

К. В. ЯЦЕНКО^{1,2}, І. В. ЛУШНІКОВА¹, Г. Г. СКИБО¹¹Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ²Неврологічна клініка доктора Яценко, Київ

Дослідження впливу мікрополяризації на нервові клітини при моделюванні запального процесу *in vitro*

Мета — вивчити функціональні зміни в культурі дисоційованих клітин гіпокампа під впливом мікрополяризації (МП) в умовах моделювання запального процесу *in vitro*.

Матеріали і методи. Експерименти проведені на дисоційованій культурі гіпокампа. Розроблено спеціальний пристрій для впливу МП на клітинні культури. Для моделювання запального процесу використовували ліпополісахарид (ЛПС). Оцінювали життєздатність та мітохондріальну активність культивованих клітин за допомогою лактатдегідрогеназного і МТС-тестів відповідно.

Результати. Виявлено найефективнішу концентрацію ЛПС для моделювання запального процесу на культурі дисоційованих клітин гіпокампа. Оптимізовано режим тривалості МП, прийнятний для дослідження ефектів МП в експериментах *in vitro* при моделюванні процесу нейрозапалення. За допомогою лактатдегідрогеназного тесту встановлено, що при додаванні у культуральне середовище ЛПС у концентрації 10 мкг/мл життєздатність гіпокампальних клітин статистично значущо знижується. При дії МП (0,25 мкВ протягом 4 год) за наявності ЛПС показники життєздатності культивованих клітин залишалися високими. МТС-тест показав, що МП суттєво підвищує мітохондріальну активність за нормальних умов і запобігає її зниженню за наявності ЛПС.

Висновки. Оптимізовано умови для дослідження МП в експериментах *in vitro* при моделюванні запального процесу нервової тканини. Встановлено, що МП активізує гіпокампальні клітини за нормальних умов і поліпшує їх життєздатність та функціональну активність за наявності ЛПС.

Ключові слова: мікрополяризація (стимуляція слабким постійним струмом), культура гіпокампальних клітин, нейрозапалення, ліпополісахарид.

Стимулювання структур центральної нервової системи (ЦНС) з використанням слабого (до 1 мА) постійного електричного струму, або мікрополяризація (МП), — це неінвазивний електротерапевтичний метод, розроблений у 1970-х роках. МП широко використовують як допоміжний засіб для підвищення ефективності когнітивних функцій, зокрема пам'яті [7, 9, 13—15] та при таких патологіях, як інсульт, епілепсія, хвороба Альцгеймера та хвороба Паркінсона, нейрозапалення, перинатальна енцефалопатія тощо [3—6, 8, 14]. Показано, що МП головного (транскраніальна) чи спинного мозку (трансвертебральна) має високу клінікофізіологічну ефективність при використанні як у го-

стрий період уражень ЦНС, так і у разі віддалених наслідків при патологічних станах різного генезу [1, 4, 11, 12]. Протективний ефект МП визначається як спрямованим на зони ушкодження впливом постійного струму, так і загальною нормалізацією клітинного і тканинного гомеостазу. Відзначають особливості анодних та катодних ефектів МП [11]. Незважаючи на застосування МП у терапевтичній практиці, механізми дії, які лежать в основі позитивних ефектів МП, маловідомі і потребують кращого розуміння для оптимізації умов використання при патологіях ЦНС.

Для дослідження механізмів функціонування клітин мозку за нормальних умов, виявлення особливостей розвитку ушкодження нервових клітин та пошуку засобів нейропротекції широко викорис-

© К. В. Яценко, І. В. Лушнікова, Г. Г. Скибо, 2018

тують експериментальні моделі *in vitro* на культурах. Це дає змогу досліджувати морфофункціональні зміни на клітинному рівні при моделюванні патологічних станів та виявляти ефекти нейропротекторних чинників, зокрема МП. Дія МП ґрунтується на зміні рівня поляризації клітинної мембрани під впливом постійного струму малої інтенсивності, що певною мірою стабілізує функціонування клітин та нейрональних мереж у міжелектродному просторі [12]. Багато питань щодо безпосереднього впливу МП на нервові клітини досі не з'ясовано. Для досліджень ми використовували довгострокові культури дисоційованих нервових клітин, які відновлюються та зберігають свої функції під час культивування. За таких експериментальних умов є можливість підвести електродну техніку з постійним електричним струмом безпосередньо до шару нервових клітин та оцінити їх стан. Додавання у середовище з культивованими нервовими клітинами бактеріального ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС) дає змогу змоделювати умови, подібні до тих, які виникають при нейрозапальних процесах та лежать в основі патогенезу багатьох захворювань ЦНС.

Мета роботи — вивчити функціональні зміни в культурі дисоційованих клітин гіпокампа під впливом мікрополяризації в умовах моделювання запального процесу *in vitro*.

Матеріали і методи

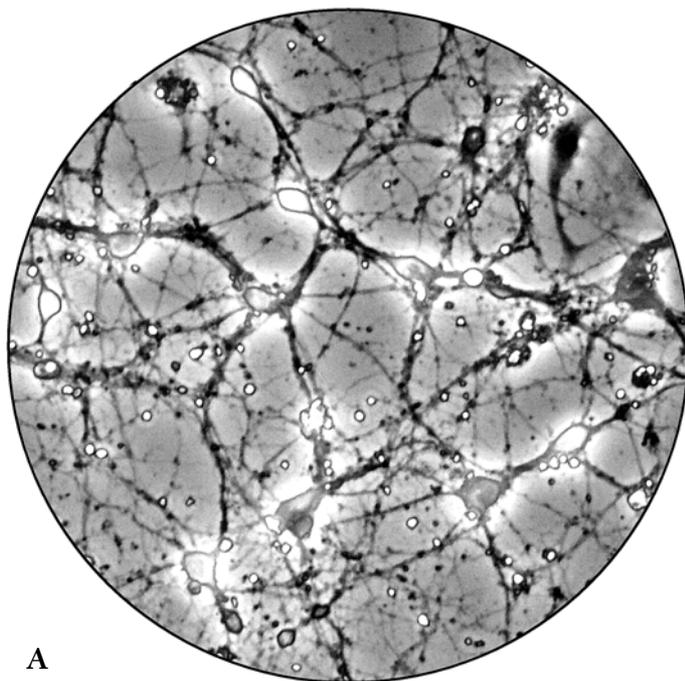
Усі експерименти на тваринах виконано з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, котрих використовують з експериментальною та іншою науковою метою (European convention, Strasburg,

1986), статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також норм біоетики та біологічної безпеки.

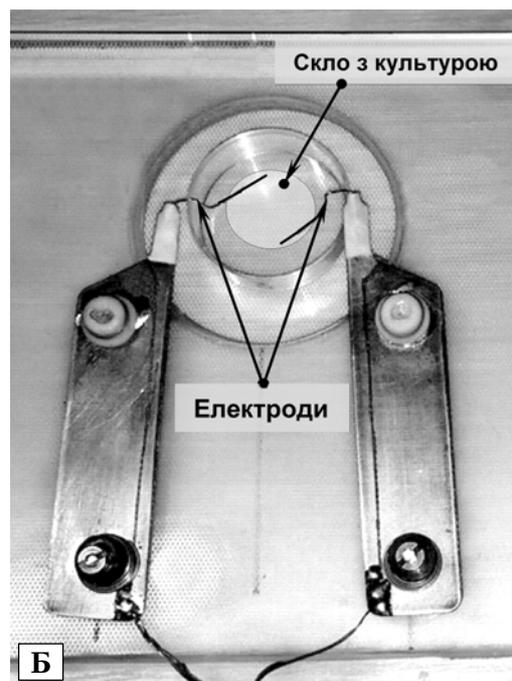
Дисоційовану культуру нейронів гіпокампа отримували від новонароджених щурів [10]. Тканину гіпокампа подрібнювали, трипсинізували (протягом 10 хв), ресуспендували пастерівською піпеткою та відокремлювали від зруйнованих клітин за допомогою центрифугування (200 g) у розчині Кребса з 20 ммоль Нерес та 0,3 % BSA. Клітини наносили на оброблені полі-L-лізином скельця круглої форми (15 000 клітин/см²) та культивували за температури 37 °C в атмосфері з 5 % CO₂. Середовище культивування містило: середовище Neurobasal A, 2 % B27, 0,4 % BSA, 15 ммоль/л НЕРЕС, 0,5 ммоль/л Glutamax, 100/100 од. пеніцилін/стрептоміцин (усі складові виробництва Invitrogen, Sigma, США). Середовище культивування змінювали на другий день інкубації, потім — двічі на тиждень. Протягом 12 днів нейрони в культурі стабілізувалися, досягали зрілого стану та утворювали нейрональні мережі. Прижиттєвий візуальний контроль гіпокампальних культур проводили, використовуючи фазово-контрастний об'єктив та світлооптичний інвертований мікроскоп Zeiss (× 200) (рис. 1А).

Процес запалення моделювали шляхом додавання до культурального середовища основного чинника процесу запалення — ендотоксину ЛПС (L4130, Sigma-Aldrich, США) у трьох концентраціях (0,1, 1,0 та 10,0 мкг/мл) для виявлення оптимальної дози-ефекту для дисоційованих нейрональних культур.

Нами розроблено спеціальний пристрій для впливу МП на клітинні культури (рис. 1Б) з використанням сертифікованого приладу «Реамед-Поля-



А



Б

Рис. 1. Фазово-контрастне зображення культур (× 200) (А) та фото пристрою для проведення мікрополяризації культивованих гіпокампальних клітин (Б)

рис» (Росія) для генерації слабого постійного струму [1]. Електроди занурювали у культуральне середовище з протилежних боків скла, на якому були розташовані гіпокампальні клітини. Для виявлення оптимальних умов впливу слабого постійного струму на культури використовували силу струму 0,25 мА у таких варіантах: 3-разово протягом 30 хв з інтервалом 1 год (МП1), 6-разово протягом 40 хв з інтервалом 1 год (МП2) та безперервно протягом 4 год (МП3). Вплив здійснювали за нормальних умов або за наявності ЛПС (10 мкг/мл).

Для оцінки життєздатності нервових клітин у культурі використовували лактатдегідрогеназний тест. Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) — цитозольний фермент, який вивільняється у культуральне середовище при пошкодженні клітинної мембрани. Інтенсивність забарвлення позаклітинного середовища в результаті ЛДГ-тесту прямо пропорційна кількості ЛДГ та обернено пропорційна життєздатності клітин у культурі [2]. Визначення змін відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі проводили спектрофотометричним методом за допомогою тест-системи CytoTox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США). Після впливу різних концентрацій ЛПС відбирали 200 мкл культурального середовища в 24-лунковий планшет. У кожну лунку додавали 200 мкл субстрату для визначення кількості ЛДГ. Проби інкубували за кімнатної температури в темряві протягом 30 хв. Потім додавали 200 мкл 1% розчину оцтової кислоти, котрий зупиняв реакцію. Оптичну щільність проб вимірювали за допомогою спектрофотометра uniSPEC 2 (LLG, Німеччина) у мікрокуветах за довжини хвилі 492 нм. Зміни відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі виражали в умовних одиницях, які відповідали одиницям оптичної щільності розчину.

МТС/формазановий тест (Promega, Німеччина) виявляє метаболічно активні клітини, оскільки жовтий тетразолій МТС ([3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-5-(3-карбоксиметоксифеніл)-2-(4-сульфофеніл)-2Н-тетразолій] відновлюється до пурпурного водорозчинного формазанового продукту за рахунок активності мітохондріальних ферментів. Для проведення МТС-тесту культури відмивали фізіологічним фосфатно-сольовим розчином (HBSS, Sigma), інкубували з МТС-реактивом (140 мкл/700 мкл) протягом 60 хв за температури 37 °С та спектрофотометрично визначали оптичну густину розчину за довжини хвилі 450 нм (спектрофотометр uniSREC 2, LLG, Німеччина). Кількість формазанового продукту прямо пропорційна до кількості активних клітин. Результати виражали в умовних одиницях, котрі відповідали одиницям оптичної щільності розчину.

Проби для ЛДГ- та МТС-тестів відбирали через 24 год після експериментальних впливів у дублях та визначали середнє значення для кожної лунки. Як контроль використовували: середовище культивування з лунки, де не було культур (значення оптичної щільності якого віднімали від показників,

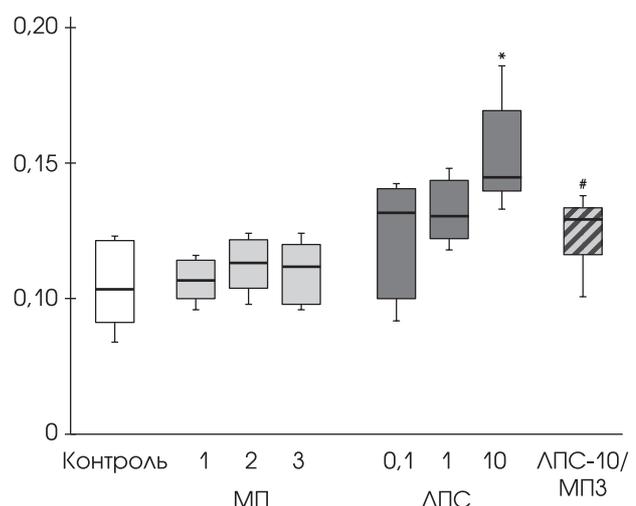
отриманих з експериментальних лунок); середовище культивування з лунки, де містилися культури без впливу ЛПС.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 5.01 (США). Вибірку результатів отримано з трьох експериментів. Дані наведено у вигляді середнього арифметичного значення ($n = 6$) у кожній експериментальній групі та стандартної похибки середнього арифметичного значення (SEM). Отримані дані характеризувалися нормальним розподілом. Статистичну значущість різниці показників визначали з використанням Tukey-тесту (ANOVA). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Об'єктом нашого дослідження була культура дисоційованих клітин гіпокампа, які на момент проведення експерименту (9—12-та доба) відновлювали свій стан та формували нейрональні мережі, зберігаючи традиційну структуру і життєздатність. Перевагами дисоційованої культури нервових клітин є можливість спостереження за змінами морфологічних та функціональних характеристик у нервових клітинах за безпосередньої дії МП. Такі властивості дисоційованої культури важливі для вивчення механізмів дії певних чинників та виявлення їх нейропротекторного потенціалу. В експериментах ми моделювали нейрозапальний процес, використовуючи ендотоксин ЛПС.

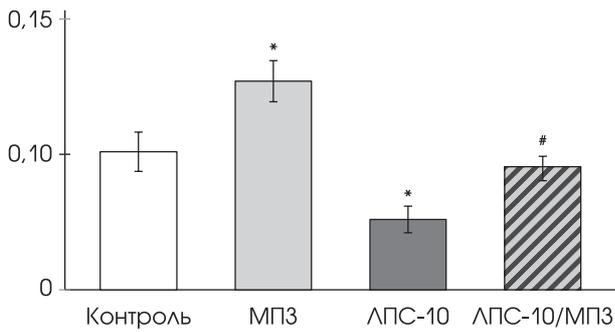
За даними ЛДГ-тесту, який виявляє ступінь життєздатності культивованих клітин, встановлено, що використані концентрації ЛПС чинили односпря-



* Статистично значуща ($p < 0,05$) різниця щодо контролю.

Статистично значуща ($p < 0,05$) різниця щодо ліпополісахариду у концентрації 10 мкг/мл

Рис. 2. Відносна кількість лактатдегідрогенази у культуральному середовищі гіпокампальних культур через 24 год після проведення мікрополяризації у трьох режимах, додавання ліпополісахариду в різних дозах та спільної дії ліпополісахариду і мікрополяризації, ум. од.



* Статистично значуща ($p < 0,05$) різниця щодо контролю.

Статистично значуща ($p < 0,05$) різниця щодо ліпополісахариду у концентрації 10 мкг/мл

Рис. 3. Мітохондріальна активність культивованих гіпокампальних клітин (за МТС-тестом), ум. од.

мований дозозалежний негативний вплив на культивовані гіпокампальні клітини. Найбільш вираженим та статистично значущим ЛПС-ефект був за концентрації 10 мкг/мл (рис. 2). Спектрофотометричний аналіз показав, що через 24 год після додавання ЛПС у такій концентрації у культуральне середовище відносна кількість ЛДГ збільшувалася і становила ($0,153 \pm 0,010$) ум. од. порівняно із контролем ($0,105 \pm 0,010$) ум. од.), що свідчить про суттєве ушкодження гіпокампальних клітин. У концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/мл ушкодження клітин виявлялося меншою мірою.

Мікрополяризація за нормальних умов не впливала на життєздатність культур у всіх варіантах впливу, але за наявності ЛПС (10 мкг/мл) спостерігали статистично значуще зменшення кількості ЛДГ у культуральному середовищі в середньому на

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція і дизайн дослідження — К. Я., Г. С.;

збір та опрацювання матеріалу, написання тексту — І. Л.; редагування — Г. С.

31% щодо ЛПС (див. рис. 2), що свідчить про нейропротекторний ефект МП.

Також досліджено мітохондріальну активність гіпокампальних клітин в умовах найбільш виражених ефектів за зміною життєздатності (ЛДГ-тест), а саме при застосуванні МПЗ та ЛПС у концентрації 10 мкг/мл. За допомогою МТС-тесту показано, що МП призводить до підвищення мітохондріальної активності культивованих нервових клітин як у нормі, так і за наявності ЛПС (рис. 3). Ці дані свідчать про активувальні та нейропротекторні властивості МП.

Таким чином, виявлено, що МП здатна безпосередньо модулювати функціональний стан нервових клітин, зокрема активувати їх метаболізм за нормальних умов та підвищувати їх резистентність за наявності ЛПС.

Висновки

Використана експериментальна модель імітує події, які відбуваються в умовах запалення нервової тканини. Ліпополісахарид у концентрації 10 мкг/мл призводить до пошкодження культивованих гіпокампальних клітин. Мікрополяризація підвищує метаболічну активність нервових клітин у нормі та певною мірою запобігає їх ушкодженню при моделюванні процесу запалення.

Розширено уявлення про нейропротекторні механізми, задіяні при використанні мікрополяризації. Активація клітинного метаболізму підвищує здатність нервових клітин протидіяти впливу негативних чинників запалення.

Отримані дані вказують на широкі перспективи застосування мікрополяризації у медичній практиці при порушеннях ЦНС.

Література

- Шелякин А. М., Пономаренко Г. Н. Микрополяризация мозга. Теоретические и практические аспекты. — СПб: Балтика, 2006. — 224 с.
- Decker T., Lohmann-Matthes M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity // *J. Immunol. Methods.* — 1988. — Vol. 115 (1). — P. 61—69.
- Elsner B., Kugler J., Pohl M., Mehrholz J. Transcranial direct current stimulation (tDCS) for idiopathic Parkinson's disease // *Cochrane Database Syst. Rev.* — 2016. — Vol. 7. — CD010916.
- Grimaldi G., Argyropoulos G. P., Bastian A. et al. Cerebellar Transcranial Direct Current Stimulation (ctDCS): A novel approach to understanding cerebellar function in health and disease // *Neuroscientist.* — 2016. — Vol. 22 (1). — P. 83—97.
- Hordacre B., Moezzi B., Ridding M. C. Neuroplasticity and network connectivity of the motor cortex following stroke: A transcranial direct current stimulation study // *Hum. Brain Mapp.* — 2018. .
- Jones K. T., Stephens J. A., Alam M. et al. Longitudinal neurostimulation in older adults improves working memory // *PLoS One.* — 2015. — Vol. 10 (4). — e0121904.
- Leffa D. T., Bellaver B., Salvi A. A. et al. Transcranial direct current stimulation improves long-term memory deficits in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder and modulates oxidative and inflammatory parameters // *Brain Stimul.* — 2018. pii: S1935—861X (18)30102-5.
- Maar T., Rønn L., Bock E. et al. Characterization of microwell cultures of dissociated brain tissue for studies of cell-cell interaction // *J. Neurosci. Res.* — 1997. — Vol. 47 (2). — P. 163—172.
- Martin D. M., Moffa A., Nikolin S. et al. Cognitive effects of transcranial direct current stimulation treatment in patients with major depressive disorder: An individual patient data meta-analysis of randomised, sham-controlled trials // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 2018. — Vol. 90. — P. 137—145.
- Parkin B. L., Bhandari M., Glen J. C., Walsh V. The physiological effects of transcranial electrical stimulation do not apply to parameters commonly used in studies of cognitive neuromodulation // *Neuropsychologia.* — 2018. pii: S0028—3932 (18)30123-4. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2018.03.030.
- Pelletier S. J., Cicchetti F. Cellular and molecular mechanisms of action of transcranial direct current stimulation: evidence from in vitro and in vivo models // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* — 2015. — Vol. 18 (2). doi:10.1093/ijnp/pyu047.

12. Pelletier S. J., Lagacé M., St-Amour I. et al. The morphological and molecular changes of brain cells exposed to direct current electric field stimulation // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* — 2014. — Vol. 18(5). — P. 1—13. doi: 10.1093/ijnp/pyu090.
13. Richmond L., Wolk D., Chein J., Olson I. transcranial direct current stimulation enhances verbal working memory training performance over time and near-transfer outcomes // *Journal of Cognitive Neuroscience.* — 2014. — Vol. 26(11). — P. 2443—2454.
14. Spezia Adachi L. N., Caumo W., Laste G. et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model // *Brain Res.* — 2012. — N 1489. — P. 17—26. doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.009.
15. Yavari F., Jamil A., Mosayebi Samani M. et al. Basic and functional effects of transcranial Electrical Stimulation (tES)-An introduction // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 2018. — Vol. 85. — P. 81—92. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.06.015.

Е. В. ЯЦЕНКО^{1,2}, И. В. ЛУШНИКОВА¹, Г. Г. СКИБО¹

¹Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины, Киев

²Неврологическая клиника доктора Яценко, Киев

Исследование влияния микрополяризации на нервные клетки при моделировании воспалительного процесса *in vitro*

Цель — изучить функциональные изменения в культуре диссоциированных клеток гиппокампа под воздействием микрополяризации (МП) в условиях моделирования воспалительного процесса *in vitro*.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на диссоциированной культуре гиппокампа. Разработано специальное устройство для воздействия МП на клеточные культуры. Для моделирования воспалительного процесса использовали липополисахарид (ЛПС). Оценивали жизнеспособность и митохондриальную активность культивируемых клеток с помощью лактатдегидрогеназного и МТС-тестов соответственно.

Результаты. Выявлена наиболее эффективная концентрация ЛПС для моделирования воспалительного процесса на культуре диссоциированных клеток гиппокампа. Оптимизирован режим продолжительности МП, пригодный для исследования эффектов МП в экспериментах *in vitro* при моделировании процесса нейровоспаления. С помощью лактатдегидрогеназного теста установлено, что при добавлении в культуральную среду ЛПС в концентрации 10 мкг/мл жизнеспособность гиппокампальных клеток статистически значимо снижается. При воздействии МП (0,25 мкВ в течение 4 ч) при наличии ЛПС показатели жизнеспособности культивируемых клеток оставались высокими. МТС-тест показал, что МП существенно повышает митохондриальную активность при нормальных условиях и предотвращает ее снижение при наличии ЛПС.

Выводы. Оптимизированы условия для исследования МП в экспериментах *in vitro* при моделировании воспалительного процесса нервной ткани. Установлено, что МП активизирует гиппокампальные клетки в нормальных при наличии ЛПС.

Ключевые слова: микрополяризация (стимуляция слабым постоянным током), культура гиппокампальных клеток, нейровоспаление, липополисахарид.

K. V. YATSENKO^{1,2}, I. V. LUSHNIKOVA¹, G. G. SKIBO¹

¹Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv

²Neurological clinic of Dr. Yatsenko, Kyiv

Investigation of the micropolarization on neuronal cells in the modeling of the inflammatory process *in vitro*

Objective — to study the functional changes of cultivate hippocampal dissociated cells under the micropolarization (MP) of *in vitro* inflammatory process modeling.

Methods and subjects. The experiments were carried out with hippocampal cell cultures. A special MP device for cellular cultures has been developed. Lipopolysaccharide (LPS) was used for modeling of the inflammatory process. The viability and mitochondrial activity of cultured cells were evaluated using LDH- and MTS-tests, respectively.

Results. The most effective concentration of LPS was found while the modeling the inflammatory process on hippocampal cell culture. The micropolarization mode was optimized for studying of MP effects *in vitro* under conditions of neuroinflammation modeling. Using LDH-test, it was found that the viability of the hippocampal cells was significantly lowered at LPS 10 μg/ml. MP (0.25 μV during 4 h) increased the resistance of cultured cells to LPS. It has been shown that MP significantly enhances mitochondrial activity under normal conditions, and also normalizes cellular metabolism at LPS (MTT-test).

Conclusions. The conditions for experimental MP study *in vitro* in the modeling of the inflammatory process of the neuronal tissue have been optimized. It was found that MP activates the hippocampal cells under normal conditions and improves their viability and functional activity at LPS.

Key words: micropolarization (direct current stimulation), hippocampal cell culture, inflammation, lipopolysaccharide.