

І.В.Лушнікова

Функціональна активність нейронів гіпокампа в умовах короткотривалої киснево-глюкозної депривації *in vitro*

*Недостаток кислорода и глюкозы индуцирует повреждение и гибель нервных клеток через множественные клеточные и молекулярные механизмы. Степень повреждения зависит от силы и длительности патологического воздействия. Экспериментальные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что кратковременная кислород-глюкозная депривация (КГД) вызывает отсроченные во времени деструктивные изменения клеток. Это позволяет изучать тонкие механизмы, участвующие в развитии нейродегенерации, индуцированной КГД, с целью поиска возможностей предотвращения повреждения и гибели клеток. В данной работе нами были оценены морфо-функциональные изменения культивируемых нейронов гиппокампа в условиях краткосрочной КГД и последующей реоксигенации 1, 4 и 24 ч. Выявлено, что 20-минутная КГД не оказывает существенного влияния на жизнеспособность клеток, но значительно снижает активность метаболизма, количество и активность синапсов в течение первого часа после КГД. Через 4 ч функциональные показатели остаются пониженными, но нормализуются в течение 24 ч. Полученные результаты расширяют представления о механизмах развития повреждения нейронов гиппокампа в условиях недостатка кислорода и глюкозы, а данная модель может быть использована для тестирования нейропротекторных средств.*

ВСТУП

Порушення кровообігу мозку різного генезу призводить до нестачі кисню та глюкози і як наслідок до ушкодження і загибелі клітин. Експериментальні та клінічні дослідження показали, що деструктивні зміни знаходяться у прямій залежності від тривалості патологічного впливу та можуть бути відстрочені [1, 2, 10, 11, 13]. В основі нейродегенерації клітин лежать численні зміни на клітинному та молекулярному рівні. Ґрунтовне вивчення та розуміння послідовності і тонкощів механізмів цих змін нині є актуальним. Для дослідження функціонування клітин мозку за нормальних умов та особливостей розвитку їх ушкодження при патології, широко використовуються культивовані клітини. Це надає змогу спостерігати окремі нейрони

та вивчати міжклітинні взаємозв'язки, оскільки при довготривалому утриманні в культурі відновлюються нейронні відростки і синаптичні контакти. Тимчасове видалення з середовища кисню та глюкози дозволяє моделювати умови, подібні до тих, що виникають при ішемії мозку. Метою нашого дослідження була оцінка змін життєздатності, метаболічної та синаптичної активності культивованих нейронів гіпокампа щурів, за умов короткотривалої киснево-глюкозної депривації (КГД) і наступного періоду реоксигенації.

МЕТОДИКА

Дисоційовану культуру нейронів гіпокампа отримували з новонароджених щурів за методом описаним Маар з співавт. [14]. Тканину гіпокампа подрібнювали, трип-

© І.В.Лушнікова

синізували (10 хв), ресуспендували пастеровською піпеткою та відокремлювали від зруйнованих клітин за допомогою центрифугування (200 g) у розчині Кребса з 20 ммоль Нерес та 0,3 % бичачим сивороточним альбуміном. Клітини наносили на оброблені полі-L-лізином 8-лункові планшети зі скляним або пластиковим дном (20000 клітин/см²) і культивували при 37°C в атмосфері з 5 % CO₂. Середовище культивування містило: DMEM, 2 % B27, NEPES – 20 ммоль/л, Glutamax – 0,5 ммоль/л, пеніцилін/стрептоміцин – 100/100 од. (всі складові від Invitrogen, “Sigma”, США). Середовище культивування змінювали на 2-гу добу інкубації та далі двічі на тиждень. Протягом 12 діб нейрони в культурі стабілізувалися, формували відростки та утворювали синаптичні зв’язки між собою (рис. 1, а).

Надалі проводили 20-хвилинну КГД утриманням культур під тонким шаром безкисневого та безглюкозного сольового буфера (0,1 М PBS, NEPES – 20 ммоль/л, сахароза – 15 ммоль/л) у закритій термостатованій камері (+35°C), кисень в газовому середовищі був замінений на азот. Після цього культури повертали до нормальних умов та проводили тестування через 1, 4 і 24 год (період нормоксичної реоксигенації). Контрольні культури утримували 20 хв при +35°C у сольовому середовищі такого складу (ммоль/л): NaCl – 124, KCl – 1,6, CaCl₂ – 2,5, MgCl₂ – 1,5, NaHCO₃ – 24, KH₂PO₄ – 1,2, аскорбінової кислоти – 2, глюкози – 10.

Морфофункціональні зміни аналізували за допомогою флуоресцентних барвників (Хехст 33342, йодид пропідіуму, FM1-43), проведення MTS-тесту ([3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-5-(3-карбоксиметоксифеніл)-2-(4-сульфофеніл)-2Н-тетразоліум]) та імуногістохімічного виявлення білків, асоційованих з відростками нейронів (GAP-43 – від англ. growth associated protein) і синаптичними терміналами (синаптофізин).

Хехст 33342 і йодид пропідіуму (“Sig-

ма”, США), які зв’язуючись з ДНК набувають зеленого і червоного кольору відповідно використовували для оцінки стану ядер нейронів і цілісності їх мембран. Хехст 33342 вільно проходить через плазматичну мембрану клітин, а йодид пропідіуму лише у разі її пошкодження, тобто Хехст 33342 дає змогу візуалізувати ядра всіх клітин у культурі, а йодид пропідіуму – тільки клітин з ушкодженою мембраною. Культури інкубували 10 хв з барвниками Хехст 33342 та йодид пропідіуму у кінцевій концентрації 2 мкмоль/л, які додавали до культурального середовища на 10–30 хв. Зажиттєво спостерігали наявність чи відсутність забарвлення клітин (збільшення – у 200 крат, селективні фільтри – 500–560 нм для Хехст 33342 та 600–640 нм для йодиду пропідіуму). Проведено 3 експерименти, проаналізовано щонайменш 100 нейронів на 20 полях зору у кожній з 4 експериментальних груп. Результати представлені як відсоткове співвідношення ушкоджених і неушкоджених нейронів.

MTS/формазаповий тест (“Promega”, Німеччина) виявляє метаболічно активні клітини, оскільки жовтий тетразолій MTS відновлюється до пурпурного водорозчинного формазапового продукту за рахунок активності мітохондріальних ферментів. Для проведення MTS-тесту культури відмивали фізіологічним фосфатно-сольовим розчином (HBSS, “Sigma”, США), інкубували з MTS-реактивом (40 мкл/200 мкл) протягом 40 хв при 37°C та колориметрично визначена оптичну густину розчину при довжині хвилі 450 нм. Кількість формазапового продукту прямо пропорційна кількості активних клітин. Результати виражали у відсотках відносно контролю. Проведено 5 експериментів, проаналізовано щонайменш 10 гіпокампальних культур з ідентичною щільністю нейронів у всіх експериментальних групах для кожного експерименту.

Синаптичну активність гіпокампальних

нейронів *in vitro* оцінювали на підставі вимірювання швидкості знебарвлення флуоресцентного барвника FM1-43 (“Molecular Probes”, США). Відомо, що FM1-43 обернено зв’язується з пресинаптичною мембраною та під час деполяризації за допомогою ендцитозу поглинається синаптичними везикулами [6]. Після відмивання культур, наступної деполяризації мембрани нейрона та вивільнення вмісту синаптичних везикул, FM1-43 втрачає флуоресценцію. Швидкість цього знебарвлення характеризує пресинаптичну активність та може бути кількісно виміряна. Завантаження барвником здійснювали посиленням спонтанного ендцитозу за допомогою гіперкалієвої деполяризації (70 ммоль/л KCl, 90 с) за наявності 10 мкмоль/л FM1-43. Далі культури відмивали розчином HBSS з 1 ммоль/л Ca²⁺ впродовж 10 хв. FM1-43 флуоресценцію спостерігали при збільшенні у 400 крат (селективний фільтр – 500–560 нм) і фіксували зображення, використовуючи цифрову камеру з’єднану з комп’ютером. Проводили повторну гіперкалієву деполяризацію та через 120 с фіксували зображення того самого поля зору відростків культивованих нейронів. Зміна інтенсивності флуоресценції за фіксований час відповідає певній швидкості знебарвлення. Результати оцінювали за допомогою програми AM Lab HESPERUS v 3,0 beta (“ЛПМ”, Росія). Представлені результати є підсумком аналізу щонайменш 100 синапсів на кожну експериментальну групу.

Для ідентифікації нейронів і синапсів використовували подвійне імуногістохімічне забарвлення GAP-43 і синаптофізину, білків, що експресуються у відростках нейронів та синаптичних терміналях, відповідно [17, 19]. Культури фіксували 4 %-м розчином формальдегіду протягом 1 год, відмивали PBS, обробляли 10 %-м розчином нормальної козячої сироватки з додаванням 0,3 % Triton-X-100 (1 год) для запобігання зайвого неспецифічного зв’язуван-

ня антитіл. Протягом 24 год інкубували у суміші кролячих поліклональних анти-GAP-43 (1:500, “Chemicon”, Англія) та моноклональних антисинаптофізинові антитіл (1:1000, “Dako”, Данія). Після відмивання PBS, культури обробляли сумішшю вторинних антикролячих FITC-кон’югованих (зелений колір) та антимишиних TRITC-кон’югованих (червоний колір) антитіл 1 год (1:500, “Molecular Probes”, США). Після відмивання PBS, пластикове дно 8-лункового планшету відокремлювали, культури фіксували покривним склом у спеціальному середовищі для флуоресцентних препаратів (“Dako”, Данія). Флуоресценцію візуалізували при збільшенні у 400 крат, отримували два цифрових зображення одного поля зору, використовуючи послідовні селективні фільтри (500–560 нм для FITC, 600–640 нм для TRITC). Підраховували кількість синаптофізинпозитивних зон на одиницю довжини нейронного відростка, результати виражали як кількість точок на 1 мм. Представлені результати є підсумком аналізу щонайменш 30 відростків довжиною близько 100 мкм на кожну експериментальну групу.

Оптичні дослідження проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопу XSP-139A-TP (Китай) з цифровою фотокамерою Canon Power Short G-6, з’єднаною з комп’ютером.

Статистичний аналіз було здійснено з використанням програми Statistica версія 5 (“StatSoft”, США). Результати представлені як середне ± стандартна похибка середнього. Вибірки порівнювали, використовуючи критерій t Стьюдента. Достовірними вважали розбіжності при P<0,05, які на рисунках позначено “*”.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гіпокамп є одним з найбільш чутливих до нестачі кисню та глюкози структур мозку, тому культивовані клітини гіпокампа стали

об'єктом нашого дослідження [1, 11]. Після 12 діб культивування нейрони гіпокампа відновлювали свої відростки і синаптичні контакти (рис. 1, а), ставали життєздатними та функціонально активними. Забарвлення інтактних культур барвником Хехст 33342 показало, що клітини розташовані рівномірно і мають нормальні неушкоджені ядра (рис. 1, б). Використання йодиду пропідіуму в цих умовах практично не виявляло забарвлених нейронів, що свідчить про стабільність і високу життєздатність культивованих клітин (рис. 1, в, г). За нормальних умов кількість забарвлених йодидом пропідіумом клітин з конденсованими ядрами становила $4,4 \% \pm 1,6 \%$.

Після короткотривалої (20 хв) КГД ці показники не мали статистично достовірних відмінностей від контролю і становили $7,3 \pm 1,9$; $7,9 \pm 1,9$ та $6,5 \% \pm 1,7 \%$ від загальної кількості клітин через 1, 4 і 24 год після КГД відповідно. Виходячи з цього можна сказати, що в умовах нашого експерименту не виявляється значних нейродегенеративних змін, тобто після 20-хвилинної КГД клітини здатні підтримувати свою життєздатність.

Проте оцінка загальної метаболічної активності за допомогою MTS-тесту, виявила значне уповільнення метаболізму через 1 та 4 год після КГД (рис. 2). У 24-годинний термін цей показник значною мірою відновлювався.

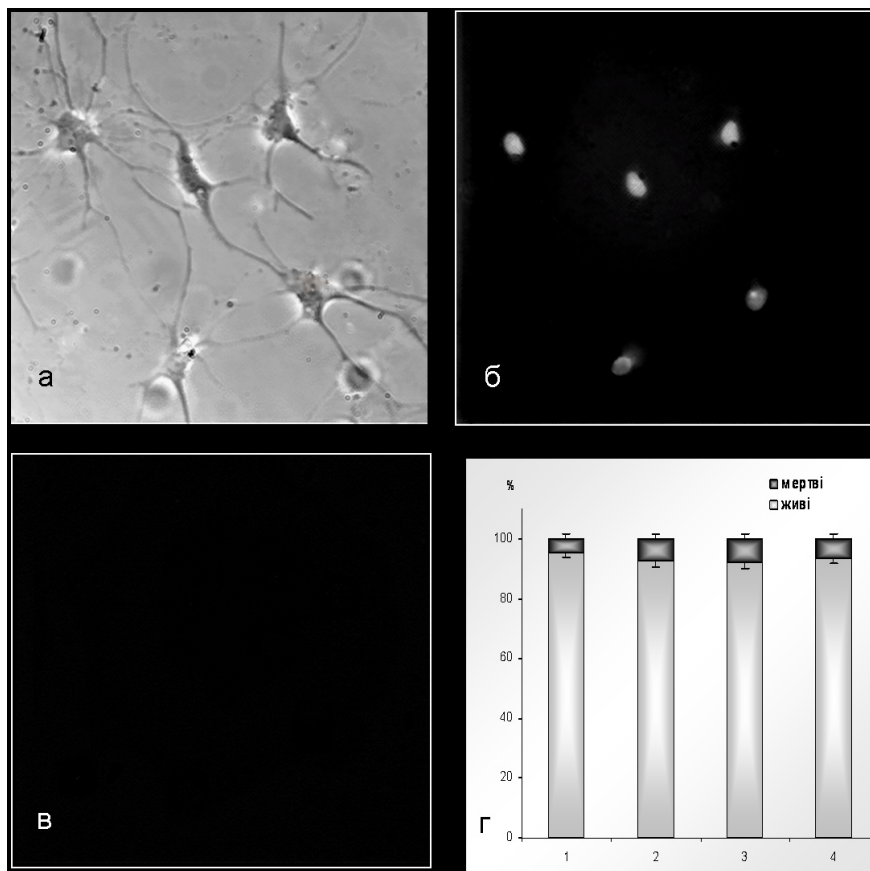


Рис. 1. Життєздатність культивованих нейронів гіпокампа після 20 хвилинної киснево-глюкозної депривації в умовах подвійного одночасного прижиттєвого забарвлення Хехстом 33342 та йодидом пропідіуму: а – фазово-контрастне зображення, б – зображення нейронів, забарвлених Хехстом 33342, в – забарвлення йодидом пропідіумом (а, б, в – одне поле зору), г – діаграма, що відображає кількість живих і мертвих нейронів у гіпокампальній культурі (1 – контроль, 2, 3, 4 – 1, 4 та 24 год після 20 хвилинної киснево-глюкозної депривації, відповідно)

Аналіз активності та кількості синапсів також продемонстрував наявність значних змін на рівні нейрональних контактів, які корелювали у часі зі змінами загальної метаболічної активності клітин. Синаптичну активність визначали, вимірюючи швидкість знебарвлення FM1-43 [6]. На рис. 3, а, б видно загальну картину зміни яскравості забарвлення FM1-43 у зонах синапсів протягом фіксованого періоду часу (120 с) у результаті гіперкалієвої деполяризації нейронів. Чим більше різниця між інтенсивністю флуоресценції синаптичних контактів після деполяризації, тим вища активність синапсів. У наших експериментах виявлено, що через 1 годину після КГД активність синаптичного екзоцитозу суттєво зменшуються (див. рис. 3, в), що свідчить про деструктивний вплив короткотривалої КГД на культивовані гіпокампальні нейрони. Через 4 год цей показник залишався зниженим і тільки на 24-й годині нормалізувався та статистично не відрізнявся від контролю.

За допомогою подвійного імуногістохімічного забарвлення білків GAP-43 і синаптофізину [17, 19] оцінювали кількість синапсів на одиницю довжини відростка

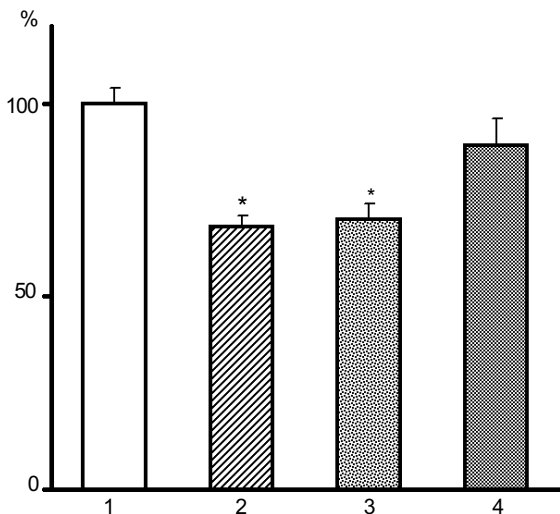
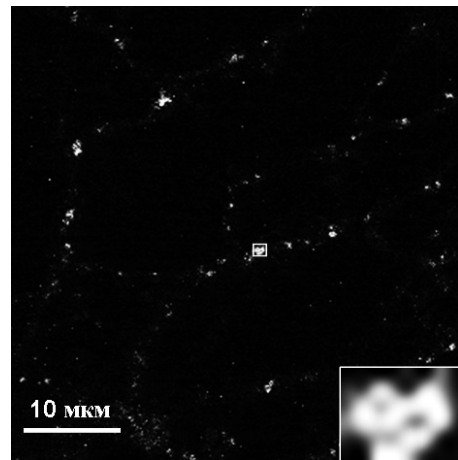
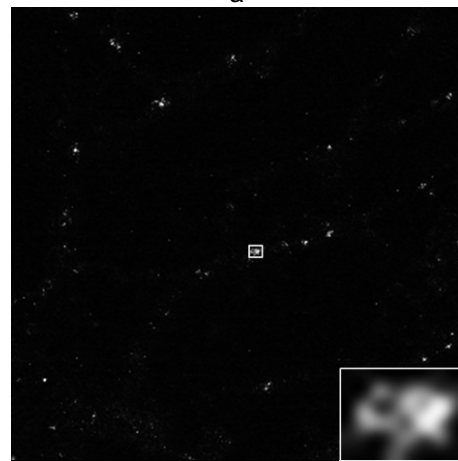


Рис. 2. Зміни метаболічної активності культивованих клітин гіпокампа: 1 – контроль, 2, 3, 4 – 1, 4 та 24 год після киснево-глюкозної депривації відповідно



а



б

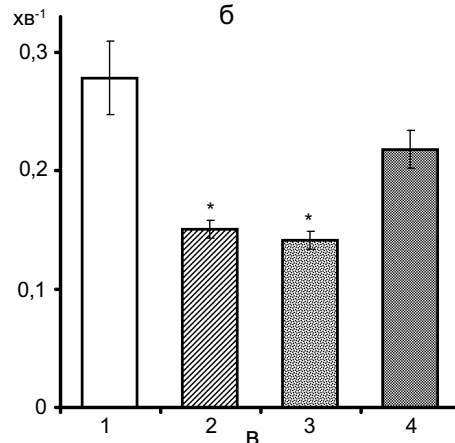
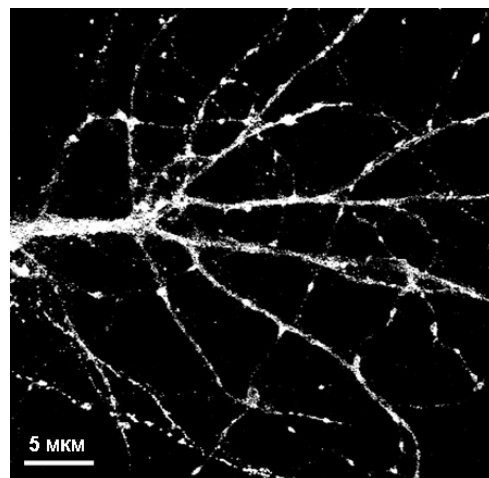


Рис. 3. Синаптична активність культивованих нейронів гіпокампа: а, б – ілюстрація зміни інтенсивності флуоресценції синапсів, забарвлених FM1-43 після деполяризації (одне поле зору), в – діаграма змін швидкості екзоцитозу (1 – контроль, 2, 3, 4 – 1, 4 та 24 год після 20 хвилинної киснево-глюкозної депривації, відповідно). Винесена вставка на рис. а, б – збільшений фрагмент синаптичної зони, забарвленої FM1-43

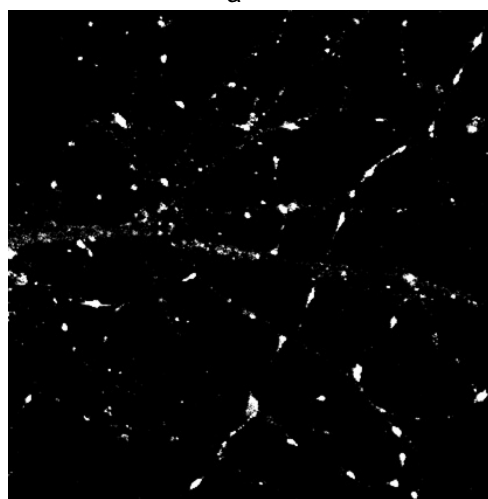
нейрона в нормальних умовах і після КГД. Використання в наших експериментах маркера відростків нейронів GAP-43 давало змогу візуалізувати у культурі чітку нейронну мережу (рис. 4, а), яка була рівномірно розподілена як у контрольних культурах, так і в умовах КГД і подальшої реоксигенації. Імуноцитохімічне дослідження у культивованих нейронах білка пресинаптичних терміналей синаптофізину, дозволило оцінити щільність синапсів у гіпокампальній культурі (рис. 4, б) і виявило суттєве зниження цього показника в умовах КГД. У контролі кількість синапсів становила: $247,8 \text{ од./мм} \pm 7,9 \text{ од./мм}$, а через 1 год після КГД – $152,6 \text{ од./мм} \pm 6,6 \text{ од./мм}$ (див. рис. 4, в).

Виходячи з отриманих результатів, можна сказати, що представлена модель ішемічного ушкодження має доволі щадний характер, дає можливість виявити початкові деструктивні зміни, які можуть бути першопричиною подальшої нейродегенерації клітин. Зокрема, виявлено, що через 1 і 4 год після 20-хвилинної КГД значною мірою проявляється зниження метаболічної активності, кількості та активності синапсів у нейронах в умовах культивування. Після 24 год функціональні показники, що вивчалися – нормалізувалися.

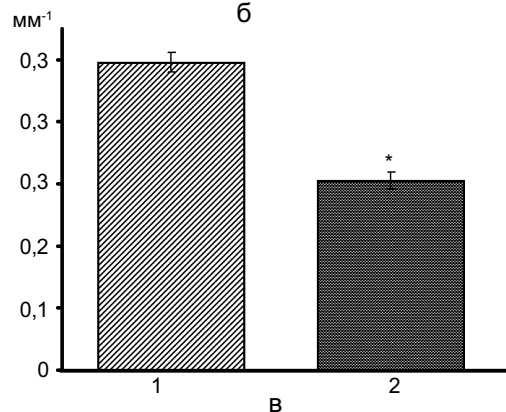
Відомо, що в основі процесів нейродегенерації лежать зміни на клітинному і молекулярному рівні. Відносно нейронів це, в основному, пов'язано з порушеннями у взаємодії клітин, яке відбувається здебільшого за допомогою хімічних синапсів. При цьому, у перенесенні сигналу від клітини до клітини велику роль відіграють екзо- та ендцитоз синаптичних везикул [20, 21]. Згадані властивості нейронів використовуються для оцінки ефективності синапсів за допомогою методу забарвлення FM1-43 [6]. Зміни активності хімічних синапсів зумовлені складними морфологічними і молекулярними перебудовами, що забезпечуються численними білками, такими як



а



б



в

Рис. 4. Імуноцитохімічне забарвлення культивованих нейронів гіпокампа: а – зображення відростків нейронів, забарвлених за допомогою анти-GAP-43 антитіл, б – забарвлення синапсів за допомогою антитіл до синаптофізину (а, б – одне поле зору), в – діаграма змін щільності синапсів після 20 хвилинної киснево-глюкозної депривації (1 – контроль, 2 – 1 год після впливу)

синаптобrevін, синптоагмін, синапсини, SNAP-25 (від англ. synaptosomal associated protein) [3, 5, 7, 9]. Важливе регуляторне значення мають rab3, mint1 і mant2, BDNF (від англ. brain-derived neurotrophic factor). Синаптофізин бере участь у формуванні тимчасової пори для вивільнення та захоплення нейромедіатора [4, 16, 18]. Молекулярні механізми, задіяні у функціонуванні синапсів є енергозалежними і тісно пов'язані з загальною метаболічною активністю нейронів.

Багатозначність факторів, які впливають на нейрональні взаємодії, визначає велику чутливість цього процесу до будь-яких патологічних впливів, зокрема до нестачі кисню та глюкози при порушеннях мозкового кровообігу, або при моделюванні ішемії у експериментальних умовах. Тривалість дії ішемії та подальшої реперфузії зумовлює ступінь деструкції клітин, а проявлення мають пропорційний характер [1, 11, 13, 22]. У досліджах *in vivo* і *in vitro* показано, що довготривала ішемія або КГД призводить до масивної загибелі нервових клітин, в умовах же короткотривалого впливу негайного uszkodження не виникає, але індукуються певні функціональні зміни, які мають віддалені деструктивні наслідки [2, 8, 10, 12, 15].

Наша експериментальна модель дозволила виявити деякі первинні механізми, які, за певних умов, можуть бути задіяні в процесі розвитку uszkodження нейронів. Зокрема, показано, що протягом декількох годин після короткотривалої КГД, знижуються загальна активність метаболізму культивованих клітин, кількість та ефективність синапсів. Можна припустити, що уповільнення клітинних і молекулярних механізмів у нейрональній культурі зумовлює виявлене зниження швидкості екзоцитозу у зонах синаптичних контактів. Напевно, описані процеси можуть бути відповідальними за порушення передачі сигналів між нейронами і виникнення

нейродегенеративних змін при нестачі кисню та глюкози. Відновлення функціональної активності нейронів у віддалений термін свідчить про наявність механізмів, які певною мірою здатні протистояти uszkodженню в умовах ішемії мозку.

Таким чином, використана експериментальна модель імітує події, які відбуваються в умовах організму при порушеннях кровообігу мозку. КГД упродовж 20 хв не спричиняє значних нейродегенеративних змін нейронів в умовах культивування, проте тимчасово пригнічує функціональну активність клітин, яка з часом нормалізується. Виходячи з цього, можна сказати, що нейрони здатні відновлюватися у разі тимчасової нестачі кисню та глюкози. Отримані результати розширюють уявлення про uszkodження нервових клітин внаслідок нестачі кисню та глюкози, а описана модельна система може бути використана для тестування нейропротективних факторів, які здатні впливати на цей процес на рівні молекулярних механізмів.

I.V.Lushnikova

FUNCTIONAL ACTIVITY OF HIPPOCAMPAL NEURONS AFTER SHORT-TERM OXYGEN-GLUCOSE DEPRIVATION IN VITRO

The deficiency of oxygen and glucose induces neuronal cell damage and death through multiple cellular and molecular mechanisms. The degree of the damage is thought to depend on the intensity and duration of pathological event. *In vivo* and *in vitro* experimental investigations have shown that short-term oxygen-glucose deprivation (OGD) results in the delayed cell destruction. It allows studying of the neurodegenerative mechanisms induced by OGD for possible corrections. The aim of the present study was to evaluate the morpho-functional changes in cultured hippocampal neurons after short-term OGD followed by reoxygenation during 1, 4 or 24 h. It is revealed that 20 min OGD has no influence on the cell viability, but metabolic activity, synaptic quantity and activity are decreased at 1 h at 4 h after OGD. These functional characteristics are normalized at 24h. The results expand a concept about different aspects of hippocampal neurons injury under deficiency of oxygen and glucose. A suggested experimental model could be used for testing different neuroprotective tools.

A.A.Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kiev, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина, 2001. – 328 с.
2. Винничук С.М., Черенько Т.М. Ишемический инсульт: эволюция взглядов на стратегию лечения – К.: ООО Комполис, 2003. – 120 с.
3. Bolay H., Gursoy-Ozdemir Y., Sara Y. et al. Persistent defect in transmitter release and synapsin phosphorylation in cerebral cortex after transient moderate ischemic injury // *Stroke*. – 2002. – **33**, № 5. – P.1369–1375.
4. Castillo P.E., Schoch S., Schmitz F. et al. RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation // *Nature*. – 2002. – **415**, № 6869. – P.327–330.
5. Genoud S., Pralong W., Riederer B.M. et al. Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures // *J.Neurochem*. – 1999. – **72**, № 4. – P.1699–1706.
6. Harata N., Ryan T., Smith S. et al. Visualizing recycling synaptic vesicles in hippocampal neurons by FM 1-43 photoconversion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – **98**, № 22. – P.12748–12753.
7. Janz R., Södhof T.C., Hammer R.E. et al. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I // *Neuron*. – 1999. – **24**, № 3. – P.687–700.
8. Jourdain P., Nikonenko I., Alberi S. et al. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia // *J.Neurosci*. – 2002. – **22**, № 8. – P.3108–3116.
9. Jung Y.J., Park S.J., Park J.S. et al. Glucose/oxygen deprivation induces the alteration of synapsin I and phosphosynapsin // *Brain Res*. – 2004. – **996**, № 1. P.47–54.
10. Kovalenko T., Osadchenko I., Nikonenko A. et al. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses // *Hippocampus*. – 2006. – **16**, № 10. – P.814–825.
11. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // *Physiol. Rev*. – 1999. – **79**, № 4. – P.1431–1568.
12. Lukyanetz E.A., Shkryl V.M., Kravchuk O.V., Kostyuk P.G. Effect of hypoxia on calcium channels depends on extracellular calcium in CA1 hippocampal neurons // *Brain Res*. – 2003. – **980**, № 1. – P. 128–134.
13. Lushnikova I.V., Voronin K., Malyarevskyy P.Y. et al. Morphological and functional changes in rat hippocampal slice cultures after short-term oxygen-glucose deprivation // *J.Cell Mol.Med*. – 2004. – **8**, № 2. – P.241–248.
14. Maar T., Rønn L., Bock E. et al. Characterization of microwell cultures of dissociated brain tissue for studies of cell-cell interaction // *J. Neurosci. Res*. – 1997. – **47**, № 2. – P.163–172.
15. Misonou H., Mohapatra D.P., Menegola M., Trimmer J.S. Calcium- and metabolic state-dependent modulation of the voltage-dependent Kv2.1 channel regulates neuronal excitability in response to ischemia // *J. Neurosci*. – 2005. – **25**, № 48. – P.11184–11193.
16. Nishimura H., Matsuyama T., Obata K. et al. Changes in mint1, a novel synaptic protein, after transient global ischemia in mouse hippocampus // *J.Cereb.Blood Flow.Metab*. – 2000. – **20**, № 10. – P.1437–1445.
17. Ring G., Mezza R., Schwob J. Immunohistochemical identification of discrete subsets of rat olfactory neurons and the glomeruli that they innervate // *J. Comp. Neurol*. – 1997. – **388**, № 3. – P.415–434.
18. Pozzo-Miller L.D., Gottschalk W., Zhang L. et al. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice // *J.Neurosci*. – 1999. – **19**, № 12. – P.4972–4983.
19. Priller C., Bauer T., Mitteregger G., Krebs B., Kretschmar H., Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein // *Ibid*. – 2006. – **26**, № 27. – P.7212–7221.
20. Rizzoli S.O., Betz W.J. The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles // *Science*. – 2004. – **303**, № 5666. – P.2037–2039.
21. Südhof T.C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions // *Nature*. – 1995. – **375**, № 6533. – P.645–653.
22. Wei L., Yu S.P., Gottron F. et al. Potassium channel blockers attenuate hypoxia- and ischemia-induced neuronal death in vitro and in vivo // *Stroke*. – 2003. – **34**, № 5. – P.1281–1286.

*Ин-т фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ
li@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 15.05.2008*