
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**УПРУГО-ЭЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ
И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕРВИЧНОЙ
СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ
БЛОКАДЫ P2X3-РЕЦЕПТОРА**

© 2024 г. А. С. Зеленцова¹, В. С. Шмигерова¹, Ю. В. Степенко¹,
М. Ю. Скоркина^{1,*}, А. В. Дейкин¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород,
Россия

*E-mail: marinaskorkina0077@gmail.com

Поступила в редакцию 11.07.2024 г.

После доработки 09.09.2024 г.

Принята к публикации 10.09.2024 г.

P2X3-рецепторы, локализованные в гиппокампе, принимают участие в передаче возбуждения и формировании синаптической пластичности, лежащей в основе обучения и памяти. Важное значение P2X3-рецепторы имеют в возникновении нейропатической боли при эпилепсии, острой и воспалительной боли различного генеза и локализации, а также в активации и росте нервов после черепно-мозговой травмы. Целью выполненного исследования явилось изучить упруго-эластические свойства поверхности и метаболический профиль нейронов эмбриональной первичной смешанной культуры гиппокампа в условиях блокады P2X3-рецептора. Исследование выполнено на первичной смешанной культуре нейронов гиппокампа, полученной от мышей линии CD1 на 18-й день гестации (E18). В качестве блокатора P2X3-рецептора выбран высокоселективный блокатор 5-(5-йод-2-изопропил-4-метоксифеноксипиримидин-2,4-диамин монохлоридная соль. Для оценки упруго-эластических свойств нейронов измеряли модуль Юнга, характеризующий жесткость клеточной поверхности. Измерения проводили на атомно-силовом микроскопе, накладывая нагрузку в 25 локальных участках клеточной поверхности. В каждой точке регистрировали силовые кривые подвода и отвода кантилевера с последующим расчетом модуля Юнга. Метаболический профиль нейроглиальной культуры изучали в тестах Energy Phenotype на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse HS mini (США). Модуль Юнга клеточной поверхности нейронов в контроле находился в пределах от 6.8 ± 0.1 до 9.7 ± 0.2 кПА, а под действием блокатора P2X3-рецептора в диапазоне от 3.1 ± 0.1 до 8.5 ± 0.1 кПА. В условиях блокады P2X3-рецептора на 5-е сутки дифференцировки модуль Юнга клеточной поверхности был снижен на 62% ($p < 0.05$), на 8-е сутки увеличился на 22% ($p < 0.05$), а к 11-м суткам – снизился на 16.7% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. Для эмбриональной культуры гиппокампа был характерен аэробный тип дыхания как в контроле, так и при блокаде P2X3-рецептора. Следовательно, блокада P2X3-рецептора не оказывала влияния на метаболический профиль культуры гиппокампа E18. Полученные данные указывают на непосредственное участие P2X3-рецептора в формировании биомеханических свойств клеточной поверхности в процессах дифференцировки и сигнальной трансдукции. Не исключено, что блокада P2X3-рецептора может быть одной из перспективных молекулярных мишеней, позволяющих снизить повреждение нейронов при травмах головного мозга, нейровоспалении, эпилепсии. Кроме того, изучение последствий

блокады P2X3-рецептора может расширить фундаментальные представления о роли пуринергической сигнальной системы в формировании сложной морфологии нейронов на ранних стадиях развития эмбрионов.

Ключевые слова: культура нейронов гиппокампа, P2X3-рецептор, упруго-эластические свойства нейронов, митохондриальное дыхание

DOI: 10.31857/S0869813924090125, **EDN:** AIROIJ

ВВЕДЕНИЕ

Пуринергическая сигнальная система гиппокампа задействована в процессах нейротрансмиссии [1, 2], синаптической пластичности нейронной сети [3], передачи модуляции сигналов воспаления, опосредованных рецепторами P2X [4], а также пролиферации, дифференцировки и регенерации клеток, происходящих с участием P2Y-рецепторов [5, 6]. Среди пуринергических рецепторов особый интерес представляет P2X3, поскольку принимает участие не только в возникновении, развитии нейропатической и воспалительной боли [7–9], но и выполняет нейропротекторную роль после нарушения целостности нервного волокна [8, 10], участвуя в процессе регенерации нервных окончаний [11, 12]. Рецепторы P2X3 экспрессируются в гиппокампе, где выявлена локализация мРНК P2X3 в аксонах клеток зубчатой извилины, формирующих мшистые волокна, проецирующиеся на полиморфный слой зубчатой извилины и проксимальные дендриты пирамидальных клеток гиппокампа [13]. Функциональной особенностью семейства рецепторов P2X является проницаемость для Ca^{2+} при мембранном потенциале покоя [14], в отличие от ионотропных рецепторов глутамата (NMDA-каналов), вход кальция через которые происходит только при деполяризации мембраны [15]. Кроме того, известна роль P2X3-рецептора в нейрогенезе, который на ранних стадиях развития эмбрионов может быть единственным подтипом рецептора, участвующим в быстрой возбуждающей передаче сигналов, опосредованной АТФ [16]. Известно, что в условиях ингибирования гена *P2rx3* нарушается нейрогенез гиппокампа, который сопровождается снижением пролиферации и недоразвитием нейритов в головном мозге, что было показано на мышинной модели болезни Альцгеймера [17]. Несмотря на спектр работ, посвященных различным аспектам функционирования P2X3-рецептора, малоизученным остается вопрос о взаимосвязи рецептора с митохондриальной функцией, определяющей активность клеточного метаболизма, кальциевый гомеостаз, и, как следствие, регуляцию синаптической пластичности гиппокампа [18]. Неизученным остается вопрос о влиянии P2X3-рецептора на биомеханические свойства клеточной поверхности, так как механическая трансдукция сигналов происходит в 40 раз быстрее, чем трансдукция биохимических сигналов в цитоплазме [19]. Целью выполненного исследования явилось изучить упруго-эластические свойства поверхности и метаболический профиль нейронов эмбриональной первичной смешанной культуры гиппокампа в условиях блокады P2X3-рецептора.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В работе использованы мыши линии CD1 в возрасте 2 месяца массой 23–25 г. Животные были приобретены в филиале "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства" России (сертификат № 18980 от 23.05.2023). Животные содержались в условиях конвенционального вивария Белгород-

ского государственного национального исследовательского университета, искусственно регулируемого светового дня (12 ч темного и 12 ч светлого времени) при температурном режиме 22–26 °С и имели свободный доступ к корму и воде. В эксперимент были взяты 5 беременных самок, от каждой отбирали по 6 хорошо сформированных эмбрионов.

Выделение культуры гиппокампа эмбрионов мыши (E18)

В исследовании в качестве объекта выбрана эмбриональная первичная смешанная культура гиппокампа, которая является универсальной моделью для создания первичных культур с преобладающим числом нейронов над глиальными клетками. Культуры, полученные от 18-дневных эмбрионов, представляют модель дифференцированных нейронов [20]. Для получения культуры гиппокампа E18 вскрывали брюшную полость, проводили эктомию матки с эмбрионами на 18-й день гестации. Все манипуляции выполняли в чашке Петри с охлажденным раствором Хенкса на льду. Выделение гиппокампа проводили под бинокляром (Leica, ув. X4). Гиппокампы делили скальпелем на 6–8 частей, переносили в пробирку с предварительно подогретым до 37 °С 0.25%-ным раствором трипсин-ЭДТА (Панэко) и помещали в инкубатор Binder (Германия) при 37 °С, 5% CO₂ на 20 мин. Клеточную суспензию трижды отмывали фосфатно-буферным раствором (PBS) с pH 7.4. К полученной суспензии добавляли 2 мл нейробазальной среды (Панэко), содержащей 2% добавки белка B-27 (НейроМакс, Панэко), 0.5 mM L-Glutamax (Gibco, 25030081), 1% ПенСтреп (ПанЭко). Для оценки упруго-эластических свойств нейронов гиппокампа первичную культуру высевали на предварительно подготовленные прокаленные стекла в концентрации 1×10^6 клеток на стекло. Общее число засеянных стекол равно десяти, по пять в опытной и контрольной группах. Для изучения метаболического профиля первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа высевали и культивировали в 8-луночных планшетах Cell Culture Miniplates (США), плотность посадки составила 2×10^5 клеток на лунку. Всего было засеяно 16 планшетов.

Оценка упруго-эластических свойств клеточной поверхности

Стекла контрольной группы инкубировали в нейробазальной среде (Панэко), содержащей 2% добавки белка B-27 (НейроМакс, Панэко), 0.5 mM L-Glutamax (Gibco, 25030081), 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко), 1% PenStrep (ПанЭко). В нейробазальную среду опытной группы добавляли высокоселективный блокатор рецептора P2X₃ 5-(5-йод-2-изопропил-4-метоксифенокси) пиримидин-2,4-диамин монохлоридная соль (Ro-4; Selleckchem, США, No.S0405) в конечной концентрации 12 нМ. Выбор дозы препарата основан на известной для данного лиганда концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀), которая по данным литературы составляет 3.16 нМ [21]. Смену культуральной среды проводили каждые 24 ч, блокатор постоянно находился в культуральной среде опытных проб.

Упруго-эластические свойства нейронов гиппокампа исследовали на 1-, 5-, 8-, 11- и 14-е сутки дифференцировки. Культуральную среду удаляли из лунок планшета на определенные сутки инкубации, трижды промывали PBS (pH 7.4). Затем на стекла наносили 95%-ный спирт до полного покрытия поверхности стекла и фиксировали препарат в течение 3 мин. По истечении времени фиксации препараты промывали трижды PBS, а затем ополаскивали дистиллированной водой. Сушили стекла в ламинарном шкафу и затем (через 24 ч) сканировали на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71, Зеленоград, Россия). Измерение модуля Юнга предполагает непосредственный контакт кантилевера с клеточной мембраной и его погружение в мембрану, в связи с чем клетки могут отрываться от подложки. В процессе работы был выбран

способ пробоподготовки стекол для сканирования с использованием фиксатора, учитывая, что условия подготовки препаратов в опытной и контрольной группах были одинаковыми, то фиксация в данном случае не повлияла на объективность полученных данных. Согласно экспериментальным данным исследований, представленных в доступной литературе, фиксация нейрональных клеток перед измерением модуля Юнга помогает обойти многие потенциальные проблемы, сопровождающие измерения в реальном времени, такие как проблемы с адгезией клеточного субстрата, подвижностью и поддержанием жизнеспособности нейронов во время измерения [22]. На неподвижных нейрональных клетках были проведены механические измерения в области сомы и конуса роста. Фиксированные нейроны обычно имеют значения модуля упругости порядка от 10 до сотен кПа [23, 24].

Сканирование проводили в режиме силовой спектроскопии с частотой развертки сканирования 0.6–0.8 Гц, используя кантилевер серии NSG03 (Nanoworld, США) с жесткостью 1.1 Н/м и радиусом закругления 10 нм. Механические свойства поверхности оценивали в локальных участках согласно картам локальной упругости. Для этого на клеточную поверхность сомы нейрона накладывали нагрузку в 25 локальных участках клеточной поверхности. Измерения проводили в области сомы нейрона (рис. 1).

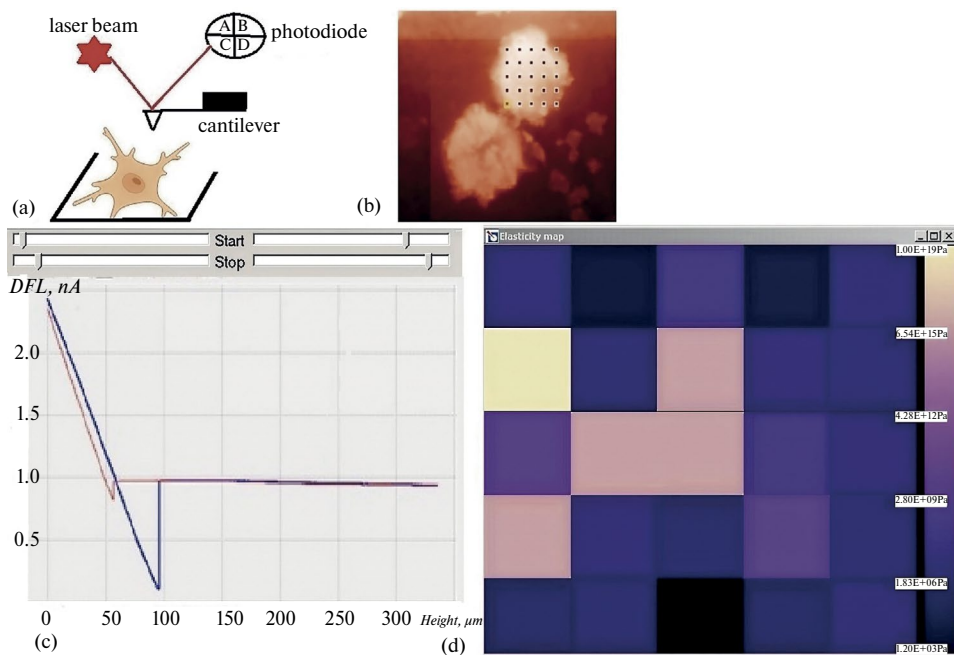


Рис. 1. Процедура атомно-силовой спектроскопии клеточной поверхности нейрона на 1-е сутки дифференцировки в культуре: (а) – принципиальная схема сканирования образца: клетка на подложке; кантилевер, который перемещается по клеточной поверхности; луч лазера настроен на гибкую консоль кантилевера, которая отклоняется при перемещении по поверхности и передает информацию на 4-секционный фотодиод, (б) – изображение нейрона, полученное при сканировании в программном обеспечении Nova с наложением нагрузки (1 нН) в 25 точках поверхности, (с) – кривые подвода (синяя) и отвода (красная) в каждой точке наложения нагрузки, по которым программное обеспечение строит карты локальной упругости, (д) – карта локальной упругости поверхности нейрона (темные участки карты указывают на высокие значения модуля Юнга, а значит и более высокую жесткость поверхности).

Алгоритм процедуры расчета модуля Юнга по силовым кривым подвода и отвода осуществляли в соответствии с ранее опубликованным способом [25]. С каждого стекла отсканировано по 20 клеток. Общее число проведенных измерений 1000.

Метаболический профиль культуры E18 гиппокампа

Оценку энергетического фенотипа нейронов проводили на 14-е сутки дифференцировки клеток в культуре с использованием набора Cell Energy Phenotype (Kit 103325–100, Agilent, США). В наборе использовали олигомицин (ингибитор АТФ-синтазы) и FCCP (митохондриальный разобщитель). Конечная концентрация стрессового раствора олигомицин/FCCP в ячейке составила 1.0/1.0 мкМ. С целью фармакологической блокады рецептора P2X3 блокатор Ro-4 вводили в опытные ячейки (B, C, D) культуральных планшетов за 24 ч до проведения измерений в конечной концентрации 12 нМ. В качестве контроля были ячейки (E, F, H) с культурой без препарата. В каждой опытной и контрольной ячейках выполнено по 3 технических измерения, в которых оценивали скорость потребления кислорода (OCR) и скорость закисления среды (ECAR). Нормализацию результатов проводили по числу клеток, подсчет клеток – после выполненного теста. По результатам измерений строили метаболические карты с помощью программного продукта Nova 1.3 (США) и Multi-File Seahorse XF Cell Energy Phenotype (США).

Статистический анализ

Результаты экспериментальных данных обработаны с использованием пакета описательной статистики Excel 10.0. В исследовании выполнена проверка гипотезы о нормальном распределении. Данные модуля Юнга приведены в виде средних значений со стандартной ошибкой, полученные результаты подвергаются нормальному распределению, в связи с чем для оценки достоверности использовали критерий Стьюдента при $p < 0.05$.

Данные по оценке метаболического профиля приведены на рисунке в виде средних значений со стандартным отклонением, результаты не подчинялись гипотезе нормального распределения, поэтому для оценки достоверности полученных результатов использовали критерий Манна – Уитни для выборок с ненормальным распределением. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался при $p = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модуль Юнга клеточной поверхности культуры нейронов гиппокампа E18

Модуль Юнга клеточной поверхности нейронов находился в пределах от 6.8 ± 0.1 до 9.7 ± 0.2 кПа в контроле, а под действием блокатора P2X3-рецептора диапазон изменений установлен от 3.1 ± 0.1 кПа до 8.5 ± 0.1 кПа. В условиях блокады P2X3-рецептора достоверные различия в значениях модуля Юнга установлены на 5-, 8- и 11-е сутки дифференцировки клеток в культуре (рис. 2). Так, на 5-е сутки дифференцировки в условиях блокады P2X3-рецептора модуль Юнга клеточной поверхности был снижен на 62% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. На 8-е сутки модуль Юнга под действием блокатора увеличился на 22% ($p < 0.05$), а к 11-м суткам снизился на 16.7% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем.

Упруго-эластические свойства клеточной поверхности нейронов изменяются в зависимости от степени дифференцировки клеток в культуре. В контрольной группе максимумы значений модуля Юнга приходятся на 5- и 11-е сутки дифференцировки клеток в культуре. В условиях блокады рецептора P2X3 максимальные значения модуля Юнга зафиксированы на 8-е сутки дифференцировки.

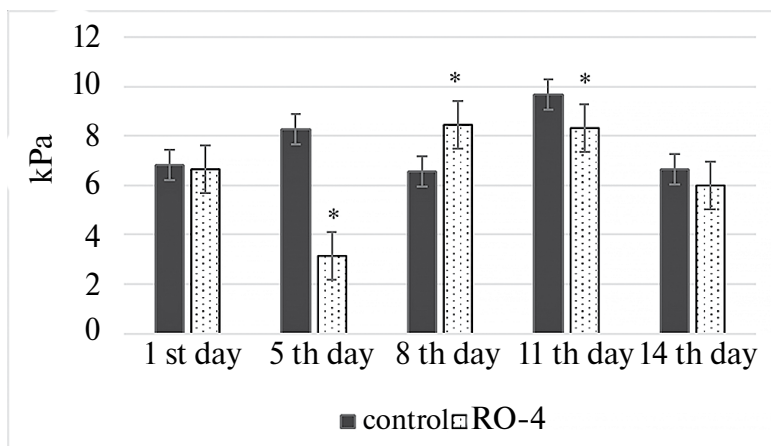


Рис. 2. Модуль Юнга клеточной поверхности первичной смешанной культуры нейронов E18 в условиях блокады P2X3 рецептора. * достоверные различия при $p < 0.05$ по критерию Стьюдента.

В выполненном исследовании проанализировано изменение модуля Юнга в 25 локальных участках клеточной поверхности нейронов отдельно в те дни дифференцировки, в которых установлены достоверные изменения данного параметра. Данные по точкам сгруппированы в зависимости от пространственной локализации, т.е. 1–6, 10–11, 15, 16, 20–25 точки отнесены к краевой зоне клетки, точки 7–9, 12–14, 17–19 – к области ядра и околядерного пространства. Согласно полученным данным, в условиях блокады P2X3-рецептора на 5-е сутки дифференцировки установлено снижение модуля Юнга как по краю клетки, так и в области ядра соответственно на 61% ($p < 0.05$) и 64% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1. Модуль Юнга (кПа) клеточной поверхности нейронов в отдельных зонах клетки по данным карт локальной упругости

Сутки дифференцировки/группы		Краевая зона клетки	Зона в области ядра
5-е сутки	контроль	8.3 ± 0.1	8.3 ± 0.2
	блокатор Ro-4	3.2 ± 0.1*	3.0 ± 0.1*
8-е сутки	контроль	6.5 ± 0.1	6.6 ± 0.2
	блокатор Ro-4	8.4 ± 0.2*	8.5 ± 0.2*
11-е сутки	контроль	9.8 ± 0.2	9.7 ± 0.2
	блокатор Ro-4	8.4 ± 0.2*	8.2 ± 0.2*

Примечание. Данные точек наноиндентирования 1–6, 10, 11, 15, 16, 20–25 – сгруппированы в столбец "Краевая зона клетки", данные точек наноиндентирования 7–9, 12–14, 17–19 сгруппированы в столбец "Зона области ядра"; * – достоверные значения по сравнению с контролем при $p < 0.05$ по критерию Стьюдента.

На 8-е сутки дифференцировки под действием блокатора наблюдали увеличение модуля Юнга на 29% ($p < 0.05$) как по краю клетки, так и в области ядра. К 11-м суткам дифференцировки в условиях блокады P2X3-рецептора модуль Юнга был снижен на 16.6% ($p < 0.05$) по краю клетки и на 18% ($p < 0.05$) в области ядра по сравнению с контролем.

Метаболический профиль культуры E18 гиппокампа

В работе проанализировано влияние блокады P2X3-рецептора на тип клеточного метаболизма. Выделяют четыре состояния, описывающих тип клеточного метаболизма: аэробный – клетка использует преимущественно митохондриальное дыхание, гликолитический – клетка использует преимущественно гликолиз, состояние покоя – когда в клетке сведены к минимуму любые из метаболических путей, энергетический фенотип – когда клетка использует окислительное фосфорилирование и гликолиз. В выполненном исследовании изучен энергетический фенотип и построена метаболическая карта, отражающая соотношение в метаболизме культуры окислительного фосфорилирования и гликолиза в физиологических условиях и при внесении стрессоров (смеси олигомицин/FCCP) на фоне блокады P2X3-рецептора (рис. 3).

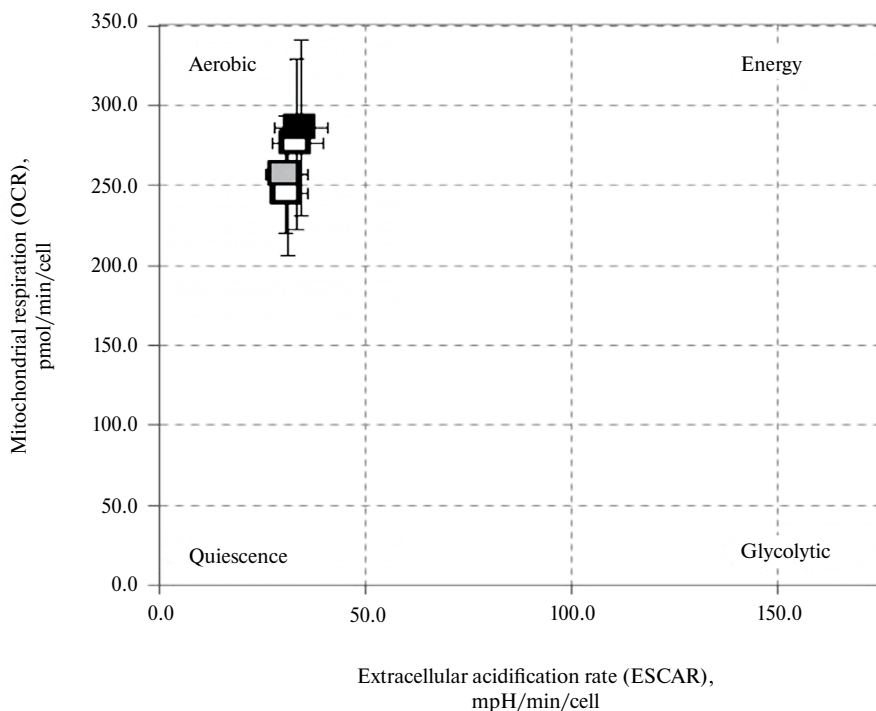


Рис. 3. Метаболическая карта энергетического фенотипа первичной смешанной культуры нейронов: обозначены области дыхания Aerobic – аэробное дыхание; Quiescence – дыхательный покой; Energy – клеточный метаболизм, основанный на смешанном дыхании (окислительное фосфорилирование и гликолиз); Glycolytic – анаэробное дыхание. Серым цветом указана контрольная группа, черным – опытная группа (блокатор Ro-4). Закрашенные квадратики обозначают дыхание до блокады цепи переноса электронов, незакрашенные квадратики означают дыхание после блокады цепи переноса электронов стрессорами.

Под влиянием блокатора рецепторов P2X3 в нейроглиальной культуре гиппокампа E18 не установлено достоверных изменений в параметрах OCR и ESCAR при введении стрессового раствора, блокирующего работу АТФ-синтазы и вызывающего разобщение митохондриального дыхания. Согласно построенной карте биоэнергетического профиля, культура сохраняла достаточно высокий тип аэробного дыхания. Следовательно, энергетический фенотип нейронов под влиянием блокатора не изменился.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании изучено влияние блокады P2X₃-рецептора на изменения упруго-эластических свойств клеточной поверхности и метаболический профиль нейронов гиппокампа. Показано, что в условиях блокады P2X₃-рецептора на 5-е и 11-е сутки дифференцировки жесткость клеточной поверхности снижается, в то время как в контроле – возрастает. Наблюдаемое изменение упруго-эластических свойств клеточной поверхности мы связываем с реорганизацией основных элементов цитоскелета нейронов – актиновых филаментов [26]. В эксперименте доказано, что повышение плотности кортикальной сети актина в подмембранном пространстве приводит к увеличению жесткости клеточной поверхности [27]. Кроме того, области высоких значений модуля Юнга в телах нейронов могут быть связаны с динамической перестройкой и высокой плотностью микротрубочек [28]. Тем не менее основным белком цитоскелета, экспрессируемым в нервной системе, выступает актин [29], он обеспечивает механические свойства клеток, рост дендритов и аксонов [30], а также участвует в транспорте белков, рецепторов и внутриклеточных везикул [31, 32]. На сенсорных нейронах спинномозгового ганглия доказано, что активация комплекса Ерас-РКС усиливает мембранную экспрессию P2X₃R, и этот эффект опосредован F-актином [33]. Однако участки взаимодействия между F-актином и P2X₃-рецептором на данный момент не идентифицированы. В качестве кандидатов, опосредованно влияющих на взаимодействие между P2X₃-рецепторами и F-актином, ученые рассматривают Ca²⁺-зависимые каналы с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPV4), которые взаимодействуют с актином и микротрубочками. Комплекс TRPV4/актин/микротрубочки взаимодействует с комплексом РКС и Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназой (САМК) [34]. Известно, что в состоянии физиологического покоя рецептор P2X₃ связан с Ca²⁺/кальмодулин-зависимой сериновой протеинкиназой (CASK), которая контролирует закрепление его в мембране и ограничивает спонтанное высвобождение АТФ [35]. CASK содержит кальмодулин-связывающий домен с внутренней чувствительностью к Ca²⁺ [36]. При передаче сигнала может реализовываться функциональное взаимодействие между внутриклеточным Ca²⁺, СаМКII и CASK. Доказана тесная ассоциация P2X₃ с CASK, которая во многом зависит от кальциевого канала CaV2.1 и активности САМКII [37]. CASK может также регулировать аутофосфорилирование СаМКII и синаптический рост в глутаматергических мотонейронах [36]. Не исключено, что наблюдаемое на 5-е сутки дифференцировки нейронов в культуре снижение жесткости в условиях блокады сигнального пути от рецептора P2X₃ может быть связано с отсутствием полимеризации F-актина в подмембранном пространстве.

На 8-е сутки дифференцировки в условиях блокады P2X₃-рецептора мы наблюдали увеличение жесткости клеточной поверхности. Данный факт мы связываем с протекающим в культуре глиогенезом и дифференцировкой глиальных клеток. В эксперименте по изучению упруго-эластических свойств стволовых клеток, дифференцирующихся в различные морфологические типы нейронов, было установлено снижение жесткости клеточной поверхности форм с типичной морфологией нейронов через 24 ч и в течение 240 ч дифференцировки в культуре [38]. Сoma истинных нейронов имеет низкие значения постоянной упругости, так как демонстрирует слабые взаимодействия между плазмалеммой и цитоскелетом [39]. Клетки с астроцитарным фенотипом появлялись через 72 ч в культуре, характеризовались более жесткой поверхностью за счет реорганизации актинового цитоскелета, состоящего из сформированных волокон определенного рисунка [39]. Мы полагаем, рост глиальных клеток сделал в целом первичную смешанную культуру нейронов нечувствительной к блокаде P2X₃-рецептора. В одной из экспериментальных работ была проверена гипотеза о том, что в первичных астроцитах крыс только некоторые рецепторы семейства P2 функционально связаны с увеличением концентрации внутриклеточного Ca²⁺. Показано отсутствие Ca²⁺-токов под влиянием агониста P2X₃-рецептора альфа, бета метилен-АТФ (α , β меАТФ) [40]. В корковых астроцитах

крыс АТФ-индуцированный кальциевый сигнал был опосредован P2X₇- и P2Y₁-рецепторами [41]. Следовательно, отсутствие АТФ-индуцированного Ca²⁺-тока в глиальных клетках [42], скорее всего, не приводит к перестройке элементов цитоскелета и, как следствие, к снижению жесткости поверхности на 8-е сутки дифференцировки, что, вероятно, связано с глиогенезом и интенсивным развитием глии в культуре *in vitro*.

Блокада P2X₃-рецептора не оказывала влияния на метаболический профиль культуры на 14-е сутки дифференцировки. Для эмбриональной культуры гиппокампа был характерен аэробный тип дыхания как в контроле, так и при блокаде P2X₃-рецептора. При введении стрессора митохондриального дыхания, блокирующего работу АТФ-синтазы и разобщающего цепь переноса электронов, тип дыхания сохранился в аэробной области, но скорость потребления кислорода немного снизилась как в опытной, так и в контрольной группе. Наблюдаемый эффект является компенсаторным влиянием глиальных клеток. Согласно данным литературы, астроциты функционируют без окислительного фосфорилирования, обеспечивают GSH-зависимый защитный эффект на нейроны, являясь синтезаторами/экспортерами биоэнергетических молекул (лактат/кетонные тела) для окислительного фосфорилирования [43].

Блокада P2X₃-рецептора оказывает влияние на биомеханические свойства поверхности, изменяя ее жесткость. Выявленные изменения упруго-эластических свойств клеточной поверхности нейронов могут быть включены в обеспечение синаптической пластичности в гиппокампе. Роль P2X₃-рецепторов в гиппокампе связана с синаптической передачей и участием в краткосрочной пластичности синапсов мшистых волокон гиппокампа, обеспечивающих передачу возбуждения по цинк-чувствительным АТФ-зависимым каналам на пирамидальные клетки CA3 [44]. В stratum oriens поля CA1 гиппокампа, которая получает сигнал от холинергической септальной области, установлена локализация P2X₃ [13], что указывает на связь данных рецепторов с никотиновыми холинорецепторами на пресинаптическом уровне для контроля чрезмерной активации норадренергических терминалей в гиппокампе [45]. Показано, что ингибирование рецепторов P2X (семейства P2X₃, P2X₄, P2X₆) способствует индукции феномена длительного потенцирования в клетках CA1 гиппокампа, что лежит в основе обучения и памяти [14]. При этом пуринергический синаптический вход может служить основным источником внутриклеточного Ca²⁺ вблизи потенциала покоя [46], что влияет на базальный уровень инактивации рецепторов NMDA и определяет порог индукции потенциалов действия, лежащих в основе обучения и памяти [14].

Еще одним важным аспектом выполненного исследования, требующим более детальных работ на перспективу, является изучение роли митохондрий в регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, связанного с нейрональной возбудимостью и синаптической пластичностью гиппокампа, в условиях блокады P2X₃-рецептора [47]. Показано, что возбудимость нейронов, связанная с чрезмерной экспрессией P2X₃-рецептора, играет ключевую роль в невропатической боли и повышенной возбудимости при эпилепсии [48]. Кроме того, при ноцицепции и повреждении нейронов спинного мозга ингибирование рецепторов P2X₃ достаточно, чтобы снизить их повреждение [49]. Установленное нами отсутствие переключения метаболического фенотипа нейронов в условиях блокады P2X₃-рецептора не дает полного представления о функции митохондриального каскада и продукции АТФ в этих условиях. Необходимы исследования, нацеленные на изучение функционального состояния митохондриальной биоэнергетики в условиях блокады P2X₃-рецептора. Не исключено, что блокада P2X₃-рецептора при таких состояниях, как травмы головного мозга, гипоксия, эпилепсия может явиться молекулярной мишенью для снижения повреждений нейронов за счет митохондриального контроля внутриклеточного кальциевого гомеостаза. Изучение блокады P2X₃-рецептора может расширить фундаментальные представления о роли пуринергической сигнальной системы в формировании сложной морфофизиологии нейронов на ранних стадиях развития эмбрионов в условиях быстрой возбуждающей передачи сигналов, опосредуемой молекулой АТФ.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М. Ю. С. и А. В. Д.), сбор данных (А. С. З., В. С. Ш., Ю. В. С.), обработка данных (А. С. З., М. Ю. С., В. С. Ш., Ю. В. С.), написание и редактирование манускрипта (А. С. З., В. С. Ш., Ю. В. С., М. Ю. С., А. В. Д.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Белгородского государственного национального исследовательского университета (НИУ «БелГУ»), протокол № 01и/23 от 23.01.2023 г.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 23–24–00600). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Papp L, Balázsa T, Köfalvi A, Erdélyi F, Szabó G, Vizi ES, Sperlág B (2004) P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 3: 973–380.
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.066712>
2. Rodrigues RJ, Almeida T, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci* 25: 6286–6295.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0628-05.2005>
3. Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhratsky A (2009) P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158: 137–148.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.076>
4. Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: Pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78: 113–145.
<https://doi.org/10.1254/jjp.78.113>
5. Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240: 31–304.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3)
6. Mishra SK, Braun N, Shukla V, Füllgrabe M, Schomerus C, Korf HW, Gachet C, Ikehara Y, Sévigny J, Robson SC, Zimmermann H (2006) Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* 133: 675–684.
<https://doi.org/doi:10.1242/dev.02233>
7. Brederson JD, Jarvis MF (2008) Homomeric and heteromeric P2X3 receptors in peripheral sensory neurons. *Curr Opin Investig Drugs* 9: 716–725.
8. Burnstock G (2015) Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system. *Curr Med Chem* 22: 819–844.
<https://doi.org/10.2174/0929867321666140706130415>
9. Burnstock G (2017) Purinergic signalling: therapeutic developments. *Front Pharmacol* 8: 661.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00661>
10. Pedata F, Dettori I, Coppi E (2016) Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology* 104: 105–130.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.007>
11. Heine C, Sygnecka K, Franke H (2016) Purines in neurite growth and astroglia activation. *Neuropharmacology* 104: 255–271.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.022>

12. *Heine C, Heimrich B, Vogt J, Wegner A, Illes P, Franke H* (2006) P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neuroscience* 138: 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.056>
13. *Lommen J, Detken J, Harr K, von Gall C, Ali AAH* (2021) Analysis of spatial and temporal distribution of purinergic P2 receptors in the mouse hippocampus. *Int J Mol Sci* 22: 8078. <https://doi.org/10.3390/ijms22158078>
14. *Pankratov YV, Lalo UV, Krushal OA* (2002) Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci* 22: 8363–8369. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-19-08363.2002>
15. *Lüscher C, Malenka RC* (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a005710. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
16. *Cheung K-K, Burnstock G* (2002) Localization of P2X3 receptors and coexpression with P2X2 receptors during rat embryonic neurogenesis. *J Comp Neur* 443: 368–382. <https://doi.org/10.1002/cne.10123>
17. *Gong M, Ye S, Li WX, Zhang J, Liu Y, Zhu J, Lv W, Zhang H, Wang J, Lu A, He K* (2020) Regulatory function of praja ring finger ubiquitin ligase 2 mediated by the *P2rx3/P2rx7* axis in mouse hippocampal neuronal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 318: C1123–C1135. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00070.2019>
18. *Devine MJ, Kittler JT* (2018) Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 19: 63–80. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.170>
19. *Na S, Collin O, Chowdhury F, Tay B, Ouyang M, Wang Y, Wang N* (2008) Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6626–6631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711704105>
20. *Kaech S, Banker G* (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1: 2406–2415. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>
21. *Carter DS, Alam M, Cai H, Dillon MP, Ford APDW, Gevertz J* (2009) Identification and SAR of novel diaminopyrimidines. Part 1: the discovery of RO-4, a dual P2X3/P2X2/3 antagonist for the treatment of pain. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 1628–1631. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.003>
22. *Spedden E, Staii C* (2013) Neuron biomechanics probed by atomic force microscopy. *Int J Mol Sci* 14: 16124–16140. <https://doi.org/10.3390/ijms140816124>
23. *Jiang FX, Lin DC, Horkay F, Langrana NA* (2011) Probing mechanical adaptation of neurite outgrowth on a hydrogel material using atomic force microscopy. *Ann Biomed Eng* 39: 706–713. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-0194-0>
24. *Xiong Y, Lee AC, Suter DM, Lee GU* (2009) Topography and nanomechanics of live neuronal growth cones analyzed by atomic force microscopy. *Biophys J* 96: 5060–5072. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.032>
25. *Skorkina MY, Fedorova MZ, Sladkova EA, Muraviov AV* (2012) The use of nanomechanic sensor for studies of morphofunctional properties of lymphocytes from healthy donors and patients with chronic lymphoblastic leukemia. *Bull Exp Biol Med* 154: 163–166. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1899-x>
26. *Lowery LA, Van Vactor D* (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*: 332–343. <https://doi.org/10.1038/nrm2679>
27. *Kronlage C, Schafer-Herte M, Boning D, Oberleithner H, Fels J* (2015) Feeling for filaments: quantification of the cortical actin web in live vascular endothelium *Biophys J* 109: 687–698. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.066>
28. *Spedden E, White JD, Naumova EN, Kaplan DL, Staii C* (2012) Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy. *Biophys J* 103: 868–877. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.08.005>
29. *Coles CH, Bradke F* (2015) Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Curr Biol* 25: R677–R691. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.020>
30. *Pollard TD, Cooper J* (2009) Actin: a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208–1212. <https://doi.org/10.1126/science.1175862>
31. *Verstegen AM, Tagliatti E, Lignani G, Marte A, Stoloro T, Atias M, Corradi A, Valtorta F, Gitler D, Onofri F, Fassio A, Benfenati F* (2014) Phosphorylation of synapsin I by cyclin-dependent kinase-5 sets the ratio between the resting and recycling pools of synaptic vesicles at hippocampal synapses. *J Neurosci* 34: 7266–7280. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3973-13.2014>

32. *Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F* (2010) The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol* 91: 313–348.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.006>.
33. *Gu Y, Wang C, Li G, Huang LY* (2016) EXPRESS: F-actin links Epac-PKC signaling to purinergic P2X3 receptors sensitization in dorsal root ganglia following inflammation. *Mol Pain* 12: 1744806916660557.
<https://doi.org/10.1177/1744806916660557>
34. *Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T* (2010) Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PLoS One* 5: e11654.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011654>
35. *Bele T, Fabbretti E* (2016) The scaffold protein calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase controls ATP release in sensory ganglia upon P2X3 receptor activation and is part of an ATP keeper complex. *J Neurochem* 138: 587–597.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13680>
36. *Gillespie JM, Hodge JJ* (2013) CASK regulates CaMKII autophosphorylation in neuronal growth, calcium signaling, and learning. *Front Mol Neurosci* 6: 27.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00027>
37. *Gnanasekaran A, Bele T, Hullugundi S, Simonetti M, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Nistri A, Fabbretti E* (2013) Mutated CaV2.1 channels dysregulate CASK/P2X3 signaling in mouse trigeminal sensory neurons of R192Q Cacna1a knock-in mice. *Mol Pain* 9: 62.
<https://doi.org/10.1186/1744-8069-9-62>
38. *Soares J, Araujo GRS, Santana C, Matias D, Moura-Neto V, Farina M, Frases S, Viana NB, Romão L, Nussenzveig HM, Pontes B* (2020) Membrane elastic properties during neural precursor cell differentiation. *Cells* 9: 1323.
<https://doi.org/10.3390/cells9061323>
39. *Pontes B, Ayala Y, Fonseca AC, Romão LF, Amaral RF, Salgado LT, Lima FR, Farina M, Viana NB, Moura-Neto V, Nussenzveig HM* (2013) Membrane elastic properties and cell function. *PLoS One* 8: e67708.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067708>
40. *Abbracchio MP, Ceruti S* (2006) Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinerg Signal* 2: 595–604.
<https://doi.org/10.1007/s11302-006-9016-0>
41. *Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonté C, Matteoli M, Verderio C, Abbracchio MP* (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43: 218–223.
<https://doi.org/10.1002/glia.10248>
42. *Abbracchio MP, Saffrey MJ, Hopker V, Burnstock G* (1994) Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience* 59: 67–76.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90099-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90099-x)
43. *Rose J, Brian C, Pappa A, Panayiotidis MI, Franco R* (2020) Mitochondrial metabolism in astrocytes regulates brain bioenergetics. *Neurotransmission and redox balance. Front Neurosci* 14: 536682.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.536682>
44. *Séguéla P, Haghghi A, Soghomonian JJ, Cooper E* (1996) A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci* 16: 448–455.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-02-00448.1996>
45. *Rodrigues RJ, Almeida T, Diaz-Hernández M, Marques JM, Franco R, Solsona C, Miras-Portugal MT, Ciruela F, Cunha RA* (2016) Presynaptic P2X1–3 and α 3-containing nicotinic receptors assemble into functionally interacting ion channels in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 105: 241–257.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.01.022>
46. *Cunha RA, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastião AM* (1996) Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J Neurochem* 67: 2180–2187.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67052180.x>
47. *Levy M, Faas GC, Saggau P, Craigen WJ, Sweatt JD* (2003) Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 278: 17727–17734.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M212878200>
48. *Zhou X, Ma LM, Xiong Y, Huang H, Yuan JX, Li RH, Li JN, Chen YM* (2016) Upregulated P2X3 receptor expression in patients with intractable temporal lobe epilepsy and in a rat model of epilepsy. *Neurochem Res* 41: 1263–1273.
<https://doi.org/10.1007/s11064-015-1820-x>

49. Chen Y, Zhang X, Wang C, Li G, Gu Y, Huang LY (2008) Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 16773–16778.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0801793105>

Elastic Properties of the Cell Surface and Metabolic Profile of an Embryonic Primary Mixed Culture of Hippocampal Neurons under Conditions of P2X3 Receptor Blockade

A. S. Zelentsova^a, V. S. Shmigerova^a, Y. V. Stepenko^a, M. Yu. Skorkina^{a,*}
and A. V. Deykin^a

^aBelgorod State National Research University, Belgorod, Russia

*e-mail: marinaskorkina0077@gmail.com

P2X3-receptors localized in the hippocampus participate in the transmission of excitation and the formation of synaptic plasticity underlying learning and memory. P2X3-receptors are of great importance in the occurrence of neuropathic pain in epilepsy, acute and inflammatory pain of various genesis and localization as well as in the activation and growth of nerves after traumatic brain injury. The aim of the study was to study the elastic properties of the surface and the metabolic profile of neurons in an embryonic primary mixed hippocampal culture under P2X3-receptor blockade. The study was performed on a primary mixed culture of hippocampal neurons obtained from CD1 mice on the 18th day of gestation (E18). The highly selective blocker 5-(5-iodo-2-isopropyl-4-methoxyphenoxy) pyrimidine-2,4-diamine monochloride salt was selected as a P2X3-receptor blocker. To assess the elastic properties of neurons Young's modulus that characterizes the rigidity of the cell surface was measured. Measurements on an atomic force microscope applying a load in 25 local areas of the cell surface were performed. At each point, the force curves of the cantilever approach and retraction were recorded with subsequent calculation of Young's modulus. The metabolic profile of the neuroglial culture in Energy Phenotype test on a *Seahorse HS mini* cell metabolism analyzer (USA) was studied. The Young's modulus of the cell surface of neurons in the control was in the range from 6.8 ± 0.1 to 9.7 ± 0.2 kPa, and under the action of the P2X3-receptor blocker in the range from 3.1 ± 0.1 kPa to 8.5 ± 0.1 kPa. Under the conditions of P2X3-receptor blockade on the 5th day of differentiation the Young's modulus of the cell surface was reduced by 62% ($p < 0.05$), on the 8th day it increased by 22% ($p < 0.05$) and by the 11th day it decreased by 16.7% ($p < 0.05$) compared to the control. Aerobic respiration was characteristic of the embryonic hippocampal culture both in the control and with the P2X3-receptor blockade. Consequently, the blockade of the P2X3-receptor did not affect the metabolic profile of the E18 hippocampal culture. The obtained data indicate the direct participation of the P2X3-receptor in the formation of biomechanical properties of the cell surface in the processes of differentiation and signal transduction. It is possible, that the blockade of the P2X3-receptor will be one of the promising molecular targets that can reduce neuronal damage in brain injuries, neuroinflammation, hypoxia, and epilepsy. In addition, the study of the P2X3-receptor blockade can expand the fundamental understanding of the role of the purinergic signaling system in the formation of complex neuronal morphology at early stages of embryonic development under conditions of rapid excitatory signal transmission mediated by the ATP molecule.

Keywords: culture of hippocampal neurons, P2X3-receptor, elastic properties of neurons, mitochondrial respiration