

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

МАЙСТРЕНКО АНАСТАСІЯ МИХАЙЛІВНА



УДК 611.018.32+57.085.23

**Участь гіпоксія-індукованого фактору в молекулярних механізмах
нейропротекції клітин гіпокампа**

03.00.13 – Фізіологія людини і тварини

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ 2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, проф. .

Скибо Галина Григорівна,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України
Завідуюча відділу цитології.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
Мінченко Олександр Григорович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
завідувач відділу молекулярної біології;

доктор медичних наук, старший науковий співробітник
Вайсерман Олександр Михайлович,
ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова»
НАМН України, завідувач лабораторії епігенетики.

Захист дисертації відбудеться «17» травня 2016 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. академіка Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. академіка Богомольця, 4 та на сайті: <http://biph.kiev.ua/uk>

Автореферат розіслано «14» квітня 2016 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



О.П.Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Підтримання кисневого гомеостазу – необхідна умова існування живого на землі. Відомо, що за умов зниження рівня кисню порушується синтез молекул АТФ, продуктів проміжного розпаду глюкози та чисельних залежних від кисню процесів біохімічного синтезу, які лежать в основі метаболізму жирних кислот, вуглеводів, амінокислот, що призводить до пошкодження і деградації білків та порушення експресії генів (Woodruff et al. 2011). Тому дослідження молекулярних механізмів, в основі яких лежить можливість попереджувати та модулювати відповідь організму до зниження рівня кисню, є важливою частиною фундаментальної фізіології. Особливу увагу привертає розробка перспективних напрямків запобігання тяжких уражень при гіпоксичних станах, які присутні у патогенезі, зокрема, церебральної та міокардіальної ішемії (інсульт, інфаркт), ракових перероджень, хронічних хвороб серця та легень, деменцій та інших.

Ішемічне ураження мозку за даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я поступається місцем за рівнем смертності лише ішемії серця. Внаслідок ішемічного інсульту гине чверть хворих, а пацієнти, що перенесли інсульт, страждають від наслідків ураження, що може призводити до порушення пам'яті, рухів (частковий або повний параліч), афазії (часткова чи повна втрата мови), психічних розладів. Згідно статистики один із шести пацієнтів переносить повторний інсульт протягом наступних 5 років із високою летальністю. Пацієнти, які перенесли інсульт, потребують постійної допомоги (близько 30%), не можуть самостійно пересуватися (близько 20%), що спричиняє тяжкі наслідки психологічного та соціального характеру, і лише незначна частина пацієнтів зберігає працездатність (близько 8-12%) (Kneebone 2014). Для попередження інсульту та полегшення наслідків від ішемічного ураження ведуться численні дослідження, де ключова увага приділяється вивченню ендогенної нейропротекції. В основі таких досліджень лежить факт неоднорідності уражень мозку внаслідок ішемії, зокрема, різна чутливість структур мозку до ішемічного пошкодження, що спричиняє особливий інтерес щодо молекулярних механізмів, які опосередковують толерантність до ішемічного ураження нейронів певних типів та селективну чутливість інших. Однак внутрішньоклітинні та молекулярні механізми толерантності нейронів до ішемічного пошкодження залишаються на сьогодні не з'ясованими. Одним із найбільш перспективних кандидатів на роль внутрішньоклітинного регулятора чутливості клітини до зміни доступності кисню є транскрипційний фактор, що індукується гіпоксією, HIF-1. Численні дослідження ролі HIF-1 у фізіологічних та патофізіологічних процесах продемонстрували, що HIF-1 активує ряд генів-мішеней для компенсації кисневої недостатності (Heikkilä et al. 2011; Siddiq et al. 2009; Valsecchi et al. 2011; Loboda et al. 2010). Відповідно, модуляція активності HIF-1 відкриває нові перспективи для корекції кисневої недостатності на молекулярному та клітинному рівнях. Зокрема, інгібування активності HIF-1 випробовується як новий терапевтичний підхід до лікування раку (Huang et al. 2014). Проте роль HIF-1 у нейропротекції залишається на

сьогодні неоднозначною, оскільки наявні експериментальні дані, що вказують одночасно на негативний ефект HIF-1 (Huang et al. 2014; Zhang et al. 2007; López-Hernández et al. 2015) та його нейропротективні властивості (Shi 2009; Badawi et al. 2012; Reischl et al. 2014; Dong et al. 2013). Цілком нез'ясованим залишається механізм активації нейропротективних чи, навпаки, про-апоптичних каскадів за участі HIF-1 у нейронах. У світлі цих даних особливий інтерес викликає роль HIF-1 у селективній чутливості нейронів різних зон гіпокампа, який є однією із найвразливіших структур мозку до ішемічного ураження. Гіпокамп є частиною лімбічної системи, яка реалізує переведення короткострокової пам'яті в довгострокову та приймає участь у формуванні складної психо-емоційної поведінки. Тканина гіпокампа є зручною моделлю досліджень ішемічного ураження мозку, оскільки нейрони CA1 зони виявляють уразливість до ішемічного ураження, тоді як нейрони CA3 зони характеризуються резистентністю до ішемії (Ovbiagele et al. 2003; Muir & Lees 2003; Schmidt-Kastner 2015; Williamson & Bilbo 2013). В основі ураження мозку лежить Ca^{2+} -залежна загибель нейронів, спричинена тривалою активацією глутаматних рецепторів при метаболічному стресі за умов ішемії (Hardingham & Bading 2010). Дослідження молекулярних механізмів та ролі HIF-1 у ендогенній нейропротекції може надати відповідь щодо шляхів її потенційної активації для попередження ішемічного ураження різних структур мозку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках НДР, які виконуються відділом цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (2009-2015 рр) «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (№ державної реєстрації 0112U001475), «Механізми внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації; вивчення шляхів їх модуляції та пошук нових фармакологічних впливів» (0107U010843), «Дослідження молекулярно-генетичних механізмів фізіологічних та патофізіологічних процесів та розробка методів їх корекції» (0107U005336), «Молекулярні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології: фокус на іонні канали» (0111U007525)

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження було з'ясувати молекулярні механізми ендогенної нейропротекції клітин CA1 і CA3 зон гіпокампа.

Задачі дослідження:

- Встановити рівень ішемічного ураження клітин CA1 та CA3 зон гіпокампа за умов моделювання ішемічного ураження у органотиповій культурі гіпокампа *in situ* шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД).
- Дослідити зміни внутрішньоклітинної регуляції Ca^{2+} у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа внаслідок ішемічного ураження *in situ*.
- Розробити модель ендогенної нейропротективної адаптації до ішемічного ураження нейронів гіпокампа на основі короткострокового аноксичного прекодиціювання (АПК) та інгібування деградації субодиниці HIF-1 α .

- Дослідити зміну експресії HIF-1 α та HIF-3 α субодиниць фактору, що індукується гіпоксією (HIF-1), після КГД, АПК та їх поєднання.
- З'ясувати вплив АПК та інгібування деградації субодиниці HIF-1 α на рівень ішемічного ураження клітин CA1 та CA3 зон гіпокампа.
- Дослідити вплив АПК та інгібування деградації субодиниці HIF-1 α на порушення внутрішньоклітинної регуляції Ca²⁺ у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа при ішемічному ураженні гіпокампа.
- З'ясувати механізми, які лежать в основі порушеної регуляції внутрішньоклітинного гомеостазу Ca²⁺ у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа та модулюються АПК і стабілізацією субодиниці HIF-1 α .

Об'єкт дослідження – селективна чутливість нейронів різних зон гіпокампа до ішемічного ураження.

Предмет дослідження – молекулярні механізми відповіді CA1 та CA3 нейронів гіпокампа на моделювання ішемічного ураження.

Методи дослідження. Для досягнення поставленої мети використовувалися наступні методи:

- приготування та культивування органотипової тканини гіпокампа;
- моделювання ішемічного пошкодження шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД) *in situ*;
- моделювання аноксичного прекодиціонування (АПК) *in situ*;
- морфо-функціональна оцінка життєздатності органотипової культури гіпокампа з використанням вітального барвника йодиду пропідію, ПЙ;
- моделювання стабілізації субодиниці HIF-1 α шляхом інгібування HIF-пролілгидроксилаз за допомогою селективного блокатора 2,4-піридиндикарбоксильного оксиду діетилового естеру (ДПД);
- оцінка зміни експресії генів на рівні мРНК в поодиноких нейронах та у CA1 та CA3 зон гіпокампа за допомогою ПЛР в реальному часі;
- флуоресцентне вимірювання концентрації іонізованого Ca²⁺ у цитоплазмі нейронів CA1 та CA3 зон гіпокампа;
- статистична обробка отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено протокол проведення АПК для отримання оптимального нейропротективного ефекту для органотипової культури гіпокампа. Вперше продемонстровано зміни рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α субодиниць у поодиноких нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа та показано, що 30-хвилинна КГД призводить до зниження рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α в нейронах CA1 і CA3 зон гіпокампа. Виявлено, що АПК призводить до відновлення ішемічних змін рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α в нейронах обох зон гіпокампа. Вперше встановлено нейропротективний ефект АПК та інгібітора деградації HIF-1 α ДПД на виживання клітини різних зон гіпокампа та на регуляцію внутрішньоклітинного гомеостазу Ca²⁺ у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа шляхом модуляції експресії генів, що кодують Ca²⁺-АТФази плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму (PMCA та SERCA). Запропоновано механізм нейропротективного ефекту HIF-1, який опосередковується шляхом активації експресії генів, що кодують Ca²⁺-АТФази,

сприяє регуляції внутрішньоклітинного гомеостазу Ca^{2+} у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа та лежить в основі зменшення Ca^{2+} -індукованої токсичності при ішемічних станах.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи передусім мають фундаментальну значимість, оскільки демонструють механізми селективної ендогенної нейропротекції та поглиблюють розуміння особливостей відповідей нейронів на ішемічне ураження. Крім того, виявлені механізми створюють підґрунтя для подальшого деталізованого дослідження активації та модуляції роботи генів-мішеней задіяних у нейрональних відповідях при ішемічному ураженні мозку. Результати дослідження розкривають механізми нейропротективної дії блокатора NIF-пролілгідроксилаз, ДПД. Виявлені нами нейропротективні властивості ДПД можуть бути надалі використані для розробки фармакологічних підходів з метою зниження рівня ушкодження клітин гіпокампа при ішемічних станах та для вдосконалення вже існуючих методів фармакотерапевтичного лікування ішемічного ураження мозку.

Особистий внесок здобувача. Науковий пошук та обґрунтування вибраного напрямку досліджень, виконання експериментів та інтерпретація отриманих результатів проводились здобувачем особисто за участі керівника наукової роботи та співавторів публікацій. Усі дослідження здійснені за безпосередньої участі здобувача. Виділення та приготування проб для аналізу РНК по визначенню рівня експресії NIF-1 α та NIF-3 α , SERCA2b, PMCA1 та PMCA2 проводилося здобувачем особисто. Культивування органотипової культури гіпокампа та визначення життєздатності нейронів гіпокампа за допомогою забарвлення ПЙ проведено за підтримки пров. наук. співробітника відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, к.б.н. Лушнікової І.В. Флуоресцентна реєстрація змін концентрації кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) у цитоплазмі нейронів CA1 та CA3 зон гіпокампа проводилося під керівництвом та спільно з ст. наук. співробітником лабораторії сенсорної сигналізації відділу загальної фізіології нервових систем Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України к.б.н. Копач О.В. У розробці концепції роботи, обробці та інтерпретації експериментальних результатів брали участь співавтори публікацій.

Автор щиро вдячний науковому керівникові д.м.н. проф. Скибо Г.Г. та співробітникам відділів цитології та загальної фізіології нервових систем Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України за корисні поради під час планування експериментів та обговорення результатів. Автор висловлює подяку завідувачому відділом загальної та молекулярної патофізіології д.м.н. В.Є. Досенку за консультування по підборі праймерів для ПЛР у реальному часі. Автор щиро вдячний к.б.н. Копач О.В., д.б.н. Білану П.В. та д.б.н. Войтенко Н.В. за допомогу у дослідженні змін кальцієвого гомеостазу в нейронах гіпокампа та за плідну співпрацю. Автор висловлює подяку співробітникам Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України м.н.с. Болдиреву О.І. та м.н.с. Гулак К.Л. за допомогу у виділенні РНК.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені на наступних наукових конференціях: Всеукраїнська наукова конференція "Біологічні дослідження молодих учених в Україні" (28-29 жовтня 2009, Київ, Україна); COST B30 "Cellular Neuropathology: In Vitro Models" (3-7 червня 2010, Київ, Україна); Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Церебральна недостатність, морфогенез, нейропротекція та інтенсивна терапія» (22-23 квітня 2010, Запоріжжя, Україна); Всеросійська конференція за міжнародною участю «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды», (7-9 грудня 2010, Санкт-Петербург, Росія); COST TD0901: HypoxiaNet OXYGEN 2011 (8-12 січня 2011, Давос, Швейцарія); V Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience (6-10 червня 2011, Київ, Україна); Всеукраїнська наукова конференція молодих учених «Фізіологія від молекули до організму» (20-21 жовтня 2011, Київ, Україна); VII Parnas Conference (27-31 серпня 2011, Варшава, Польща); VIII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (3-6 квітня 2012, Львів, Україна); II Міжнародна наукова конференція «Високогірна гіпоксія і геном» (14-17 серпня 2012, Терскол, Росія); Neuroscience 2012, SfN's (Society for Neuroscience) 42nd annual meeting, (13-17 жовтня 2012, Новий Орлеан, США); 8-th FENS forum of Neuroscience, (14-18 липня 2012, Барселона, Іспанія); Neuroscience 2013, SfN's (Society for Neuroscience) 43rd annual meeting (9-13 листопада 2013, Сан Дієго, США).

Публікації. Результати дисертації викладені в 20 публікаціях, з яких 6 статей надрукованих у фахових наукових журналах та 14 тез доповідей за матеріалами міжнародних конференцій та симпозіумів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів, аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел. Робота викладена на 147 сторінках стандартного машинопису та проілюстрована 3 таблицями і 50 рисунками. Перелік використаної літератури містить 310 посилання.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано необхідність і актуальність досліджень молекулярних механізмів ендогенної нейропротекції при ішемічному ураженні гіпокампа. Сформульовані мета і завдання дослідження, наведені відомості щодо наукової новизни, теоретичного та практичного значення роботи, апробації отриманих результатів.

Розділ 1 «Огляд літератури» присвячений аналізу літературних даних щодо молекулярних механізмів, які лежать в основі ішемічного ураження мозку, та пошуку засобів для попередження такого ушкодження або зниження гостроти ураження і відновлення функціонування нервових клітин. Представлено відомості щодо молекулярних механізмів активації фактора, що індукується гіпоксією, NIF-1 та його ролі у механізмах відповіді на ішемію. Охарактеризовано порушення внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостазу при ішемічних станах з особливою увагою щодо ролі Ca^{2+} -транспортувальних систем плазматичної мембрани та

ендоплазматичного ретикулуму (PMCA та SERCA) у підтриманні нейронального Ca^{2+} -гомеостазу.

Матеріали та методи досліджень

Описано методичні підходи, які використовували у проведених дослідженнях. Усі експерименти з тваринами проводили у відповідності до міжнародних етичних стандартів та згідно протоколів затверджених Комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України (Київ, Україна).

Культивування органотипової тканини гіпокампа. Для отримання органотипової культури гіпокампа використовували щурів лінії Wistar 7-денного віку. Культивування зрізів гіпокампа проводили за методом Stoppini (Stoppini et al. 1991). На 12-14 день зрізи використовували для проведення експериментів. Товщина зрізів становила 150-180 мкм.

Модель ішемічного ураження гіпокампа *in situ* та моделювання АПК і інгібування NIF-пролілгідроксилаз. Для моделювання ішемічного ураження було обрано модель киснево-глюкозної деривації (КГД). Зокрема, зрізи інкубували протягом 30 хв при температурі 35°C та заміні глюкози в середовищі культивування на сахарозу, а кисню на азот (95% N_2 , 10 ммоль/л сахарози). Після КГД зрізи повертали до нормальних умов культивування (95% O_2 , 10 ммоль/л глюкози) на 4 години (період реоксигенації). АПК моделювали шляхом інкубації зрізів протягом 5 хв при температурі 35°C та заміні кисню на азот та наявності глюкози у середовищі культивування (95% N_2 , 10 ммоль/л глюкози). Для попередження деградації NIF-1 α субоддиниці, яка чутлива до змін рівня кисню, зрізи інкубували за присутності інгібітора NIF-пролілгідроксилаз, ДПД (внутрішньоклітинні ферменти, які каталізують убіквітинування NIF-1 α субоддиниці) у середовищі культивування у концентрації 5 μM протягом 4 годин. У випадку моделювання ішемічного ураження та стабілізації NIF-1 α субоддиниці, блокатор NIF-пролілгідроксилаз додавали до середовища культивування за 30 хв до проведення КГД та залишали протягом подальшого періоду реоксигенації тривалістю 4 години.

Морфофункціональна характеристика життєздатності нейронів різних зон гіпокампа за допомогою йодиду пропідію (ПЙ). Флуоресцентна реєстрація клітин, забарвлених ПЙ, використовувалась для оцінювання рівня ушкодження клітин в органотипових зрізах гіпокампа, оскільки ПЙ є мембранонепроникним барвником і його присутність внутрішньоклітинно свідчить про пошкодження мембран (Hassen et al. 2004; Raval et al. 2006; Laake et al. 1999). Зрізи інкубували з ПЙ у концентрації 2 мкмоль/л протягом 15-20 хв. після проведення експериментального впливу. Зображення отримували за допомогою мікроскопу обладнаного флуорисцентним родаміновим фільтром (XSP-139A-TP, China) і цифровою камерою (Canon Power Short G-6). Кількість ПЙ-позитивних клітин підраховували в межах площі CA1 та CA3 зон гіпокампа фіксованого розміру (0.5 mm^2).

Кількісний ПЛР-аналіз у реальному часі (Single-cell real-time RT-PCR) у поодиноких нейронах та CA1 і CA3 зон гіпокампа. Дослідження рівня експресії

Н1F-1 α та Н1F-3 α субодиниць проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі у поодиноких нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа. Дослідження зміни рівня експресії Ca²⁺-АТФаз плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму підтипів РМСА1, РМСА2 та SERCA2b, SERCA 3 проводили за допомогою ПЛР у реальному часі в CA1 та CA3 зонах гіпокампа. Для ПЛР були використані специфічні праймери, комплементарні унікальним послідовностям нуклеотидів, які утворюються після вирізання інтронів під час сплайсингу матричної РНК (мРНК). Це дозволяло виключити можливість ампліфікації необхідного продукту з ядерною ДНК, а не з матриці, отриманої внаслідок зворотної транскрипції. У якості внутрішнього контролю використовували β -актин; для експериментів з поодинокими нейронами додатково використовували нейрональний маркер – енолазу (NSE).

Визначення [Ca²⁺]_i у нейронах CA1 і CA3 зон гіпокампа. Визначення якісних і кількісних змін [Ca²⁺]_i у нейронах гіпокампа проводили з використанням високоафінного флуоресцентного Ca²⁺-барвника фура-2/АМ, який додавали до середовища культивування у концентрації 5 μ М/л за наявності детергенту плуронік F-127 (0,02%). Зрізи інкубували з барвником протягом 60 хв при 35°C. Експерименти проводили протягом 1 години після деетерифікації барвника. Флуоресцентний сигнал реєстрували у пірамідальних нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа, розташованих на відстані 30-100 μ м від поверхні, використовуючи водо-імерсійний об'єктив (60x, Ч.А. 0,9, Olympus, Японія) та 12-бітну ССD камеру (Sensicam, PCO, Germany). Збудження флуоресценції барвника здійснювали за допомогою монохроматора PolyChrome IV (Till Photonics, Germany) на довжинах хвиль 340 і 380 нм; емісію реєстрували на довжині хвилі 510 нм з використанням програмного забезпечення Imaging Workbench (INDEC System, USA). Зміну [Ca²⁺]_i у нейронах виражали як зміну інтенсивності флуоресценції сигналів на обох хвилях збудження барвника ($\Delta F_{340}/F_{380}$), що пропорційно зміні [Ca²⁺]_i. Окремо було проведено серію експериментів для визначення рівня автофлуоресценції у органотиповій культурі, яку вираховували із експериментальних реєстрацій [Ca²⁺]_i. Для цього зрізи не фарбували флуоресцентним барвником і реєстрували автофлуоресценцію тканини на обох хвилях збудження барвника фура-2/АМ. Для дослідження функціонування внутрішньоклітинних депо Ca²⁺ використовували селективний блокатор SERCA тапсигаргін, а також кофеїн, який активує Ca²⁺ індуковане вивільнення Ca²⁺ із внутрішньоклітинних органел.

Статистична обробка результатів. Подальшу обробку і представлення результатів, включаючи статистичний аналіз, проводили за допомогою електронних таблиць “Excell 2007” (“Microsoft corporation” США) та за допомогою програмного забезпечення “Origin Pro8” (“OriginLab Corporation” США). Дані перевіряли на нормальність за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Якщо дані демонстрували непараметричний розподіл, їх статистичне порівняння проводили з використанням непараметричних статистичних тестів (Манн-Уїтні U-test), а результати представляли у вигляді медіани з діапазоном вірогідностей (МКР). За умов нормального розподілу даних статистична вірогідність різниць визначалась парним або непарним t-критерієм Стьюдента, а результати представляли як

середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього арифметичного (SEM). Порівняння розподілу вибірок експресії генів для підтипів Ca^{2+} -АТФаз проводили з використанням тесту Колмогорова-Смірнова. Для порівняння більше ніж двох експериментальних груп застосовували тест Крускала-Уолеса (H-тест) та дисперсійний аналіз (one-way ANOVA). Рівень статистичної достовірності позначали наступним чином: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Результати досліджень та їх обговорення

У розділі описано усі результати, отримані при проведенні досліджень для виконання поставлених задач. Результати детально проаналізовані для представлення зміни рівня експресії генів, що кодують HIF-1 α та HIF-3 α субодиниці, Ca^{2+} -АТФази (PMCA та SERCA) та реєстрації зміни внутрішньоклітинного $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при КГД, АПК, ДПД. Наведено аналіз, зокрема $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах CA1 та CA3 зони гіпокампа (аплікація 50 mM KCl тривалістю 60 с), кінетик спаду та наростання цих транз'єнтів та вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо.

Вплив КГД на життєздатність клітин CA1 та CA3 зон гіпокампа.

Для дослідження впливу ішемічного ураження на нейрони гіпокампа було обрано модель 30 хв КГД з наступною 4 год реоксигенацією (Lushnikova et al. 2004) з використанням ПЙ як маркеру ураження клітин (рис.1).

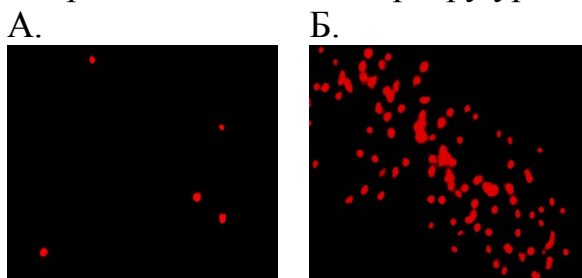


Рис. 1. Оцінювання життєздатності клітин CA1 зони гіпокампа в контролі (А) та після КГД (Б). ПЙ-позитивні клітини зображені червоним кольором.

Таблиця 1.

Кількість ПЙ-позитивних клітин у CA1 та CA3 зонах гіпокампа. ** $P < 0,01$ у порівнянні до контролю.

	Контроль	КГД
CA1	4,2 \pm 0,8(n=10)	107,2 \pm 9,2** (n=10)
CA3	2,8 \pm 1,1(n=10)	55,6 \pm 5,7** (n=10)

Кількість ПЙ-позитивних клітин залишалася стабільно низькою в CA1 та CA3 зонах гіпокампа у контрольних зрізах, однак значно зростала у CA1 зоні (у 25 разів, рис.1 А-Б) та менше у CA3 зоні (у 12 разів) після проведення 30 хв. КГД (таблиця 1). Отже, чутливість нейронів CA1 зони до ішемічного ушкодження є

значно вищою, ніж у нейронів CA3 зони гіпокампа.

Вплив КГД на порушення регуляції внутрішньоклітинного $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа. Одним із механізмів, що зумовлює загибель клітин внаслідок ішемічного ураження є кальцій-індукована токсичність, що опосередковується дестабілізацією внутрішньоклітинної регуляції кальцію внаслідок порушення функціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} -транспортуючих систем. Тому ми дослідили як впливає КГД на

внутрішньоклітинну регуляцію $[Ca^{2+}]_i$ у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа при деполяризації нейронів та на функціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо. Виявилось, що пікова амплітуда та час наростання $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих деполяризацією клітинної мембрани (аплікація 50 mM KCl тривалістю 60 с), не змінювалась у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа після КГД (CA1: $n = 34$; CA3: $n = 29$, рис. 2А-Б, Г-Д). Однак, кінетики спаду $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих деполяризацією, істотно сповільнювалися після КГД в нейронах CA1 зони (на $47 \pm 6\%$, $n = 21$, рис. 2В), проте не в нейронах CA3 зони (рис. 2Е). Таке сповільнення призводило до помітного зростання тривалості відновлення $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів до базового рівня $[Ca^{2+}]_i$. Відновлення тривалістю більше 4 хв. після індукції деполяризації спостерігалось у 7 зрізах із 12 для нейронів CA1 зони та 6 зрізах із 8 для нейронів CA3 зони. Детальний аналіз кінетик відновлення $[Ca^{2+}]_i$ виявив сповільнення швидкої компоненти спаду виключно у нейронах CA1 зони (на $27 \pm 6\%$, $n = 21$, рис. 2В), але не в нейронах CA3 зони (рис. 2Е). Ці дані демонструють порушення регуляції внутрішньоклітинного $[Ca^{2+}]_i$ при деполяризації нейронів та свідчать про значні порушення в роботі Ca^{2+} -транспортних систем, що відповідають за утилізацію високої концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} при деполяризації нейронів.

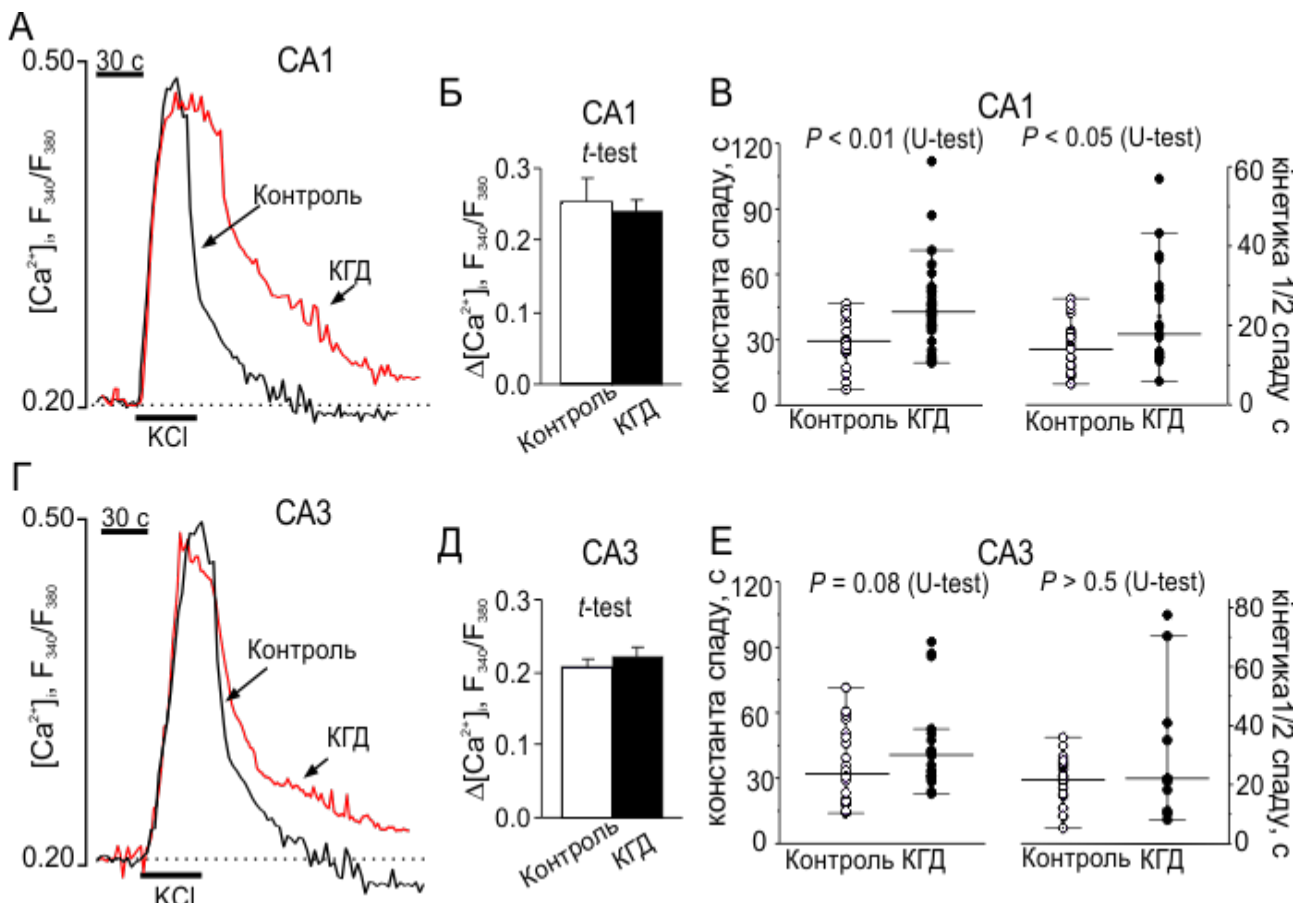


Рис. 2. Реєстрація $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих деполяризацією клітинної мембрани, у нейронах CA1 (А, Б) та CA3 зон гіпокампа (А, Е) у контролі та після КГД.

Акумуляція Ca^{2+} у внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо шляхом SERCA-залежного транспорту в ендоплазматичний ретикулум (ЕР) є важливим

механізмом підтримання внутрішньоклітинного Ca^{2+} гомеостазу. Тому ми надалі з'ясували, як КГД впливає на накопичення Ca^{2+} в депо ЕР. Для цього ми використали агоніст-індуковане вивільнення Ca^{2+} із ЕР за допомогою кофеїну (10 mM), який активує р'анодинові рецептори мембрани ЕР та Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} (CICR).

Кофеїн-індуковане вивільнення Ca^{2+} з ЕР було істотно зменшеним у нейронах СА1 зони (на $51 \pm 7\%$, $n = 25$, $p < 0.05$) після КГД, тоді як у нейронах СА3 зони статистично достовірних змін не спостерігалось (рис. 3). Зменшення кофеїн-індукованого вивільнення Ca^{2+} з ЕР у СА1 нейронах після КГД свідчить про порушення акумуляції Ca^{2+} у внутрішньоклітинних депо цих нейронів та зниження рівня Ca^{2+} всередині ЕР у нейронах СА1 зони.

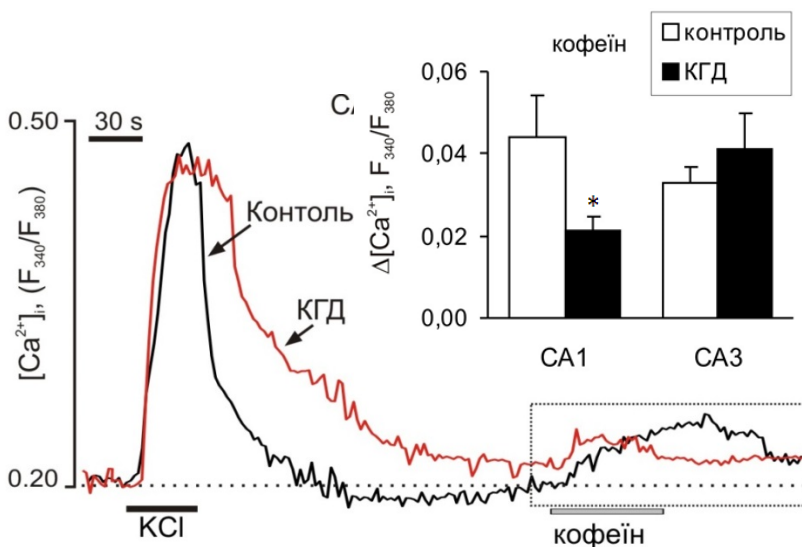


Рис.3. Оцінювання вмісту Ca^{2+} у внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо в СА1 та СА3 нейронах у контролі та після КГД за допомогою кофеїну (10 mM). * $P < 0,05$ у порівнянні до контролю.

Дослідження впливу КГД на нейрон-специфічну експресію генів, що кодують субодиниці NIF-1 α та NIF-3 α . Дослідження експресії різних субодиниць NIF-1 на генному та білковому рівнях активно проводиться багатьма дослідниками (Chávez et al. 2000; Heidbreder et al. 2003), проте як змінюється рівень експресії NIF-1 у нейронах при ішемії залишалось до сьогодні не вивченим. Ми розробили методику отримання поодиноких нейронів різних зон гіпокампа з метою дослідити ці зміни. Ми виявили присутність мРНК NIF-1 α та NIF-3 α субодиниць у нейронах СА1 та СА3 зон гіпокампа до проведення експериментальних впливів. При цьо * рівень експресії NIF-1 α був достовірно вищим у нейронах СА1 зони ($n = 6$), ніж у нейронах зони СА3 ($n = 6$), і вищим ніж рівень експресії NIF-3 α субодиниці ($n = 6$), рис. 4). Рівень експресії NIF-1 α у нейронах СА1 зони гіпокампа достовірно знижувався після проведення КГД ($n = 6$, $p < 0,01$, рис. 4), тоді як у нейронах СА3 зони змін не спостерігалось ($n = 8$). Також спостерігалось достовірне зниження рівня експресії NIF-3 α субодиниці в нейронах СА1 зони після КГД ($n = 6$, $p < 0,01$, рис. 4), однак зниження експресії було незначним у нейронах СА3 зони.

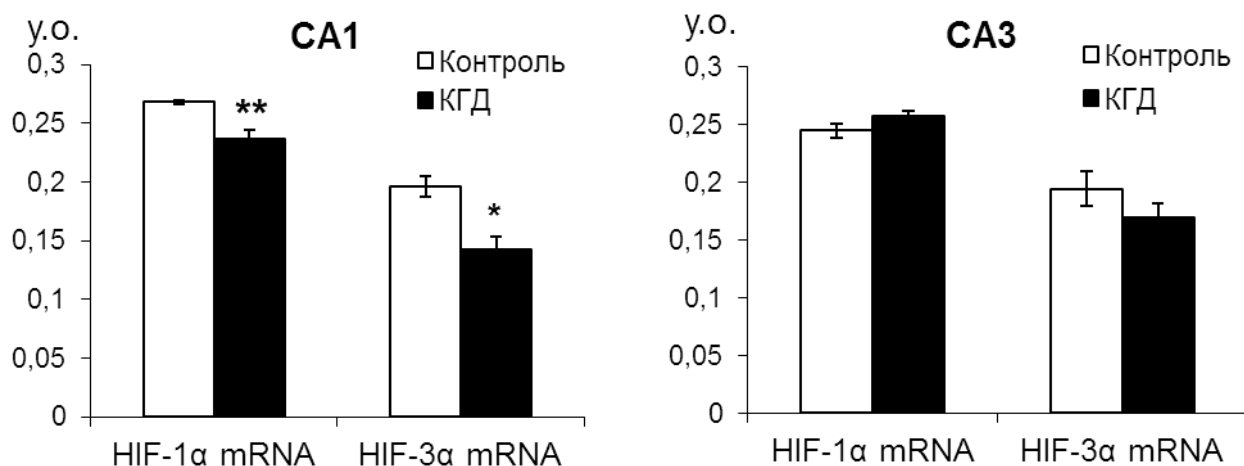


Рис. 4. Експресія генів, що кодують субодиниці HIF-1α та HIF-3α за контрольних умов та після проведення КГД. * $P < 0.05$ та ** $p < 0.01$ у порівнянні до контролю.

Вплив стабілізації HIF-1α на життєздатність клітин CA1 та CA3 зон гіпокампа при ішемічному ураженні. Для дослідження ефекту стабілізації субодиниці HIF-1α на життєздатність нейронів після ішемічного ураження мозку ми використали специфічний блокатор HIF-пролілгідроксилаз, ДПД. Додавання ДПД без наступного моделювання КГД не вело до зміни кількості ПЙ-позитивних клітин в обох зонах гіпокампа (таблиця 2), тоді як комбінування додавання ДПД до середовища культивування перед проведенням КГД призводило до вираженого нейропротективного ефекту, що проявлялось у зниженні кількості ПЙ-позитивних клітин в CA1 та CA3 зонах (в 5,7 та 5,3 рази відповідно, рис. 1 А-Б, рис. 5 А-Б, таблиця 2). Таким чином, стабілізація HIF-1α субодиниці має нейропротективний вплив проти ішемічного ураження тканини мозку.

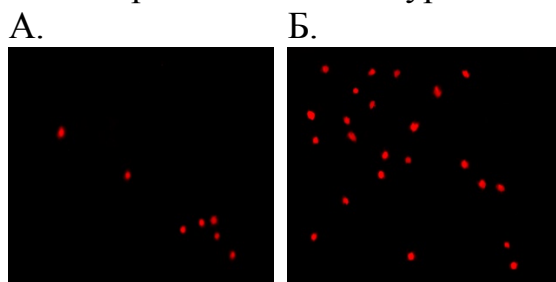


Рис. 5. Оцінювання життєздатності клітин CA1 зони гіпокампа за умов додавання ДПД (А) та комбінування ДПД з КГД (Б). ПЙ-позитивні клітини зображені білим кольором.

Таблиця 2.

Кількість ПЙ-позитивних клітин у CA1 та CA3 зонах гіпокампа. * $P < 0.05$ та ** $p < 0.001$ у порівнянні до контролю, ## $p < 0.001$ у порівнянні до КГД

	Контроль	КГД	ДПД	ДПД+КГД
CA1	4,2±0,8 (n=10)	107,2±9,2** (n=10)	5,6±0,9 (n=10)	19,2±4,47## (n=10)
CA3	2,8±1,1 (n=10)	55,6±5,7** (n=10)	3,8±0,9 (n=10)	10,5±3,2## (n=10)

Вплив стабілізації HIF-1α на КГД-індуковані порушення регуляції внутрішньоклітинного $[Ca^{2+}]_i$ у нейронах CA1 зони гіпокампа. При дослідженні участі HIF-1 у регуляції внутрішньоклітинного $[Ca^{2+}]_i$ ми виявили зростання

амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, викликаних деполяризацією мембрани, в нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа після інкубування зрізів з ДПД (на $\sim 38\%$, $n = 13$ та на $\sim 33\%$ відповідно $n = 25$, рис. 6).

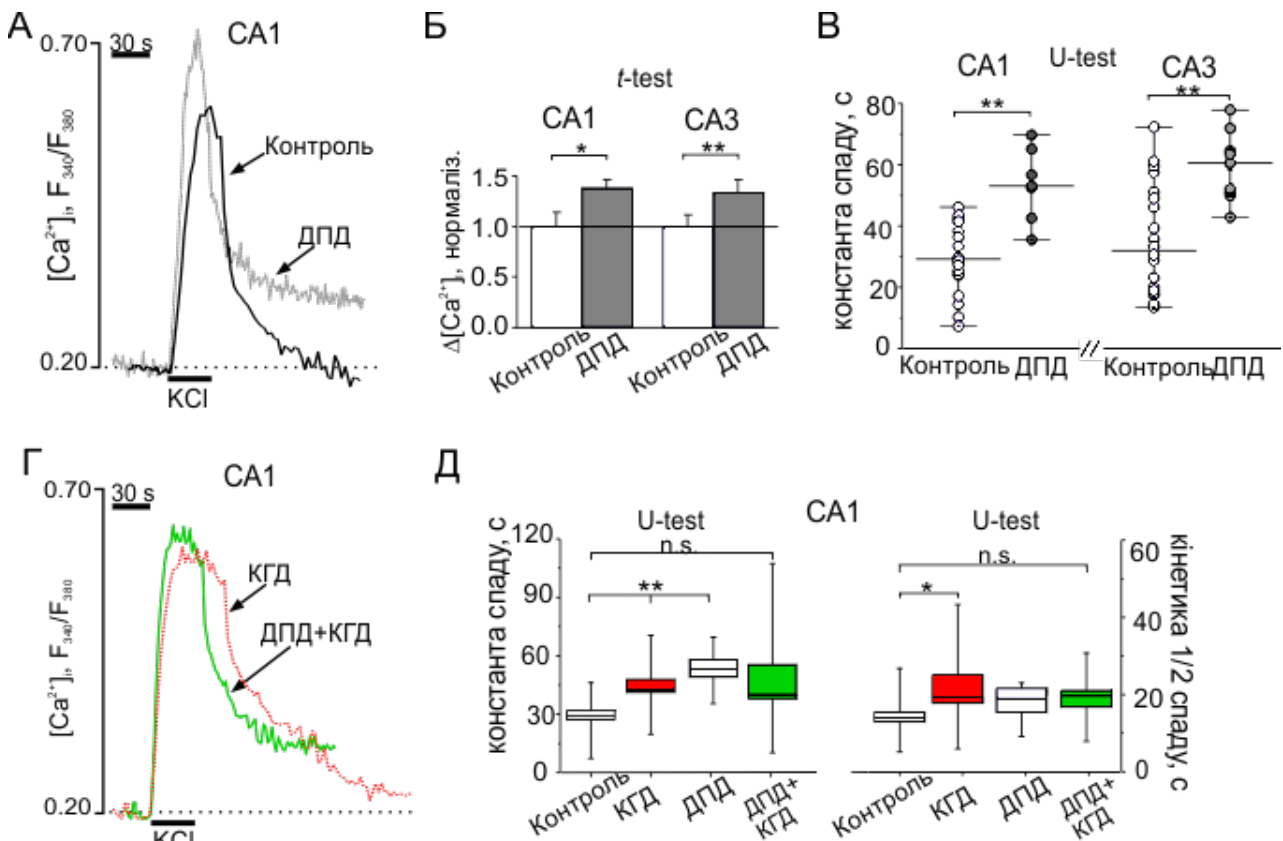


Рис.6. Реєстрація $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих деполяризацією клітинної мембрани, у нейронах CA1 (А, Б) та CA3 зон гіпокампа (Д, Е) після додавання ДПД та комбінування ДПД та КГД. * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$ у порівнянні до контролю.

Зростання амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів супроводжувалось сповільненням кінетики їх спаду в нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа (на $\sim 81\%$ та на $\sim 90\%$ відповідно, рис. 6Б). Такий ефект очевидно обумовлений нещодавно встановленою здатністю NIF-1 потенціювати потенціал-керовані Ca^{2+} -канали Т-типу (Del Toro et al. 2003; González-Rodríguez et al. 2015). Як наслідок такої потенціації, комбінування ДПД з КГД істотно не змінювало ішемічного сповільнення кінетик $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, викликаних деполяризацією мембрани в нейронах обох зон (рис. 6 А, В).

Блокування гідроксилування NIF-1 α призводило до відновлення КГД-індукованого зменшення кофеїн-індукованого вивільнення Ca^{2+} з ЕР у CA1 нейронах (рис. 7). Це свідчить про NIF-1-опосередковану корекцію акумуляції Ca^{2+} у внутрішньоклітинних депо та відновлення рівня Ca^{2+} всередині ЕР у нейронах CA1 зони після проведення ішемії у поєднанні із блокатором NIF-пролілгідроксилаз.

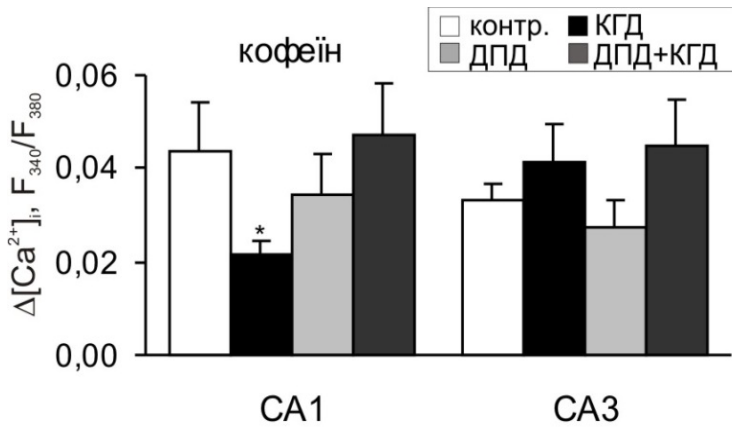


Рис. 7. Агоніст-індуковане вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних депо у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа при аплікації кофеїну (10 мМ) у різних експериментальних умовах. * $P < 0,05$ у порівнянні до контролю.

Вплив стабілізації HIF-1 α на рівень експресії генів, що кодують підтипи Ca²⁺-АТФаз у CA1 та CA3 зонах гіпокампа. Для дослідження молекулярних механізмів, що лежать в основі порушення регуляції внутрішньоклітинного [Ca²⁺]_i при ішемії ми проаналізували зміну експресії генів, що кодують Ca²⁺-АТФази плазматичної мембрани (PMCA1 і PMCA2) та мембрани EP (SERCA2b підтипу) у різних зонах гіпокампа. Нами виявлено високий рівень експресії SERCA2b, PMCA1 і PMCA2 у CA1 та CA3 зонах за контрольних умов. Однак, рівень мРНК PMCA1 та PMCA2 знижувався у CA1 зоні після КГД на 76% (n = 5, p < 0,05) та 68% (n = 4, p < 0,01) відповідно (рис. 8А). Змін рівня експресії SERCA2b в CA1 зоні гіпокампа після КГД не спостерігалось. При цьому у CA3 зоні рівень експресії PMCA1 та PMCA2 залишався незмінним після КГД (рис. 8 Б), тоді як рівень експресії SERCA2b зростав на 81% (n = 7, p < 0.01, рис. 8Б). Ці дані узгоджуються з отриманими нами результатами дослідження змін регуляції внутрішньоклітинного [Ca²⁺]_i після ішемії, а саме, відсутності драматичних змін регуляції [Ca²⁺]_i у нейронах CA3 зони. Отже, зростання рівня експресії генів, що кодують Ca²⁺-АТФази може лежати в основі резистентності нейронів CA3 зони до Ca²⁺-індукованої токсичності і опосередковувати виживання CA3 нейронів гіпокампа за умов ішемічного ураження.

Стабілізація HIF-1 α обумовлювала зростання рівня експресії SERCA2b у CA1 зоні на 135% (n = 5, p < 0.01; рис. 8А). Крім того, таке зростання рівня експресії SERCA2b зберігалось у нейронах CA1 зони після КГД у комбінації з ДПД (на 88%, n = 6, p < 0.05, рис. 8А). Ці результати свідчать про роль HIF-1 α у регуляції експресії SERCA2b у нейронах гіпокампа. Цікаво, що стабілізація субодиниці HIF-1 α достовірно не впливала на зміну рівня експресії PMCA1 та PMCA2 в CA1 зоні гіпокампа, проте, попереджувала КГД-індуковане зниження рівня експресії PMCA2 в CA1 зоні (n = 6, рис. 8А) Зокрема, рівень експресії PMCA2 зростав на 41% (n = 5, p < 0,05, рис. 8А) після КГД у комбінації з ДПД у порівнянні із КГД без ДПД. Отримані дані свідчать, що стабілізація субодиниці HIF-1 α регулює рівень експресії Ca²⁺-АТФаз у нейронах різних зон гіпокампа та може опосередковувати механізм селективної чутливості CA1 та CA3 нейронів гіпокампа до ішемічного ушкодження.

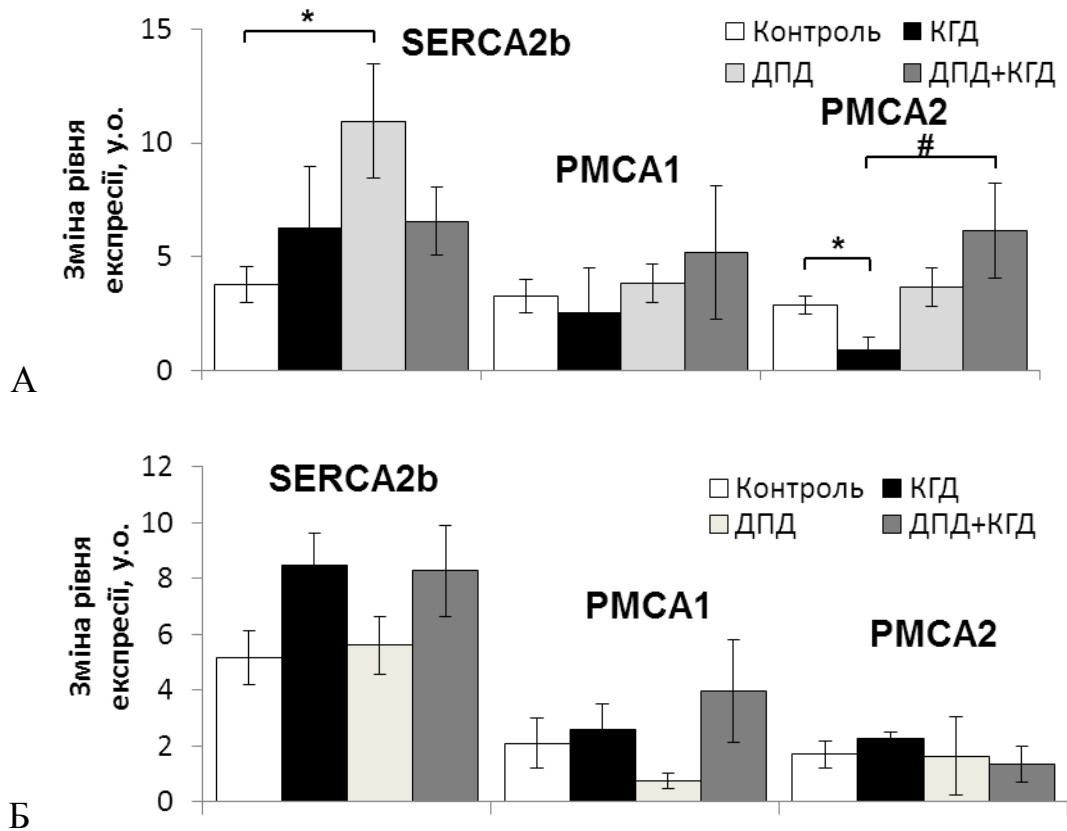


Рис. 8. Експресія SERCA2b та PMCA1 і PMCA2 в CA1(А) та CA3(Б) зонах гіпокампа в контролі, КГД, ДПД та ДПД + КГД. * $P < 0,05$ у порівнянні до контролю, # $p < 0,05$ у порівнянні до КГД.

Дослідження впливу АПК на життєздатність клітин CA1 та CA3 зон гіпокампа. В кінці 1990 р. було вперше виявлено, що короткострокове гіпоксичне прекодиціювання підвищує резистентність нейронів гіпокампа до тривалого ішемічного ураження (Kitagawa et al. 1990). Подальші клінічні дослідження показали, що повторювані гіпоксичні прекодиціювання сприяють адаптації до ішемічного ураження (Moncayo et al. 2000; Weih et al. 1999). Незважаючи на численні експериментальні дані, які демонструють виражений нейропротективний властивості застосування короткострокового повторюваного аноксичного або гіпоксичного пре- та посткодиціювання (Dirnagl et al. 2009), молекулярний механізм такого ефекту залишається нез'ясованим.

Для встановлення оптимальної моделі АПК, ми проводили АПК тривалістю 2- та 5-хв. з одно-, дво-, чи триразовим повторенням кожні 12 годин. Наші результати демонструють незначне зростання кількості ушкоджених клітин на одиницю площі при застосуванні одно-, дво- чи трикратного повторення як 2-хв, так і 5-хв АПК (таблиця 3). Поодинокі 2-хв чи 5-хв. АПК з наступним КГД не мало вираженого протективного ефекту, який досягався за умов дво- та трикратного повторення 2-хв чи 5-хв АПК в поєднанні з КГД (таблиця 3). Тому подальший вибір моделі АПК був зосереджений на дослідженні 2-х та 3-разових повторень АПК тривалістю 2 хв. та 5 хв.

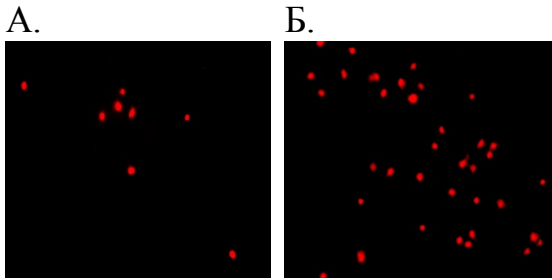


Рис. 9. Оцінювання життєздатності клітин СА1 зони гіпокампа за умов АПК (А) та за умов комбінування АПК з КГД (Б). ПЙ-позитивні клітини зображені білим кольором.

Таблиця 3.

Кількість ПЙ-позитивних клітин на мм² в СА1 зоні гіпокампа за умов АПК різної тривалості і кратності повторів (n=4). *P < 0.05 у порівнянні до КГД.

СА1	1хАПК (2 хв)	2хАПК (2 хв)	3хАПК (2 хв)	1хАПК (5 хв)	2хАПК (5 хв)	3хАПК (5 хв)
контроль	3,8±1,9	4,5±1,3	6,5±1,5	8±1,4	11±2,8	8,2±1,3
КГД	100±7,1	62,5±11,8*	57,5±8,5*	85±2,9	52,5±4,8*	33,2±5,4*

Найефективнішою моделлю виявилось 3-разове повторення АПК тривалістю 5 хв., яке супроводжувалось зниженням кількості ушкоджених нейронів в СА1 зоні у 3,2 рази після КГД (зокрема, таке зниження при 1-разовому 2-хв. АПК було у 1,7 разів, а при 2-разовому 5-хв. АПК у 1,5 рази, Таблиця 3, рис. 1Б, рис. 9 А-Б). Отже, 3-разове повторення АПК тривалістю 5 хв. виявляє найбільш виражений нейропротективний характер.

Вплив АПК на зміну рівня експресії генів, що кодують субодиниці HIF-1α та HIF-3α, у поодиноких нейронах СА1 та СА3 зон гіпокампа. Для встановлення ефекту АПК на модуляцію експресії HIF-1α ми застосували найбільш оптимальну модель АПК і дослідили нейрон-специфічну експресію субодиниць HIF-1α та HIF-3α. АПК призводило до достовірного зростання рівня експресії обох субодиниць у СА1 зоні гіпокампа після КГД (n = 6, рис.10). Такий ефект схожий до ефекту блокування пролілгідроксилаз, що свідчить про HIF-1-опосередкований ефект АПК. При цьому у нейронах СА3 зони гіпокампа достовірних змін не спостерігалось (n = 8).

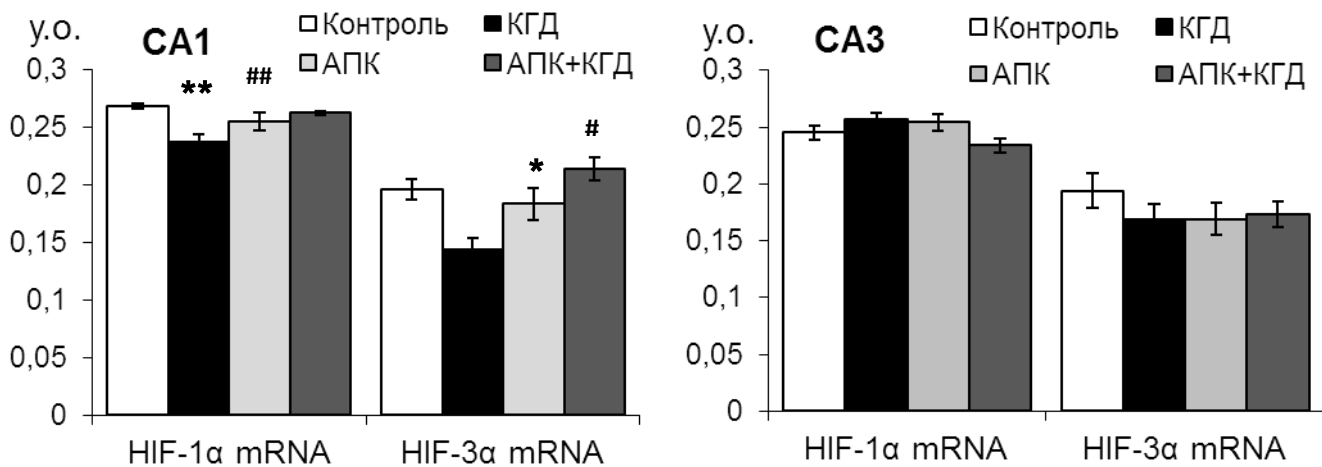


Рис. 10. Експресія HIF-1α та HIF-3α у контролі та після КГД, АПК, АПК+КГД у поодиноких нейронах СА1 та СА3 зон гіпокампа. *P < 0,05; **p < 0,01 у порівнянні до контролю; #p < 0,05; ##p < 0,01 у порівнянні до КГД.

Ефект АПК на порушення регуляції внутрішньоклітинного $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах СА1 зони гіпокампа за умов ішемічного ураження мозку. При дослідженні ефекту АПК на регуляцію внутрішньоклітинного $[Ca^{2+}]_i$ ми виявили суттєве зростання амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, викликаних деполяризацією мембрани, у нейронах СА1 зони (на $56 \pm 4\%$, $n = 19$), що супроводжувалось зростанням кінетики транз'єнту (на $28 \pm 1\%$). У нейронах СА3 зони змін не спостерігалось. Подібний ефект зростання амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів (на $58 \pm 6\%$, $n = 11$, $p < 0.01$) спостерігався у нейронах СА1 зони при комбінуванні АПК з КГД (рис. 11А-Б). Однак, АПК не призводило до відновлення КГД-індукованого сповільнення кінетики спаду $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів у нейронах СА1 зони (рис. 12).

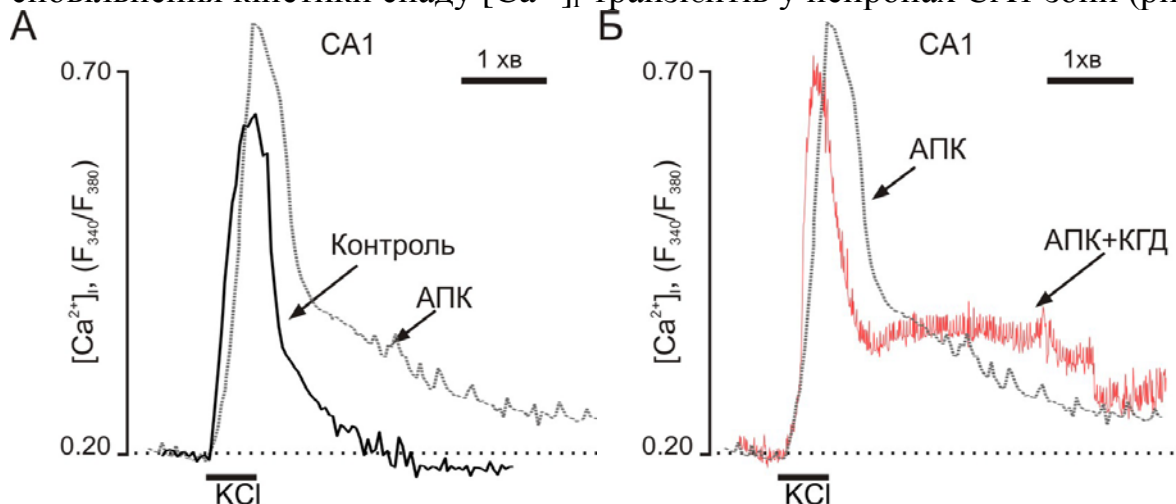


Рис. 11. Реєстрація $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих деполяризацією клітинної мембрани, у нейронах СА1 зони після АПК та АПК+КГД.

При дослідженні впливу АПК на вміст Ca^{2+} у внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо ми не спостерігали змін кофеїн-індукованого вивільнення Ca^{2+} з ЕР у нейронах СА1 та СА3 зон після АПК. При цьому АПК призводило до попередження КГД-індукованого зменшення кофеїн-індукованого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту у нейронах СА1 зони (амплітуда транз'єнтів зростала на $69 \pm 5\%$ після АПК з КГД порівняно з КГД, рис. 13). Отже, АПК потенціювало акумуляцію Ca^{2+} в ЕР та відновлювало рівень Ca^{2+} , депонованого в ЕР у нейронах СА1 зони після ішемії. Такий ефект АПК був подібним до ефекту блокування гідроксилування НІФ-1 α і свідчить про потенціацію SERCA-залежного транспорту Ca^{2+} за умов ішемії.

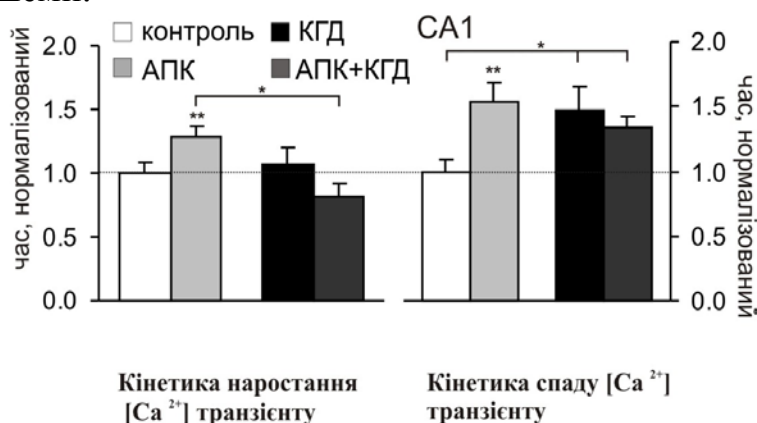


Рис. 12. Кінетика спаду та наростання індукованого деполяризацією $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту в СА1 нейронах гіпокампа за контрольних умов, КГД, АПК та АПК+КГД. * $P < 0,05$ та ** $p < 0,01$ у порівнянні до контролю.

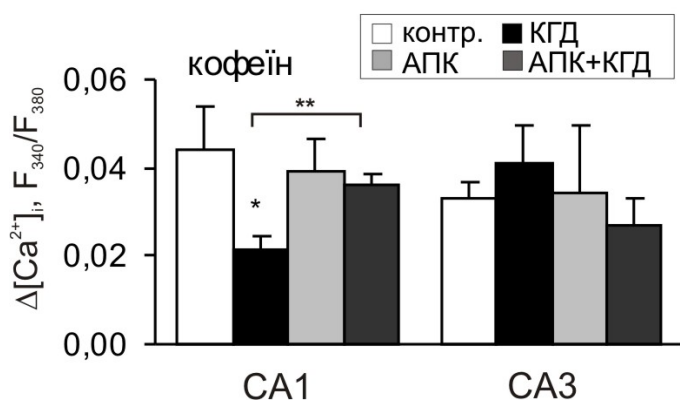


Рис. 13. Амплітуди кальцієвих транз'єнтів, індукованих аплікацією кофеїну (10 мМ) в нейронах CA1 та CA3 зон в контроль, КГД, АПК, АПК+КГД * $P < 0,05$ у порівнянні до контролю, ** $p < 0,01$ у порівнянні до КГД.

Вплив АПК на зміну рівня експресії генів, що кодують підтипи Ca^{2+} -АТФаз (SERCA ТА PMCA) у CA1 та CA3 зонах гіпокампа. Для підтверження здатності АПК активувати SERCA-залежну акумуляцію Ca^{2+} в ЕР у нейронах CA1 зони за умов ішемії ми дослідили нейрон-специфічну зміну експресії Ca^{2+} -АТФаз. АПК достовірно не впливало на зміну рівня експресії PMCA1 та PMCA2 в CA1 зоні гіпокампа, але призводило до зростання рівня експресії SERCA2b в CA1 зоні (на 62%, $n = 8$, $p < 0.05$; рис. 14А). Таке зростання рівня експресії SERCA2b у нейронах CA1 зони спостерігалось також після КГД (на 58%, $n = 6$, $p < 0.05$, рис. 14А). Ці результати свідчать про здатність АПК потенціювати експресію SERCA2b у нейронах CA1 зони гіпокампа, що попереджує КГД-індуковане дисфункціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо у нейронах CA1 зони та може лежати в основі високої селективності цих нейронів до ішемічного ушкодження.

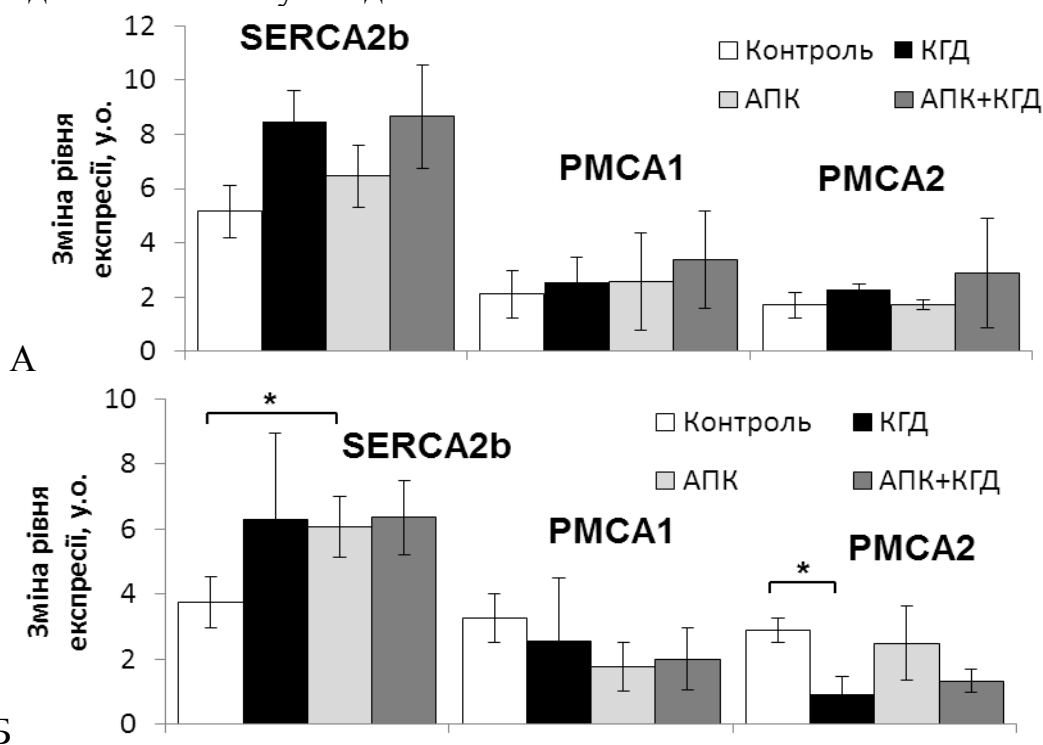


Рис. 14. Експресія SERCA2b, PMCA1 і PMCA2 у CA1 (А) та CA3 (Б) зонах гіпокампа у контролі, КГД, АПК та АПК+КГД. * $P < 0,05$ у порівнянні до контролю.

Отримані нами експериментальні результати комплексного дослідження механізмів ендогенної нейропротекції для запобігання уражень мозку та попередження ішемічного ушкодження на клітинному рівні демонструють, що в основі селективної чутливості нейронів СА1 та СА3 зон гіпокампа до ішемічного ураження лежить нейрон-селективна активація експресії транскрипційного фактору, який індукується гіпоксією, HIF-1 та, як наслідок, нейрон-специфічне ураження внутрішньоклітинних Ca^{2+} -регуляторних механізмів, що призводить до Ca^{2+} -індукованої токсичності та загибелі нейронів. Наші експериментальні дані вказують на нейропротективні властивості стабілізації кисеньчутливої субодиниці HIF-1 α та АПК для потенціації ендогенної нейропротекції до ішемічного ушкодження а також розкривають механізм такої потенціації, який обумовлюється шляхом HIF-1-опосередкованої регуляції експресії генів, що кодують Ca^{2+} -АТФази.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено, що ішемічне ураження має різний вплив на нейрони різних зон гіпокампа, зумовлюючи високий рівень смертності нервових клітин, порушення кальцієвого гомеостазу та зниження рівня HIF-1 α та HIF-3 α субодиниць в СА1, але не в СА3 зоні гіпокампа. Активація HIF-1 α , шляхом попереднього інгібування HIF-1-пролілгідроксилаз та АПК має виражений нейропротективний характер.

1. Показано, що моделювання ішемічного ураження *in situ* шляхом проведення КГД тривалістю 30 хв. призводило до загибелі нейронів СА1 та СА3 зон гіпокампа із виражено вищим рівнем чутливості клітин СА1 зони, ніж клітин СА3 зони гіпокампа.
2. Ішемічне ураження клітин СА1 зони корелювало із зниженням рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α , тоді як вища резистентність клітин СА3 зони супроводжувалась зростанням рівня експресії HIF-1 α .
3. Моделювання ішемічного ураження *in situ* призводило до порушення регуляції внутрішньоклітинного $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у нейронах СА1 зони, що супроводжувалось сповільненням відновлення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ після деполаризації нейронів та зниженням рівня Ca^{2+} у внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо після КГД, тоді як у нейронах СА3 зони таких змін не спостерігалось.
4. Розроблено оптимальну модель короткострокового аноксичного прекодиціювання (3-разове повторення АПК тривалістю 5 хв), що призводило до зниження кількості ушкоджених клітин в обох зонах.
5. АПК призводило до відновлення рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α субодиниць у нейронах СА1 зони гіпокампа за умов КГД, нормалізації вмісту Ca^{2+} у внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депонуючих органелах, що супроводжувалось зростанням рівня експресії SERCA2b у цих нейронах.
6. Показано, що при інгібуванні HIF-пролілгідроксилаз у нейронах СА1 зони гіпокампа за умов КГД, також відбувається нормалізація вмісту Ca^{2+} у внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депонуючих органелах і зростає рівень експресії

SERCA2b, а це вказує на HIF-1-опосередковану модуляцію експресії генів, які кодують Ca^{2+} -АТФази, демонструючи нові гени-мішені HIF-1.

7. Таким чином, виражений нейропротективний характер АПК та інгібування HIF-пролілгідроксилаз свідчить про HIF-1-опосередковану ендогенну нейропротекцію.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Brief anoxia preconditioning and HIF prolyl-hydroxylase inhibition enhances neuronal resistance in organotypic hippocampal slices on model of ischemic damage. / Lushnikova I., Orlovsky M., Dosenko V., Maistrenko A., Skibo G.. Mild anoxia and HIF prolyl-hydroxylase inhibitor prevent ischemic neurodegeneration in organotypic hippocampal slices // Brain Res. 2011 PMID: 21338581 pp. 175-183. *(Дисертант особисто виконувала частину експериментів та брала участь у обговоренні результатів дослідів).*

2. Neuroprotective Mechanisms of Intermittent Hypoxia: An In Vitro Study / Skibo G., Orlovsky M, Maistrenko A., Dosenko V., Lushnikova I. // Intermittent Hypoxia and Human Diseases, London: Springer-Verlag. – 2012. –P.173-180. *(Дисертант особисто виконувала частину експериментів та брала участь у обговоренні результатів дослідів).*

3. Експресія факторів індукованих гіпоксією (HIF) в умовах моделювання ішемічного ушкодження гіпокампа *in vitro*/ Г. Скібо, А. Майстренко, М. Орловський, В. Досенко, М. Пацева, І. Лушнікова// Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Vol. 15. – № 3. – С. 299-302. *(Дисертант особисто виконувала більшу частину експериментів, обробку результатів аналіз та написання статті).*

4. Фактор, що індукується гіпоксією: комплексність дії та дуалізм ефектів / А.М. Майстренко, О.В. Копач, Г.Г. Скібо // Нейрофізіологія. – 2015. – Т. 47. –№ 3. – С. 300-308. *(Дисертант особисто здійснювала аналіз та узагальнення даних літератури та написання статті).*

5. Майстренко А.М. Особливості кальцієвої сигналізації при ішемічному ураженні нервових тканин – нейронів гіпокампа / А.М. Майстренко, Н.В. Войтенко // "Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія ". – 2015. – № 70. –С. 70-73. *(Дисертант особисто здійснювала аналіз та узагальнення даних літератури та написання статті).*

6. HIF-1 α -mediated upregulation of SERCA2b: The endogenous mechanism for alleviating the ischemia-induced intracellular Ca^{2+} store dysfunction in CA1 and CA3 hippocampal neurons / О. Корпач, А.Маистренко, І. Lushnikova, Р. Belan, G.Skibo, N.Voitenko // Cell Calcium. – 2016. doi:10.1016/j.cesa.2016.02.014. *(Дисертант особисто виконувала більшу частину експериментів, обробку результатів аналіз, брала участь у обговоренні результатів дослідів та написанні статті).*

7. Експресія HIF (Фактору індукованого гіпоксією) в нейронах гіпокампа в умовах моделювання ішемічного ушкодження та аноксичного прекодиціювання / Майстренко А.М., Лушнікова І.В., Орловський М.А., Досенко

В.Є. Скибо Г.Г. // Всеукраїнська наукова конференція "Біологічні дослідження молодих учених в Україні", 28-29 жовтня 2009 р, м. Київ.

8. Role of HIF-1 and HIF-3 in anoxia-induced neuroprotection in cultured rat hippocampal slices / Maistrenko A., Lushnikova I., Orlovsky M., Dosenko V., Skibo G. // COST B30 "Cellular Neuropathology: In Vitro Models", Kiev, 3-7 June 2010.- Abstract book. - P.38.

9. Молекулярні механізми ендогенної нейропротекції в умовах моделювання ішемічного ушкодження гіпокампа in vitro / Лушнікова І.В., Орловський М.О., Майстренко А.М., Рибачук О.А., Досенко Є.В.// Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Церебральна недостатність, морфогенез, нейропротекція та інтенсивна терапія», Запоріжжя, 22-23 квітня 2010.

10. Эндогенная нейропротекция при экспериментальной ишемии мозга / Скибо Г.Г., Майстренко А.М., Лушнікова І.В., Орловський М.А., Досенко В.Е. // Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды», Санкт-Петербург, 7-9 дек. 2010.

11. Role of hypoxia-inducible factors in anoxia-mediated neuroprotection of hippocampal neurons / Maistrenko A., Lushnikova I., Orlovsky M., Dosenko V., Skibo G. // COST TD0901: HypoxiaNet OXYGEN 2011, Davos, Switzerland 8-12 January 2011, p. 52.

12. Neuroprotection induced by anoxia preconditioning in hippocampal slices are dependent upon hypoxia-inducible factors HIF expression and degradation / Maistrenko A., Lushnikova I., Orlovsky M., Dosenko V., Skibo G.// V Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, Kiev, June 6-10, 2011. - Abstract book. - P. 67.

13. Роль факторів, індукованих гіпоксією, у нейропротекторних механізмах при моделюванні ішемічного ушкодження на культивованих зрізах гіпокампа / Майстренко А.М., Лушнікова І.В., Орловський М.А., Досенко В.Є. Скибо Г.Г. // Всеукраїнська наукова конференція молодих учених «Фізіологія від молекули до організму», Київ 2011, 20-21 жовтня 2011 р., Фізіологічний журнал. 2012, - Т.57. - № 5. - С.108.

14. Expression of HIF mediates endogenous neuroprotection of hippocampal neurons during the ischemic and anoxic precondition / Maistrenko A., Lushnikova I., Orlovsky M., Dosenko V., Skibo G. // VII Parnas Conference, Warsaw, Poland, August 27-31, 2011, Acta Biochimica Polonica, - 2011. - V. 58. - Supp. 1. - P. 32.

15. HIF індуковані механізми нейрональної толерантності в умовах киснево-глюкозної депривації / Майстренко А.М., Лушнікова І.В., Орловський М. О., Досенко В.Є., Скибо Г.Г. // «Молодь і поступ в біології» м. Львів, Україна 3-6 квітня 2012 р. Збірник тез. - С. 285.

16. Endogenous mechanisms of adaptation under oxygen-glucose deficiency / Lushnikova I.V., Kyrychenko K.A., Orlovsky M.A., Maistrenko A.M., Dosenko V.E., Skibo G.G. // Матеріали 2 Міжнародної наукової конференції «Високогірна гіпоксія і геном» Терскол, Росія 2012, Фізіол. журн. 2012. - Т. 58. - № 4. - С. 70.

17. Neuronal subtypes specificity of altered calcium signaling during ischemia, anoxia preconditioning, and blockage of HIF degradation in hippocampal organotypic slices / Voitenko N., Kopach O., Maistrenko A., Lushnikova I., Dosenko V., Skibo G. // Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, Oct. 13 -17, New Orleans, USA. - Abstract book.

18. Neuronal subtyped specificity of altered calcium signaling during ischemia, anoxia preconditioning, and blockage of HIF degradation in hippocampal organotypic slices / O. Kopach, A. Maistrenko, I. Lushnikova, G. Skibo, N. Voitenko // 8-th FENS forum of Neuroscience, Barcelona, Spain July 14-18 2012, - Abstract book. - P. 396.

19. Voitenko N. V Anoxia preconditioning and block of HIF degradation specifically attenuates ischemia-induced changes in intracellular calcium signaling in CA1 and CA3 hippocampal neurons / Voitenko N., Kopach O., Maistrenko A., Lushnikova I., Dosenko V., Skibo G // Neuroscience 2013, SfN's 43rd annual meeting, Nov. 9-13, San Diego, USA- Abstract book.

20. Ischemia-induced changes in intracellular calcium signaling in CA1 and CA3 hippocampal neuros specifically attenuates by anoxia preconditioning and block of HIF degradation / Maistrenko A., Kopach O., Lushnikova I., Dosenko V., Voitenko N., Skibo G. // "Physiology: from Molecules to Organism" III conference of young scientists, 24-25 Jun. 2013, - Abstract book. - P. 20.

АННОТАЦІЯ

Майстренко А.М. Участь гіпоксія-індукованого фактору в молекулярних механізмах нейропротекції клітин гіпокампа.– На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена дослідженню молекулярних механізмів ендогенної нейропротекції клітин гіпокампа після киснево-глюкозної депривації (КГД) та активації цих процесів за допомогою аноксичного прекодиціювання (АПК) та інгібування HIF-пролілгідроксилаз. Показано істотне пошкодження нейронів CA1 зони гіпокампа після КГД та резистентність нейронів CA3 зони до ішемічного ушкодження. Висока селективна чутливість нейронів CA1 зони гіпокампа до ішемічного ушкодження супроводжувалась зниженням рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α субодиниць у цих нейронах та порушенням регуляції внутрішньоклітинного [Ca²⁺]_i. Зокрема, істотно сповільнювалось відновлення [Ca²⁺]_i транзйенту, індукованого деполяризацією плазматичної мембрани, та зменшувався вміст Ca²⁺ депонованого у внутрішньоклітинних органелах, що свідчить про порушення функціонування Ca²⁺-АТФаз у нейронах CA1 зони після КГД. Спостерігалось зниження рівня експресії генів, що кодують Ca²⁺-АТФази плазматичної мембрани (PMCA1 та PMCA2 підтипи) в CA1 зоні гіпокампа внаслідок КГД, тоді як у CA3 зоні спостерігалось навпаки зростання рівня експресії Ca²⁺-АТФаз ендоплазматичного ретикулуму (підтипу SERCA2b)() та незмінна експресія PMCA1 та PMCA2. АПК призводило до відновлення рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α субодиниць в нейронах CA1 зони гіпокампа за умов

КГД та зростання рівня SERCA2b, що супроводжувалось нормалізацією вмісту Ca^{2+} у внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депонуючих органелах. Подібний ефект спостерігався при інгібуванні HIF-пролілгідроксилаз, що вказує на HIF-1-опосередковану модуляцію експресії генів, що кодують Ca^{2+} -АТФази та демонструє нові гени-мішені HIF-1, і може лежати в основі HIF-1-індукованої ендогенної нейропротекції.

Ключові слова: фактор, що індукується гіпоксією (HIF-1), аноксичне прекодиціювання (АПК), киснево-глюкозна депривація (КГД), внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} , Ca^{2+} -АТФаза плазматичної мембрани (PMCA), Ca^{2+} -АТФаза ендоплазматичного ретикулуму (SERCA).

АННОТАЦІЯ

Майстренко А.М. Участие гипоксия-индуцированного фактора в молекулярных механизмах нейропротекции клеток гиппокампа.- На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 - физиология человека и животных. Институт физиологии им.А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена исследованию молекулярных механизмов эндогенной нейропротекции клеток гиппокампа после кислородно-глюкозной депривации (КГД) и активации этих процессов с помощью аноксического прекодиционирования (АПК) и ингибирования HIF-пролилгидроксилаз. Показано существенное повреждение нейронов CA1 зоны гиппокампа после КГД и резистентность нейронов CA3 зоны к ишемическому повреждению. Высокая селективная чувствительность нейронов CA1 зоны гиппокампа к ишемическому повреждению сопровождалась снижением уровня экспрессии HIF-1 α и HIF-3 α субъединиц в этих нейронах и нарушением регуляции внутриклеточного $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В частности, существенно замедлялось восстановление $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -транзиента, индуцированного деполяризацией плазматической мембраны, и уменьшалось содержание Ca^{2+} , депонированного во внутриклеточных органеллах, что свидетельствует о нарушении функционирования Ca^{2+} -АТФаз в нейронах CA1 зоны после КГД. Наблюдалось снижение уровня экспрессии генов, кодирующих Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны (PMCA1 и PMCA2 подтипы) в CA1 зоне гиппокампа после КГД, тогда как в CA3 зоне наблюдался наоборот рост уровня экспрессии Ca^{2+} -АТФазы ендоплазматического ретикулума (подтипа SERCA2b) и неизменная экспрессия PMCA1 и PMCA2. АПК приводило к восстановлению уровня экспрессии HIF-1 α и HIF-3 α субъединиц в нейронах CA1 зоны гиппокампа вследствие КГД и к повышению уровня экспрессии SERCA2b, что сопровождалось нормализацией содержания Ca^{2+} во внутриклеточных Ca^{2+} -депонировавших органеллах. Подобный эффект наблюдался при ингибировании HIF-пролилгидроксилаз, что указывает на HIF-1-опосредованную модуляцию экспрессии генов, кодирующих Ca^{2+} -АТФазы, и демонстрирует новые гены-мишени HIF-1, что может лежать в основе HIF-1-индуцированной эндогенной нейропротекции.

Ключевые слова: фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1), аноксическое preconditionирование (АПК), кислородно-глюкозная депривация (КГД), внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны (PMCA), Ca^{2+} -АТФаза эндоплазматического ретикулума (SERCA).

SUMMARY

Maistrenko A.M. Involvement of hypoxia-inducible factor in the molecular mechanisms of hippocampal cells neuroprotection .– Manuscript.

Thesis for Ph.D. degree in biological sciences, speciality 03.00.13 – human and animal physiology/ Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

The study is focused on the molecular mechanisms mediating endogenous neuroprotection in CA1 and CA3 neurons of the hippocampus and a possibility to activate this neuroprotection with anoxic precondition (APC) and inhibition of HIF-prolylhydroxylase.

We have shown the differential susceptibility of CA1 and CA3 hippocampal neurons to cell damage after oxygen-glucose deprivation (OGD) *in situ*, particularly higher vulnerability of CA1 neurons and lower one for CA3 neurons, accompanied by the decayed level of both HIF-1 α and HIF-3 α subunit expression in CA1 neurons with none changes in CA3 neurons. APC (performed three times for 5-min duration) led to a recovery of HIF-1 α and HIF-3 α subunit expression in CA1 neurons those remained increased following subsequent OGD (as compared to OGD without APC).

We also combined Ca^{2+} imaging in organotypic hippocampal slices with quantitative real time PCR analysis to investigate the ischemic impairments in intracellular Ca^{2+} regulation in CA1 and CA3 neurons and to establish the role of HIF-1 α in alleviating of these changes in both neuronal populations. Our results demonstrate the differential vulnerability of CA1 and CA3 hippocampal neurons to the ischemic impairments of intracellular Ca^{2+} regulation. For instance, the depolarization-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients were decelerated (both fast and slow decay kinetics) and the intracellular Ca^{2+} store functioning was impaired specifically in CA1 neurons 4 h post-OGD, a time-point representing a massive delayed death of CA1 neurons induced by OGD. The OGD-induced Ca^{2+} store dysfunction in CA1 neurons was manifested as the decrease of Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} stores (both caffeine-sensitive and -insensitive) that resulted in the abolished contribution of Ca^{2+} stores to generation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients during neuronal depolarization. Together this demonstrates the impaired cytosolic Ca^{2+} sequestration following ischemia and suggests the affected Ca^{2+} pumping by Ca^{2+} -ATPases (PMCA and SERCA). Indeed, our q-RT PCR analysis revealed the downregulation in both PMCA1 and PMCA2 mRNAs in CA1 area at 4 h post-OGD. In CA3 neurons, the depolarization-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients as well as Ca^{2+} release from the ER were not changed following OGD. Further, the PMCA1 and PMCA2 gene expression were unchanged in CA3 neurons while the SERCA2b gene expression was upregulated in these neurons by ischemic conditions. Our findings of the cross-link between differently impaired intracellular Ca^{2+} regulation in CA1 and CA3 neurons and the altered Ca^{2+} -ATPase gene expression indicate the heterogeneity of CA1- and CA3-neuron-specific responses to ischemia at both cellular and genetic levels. Ischemic

upregulation of SERCA2b in CA3 neurons, evidenced by the increased gene expression and unaltered intracellular Ca^{2+} store function after OGD, argues for the role of SERCA2b upregulation as a mechanism mediating, at least partially, less vulnerability of CA3 neurons to the ischemia-induced cytoplasmic Ca^{2+} overload and Ca^{2+} -dependent excitotoxicity.

We have also shown the capability of APC and stabilization of HIF-1 α to modulate Ca^{2+} -ATPase expression and to amend the intracellular Ca^{2+} regulation in CA1 and CA3 hippocampal neurons. Either APC or stabilization of HIF-1 α arrested the ischemic dysfunction of intracellular Ca^{2+} stores in CA1 neurons, probably through a direct post-transcriptional control of gene coding SERCA2b, and alleviated the ischemic downregulation of PMCA1 and PMCA2 gene expression in these neurons.

Thus, our results unveil, for the first time, the HIF-1 α -mediated, CA1- and CA3-neuron-specific modulation of Ca^{2+} -ATPase expression (both PMCA and SERCA) and provide basis for further investigations of the effects of APC and HIF-1 α on the CA1- and CA3-neuron-specific tolerance to the ischemia-induced Ca^{2+} -dependent excitotoxicity with the potential significance for implementation of HIF-1 α stabilizing strategy to activate endogenous neuroprotection against cell damage in ischemic conditions.

Key words: hippocampal organotypic slice culture, hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1), oxygen-glucose deprivation (OGD), anoxia preconditioning (APC), the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA), the Sarco/Endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA).