является чрезмерное повышение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), приводящее к кальциевой перегрузке митохондрий и нарушению их функционального состояния [4–6].

Ранее было показано, что источником повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при нанесении нейрональной культуры механической травмы служит внеклеточный Ca^{2+} [7, 8]. Было обнаружено, что MK801, ингибирующий ионотропные глутаматные каналы NMDA-типа, предотвращал повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в 99% нейронов [9]. Это свидетельствует о том, что основным путем поступления Ca^{2+} в нейроны служат ионные каналы NMDA-рецепторов. Недавно нами показано, что инсулин защищает первичные культуры нейроны от эксайтотоксического действия глутамата (Glu) [10]. Целью данной работы было выявить, способен ли инсулин оказывать нейропротекторное действие в тех случаях, когда изменение внутриклеточного ионного гомеостаза и нарушение функций митохондрий вызвано не экзогенным Glu, а эндогенным,

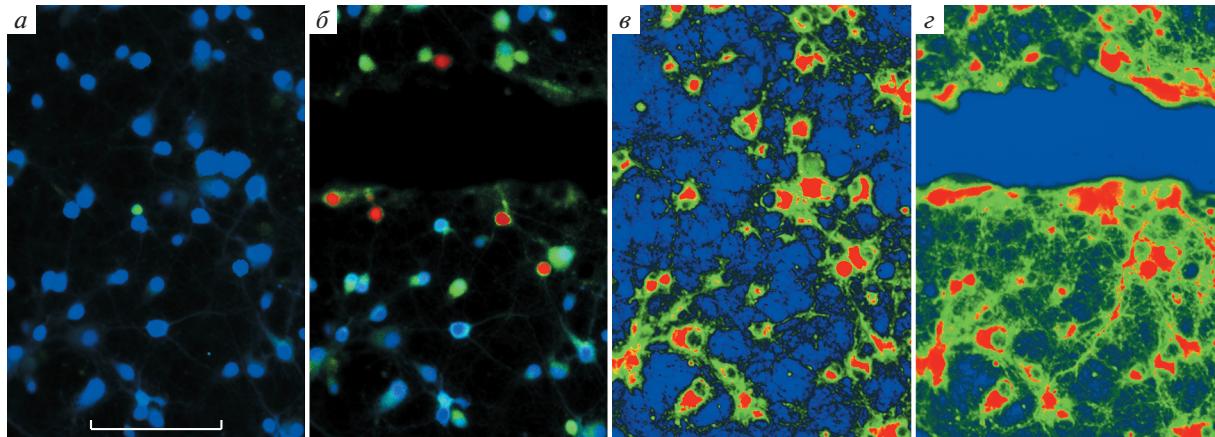


Рис. 1. Типичные флуоресцентные изображения первичной культуры кортикальных нейронов крысы, нагруженных Fura-FF (*а, б*) и Rhodamine 123 (*в, г*) до нанесения царапины (*а, в*) и спустя 60 с после ее нанесения (*б, г*). Более теплый цвет флуоресцентных изображений Fura-FF соответствует увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в соме клеток; более теплый цвет флуоресцентных изображений Rhod-2 соответствует снижению $\Delta\Psi_m$ в соме и нейритах. Масштабный отрезок соответствует 100 мкм.

выделяющимся в условиях, моделирующих механическую травму мозга *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на первичных культурах кортикальных нейронов крыс Вистар в возрасте 1–2 дня (возраст клеток в культуре 10–12 дней), приготовленных как описано в работе [10]. Травму нейрональной сети производили иглой, установленной в механическом манипуляторе, позволяющем наносить горизонтальную царапину длиной 2–3 мм и шириной 80–100 мкм в течение 1–2 с. Регистрацию флуоресцентных сигналов Ca^{2+} - и Na^+ -индикаторов и потенциал-чувствительного митохондриального зонда производили с интервалом между кадрами 3 с до, во время и после нанесения повреждения в пределах 150 мкм от границы царапины. Измерения выполнены с помощью системы анализа изображения на основе инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX-71. Для одновременных измерений $[Ca^{2+}]_i$ и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) использовали флуоресцентные зонды: Fura-FF (4 мкМ, 60 мин, возбуждение 340 ± 8 и 380 ± 8 нм, испускание 525 ± 15 нм) и потенциал-чувствительный зонд Rhodamine 123 (Rhod-2, 2.5 мкг/мл, 15 мин, возбуждение 485 ± 8 нм, испускание 525 ± 15 нм) соответственно. Для одновременных измерений внутриклеточной концентрации Na^+ ($[Na^+]_i$) и Ca^{2+} использовали флуоресцентные зонды: SBFI (8 мкМ, 60 мин, длины волн возбуждения и регистрации те же, что для Fura-FF) и Rhod-2 (1 мкМ, 60 мин, возбуждение 565 ± 8 нм, испускание 610 ± 15 нм) соответственно.

Все измерения выполнены в буферном растворе следующего состава (мМ): 130 $NaCl$, 5.4 KCl ,

2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 глюкозы, 20 HEPES, pH 7.4. Добавление инсулина (100 нМ, свиной, Sigma-Aldrich, США) производили за 5 мин до нанесения травмы, и далее он присутствовал в растворе в течение всей процедуры измерений, за исключением периодов действия протонофора FCCP (1 мкМ) и калибровки сигналов Ca^{2+} -индикатора в конце экспериментов. Для калибровки максимального сигнала Fura-FF и Rhod-2 добавляли Ca^{2+} -ионофор иономицин (Iono, 2 мкМ, в присутствии 5 мМ Ca^{2+}), что приводило к насыщению индикатора ионами Ca^{2+} .

Изменения $[Ca^{2+}]_i$, измеренные с помощью Fura-FF, представлены как изменения отношения F_{340}/F_{380} и нормированы относительно исходного состояния в покоящихся клетках до нанесения травмы ($F_{340}/F_{380} = 0$) и после калибровки максимального сигнала ($F_{340}/F_{380} = 1$). Изменения $[Ca^{2+}]_i$, измеренные с помощью Rhod-2, представлены как изменения отношения F/F_o , где F и F_o соответственно текущее значение интенсивности флуоресценции и исходное в покоящихся клетках в начале эксперимента. Отношение F/F_o принято за 0 в покоящихся клетках и за 1 после калибровки максимального сигнала Rhod-2 с помощью иономицина. Изменения $[Na^+]_i$ представлены как изменения отношения F_{340}/F_{380} индикатора SBFI и нормированы относительно исходного значения в покоящихся клетках ($F_{340}/F_{380} = 1$).

Флуоресцентные индикаторы приобретены в ThermoFisher (США), остальные реагенты в Sigma-Aldrich.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программы GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., США), непарный *t*-тест. Статистически значимыми считали различия при

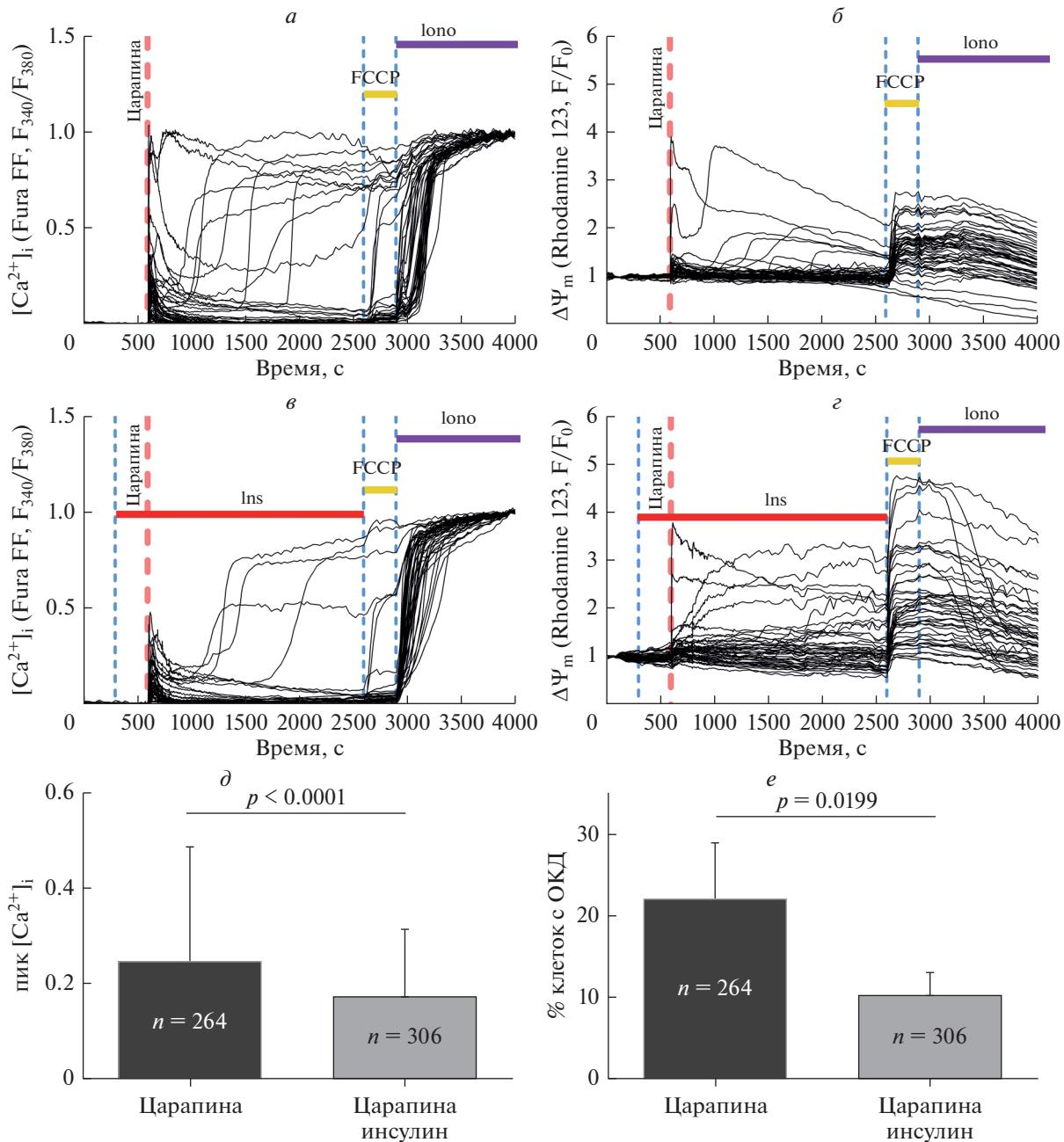


Рис. 2. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в первичной культуре кортикальных нейронов крысы, подвергнутой механическому повреждению с разрывом нейрональной сети в буферном растворе без (*а* и *б*) и с добавлением инсулина (Ins, 100 нМ) (*в* и *г*). В каждой группе представлено по 50 кривых, соответствующих сигналам индивидуальных нейронов. Пиковые значения $[Ca^{2+}]_i$ (пик $[Ca^{2+}]_i$), отмечаемые в первые 120 с после нанесения царапины (*д*), и % клеток, в которых развилась отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД) (*е*).

уровне вероятности $p < 0.05$. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n — общее количество клеток во всех экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Механическое повреждение первичной культуры кортикальных нейронов крысы приводит к

быстрому увеличению $[Ca^{2+}]_i$ и синхронному падению $\Delta\Psi_m$. Типичные изображения изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ до и после механического повреждения (нанесения царапины) представлены на рис. 1.

В $77.7 \pm 9.1\%$ клеток ($n = 264$, 4 эксперимента) эти изменения имели быстрый транзиторный характер с возвращением $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ к низкому

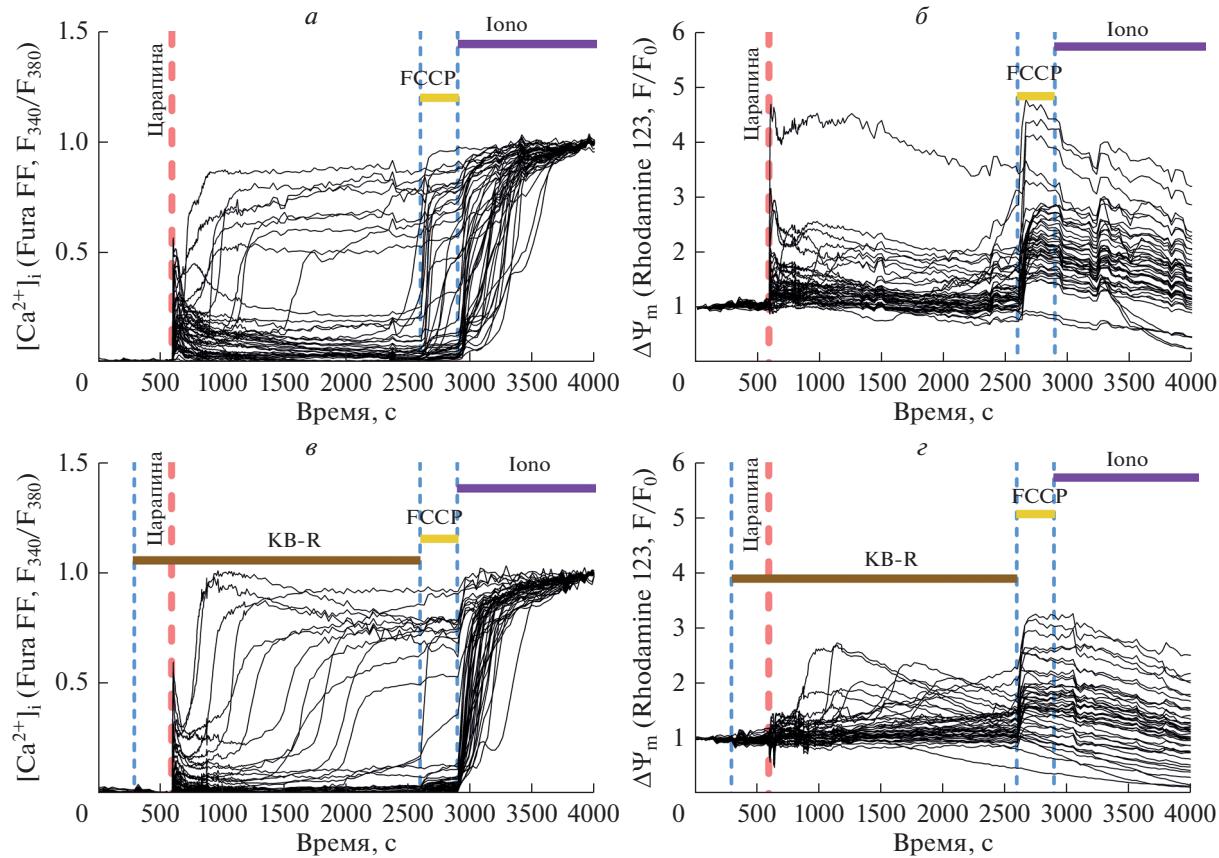


Рис. 3. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в первичной культуре кортикальных нейронов крысы, подвергнутой механическому повреждению с разрывом нейрональной сети в буферном растворе без (а и б) и с добавлением KB-R7943 (10 мМ) (в и г). В каждой группе представлено по 50 кривых, соответствующих сигналам индивидуальных нейронов.

значению. В остальных 22.3% происходило двухфазное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ с развитием устойчивого плато и митохондриальной деполяризацией (рис. 2а, 2б). Большая часть клеток ($63 \pm 7\%$), развивших двухфазный Ca^{2+} -ответ на травму, локализовалась в пределах 50 мкм от границы царапины. Подобные изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ наблюдаются при эксайтотоксическом действии экзогенного Glu на первичные нейрональные культуры мозга и получили название отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД) [4–6]. В настоящем экспериментальном протоколе Glu не добавляли, однако этот нейромедиатор мог выделяться из клеток, разрушенных в результате нанесения механического повреждения. Это предположение подтверждается тем, что доля клеток, ответивших быстрым подъемом $[Ca^{2+}]_i$ на механическое повреждение многократно снижается в присутствии MK-801, что указывает на доминирующую роль ионотропных Glu-активируемых каналов NMDA-типа в реакции нейронов на повреждение [9]. Интересно, что в отличие от стандартных протоколов при изучении глутаматной эксайтотоксичности, использующих экзогенный Glu в безмагниевом буфере в присутствии глицина [4, 5, 10], при нанесении механической травмы ОКД развивалась не только без введения глицина, являющегося ко-агонистом NMDA-рецепторов, но и без удаления Mg^{2+} . Возможно, при механическом повреждении культуры выделяется не только эндогенный Glu, но и глицин, а также происходит быстрая деполяризация плазматической мембраны, снимающая потенциал-зависимую магниевую блокаду.

Добавление инсулина (100 нМ) за 5 мин до нанесения травмы само по себе не влияло на сигнал Fura-FF, однако приводило к достоверному снижению доли нейронов, имевших ОКД в результате повреждения культуры с $22.3 \pm 9.1\%$ до $10.3 \pm 4.2\%$ ($p = 0.02$, $n = 306$, 4 эксперимента) (рис. 2е). Доля нейронов, показавших синхронное с ОКД сильное падение $\Delta\Psi_m$, также уменьшалась (рис. 2б, 2г). Инсулин достоверно уменьшал пиковые значения $[Ca^{2+}]_i$ с 0.24 ± 0.01 до 0.17 ± 0.00 , наблюдавшиеся в первые 2 мин после нанесения травмы ($p < 0.0001$, за 1 принятая максимальная $[Ca^{2+}]_i$, достигаемая при добавлении иономицина) (рис. 2д).

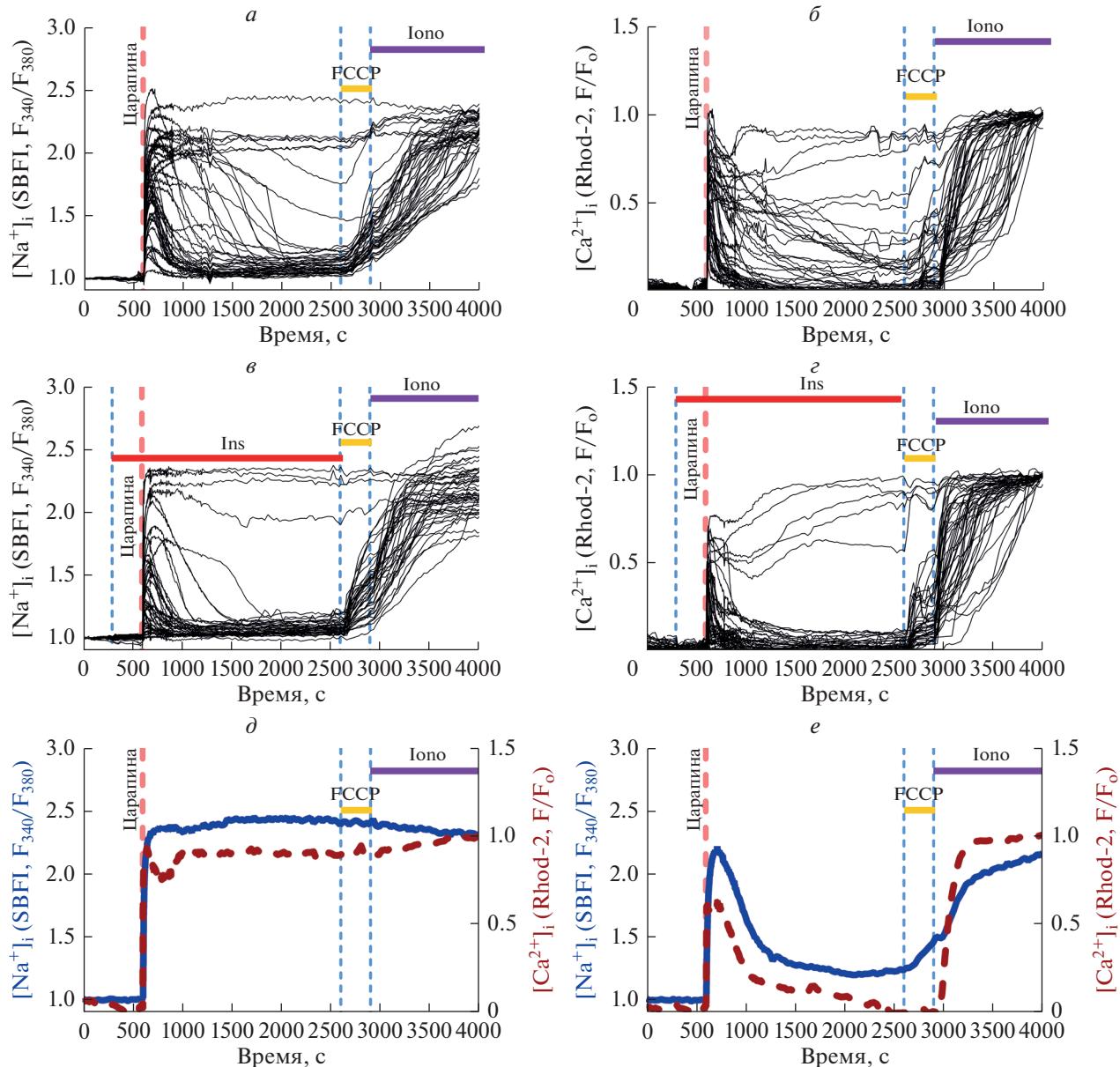


Рис. 4. Изменения $[Na^+]$ _i и $[Ca^{2+}]$ _i в первичной культуре кортикальных нейронов крысы, подвергнутой механическому повреждению с разрывом нейрональной сети в буферном растворе без (а и б) и с добавлением инсулина (Ins, 100 нМ) (в и г), в каждой группе представлено по 50 кривых, соответствующих сигналам индивидуальных нейронов. Сопоставление $[Na^+]$ _i и $[Ca^{2+}]$ _i сигналов в ответ на травму в двух представительных нейронах (д и е).

Добавление протонефора FCCP в конце эксперимента вызывало больший подъем флуоресценции Rh123 в тех культурах, которые содержали в буфере инсулин. Это свидетельствует о том, что в присутствии инсулина митохондрии удержали большее количество Rh123 в матриксе при механическом повреждении культуры и, соответственно, высвободили больше зонда в цитозоль при деполяризации с помощью FCCP (рис. 2г). Очевидно, митохондрии нейронов имели в присутствии инсулина более высокий $\Delta\Psi_m$, позволивший удержать большее количество Rh123.

Для развития ОКД при действии экзогенного Glu требуется не только активация NMDA-рецепторов, но и реверсия Na^+/Ca^{2+} -обменника [11]. Мы проверили, насколько ингибирование реверсивной моды Na^+/Ca^{2+} -обменника с помощью KB-R7943 важно для развития ОКД и сильного падения $\Delta\Psi_m$. Оказалось, что при механической травме нейрональной культуры и действии Glu, выделившегося в результате повреждения клеток, KB-R7943 (10 мКМ) не вызвал достоверного уменьшения доли клеток, имевших ОКД

($n = 167$ в группе клеток, подвергшихся механическому повреждению; $n = 158$ в группе клеток предобработанных K-BR7943 и подвергшихся механическому повреждению, 3 эксперимента, $p > 0.05$) (рис. 3).

Известно, что NMDA-каналы обладают высокой проводимостью не только для Ca^{2+} , но и для Na^+ [4], поэтому мы проверили, происходят ли изменения $[\text{Na}^+]_i$ в нейронах в ответ на механическое повреждение культуры. Действительно, в ответ на царапину изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ шли параллельно с изменениями $[\text{Na}^+]_i$ (рис. 4). Добавление инсулина приводило к уменьшению доли нейронов, которые в ответ на травму развивали устойчивое повышение $[\text{Na}^+]_i$ с $19.7 \pm 2.3\%$ ($n = 211$, 4 эксперимента) до $9.9 \pm 2.4\%$ ($n = 204$, 4 эксперимента, $p < 0.0012$). Это наблюдение согласуется с результатами измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2). Так же как и в случае измерений $[\text{Ca}^{2+}]_i$, инсулин достоверно уменьшал пиковые значения $[\text{Na}^+]_i$ с 1.77 ± 0.03 до 1.45 ± 0.03 , наблюдавшиеся в первые 2 мин после нанесения повреждения ($p < 0.001$, за 1 принято стартовое значение $[\text{Na}^+]_i$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие ОКД является “точкой невозврата” при глутаматной нейротоксичности, и гибель таких нейронов в первичной культуре предопределена [12, 13]. Снижение доли клеток, имеющих $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -плато в *in vitro* модели травматического повреждения мозга, должно положительно скаживаться на выживании нейронов вблизи травмированной зоны. Инсулин понижал амплитуду скачка $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2d) и $[\text{Na}^+]_i$ (рис. 4) в момент нанесения царапины, что свидетельствует о способности этого гормона снижать поступление Ca^{2+} и Na^+ в клетку при механическом повреждении нейрональной сети *in vitro*. Снижение поступления Ca^{2+} в цитозоль из буфера уменьшает вероятность развития ОКД [14] и хорошо согласуется с результатами настоящего исследования (рис. 2e). С другой стороны, показано, что в гетерологических системах (в ооцитах лягушки) инсулин способен увеличивать экспрессию NMDA-рецепторов [15]. Однако электрофизиологические исследования на мозге крыс продемонстрировали, что эффект инсулина может быть разнонаправленным в зависимости от того, какие рецепторы вовлечены в нейротрансмиссию дополнительно к ионотропным рецепторам глутамата [16]. Кроме того, снижение в присутствии инсулина доли клеток, в которых повреждение вызывало длительное повышение $[\text{Na}^+]_i$, указывает на то, что инсулин способствовал более эффективной работе Na^+/K^+ -ATP-азы (рис. 4). Это

подтверждается тем, что в присутствии инсулина митохондрии нейронов имели более высокий $\Delta\Psi_m$, чем контрольные культуры без добавки гормона (рис. 2б, 2г), и хорошо согласуется с современными представлениями о более эффективной работе митохондрий по энергообеспечению нейронов в присутствии инсулина [17].

Мы не обнаружили реверсии $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника при механическом повреждении (рис. 3). Вероятно, снижение градиента концентрации Na^+ между буфером и цитозолем и падение трансмембранных потенциала плазмалеммы не достигали уровня, необходимого для реверсии $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, которое реализуется при нейротоксическом воздействии глутамата [4, 5, 12, 13].

В заключение отметим, что обработка нейронов инсулином способствует нормализации Ca^{2+} - и Na^+ -гомеостаза и функции митохондрий, нарушенных в результате разрыва нейрональной сети. Можно надеяться, что положительное действие инсулина проявляется не только на двумерной модели травмы мозга, механическом повреждении первичной нейрональной культуры, но также *in vivo*.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Источники финансирования. Исследование поддержано грантами РФФИ 17-00-00106 и гос. заданием НИР № 0520-2019-0029 и АААА-A19-119012590191-3.

Соответствие принципам этики. Все примененные международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumaria A. 2017. *In vitro* models as a platform to investigate traumatic brain injury. *Altern. Lab. Anim.* **45** (4), 201–211.
<https://doi.org/10.1177/026119291704500405>
2. Morrison B., Elkin B.S., Dollé J.-P., Yarmush M.L. 2011. *In vitro* models of traumatic brain injury. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **13** (1), 91–126.
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124706>
3. Lööv C., Shevchenko G., Geeyarpuram Nadadhur A., Clausen F., Hillered L., Wetterhall M., Erlandsson A. 2013. Identification of injury specific proteins in a cell culture model of traumatic brain injury. *PLoS One.* **8** (2), e55983.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055983>
4. Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86** (2), 279–351.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002>
5. Duchen M.R. 2012. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **464** (1), 111–121.
<https://doi.org/10.1007/s00424-012-1112-0>

6. Ludtmann M.H.R., Abramov A.Y. 2018. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **663**, 86–90.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.044>
7. Mukhin A.G., Ivanova S.A., Allen J.W., Faden A.I. 1998. Mechanical injury to neuronal/glial cultures in microplates: Role of NMDA receptors and pH in secondary neuronal cell death. *J. Neurosci. Res.* **51** (6), 748–758.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980315\)51:6<748::AID-JNR8>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980315)51:6<748::AID-JNR8>3.0.CO;2-B)
8. Mukhin A.G., Ivanova S.A., Knoblach S.M., Faden A.I. 1997. New *in vitro* model of traumatic neuronal injury: Evaluation of secondary injury and glutamate receptor-mediated neurotoxicity. *J. Neurotrauma*. **14** (9), 651–663.
<https://doi.org/10.1089/neu.1997.14.651>
9. Красильникова И.А., Бакаева З.В., Пинелис В.Г., Лисина О.Ю., Сурин А.М. 2018. Изменения концентрации внутриклеточного кальция и митохондриального потенциала в клетках первичной культуры коры головного мозга крысы при острой механической травме. *Патогенез*. **16** (3), 124–128.
10. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E., Fisenko A., Boyarkin D., Balyasin M., Demchenko A., Pomytkin I., Pinelis V. 2019. Insulin protects cortical neurons against glutamate excitotoxicity. *Front. Neurosci.* **13**, 1027.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01027>
11. Brittain M.K., Brustovetsky T., Sheets P.L., Brittain J.M., Khanna R., Cummins T.R., Brustovetsky N. 2012. Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger. *Neurobiol. Dis.* **46** (1), 109–117.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.051>
12. Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. 2014. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca^{2+} -дизрегуляцией, митохондриальной деполяризацией и последующей гибелью нейронов. *Патогенез*. **12** (4), 40–46.
13. Nicholls D. 2005. Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr. Mol. Med.* **4** (2), 149–177.
<https://doi.org/10.2174/1566524043479239>
14. Вабниц А.В., Сенилова Я.Е., Колесникова Е.В., Сурин А.М., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. 2006. Отсроченная Ca^{2+} дисрегуляция в молодых нейронах мозжечка при гиперстимуляции глутаматных рецепторов. Роль NMDA-каналов. *Биол. мембранны*. **23** (4), 311–319.
15. Skeberdis V.A., Lan J.Y., Zheng X., Zukin R.S., Bennett M.V.L. 2001. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98** (6), 3561–3566.
<https://doi.org/10.1073/pnas.051634698>
16. Fetterly T.L., Oginsky M.F., Nieto A.M., Alonso-Caraballo Y., Santana-Rodriguez Z., Ferrario C.R. 2021. Insulin bidirectionally alters NAc glutamatergic transmission: Interactions between insulin receptor activation, endogenous opioids, and glutamate release. *J. Neurosci.* **41** (11), 2360–2372.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3216-18.2021>
17. Pomytkin I., Pinelis V. 2021. Insulin receptors and intracellular Ca^{2+} form a double-negative regulatory feedback loop controlling insulin sensitivity. *F1000Research*. **9**, 598.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.24558.2>

Insulin Normalizes Ionic Homeostasis and the State of Mitochondria during Mechanical Trauma to the Culture of Brain Neurons

I. A. Krasilnikova^{1, *}, I. A. Pomytkin², V. G. Pinelis¹, A. M. Surin^{1, 3}

¹National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, 119296 Russia

²Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

³Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

*e-mail: Irinakrsl81@gmail.com

Mechanical damage to the primary neuronal culture serves as a convenient *in vitro* model for studying the molecular and cellular mechanisms involved in the spreading of the lesion in mechanical trauma to the brain. In this work, we investigated changes in the intracellular concentrations of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) and in the mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) in response to mechanical damage to the primary culture of rat cortical neurons. Rapid (within 1–2 s) damage to the neural network in the form of a $\sim 3 \times 0.1$ mm scratch caused an abrupt increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^+]_i$ and a sharp drop in $\Delta\Psi_m$. In $\sim 78\%$ of the cells that responded to the culture trauma, these parameters gradually restored to the basal level. In the remaining 22% of the cells, there was a second phase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise (delayed calcium dysregulation, DCD), synchronous with a profound decrease in $\Delta\Psi_m$. In these cells $[\text{Na}^+]_i$ remained at a high plateau level. The addition of insulin (100 nM) 5 min before the mechanical damage caused a decrease in the proportion of neurons with DCD and a sustained increase in $[\text{Na}^+]_i$. Thus, the presence of insulin contributes to the normalization of Ca^{2+} and Na^+ homeostasis and mitochondrial function, which were impaired when simulating mechanical brain injury *in vitro*.

Keywords: mechanical brain damage *in vitro*, glutamate excitotoxicity, delayed calcium dysregulation, insulin