

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОРГАНОТИПОВИХ ЗРІЗІВ СПИННОГО МОЗКУ В УМОВАХ ДОВГОТРИВАЛОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

Надійшла 01.06.17

Органотипові культури спинного мозку мають певні переваги перед звичайними клітинними системами *in vitro*; в таких препаратах зберігаються цитоархітектоніка, цитоспецифічність клітин, міжклітинні зв'язки та інші характеристики вихідної тканини. Ми проводили структурно-функціональну оцінку органотипових зрізів спинного мозку миші в умовах тривалого (до трьох тижнів) культивування. Як виявилось, у таких органотипових культурах спинного мозку зберігаються типова морфологія клітин та міжклітинні зв'язки, характерні для відповідних спінальних структур. Тому подібна органотипова культура спинного мозку може бути успішно використана в подальших експериментальних дослідженнях, наприклад вивченні пошкоджень спинного мозку різних типів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: спинний мозок, органотипова культура, нейрони, астроцити, олігодендроцити, мікроглія, імуногістохімія, потенціал дії (ПД), спонтанна активність.

ВСТУП

Серед систем *in vitro*, широко вживаних зараз у дослідженнях ЦНС, особливе місце займають органотипові культури нервової тканини, зокрема такі культури спинного мозку (СМ). Так, у дослідженнях з моделюванням травми СМ (розріз на поперековому рівні) використовували органотипові зрізи СМ ембріонів щурів (E13-14) [1]. Органотипові зрізи СМ щурів (P5-7), піддані тривалому культивуванню, були застосовані для оцінки рівня життєздатності стовбурових клітин у мікрооточенні ураженої тканини СМ [2]. Для органотипових зрізів СМ щурів (P7-9), культивованих на фібриновому гелі, були отримані оцінки відновлення зв'язків між мотонейронами [3]. Подібна методика взагалі відкриває істотні можливості для отримання кількісних оцінок ураження нервової тканини [4].

Культивування *in vitro* дозволяє досліджувати нейронні системи СМ протягом тривалого часу, забезпечуючи їх відносно стабілізований стан. В

органотипових зрізах порівняно з кокультурами клітин (нейронів, астроцитів та олігодендроцитів) значно краще зберігаються тканинна організація та міжклітинні контакти, наявні в природних умовах. На відміну від звичайних клітинних систем *in vitro*, в органотипових зрізах протягом тривалого часу культивування зберігаються нативна цитоархітектоніка, цитоспецифічність, нейронна активність та функціональні синаптичні системи. Органотипові культури клітин СМ *in vitro* є перспективним об'єктом для ідентифікації первинних проявів механічного ураження нейронів, встановлення можливих подальших наслідків пошкодження нервової тканини та визначення напрямків розвитку відповідних терапевтичних заходів.

Ми проводили структурно-функціональну оцінку органотипових зрізів СМ в умовах тривалого культивування для встановлення можливостей подальшого використання подібних систем, наприклад в експериментах з моделюванням травм СМ різного походження.

МЕТОДИКА

Приготування та культивування органотипових зрізів СМ. Для отримання органотипових зрізів

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

² Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ (Україна).

³ Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ (Україна).

Ел. пошта: oks.rybachuk@gmail.com (О. А. Рибачук).

СМ використовували ембріонів мишей лінії FVB (E16-17). Поперековий відділ СМ таких тварин виділяли в стерильному охолодженому середовищі Neurobasal-A («Gibco», США), після чого виготовляли поперечні зрізи завтовшки 375 мкм на чоппері («McIlwain», Велика Британія). Культивування таких зрізів протягом до трьох тижнів у CO₂-інкубаторі (5 % CO₂, +37 °C) проводили на напівпроникних мембранах за методом Стоппіні.

Імуногістохімічне забарвлення зрізів СМ. Для ідентифікації клітин СМ використовували подвійне імуногістохімічне мічення таких одиниць антитілами до NeuN (1:200), Iba-1 (1:200), olig-2 (1:200; всі – «Abcam», Велика Британія), GFAP (1:1000; «NB», Велика Британія) та каспази-3 (1:200; «Sigma», США). Після відмивання у фосфатному буфері зрізи обробляли протягом 1 год сумішшю вторинних антитіл, кон'югованих з AlexaFluor-555, AlexaFluor-488 та AlexaFluor-647 (всі – 1:1000; «Invitrogen», США). Імуногістохімічне забарвлення зрізів СМ вивчали з використанням конфокального мікроскопа Fluo View FV1000 («Olympus», Японія), обладнаного цифровою фотокамерою та комп'ютером.

Електрофізіологічні дослідження. Для функціонального підтвердження життєздатності нейронів були отримані петч-клемп-відведення від клітин органотипових зрізів СМ у режимі «ціла клітина». Використовували підсилювач MultiClamp 700B, ЦАП/АЦП Digidata 1320A («Axon Instruments», США) та програмний продукт «pClamp 9.2» («Molecular Devices», США). Під час експериментів зрізи знаходилися в камері, котру перфузували зі швидкістю 1.5–2 мл/хв розчином Кребса, попередньо насиченим сумішшю O₂ (95 %) та CO₂ (5 %). Розчин мав наступний склад (у мілімолях на 1 л): NaCl – 125, KCl – 2.5, глюкоза – 10, NaHCO₃ – 26, NaH₂PO₄ – 1.25, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1 (pH 7.3, осмолярність 310 мОсм). Петч-піпетки виготовляли з боросилікатного скла («Sutter Instruments», США) за допомогою пулера P-87 («Sutter Instruments», США); вони мали опір 3–5 МОм при заповненні розчином наступного складу (в мілімолях на 1 л): K-глюконат – 145, MgCl₂ – 2.5, NEPER – 10, Na₂-АТФ – 2, Na-ГТФ – 0.5 та EGTA – 0.5 (pH 7.2, осмолярність 290 мОм).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

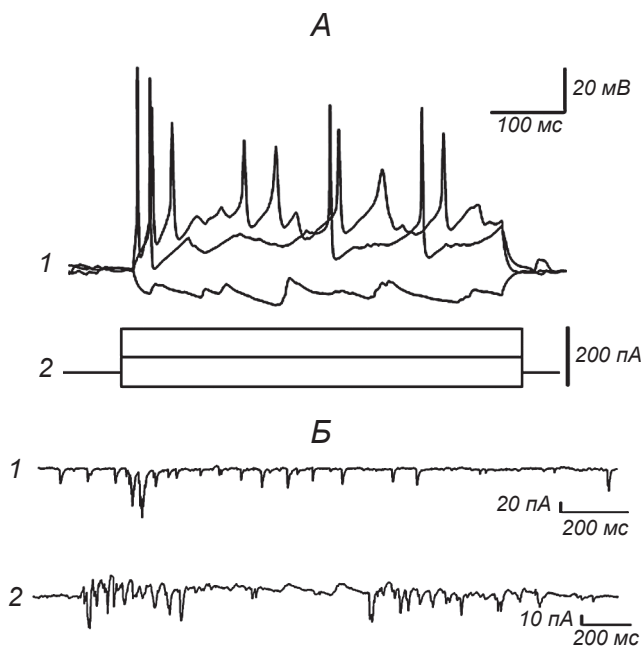
До кінця першого тижня культивування зрізи СМ повністю очищувалися від клітин, пошкоджених під час виділення; стан зрізів був стабільним протягом усього періоду культивування, аж по третій тиждень включно. Культивовані зрізи СМ розплавувались; їх товщина зменшувалася від 375 до приблизно 250–270 мкм.

Результати імуногістохімічного мічення з використанням антитіл до білків NeuN (характерних для ядер нейронів), GFAP (маркера астроцитів), olig-2 (ядерного маркера олігодендроцитів), Iba-1 (маркера мікрогліальних клітин) та каспази-3 (маркера клітин, які загинули внаслідок апоптозу) показали, що культури СМ зберігали типовий клітинний склад, характерний для нервової тканини, протягом як першого, так і другого та третього тижнів культивування. Щільність каспази-3-позитивних клітин протягом усього періоду культивування була практично незмінною.

Для виявлення здатності нейронів у зрізах СМ генерувати потенціали дії (ПД) клітини поверхневих шарів дорсального рогу (*substantia gelatinosa*) стимулювали прямокутними поштовхами струму зростаючої амплітуди, що мали тривалість 500 мс. Із 10 досліджених клітин *substantia gelatinosa* у п'яти спостерігалася лише перезарядка плазматичної мембрани у відповідь на вказану стимуляцію без жодних ознак роботи потенціалкерованих каналів. Скоріш за все, подібні клітини були гліальними. В той же час інші п'ять клітин генерували високоамплітудні ПД, що дозволяє кваліфікувати їх як нейрони (див. рисунок, А).

Щоб визначити можливе залучення нейронів культивованих зрізів СМ у формування нейронних мереж, ми реєстрували фонову синаптичну активність у таких клітинах. Для цього в режимі фіксації потенціалу на рівні –60 мВ записували синаптичні струми. В усіх п'яти досліджених нейронах спостерігалася негативні струми, що вказує на наявність глутаматергічних синаптичних контактів в органотипових зрізах СМ (див. рисунок, Б).

У деяких випадках поряд з негативними струмами реєструвалися струми позитивного напрямку (здебільшого в складі «пачок» синаптичних подій)



Електрична активність нейронів в органотипових культурах (зрізах) спинного мозку (СМ).

А – генерація потенціалів дії нейроном (1) у відповідь на стимуляцію тривалими поштовхами струму (2). Б – приклади спонтанних збуджуючих синаптичних струмів (1) та «пачок» збуджуючих та гальмівних струмів (2) у двох нейронах культивованих зрізів СМ.

(див. рисунок, Б). Цей факт дає підстави для висновку про наявність функціональних гальмівних синапсів та про роботу певних нейронних мереж.

Отже, при тривалому культивуванні органотипових зрізів СМ у певному режимі в таких препаратах зберігаються всі основні типи клітин (нейрони, клітини макро- та мікроглії) та синаптичні зв'язки, які наявні в СМ у фізіологічних умовах. Отримані результати підтверджують можливість використання даної моделі (органотипових культивованих зрізів СМ миші) для подальших експериментів (наприклад, з моделюванням травм СМ різного генезу),

розробки нових способів терапії уражень СМ і тестування впливу різноманітних фармакологічних препаратів на нервову тканину.

У публікації наведені результати досліджень, проведених за грантом Президента України за конкурсним проектом Ф70/19138 Державного фонду фундаментальних досліджень.

Усі експериментальні процедури відповідали міжнародним етичним стандартам – положенням Європейської Конвенції про захист тварин, які використовуються в дослідницьких та інших наукових цілях (86/609/ЄЕС, 1986, Страсбург), та нормативам Комітетів з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України та Національного університету «Киево-Могилянська академія».

Автори даної роботи – О. А. Рибачук, Ю. А. Лазаренко, В. В. Кротов і Н. В. Войтенко – підтверджують відсутність конфліктів щодо комерційних або фінансових інтересів, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. M. Heidemann, J. Streit, and A. Tschertter, "Investigating functional regeneration in organotypic spinal cord co-cultures grown on multi-electrode arrays," *J. Vis. Exp.*, **103**, e53121, doi:10.3791/53121 (2015).
2. H. M. Kim, H. J. Lee, M. Y. Lee, et al., "Organotypic spinal cord slice culture to study neural stem/progenitor cell microenvironment in the injured spinal cord," *Exp. Neurobiol.*, **19**, No. 2, 106-113 (2010).
3. J. Gerardo-Nava, D. Hodde, I. Katona, et al., "Spinal cord organotypic slice cultures for the study of regenerating motor axon interactions with 3D scaffolds," *Biomaterials*, **35**, No. 14, 4288-4296 (2014).
4. M. Ravikumar, S. Jain, R. H. Miller, et al., "An organotypic spinal cord slice culture model to quantify neurodegeneration," *J. Neurosci. Methods*, **211**, No. 2, 280-288 (2012).