

І.В.Лушнікова, К.Ю.Воронін, П.Ю.Маляревський, К.Г.Сможаник, Г.Г.Скібо

Вплив киснево-глюкозної депривації різної тривалості на культивовані зрізи гіпокампа щурів

Было проведено исследование морфофункциональных изменений в культивируемых срезах гиппокампа после кислородно-глюкозной депривации (КГД) различной длительности (10, 30 и 60 мин) и последующей нормоксической реоксигенации на протяжении 1, 4 и 24 ч. Жизнеспособность культур оценивали с помощью окрашивания трипановым синим, определения активности лактатдегидрогеназы в культуральной среде и метаболической активности культивируемых срезов с помощью МТТ-теста. Структурные изменения в зоне СА1 культивируемых срезов гиппокампа анализировали с помощью световой и электронной микроскопии. Выявлено, что в течение первого часа после 10 мин КГД деструктивные изменения в культивируемых срезах проявляются незначительно; более того, в этот период наблюдается увеличение метаболической активности клеток. При анализе ультраструктурных изменений через 1 ч после 10 мин КГД отмечено увеличение количества глиальных отростков на единицу площади stratum radiatum зоны СА1 исследуемых культур. Отмечено увеличение количества перфорированных и множественных синапсов по отношению к контролю, где более многочисленны синапсы простого типа. Спустя 4 ч после 10 мин КГД признаки повреждения исследуемых культур начинали проявляться и становились отчетливыми через 24 ч. Таким образом, легкая (10 мин) депривация вызывает пластические изменения в нейронах и приводит к отсроченному их повреждению. После 30 и 60 мин КГД повреждение клеток отмечалось раньше и было более выраженным по сравнению с 10-минутной КГД. Таким образом, нами показана прямая зависимость степени повреждения как от длительности периода КГД, так и от продолжительности реоксигенации. Модель ишемического повреждения в культивируемых срезах позволяет анализировать особенности и механизмы реакции нервных клеток на КГД и может быть использована для тестирования нейропротекторных средств.

ВСТУП

Вивчення особливостей і механізмів розвитку ушкодження клітин мозку внаслідок нестачі кисню та глюкози, що виникає при патології різного генезу, зокрема при ішемічних інсультах є актуальним. Показано, що киснево-глюкозна недостатність – фактор ризику при багатьох нейродегенеративних захворюваннях, а саме: хворобах Альцгеймера та Паркінсона, епілепсії тощо [2, 6]. Ступінь ушкодження мозку та можливість запобігти загибелі нервових клітин залежать від інтенсивності ішемічного впливу та тривалості постішемічного

періоду. Відомо, що тривала ішемія призводить до сильних і швидких ушкоджень або загибелі нервових клітин. У разі короткочасної ішемії нейродегенеративні зміни бувають менше виражені, але розвивається відстрочена загибель клітин [11]. Багато питань щодо динаміки та механізмів розвитку ішемічного ураження мозку залишаються відкритими.

Зрізи, які протягом усього періоду культивування зберігають цитоархітектоніку відповідної ділянки мозку, основні зв'язки між клітинами та їх відростками, широко використовуються для вивчення процесів, що відбуваються при нестачі кис-

ню та глюкози в організмі [3, 12, 14]. Для моделювання *in vitro* ішемічного ушкодження клітин використовується киснево-глюкозна депривація (КГД) [10]. Відомо, що гіпокамп (і, особливо, пірамідні клітини зони СА1 гіпокампа) дуже чутливий до гіпоксії та гіпоглікемії [9].

Метою нашої роботи було виявлення морфологічних і функціональних змін у культивованих зрізах гіпокампа щурів після КГД різної тривалості, а також подальшої нормоксичної реоксигенації.

МЕТОДИКА

Для отримання зрізів гіпокампа використовували щурів 7-добового віку. За допомогою автоматичного чоппера ("McIlwain", Великобританія) робили зрізи товщиною 350 мкм. Культивування зрізів проводили за методом Stoppini [15] на напівпроникних мембранах, розміщених на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5% CO₂) і рідкого середовища (50% MEM, 25% збалансованого сольового розчину Хенкса, 25% термічно інактивованої кінської сироватки; рН 7,3) при 35°C. Середовище культивування змінювали на другу добу інкубації та далі двічі на тиждень. Після 12–14 днів *in vitro* стан культур стабілізувався і вони ставали придатними до експериментів.

КГД створювали утриманням зрізів у спеціальній камері (35°C), в якій кисень повітря був замінений на азот, а в середовищі культивування глюкоза була замінена на сахарозу. Тривалість КГД становила 10, 30 або 60 хв. Надалі зрізи повертали до нормальних умов культивування на 1, 4 або 24 год (нормоксична реоксигенація).

Життєздатність культивованих зрізів оцінювали за методом виключення з клітин вітального барвника трипанового синього [13], а також аналізуючи кількість цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі (kit G4000, "Promega", США) колориметричним мето-

дом. Трипановий синій додавали до культурального середовища у кінцевій концентрації 0,2%. Після відмивання у фізіологічному розчині зрізи фіксували 2,5%-м формальдегідом і підраховували кількість забарвлених клітин у зоні СА1 культивованих гіпокампальних зрізів, розташованих у межах прямокутної зони фіксованого розміру. Відомо, що трипановий синій проходить через плазматичну мембрану клітин у разі її пошкодження та забарвлює компоненти цитоплазми у синій колір. Фермент ЛДГ у нормі знаходиться у цитоплазмі клітин, а при пошкодженні клітинної мембрани вивільнюється у зовнішнє середовище. Таким чином, кількість клітин, забарвлених трипановим синім і активність ЛДГ у культуральному середовищі обернено пропорційні життєздатності культур.

Метаболічну активність визначали за допомогою МТТ-тесту [4]. Принцип методу полягає в тому, що у живих клітинах розчинний МТТ (3-(4,5-диметил-тіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід) внаслідок акцепції вільних електронів з електронно-транспортного ланцюга мітохондрій відновлюється до нерозчинного формазану, який накопичується у цитоплазмі клітин у вигляді темно-синіх кристалів. Кількість утвореного у клітинах формазану прямо пропорційна їх метаболічній активності. Культивовані зрізи були інкубовані протягом 10 хв у культуральному середовищі без фенолового червоного з 0,5 мг/мл МТТ при 35 °C. Надалі культури відмивали холодним фізіологічним розчином та утворений у клітинах формазан розчиняли у суміші ізопропанолу з мурашиною кислотою (95:5). Оптичну густину забарвленого розчину визначали колориметрично при довжині хвилі 545 нм і виражали у відсотках відносно контролю.

Для морфологічної оцінки культивовані зрізи, зафіксовані у суміші 2,5%-го формальдегіду та 2,5%-го глютаральдегіду, заключали у епоксидну смолу за загально-

прийнятою методикою. Напівтонкі зрізи (1–2 мкм завтовшки) забарвлювали метиленовим синім. Пірамідні клітини зони СА1, розташовані у межах прямокутної зони фіксованого розміру, аналізували на світлооптичному рівні (збільшення у 200 разів), підраховуючи кількість нормальних, конденсованих і набряклих клітин.

Ультратонкі зрізи (30–50 нм завтовшки), контрастовані ураніацетатом і нітратом свинцю, аналізували за допомогою електронного мікроскопа JEM100-CX. Проводили якісну оцінку стану нейропіля, а саме, оцінювали співвідношення різних типів синаптичних контактів (прості, перфоровані та множинні) та виразність гліальної реакції в *stratum radiatum* зони СА1 культивованих зрізів гіпокампа.

Статистичну обробку результатів проводили за критерієм t Стьюдента, відмінності вважалися достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Протягом 12–14 діб культивування зрізи гіпокампа повністю очищувалися від клітин, пошкоджених під час виділення, та досягали стабільного стану. Забарвлення зрізів вітальним барвником трипановим синім практично не виявляло ушкоджених клітин (рис. 1, а), а вміст ЛДГ у культуральному середовищі виражався мінімальними значеннями (див. рис. 1, б). Мікроскопічний аналіз напівтонких зрізів органотипових культур гіпокампа показав, що у них зберігається типова топографія клітинних шарів і зон гіпокампа, а нейрони зони СА1 мають традиційну пірамідну форму.

Після утримання культивованих зрізів 10, 30 або 60 хв під час КГД їх

повертали до нормальних умов і продовжували культивування (нормоксична реоксигенація). Морфофункціональну оцінку стану культивованих зрізів проводили відразу, а також через 1, 4 і 24 год після КГД.

Нами виявлено, що протягом першої години після 10 хв КГД немає виражених ознак ушкодження нервових клітин (див. рис. 1, а, б). Більше того, збільшується їхня загальна метаболічна активність (рис. 2). Цей ефект можна пояснити декількома причинами. По-перше, з літературних даних

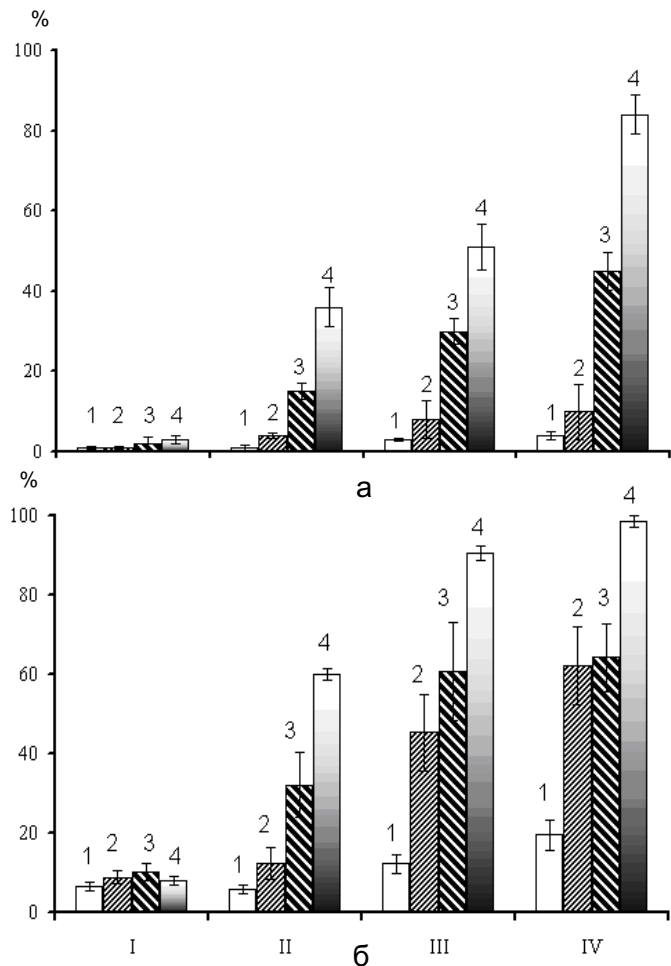


Рис. 1. Зміни життєздатності культивованих зрізів гіпокампа у контролі (I) та після 10- (II), 30- (III) і 60-хвилинної (IV) киснево-глюкозної депривації (КГД): 1 – відразу після КГД, 2 – через 1 год, 3 – через 4 год, 4 – через 24 год після КГД; а – кількість пірамідних клітин зони СА1, забарвлених трипановим синім; б – активність цитозольного ферменту лактат-дегідрогенази у культуральному середовищі

відомо, що церебральна ішемія викликає швидку активацію гліальних клітин [1, 8], отже, збільшення загального рівня метаболізму у культивованих зрізах може відбуватися внаслідок цієї активації. По-друге, КГД може спричиняти індукцію апоптозу, що потребує додаткової енергії [5]. Крім того, показано, що при аноксії/гіпоглікемії відбуваються значні пластичні перебудови у терміналях нервових клітин [7, 12], для чого також потрібна енергія. Ймовірно, всі ці процеси певною мірою призводять до підвищення загальної метаболічної активності протягом першої години після 10 хв КГД.

Нами був проведений електронно-мікроскопічний аналіз *stratum radiatum* зони СА1 культивованих гіпокампальних зрізів через 1 год після 10 хв КГД (рис.3). Показано, що відгалуження астрогліальних клітин, які виявлялися за наявністю специфічних фібрилярних структур, значно більш виражені, ніж у контрольних культурах.

Розрізняли три типи синаптичних контактів: прості, перфоровані та множинні (рис.3,а). У контрольних культурах більш поширені були синаптичні контакти простого типу, тоді як після 10 хв КГД частіше зустрічалися перфоровані та множинні синапси (див.рис.3,б,в), що може свідчити

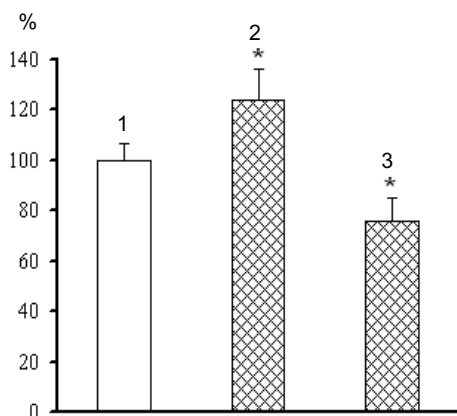


Рис.2. Зміни метаболічної активності (МТТ-тест) культивованих зрізів гіпокампа шурів після 10-хвилинної киснево-глюкозної депривації (КГД): 1 – контроль, 2 – через 1 год після КГД, 3 – через 4 год після КГД

про активацію пластичних змін у синапсах [7].

Проведений нами аналіз напівтонких зрізів також показав, що морфологічні зміни пірамідних клітин зони СА1 культивованих гіпокампальних зрізів виявляються не відразу, а у віддалені терміни. Через 24 год культивування після 10 хв КГД спостерігалось збільшення на $65\% \pm 8\%$ кількості конденсованих клітин і на $10\% \pm 5\%$ – набряклих клітин. Поступове збільшення числа клітин, забарвлених трипановим синім і активності цитозольного ферменту ЛДГ у культуральному середовищі (див. рис. 1,а,б) свідчить про порушення з часом цілісності клітинних мембран.

На відміну від 10-хвилинної КГД, 30- і 60-хвилинні КГД спричиняють більш виразні деструктивні зміни, які виявляються значно раніше. Вже протягом першої години відмічаються ознаки ушкодження мембран, про що свідчить збільшення активності ЛДГ у культуральному середовищі відразу після 30 хв та, особливо, після 60 хв КГД. З часом значення цього показника продовжує збільшуватися в обох випадках. Аналіз змін активності ЛДГ у культуральному середовищі та кількості забарвлених трипановим синім пірамідних клітин зони СА1 (див.рис. 1,а,б) показав, що протягом першої години після КГД ушкоджуються переважно поверхневі клітини культивованих зрізів, які, як відомо [12, 15], є гліальними клітинами; тільки незначна кількість пірамідних клітин зони СА1 забарвлюється трипановим синім. Після 4 год реоксигенації ознаки ушкодження нейронів значно посилюються та проявляються найвиразніше у випадку 60-хвилинної КГД та наступної 24-годинної реоксигенації. Морфологічні зміни у пірамідному шарі зони СА1 проявляються у значному збільшенні кількості набряклих клітин.

Слід відзначити, що в наших експериментах при використанні різних режимів КГД ушкодження клітин носило відстро-

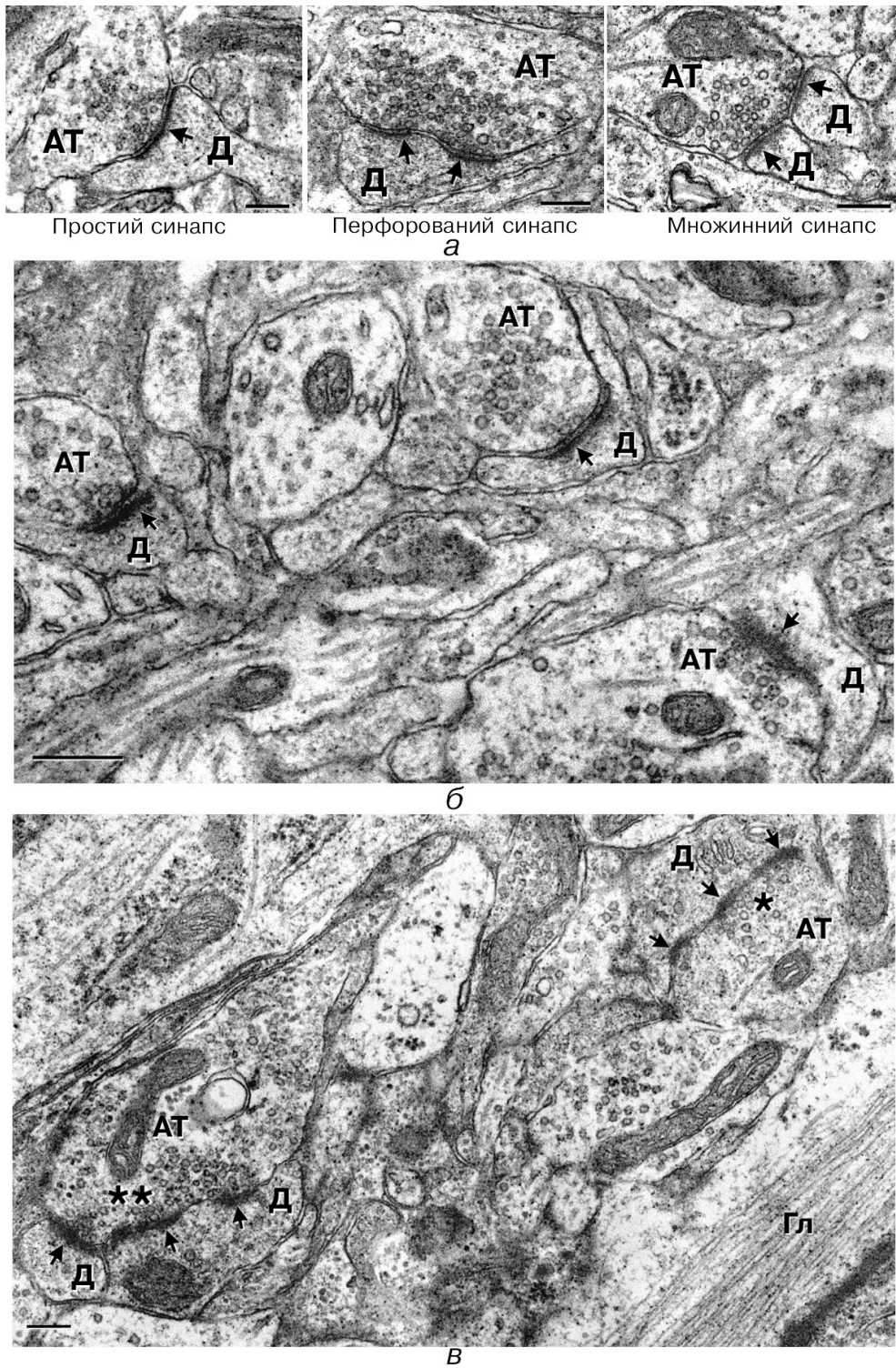


Рис.3. Електронोगрами stratum radiatum зони СА1 культивованих зрізів гіпокампа (АТ – аксонна терміналь, Д – дендрит, Гл – глія; стрілками позначено постсинаптичну щільність). Масштаб – 250 мкм; а – типи синаптичних терміналей; б – фрагмент нейропіля зони СА1 контрольного зрізу з синаптичними терміналями простого типу; в – перфоровані (*) та множинні (**) синапси у зрізах після 10-хвилинної киснево-глюкозної депривації

чений характер: значні ознаки uszkodження клітин зони СА1 спостерігалися тільки після декількох годин нормоксичної реоксигенації. Водночас виявляється пряма залежність ступеня uszkodження клітин гіпокампа у культивованих зрізах від тривалості періоду КГД і часу подальшої нормоксичної реоксигенації. Разом з тим показано, що у ранні терміни після легкої депривації (10 хв) спостерігаються структурні ознаки змін синаптичної пластичності та загальна активація клітинного метаболізму. Така депривація не є руйнівною для клітин тривалий час, що дозволяє більш детально аналізувати особливості та механізми реакції нервової тканини на дефіцит кисню і глюкози та передбачає потенційну можливість запобігання відстроченим деструктивним змінам.

Отримані морфофункціональні характеристики змін у культивованих зрізах гіпокампа поглиблюють сучасні уявлення про ефекти КГД на нервові клітини. Використана нами модель КГД може бути корисна для вивчення механізмів розвитку ішемічного ураження мозку та застосована для тестування нейропротекторних засобів.

**I.V. Lushnikova, K.Voronin,
P.Y.Malyarevsky, K.G. Smozhanyk, G.G.Skibo**

EFFECTS OF OXYGEN-GLUCOSE DEPRIVATION OF DIFFERENT DURATION ON HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES

We studied morphofunctional changes in organotypic hippocampal slice cultures (OHSC) subjected to oxygen-glucose deprivation (OGD) for 10, 30, and 60 min followed by normoxic reoxygenation for 1, 4, and 24 h. Cell viability was estimated using trypan blue (TB) staining, lactate dehydrogenase (LDH) assay, and MTT/formazan assay. Structural changes in CA1 area of OHSC were analyzed by light and electron microscopy. No significant signs of destruction were found in the cultures 1 h following 10 min OGD; moreover, clear increase in cell metabolic activity was determined by MTT/formazan assay. Ultrastructural analysis of CA1 stratum radiatum revealed an increase in the number of glial processes and the number of perforated and multiple synapses as compared to the control, where simple synapses were relatively more numerous. 4 h fol-

lowing 10 min OGD, manifestations of cell damage in the cultures appeared and become profound at 24 h after OGD. We suppose that mild (10 min) OGD leads to plastic changes in neurons and delayed cell damage. 30 and 60 min OGD resulted in more early and pronounced cell damage as compared to 10 min OGD. To conclude, clear dependence of cell damage on the duration of deprivation as well as reoxygenation was observed. The model of ischemic damage in the slice cultures appears convenient to be used to analyze properties and mechanisms of neural cell response to OGD and to test neuroprotective tools.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abraham H., Losonczy A., Czeh G., Lasar G. Rapid activation of microglial cells by hypoxia, kainic acid, and potassium ions in slice preparations of the rat hippocampus // *Brain Res.* – 2001. – **906**. – P.115–126.
2. Afsar N., Kaya D., Aktan S., Aykut-Bingol C. Stroke and status epilepticus: stroke type, type of status epilepticus and prognosis // *Seizure.* – 2003. – **12**, №1. – P.23–27.
3. Bahr B.A. Long-term hippocampal slices: a model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes // *J. Neurosci. Res.* – 1995. – **42**, № 3. – P.294–305.
4. Connelly C., Chen L., Colquhoun S. Metabolic activity of cultured rat brainstem, hippocampal and spinal cord slices // *J. Neurosci. Meth.* – 2000. – **99**, № 1. – P.1–7.
5. Davis P.K., Johnson G.V.W. Energy metabolism and phosphorylation during apoptosis // *Biochem. J.* – 1999. – **340**. – P.51–58.
6. Egashira N., Iwasaki K., Ishibashi M., Hatip-Al-Khatib I., Wolozin B., Mishima K., Irie K., Fujiwara M. Hypoxia enhances β -amyloid-induced apoptosis in rat cultured hippocampal neurons // *Jap. J. Pharmacol.* – 2002. – **90**. – P.321–327.
7. Jourdain P., Nikonenko I., Alberi S., Muller D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia // *J. Neurosci.* – 2002. – **22**. – P.3108–3116.
8. Kato H., Takahashi A., Itoyama Y. Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat // *Brain Res. Bul.* – 2003. – **60**. – P.215–221.
9. Kreisman N.R., Soliman S., Gozal D. Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices // *J. Neurophysiol.* – 2000. – **83**. – P.1031–1038.
10. Laake J., Haug F.M., Wieloch T., Ottersen O. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence // *Brain Res. Prot.* – 1999. – **4**. – P.173–184.

11. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // *Physiol. Rev.* – 1999. – **79**, №4. – P.1431–1568.
12. Muller D., Buchs P.A., Stoppini L. Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures // *Brain Res.* – 1993. – **71**, № 1. – P.93–100.
13. Noraberg J., Kristensen B.W., Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures // *Brain Res. Prot.* – 1999. – **3**. – P.278–290.
14. Sarnowska A. Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death // *Folia Neuropathol.* – 2002. – **40**, № 2. – P.101–106.
15. Stoppini L., Buchs P.A., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue // *J. Neurosci. Meth.* – 1991. – **37**, № 2. – P.173–182.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 21.01.2003