

О.М. Цупиков, Т.А. Півнева, А.О. Поддубна, В.М. Кирик, О.В. Кучук,
Г.М. Бутенко, Г.Г. Скибо

Міграція та диференціація трансплантованих фетальних нейрогенних клітин при ішемії мозку тварин

Вивчали міграцію, інтеграцію та диференціацію трансплантованих фетальних нейрогенних клітин (ФНК) у мозку тварин з ішемією. Ішемічний інсульт у мишей лінії FVB моделювали 20-хвилинною двосторонньою оклюзією сонних артерій. Через 24 год після оклюзії ФНК, що були виділені з плодів мишей, трансгенних за зеленим флуоресцентним білком (від англ. green fluorescent protein – GFP), субокципітально вводили в мозок мишей з ішемією. Міграцію та диференціацію GFP-позитивних ФНК у тканині реципієнта у різні терміни після їх введення досліджували за допомогою імуногістохімічного методу з використанням скануючого конфокального мікроскопа. Було показано, що GFP-позитивні ФНК виживали, мігрували та диференціювалися в зрілі нейрони в гіпокамі ішемізованих тварин.

Ключові слова: фетальні нейрогенні клітини, трансплантація, ішемія, імуногістохімічне фарбування

ВСТУП

Відомо, що нервова тканина надто чутлива до ішемічного ушкодження і має низький регенеративний потенціал внаслідок багатьох факторів, таких, як високий вміст поліненасичених жирних кислот, іонів металів, недостатній захист антиоксидантними ферментами [10, 12].

Нині ведеться постійний пошук нейропротекторних засобів, здатних впливати на механізми ішемічно-реперфузійних ушкоджень мозку, які слід застосовувати в перші години та доби після ішемічного інсульту [13]. Перспективним напрямком регенеративної медицини є вивчення можливостей застосування клітинної терапії з використанням нейрогенних стовбурових клітин (НСК) у лікуванні, розробці профілактичних протиінсультних заходів і реабілітації пацієнтів з ішемічними ураженнями головного мозку. НСК можуть самовідновлюватися і мають мультипотентні

властивості (здатні диференціюватися в певний тип клітин, а саме нейрони, астроцити та/або олігодендроцити) [6]. Під час ембріогенезу НСК знаходяться в шлунковій зоні нервової трубки і спроможні диференціюватися в усі типи клітин, які необхідні для формування центральної нервової системи. Вважалося, що нейрогенез відбувається лише під час ембріонального розвитку організму. Дослідження останніх років показали, що нові нейрони постійно утворюються з НСК протягом усього життя [9, 11]. Такий нейрогенез у дорослому віці відбувається в певних ділянках мозку, а саме: субгранулярній зоні (SGZ) зубчастої фасції гіпокамп та субветрикулярній зоні (SVZ) латеральних шлуночків.

Відомо також, що стовбурові клітини здатні розрізняти ділянки ушкодженої тканини, мігрувати у ці зони та диференціюватися у тип клітин, потрібний для відновлення втраченої функції. Для дослідження можливого регенеративного потен-

ціалу НСК широко використовують різні моделі ішемічного пошкодження мозку з подальшою їх трансплантацією. Важливим моментом під час вивчення шляхів розселення, диференціювання та можливого трансдиференціювання трансплантованих стовбурових клітин є їх ідентифікація в організмі реципієнта [14]. Для цього потрібен надійний маркер трансплантованих клітин. Такими маркерами можуть бути радіонукліди (^{99m}Tc), синтетичні аналоги нуклеотидів ДНК (бромдезоксириндин – BrdU) тощо [1, 4]. Але ці маркери не завжди стійкі та передбачають попередній вплив на організм донора або культуру клітин для мічення їх безпосередньо перед процедурою трансплантації.

Раніше активно застосовували хромосомні маркери (виявлення Y-хромосоми у самиць-реципієнтів клітин від самців, лінія мишей T6T6 тощо), але новим перспективним напрямком стало використання трансгенних мишей, клітини яких стійко експресують гени, відповідальні за продукцію нетипових для організму реципієнта білків (β -галактозидаза *E.coli*, флуоресцентні білки, зокрема зелений, жовтий, червоний), які можна виявляти імуногістохімічними або іншими методиками. Так, зелений флуоресцентний білок (від англ. green fluorescent protein – GFP) став важливим маркером для ідентифікації донорських клітин в організмі реципієнтів тварин різних класів за рахунок нетоксичності та можливості виявлення простими методами візуалізації без руйнування структури тканин.

Мета нашої роботи – дослідження міграції та диференціації трансплантованих фетальних нейрогенних клітин (ФНК), мічених GFP, у тварин з ішемічним ураженням головного мозку.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на статевозрілих (3 – 4 міс) мишах лінії FVB дикого типу та FVB-

Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном GFP. Для контролю за естральним циклом самиць витримано параметри приміщення для утримання тварин: температура повітря 22 °С, відносна вологість повітря 40–60%, освітленість 50 лк, відтворено цикл 12-годинного світлового режиму. Тварини мали вільний доступ до води та збалансованого комбікорму. Факт запліднення самиць перевіряли на наступну добу після підсадки до самця за наявністю копулятивної пробки.

Миші лінії FVB дикого типу були розподілені довільно на три групи. До контрольної групи (7 тварин) ввійшли псевдооперовані тварини, у яких проводили оперативне втручання, як і при створенні ішемії, за винятком перетискування сонних артерій. До 2-ї та 3-ї груп ввійшли тварини з ішемією мозку, яким через 24 год після ішемії субокципітально вводили культуральне середовище (2-га група, 5 тварин) і свіжовиділені GFP-позитивні ФНК (3-тя група, 13 тварин).

Усі роботи з експериментальними тваринами проводилися з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою», а також принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

Глобальна короткотривала ішемія головного мозку. Ішемію викликали у наркотизованих (каліпсол – 75 мг/кг і ксилазин – 2 мг/кг внутрішньом'язово) тварин лінії FVB перетискуванням (оклюзія) обох загальних сонних артерій протягом 20 хв з наступним зняттям затискачів і відновленням кровопостачання (реперфузія).

Отримання ФНК. У стерильних умовах з мозку плодів 12,5-добого розвитку від мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за GFP, виділяли медіальні гангліозні горбики. За допомогою Пастєрівських піпеток різного діаметра механічно дисоціювали ембріональну нервову тканину

у середовищі, що складалось з DMEM та F12 у співвідношенні 1:1 (DMEM – F12). Після дисоціації суспензію клітин пропускали через нейлонові клітинні фільтри («Falcon», США) з діаметром пор 40 мкм. Очищену фракцію ФНК отримували центрифугуванням суспензії клітин у градієнті щільності (22%-й розчин Percoll). Відмиті у середовищі ФНК трансплантували тваринам з ішемією. Відсоток життєздатних клітин у суспензії визначали методом проточної цитометрії за допомогою лазерного цитофлюориметра-сортера FACSAria («Becton Dickinson», США) після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином.

Трансплантація ФНК. Через 24 год після оклюзії тваринам з ішемією під каліпсол-ксилазиновим наркозом робили субокципітальне введення свіжовиділених GFP-позитивних ФНК (200 000 клітин у 25 мкл середовища DMEM – F12).

Імуногістохімічне фарбування. Міграцію та диференціацію клітин оцінювали на 7, 14, 30 та 90-ту добу після трансплантації імуногістохімічним фарбуванням. Забір матеріалу для морфологічних досліджень проводили у тварин, яких наркотизували внутрішньом'язовим введенням каліпсолу (75 мг/кг) та інгаляційно – ефіром. Фіксацію тканини у мишей виконували методом транскардіальної перфузії-фіксації 4%-м розчином параформальдегіду на 0,1 М фосфатному буфері (ФБ) з рН 7,4. За допомогою вібротома Vibroslice 752M («Campden Instruments Ltd», Великобританія) виготовляли фронтальні зрізи мозку завтовшки 50 мкм. Після промивки у 0,1 М ФБ зрізи інкубували у 1%-му розчині нормальної козячої сироватки на 0,1 М ФБ, що містив 0,3 % Triton-X-100. Для виявлення астроцитарних клітин використовували антитіла до специфічного маркера астроцитів – гліального фібрилярного кислого білка (від англ. glial fibrillary acidic protein – GFAP (у розведенні 1:1000) («DAKO», Данія); для виявлення нейро-

генних стовбурових клітин – антитіла до нестину (1:350) («Chemicon», США); для ідентифікації нейронів – антитіла до NeuN (від англ. Neuronal Nuclei), (1:1000) («DAKO», Данія), для виявлення донорських клітин – антитіла до GFP (1:750) («Molecular Probes Inc.», США). Візуалізацію первинних антитіл проводили вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor 350, 488 та 555, (1:1000) («Molecular Probes Inc.», США). Зрізи мозку вивчали, використовуючи конфокальний мікроскоп FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для імуногістохімічних досліджень ми обрали гіпокамп – структуру мозку, значною мірою відповідальну за процеси навчання та формування пам'яті, а також за керування поведінковими реакціями. Порівняно з клітинами інших структур мозку нейрони гіпокампа, особливо в зоні CA1, є надзвичайно чутливими до нестачі кисню [24]. Крім того, було показано, що глія бере активну участь у контролі нейронної активності та синаптичної передачі в нормі та при різних патологічних станах [16]. При моделюванні глобальної ішемії *in vivo* найчастіше використовують припинення кровопостачання всього головного мозку за допомогою чотирисудинної оклюзії (загальні сонні та вертебральні артерії) у шурів або двосудинної оклюзії (загальні сонні артерії) у піщанок і мишей [17, 25]. Саме тому в нашій роботі ми використовували двосудинну оклюзію загальних сонних артерій у мишей лінії FVB дикого типу для створення експериментальної глобальної ішемії головного мозку.

Імуногістохімічне дослідження зрізів мозку з використанням антитіл до NeuN та GFAP показало, що в гіпокампі псевдооперованих тварин NeuN-позитивні пірамідальні нейрони в зоні CA1 гіпокампа розташовувались у вигляді довгого шару з 3-5

клітин завширшки. GFAP-позитивні астроцити мали тонкі відростки і розташовувалися у всіх шарах зони CA1 гіпокампа.

Після експериментальної ішемії–реперфузії мозку у мишей лінії FVB спостерігалось ушкодження пірамідальних нейронів зони CA1 гіпокампа разом із активацією гліальних клітин. Ступінь імунореактивності астроцитів і локалізація їх в шарах гіпокампа суттєво залежала від строку постішемичного періоду. На 7-му та 14-ту добу після оклюзії усі структури нейропіля CA1 зони гіпокампа були сильно вакуолізовані, переважно через наявність великої кількості набряклих відростків астроцитів.

На 1-му добу після оклюзії ішемізо-

ваним тваринам субокципітально вводили свіжовиділені GFP-позитивні ФНК. Відсоток життєздатних клітин, визначений методом проточної цитометрії на лазерному цитофлюориметрі-сортері FACS Aria («Becton Dickinson», США), після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином, становив від 89,8 до 93,5 %. Вміст GFP-позитивних клітин серед життєздатних у цій фракції був від 97,5 до 99,6 % (рис. 1).

Імуноцитохімічне фарбування суспензії клітин, отриманих з мозку 12,5-добових ембріонів мишей, трансгенних за GFP, показало, що 81,2 % клітин були нестинпозитивні, що підтверджує їх недиференційований стан (рис.2).

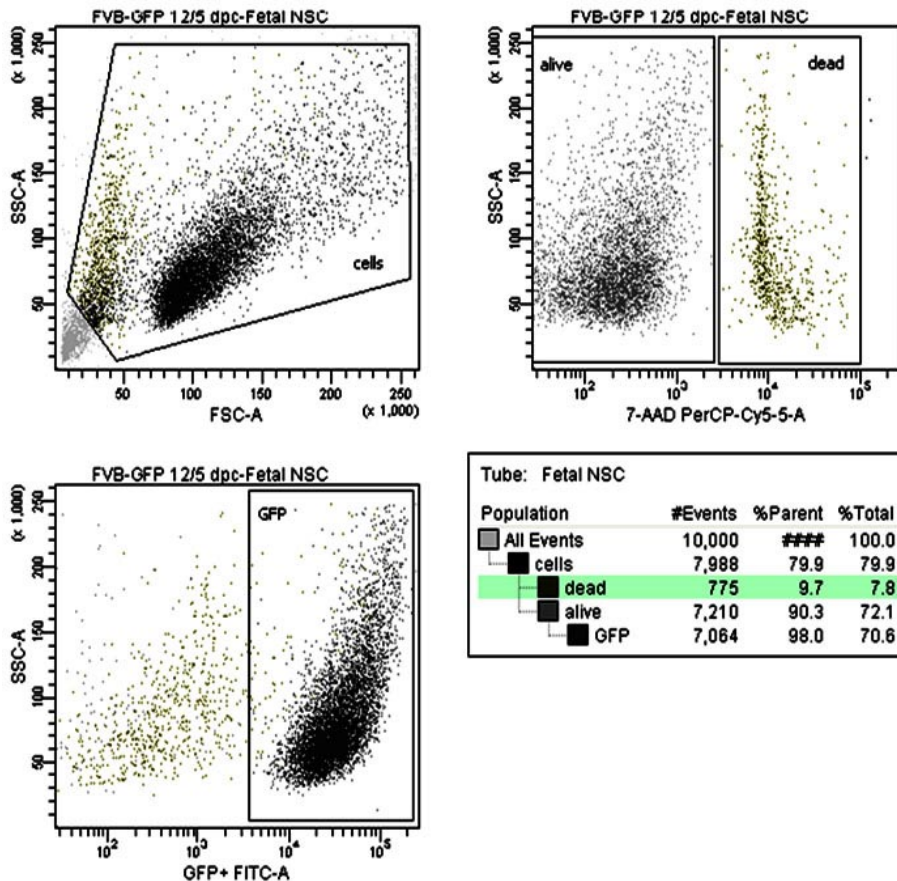


Рис. 1. Визначення за допомогою лазерного цитофлюориметра-сортера FACS Aria кількості життєздатних і GFP-позитивних клітин у суспензії клітин, яку трансплантували тваринам з ішемією: а – відбір популяції непошкоджених клітин; б – виявлення загинувших клітин на каналі флуоресценції PerCP-Cy5.5 за поглинанням 7-аміноактиноміцином; в – виявлення GFP-позитивних живих клітин на каналі флуоресценції FITC; г – абсолютна та відносна кількість проаналізованих клітин

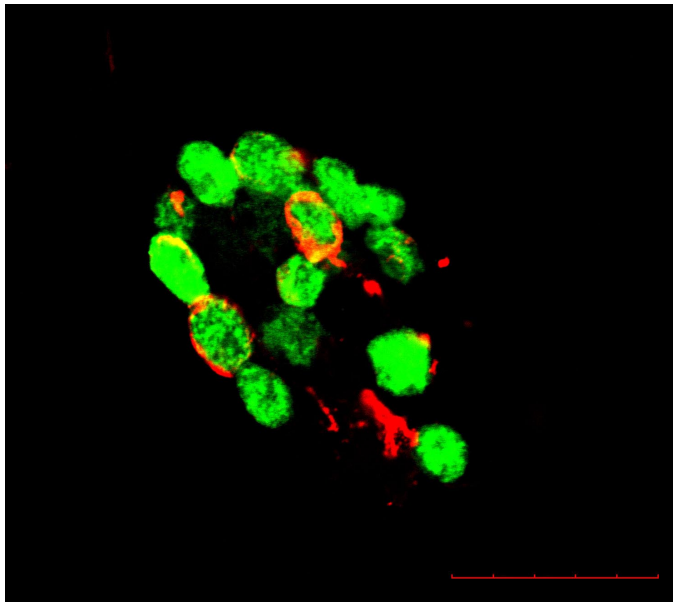


Рис. 2. GFP-позитивні нейрогенні фетальні клітини (зелений колір), що були виділені з медіальних гангліозних горбиків мозку плодів 12,5-добового розвитку мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, експресують нестин (червоний колір). Подвійне імуногістохімічне фарбування. Шкала – 20 мкм

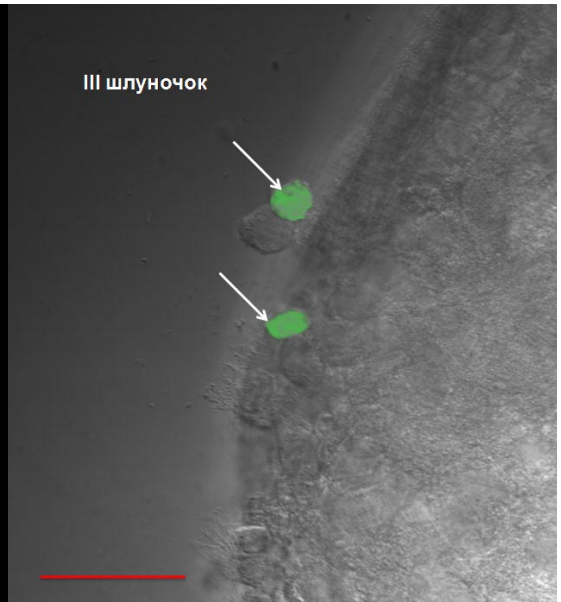


Рис. 3. Трансплантовані GFP-позитивні нейрогенні фетальні клітини (відмічені стрілками) на 7-му добу після трансплантації контактують з епендимальною поверхнею 3-го шлуночка. Поєднання зображень фазового контрасту та імуногістохімічного фарбування. Шкала – 50 мкм

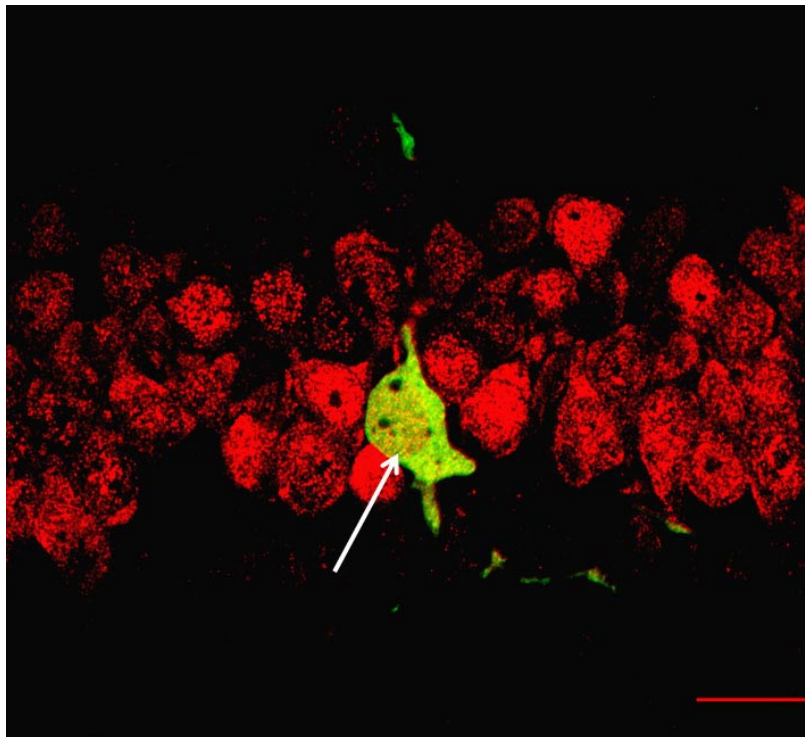


Рис. 4. CA1-зона гіпокампа на 14-ту добу після трансплантації. Стрілкою вказана GFP-позитивна клітина (зелений колір) у пірамідальному шарі, що експресує NeuN (червоний колір) – маркер зрілих нейронів. Шкала – 20 мкм

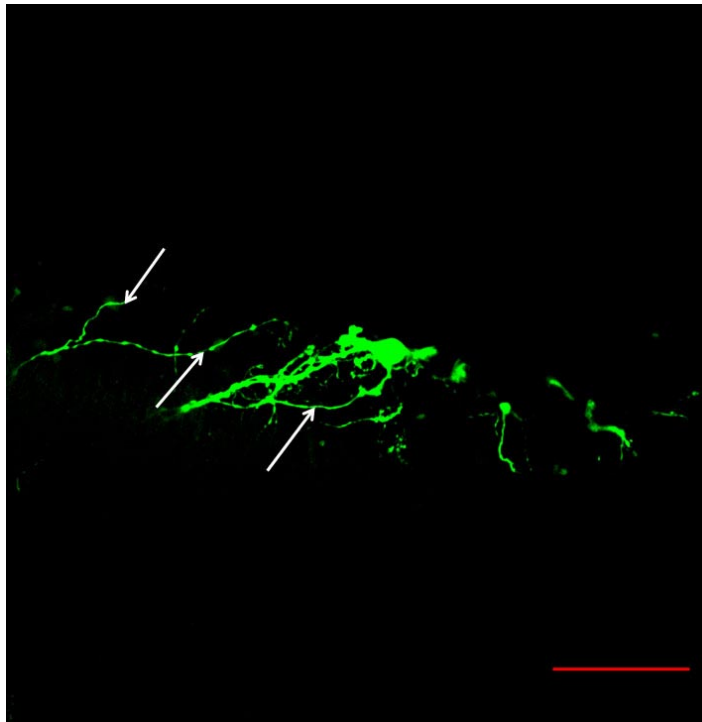


Рис. 5. GFP-позитивні нейрони з добре розгалуженими відростками (вказані стрілками) у CA1-зоні гіпокампа на 28-му добу після трансплантації. Шкала – 50 мкм

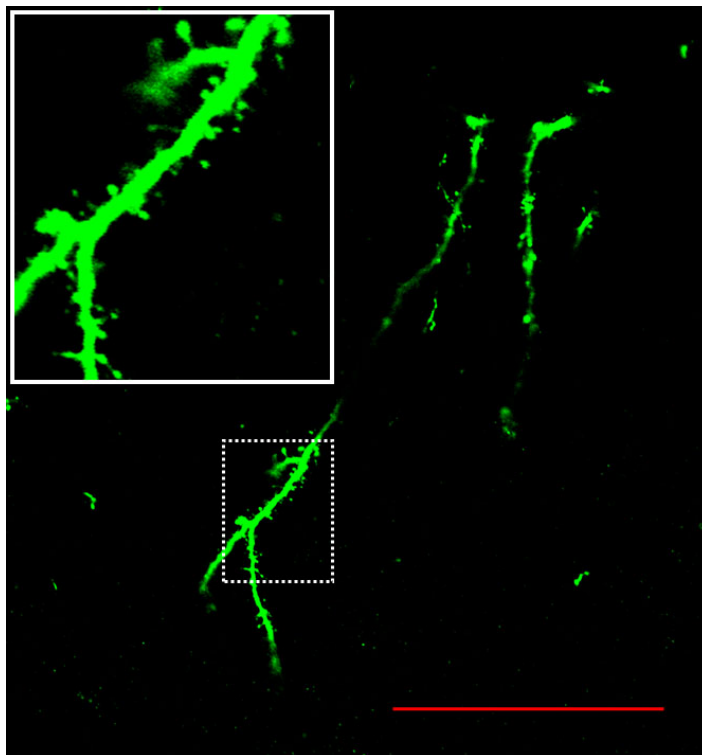


Рис. 6. На 90-ту добу після трансплантації GFP-позитивні дендрити мають добре розвинені шипики (вставка). Імуногістохімічне фарбування на GFP. Шкала – 50 мкм

Субокципітальна трансплантація GFP-позитивних ФНК гальмувала розвиток реактивного гліозу, а також збільшувала кількість неушкоджених нейронів у зоні CA1 гіпокампа після ішемії-реперфузії.

На 7-му добу після трансплантації ФНК основна кількість GFP-позитивних клітин знаходилася на епендимній поверхні 3-го шлуночка мозку і була представлена округлими клітинами без відростків (рис.3). Також спостерігалось скупчення GFP-позитивних клітин у медіальному ганглії повідка таламуса безпосередньо за епендимним шаром. Здебільшого це були клітини витягнутої форми з відростком. Імуногістохімічне дослідження таких клітин показало, що деякі з них усе ще експресували нестин – маркер нейрогенних стовбурових клітин, що свідчить про їх недиференційований стан. У цей термін була виявлена міграція незначної кількості GFP-позитивних клітин у зону ішемії.

На 14-ту добу після трансплантації GFP-позитивні клітини переміщались у зону ішемічного ушкодження та вбудовувалися в CA1-зону гіпокампа. Імуногістохімічне фарбування показало, що GFP-позитивні клітини диференціювалися в клітини з нейрональним (експресія маркера NeuN) (рис.4) і гліальним (GFAP-позитивні) фенотипом. У значній кількості GFP-позитивних клітин, які експресували NeuN, на 28 добу спостерігалась арборизація дендритних відростків (рис.5). На 90-ту добу після трансплантації GFP-позитивні нейрони мали розгалужене дендритне дерево (рис.6). На дендритах виявлялися чітко виражені шипики, що може свідчити про утворення синаптичних контактів між трансплантованими клітинами та нейронами гіпокампа реципієнта.

Таким чином, ми дослідили можливість довгострокового виживання ФНК у мозку тварин з ішемією. Наші результати свідчать про те, що GFP – це надійний нетоксичний маркер, який дає змогу ідентифікувати

донорські клітини навіть до 90 діб після трансплантації.

Крім того, ми показали, що GFP-позитивні ФНК, трансплантовані в мозок, уражений ішемією, диференціювалися як у нейрони, так і в астроцити. Це говорить про те, що трансплантовані клітини можуть реагувати на сигнали мікрооточення тканини реципієнта, які регулюють клітинну диференціацію та визначають напрямок міграції.

Досі недосліджений до кінця механізм того, як трансплантовані ФНК мігрують у пошкоджені ділянки [2, 3, 7]. У нашому дослідженні GFP-позитивні клітини були виявлені на епендимній поверхні 3-го шлуночка на 7-му добу після трансплантації, в мозолистому тілі на 7–14-ту добу, а потім в ушкоджених ділянках CA1 зони гіпокампа на 14, 30 та 90-ту добу. Можливо, саме по мозолистому тілу трансплантовані клітини мігрують з шлуночка до ушкодженої ділянки. Відомо, що ФНК експресують різні молекули поверхневої адгезії, які сприяють їх міграції [2].

Субокципітальна трансплантація ФНК виявила нейропротекторні властивості. Точний механізм дії трансплантованих клітин на мозок з ішемією невідомий. Але ми припускаємо, що таке покращення морфофункціонального стану ішемізованої тканини відбувається саме завдяки активації синаптогенезу, нейрогенезу або нейропротекції за рахунок ростових факторів, про що зазначають деякі автори [8, 15, 18, 19]. Нові NeuN-позитивні нейрони після трансплантації клітин *in vivo* утворюються протягом 2–6 тиж [5, 22, 23]. Було також показано, що гіпокампульні НСК гризунів диференціюються у функціонально зрілі нейрони з формуванням синапсів (*in vitro* та *in vivo*) [20]. ФНК можуть диференціюватися в нейрони з глутаматергічною та ГАМК-ергічною синаптичною передачею, генерувати потенціали дії через 12 діб після диференціації, та формувати синапси через

28–35 діб [21]. Ці дані свідчать про те, що в період між 2 та 6 тиж після трансплантації формування нових синапсів нейронами, яку утворилися з ФНК, може сприяти відновленню втрачених функцій.

ВИСНОВКИ

1. Трансплантовані фетальні нейрогенні клітини, отримані з мозку плодів мишей 12,5-добового розвитку, трансгенних за GFP, здатні виживати у мозку ішемізованих тварин навіть до 90 діб після трансплантації.

2. На 7-му та 14-ту доби після трансплантації ФНК мігрували в ушкоджені ділянки зони CA1 гіпокампа.

3. Трансплантовані клітини диференціювалися як в астроцити, так і в зрілі нейрони з добре розвиненими дендритами та шипиками.

О.М. Цупиков, Т.А. Пивнева, А.А. Поддубная, В.М. Кирик, О.В. Кучук, Г.М. Бутенко, Г.Г. Скибо

МИГРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ ФЕТАЛЬНЫХ НЕЙРОГЕННЫХ КЛЕТОК С ИШЕМИЕЙ МОЗГА ЖИВОТНЫХ

Изучали миграцию, интеграцию и дифференциацию трансплантированных фетальных нейрогенных клеток (ФНК) в мозгу животных с ишемией. Ишемический инсульт у мышей линии FVB моделировали путем 20-минутной двусторонней окклюзии сонных артерий. Через 24 ч после окклюзии ФНК, выделенные из плодов мышей, трансгенных по зеленому флюоресцентному белку (от англ. green fluorescent protein – GFP), субокципитально вводили в мозг мышей с ишемией. Миграцию и дифференциацию GFP-положительных ФНК в ткани реципиента на разные сроки после их введения исследовали с помощью иммуногистохимического метода с использованием сканирующего конфокального микроскопа. Было показано, что GFP-положительные ФНК выживали, мигрировали и дифференцировались в зрелые нейроны в гиппокампе ишемизированных животных.

Ключевые слова: фетальные нейрогенные клетки, трансплантация, ишемия, иммуногистохимическое окрашивание.

O.M.Tsypkyov, T.A.Pivneva, A.O. Poddubna, V.M.Kyryk, O.V. Kuchuk, G.M. Butenko, G.G.Skibo

MIGRATION AND DIFFERENTIATION OF FETAL NEURAL PROGENITOR CELLS IN BRAIN OF ISCHEMIC ANIMALS

The migration, integration and differentiation of fetal neural progenitor cells (NPCs) in the ischemic brain have been studied. In our study the ischemic insult in FVB line mice was produced by occlusion of both carotid arteries during 20 min. A day after occlusion NPCs from GFP-transgenic 12.5 dpc embryos were suboccipitally transplanted to the ischemic brain. The migration and differentiation of GFP-positive NPCs in the recipient tissue were observed in different time points after their transplantation by immunohistochemical approaches using confocal scanning microscopy. It has been shown that GFP-positive NPCs survived, migrated and differentiated to the mature neurons and glial cells in CA1 area of hippocampus of ischemic animals.

Key words: neural progenitor cells, transplantation, ischemia, immunohistochemical staining.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Institute of genetic and regenerative medicine AMN of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Остроумов Е.Н., Крашенинников М.Е., Гуреев С.В. и др. Визуализация распределения в миокарде аутологических стволовых клеток костного мозга при их интракоронарном и интрамиокардиальном введении // Вест. трансплантология и искусств. органов. – 2004. – №1. – С. 26–29.
2. Cho T., Bae J.H., Choi H.B. et al. Human neural stem cells: electrophysiological properties of voltage-gated ion channels // Neuroreport. – 2002 –13, № 43. – P. 1447–1452.
3. Chu K., Kim M., Jeong S.W. et al. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia // Neurosci. Lett. – 2003. – 343, № 2. – 129–133.
4. Coulombel L. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays // Oncogene. – 2004. – 23, № 43. – P. 7210–7222.
5. Euglund U., Bjorklund A., Wictorin K. et al. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2002. – 99, № 26. – P. 17089–17094.
6. Gage F.H. Mammalian neural stem cells // Science. – 2000. – 287, № 5457. – P. 1433–1438.

7. Jeong S.W., Chu K., Jung K.H. et al. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage // *Stroke*. – 2003. – **34**, № 9. – P. 2258–2263.
8. Kokaia Z., Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2003. – **13**, № 1. – P. 127–132.
9. Kuhn H.G., Dickinson-Anson H. and Gage F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation // *J. Neurosci.* – 1996. – **16**, № 6. – P. 2027–2033.
10. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // *Physiol. Rev.* – 1999. – **79**, №4. – P.1431–1568.
11. Lois C., Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – **90**, №5. – P. 2074–2077.
12. Mattson M.P., Liu D. Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders // *Neuromol. Med.* – 2002. – **2**, № 2. – P. 215–231.
13. Mokudai T., Ayoub I.A., Sakakibara Y. et al. Delayed treatment with nicotinamide (vitamin B3) improves neurological outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in Wistar rats // *Stroke*. – 2000. – **31**, № 7. – P. 1679–1685.
14. Morrison S.J., Wandycz A.M., Hemmati H.D. et al. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors // *Development*. – 1997. – **124**, №10. – P. 1929–39.
15. Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S. et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors // *Cell*. – 2002. – **110**, №4. – P. 429–441.
16. Neuroglia / Edited by H.Kettenmann, B.R. Ransom. – 2nd ed. – NY: Oxford University Press, 2005. – 601 p.
17. O'Neill M.J., Clemens J.A. Rodent Models of Global Cerebral Ischemia // *Current Protocols in Neuroscience*. – 2000. – Supp.12, unit 9.5. – P. 1–25.
18. Parent J.M., Vexler Z.S., Gong C. et al. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke // *Ann. Neurol.* – 2002. – **52**, №6. – P. 802–813.
19. Savitz S.I., Rosenbaum D.M., Dinsmore J.H. et al. Cell transplantation for stroke // *Ann. Neurol.* – 2002. – **52**, №3. – P. 266–275.
20. Song H.J., Stevens C.F., Gage F.H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons // *Nat. Neurosci.* – 2002. – **5**, №5. – P. 438–445.
21. Toda H., Takahashi J., Mizoguchi A. et al. Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses in vitro // *Exp. Neurol.* – 2000. – **165**, №1. – P. 66–76.
22. Van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus // *Nature*. – 2002. – **415**, № 6875. – P. 1030–1034.
23. Vicario-Abejon C., Collin C., Tsoulfas P., McKay R.D.G. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons // *Eur. J. Neurosci.* – 2000. – **12**, №2. – P. 677–688.
24. Winkelmann E. R., Charcansky A., Faccioni-Heuser M. C. et al. An ultrastructural analysis of cellular death in the CA1 field in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia followed by 2, 4 and 10 days of reperfusion // *Anat. Embryol. (Berl)*. – 2006. – **211**, № 5. – P. 423–434.
25. Wong A.M., Hodges H., Horsburgh K. Neural stem cell grafts reduce the extent of neuronal damage in a mouse model of global ischaemia // *Brain Res.* – 2005. – **1063**, № 2. – P. 140–150.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
ДУ «Ин-т генетич. та регенерат. медицини АМН України»
E-mail: oleg_tsupikov@mail.ru

Матеріал надійшов до
редакції 01.06.2009