

10. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б. Иммуная система, стресс и иммунодефицит. – М.: АПП «Джангар», 2000. – 183с.

11. Сапин М.Р., Этинген Л.Е. Иммуная система человека. – М.: Медицина, 1996. – 304с.

12. Стефанов С.Б. Сравнение морфологических результатов по отношению кумулят // Арх.анат.- 1982.-Т.82, №3.-С.91-94.

13. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Т. Иммунология М.: Медицина, 2002. – 430с.

14. Юшин Е.И., Чернышева О.Е., Кривушев Б.И. Динамика морфофункциональных изменений в иммунокомпетентных органах на фоне иммунотерапии // Буковинський медичний вісник. – 2001.- Т.5, №1-2.- С.190-191.

Лушнікова І.В., Маляревський П.Ю., Воронін К.Ю., Сможаник К.Г., Скибо Г.Г. МОДЕЛЮВАННЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ НА КУЛЬТИВОВАНИХ ЗРІЗАХ ГІПОКАМПУ

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, м.Київ

МОДЕЛЮВАННЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ НА КУЛЬТИВОВАНИХ ЗРІЗАХ ГІПОКАМПУ – Моделювання ішемічного ушкодження мозку проводили на культивованих зрізах гіпокампу щурів за допомогою короткотривалої киснево-глюкозної депривації (КГД). Оцінювали морфологічні зміни (світлова мікроскопія) у СА1 зоні гіпокампу та досліджували механізми, пов'язані з глутаматною ексайтотоксичністю і активацією процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), задіяні у розвитку ушкодження клітин в умовах цієї моделі (оцінка життєздатності та рівня малонового діальдегіду (МДА) при дії МК-801 та U-74389G). Показано, що конденсація та набряклість СА1 нейронів спостерігаються через 1 годину після КГД та стають більш вираженими через 4 години. Встановлено, що, в умовах даної експериментальної моделі, у розвитку ушкодження клітин культивованих зрізів гіпокампу задіяні механізми пов'язані з дією як глутамату, так і вільних радикалів. Використана модель дозволяє вивчати тонкі механізми розвитку ішемічного ушкодження нервових клітин та проводити тестування фармакологічних засобів, спрямованих на корекцію нейродегенеративних порушень.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЗГА НА КУЛЬТИВИРОВАННЫХ СРЕЗАХ ГИППОКАМПА – Моделирование ишемического повреждения проводили на культивированных срезах гиппокампа крыс с помощью кислород-глюкозной депривации (КГД). Оценивали морфологические изменения (световая микроскопия) в СА1 зоне гиппокампа и исследовали механизмы, связанные с глутаматной эксайтотоксичностью и активацией процессов перекисного окисления (ПОЛ), участвующие в развитии повреждения клеток в условиях этой модели (оценка жизнеспособности и уровня малонового диальдегида (МДА) при действии МК-801 и U-74389G). Показано, что конденсация и набухание СА1 нейронов наблюдается через 1 час после КГД и становятся более выраженными через 4 часа. Установлено, что, в условиях данной экспериментальной модели, в развитии повреждения клеток культивируемых срезов гиппокампа участвуют механизмы, связанные с действием как глутамата, так и свободных радикалов. Используемая модель позволяет изучать механизмы развития ишемического повреждения, а также тестировать фармакологические препараты, направленные на коррекцию нейродегенеративных повреждений.

MODELLING OF BRAIN ISCHEMIC DAMAGE ON CULTURED HIPPOCAMPAL SLICES – Modelling of brain ischemic damage was carried out on cultured rat hippocampal slices by oxygen-glucose deprivation (OGD). Morphological changes (light microscopy) in CA1 zone of the hippocampus was analyzed, glutamate and oxidizing mechanisms were investigated (the estimation of viability and lipid peroxidation at the МК-801 and U-74389G action). It was shown that the condensation and swelling of the CA1 neurons was observed in 1h after OGD and was strongly pronounced in 4h. It was determined that the glutamate and reactive oxygen species were enabled to cell ischemia damage in the present experimental model. The used model allows to study mechanisms of ischemic neuronal injury and to test pharmacological agents to correct cure neurodegenerative disorders.

Ключові слова: моделювання ішемічного ушкодження мозку, культивовані зрізи гіпокампу, киснево-глюкозна депривація.

Ключевые слова: моделирование ишемического повреждения мозга, культивированные срезы гиппокампа, кислородно-глюкозная депривация.

Key words: modelling of brain ischemia damage, hippocampal slice cultures, oxygen-glucose deprivation.

Проблема Функціонування головного мозку в цілому та всі специфічні для нервової тканини процеси (проведення нервового імпульсу, синаптогенез, зберігання і переробка інформації та ін.) знаходяться в тісній залежності від

рівня енергетичного обміну, який, перш за все, забезпечується надходженням кисню та глюкози з кровотоком. Будь-які порушення кровотоку неминуче призводять до пошкодження клітин мозку. Мозковий інсульт, що виникає внаслідок обмеженого надходження кисню та глюкози, є однією з причин пошкодження клітин та порушення функцій мозку. Згідно з даними ВООЗ, інсульт щорічно уражує в світі близько 20 млн. людей, з яких 5 млн вмирають [1].

Розуміння патогенезу ішемії мозку поступово поглиблювалось протягом останніх десятиріч. На сьогодні виділяють декілька основних молекулярних механізмів ішемічного ушкодження клітин мозку: глутаматна ексайтотоксичність, неконтрольоване збільшення в цитоплазмі нейронів концентрації іонів Ca²⁺, утворення вільних радикалів [2, 3, 4]. В результаті гіперактивації цих механізмів відбуваються численні деструктивні зміни клітин та їх загибель. Досі не знайдені ефективні засоби корекції нейродегенеративних станів, спричинених ішемією мозку. Вивчення особливостей розвитку та механізмів ушкодження головного мозку при ішемії тривають. Дослідження такої спрямованості є актуальними, вони націлені на можливість запобігання загибелі нервових клітин. Важливим завданням на цьому шляху є розробка адекватних та придатних для досліджень експериментальних моделей *in vitro*.

Мета роботи Метою даної роботи було виявлення морфологічних змін у СА1 зоні культивованих зрізах гіпокампу при моделюванні ішемічного ушкодження мозку за допомогою киснево-глюкозної депривації (КГД) та вивчення механізмів, що задіяні у розвитку ушкодження клітин в умовах цієї моделі.

ОСНОВНА ЧАСТИНА Об'єктом наших досліджень була обрана органотипова культура (культивовані зрізи) гіпокампу оскільки, як відомо, гіпокамп є найбільш чутливий до недостатку кисню та глюкози, що виникає при ішемії [6], а культивовані зрізи зберігають цитоархітектоніку тканини, типи клітин та шарів, первинні міжклітинні зв'язки, синаптичну організацію, розташування рецепторів, які сформовані в природних умовах [10].

Для одержання культур, в наших експериментах було використано 15 самок щурів лінії Вістар віком 7 діб. При виконанні роботи були дотримані міжнародні принципи Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Умертвіння проводилося миттєвою декапітацією. Культивування зрізів гіпокампу проводили за методом Stoppini [5, 10] який запропонував вирощування тканинних зрізів на межі газового (повітря з 5 % CO₂ - інкубатор) та рідкого (50 % MEM, 25 % Хенкс, 25 % кінської сироватки) середовища, використовуючи спеціальні вкладники з напівпроникною мембраною. Зрізи товщиною 300-400 мкм були розміщені на мембрані, вкладники ставили в 6-лункові планшети, у яких знаходилося рідке поживне середовище. Культивування проводили у CO₂-інкубаторі, де підтримувалася постійна температура (35°C) та рівень вуглекислого газу (5 %). Зміна поживного середовища відбувається без механічно-

го пошкодження тканини двічі на тиждень. Протягом 12-14 днів культивування зрізи гіпокампу повністю очищувалися від клітин, пошкоджених під час виділення, та досягали стабільного стану. Морфологічна оцінка культивованих зрізів гіпокампу при нормальних умовах продемонструвала високу якість культур, що дозволило нам використовувати цей об'єкт у подальших дослідженнях.

Найчастіше для моделювання ішемічних умов *in vitro* використовують киснево-глюкозну депривацію (КГД) [7]. Для створення умов, подібних тим, що виникають у випадках ішемії мозку, ми розташували культури у спеціальній камері, де кисень повітря було замінено на азот, а у середовищі культивування глюкозу замінювали на сахарозу, яка не може бути використана клітинами для енергетичних потреб, але утримує осмолярність розчину. Нами була обрана короткотривала 10-хвилинна КГД, яка є не сильно руйнівною і дозволяє простежити зміни, що відбуваються у культивованих зрізах. Після КГД зрізи повертали до нормальних умов культивування та аналізували через 1 або 4 години, оскільки відомо, що ушкодження клітин відбувається не відразу, а зміни мають відстрочений характер [8, 9]. Оскільки відомо, що нейрони СА1 зони гіпокампу є найбільш чутливі до недостатку кисню та глюкози зоною гіпокампу, ми зосередили наші дослідження саме на цій зоні.

Морфологічну оцінку нейронів СА1 зони культивованих зрізів гіпокампу проводили за допомогою світлової мікроскопії після заключення в смолу (за загальноприйнятою методикою) та забарвлення метиленовим синім. При морфологічному аналізі контрольних зрізів СА1 зону склали неушкоджені нейрони пірамідальної форми з добре вираженими ядрами. Ушкодження проявлялося у двох основних формах: конденсації ядра і цитоплазми або загальної набрякlosti нейронів. За першу годину реоксигенації після 10 хв КГД кількість нормальних СА1 нейронів становила $79,62 \pm 0,3$ відносно загальної кількості клітин у зоні підрахунку фіксованого розміру ($97,35 \pm 0,88$ у контролі, $p < 0,001$) (рис. 1), кількість конденсованих клітин збільшувалася з $2,65 \pm 0,88$ у контролі до $18,04 \pm 0,3$ після КГД ($p < 0,001$), з'являлися набряклі клітини. Після 4 годин реоксигенації зміни у співвідношенні різних типів клітин були ще більш виражені: $25,49 \pm 3,6$ - нормальні ($p < 0,001$), $58,83 \pm 1,59$ - конденсовані ($p < 0,001$) та $15,68 \pm 1,64$ - набряклі ($p < 0,01$).

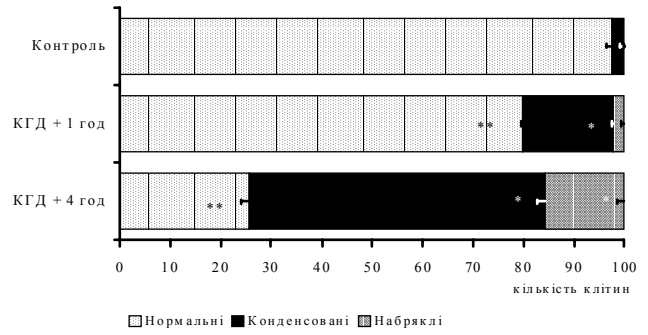
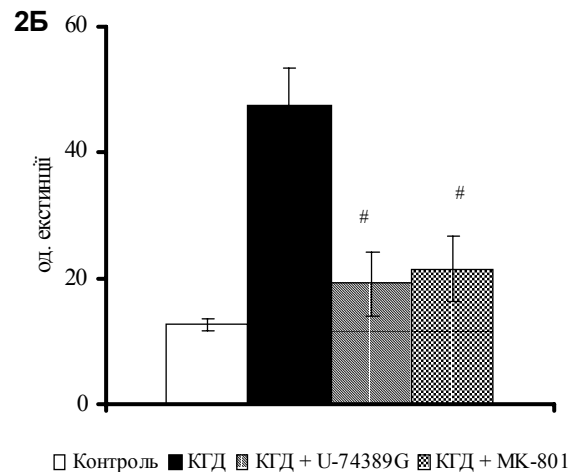
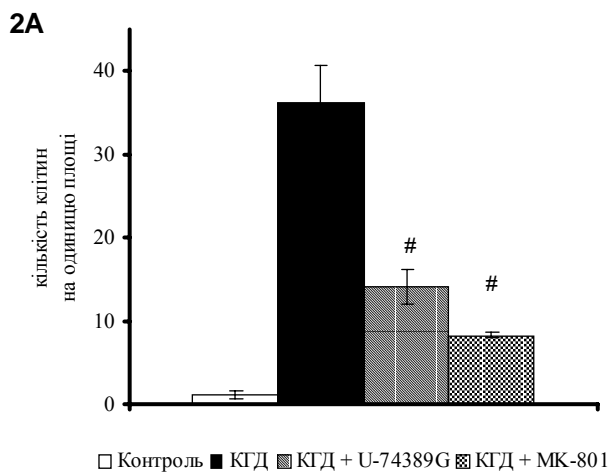


Рис.1. Аналіз співвідношення нормальних, конденсованих та набряклих СА1 нейронів культивованих зрізів гіпокампу після 10-хвилинної киснево-глюкозної депривації.

Відомо, що розвиток пошкодження мозку при ішемії пов'язаний з глутаматною ексайтотоксичністю та активацією процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) внаслідок дії вільних радикалів [1, 2, 3, 4]. Щоб оцінити наявність цих процесів в нашій моделі ішемічного ушкодження та їх вплив на життєздатність клітин органотипової культури гіпокампу в умовах КГД, нами були використані: антагоніст глутаматних рецепторів МК-801 та інгібітор ПОЛ (представник групи лазароїдів) — U-74389G. Оцінку стану культур проводили через 4 години після 10 хв КГД, вимірюючи кількість клітин, забарвлених вітальним барвником трипановим синім та рівень у культуральному середовищі малонового діальдегіду (МДА), одного з кінцевих продуктів перекисного окислення ліпідів.

За даними обчислення клітин, забарвлених вітальним барвником трипановим синім, у контрольних зрізах число ушкоджених нейронів було мінімальним. Через 4 год після 10 хв КГД їх кількість значно збільшувалася. Додавання у культуральне середовище МК-801 (10 мкМ) або U-74389G (25 мкМ) запобігало ушкодженню клітин (рис. 2А).

Оцінка рівня ПОЛ проводилася по накопиченню в культуральному середовищі малонового діальдегіду (МДА) через 4 години після КГД. Виявлено, що в умовах КГД перекисне окислення ліпідів значно підсилюється. Присутність U-74389G та МК-801 у культуральному середовищі перешкоджає посиленню ПОЛ (рис. 2Б).



* - $p < 0,01$ порівняно з контролем
- $p < 0,01$ порівняно з КГД

Рис. 2. А. Оцінка життєздатності клітин з допомогою вітального барвника трипанового синього в умовах 10-хвилинної КГД в присутності U-74389G та МК-801 Б. Оцінка кількості малонового діальдегіду (МДА) при дії U-74389G та МК-801 в умовах 10-хвилинної КГД (термін після КГД - 4 год).

Дані результати свідчать про наявність в умовах нашої моделі активації як глютаматної ексайтотоксичності, так і процесів ПОЛ та про їх непосредний вплив на розвиток ушкодження клітин при КГД.

ВИСНОВКИ Представлена експериментальна модель є дуже вдалою для вивчення динаміки та механізмів розвитку ушкодження нервових клітин в умовах нестачі кисню та глюкози, яка спостерігається при ішемії мозку, і може бути застосована для тестування нейропротекторних засобів.

Отримані дані демонструють, що 10 хв КГД призводить до поступового розвитку ушкодження СА1 нейронів. Морфологічні зміни (конденсація та набряклість СА1 нейронів) спостерігаються через годину реоксигенації та стають більш вираженими через 4 години.

Встановлено, що в умовах нашої експериментальної моделі у розвитку ішемічного ушкодження клітин культивованих зрізів гіпокампу задіяні механізми пов'язані з дією як глютамату, так і вільних радикалів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга: Монография. – М.: Медицина, 2001. – 328 с.

2. Винничук С.М., Черенко Т.М. Ишемический инсульт: эволюция взглядов на стратегию лечения: Монография – К.: ООО Комполис, 2003. – 120 с.

3. Chan P.K. Cerebral Ischemia. – New Jersey, Totowa: Humana Press, 1999. – P. 105-125.

4. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view // Trends Neurosci. – 1999. – Vol. 22, № 9. – P. 391-397.

5. Fedoroff S., Richardson A. Protocols for neural cell culture. – Totowa, New Jersey: Humana Press. – 2001. – P. 13-27.

6. 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.

7. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol.Rev. – 1999. – 79, № 4. – P. 1431-1568.

8. 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. – Vol. 8, № 2. – P. 241-248.

9. Nikonenko I., Jourdain P., Muller D. Presynaptic remodeling contributes to activity-dependent synaptogenesis // J. Neurosci. – 2003. – Vol. 23, № 24. – P. 8498-8505.

10. 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.

Мардар Г.І., Трибовська С.В., Савчук Г.Г.

ДИНАМІКА ЗМІН МОРФОЛОГІЇ ПЕЧІНКИ ПРИ ДІЇ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ (РВ) І СУМІШІ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ (СВМ)

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

ДИНАМІКА ЗМІН МОРФОЛОГІЇ ПЕЧІНКИ ПРИ ДІЇ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ (РВ) І СУМІШІ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ (СВМ) – При окремій і сумісній дії тотального одноразового рентгенівського опромінення (РО) в дозі 0,5 Гр і вживання суміші СВМ (PbCl₂, CuCl₂, ZnCl₂ в концентраціях 1 мг/л, 10 мг/л, 10 мг/л відповідно) на 2-у добу після опромінення і закінчення вживання СВМ зростала відносна маса печінки і залишалася такою на 20-у добу після поєднаної дії чинників. У мазках органа спостерігалось збільшення частки клітин з великими (< 7,50 мкм) і зменшення - з дрібними ядрами, тобто клітин мікроциркуляторного русла (МЦР). Ці зміни пов'язані з явищами дистрофії і компенсаторної гіпертрофії клітин і тривали в період від 2-ї до 20-ї доби.

ДИНАМІКА ИЗМЕНЕНИЙ МОРФОЛОГИИ ПЕЧЕНИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ (РИ) И СМЕСИ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (СТМ) – На фоне отдельного и совместного действия тотального одноразового рентгеновского облучения (РО) в дозе 0,5 Гр и употребления смеси СТМ (PbCl₂, CuCl₂, ZnCl₂ в концентрациях 1 мг/л, 10 мг/л 10 мг/л соответственно на протяжении одного месяца) на 2-е сутки после облучения и окончания приёма СТМ увеличилась относительная масса печени и оставалась такой на 20-е сутки после совместного действия факторов. В мазках органа наблюдалось увеличение процента клеток с большими (< 7,50 мкм) и уменьшение процента клеток с мелкими ядрами, то есть клеток микроциркуляторного русла (МЦР). Эти изменения сопряжены с явлениями дистрофии, компенсаторной гипертрофии и регенерации клеток и продолжались в период со 2-х до 20-ти суток.

DYNAMICS OF LIVER MORPHOLOGIC CHANGES AFTER ACTION OF ROENTGEN IRRADIATION (RI) AND HEAVY METALS SALTS MIXTURE – On the background of separate and joint action of single Roentgen irradiation (RI) of 0,5 Gr dose and using of PbCl₂, CuCl₂, and ZnCl₂ mixture (in concentration of 1 mg/l, 10 mg/l, 10 mg/l accordingly, with drinking water during one month) the relative liver mass increased on the second day and it remained the same on the 20th day after the joint action. In the smears of organ was observed the increase of percentage of cells with big nuclei (< 7,5 mm) and the decrease of percentage of cells with small nuclei that is cells of microcirculatory channel (MCC). These changes are connected with the phenomena of dystrophia, and compensated hypertrophy of cells. They lasted from the second to the 20th day.

Ключові слова: рентгенівське опромінення, солі важких металів, структура печінки.

Ключевые слова: рентгеновское облучение, соли тяжелых металлов, структура печени.

Key words: Roentgen irradiation, salts of heavy metals, structure of liver.

ВСТУП Зростання захворюваності населення України у зв'язку з дією малих доз радіації, забруднення довкілля СВМ [1,3,11] ставить дослідження реакції печінки на вплив даних антропогенних чинників в ряд актуальних проблем медицини і біології. Про це свідчить значне число наукових досліджень з їх розв'язання [4,5,6]. Проте динаміка реактивних структурних змін органа при поєднаній дії двох чинників (невисоких доз опромінення і малих концентрацій СВМ) досі маловивчена, хоч патологія печінки часто зустрічається в житті людей. **Метою** нашої роботи стало вивчення гістологічними методами динаміки (протягом 20-и діб) реакційних процесів у печінці за умов сумісної дії РВ і СВМ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Досліди проводили на 128 статевозрілих самцях білих щурів з початковою масою 150-200 г. Усі тварини були розподілені на 4 групи по 32 щури в кожній групі. Тварин піддавали одноразовому рентгенівському опромінюванню в дозі 0,5 Гр за допомогою рентгенівського діагностичного апарата 12П6 ("Lachema", Чехія) за таких умов: напруга 90 кВ, сила струму 40 мА, фільтр 0,5 мм Cu, шкірно-фокусна відстань 48 см, потужність дози 0,258 мКл/с. Суміш СВМ (PbCl₂, CuCl₂, ZnCl₂ в концентраціях 1 мг/л, 10 мг/л 10 мг/л з розрахунку на метал відповідно, що становить 10 ГДК для води водних об'єктів) щури отримували з питною водою протягом одного місяця. Тварин кожної групи розбивали на 4 підгрупи (по 8 тварин) і умертвляли шляхом декапітації на 2-у, 4-у, 7-у та 20-у доби після опромінення, вилучаючи печінку. Індекс маси печінки розраховували за формулою: масу органа х 100 і ділили на масу тіла конкретної тварини. Шматочки з правої частки печінки фіксували за Карнуа. Вивчали особливості гістологічної будови органа. Окрім того, для морфометричного дослідження ядер гепатоцитів виготовляли мазки із паренхіми печінки, які після фіксації в 5 % фор-