

Uticaj hipoksije na smrtnost ćelijske linije mikroglia BV-2

Ispitivanjem uticaja veštački stvorene hipoksije omogućava se bolje razumevanje reagovanja mikroglie u ishemijskim procesima u mozgu. U ovom istraživanju korišćen je kobalt(II)-hlorid (CoCl₂) za veštačko stvaranje hipoksije sa ciljem utvrđivanja reakcija ćelijske linije mikroglie BV-2 na postavljene uslove. Grupe tretirane kobalt(II)-hloridom koncentracija 20, 100 i 500 μM upoređene sa kontrolnom grupom koja nije bila tretirana. Rezultati su pokazali da hipoksija stvorena kobalt(II)-hloridom ima negativno dejstvo na mikrogliju izazivajući promene u morfologiji ćelije, kao i da dovodi do smrti ćelije. Pokazano je da visoke koncentracije kobalt(II)-hlorida izazivaju ćelijsku smrt – apoptozu. Letalna doza i nakon 24 i nakon 36 h tretmana iznosila je 500 μM.

Uvod

Hipoksija je jedan od najznačajnijih stimulusa koji se često povezuje sa različitim patološkim stanjima kao što su ishemija, respiratorna oboljenja i tumorogeneza. U centralnom nervnom sistemu, hipoksija ne izaziva samo oštećenje nervnih ćelija, već podstiče patološku aktivaciju mikroglie (Alvarez-Diaz *et al.* 2007). Mikroglia je imunska ćelija centralnog nervnog sistema, čija je ključna uloga u razvoju i regeneraciji centralnog nervnog sistema. Prilikom povrede centralnog nervnog sistema, mikroglia učestvuje u zapaljenskom procesu i zarastanju rana migracijom u povređeno tkivo i otklanjanjem oštećenih ćelija (Gehrmann *et al.* 1995; Remington *et al.* 2007). Migracija mikroglie kao odgovor na hipoksiju ključni je korak za razumevanje mehanizma njenog delovanja (Lambertsen *et al.* 2011). Prekomerna aktivacija mikroglie usled produkcije pro- i antiinflamatornih medijatora kao što su citokini, hemokini i azot-monoksid pri izvršavanju neuroprotektivne i/ili neurotoksične uloge uključena je u patogenezu neuroloških oboljenja poput traume, krvarenja, zapaljenja, epilepsije i neurodegenerativnih promena (Nelson *et al.* 2002; Orr *et al.* 2002).

Jovan Isma (1996), Senta, Zlatne grede 2/21, učenik 3. razreda Srednje medicinske škole u Senti

*MENTORI:
Saša Šviković,
Univerzitet u
Kembriđu,
doktorant i istraživač*

*Jana Ognjenović,
Hemijski fakultet
Univerziteta u
Beogradu, istraživač
saradnik*

Kobalt(II)-hlorid (CoCl_2) se često primenjuje za indukovanje hipoksije u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima. Injekcija kobalt(II)-hlorida u moždano tkivo izaziva smrt neurona i aktivaciju astrocita i oligodendrocita u životinjskom modelu laboratorijskog pacova (Caltana *et al.* 2009). U prekomernim količinama kobalt ima citotoksično i neurotoksično dejstvo, iako je esencijalni mikroelement, aktivni učesnik u metabolizmu. Važan je element za normalno funkcionisanje vitamina B12, osnovnog koenzima mitoze i održavaoca integriteta mijelinskog omotača. Dokazano je da svakodnevno izlaganje kobaltu, odnosno nagomilavanje kobaltovog jona u tkivima dovodi do deficita memorije (Jordan *et al.* 1997). Na primer, kobalt u jonskom obliku oslobođen iz veštačkog kuka može izazvati oštećenje kranijalnih nerava, poremećaj distalnih senzomotornih nerava i neurološke simptome (Rizzetti *et al.* 2009; Mao *et al.* 2011). Neurotoksičnost kobalta postaje sve lakše prepoznatljiva, ali mehanizam delovanja nije još uvek u potpunosti poznat. Apoptoza je proces programirane ćelijske smrti, povezan sa nizom fizičkih i biohemijskih promena citoplazme, jedra i ćelijske membrane (Kerr *et al.* 1972; Arends i Wyllie 1991; Schwartzman i Cidlowski 1993), pri čemu ćelija gubi kontakt sa okolinom. Jedna od morfoloških karakteristika ćelijske smrti po tipu apoptoze je kondenzacija i fragmentacija hromatina u jedru (Savill i Fadok 2000).

U ovom radu ispituje se otpornost ćelijske linije mikroglia BV-2 na hipoksične uslove indukovane različitim koncentracijama kobalt(II)-hlorida (0, 20, 100, 500 μM), kao i tip ćelijske smrti koji nastaje dejstvom hipoksične sredine nakon 12, 24 i 36 h. Beležen je procenat preživelih ćelija mikroglie, kao i procenat ćelija u apoptozi u odnosu na ukupnu populaciju ćelija.

Materijal i metode

Zasejavanje ćelijske linije mikroglia BV-2. Za istraživanje je korišćena ćelijska linija mikroglia BV-2 dobijena iz Instituta za biološka istraživanja „Siništa Stanković” Beograd, čuvana na -80°C . Odmrzavanje je vršeno na 37°C u vodenom kupatilu 10 minuta. Odmrznuta ćelijska linija centrifugirana je 5 minuta na 500 g sa 10 mL svežeg medijuma (RPMI, FBS 10%, 1% penicilin–streptomycin), nakon čega je ćelijski pelet resuspendovan. Za dalji rad korišćeno je 2 mL ćelijske suspenzije inkubirane u 3 mL tečnog hranljivog medijuma. Ćelije su uzgajane u sterilnom CO_2 inkubatoru (Mettler inco 108, Germany) na temperaturi od 37°C , koncentraciji CO_2 od 5% i vlažnosti vazduha 95%. Zasejavanje je vršeno u sterilnim uslovima u laminaru.

Praćenje rasta ćelija. Rast ćelija praćen je osam dana kako bi se dostigla brojnost dovoljna za postavku eksperimenta. Konfluentost je praćena svakodnevno. Medijum je menjan prvih pet dana na svakih 24 h, nakon čega je izvršeno pasažiranje ćelija. Rast ćelija je praćen u tri T25 flaska i u Petrijevoj šolji 60 mm. Za ispiranje ćelija korišćeno je 3 mL PBS, nakon čega je u flask dodato 4.5 mL medijuma, odnosno 10 mL medijuma u

Petrijevoj šolji. Pri pasažiranju, uz ispiranje sa 3 mL PBSa, korišćeno je 3 mL 0.1% tripsin-EDTA za Petrijevu šolju, odnosno 1 mL 0.1% tripsin-EDTA za T25 flask. Nakon dodavanja tripsin-EDTA, ćelije su inkubirane 5 minuta, zatim je dejstvo tripsin-EDTA u 60 mm Petrijevoj šolji blokirano sa 10 mL medijuma, dok je u T25 flasku dejstvo tripsin-EDTA blokirano sa 4 mL medijuma. Ćelije su zatim centrifugirane 5 min na 500 g, prebrojane i zasađene. U jedan T25 flask sa 4.5 mL medijuma zasađeno je 145 000 ćelija, u dva T25 flaska sa 2 mL medijuma zasađeno je po 145 000 ćelija, odnosno u Petrijevu šolju 60 mm sa 9.5 mL medijuma zasađeno je 435 000 ćelija. Ćelije su brojane na hemocitometru pre zasejavanja, korišćenjem 10 μ L tripan plave boje i 10 μ L ćelijske suspenzije. Pregled je vršen uz pomoć Zeiss Primo Vert invertnog mikroskopa.

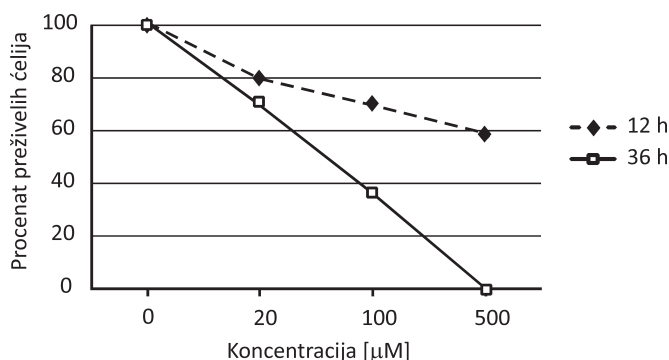
Eksperiment sa kobalt(II)-hloridom. Koncentracije kobalt(II)-hlorida primenjivane su po modelu predloženom u Mou i saradnika (2012). Zasejavanje je vršeno u mikrotitar ploči sa 6 bunarčića, 70 000 ćelija po bunarčiću. Korišćeni su kristali kobalt(II)-hlorida rastvoreni u 50 mL destilovane vode. Rastvor je sterilisan u autoklavu. U eksperimentu su korišćene koncentracije od 20, 100 i 500 μ M CoCl_2 koje su dodate u 2 mL medijuma. Kao kontrola korišćena je sterilna voda. Dejstvo kobalt(II)-hlorida na ćelije praćeno je nakon 12 i 36 h. Preračunavanje smrtnosti ćelija vršeno je brojanjem ćelija na hemocitometru korišćenjem tripan plave i ćelijske suspenzije. Vijabilnost je broj preživelih ćelija u odnosu na broj zasađenih ćelija izražen u procentima.

Fluorescentno bojenje ćelija i analiza snimaka. Imunocitohemijsko bojenje korišćeno je kako bi se utvrdila vrsta ćelijske smrti. Korišćeno je dvojno bojenje propidijum jodidom i DAPI-jem (4',6-diamidino-2-phenylindole) kako bi se izdvojilo jedro od citoplazme, pri čemu propidijum jodid boji citoplazmu, a DAPI jedro. Nakon brojanja na hemocitometru i izražavanja broja umrlih ćelija, vijabilne ćelije su presađene na sterilno staklo u mikrotitar ploči sa 6 bunara dodatkom 2 mL medijuma i inkubiranjem 2 h na optimalnim uslovima. Ćelije su pažljivo ispirane sa 2 mL PBS nakon čega su fiksirane sa 2 mL 4% paraformaldehida. Mikrotitar ploča sa ćelijama inkubirana je 20 minuta na -20°C , nakon čega je vršena rehidracija 3 puta sa 1 mL $1 \times$ PBS. Bojenje je vršeno 125 nM propidijum jodidom (PI) 20 minuta, zatim su ćelije ispirane sa 2 mL PBS rastvorom. Nakon ispiranja ćelije su 20 minuta bojene rastvorom 1: 1000 DAPI. Preparati su čuvani u 4 mL PBS, nakon čega su snimani konfokalnim mikroskopom.

Ćelije u apoptozi prepoznate su na osnovu snimaka sa konfokalnog mikroskopa. Preparati ćelija su snimani 24 i 36 h nakon tretmana kobalt(II)-hloridom koncentracije 0, 20, 100 i 500 μ M, pri čemu su obojeni imunofluorescentnim bojama. Svaka grupa sadržala je deset snimaka. Analizom snimaka, posmatrana je svaka ćelija posebno, utvrđujući da li postoje promene u strukturi jedra. Na osnovu dobijenih podataka određen je procenat ćelija sa kondenzovanim i fragmentisanim jedrom u odnosu na ukupan broj ćelija uzorka, pri čemu je dobijen procenat ćelija u apoptozi.

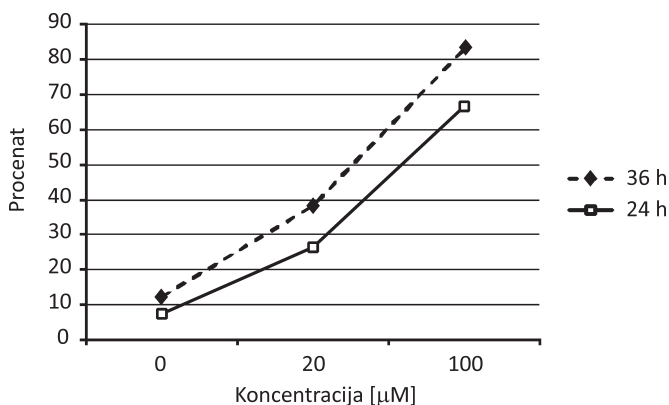
Rezultati i diskusija

Efekat kobalt(II)-hlorida na ćelijsku smrt. Procenat preživelih ćelija mikroglia BV-2 zavasio je od koncentracija CoCl_2 (slika 1). Postoji razlika u procentu preživelih ćelija inkubiranih 12 i 36 h pri koncentracijama 100 i 500 μM CoCl_2 . Ova razlika nije značajna pri koncentraciji od 20 μM . Citotoksičnost kobalt(II)-hlorida zavisila je od vremena trajanja tretmana. IC_{50} vrednost (koja predstavlja polovinu maksimalne inhibitorne koncentracije) kobalt(II)-hlorida za 12 h i iznosila je 700 μM , a za 36 h 70 μM . Na osnovu dobijenih IC_{50} vrednosti zaključeno je da kratkotrajno izlaganje ćelijske linije mikroglia BV-2 pri navedenim koncentracijama CoCl_2 ne dovodi do potpunog odumiranja ćelija, dok pri dugotrajnom izlaganju ima jak citotoksičan efekat uz potpunu smrtnost.



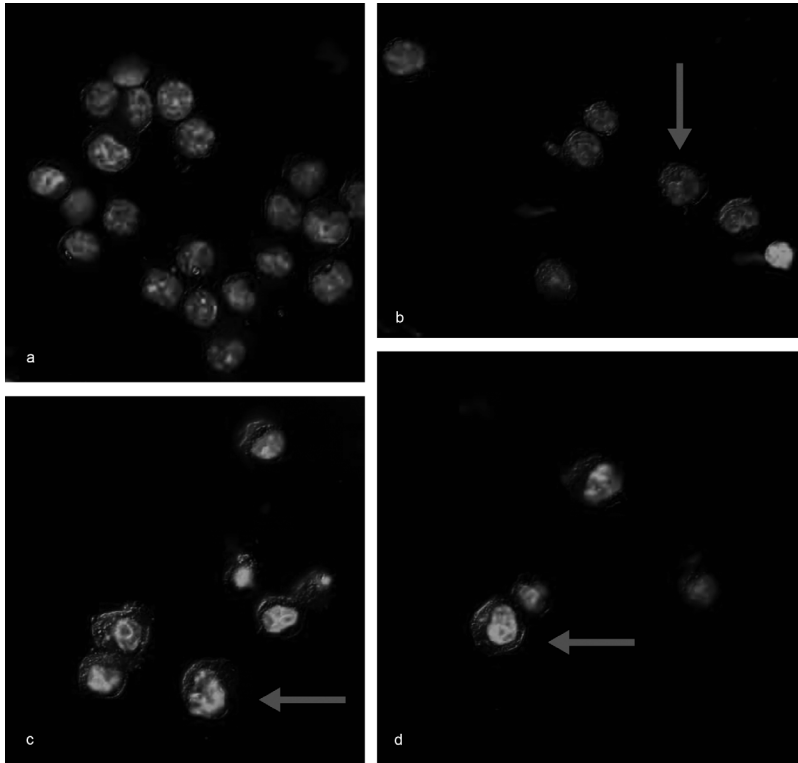
Slika 1. Citotoksičan efekat kobalt(II)-hlorida na brojnost ćelija mikroglia BV-2. Primenjivane su koncentracije: 20, 100 i 500 μM kobalt(II)-hlorida.

Figure 1. Cytotoxic effect of cobalt chloride on cell viability. The cell viability difference is present after treatment with 20, 100 and 500 μM cobalt chloride.



Slika 2. Procenat ćelija u apoptozi sa segmentisanim jedrom.

Figure 2. Apoptotic effect of cobalt chloride on cell line microglia BV-2.



Slika 3.
Efekat
kobalt(II)-hlorida na
segmentaciju jedara
nakon 36 h tretmana.
a – kontrola
b – koncentracija
 CoCl_2 20 μM
c, d – koncentracija
 CoCl_2 100 μM . Primeri
ćelija u apoptozi
označeni su strelicom.

Figure 3.
The effect of cobalt
chlorid on microglia
cell line after 36 h.
a – Control group
b – CoCl_2 20 μM
c, d – CoCl_2 100 μM .
The examples of
apoptotic cells are
marked with arrows.

Segmentacija ćelijskog jedra mikroglia BV-2. Tretiranje mikroglia BV-2 ćelijske linije koncentracijama 20, 100 i 500 μM CoCl_2 pokazalo je efekat na segmentaciju jedara (slika 3). Procenat ćelija u apoptozi sa segmentisanim jedrom prikazan je na slici 2. Koncentracija CoCl_2 od 500 μM imala je letalni efekat već nakon 24 h, što je onemogućilo određivanje tipa ćelijske smrti.

Na osnovu brojnih radova dokazano je da hipoksija izaziva fragmentaciju DNK u različitim ćelijskim linijama (Bae *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2007); međutim, ne postoje dokazi o načinu na koji kobalt(II)-hloridom uzorkovana hipoksija izaziva apoptotske promene glijskih ćelija. Tretirane ćelije obojene imunofluorescentnim bojama pokazale su iste morfološke promene jedra opisane u literaturi (Yang *et al.* 2004).

Zaključak

Hipoksija izazvana kobalt(II)-hloridom dovela je do procesa ćelijske smrti što se moglo jasno uočiti na osnovu analize snimaka ćelija nakon imunocitohemijskog bojenja. Sa povećanjem koncentracije kobalt(II)-hlorida usporava se rast ćelija i smanjuje se procenat preživelih ćelija mikroglie BV-2. Pri maksimalnoj koncentraciji od 500 μM CoCl_2 , preživljavanje ćelija je minimalno nakon 24 i 36 h i može se uočiti njihova potpuna smrt.

Ovo istraživanje je pokazalo da kobalt(II)-hlorid, sem što izaziva hipoksiju koja dovodi do aktivacije ćelija mikroglije i poremećaja u metabolizmu, ima i citotoksičan uticaj na ćeliju jer dovodi do njene smrti posebno akutnim delovanjem u većim koncentracijama. Posmatranjem snimaka bojenih ćelija vidljive su morfološke promene u jedru, što je pokazatelj da su ćelije ušle u apoptozu.

Kako je mikroglija ključna ćelija u imunskom odgovoru centralnog nervnog sistema, na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu može se pretpostaviti da veće koncentracije kobalta koje se mogu naći u organizmu mogu dovesti do odumiranja ovih ćelija, što bi dalje moglo da dovede do smanjenog kapaciteta centralnog nervnog sistema za borbu protiv invazivnih mikroba, kao i od potencijalnih oštećenja koja mogu nastati kao posledica nervne traume ili bolesti.

Zahvalnost. Ovom prilikom zahvalio bih se Ivi Božić sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu na ukazanim sugestijama pri izradi rada, kao i Saši Švikoviću i Jani Ognjenović na predlozima i mentorstvu koji su doprineli ostvarenju ovog istraživanja. Zahvaljujem se i dr Tanji Adnađević sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” na dragocenim sugestijama tokom pisanja rada i obrade podataka.

Literatura

- Arends M. J., Wyllie A. H. 1991. Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. *International Review of Experimental Pathology*, **32**: 223.
- Alvarez-Diaz A., Hilario E., de Cerio F.G., Valls-I-Soler A., Alvarez-Diaz F. J. 2007. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain-key vascular and cellular players. *Neonatology*, **92**: 227.
- Bae J. H., Jang B. C., Suh S. I., Ha E., Baik H. H., Kim S. S., Lee M., Shin D. H. 2006. Manganese induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells. *Neuroscience letters*, **398**: 151.
- Caltana L., Merelli A., Lazarowski A., Brusco A. 2009. Neuronal and glial alterations due to focal cortical hypoxia induced by direct cobalt chloride (CoCl₂) brain injection. *Neurotoxicity Research*, **15**: 348.
- Gehrmann J., Banati R. B., Wiessner C., Hossmann K. A., Kreutzberg G. W. 1995. Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **21**: 277.
- Jordan C. M., Whitman R. D., Harbut M. 1997. Memory deficits and industrial toxicant exposure: a comparative study of hard metal,

- solvent and asbestos workers. *International journal of neuroscience*, **90**: 113.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, **26**: 239.
- Lambertsen K. L., Deierborg T., Gregersen R., Clausen B. H., Wrenfeldt M., Nielsen H. H. Finsen B. 2011. Differences in origin of reactive microglia in bone marrow chimeric mouse and rat after transient global ischemia. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **70**: 481.
- Mao X., Wong A. A., Crawford R. W. 2011. Cobalt toxicity – an emerging clinical problem in patients with metal-on-metal hip prostheses. *Medical Journal of Australia*, **194**: 649.
- Mou Y. H., Yang J. Y., Cui N., Wang J. M., Hou Y., Song S., Wu C. F. 2012. Effect of Cobalt chloride on nitric oxide and cytokines/chemokines production in microglia. *International immunopharmacology*, **13**: 120.
- Nelson P. T., Soma L. A., Lavi E. 2002. Microglia in diseases of the central nervous system. *Annals of medicine*, **34**: 491.
- Orr C. F., Rowe D. B., Halliday G. M. 2002. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, **68**: 325.
- Remington L. T., Babcock A. A., Zehntner S. P., Owens T. 2007. Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. *The American journal of pathology*, **170**: 1713.
- Rizzetti M. C., Liberini P., Zarattini G., Catalani S., Pazzaglia U., Apostoli P., Padovani, A. 2009. Loss of sight and sound. Could it be the hip?. *The Lancet*, **373**: 1052.
- Schwartzman R. A., Cidlowski J. A. 1993. Apoptosis: The Biochemistry and Molecular Biology of Programmed Cell Death. *Endocrine reviews*, **14**: 133.
- Savill J., Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, **407**: 784.
- Saijo K., Glass C. K. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, **11**: 775.
- Yang S. J., Pyen J., Lee I., Lee H., Kim Y., Kim T. 2004. Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation in rat C6 glioma cells. *Journal of biochemistry and molecular biology*, **37**: 480.
- Zhang P., Hatter A., Liu B. 2007. Manganese chloride stimulates rat microglia to release hydrogen peroxide. *Toxicology letters*, **173**: 88.

Jovan Isma

The Effect of Hypoxia on Microglia BV-2 Cell Line Death

Investigation of artificial hypoxia allows us to understand the reaction of microglia in ischemic brain states. In the present study different concentrations of cobalt-chloride were applied to induce hypoxia and determine the reaction of microglia BV-2 cell line. Concentrations of 20, 100 and 500 μM cobalt chloride and sterile water as control were used in the experiment. The results showed that cobalt chloride induced hypoxia has a negative influence on microglia inducing morphological changes and cell death (Figure 3). We determined that a high level of cobalt chloride induces cell death – apoptosis. After 24 h and 36 h of treatment the lethal dose was 500 μM cobalt chloride (Figure 2 and 3). It is possible that the cell death of microglia which presents the immune cell of CNS, and protects potential defects caused by trauma or disease, might cause immunodeficiency.

