

G.V. Malieieva, I.V. Lushnikova, G.G. Skibo

Mitochondrial dynamics in oxygen-glucose deprivation on a model of cultivated hippocampal slices

Ischemia injury is one of the most common death reasons in Ukraine and in a whole world. At the cells level stroke characterized by oxygen and glucose supply loose that cause energy failure and neurdegeneration. Mitochondrais are the key organelles of cell energy homeostasis. In order to discover dynamics of energy metabolism in ischemia damage we have been focused on investigation of mitochondrial functioning after 30-min oxygen-glucose deprivation (OGD) and reoxygenation 1 and 4 hours. We have done a comparison analyze of active mitochondrial activity of hippocampal pyramidal neurons and glial cells of CA1 and CA3 areas using fluorescent dyer MitoTracker Orange. In the present study it was determined that pyramidal neurons and glial cells have different dynamics of mitochondrial activity. Hippocampal pyramidal neurons have demonstarated the increasing of activity during first hour and the decreasing for four hours after OGD. Glial cells increased their mitochondrial activity fourth hours after start of reoxygenation, comparing with first hour. This indicates a specific activation of pyramidal neurons in response to the OGD, which, however, can not be maintained for a long time. For glial cells is characteristic of a more prolonged and sustained increase in mitochondrial activity. Thus, it can be assumed that the more resistant glial cells are able to some extent, to modulate the function of neurons in a lack of oxygen and glucose.

INTRODUCTION

Mitochondria are important for functioning of eukaryotic cells. It is main determinants of cellular respiration, energy homeostasis. Lots of pathological states (anoxia, ischemia, hemorrhagic shock) are accompanied by disfunction of the mitochondria and its inability to keep electrochemical proton gradient on membrane that result in cell degeneration and death. As consequence, oxide phosphorylation, ATP producing and Ca^{2+} homeostasis can not be maintained at native level. Brain ischemia is one of the most widespread pathology in Ukraine and in the whole world. The study of the cellular mechanisms of neurodegeneration is of great importance. Hippocampal organotypic culture is effective and useful model to investigate the mechanisms of ischemic damage of the brain. The natural tissue cytoarchitectonic and cell connections are preserved into cultivated slices. In present work we have been focused on mitochondria of neuronal and glial cells in CA1 and CA3 area under

oxygen-glucose deprivation (OGD) on a model of cultivated hippocampal slices.

METHODS

Hippocampal slices were obtained from the brains of 7-day-old rats and cultured according to the technique by Stoppini [1]. The procedure of oxygen-glucose deprivation was performed as described previously [2, 3]. The duration of OGD was 30 min; then, the slices were returned to normal conditions of culturing for 1h or 4 h (period of normoxic reoxygenation).

One and four hours after OGD hippocampal cultivated slices were stained with MitoTracker Orange CMTMRos (Cat. no.M7510). Next operations were performed: 1 – slices were washed with serum free medium; 2 – incubation with MitoTracker Orange (final concentration – 50 nM) was lasting 30 min at temperature 37°C; 3 – slices were washed with PBS (2 times, 5 min); 4 – staining was controlled with inverted microscope; 5 – fixation with 4% paraformaldehyde in

© G.V. Malieieva, I.V. Lushnikova, G.G. Skibo

PBS (30 min); 6 – slices were washed with PBS (2 times, 15 min), mounted on slides, embedded in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Denmark). Mitochondrial activity of CA1 and CA3 hippocampal cells was analyzed at 1 and 4 hours after OGD. Pyramidal neurons and glial cells were estimated separately. The slices and sections were analyzed under a confocal microscope FV1000-BX61WI (“Olympus”, Japan, magnification – $\times 600$) using the corresponding software. Statistical analysis was performed using Statistica software, version 5 (StatSoft, USA). Numerical data are presented below as means \pm S.E.M. Intergroup differences were estimated using Student’s t-test; these differences were considered to be significant at $P < 0.05$ (marked by an asterisk in the figures).

RESULTS AND DISCUSSION

The aim of investigation was to analyze mitochondrial dynamics of CA1 and CA3 hippocampal cells after 30-min OGD and normoxic reoxygenation 1 and 4 hours. Pyramidal neurons and glial cells were estimated separately, as previously was reported that they have different susceptibility to deficiency of oxygen and glucose [4].

For estimation mitochondrial activity was used fluorescent dye MitoTracker Orange. Fluorescent probes aloud to uncover changes in membrane lipoprotein composition and to explore molecular mechanisms of cell pathogenesis. The membrane surface heterogeneity, charges accumulation, membrane ion binding and changes in membrane potential during mitochondrial functioning can be estimated [5]. The intensity of fluorescent probe luminescence was influenced by membrane dynamics and changes in trans-membrane potential.

The cell-permeant fluorescent MitoTracker probes contain a mildly thiol-reactive chromethyl moiety for labeling mitochondria. To label mitochondria, cells are incubated with MitoTracker probes, which passively diffuse across the plasma membrane and accumulate

in active mitochondria forming thiol conjugates with mitochondrial proteins. MitoTracker Orange determine amount of functionally active mitochondrias.

Electrochemical proton gradient was used as criteria of mitochondrial functional state. Mitochondrial membrane potential provided by respiratory chain electron transport and can reach 200mV [6]. Its decrease is an evidence of respiratory chain disruption and ATP synthesis failure. Mitochondrial membrane potential decreasing can provoke release of mitochondrial factors that can trigger cell death pathways. It is well known that changes in cell conditions directly connected with changes in mitochondrial membrane potential [7].

In control mitochondrial activity of pyramidal neurons in CA3 hippocampal area was $2,4 \pm 0,1$ (a.u.) and $1,7 \pm 0,2$ in CA1 area. That confirms previously observed differences in metabolic and energy state of this brain area [8]. In present investigation in control we have not observed any significant difference in mitochondrial activity between CA1 and CA3 glial cells. Mitochondrial activity of pyramidal neurons of CA1 area is lower ($1,7 \pm 0,2$) than activity of glial cells of the same zone ($2,7 \pm 0,3$). This phenomenon was not typical for CA3 hippocampal area.

The level of mitochondrial activity was higher in both pyramidal and glial cells of CA1 and CA3 areas one hour after OGD. Most prominent activation was noticed in pyramidal neurons ($3,1 \pm 0,1$) and glial cells ($3,6 \pm 0,2$) of CA3 hippocampal area. That could be an evidence of cell defense mechanisms switch and employment of mitochondrial reserve energy sources.

Mitochondrial activity level of pyramidal neurons in CA1 and CA3 areas was decreased ($2,2 \pm 0,3$ and $2,7 \pm 0,2$ respectively) four hours after OGD, but did not reach control meaning. We suppose that damaged mitochondria amount increase is responsible for that. In contrast, glial cells demonstrated a tendency to activation even four hours after OGD, both in CA1 and CA3 areas ($3,5 \pm 0,2$ and $3,8 \pm 0,2$ respectively). That lets us

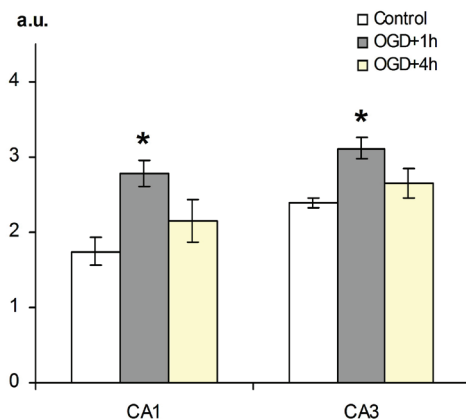
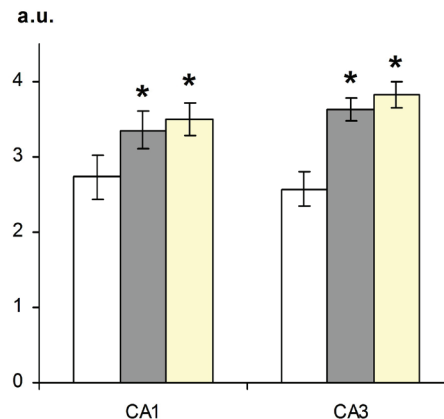
A - Pyramidal neurons**B - Glia**

Fig. 1 Level of mitochondrial activity of pyramidal neurons (A) and glial cells (B) of CA1 and CA3 hippocampal areas

to conclude that in our experimental conditions the glial cells are significant activated.

Thus, it was shown the differences of mitochondrial dynamics in hippocampal pyramidal neurons and glial cells after OGD. Mitochondrial activity of pyramidal neurons was increased during first hour and decreased after four hours of reoxygenation. Glial cells demonstrated continuing increase in their mitochondrial activity with time (one and four hours after reoxygenation). This is evidence of the specific features of the energy metabolism in the pyramidal and glial cells as well as the greater sensitivity and vulnerabilities of neurons in oxygen-glucose deficiency.

Малєєва Г. В., Лушнікова І. В., Скибо Г. Г.

МИТОХОНДРИАЛЬНА ДИНАМІКА ПРИ КИСНЕВО-ГЛЮКОЗНІЙ ДЕПРИВАЦІЇ НА МОДЕЛІ КУЛЬТИВОВАНИХ ЗРІЗІВ ГІПОКАМПА

Ішемічне ураження мозку є однією із найчастіших причин нервових патологій. Ці захворювання обумовлені порушеннями кисневого та глюкозного постачання на клітинному рівні, що призводить до падіння рівня енергетичного метаболізму і, як результат, до нейродегенерації. Ключовими клітинними органелами, які забезпечують гомеостаз клітин є мітохондрії. З метою дослідження динаміки енергетичного метаболізму в умовах розвитку ішемічного ушкодження, нами було проведено серію експериментів,

спрямованих на виявлення особливостей функціонування мітохондрій після 30-хв киснево-глюкозної депривації (КГД) та нормоксичної реоксигенації 1 та 4 години на моделі культивованих зрізів гіпокампа. Із використанням флуоресцентного барвника (MitoTracker Orange), було проведено порівняльний аналіз активації мітохондрій у пірамідних нейронах та гліальних клітинах CA1 та CA3 зон гіпокампа. Раніше було показано, що гліальні клітини більш резистентні до ішемічного ураження, ніж нейрони. Встановлено, що, в наших експериментальних умовах, для пірамідних нейронів та гліальних клітин характерна різна динаміка мітохондріальної активності. В пірамідних нейронах гіпокампа спостерігалось підвищення активності мітохондрій через одну годину після КГД та зниження через чотири години. У гліальних клітинах активність мітохондрій підвищувалася на протязі всього періоду спостереження. Це вказує на певну активацію пірамідних нейронів у відповідь на КГД, яка однак не може підтримуватись довгий час. Для гліальних клітин характерним є більш тривале підвищення мітохондріальної активності. Таким чином, можна припустити, що більш стійкі до ішемічного впливу гліальні клітини, залишаються здатними, в певній мірі, модулювати функції нейронів за умов нестачі кисню та глюкози.

Ключові слова: мітохондріальна активність, флуоресцентний зонд, киснево-глюкозна депривація

Малєєва Г. В., Лушнікова І. В., Скибо Г. Г.

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИНАМИКА ПРИ КИСЛОРОДНО-ГЛЮКОЗНОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА МОДЕЛИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ СРЕЗОВ ГИПОКАМПА

Ишемическое поражение мозга является одной из наиболее частых причин нервных патологий. Эти заболевания

обусловлены нарушениями кислородного и глюкозного обеспечения на клеточном уровне, которые приводят к падению уровня энергетического метаболизма и, как результат, к нейродегенерации. Ключевыми органеллами, обеспечивающими гомеостаз клеток, являются митохондрии. С целью исследования динамики энергетического метаболизма в условиях ишемического повреждения, нами была проведена серия экспериментов, направленных на выявление особенностей функционирования митохондрий после 30-мин кислород-глюкозной депривации (КГД) и нормоксической реоксигенации в течение 1 и 4 часов на модели культивируемых клеток гиппокампа. С использованием флуоресцентного зонда (MitoTracker Orange), был проведен сравнительный анализ активации митохондрий в пирамидных нейронах и клетках глии CA1 и CA3 зон гиппокампа. Ранее было показано, что глиальные клетки более резистентны к ишемическому повреждению, чем нейроны. Установлено, что, в наших экспериментальных условиях, для пирамидных нейронов и глиальных клеток характерна различная динамика митохондриальной активности. В пирамидных нейронах гиппокампа наблюдалось увеличение активности митохондрий через один час после КГД и снижение через четыре часа. В глиальных клетках активность митохондрий повышалась в течение всего периода наблюдения. Это указывает на определенную активацию митохондрий пирамидных нейронов в ответ на КГД, которая, однако, не может поддерживаться длительное время. Для глиальных клеток характерным является более длительное повышение митохондриальной активности. Таким образом, можно предположить, что, более стойкие к ишемическому воздействию глиальные клетки, остаются способными, в определенной мере, модулировать функции нейронов в условиях недостатка кислорода и глюкозы.

Ключевые слова: митохондриальная активность, флуоресцентный зонд, кислород-глюкозная депривация

REFERENCES

1. Stoppini L., Buchs P.A., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue // *J. Neurosci. Methods.* – 1991. – N 37. – P. 173 - 82.
2. 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. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* - 2004. - V.8, №2. - P.241-248.
3. Skibo G.G., Lushnikova I.V., Voronin K.Y., Dmitrieva O., Novikova T., Klementiev B., Vaudano E., Berezin VA, Bock E. A synthetic NCAM-derived peptide, FGL, protects hippocampal neurons from ischemic insult both in vitro and in vivo // *Eur J Neurosci.* - 2005. - V.22, N 7. - P. 1589-1596.
4. Nedergaard M. and Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia // *Glia.* – 2005. – N 50. – P. 281-286.
5. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран // М.: Наука, 1980. - 318 с.
6. Reers M., Smiley S.T., Mottola-Hartshorn C., Chen A., Lin M., Chen L. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 // *Methods Enzymol.* – 1995. – N 260. – P.406 – 417.
7. Freedman J.C., Novak T.S. Membrane potentials associated with Ca-induced K conductance in human red blood cells: studies with a fluorescent oxonol dye // *J Membr Biol.* – 1983. – N 72. – P.59 - 74
8. Wieloch T. Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability // *Prog Brain Res.* – 1985. – N 63. – P. 69 – 85.

Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine, li@biph.kiev.ua