

УДК 612.822:616-005.4:57.086.83

© Колектив авторів, 2012.

ЕКСПРЕСІЯ ФАКТОРІВ ІНДУКОВАНИХ ГІПОКСІЄЮ (HIF) В УМОВАХ МОДЕЛЮВАННЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ГІПОКАМПА IN VITRO

Г.Г. Скибо, А.А. Майстренко, М.О. Орловський, В.Є. Досенко, М.А. Пацева, І.В. Лушнікова
 Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології, м. Київ.

EXPRESSION OF HYPOXIA-INDUCED FACTORS (HIF) AFTER MODELING OF HIPPOCAMPAL ISCHEMIA DAMAGE IN VITRO

G.G. Skibo, A.A. Maistrenko, M.O. Orlovsky, V.E. Dosenko, M.A. Patseva, I.V. Lushnikova

SUMMARY

Changes of level of hypoxia-induced factors (HIF-1 α and HIF-3 α) mRNA expression have been evaluated after modeling of ischemia damage on organotypical hippocampal culture. We have analyzed of CA1 and CA3 neuronal damage under 30 min OGD with 4h-reoxygenation and inhibition of HIF-prolyl-hydroxylase. It was shown that neuronal damage is accompanied by a significant decrease in mRNA expression of HIF-1 α and HIF-3 α in the CA1 area but not in CA3. Addition of HIF-prolyl-hydroxylase inhibitors increases the resistance of hippocampal neurons.

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ГИПОКСИЕЙ (HIF) В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГИПОКАМПА IN VITRO

Г.Г. Скибо, А.А. Майстренко, М.А. Орловский, В.Е. Досенко, М.А. Пацева, И.В. Лушников

РЕЗЮМЕ

В данной работе исследовали изменения уровня экспрессии мРНК факторов, индуцированных гипоксией (HIF-1 α и HIF-3 α) при моделировании ишемического повреждения на органотипической культуре гиппокампа. Проведена количественная оценка жизнеспособности нейронов CA1 и CA3 зон в условиях 30 мин КГД и при ингибировании HIF-пролил гидроксилазы. Показано, что повреждение нейронов при КГД сопровождается снижением экспрессии мРНК HIF-1 α и HIF-3 α в CA1 зоне, но не в CA3. Внесение в среду блокатора HIF пролил-гидроксилазы повышало резистентность нейронов гиппокампа.

Ключові слова: гіпокамп, киснево-глюкозна депривація, HIF.

Кисень та глюкоза є головними факторами існування всього живого на землі. Навіть незначні коливання їх рівня призводять до тяжких та навіть фатальних для організму наслідків. Найбільш чутливими до нестачі кисня і глюкози є тканини мозку. Механізми ішемічного ушкодження залишаються з'ясовані не повною мірою, а пошуки можливостей модулювання наслідків ішемії мозку продовжуються досі. Показано, що активуються складні механізми, які базуються на внутрішньоклітинних міжмолекулярних взаємодіях. Роль факторів індукованих гіпоксією (HIF – від англ. hypoxia-inducible factor) в молекулярних механізмах ішемічного ушкодження розкрита недостатньо.

Метою даної роботи було проведення оцінки рівня експресії HIF у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа при моделюванні ішемічного ушкодження на культивованих зрізах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти проводилися на органотиповій культурі гіпокампа, отриманій з 7-денних шурів лінії Wistar за методом Stoppini [4]. Початкова товщина зрізів становила 300-400 мкм. Стан зрізів простежувався за допомогою інвертованого світлової мікроскопа (Zeiss Telaval 31) на протязі 12-14 днів, після стабілізації культур проводили експериментальні впливи та аналіз згідно з протоколом, рис. 1.

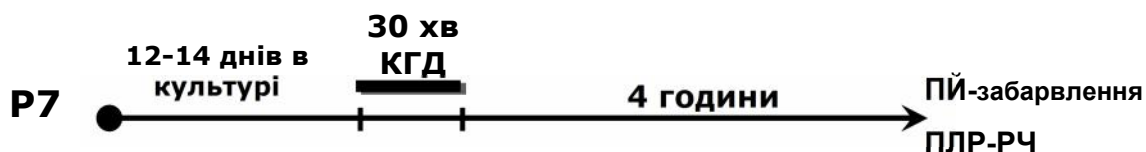


Рис. 1. Схематичне зображення експериментального протоколу.

Киснево-глюкозну депривацію (КГД) створювали у спеціальній камері, де газове середовище містило 95 % азоту (N_2) і 5 % CO_2 , а рідке середовище – ACSF (містить в ммоль: 124 NaCl, 1.6 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 24 $NaHCO_3$, 1,5 $MgSO_4$, 2,5 CaCl₂, 2 аскорбінова кислота; pH 7,2 - 7,4) з додаванням сахарози (10 ммоль) замість глюкози. Тривалість КГД становила 30 хвилин, після чого зрізи двічі відмивали і повертали до нормальних умов культивування (нормоксична реоксигенація).

Оцінка кількості ушкоджених нейронів проводилась через 4 години після КГД. Пропідіум йодид (ПІЙ) у кінцевій концентрації 2мМ додавали до середовища культивування після експериментального впливу. Зображення отримували за допомогою стандартного флуоресцентного мікроскопу обладнаного родаминовим фільтром (XSP-139A-TP, China, довжина хвилі - 530 нм) і цифровою камерою (Canon Power Short G-6). Кількість ПІЙ-позитивних клітин в СА1 та СА3 зонах оцінювали на площі фіксованого розміру (1 mm^2).

Експресія HIF-1 α та HIF-3 α в зрізах гіпокампа досліджувалася на поодиноких клітинах (single cells) екстрагованих з шару пірамідальних клітин СА1 та СА3 областей використовуючи метод поодиноких мікропроб. Екстракція клітин проводилася мікропіпеткою (d-10-20 мкм), використовуючи мікроманіпулятор при контролі світлової мікроскопії (x200). ПЦР-аналіз проводився у реальному часі (ПЦР-РЧ). Рівень експресії факторів індукованих гіпоксією в контрольних зрізах гіпокампа по відношенню до рівня мРНК GADPH – 20-25%, GADPH є білком домашнього господарства та в нашому експерименті використовувався як контроль.

Порівняння між групами були здійснені за допомогою теста Туркі та t-тесту Стьюдента (ANOVA). Статистично вірогідними були визнані дані з $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження проводилися на органотиповій культурі гіпокампа, яка здатна зберігати природну клітинну організацію, нейрональні мережі та синаптичні контакти, притаманні гіпокампі *in vivo*. Для моделювання ішемічного ушкодження використовували КГД. Досліджували ефекти впливу 30 хв КГД на життєздатність та експресію HIF у пірамідних нейронів СА1 і СА3 зон гіпокампа, які характеризуються найбільшою чутливістю до нестачі кисню та глюкози [1]. Експериментальні серії включали: 1 - контрольні необроблені культивовані зрізи гіпокампа; 2 - зрізи, піддані 30 хв КГД та реоксигенації на протязі 4 годин. Загальна схема експериментального протоколу зображена на рис. 1. Ступінь пошкодження нервових клітин оцінювали за допомогою зажиттєвого забарвлення пропідіумом йодидом, який є нетоксичним для клітин та використовується як маркер цілісності мембрани. ПІЙ - стабільний флуоресцентний барвник, що проникає

у клітину в разі ушкодження плазматичної мембрани, взаємодіє з ДНК після чого набуває червоної флуоресценції. Візуальний контроль та врахування ПІЙ-позитивних нейронів дозволяє оцінити динаміку розвитку ушкодження тканини. Раніше було показано, що в умовах нашої модельної системи у СА1 зоні функціональні зміни у нейронах мають відстрочений характер та виявляються через кілька годин після проведення КГД [2].

У теперішній роботі детально проаналізована кількість ПІЙ-забарвлених нейронів у СА1 та СА3 зоні культивованих зрізів. У контрольній серії експериментів наявність ПІЙ-позитивних клітин мала випадковий характер, а їх кількість не перевищувала 5 % від загальної. Після 30-хв КГД та 4-годинної реоксигенації життєздатність нейронів зменшувалася, кількість забарвлених клітин значно зростала (рис. 2). Максимально виражений ефект спостерігається у СА1 зоні, що свідчить про більшу чутливість СА1 нейронів, по відношенню до СА3.

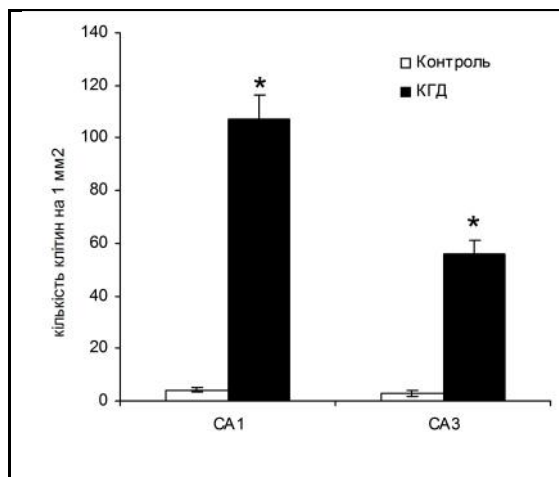


Рис. 2. Кількісна оцінка життєздатності нейронів СА1 та СА3 зон культивованих зрізів гіпокампа в умовах 30 хв КГД та 4-годинної реоксигенації.

Відомо, що нестача кисню та глюкози призводить до системних змін у клітинах та активації ендогенних механізмів, які пов'язані з численними внутрішньоклітинними сигнальними молекулами. Особливий інтерес представляють специфічні білкові фактори, що активуються гіпоксією (HIF, hypoxia-inducible factor). В нашій роботі за допомогою ПЛР-аналізу було оцінено зміни експресії HIF-1 α і HIF-3 α мРНК у СА1 та СА3 зоні культивованих зрізів гіпокампа за умов 30-хв КГД та 4-годинної реоксигенації.

Виявлено, що за нормальних умов експресія HIF-1 α мРНК (субодиниця гіпоксія-індукованого фактору) більш виражена ніж HIF-3 α мРНК в обох зонах, а пірамідальні нейрони СА1 зони мають дещо вищий рівень експресії HIF-1 α мРНК ніж нейрони СА3 зони (СА1 – 0.268 ± 0.002 , СА3 – 0.245 ± 0.006) (рис. 3).

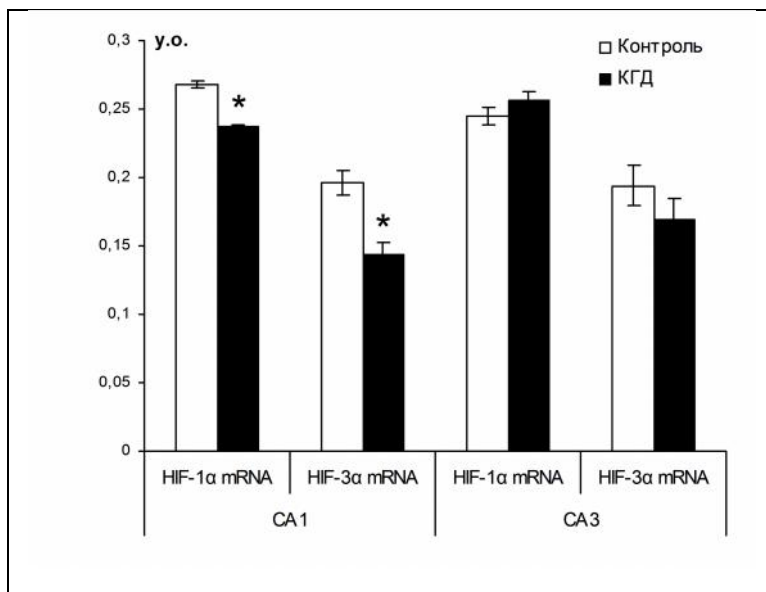


Рис. 3. Рівень експресії мРНК HIF-1α мРНК та HIF-3α мРНК у CA1 та CA3 зонах культивованих зрізів гіпокампа після 30 хв КГД і 4-годинної реоксигенації.

КГД призводить до суттєвого зниження експресії як HIF-1α мРНК (з 0.268 ± 0.002 у контролі до 0.237 ± 0.007) так і HIF-3α мРНК (з контрольного 0.196 ± 0.009 до 0.143 ± 0.010) саме у CA1 нейронах. На відміну від цього у CA3 зоні зміни рівня експресії були недостовірними відносно контрольних значень.

В додатковій серії експериментів нами було використано блокатор ферменту HIF пролил-гідроксилази - ДПД (2,4 pyridinedicarboxylic acid diethyl ester), який попереджає убіквітин-залежну протеасомну деградацію HIF-1α цим ферментом, тобто забезпечує більш стабільний внутрішньоклітинний рівень HIF-1α [3]. Виявлено, що додавання ДПД до контрольних зрізів не впливає на кількість ПЙ-позитивних нейронів в порівнянні з контролем (в середньому складала 4.7 ± 0.9), але за умов внесення ДПД у середовище культивування за 30 хв до КГД попереджало ушкодження нейронів. Кількість ПЙ-позитивних нейронів в CA1 зоні значно зменшувалася (з 107.2 ± 9.2 до 19.2 ± 4.2 на mm^2).

ВИСНОВКИ

ПЛР-РЧ аналіз поодиноких пірамідних нейронів CA1 та CA3 зон культивованих зрізів гіпокампа показав, що індуковане КГД пошкодження супроводжується значним зниженням експресії HIF-1α та HIF-3α мРНК в CA1 зоні. Блокада деградації HIF

інгібітором HIF-пролил гідроксилази попереджала пошкодження нейронів. Таким чином, можна сказати, що HIF є важливими факторами ендогенної регуляції, який, в певній мірі, обумовлює резистентність нейронів в умовах нестачі кисню та глюкози.

Робота проведена за підтримки гранту Державного фонду фундаментальних досліджень - F 46.2/001.

ЛІТЕРАТУРА

- Griesemer, D., Mautes, A.M. Closed head injury causes hyperexcitability in rat hippocampal CA1 but not in CA3 pyramidal cells // J. Neurotrauma. – 2007. – 24. – P.1823-1832.
- Lushnikova, I.V., Voronin, K.Y., Malyarevskyy, P.Y., Skibo, G.G. Morphological and functional changes in rat hippocampal slice cultures after short-term oxygen-glucose deprivation // J. Cell. Mol. Med. – 2004. – 8. – P.241-248.
- Ragunath, M., Sy Wong, Y., Farooq, M., Ge, R. Pharmacologically induced angiogenesis in transgenic zebrafish // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2009. – 378. – P.766-771.
- Stoppini L., Buchs P.A., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue // J. Neurosci. Methods. – 1991. - Vol. 37. – № 2. – P. 173-82.