

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

На правах рукопису

МАЙСТРЕНКО АНАСТАСІЯ МИХАЙЛІВНА

УДК 611.018.32+57.085.23

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

Спеціальність 03.00.13 – Фізіологія людини і тварини

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

доктор медичних наук, проф.

Скибо Галина Григорівна

КИЇВ 2016

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	14
1.1 Гіпоксичне та ішемічне ушкодження мозку	14
1.2. Молекулярні механізми розвитку ішемічного ушкодження мозку	16
1.3. Нейропротективний ефект короткострокового гіпоксичного та аноксичного прекондиціювання.....	19
1.4. Функції гіпокампа та відповідь на ішемічне ураження	20
1.5. Клітинні механізми, що забезпечують Ca^{2+} гомеостаз.....	22
1.6. Фактор, що індукується гіпоксією кисневий сенсор клітин	27
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	38
2.1. Обґрунтування вибору об'єкта досліджень	38
2.2. Виділення та культивування органотипових зрізів гіпокампа	40
2.3. Експериментальна модель ушкодження.....	43
2.4. Морфофункціональна характеристика життєздатності органотипової культури гіпокампа за допомогою йодиду пропідію (ПЙ).....	46
2.5. Проведення кількісного ПЛР-анлізу в реальному часі поодиноких нейронів гіпокампа	46
2.6. Проведення кількісного ПЛР-анлізу в реальному часі окремих СА1 та СА3 зон гіпокампа	49
2.7. Визначення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у цитоплазмі нейронів різних зон органотипової культури гіпокампа	51
2.8 Розчини та реактиви:	54
2.9. Статистична обробка результатів	56
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	58
3.1. Розробка оптимальної моделі попереднього нейропротективного АПК в поєднанні з КГД.....	58
3.2. Оцінка життєздатності нейронів органотипової культури гіпокампа в СА1 та СА3 зонах при КГД, АПК, додаванні інгібітора NIF-	

пролілгідроксилаз (ДПД), та при комбінуванні АПК та ДПД з наступною КГД.....	61
3.3. Зміна рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α в поодиноких нейронах гіпокампа при проведенні КГД, АПК, та КГД+АПК.....	65
3.4 Зміна кальцієвого гомеостазу в нейронах гіпокампа СА1 та СА3 зони, викликана деполяризацією клітинної мембрани.....	67
3.4.1 Загальні зміни кальцієвого сигналу та зміни в роботі кальцієвого депо ендоплазматичного ретикулуму в нейронах СА1 та СА3 зони за контрольних умов і після проведення КГД.....	67
3.4.2. Загальні зміни кальцієвого сигналу та зміни в роботі кальцієвого депо ендоплазматичного ретикулуму в нейронах СА1 та СА3 зони в контрольних умовах, після додавання ДПД, ДПД і КГД, та КГД.	83
3.5. Дослідження зміни рівня експресії підтипів Ca ²⁺ -транспортних систем, SERCA та PMCA, у різних зонах гіпокампа за експериментальних умов.	88
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	98
4.1 Виживання нейронів гіпокампа при попередньому АПК та додаванні ДПД.....	103
4.2 Зміни Ca ²⁺ -гомеостазу в пірамідальних нейронах гіпокампа після проведення КГД.....	109
4.3 Нейропротективний ефект АПК на КГД-індуковані зміни Ca ²⁺ -гомеостазу	110
4.4 HIF-1 та Ca ²⁺ -гомеостаз в пірамідальних нейронах гіпокампа.....	112
ВИСНОВКИ.....	115
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	117

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

HIF-1 – фактор, що індукується гіпоксією

EPO – еритропоетин

MTF-1 – металло-транскрипційний фактор

NFκB – ядерний фактора-κB

HRE – hypoxia response element (елемент відповіді на гіплексію)

ARNT – aryl hydrocarbon nuclear translocator (арильний вуглеводневий ядерний транслокатор)

ODDD – киснево-залежний деградаційний домен

N-TAD – N-термінальний трансактиваційний домен

C-TAD – C -термінальний трансактиваційний домен

FIH-1 – фактор інгібування HIF-1

VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту

NOS2 – NO-синтетаза

MAPK – протеїнкіназа активована мітогенами

КГД – киснево-глюкозна депривація

АПК – аноксичне прекондиціювання

ДПД – інгібітор HIF-пролілгідроксилаз – 2,4- піридиндикарбоксильний оксид діетилового естеру

NSE – нейрон специфічна енолаза (Neuron specific enolase)

IY – ішемічне ураження

RT-PCR – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) в реальному часі

SC RT-PCR – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) в реальному часі поодиноких нейронів

r-TPA – рекомбінантного активатору тканинного плазміногену

PMCA – Ca²⁺-АТФаза плазматичної мембрани

SERCA – Ca²⁺-АТФаза ендоплазматичного ретикулуму

NCX – Натрій-кальцієвий обмінник

АІФ – фактору індукованого апоптозом

АТФ – аденозинтрифосфат

NMDA – N-метил d-аспартат

AMPA – α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолепропіонієвої кислоти

ASICs – Ca^{2+} проникні протон-чутливі йонні каналів

ER – ендоплазматичний ретикулум

ICAM-1 – внутрішньоклітинні молекули адгезії

PARP – полі (АДФ рибози) полімераза

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК - рибонуклеїнова кислота

VGC – потенціал керовані кальцієві канали

RGC – рецепторкеровані кальцієві канали

ВСТУП

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 [1]. 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%) [2]. 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 [3–6]. 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 [7]. Проте роль HIF-1 у нейропротекції залишається на сьогодні неоднозначною, оскільки наявні експериментальні дані, що вказують одночасно на негативний ефект HIF-1 [7–9] та його нейропротективні властивості [10–13]. Цілковитим 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 [14–

17]. В основі ураження мозку лежить Ca^{2+} -залежна загибель нейронів, спричинена тривалою активацією глутаматних рецепторів при метаболічному стресі за умов ішемії [18]. Дослідження молекулярних механізмів та ролі HIF-1 у ендogenousній 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 та задачі дослідження

Мета дослідження: з'ясувати молекулярні механізми ендogenousної 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 прекондиціювання (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, АПК та інгібування HIF-пролілгідроксилаз.

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 прекондиціювання (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-пролілгідроксилаз 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 у реальному часі;
- флуоресцентне вимірювання концентрації іонізованого Ca^{2+} 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 Ca^{2+} у нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа шляхом модуляції експресії генів, що кодують Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму (PMCA та SERCA). Запропоновано механізм нейропротективного ефекту HIF-1, який опосередковується шляхом активації експресії генів, що кодують Ca^{2+} -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 HIF-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 HIF-1 α та HIF-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 ($[Ca^{2+}]_i$) 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. Болдирєву О. І. та м.н.с. Гулак К. Л. за допомогу у виділенні РНК.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертації слухали та обговорювали на наступних наукових конференціях:

- Всеукраїнська наукова конференція "Біологічні дослідження молодих учених в Україні" (Київ; 2009);
- COST B30 "Cellular Neuropathology: In Vitro Models" (Kiev, 2010);
- Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Церебральна недостатність, морфогенез, нейропротекція та інтенсивна терапія» (Запоріжжя, 2010);
- Всеросійська конференція за міжнародною участю «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды», (Санкт-Петербург, 2010);
- COST TD0901: HypoxiaNet OXYGEN 2011 (Davos, Switzerland 2011);
- V Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience (Kiev, 2011);
- Всеукраїнська наукова конференція молодих учених «Фізіологія від молекули до організму» (Київ 2011);
- VII Parnas Conference (Warsaw, Poland, 2011);

- VIII міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2012);
- II Міжнародній науковій конференції «Високогірна гіпоксія і геном» (Терскол, Росія 2012);
- Neuroscience 2012, SfN's (Society for Neuroscience) 42nd annual meeting, (New Orleans, USA 2012);
- 8-th FENS forum of Neuroscience, (Barcelona, Spain 2012);
- Neuroscience 2013, SfN's (Society for Neuroscience) 43rd annual meeting (San Diego, USA 2013)

Публікації

Результати дисертаційної роботи опубліковано в **20** публікаціях: **6** статей у фахових наукових журналах затверджених ВАК України, та 14 тезах доповідей конференцій, симпозиумів та з'їздів у відповідних виданнях.

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 50 рисунками. Перелік використаної літератури містить 310 посилань.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Гіпоксичне та ішемічне ушкодження мозку

В організмі людини мозок становить всього 2% від загальної маси тіла, але в той же час використовує для задоволення власних енергетичних потреб 20% енергії, що генерується. Більша частина цієї енергії викорисовується нейронами для підтримання потенціалу спокою та відновлення концентрації іонів після синаптичної передачі. Деяка енергія також необхідна для підтримки синтетичної та катаболічної активності нейронів і гліальних клітин. Енергія для забезпечення перебігу цих процесів отримується за рахунок гідролізу АТФ. Окрім невеликих запасів глікогену в астроцитах, мозок енергетичних запасів не має. Енергетичний вихід гліколізу значно менший, ніж циклу Кребса, тому він не може ефективно забезпечувати безперебійну роботу клітин мозку. Альтернативних джерел енергії, як креатинфосфат в м'язах, мозок не має. Окисне фосфорилування глюкози залишається єдиним джерелом енергії для нього. Тому мозок потребує безперебійного постачання кисню та глюкози. Порушення церебрального кровопостачання, гіпоксія, гіпоглікемія чи важка анемія викликає енергетичну кризу [19]. Гіпоксичне ураження може бути спричинене тривалим перебуванням у замкнених приміщеннях, підйомом на значну висоту, де парціальний тиск кисню буде меншим, високим фізичним навантаженням, здатним спричинити перевантаження людини та багатьма іншими факторами. При тривалих порушеннях кровопостачання нестача кисню може досягати критичного рівня і призводити до летальних наслідків. Найрозповсюдженішою причиною припинення кровопостачання мозку є глобальне ураження, що може розвиватися в наслідок серцевого нападу, чи ішемічного інсульту. Близько 80% інсультів спричинені ішемічним інфарктом головного мозку, решта 20% припадає на геморагічний інсульт. Ішемічний інсульт може бути обумовлений як

зниженням доступності артеріальної крові, яка постачає тканини головного мозку глюкозою, киснем та поживними речовинами, так і венозною оклюзією. Венозна оклюзія призводить до розвитку набряку мозку, і може викликати як ішемію так і крововиливи у мозку. Тромбоз (атеросклероз, фіброзно-м'язова дисплазія і т. ін), емболія та системна гіперперфузія (зниження перфузійного тиску до 50 мм рт.ст. зі зниженням кровотоку) спричиняють ішемічне ураження мозку.

Тромболітичний та емболічний інсульт, як правило, фокальні або мультифокальні за своєю природою, в той час як гіперперфузія спричиняє глобальні ушкодження мозку.

При фокальному ішемічному пошкодженні мозку згусток крові перекриває церебральну судину і знижується приплив крові до певної області мозку, що підвищує ризик загибелі клітин в саме цій конкретній області [20].

Глобальне ішемічне ушкодження мозку відбувається через припинення чи різке зниження постачання крові до мозку і зазвичай викликане зупинкою серця. Якщо достатній кровообіг відновлюється протягом короткого періоду часу, симптоми ішемічного ушкодження можуть носити тимчасовий характер. Однак, якщо відновлення кровопостачання швидко не відбудеться, пошкодження головного мозку може бути критичним. Реперфузія (відновлення кровопостачання) має важливе значення для відновлення ушкоджених тканин мозку, але також може призвести до реперфузійного пошкодження [21]. Нейрони більш чутливі до ішемічного ураження, ніж гліальні клітини, оскільки вони мають вищі енергетичні потреби і виробляють глутамат. Не всі структури мозку та навіть не всі нейрони, мають однакову вразливість до ішемічного ураження: найбільш вразливими, за літературними даними, є пірамідальні нейрони CA1 зони гіпокампа, пірамідальні нейрони неокортексу. Кора головного мозку чутливіша за таламус, таламус за стовбур мозку. Спинний мозок може залишатися повністю неушкодженим, навіть якщо інші системи ЦНС

сильно постраждали. Цікаво що селективна вразливість спостерігається не лише в різних відділах мозку, а й в межах однієї структури. Нейрони CA1 та CA3 зон гіпокампа мають різну чутливість до ішемічного ушкодження [14,15,22,23].

1.2. Молекулярні механізми розвитку ішемічного ушкодження мозку

Патогенез церебрального ішемічного ушкодження включає багаточисленні процеси, які мають загальний алгоритм як в нейронах гіпокампа, так і в нейронах будь-якого іншого відділу мозку, проте можуть розвиватися з різною швидкістю. Насамперед, це зниження продукування енергії, пригнічення аеробного і активація анаеробного шляху утилізації глюкози, порушення активного транспорту іонів через мембрани з розкриттям агоніст-залежних Ca^{2+} -каналів і підвищенням концентрації вільного цитозольного кальцію в нейронах, та відхилення в функціонуванні ексайтотоксичних медіаторів збудження, розвиток ексайтотоксичності та цитокін-опосередкованої цитотоксичності, накопичення вільних радикалів та багато ін. [1]. Всі ці події взаємопов'язані і зкоординовані, і можуть призвести до розвитку ішемічного некрозу, який спостерігається в ішемічному ядрі. Протягом декількох хвилин після ішемічного ураження в тканинах мозку, які знаходилися в зоні припинення кровопостачання клітини починають гинути. Некротичне ядро, утворене мертвими клітинами, оточують тканини які постраждали від ішемічного ураження меншою мірою і зберігають метаболічну активність, залишаючись функціонально неактивними через зниження кровопостачання [24,25]. Цю ділянку називають ішемічною напівтіллю – пенумброю, і вона включає майже половину загального обсягу ураження на початкових стадіях і залишається тією областю за порятунок якої іде боротьба під час постішемічної терапії [26] . В зоні напівтілі спостерігається відстрочена загибель клітин, яку потенційно можна попередити [27,28].

Клітини мозку мають швидкий енергетичний обмін, але невисоку енергетичну ємність [29]. Рівень АТФ виснажується протягом приблизно 3 хвилин повної ішемії [30,31], порушується робота АТФ-аз залежних процесів, в першу чергу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ АТФ-аз, що веде до порушення іонного градієнту через мембрану. Це викликає зростання рівня позаклітинного K^+ і вхід Na^+ , йонів хлору Cl^- та Ca^{2+} в клітину. Зростання концентрації позаклітинного K^+ викликає деполяризацію і відновлення амінокислотних транспортерів. При цьому і потенціал-керовані і рецептор-керовані Ca^{2+} канали активуються, призводячи до збільшення вільного цитозольного Ca^{2+} . Масове вивільнення збудливих амінокислот, особливо глутамату, може призвести як до відновлення роботи транспортерів глутамату, так і до Ca^{2+} залежного екзоцитозу [32]. Глутаматіндукована смерть пов'язана з апоптозом, присутня характерна фрагментація ДНК, морфологічні зміни, активація кальпаїну, обумовлене активацією каспази-3 розщеплення і інактивація Ca^{2+} помпи плазматичної мембрани (PMCA), в нейронах, транслокація фактору індукованого апоптозом (АІФ) з мітохондрій в цитоплазму і ядро [33].

Значна роль у надлишковому вході Ca^{2+} в клітину належить ацидозу [34]. За умов низького рН активуються Ca^{2+} проникні протон-чутливі йонні канали (ASICs), субодиниці ASIC1a, що відповідають за ацидоз опосередковане та глутаматрецептор незалежне ішемічне пошкодження.

Одним із важливих факторів розвитку некрозу та апоптозу при ішемічному пошкодженні тканин, особливо при реперфузії є оксидативний стрес [35,36]. Кальмодулінзалежна регуляції NO-синтаз (NOS) веде до збільшення глутаматопосередкованої внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} після ішемічного ураження [31]. Ішемія викликає сплеск активності кальцій-залежної NOS-1 у нейронах та глії і вважається вторинною у відновленні повторного захоплення глутамату, активації NMDA рецепторів, наслідком якого є підвищення внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Активність всіх трьох форм NOS зростає після ішемії та реперфузії.

Розвиток запалення в тканинах мозку, під час ішемічного ураження чи після нього залежить від тяжкості та тривалості ішемії, є вторинним механізмом ураження після ішемічного інсульту і вважається одним із головних факторів реперфузійного пошкодження [37,38]. Експериментальні дані показують, що у відповідь на ішемічне ушкодження, мікроглія активується протягом декількох хвилин і продукує велику кількість прозапальних медіаторів, активуються фактор некрозу пухлин TNF- α , через 2 години після ішемії активується інтерлейкін IL-1 β і фактор активації тромбоцитів які можуть як посилювати пошкодження тканин [21,39,40], так і захищати мозок від ішемічного та ексайтотоксичного ушкодження [41–43]. (NF)- κ B також впливає на продукцію NOS та циклогексанази-2 (COX-2), яка опосередковує запалення.

Неспроможні накопичувати глюкозу і залежні від постійної роботи кардіоваскулярної системи та від астроцитів, які забезпечують енергетичний обмін, нейрони реагують на ішемічне пошкодження неоднозначно, і ця реакція залежить як від тривалості ішемічного ушкодження так і від об'єму уражених тканин [44]. Перфузія, яка підтримується клітинами не ураженими ішемією, сповільнює розвиток пошкодження в пенумбрі. Зниження кровотоку там становить до 20-40% від нормального [45–47]. Тривалий час вважалося, що тканини в зоні інфаркту гинуть виключно шляхом некрозу [48], але в 1990–их роках було описано механізми загибелі клітин, які включали в себе фрагментацію ДНК та продукцію апоптичних тілець – апоптоз [49,50]. Саме апоптоз, вважається однією з причин відстроченої загибелі нейронів [51], [52,53] хоча за деякими даними в мозку людини він відіграє менш драматичну роль в смерті нейронів ніж у випадку проведення досліджень на лабораторних тваринах [54–56]. Механізми відповіді на ішемічне ушкодження в ядрі ішемічного ураження та в пенумбрі, відрізняються.

1.3. Нейропротективний ефект короткострокового гіпоксичного та аноксичного прекондиціювання

Розробка медичних препаратів та стратегій лікування ішемічного ураження ведеться постійно, але значних зрушень з моменту відкриття рекомбінантного активатора тканинного плазміногену (r-TPA) 20 років тому не було. Використання гепарину, аспірину, дипірамідолу, клопідогрелю не дають виразного лікувального ефекту, а наявність у r-TPA побічних ефектів і обмеженість його використання через трьох године терапевтичне вікно, значно лімітує коло його використання. Постійно ведеться пошук фармакологічних та терапевтичних засобів здатних попереджувати чи нівелювати розвиток ураження взагалі [57,58]. Клінічні випробування більшості провідних методів нейропротективного лікування не дають очікуваних ефектів і не відрізняються безпечністю. Однією з причин таких невдач може бути неправильно підібраний час для втручання в молекулярні процеси та не повне розуміння процесів загалом [58].

Протективні властивості короткострокових гіпоксичних впливів досліджувалися з кінця 50-х [59]. У 1990 р. було показано, що короткострокові гіпоксичне прекондиціювання підвищує резистентність до тривалого ішемічного ураження нейронів гіпокампа [60]. Клінічні дослідження показали, що повторювані гіпоксичні прекондиціювання сприяють адаптації до ішемічного ураження [61,62], що співпадало з результатами отриманими *in vitro* [63]. Показано, що короткострокові повторювані аноксичні та гіпоксичні пре- та посткондиціювання мають виражені нейропротективні властивості і сприяють резистентності нейронів до ішемії [64]. Гіпоксичне прекондиціювання може достовірно знижувати наслідки ішемічного інсульту, а також поліпшити стійкість до інсульту. На базі досліджень прекондиціювань розробляються численні стратегії для лікування хворих, що перенесли ішемічне ураження [64].

1.4. Функції гіпокампа та відповідь на ішемічне ураження

В природних умовах гіпокамп забезпечує перенесення інформації про подію, яка відбувається в даний момент, переводить її з короткострокової пам'яті в довгострокову. Його пірамідні нейрони здатні до інтеграції та диференційованого управління сигналами, які надходять з різних аферентних сигнальних шляхів [65].

Гіпокамп є однією із найважливіших структур лімбічної системи, в якій знаходяться пірамідні нейрони, здатні продукувати регулярний тета-ритм ЕЕГ, пов'язаний з певним рівнем емоційного напруження типу страху, агресії, сексуальної потреби.

Гіпокамп поділяють на дорзальну та вентральну частини. Вибіркове руйнування цих структур мало впливає на швидкість утворення умовних рефлексів здобування їжі, проте значно утруднює їх зміцнення завдяки підвищенню рівня загальної збудливості і послабленню гальмівних процесів. Руйнування дорзального гіпокампа покращує, а вентрального – погіршує формування активних захисних реакцій. В обох випадках значно послаблюються процеси внутрішнього гальмування.

Функції гіпокампа дуже різноманітні: від формування складних мотивацій і реалізації соціально-поведінкових актів до простих емоційно-вегетативних реакцій. Гіпокамп здійснює також організацію реакцій організму на сигнали з малою ймовірністю підкріплення, він пов'язаний з "інформаційним компонентом" емоцій. Основні специфічні функції гіпокампа полягають у регуляції навчання та пам'яті, особливо у консолідації та відтворенні пам'ятного сліду. Вважається що формування пам'ятного сліду відбувається внаслідок тривалої реверберації (циркуляції) нервових імпульсів по замкнених колах нейронів.

З гіпокампом пов'язане явище "несправжнього пізнання" (дежавю), згортка і розгортка пам'ятного сліду. Специфічні нейрони гіпокампа також реагують на складні біологічно значущі подразники, що відіграє важливу роль

при визначенні біологічної (а для людини – і соціальної) цінності інформації при формуванні доцільної поведінки та сприйняття предметів у просторі [65,66].

Вразливість нейронів до ішемічного ушкодження варіює у різних регіонах центральної нервової системи. Різні популяції нейронів у мозку також показують неоднакову сприйнятливість до ішемії. Численні дослідження показали що пірамідальні нейрони СА1 зони гіпокампа являються надзвичайно чутливими до ішемічного ушкодження і гинуть на 2-3 день після фокальної транзиторної ішемії, в той час як в СА3 зоні пірамідальні нейрони залишаються життєздатними і виживають [67,68]. Механізми такої вибіркової загибелі клітин тривалий час залишаються не повністю зрозумілими і активно досліджуються. Висловлювалися припущення, що гіперактивність нейронів веде до накопичення зовнішньоклітинних ексайтотоксичних амінокислот протягом ішемії та значного збільшення вільного внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що могло б викликати нейродегенерації [69,70]. Порівнювалися зміни калієвих струмів в гострій дисоційованій культурі нейронів гіпокампа за різних інтервалів після ушкодження в різних зонах і була показана неоднорідність калієвих струмів у різних зонах [71].

Дослідження експресії генів в різних зонах гіпокампа за нормальних умов та при ішемічному ушкодженні показали, що за фізіологічних умов більше ніж 1000 генів, які контролюють різноманітні процеси експресуються в різних зонах не однаково. Порівняння експресії при ішемії та в нормі виявило майже 5000 генів які контролюються ішемічним станом для обох регіонів гіпокампа [72].

Загалом 5-7 хв ішемія *in vitro* при 36-37° С, або періодична ішемія на протязі 2-3 хв з аноксичною деполяризацією, призводить до швидкого пошкодження різних параметрів пірамідальних клітин СА1 зони, яке триває від 8- до 14- годин життя зрізу. Дещо довша експозиція необхідна для пошкодження зубчастих гранулярних клітин для того, щоб зрізи дійсно показали ті ж зміни, що мають відбуватися в тканинах *in vivo*.

Пошкодження, отримані тканинами, включають пошкодження синаптичної передачі [73,74], синтезу білка [75,76], рівня АТФ [77], цілісності цитоскелету [78] і морфології нейронів [76]. Всі ці пошкодження відбуваються протягом перших 30 хв і зберігаються протягом періоду реперфузії [77,79,80]. Зміни в синтезі білка аналогічні тим, які спостерігаються *in vivo*, але повна втрата синаптичної передачі, дуже інтенсивні морфологічні пошкодження і руйнування цитоскелету, як правило, не спостерігаються так рано чи так виражено *in vivo*, зрізи більш чутливі до ішемії, ніж клітини *in vitro*. Результати досліджень отримані на органотиповій культурі гіпокампа *in vitro*, такі як, швидкість зміни іонів, метаболітів, і синтезу білка, з результатами отриманими *in vivo*, співпадають. Пошкодження синаптичної передачі були вивчені саме з використанням органотипових зрізів гіпокампа [81,82].

Органотипові зрізи гіпокампа виконують дуже важливу роль, сприяючи аналізу механізмів ранніх змін при ішемічному ураженні нейронів СА1 та СА3 зон. Досліджуючи молекулярні механізми селективної чутливості нейронів різних зон до ІУ можна зрозуміти, які саме процеси лежать в основі виживання нейронів, і яким саме чином можна стимулювати ендогенну нейропротекцію в інших нейронах мозку.

1.5. Клітинні механізми, що забезпечують Ca^{2+} гомеостаз

Глутамат-опосередкована ексайтотоксичність та вхід великої кількості Ca^{2+} відіграє важливу роль в розвитку ішемічного ураження, окрім того, вони задіяні також у розвитку відстроченої загибелі нейронів СА1 зони гіпокампа [83,84]. Дослідження транскрипційних факторів, білків та сигнальних систем, здатних забезпечувати Ca^{2+} гомеостаз у клітинні, є багатообіцяючим для розуміння фундаментальних механізмів перебігу ішемічного ураження та пошуку стратегій здатних попередити негативні та летальні наслідки.

Системи та механізми, що контролюють вміст Ca^{2+} в цитоплазматичному просторі. Концентрація вільного кальцію Ca^{2+} в зовнішньоклітинному просторі становить 1,2 mM, в той час як концентрація

цитоплазматичного кальцію близько 100 nM. Кальцієвим депо в клітині є ендоплазматичний ретикулум, вміст кальцію в ньому близько 0,5 mM. Для забезпечення сталого рівня йонів Ca^{2+} плазматична мембрана, як правило, містить три системи: Ca^{2+} канали, Ca^{2+} АТФ-азу, та Na^+ - Ca^{2+} обмінник.

Вхід кальцію за градієнтом концентрації здійснюється в основному Ca^{2+} каналами плазматичної мембрани. Вихід же Ca^{2+} здійснюється Ca^{2+} АТФ-азою (PMCA) та Na^+ - Ca^{2+} -обмінником (NCX). Найважливішими мембранними структурами, які контролюють концентрацію іонів Ca^{2+} є кальцієві канали. При активації канали формують миттєві іоноселективні пори, через які іони кальцію проникають всередину клітини за градієнтом концентрації. В плазматичній мембрані є три основні типи каналів для входу кальцію: потенціалкеровані (VGC), рецепторкеровані (RGC), та канали регульовані вивільненням з депо (SOCC). Ці три канали мають різні кінетичні властивості, потенціал- та рецептор-керовані канали зазвичай дають короткі всплески високої інтенсивності в той час як канали керовані депо кальцію (SOCC) забезпечують менший, але постійний приток кальцію табл.1. [85].

Табл..1 Системи, що забезпечують гомеостаз йонів Ca^{2+} [86]

Клітинна структура	Забезпечення входу	Забезпечення виходу
Плазматична мембрана	NCX, VGC, RGC, SOCC	NCX, PMCA
Мембрана ЕПР	SERCA	(RyRs), (IP3Rs)
Мітохондріальна мембрана	Мітохондріальний NCX, Юніпортер, MMCA	Мітохондріальний NCX MPT-пора

При цьому в той час як, плазматична мембрана клітини містить кілька типів каналів, що опосередковують вхід Ca^{2+} з зовнішньоклітинного середовища, в ній наявна лише одна система для виведення йонів Ca^{2+} за межі цитоплазматичного простору - високоафінна, малоемнісна Ca^{2+} -АТФазу (кальцієва помпа плазматичної мембрани, PMCA – plasma membrane calcium

pump), що необхідну для підтримання сталого рівня Ca^{2+} , а також регулювання його цитоплазматичних осциляцій. Окрім цієї системи виведення Ca^{2+} через плазматичну мембрану в клітині існує низькоафінний високоємнісний $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник (NCX), в клітині $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник здатний як виводити Ca^{2+} за межі клітини так і забезпечувати його накопичення в мітохондріях. До того ж депо ЕПР має Ca^{2+} -АТФазу (SERCA –Sarco/EndoplasmicReticulum Ca^{2+} -ATPase), що також забезпечує вихід йонів Ca^{2+} з цитоплазми до ендоплазматичного ретикулуму. Вихід же Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму опосередковується двома типами каналів, що керуються рецепторами: ріанодинові канали (RyRs) та інозитол-1,4,5-трифосфатні (IP3Rs). Типи каналів на мембранах та їхнє співвідношення залежить від типу клітин [87].

Особливості функціонування Ca^{2+} контролюючих систем: PMCA, SERCA, під час ішемічного ураження в нейронах гіпокампа. Надлишок внутрішньоклітинного Ca^{2+} , ексайтотоксична активність глутамату та супутнє утворення вільних радикалів значною мірою сприяють загибелі нейронів в певних зонах гіпокампа [83,84]. Було показано, що за фізіологічних умов в нейронах гіпокампа основну роль у зниженні рівня цитоплазматичного Ca^{2+} відіграють PMCA [88,89] і SERCA, тоді як вклад $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника та мітохондрій в цьому процесі займає незначну роль, проте нехтувати вкладом мітохондрій в підтримання Ca^{2+} -гомеостазу не варто [90].

PMCA. У ссавців чотири окремі гени кодують чотири ізоформи PMCA: PMCA-1, PMCA-2, PMCA-3 та PMCA-4 [87]. PMCA-1 та PMCA-4 експресуються в переважній більшості тканин, PMCA-2 та PMCA-3 є більш тканинно-специфічними, це і тканини мозку, посмугована м'язова тканина. PMCA-2 присутня в нейронах Пуркінє в мозочку, кохлеарних волосяних клітинах, матці, печінці, нирках. PMCA3 експресується в судинному сплетенні.

Експресія PMCA регулюється іонами Ca^{2+} , що було досліджено на культурі нейронів і корелює з їхнім дозріванням. У гранулярних клітинах мозочку збільшення концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі змінювало патерн експресії

ізоформ РМСА. Відзначався високий рівень експресії усіченого варіанту РМСА-3, а експресія РМСА-4 взагалі зникла [91]. Перепрограмування транскрипції РМСА відіграє важливу роль у виживанні нейронів, а регуляція експресії РМСА може мати вирішальне значення для виживання клітин при патологічному збільшенні концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} [92]. В нейронах гіпокампа щурів транскрипція всіх ізоформ РМСА в культурі була значно підвищена, загальне збільшення Ca^{2+} супроводжувалося змінами в експресії та клітинній локалізації різних ізоформ [93].

Нейрон специфічна ізоформа РМСА-2 розщеплюється *in vivo* після ішемічного ушкодження мозку, і після ексайтотоксичної стимуляції в нейронах запускається апоптоз. Наслідками інгібування РМСА була загибель нейронів пірамідального шару у СА1 зоні гіпокампа [94]. Фрагментація РМСА-2 в експериментах *in vitro* відбувалася більш обширно, що пояснювалося більшою концентрацією каспаз в експериментах [95]. Цікаво, що при дослідженні СА1-толерантних до ішемічного ураження нейронів гіпокампа на монгольських піщанках, було показано значне зниження рівня РМСА-1 за умов летального ішемічного ураження [94], а за умов 2-хв. ішемічного ураження, навпаки спостерігалось зростання рівня експресії РМСА1 [96].

SERCA. У ссавців SERCA кодується трьома генами ATP2A 1-3, кожен з них в свою чергу кодує кілька ізоформ: SERCA-1a,b, SERCA-2a-c, SERCA-3a-f (9-13, 26). Серед всіх цих ізоформ SERCA-2 основна, якщо не єдина яка була знайдена в майже усіх регіонах мозку. SERCA1 не детектувалася у мозку взагалі, а SERCA-3 була знайдена на досить високому рівні лише у нейронах Пуркін'є мозочка і в корі головного мозку [97].

SERCA-2 завдяки альтернативному сплайсингу являються тканино специфічними [98]. SERCA-2a експресується у скелетних, гладеньких та посмугованих м'язах [99]. SERCA-2b має високий рівень експресії в пірамідальних нейронах гіпокампа [100].

Під час ішемічного пошкодження спостерігалось швидке і значне зростання рівня внутрішньоклітинного $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у нейронах СА1 зони гіпокампа

in vivo та в органотиповій культурі гіпокампа. Глутаматна ексайтотоксичність та спричинена нею висока концентрації $[Ca^{2+}]_i$ і вважається головним механізмом нейронального ішемічного пошкодження. Дослідження ж на дисоційованій культурі CA1 нейронів гіпокампа показали, що енергетичний дефіцит викликає швидке порушення гомеостазу Ca^{2+} в ендоплазматичному ретикулумі та призводить до незворотнього зростання $[Ca^{2+}]_i$ та ушкодження нейронів за відсутності глутаматної експозиції. Було показано також, що вхід Ca^{2+} через потенціал-керовані канали та NCX посилює дезрегуляцію Ca^{2+} гомеостазу, але не є його основною причиною. Вихід Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму під час ішемії спричинений в основному недостатнім рівнем роботи SERCA, через недостатній енергетичний рівень, який в свою чергу обумовлений погіршенням функціонування мітохондрій в перші ж хвилини КГД (киснево-глюкозної депривації) [101].

В роботі по дослідженню SERCA-2 в кардіоміоцитах при гіпоксичному ураженні [102] було показано значне зниження рівня експресії SERCA-2, що корелювало з високим рівнем альфа субодиниці транскрипційного фактору HIF-1 (HIF-1 α). Робота цього ж транскрипційного фактору за останніми даними впливає і на роботу ще однієї системи, здатної знижувати рівень цитоплазматичного Ca^{2+} .

В дослідженнях постішемічних змін в гіпокампі при 8 хв. глобальній ішемії було показане зниження рівня білка NCX1 в нейронах CA1 зони, в той час як в нейронах CA2 та CA3 зони рівень не змінювався [103]. Нокдаун NCX1 збільшує ішемічне пошкодження мозку, і є одним із генів-мішеней HIF-1, а індукована HIF-1 надекспресія NCX1 має нейропротективний ефект [104]. Супресія NCX3 приводила до загибелі нейронів в усіх зонах гіпокампа після ішемічного ушкодження. Дослідження проводилися на органотиповій культурі гіпокампа, і було виявлено що при видаленні NCX3 рівень смертності клітин спостерігався більшою мірою в CA3 зоні та DG в порівнянні з CA1 [105].

Останні дослідження показують, що такі добре відомі системи, як PMCA та SERCA за умов ішемічного ураження в нейронах відіграють важливу роль і

розуміння механізмів їхньої активації та стабілізації може дати поштовх у пошуку ендогенних нейропротективних стратегій попередження негативних наслідків ішемічного ураження. Взаємозв'язок же цих систем з одним із ключових факторів відповіді на зміну доступності кисню – HIF-1, може відігравати в цих адаптивних процесах надзвичайно важливу роль, яка на даний момент залишається майже не дослідженою і не розкритою.

1.6. Фактор, що індукується гіпоксією кисневий сенсор клітин

У 1992 році групою дослідників із університету Джона Хопкінса у Балтіморі на чолі з Грегом Семензою було вперше ідентифіковано транскрипційний фактор, що індукується гіпоксією (hypoxia-inducible factor, HIF) [106–109]. HIF-1 є гетеродимерним транскрипційним комплексом, що складається з двох субодиниць: β -субодиниці, яка конститутивно експресується у клітинах, та α -субодиниці, стабільність і рівень експресії якої регулюється рівнем кисню [110]. На сьогодні родина HIF-1 включає ідентифіковані 3 підтипи α -субодиниці: HIF-1 α , HIF-2 α та HIF-3 α , та 3 підтипи β -субодиниці: HIF-1 β , HIF-2 β та HIF-3 β , які кодуються різними генами та характеризуються особливостями молекулярно-структурної організації і функціональної ролі [111–114]. Клітинні та молекулярні механізми, в яких задіяний HIF-1, активно досліджуються з моменту відкриття транскрипційного фактору і дотепер. Такий інтерес обумовлений в першу чергу практичною значимістю розуміння фундаментальних механізмів, які опосередковує HIF-1, що дозволяє ефективно модулювати фізіологічну адаптацію до гіпоксичних станів від рівня поодинокі клітини через кластер клітин до тканин та організму в цілому. Крім того, дослідження генів-мішеней, які активуються HIF-1, дало значний поштовх у розумінні патології функціонування злоякісних новоутворень [115] та нейродегенеративних захворювань, зокрема хвороби Паркінсона [116,117], Альцгеймера [118,119] та Хантінгтона [120,121].

Молекулярно-структурна організація субодиниць HIF комплексу.
Субодиниці α та β , що входять до складу комплексу HIF-1 і формують

гетеродимер, є білками родини bHLH-PAS, які характеризуються наявністю 2 доменів (Рис. 1): базового домену-мотиву типу "спіраль-петля-спіраль" (basic helix-loop-helix, bHLH) та PAS домену, назва якого є акронімом першого відкритого білка родини PAS (*Drosophila* period (Per) and single-minded (Sim) proteins and mammalian aryl hydrocarbon receptor (AHR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) protein) [111]. Домени bHLH та PAS забезпечують гетеродимеризацію α - і β -субодиниць між собою та наступне зв'язування утвореного гетерокомплексу із ДНК.

Субодиниця α містить два термінальні трансактиваційні домени: C-TAD та N-TAD (C-terminal та N-terminal transactivation domains), які також відомі як CAD та NAD [122]. NAD термінальний трансактиваційний домен містить кисень-залежний деградаційний домен ODD (Oxygen-dependent Degradation Domain) і забезпечує стабілізацію α -субодиниці, тоді як CAD домен забезпечує взаємодію комплексу HIF з коактиватором p300/CBP [123] та наступну активацію транскрипції генів-мішеней [124]. На сьогодні найбільш детально досліджено молекулярно-структурну організацію субодиниці HIF-1 α , яка була відкрита першою. Субодиниця HIF-2 α , ідентифікована пізніше (у 1997 р), є структурно спорідненою до HIF-1 α . Обидві субодиниці мають CAD та NAD термінальні трансактиваційні домени; амінокислотний склад субодиниці HIF-2 α є на 48% ідентичний HIF-1 α . Однак, незважаючи на високу структурну гомологію, HIF-1 α та HIF-2 α активують різні гени-мішені [125]. Субодиницю HIF-3 α було відкрито у 1998 році і її функціональна роль до сьогодні залишається малозрозумілою [126]. Структурно HIF-3 α містить тільки NAD термінальний трансактиваційний домен і виступає негативним регулятором експресії генів, які індукуються гіпоксією. Сплайсинговий варіант HIF-3 α (IPAS) має здатність приєднуватися до HIF-1 α , інгібуючи таким чином його транскрипційну активність [127], а ізоформа HIF-3 α 4 приєднується до HIF-2 α , блокуючи роботу останнього [128–135].

Субодиниця β конститутивно експресується у клітинах і має 3 альтернативних сплайс-варіанти (HIF-1 β , HIF-2 β та HIF-3 β). Вона містить лише

один трансактиваційний TAD-домен і може входити до складу різноманітних комплексів, які зв'язуються із ДНК.

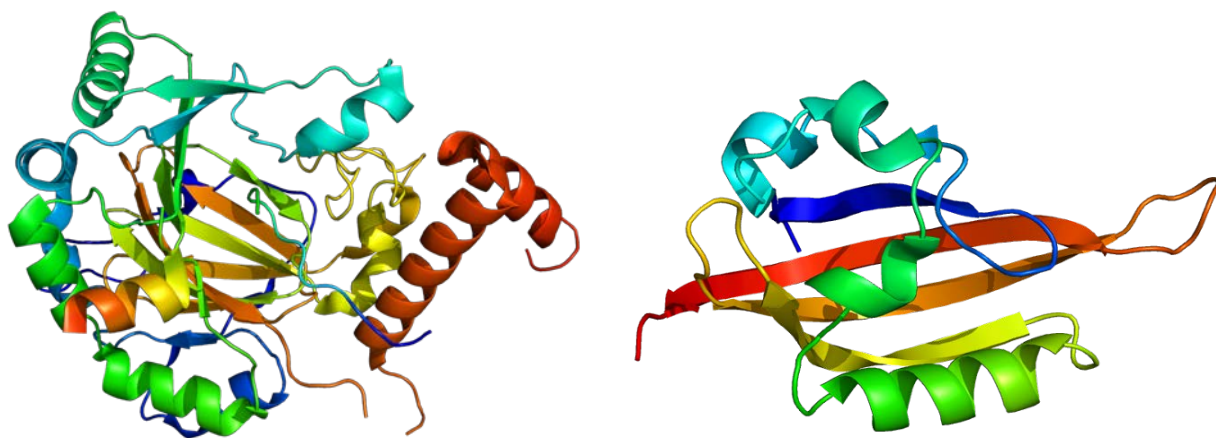


Рис. 1. Кристалографічна структура субодиниці HIF-1 α : bHLH [136] домен (зліва) та PAS домен ендотеліального білку HIF-1 [137](справа).

Тканинна специфічність експресії субодиниць HIF-1. Експресія α -субодиниць у тканинах організму є неоднорідною і відрізняється для різних підтипів α -субодиниць. Субодиниця HIF-1 α експресується у різних типах тканин, однак найвищий рівень її експресії виявлено у нервовій тканині, зокрема у нейронах [111,138]. Експресія субодиниці HIF-2 α є більш тканинно-специфічною і характерною для ендотеліальних тканин, нирок, легень, тканин серця, тонкого кишківника, гепатоцитів, підшлункової залози, а також нейробластом [139–143]. Подібно до HIF-1 α субодиниці, субодиниця HIF-3 α експресується у різних типах тканин [126]. Сплайсинговий варіант HIF-3 α (IPAS) експресується переважно в клітинах Пуркінє мозочку та епітелії рогівки; високий рівень експресії HIF-3 α також було виявлено у тканинах легень та серця при гіпоксії [127,144].

Клітинна специфічність експресії різних субодиниць HIF-1 залишається остаточно нез'ясованою. Численні дослідження, присвячені встановленню особливостей клітинної експресії субодиниць HIF-1 з використанням генно-інженерних підходів, зіткнулись з проблемою того, що генетичне вимкнення

навіть однієї із субодиниць HIF-1 призводило до летальних наслідків. Так, за умов трансгенного нокауту субодиниці HIF-1 α ембріони мишей гинули на 11 день ембріонального розвитку внаслідок порушення розвитку кровоносних судин, дефектів формування нервової складки та серцевосудинної мальформації [145,146]. Трансгенний нокаут субодиниці HIF-2 α призводив до загибелі ембріону на 16,5 день ембріонального розвитку внаслідок сповільненого серцевого ритму, неправильного злиття та ремоделювання судин, порушення розвитку легень [147]. Нокаут конститутивної субодиниці HIF-1 β також супроводжувався дефектами формування кровоносних судин, ангіогенезу жовточного мішка і зябрової дуги, пригніченням розвитку ембріона та смертю на 10,5 день ембріонального розвитку [148,149]. Висока летальність генетичного вимкнення експресії однієї із субодиниць HIF-1 ускладнює дослідження клітинної специфічності та з'ясування функціональної ролі різних підтипів субодиниць HIF із застосуванням сучасних науково-методологічних підходів.

Механізми активації та регуляції HIF-1 комплексу. Субодиниця HIF-1 α постійно експресується у клітинах, проте період її напіврозпаду за нормоксичних умов є коротким – ~ 5 хв. [150]. Внутрішньоклітинні ферменти родини проліл-гідролаз каталізують гідроксилювання пролінових залишків Pro402 та Pro564, що знаходяться в ODD домені HIF-1 α . Ідентифіковано три ізоформи проліл-гідролаз (PHD1–3), які присутні у клітинах у різних кількостях [106,124,151]. Гідроксилювання пролінових залишків служить сигналом для впізнавання α -субодиниці білком pVHL (von Hippel-Lindau) та сприяє наступній протеасомній деградації α -субодиниці (Рис. 2) [112,152].

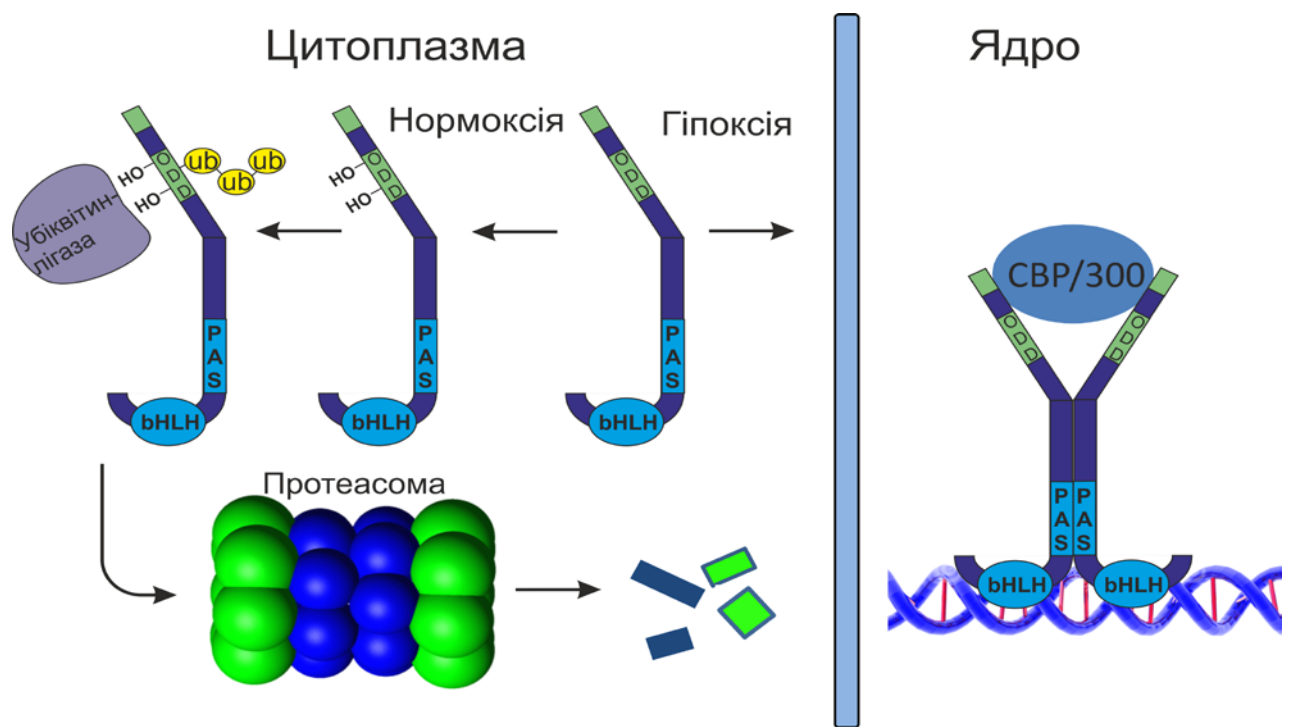


Рис. 2. Кисень-залежний механізм регуляції стабільності субодиниці HIF-1 α (адаптовано із [153]).

Альтернативним механізмом інактивації HIF-комплексу за умов присутності кисню є блокування взаємодії CAD термінального трансактиваційного домену субодиниці HIF-1 α із коактиватором транскрипції p300/CBP [150]. Таке блокування опосередковується ферментом HIF-аспарагініл-гідроксилазою, який інгібує HIF-1 (factor inhibiting HIF-1, FIH-1) [124,140]. Активація ферментів проліл-гідролаз та FIH-1 забезпечує блокування субодиниці HIF-1 α та попереджує подальшу активацію транскрипції генів.

За умов гіпоксії ферменти проліл-гідролази та FIH інактивуються, що супроводжується стабілізацією субодиниці HIF-1 α , її подальшою транслокацією в ядро, де HIF-1 α гетеродимеризується з субодиницею HIF- β з наступним приєднанням комплексу HIF до ДНК. Гетерокомплекс HIF взаємодіє з елементом відповіді на гіпоксію (hypoxia response element, HRE), та коактиватором транскрипції CBP/p300, що обумовлює активацію численних генів-мішеней [123].

Гени-мішені HIF-1. На сьогодні відомо більше 100 генів-мішеней, які активуються HIF-1. У людини HIF-1 прямо чи опосередковано регулює близько

2% генів ендотеліальних клітин артерій кровоносної системи [106,125,154]. Незважаючи на структурну схожість HIF-1 α , HIF-2 α та HIF-3 α субодиниць, після димеризації з HIF-1 β вони здатні активувати різні гени-мішені. Дослідження *in vitro* показали, що гетеродимер субодиниць HIF- β та HIF-1 α активує гени, які кодують білки, що опосередковують клітинну відповідь на гостре гіпоксичне ураження, в той час як для комплексу HIF- β та HIF-2 α характерна активація генів, які опосередковують клітинні реакції на помірну гіпоксію [133]. HIF-1 активує гени, які кодують еритропоетин (*EPO*), судинний ендотеліальний фактор росту (*VEGF*) [155]. Еритропоетин попереджує загибель нейронів в умовах окисного та азотно-окисного стресу *in vitro* та сприяє відновленню мозку після інсульту *in vivo* [156–161]. Це ключовий механізм, який лежить в основі характерних нейропротективних властивостей HIF-комплексу. Однак, крім активації генів *EPO* та *VEGF*, у сфері впливу HIF-1 є також активація експресії генів, які кодують ET1 [162,163], проапоптичні білки, такі як *p53*, *BNIP3* та ін. [164,165] [166–169]. Зокрема, білок *p53* є тригером апоптозу, що індукується гіпоксією, активуючи такі проапоптичні гени як *Bax*, *NOXA*, *PUMA*, *PERP* [165,166,170]. Як наслідок, активуються механізми апоптозу та зростає рівень клітинної смертності за умов гіпоксичного ураження. Таке різноманіття генів-мішеней, які активуються HIF-комплексом, відображає дуалізм ефектів, які опосередковуються HIF-1.

Крім генів, які кодують експресію білків еритропоезу, ангиогенезу та проапоптичних білків, до генів-мішеней HIF-1 належать гени, що кодують експресію багаточисельних білків-регуляторів клітинного метаболізму. Серед них зокрема: металопротейни – білки, які регулюють метаболізм заліза (трансферин, церулоплазмін, рецептор трансферину [171,172], глюкозні транспортери 1 та 3 – білки, що беруть участь у метаболізмі глюкози [169], *PFKFB* [173], білки позаклітинного матриксу, структурні білки цитоскелету, хемокіни, а також білки ліпідного метаболізму, судинного тонусу [174] та ін. Пошук генів-мішеней HIF-1 активно ведеться і сьогодні. Важливо зрозуміти, що в той час, як проводиться дослідження великої кількості генів задіяних у

відстрочених адаптивних реакціях, таких як васкуляризація ураженої зони, та активація еритропоезу, робіт по з'ясуванню взаємодії HIF-1 з системами підтримання Ca^{2+} гомеостазу на кілька порядків менше, хоча ці дослідження, які ми розглянемо нижче, мають бути не менш багатообіцяючими.

Дуалізм HIF-опосередкованих клітинних відповідей при ішемічних станах. HIF-1 та онкогенез. У багатьох випадках злоякісних новоутворень у людей спостерігається надекспресія субодиниць HIF-1 α і HIF-2 α [175]. Це обумовлюється прогресуючою гіпоксією всередині пухлинної маси та адаптивних процесів, індукованих тривалою гіпоксією. Гіпоксичні умови, які створюються через відсутність судин у новоутворенній пухлині та недостатнього забезпечення тканин киснем, ведуть до стабілізації та активації HIF-1. Крім стимуляції гіпоксією, HIF-1 також активується фактором росту та онкогенами, які стимулюють виживання та проліферацію клітин [10], тим самим впливаючи на потенційну кореляцію між ростом тканин і їх кисневим забезпеченням. Фактори росту активують внутрішньоклітинні метаболічні шляхи, зокрема, каскади фосфорилування, такі як мітоген-активовану протеїн кіназу (mitogen-activated protein kinase, *MAPK*), фосфоінозитид 3-кінazu (phosphoinositide 3-kinase, *PI3K*), і підсилюють відповідь HIF на гіпоксію за допомогою як посттрансляційного, так і трансляційного контролю [122]. Це підтверджують також результати імуногістохімічних досліджень, що виявили базовий рівень білка HIF-1 α у доброякісних утвореннях, на противагу істотному підвищенню його рівня у первинних злоякісних пухлинах та у пухлинних метастазах [175,176]. Спостерігається пряма кореляція між надекспресією HIF-1 α та рівнем смертності пацієнтів у клінічних дослідженнях [115].

Крім HIF-1 α , HIF-2 α також приймає активну участь у прогресії пухлин [173,177]. Проонкотичний ефект HIF обумовлюється необхідністю посиленого постачання клітин киснем для забезпечення прогресивного росту пухлинної маси шляхом активації ангиогенезу та гліколізу – так званий ефект Варбурга. Ці процеси забезпечуються стабілізацією субодиниці HIF-1 α з подальшою

активацією HIF-1 комплексу та наступною індукцією експресії еритропоєтину та ендотеліального фактору росту судин.

HIF-опосередкована нейропротекція та апоптоз. Клітинні ефекти, які опосередковує HIF-1 у нервовій тканині у відповідь на ішемічне ураження, виявляють дуалістичний та суперечливий характер. Численні дослідження продемонстрували, що вже через годину після ішемічного ураження серця спостерігається акумуляція білка HIF-1 α у тканинах мозку. Підвищений рівень HIF-1 α у нервовій тканині зберігався протягом тижня і супроводжувався активацією численних генів-мішеней [178]. Рівень білка HIF-1 α у мозку щурів був високим протягом 14 діб після індукції тривалої гіпоксії, а знижувався, починаючи лише з 21 доби [178,179]. Зокрема, зміна рівня експресії HIF-1 α при ішемічному ураженні нейронів характеризувалась двохфазністю відповіді: рівень експресії HIF-1 α драматично зростав (на 10 порядків) з 1 по 6 годину після ішемічного ураження, короткотривало знижувався протягом наступних 24 годин із подальшою фазою драматичного зростання на другу добу після ураження (на 7 порядків), яке підтримувалось протягом наступних 8 діб [180]. Виявлено, що протягом 1 – 24 годин після ішемічного ураження відбувається активація генів-мішеней, які кодують експресію ферментів гліколізу, білків про-ангіогенезу та факторів, задіяних у загибелі клітини [180]. Вже на другу добу після ішемічного ураження спостерігалось зниження експресії проапоптичних факторів, таких як *bNIP3*, *Noxa*, *Nix* та *RTP801*, а також активація генів, що беруть участь у ангіогенезі (*VEGF*, *Flt-1*, *PAI-1*, *Ang-2*, та *Flk*), еритропоезі та ін.; при цьому високим залишався рівень експресії еритропоєтину, енолази та глутаматного транспортеру 1 типу [180]. Таким чином, активація HIF-1 індукує включення компенсаторних механізмів (еритропоез, гліколіз), які швидко нейтралізують дефіцит кисню, васкуляризацію та ін., забезпечуючи відстрочену в часі нейропротекцію. Підтвердженням цього служить той факт, що селективне пригнічення експресії HIF-1 α у нейронах шляхом генетичного нок-дауну призводило до зростання ушкоджень тканин мозку у моделі оклюзії середньої церебральної артерії і

зменшення кількості клітин, що вижили після ішемічного ураження [180]. Шляхом фармакологічного блокування HIF-1 α за допомогою блокатору 2-метоксиестрадіолу (2-MEO) було показано достовірне зростання ступеню ушкодження CA1 зони гіпокампа за умов ішемічного ураження у моделі 10-хвилинної двохсудинної оклюзії [181]. У підтвердження нейропротекторної ролі HIF-1 α активація HIF-1 α сприяла виживанню нейронів як *in vitro*, так і *in vivo* [182], як у випадку додавання активаторів перед моделюванням гіпоксичних умов [183], так і після ішемічного ураження [180]. Нещодавно було показано зменшення зони ураження після ішемічного впливу за умов використання дослідниками інгібітора проліл-гідроксилаз, FG-4497 [184].

З іншого боку, комбінування фармакологічного блокування HIF-1 α з використанням 2-MEO та пригнічення експресії HIF-1 α на генетичному рівні інтерферуючими РНК (si-RNA) призводило до зменшення кількості ушкоджених нейронів за умов тривалого ішемічного ураження при додаванні 2-MEO та si-RNA через 30 хвилин після моделювання умов ішемії у культурі первинних нейронів (64). Застосування ж фармакологічного блокування роботи HIF-1 α та інгібування його експресії на пізніх стадіях пост-ішемічного ураження (2-MEO через 8 годин та si-RNA через 12 годин після моделювання ішемії) не супроводжувалось позитивними ефектами, а смертність нейронів зростала [185]. Ряд досліджень також продемонстрували, що селективне вимкнення експресії HIF-1 α у нейронах (нок-даун гену) призводило до зниження рівня ішемічного ураження у нейронах і підвищення їх виживання за умов ішемії [186]. Характерно, що рівень експресії певних генів-мішеней (*HIF-1*, *VEGF* та *GADD45*) залишався незміним [186]. Останній факт свідчить на користь того, що регуляція експресії цих генів опосередковується не лише HIF, а й іншими транскрипційними факторами.

Дуалістичність HIF-опосередкованих механізмів проявляється також у ефектах реактивних форм кисню (reactive oxygen species, ROS) на HIF-1 α . Було показано, що ROS індуюють деградацію HIF-1 α у нейронах за умов гіпоксії [187]. Було виявлено не лише ROS-опосередковану деградацію HIF-1 α

субодиниці, а й зниження рівня експресії HIF-1 α під час ішемії [188,189]. З іншого боку, ROS призводили до акумулювання HIF-1 α шляхом активації рівня експресії HIF-1 α , а також до індукції експресії еритропоєтину [190]. Чим обумовлені такі різноспрямовані ефекти залишається незрозумілим, як і молекулярні механізми, що їх опосередковують.

Мало дослідженням на сьогодні залишається також причинно-наслідковий зв'язок між HIF та внутрішньоклітинною сигналізацією, яка опосередковує спряженість сигнальних та ефекторних механізмів. Виявлено, що HIF-1 α потенціює утворення аденозину, що супроводжувалось зниженням входу Ca²⁺ у клітини [191–193]. Це свідчить, що HIF-1 α опосередковує внутрішньо-клітинні механізми зменшення кальцій-індукованої цитотоксичності. Генетичне пригнічення експресії HIF-1 α попереджувало глутаматну токсичність у клітинах HT22, в той час як активація HIF-1 α шляхом приєднання транскрипційного активатора VP16 навпаки сприяла розвитку глутаматної інтоксикації та загибелі нейронів [194,195]. З іншого боку, стабілізація субодиниці HIF-1 α інгібіторами проліл-гідроксилаз призводила до підвищення рівня виживання клітин [186].

Практична значимість досліджень HIF-індукованих клітинних механізмів; подальші перспективи. Молекулярні та внутрішньо-клітинні механізми роботи HIF та його генів-мішеней на даному етапі наукових досліджень містять більшу кількість запитань, ніж можуть запропонувати відповіді, проте саме у фундаментальному розумінні тонких аспектів регуляції цих механізмів та можливостей їх корекції прихована потенційна можливість терапевтичної та фармакологічної корекції ішемічного ураження мозку, яке згідно Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) займає друге місце за рівнем смертності після ішемії серця.

Комплексність і різноспрямованість HIF-опосередкованих клітинних ефектів істотно ускладнює порівняння наукових результатів та їх узагальнення. Різноманіття HIF-опосередкованих ефектів може обумовлюватися як різним ступенем ішемічного ураження, так і різноманіттям експериментальних моделей,

які застосовуються для наукових досліджень на різних рівнях. Крім того, дуалізм HIF-опосередкованої активації нейропротективних та проапоптичних механізмів демонструє, що така комплексність очевидно включає активацію не лише HIF-комплексу, а й інших факторів. Враховуючи це, особливу увагу варто приділити також пошуку партнерів HIF-1, активація яких індукує внутрішньоклітинні процеси клітинної адаптації до зміни кисневого гомеостазу. Важливо встановити так звану «точку відліку», де відбувається «перемикання» нейропротекторних механізмів на «сценарій» запрограмованого апоптозу, що становить головне завдання клінічних досліджень, метою яких є активація ендогенної нейропротекції для розробки лікувальної стратегії при ішемічному інсульті. Розуміння сигнальних шляхів, які опосередковують виживання чи загибель клітин при гіпоксичних станах, дає можливість стимулювати HIF-опосередковану нейропротекцію при ішемічних ураженнях мозку. В своїй роботі ми прагнули з'ясувати, які саме нейропротективні механізми і яким чином ці механізми можуть опосередковуватися HIF-1 в нейронах гіпокампа і чи саме вони лежать в основі попередження ураження нейронів при попередньому аноксичному прекодиціонуванні.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідження ішемічного ушкодження гіпокампа *in vitro* було обрано модельну біосистему - органотипову культуру гіпокампа щурів лінії Wistar (P7). Для виконання досліджень нами було використано наступні методи:

- виділення та культивування органотипових зрізів гіпокампа;
- моделювання ішемічного пошкодження – киснево-глюкозна депривація;
- моделювання аноксичного прекондиціювання;
- інгібування NIF-пролілгідроксилаз за допомогою 2,4-піридиндикарбоксильного оксиду діетилового естеру (ДПД);
- морфо-функціональна оцінка життєздатності органотипової культури гіпокампа за допомогою вітального барвника йодиду пропідію;
- ПЛР у реальному часі для оцінки рівня мРНК у поодиноких нейронах та в окремих зонах гіпокампа;
- флуоресцентне вимірювання концентрації іонізованого Ca^{2+} у цитоплазмі нейронів різних зон гіпокампа

2.1. Обґрунтування вибору об'єкта досліджень

Для дослідження ішемічного ураження розроблено багато моделей, які дозволяють варіювати параметрами тривалості та тяжкості ураження. Існують моделі ішемічного ураження як *in vivo* так і *in vitro* і всі вони мають свої плюси і мінуси, які враховуються дослідниками з урахуванням поставлених завдань. Роботи *in vivo* сьогодні базуються на проведенні судинної оклюзії розробленої ще в кінці 1980-х початку 1990-х рр. [196,197]. Ці роботи діляться на дві категорії – глобальна та фокальна ішемія. Глобальний ішемічний інсульт модулюють частіше за допомогою судинної оклюзії. Рідше повною зупинкою кровообігу мозку. Найчастіше

проводиться 4-х та 2-х судинна оклюзія в поєднанні з гіпотонією у щурів, і 2-х судинна у монгольських піщанок. Після широкого розповсюдження в дослідженнях світових лабораторій трансгенних мишей, 2-х судинну оклюзію стали застосовувати для вивчення наслідків ішемічного ураження на них [198,199]. Плюс до того існує повна глобальна ішемія, яка здійснюється шляхом накладання на шию тварини манжети [200,201], зупинки серця [82,202], чи лігування всіх артерій, що відходять від серця [203,204]. В цих моделях приплив крові до мозку дорівнює нулю, або $\approx 1\%$.

Судинну ж оклюзію часто називають "неповною ішемією" через часткове перекриття судин і залишковий кровоток. Повна ішемія протягом 10 хвилин у щурів, навіть без підтримки температури, спричиняє повне руйнування клітин в нейронах пірамідального шару CA1 зони через 7 днів [202].

Майже всі моделі фокальної ішемії, досліджуються на більших ссавцях, таких, як: коти [205], примати [248], більші гризуни, і здійснюються насамперед через оклюзію середньої мозкової артерії [197]. В деяких випадках лігували і сонну артерію. Ішемічне ураження отримане таким чином має певні відмінності. По-перше, навіть в безпосередньому місці ураження, кровоток завжди вищий ніж при глобальній ішемії, тому для отримання однакових ушкодження тривалість інсульту має бути вища. По-друге ураження неоднорідне від кору ішемічного ураження до його граничних ділянок. Через свою тривалість і неоднорідність інсульт набагато складніший, ніж при глобальній ішемії.

Для дослідження ішемічного ураження *in vitro* використовується кілька моделей: клітинні культури та зрізи мозку. Однією з найпоширеніших моделей для дослідження ішемічного та аноксичного ураження *in vitro*, є зрізи гіпокампа [73,74,82,206,207]. Для моделювання інсульту в цих умовах повітряне середовище в якому перебувають зрізи заміщується з O_2/CO_2 на N_2/CO_2 . Якщо в рідкому середовищі залишають глюкозу, то ураження називається гіпоксією (аноксією), у разі заміщення чи

елімінації глюкози, інсульт називають киснево-глюкозна депривація чи ішемія *in vitro*. Використання органотипової культури гіпокампа для дослідження ішемічного ураження дозволяє вивчати відстрочену смерть [208,209]. Хоча цим переваги використання органотипових зрізів гіпокампа не вичерпуються. Однією з особливостей зрізів гіпокампа є здатність зберігати цитоархітектоніку, характерну для цілого органу, зберігається не лише клітинний склад, а й зв'язки клітин між собою та функціональна діяльність. Органотипова культура гіпокампа дозволяє здійснювати прямі безпосередні хірургічні маніпуляції, в нашому випадку, це і ізоляція поодиноких нейронів і хірургічне виокремлення зон гіпокампа для подальшого дослідження. До зрізів зберігається прямий доступ і внесення змін до середовища культивування, також не становить труднощів. На відміну від гострих зрізів гіпокампа, життєздатність і придатність органотипових зрізів для проведення подальших експериментів набагато довша, що дозволяє досліджувати не лише гострі зміни після проведення експерименту, а й відстрочені реакції. Дані, отримані у дослідженнях, що проводилися на органотиповій культурі гіпокампа, співставні з такими, що проводилися *in vivo* [79].

2.2. Виділення та культивування органотипових зрізів гіпокампа

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

Для отримання органотипової культури гіпокампа використовували щурів лінії Wistar 7-денного віку. За допомогою ножиць проводилася декапітація 7-денних щурів, мозок обережно видаляли з черепної коробки та перекладали в попередньо охолоджене середовище виділення. Сагітальним розтином через Sulcus Inter-hemisphericum мозок розділяли на

дві півкулі. Делікатно відсікали таламус та базальні ганглії, розташовані над гіпокампом, знімали м'яку мозкову оболонку та виділяли гіпокамп (рис. 2.2). Далі робили перпендикулярні зрізи гіпокампа використовуючи спеціальний прилад для нарізання тканинних зрізів – чопер (McIlwain tissue chopper, Англія).

Товщина зрізів становила 300-400 мкм. За допомогою обрізаної пастерівської піпетки зрізи переносилися до чашки Петрі з середовищем виділення. Під візуальним контролем за допомогою мікроскопа ретельно відбиралися зрізи, що не мали ніяких ознак ушкодження для подальшого культивування. Відібрані зрізи розташовували на проникній мембрані (рис. 2.1) по чотири в одній лунці 6-лункового планшету. Культивування зрізів гіпокампа проводилося за методом Stoppini, коли тканина розташована на межі поживного рідкого та газового середовища [210]. Плашку ставили до CO₂-інкубатору зі збалансованою концентрацією CO₂ (5%) у повітрі та температурою 37°C.

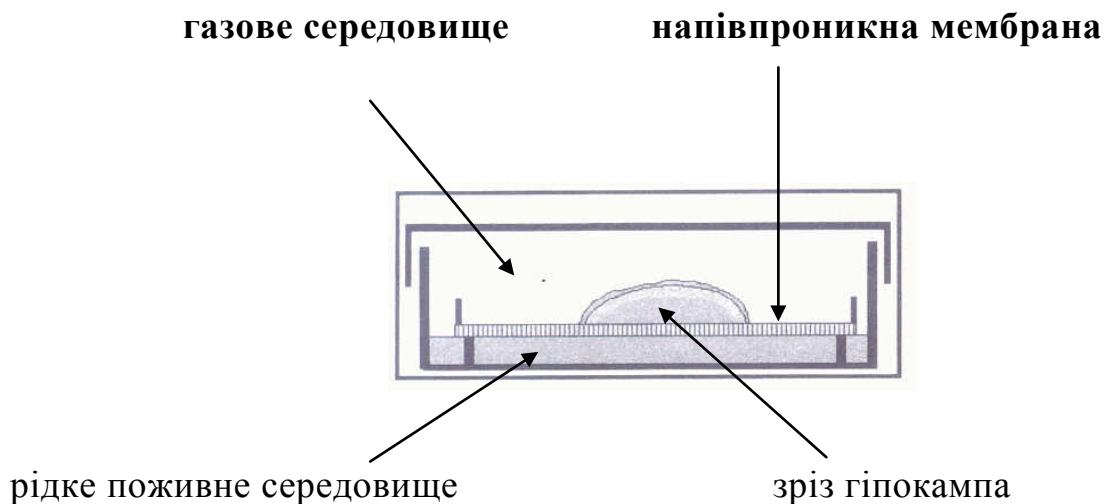


Рис. 2.1. Зріз гіпокампа на напівпроникній мембрані

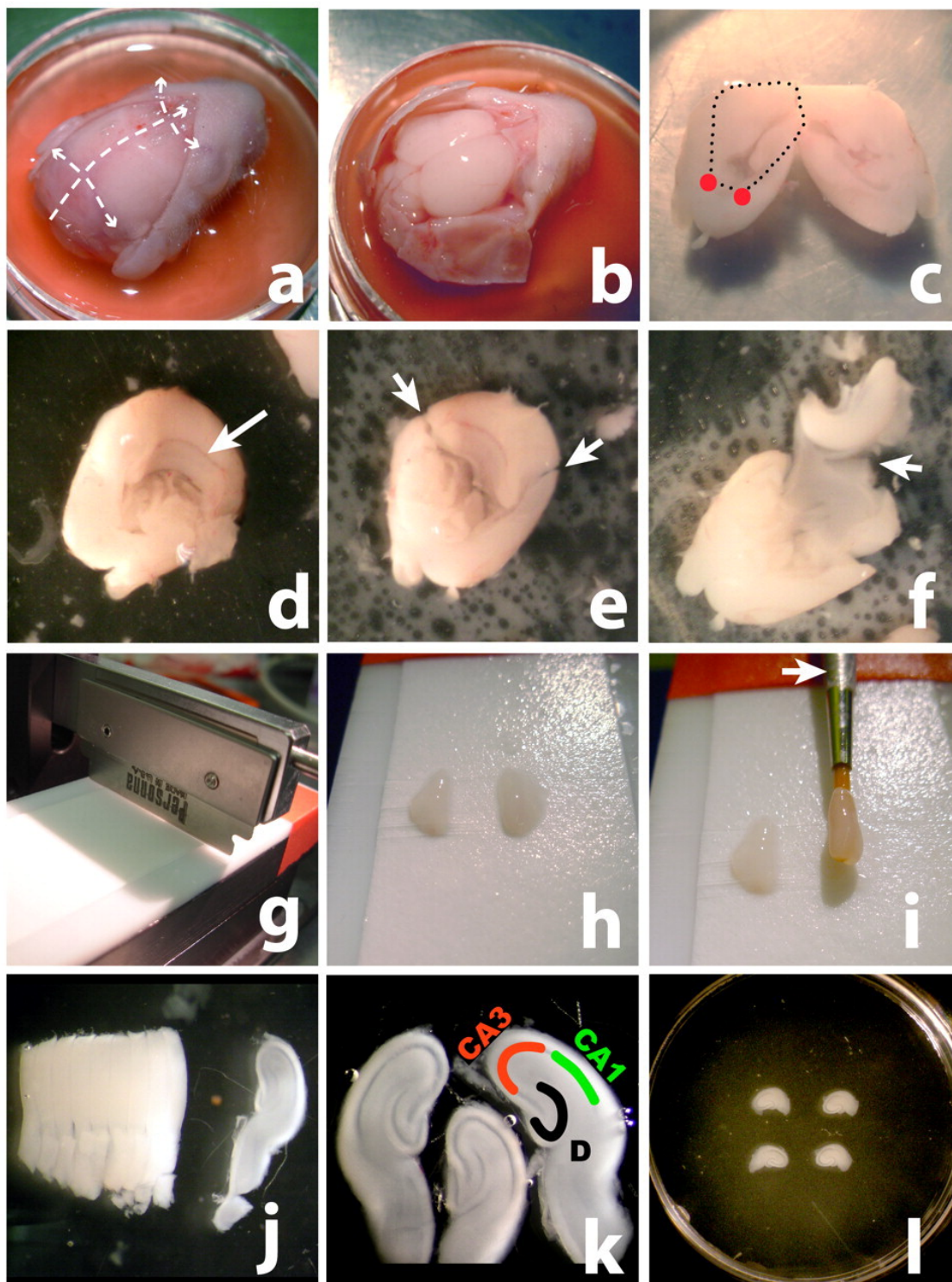


Рис. 2.2. Хід експерименту з виділення органтипових зрізів гіпокампа з мозку щура (а-с – виділення та підготовка мозку, d-f – виділення гіпокампа, g –налаштування чоперу, h – нарізання зрізів гіпокампа, i – перенесення у свіже середовище виділення, j – розділення та очистка зрізів гіпокампа, k-l – відокремлення зрізів та посадка [211])

Середовище культивування змінювалось наступного дня та надалі двічі на тиждень. Розвиток культивованих зрізів контролювався з допомогою інвертованого світлового мікроскопа Zeiss Telaval 31. На 12-14 день зрізи були готові для проведення експерименту.

Маніпуляції, пов'язані з отриманням тканинного матеріалу для органотипової культури, а також наступні процедури зміни середовища та культивування проходили у стерильних умовах. Середовища виділення та культивування стерилізували, використовуючи фільтри Millipore Steritor SCGPT05RE з діаметром пор 0,22-мкм та зберігали при температурі -20°C кілька місяців.

Культивування проводилося у 6-лункових планшетах, використовуючи додатково спеціальні вкладиші з проникною мембраною, яка забезпечує проходження через неї розчинних речовин. Один мілілітр середовища культивування додавався в кожен лунку. Стерильні проникні вкладиші діаметром 30 мм та з розмірами пор 0,4 мкм (Millicell-CM, Millipore) були розташовані в кожній лунці та змочувалися середовищем культивування. Планшет залишали в CO_2 інкубаторі не менш ніж на 1 годину для стабілізації температури (37°C) та pH середовища культивування, до того часу, коли на них будуть розташовані зрізи.

2.3. Експериментальна модель ушкодження

Було розроблено модель експериментальних впливів для дослідження впливу КГД, АПК, додавання блокатора ДПД та їхньої комбінації (рис. 2.3).

Перед проведенням КГД вкладиші з органотиповою культурою гіпокампа двічі відмивали в HBSS від глюкози. Для моделювання ішемічного ушкодження культуру переносили в чашку Петрі з 1 мл середовища для КГД та розміщували у спеціальній камері, в якій повітря було замінено газовою сумішшю ($95\%\text{NO}_2/5\%\text{CO}_2$). Після проведення КГД зрізи поверталися до нормальних умов культивування в середовище на 4

години (нормоксична реоксигенація) після чого проводилися наступні дослідження та маніпуляції.

Інгібітор HIF-пролілгідроксилази ДПД за відсутності наступного проведення КГД додавався в культуру на 5 год в кінцевій концентрації 5 μM . За умов комбінування з 30 хв КГД, блокатор додавався до середовища культивування за 30 хв до проведення КГД (концентрації 5 μM) на період проведення КГД та реоксигенації (4 год), концентрація ДПД підтримувалася на рівні 5 μM .

Контроль

КГД

АПК

АПК+КГД

ДПД

ДПД+КГ

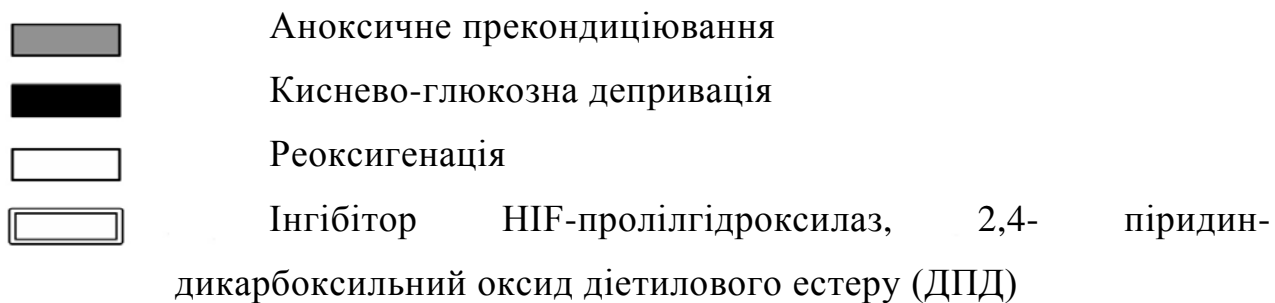


Рис. 2.3. Алгоритм проведення експерименту

Підбір оптимальної моделі АПК відбувався емпірично, шляхом варіювання тривалості АПК та кратності проведення (рис. 2.4). Було досліджено вплив 2 хв та 5 хв АПК, яке проводилося наступним чином: зрізи переносили в чашку Петрі без заміни середовища культивування та

розміщували у спеціальній камері, в якій повітря було замінено газовою сумішшю (95%NO₂/5%CO₂) на 2 та 5 хвилин відповідно. Було проведено 1-, 2- та 3-кратне АПК. При 1-кратному АПК (2 та 5 хв), зрізи через 12 годин інкубування в CO₂-інкубаторі забиралися для наступних експериментів. За умов 2-х кратного АПК (2 та 5 хв), через 12 год повторно проводилося АПК, та наступне 12-годинне інкубування за норм умов, після чого проводилися наступні експерименти. 3-х кратне АПК проводилося за аналогією, зрізи поміщалися у спеціальній камері, в якій повітря було замінено газовою сумішшю (95%NO₂/5%CO₂) на 2 або 5 хвилин, потім 12 годин інкубування в CO₂-інкубаторі, і так тричі. Після останнього 3 АПК з 12 год інкубування в CO₂-інкубаторі зрізи відбиралися для наступних досліджень.

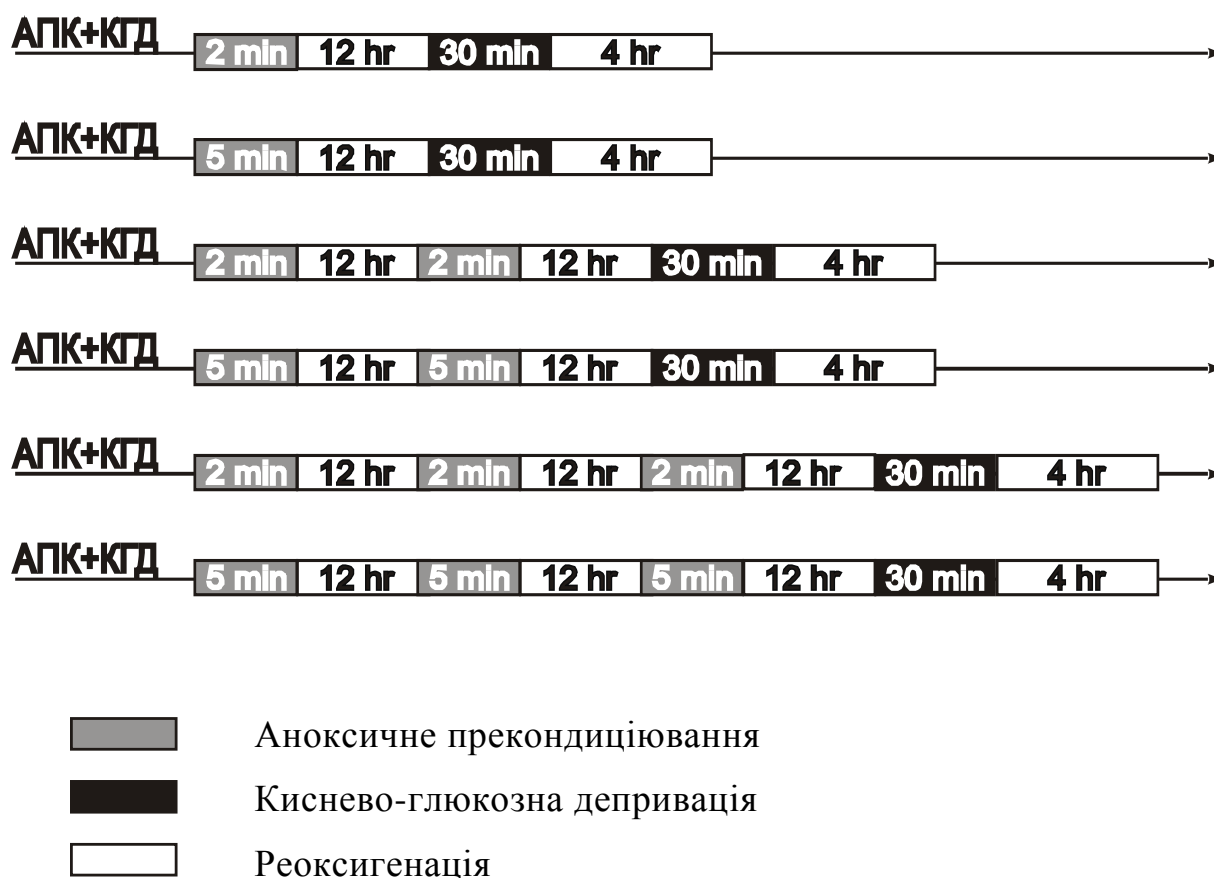


Рис. 2.4. Алгоритм підбору оптимальної моделі проведення АПК

2.4. Морфофункціональна характеристика життєздатності органотипової культури гіпокампа за допомогою йодиду пропідію (ПЙ)

Поглинання клітинами йодиду пропідію (ПЙ) використовувалось для оцінювання рівня ушкодження клітин в культурі гіпокампальних слайсів. [212–214]. ПЙ стійкий флюоресцентний барвник, що проникає в клітину через пошкодження плазматичної мембрани. Потрапивши в клітину ПЙ взаємодіє з ДНК, після взаємодії з ДНК флуоресценція ПЙ зростає на 20-30-порядків, у зв'язку з чим пошкоджені клітини забарвлюються в червоний колір. ПЙ (кінцева концентрація 2μM) додавався до середовища культивування на 15-20 хв. після проведення експериментального впливу.

Зображення отримували за допомогою стандартного флюорисцентного мікроскопу обладнаного родаміновим фільтром (XSP-139A-TP, China) і цифровою камерою (Canon Power Short G-6). Кількість ПЙ-позитивних клітин в CA1 та CA3 зонах підраховували в межах площі фіксованого розміру (0.5 мм²).

2.5. Проведення кількісного ПЛР-анлізу в реальному часі поодиноких нейронів гіпокампа

Для дослідження рівня експресії факторів, що індукуються гіпоксією проводилася полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі поодиноких нейронів.

Отримання проб для ПЛР поодиноких нейронів CA1 та CA3 зон гіпокампа у реальному часі відбувалося наступним чином: клітина засмоктувалася в мікропіпетку (10–20 μm), яка вміщувала 4 мкл внутрішньоклітинного розчину, використовуючи мікроманіпулятор під видимим світлом світлового мікроскопа (x200) (рис. 2.5) і для проведення зворотної транскрипції (ЗТ) переносилася у спеціальний буферний розчин для забору поодиноких нейронів (див. розділ 2.8 розчини та реактиви,

розчин №3). Зрізи були попередньо пофарбовані ПЙ, щоб уникнути екстракції ушкоджених клітин.

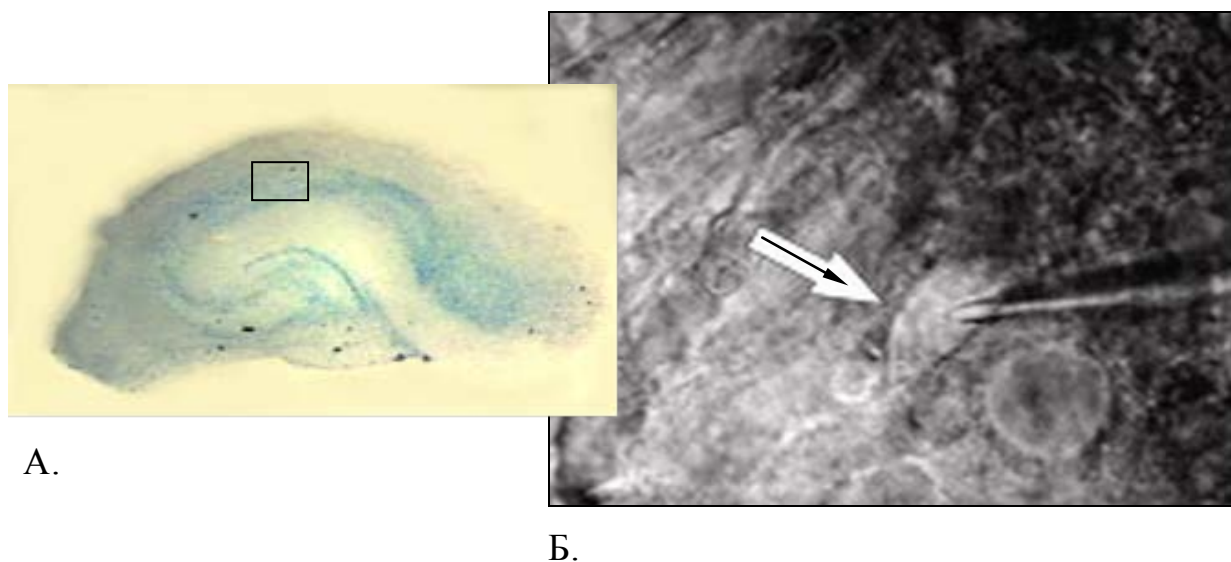


Рис. 2.5. Виділення поодиноких нейронів гіпокампа А. Нативний органотиповий зріз гіпокампа забарвлений толуїдиновим синім Б. Екстракція нейрону СА1 зони за допомогою мікропіпетки.

Проби зберігалися при температурі 4°C протягом 3-4 год, після чого одночасно до всіх зразків додавали 20 ОД М-MuLV зворотної транскриптази („Fermentas”, Литва), та інкубували проби протягом 2 год при температурі 37°C. Отриману таким чином одноланцюгову кДНК поодиноких клітин гіпокампа використовували для проведення двох раундів ПЛР із застосуванням праймерів для HIF-1 α , HIF-3 α та гена β -актину (внутрішній контроль) послідовності наведені у таблиці. (**Таблиця 2.1**).

При проведенні другого раунду ПЛР в окремі пробірки додавали по 4 мкл продукту першого раунду мультиплексної ПЛР (див. розділ 2.8 розчини та реактиви, розчин №4). Перший раунд ампліфікації складається з 15 циклів з наступними етапами:

- денатурація – 94°C, 60 с ;
- приєднання праймерів – 58°C, 80 с;
- елонгація – 62°C, 60 с;

ПЛР проводилася в термоциклері GeneAmp System 2700 (“Applied Biosystems”, США). Аналіз отриманих даних проводився за допомогою 7500 Fast Real-time PCR Software.

Таблиця 2.1.

Послідовність інтронстягуючих праймерів для HIF-1 α , HIF-3 α , β -actin та Neuron specific enolase (NSE/ENO2 - Enolase 2 (Gamma, Neuronal))

Ген	Послідовність	ПЛР р.п.	Кат. № ген. Банку
HIF-1 α	5'-AGAAACCGCCTATGACGTG-3' 5'-CCACCTCTTTTGTGCAAGCAT-3'	301	AF057308
HIF-3 α	5'-AGAGAACGGAGTGGTGCTGT-3' 5'-ATCAGCCGGAAGAGGACTTT-3'	301	NM_022528
β -actin ACTB	5'-AACCTAAGGCCAACCGTGAAA-3' 5'-TCATGAGGTAGTCTGTCTCAGGTC-3'	300	NM_031144.3
NSE (ENO2)	5'-TGTGGTGGAGCAGGAGAAGC-3' 5'-GATGCATCGGGAAGGGTCAG-3'	564	AF019973

Продукт першого раунду ПЛР використовували для кількісної оцінки експресії відповідних генів за допомогою 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, США). Суміш для ампліфікації складалася з 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, США) та 30 пМ відповідних праймерів. Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації починалася після попередньої активації AmpliTaq ДНК-полімерази протягом 10 хв при 94°C та складалася з 40 циклів:

- денатурація - 94°C, 15 с,
- приєднання праймерів та елонгація - 60°C, 1 хв.

Для контролю за специфічністю флуоресценції продукту ампліфікації додавали стадію дисоціації: послідовне підвищення температури від 60 до 94°C із реєстрацією падіння інтенсивності флуоресценції комплексів двохланцюгових ДНК з SYBR Green.

Ампліфікат розділяли в 2.5%-вому агарозному гелі, що вміщував бромистий етідій. Візуалізація ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (170 В протягом 40 хв) проводилися за допомогою транслюмінатора та камери ViTran („Біоком” РФ).

2.6. Проведення кількісного ПЛР-аналізу в реальному часі окремих CA1 та CA3 зон гіпокампа

Зрізи гіпокампа переносилися в робочу зону під хірургічним бінокляром, де під видимим світлом на збільшенні x7, відбиралася окремо тканина з відповідної зони (рис. 2.6). З допомогою пластикових піпеток тканина переносилася в пробірки, в яких містилося 0,3 мл розчину innuSOLV RNA (Analytic Jena, Германія) для наступного виділення РНК.

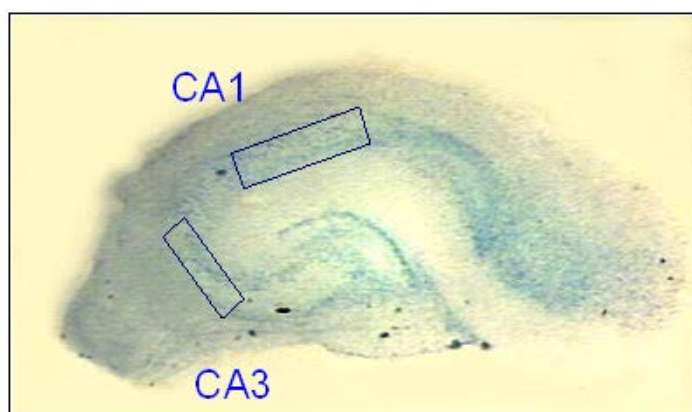


Рис. 2.6. Виділення окремих зон гіпокампа з органотипового зрізу.

Виділення РНК: проби інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв; додавали 0,1 мл хлороформу і суспендували вміст пробірки на вортексі протягом 10 сек; інкубували на льоду 3-10 хв; центрифугували на 13 500 x g (14 000 rpm) при температурі 4° C 5 хв до розділення проби на фази: червона фаза на дні – органічна фаза, біла – середня фаза, і найвища –

прозора, водна фаза; РНК знаходиться і найвищій прозорій водній фазі, ДНК та білки знаходяться в проміжній фазі. Водна фаза займає 60% загального об'єму проби; обережно відбиралася водна фаза в нову пробірку для центрифугування; додавали 0,15 мл ізопропанолу; інкубували пробу за температури 4° С 15 хв; центрифугували на максимальній швидкості за температури 4° С 10 хв.; обережно відбирали супернатант та додавали в пробірку 0,3 мл 75% етанолу, центрифугували 10 хв на 13 500 об. за хв.; пункт 10 повторювали двічі; відбирали 75% спирт та підсушували осад за температури 65° С 5-10 хв.; додавали 30 мкл деіонізованої води та суспендували пробу на вортексі 15-20 с. залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв, та ще раз суспендували; виділену РНК зберігали при температурі -70 ° С або використовували негайно. Концентрація та якість отриманої РНК вимірювалася за допомогою NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. USA).

Зворотня транскрипція проводилася з використанням M-MuLV зворотної транскриптази (див. розчини та реактиви, розчин №5 „Fermentas”, Литва). Отриману таким чином одноланцюгову кДНК тканин різних зон гіпокампа використовували для проведення кількісної реакції ПЛР у реальному часі із застосуванням праймерів для SERCA-2b, SERCA 3, PMCA1, PMCA2 та гену β -актину (внутрішній контроль), послідовності яких наведені у таблиці. (Таблиця 2.2)

Таблиця 2.2.

Послідовності праймерів для SERCA-2b, SERCA 3, PMCA1, PMCA2 та гена β -актину

Ген	Послідовність	ПЛР р. п.	Кат. № ген. Банку
SERCA2b	5'-AAACCCTCCTGCTCCCTGTC-3'	90	AF043106.1
ATP2A2	5'-GCTCTAGACCCAGACCACCAG-3'		

SERCA3	5'-ACTCAGCCACCTGTCTCCTG-3'	109	NM_012914.1
ATP2A3	5'-CCAGAGCTGTAGGGAGGACA-3'		
β-actin	5'-AAGTCCCTCACCTCCCAAAAG-3'	97	V01217.1
ACTB	5'-AAGCAATGCTGTCACCTTCCC-3'		
PMCA-1	5'-ACGTTAACACACTAGCCGCA-3'	83	NM053311.1
ATP2B1	5'-AAGAACGCCATCTTGTCCGT-3'		
PMCA-2	5'-CTCTGCTCCTGAGGAAACCTTA-3'	101	NM012508.5
ATP2B2	5'-GATGAGGGTTAGCTGGTAGACG-3'		

Суміш для ампліфікації складалася з 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, США), 0,25 мкл (25 пМ) відповідних праймерів (1,25 пМ/мл). Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації починалася після попередньої активації AmpliTaq ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95°C: денатурація - 95°C, 15 с, приєднання праймерів та елонгація - 62°C, 1 хв.

Для контролю за специфічністю продукту ампліфікації додавали стадію дисоціації: послідовне підвищення температури від 60 до 94°C із реєстрацією падіння інтенсивності флуоресценції комплексів двохланцюгових ДНК з SYBR Green.

2.7. Визначення $[Ca^{2+}]_i$ у цитоплазмі нейронів різних зон органотипової культури гіпокампа

Для визначення кількісної зміни $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах використовують високоафінний Ca^{2+} -барвник фура-2. Оскільки фура-2/АМ практично нерозчинний у воді, ми попередньо готували маточний розчин барвника (1 ммоль/л) у диметилсульфоксиді. Розчин зберігали у замороженому вигляді протягом кількох місяців без погіршення властивостей барвника.

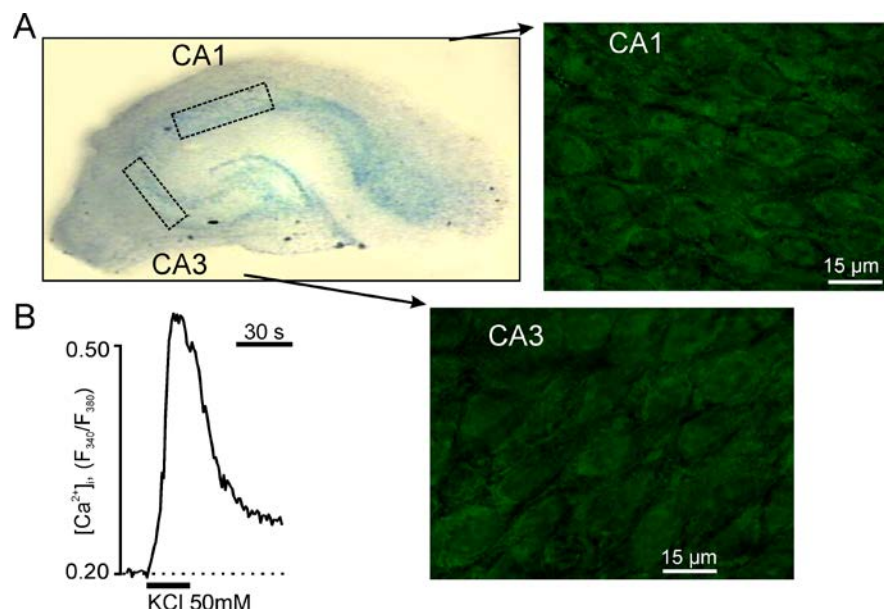


Рис. 2.7. Реєстрація концентрації іонізованого кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) у цитоплазмі нейронів CA1 та CA3 зони органотипових зрізів гіпокампа. А – зйомка CA1 та CA3 зон органотипових зрізів гіпокампа під час проведення запису концентрації вільного цитозольного кальцію $[Ca^{2+}]_i$ у правому верхньому куті флуоресцентне зображення Фура2/АМ нейронів CA1 зони (вгорі) та CA3 зони (знизу) шкала = 15 μm В – репрезентативний трек індукованих деполяризацією плазматичної мембрани змін у $[Ca^{2+}]_i$, записаних в нейронах гіпокампа.

Для введення Ca^{2+} -чутливого зонду в нейрони гіпокампа до середовища культивування додавався барвник фура-2/АМ у концентрації 5 мкмоль/л за наявності детергенту плуронік F-127 (0,02 %). Неіонний детергент плуронік F-127 забезпечує підтримання гідрофобних молекул фура-2/АМ у вигляді мікродисперсної емульсії, що прискорює їх проникнення у клітину. Фарбування проводили протягом 60 хв при 35°C. Експерименти проводилися протягом 1 години після завантаження барвника фура-2/АМ (рис. 2.7).

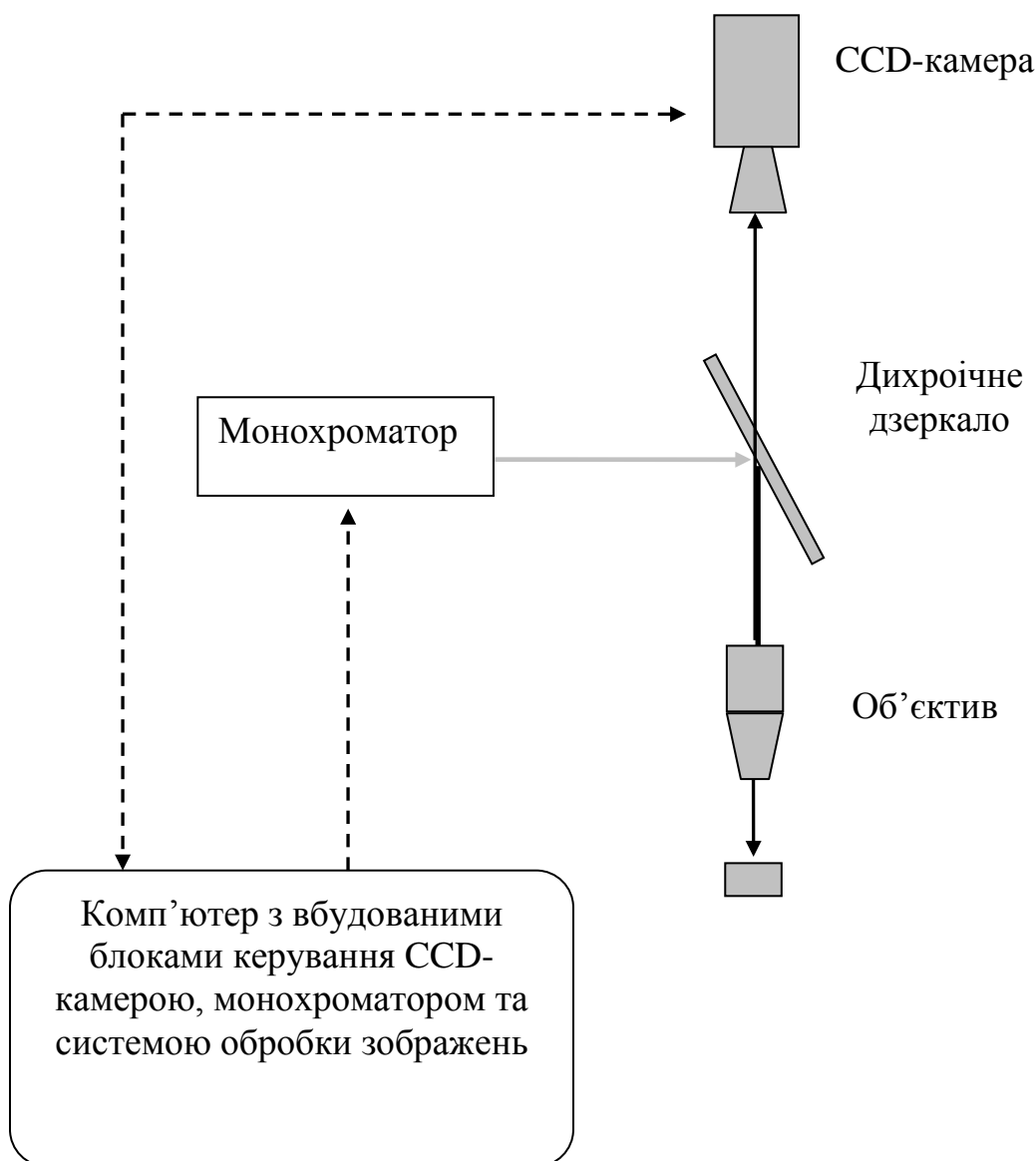


Рис. 2.8. Принципова схема експериментальної установки для двохвильового вимірювання концентрації іонізованого кальцію.

Флуоресцентний сигнал реєстрували у пірамідальних нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа, розташованих на відстані 30-100 μm від поверхні, використовуючи водо-імерсійний об'єктив (60x, Ч.А. 0,9, Olympus, Японія) та 12-бітну CCD камеру (рис. 2.8., 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 $[Ca^{2+}]_i$ у нейронах виражали як зміну інтенсивності флуоресценції сигналів на обох хвилях збудження барвника ($\Delta F340/F380$), що пропорційно зміні $[Ca^{2+}]_i$. Окремо було проведено серію експериментів для визначення рівня автофлуоресценції у органотиповій культурі, яку вираховували із експериментальних реєстрацій $[Ca^{2+}]_i$. Для цього зрізи не фарбували флуоресцентним барвником і реєстрували автофлуоресценцію тканини на обох хвилях збудження барвника фура-2/АМ. Для дослідження функціонування внутрішньоклітинних депо Ca^{2+} використовували селективний блокатор SERCA тапсигаргін, а також кофеїн, який активує Ca^{2+} індуковане вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних органел.

2.8 Розчини та реактиви:

1. Середовище виділення гіпокампа (рН середовища - 7,3):

- 50% мінімального поживного середовища MEM (Gibco, Велика Британія);
- 5 ммоль Tris (Sigma, США);
- 2 ммоль $NaHCO_3$ (Gibco, Велика Британія);
- 12,5 ммоль HEPES (Gibco, Велика Британія)
- 15 ммоль D-глюкози (G-7021, Sigma);
- 100 од.д./мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину (Gibco, Велика Британія)
- 25 % сольового розчину HBSS (Gibco, Велика Британія);
- 25% деіонізованої води.

2. Середовище для культивування зрізів гіпокампа (рН середовища - 7,2):

- 50% мінімального поживного середовища MEM (Gibco, Велика Британія);
- 2,5 ммоль Tris (Sigma, США);
- 2 ммоль $NaHCO_3$ (Gibco, Велика Британія);
- 12,5 ммоль HEPES (Gibco, Велика Британія);

- 15 ммоль D-глюкози;
- 100 од.д./мл пеніциліну; 100 мг/мл стрептоміцину (Gibco, Велика Британія);
- 25 % кінської сироватки (Gibco, Велика Британія);;
- 25 % сольового розчину HBSS (Gibco, Велика Британія);.

3. Буферний розчин, для забору поодиноких нейронів гіпокампа та проведення ПЛР в реальному часі (у мілімолях на літр):

- 50 Tris-HCl (Sigma, США);
- 50 KCl (Sigma, США);
- 4 MgCl₂ (Sigma, США);
- 40 ДТТ(Sigma, США);
- 40 ОД суміш чотирьох нуклеотидфосфатів („Fermentas”, Литва);
- 0.2 мкг випадковий гексамерний праймер („Fermentas”, Литва);

4. Ампліфікаційна суміш для проведення ПЛР в реальному часі поодиноких нейронів гіпокампа:

- 5 мкл п'ятикратного PCR-буферу з NH₄CL;
- 2.5 mM MgSO₄;
- 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидфосфатів („Fermentas”, Литва);
- по 5 пМ кожного з праймерів для першого раунду або 20 пМ однієї з пар праймерів при проведенні другого раунду та 0.5 ОД рекомбінантної Taq-полімерази („Fermentas”, Литва).Об'єм зразка доводили до 25мкл деіонізованою водою.

5. Ампліфікаційна суміш для проведення зворотної транскрипції різних зон гіпокампа:

- 4 мкл п'ятикратного PCR-буферу з NH₄CL (Fermentas, Lithuania);
- 20 u RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas, Lithuania) інгібітор РНКаз;
- 1 мМ суміші чотирьох нуклеотидфосфаті („Fermentas”, Литва);
- 0.9 мкл M-MuLV зворотної транскриптази („Fermentas”, Литва)

- 0.2 мкг random hexamer primer („Fermentas”, Литва);
- та 4 мкл загальної РНК;
- об’єм зразка доводили до 19,4 мкл деіонізованою водою.

Розчини та реактиви для визначення $[Ca^{2+}]_i$ у цитоплазмі нейронів різних зон органотипової культури гіпокампа:

4.ACSF x10

- 124 ммоль NaCl(Sigma, США);
- 1,6 ммоль KCl(Sigma, США);
- 24 ммоль KH_2PO_4 (Sigma, США);
- 1,2 ммоль $NaHCO_3$ (Sigma, США);
- 2 ммоль Аскорбінова кислота(Sigma, США);
- 246,5 ммоль $MgCl_2$ (Sigma, США);
- 180,2 Глюкоза(Sigma, США);

5.K-50 (ACSF)

- 124 ммоль NaCl(Sigma, США);
- 1,6 ммоль KCl(Sigma, США);
- 24 ммоль KH_2PO_4 (Sigma, США);
- 1,2 ммоль $NaHCO_3$ (Sigma, США);
- 2 ммоль Аскорбінова кислота(Sigma, США);
- 246,5 ммоль $MgCl_2$ (Sigma, США);
- 2,5 ммоль $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma, США);
- 180,2 Глюкоза(Sigma, США);

2.9. Статистична обробка результатів

Подальшу обробку і представлення результатів, включаючи статистичний аналіз, проводили за допомогою електронних таблиць “Excell 2007” (“Microsoft corporation” США), побудову графіків – за допомогою програми “Origin Pro8” (“OriginLab Corporation” США).

Дані було досліджено на нормальність за допомогою тесту Шапіро-Вілکا. Групи даних порівнювалися з використанням непараметричного

статистичного аналізу Манна-Уїтні U-test, у разі не нормального розподілу, результати було представлено у вигляді медіани з діапазоном вірогідностей (МКР), n – відповідає кількості проаналізованих клітин. Для порівняння розподілу двох вибірок експресії генів для будь якого підтипу Ca^{2+} -АТФаз використовувався тест Колмогорова-Смірнова. Для порівняння більше ніж двох експериментальних груп застосовували тест Крускала-Уолеса – Н-тест, та one-way ANOVA дисперсійний аналіз. За умов нормального розподілу, результати представлені як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середньої (SEM); розміри вибірки усереднення подані в дужках. Для визначення статистичної вірогідності різниць між середніми значеннями у групах даних використовували парний чи непарний t-критерій Стьюдента. Рівень статистичної достовірності позначали наступним чином: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

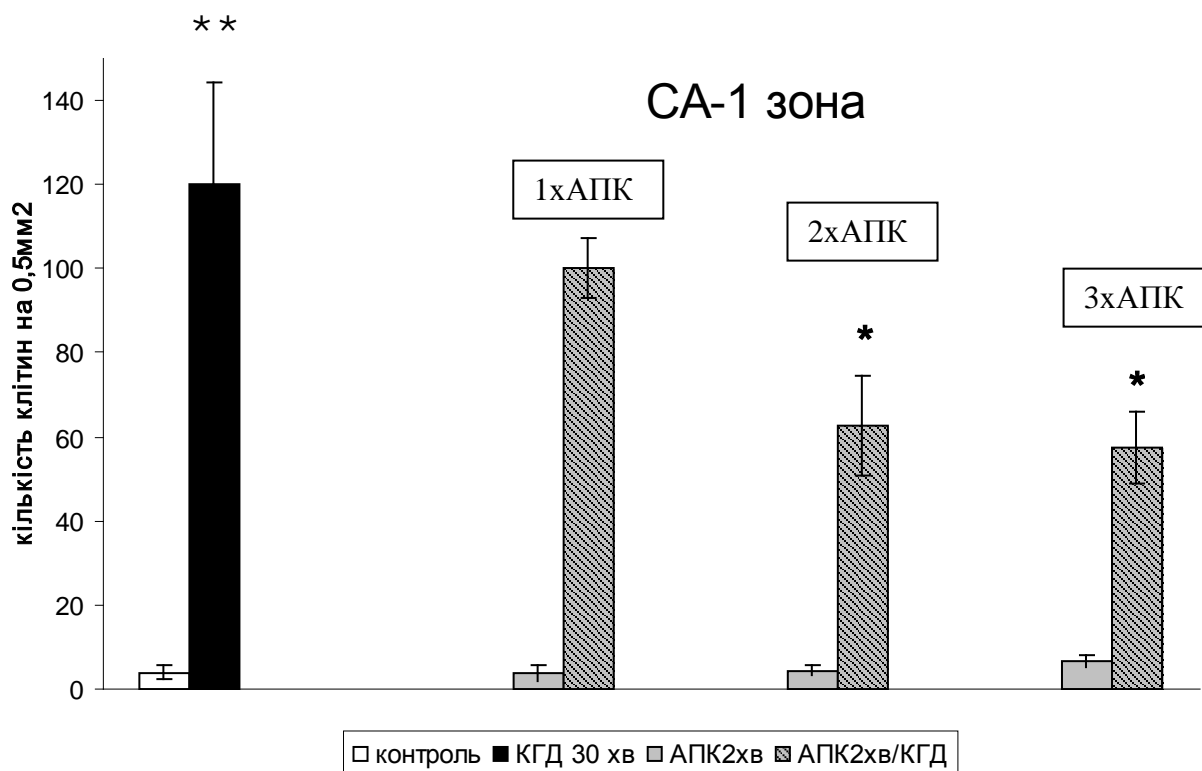
3.1. Розробка оптимальної моделі попереднього нейропротективного АПК в поєднанні з КГД

Для проведення експериментальних досліджень використовувалася органотипова культура гіпокампа, яка вирощувалася за методом Stoppini [210]. Культивування проводилося протягом 12-14 діб, за цей проміжок часу зрізи гіпокампа максимально очищувалися від ушкоджених під час виділення клітин і стабілізувалися, зменшувалася товщина зрізів від 300-400 мкм до 100-150 мкм. Зрізи зберігали характерну архітектуру та типовий склад клітин і були готовими до подальших досліджень. В органотипових зрізах гіпокампа залишається незмінним склад клітин: наявні пірамідні та гранулярні нейрони, інтернейрони, гліальні клітини. На зрізі органотипової культури можна відмітити, що кілька шарів нейронів (3-5) розташовуються в середині і оточені гліальними клітинами, що підтримують трофічну та захисну функцію, і сприяють фіксації зрізів до напівпроникної мембрани.

Життєздатність нейронів гіпокампа за умов моделювання експериментальних впливів (КГД, АПК ДПД та їх комбінації) оцінювалася шляхом підрахунку кількості ПЙ-позитивних клітин на одиницю площі 0,5 мм² (рис. 3.1.- 3.2).

Модель АПК було підібрано для даного об'єкту емпірично. Проведено експерименти з використанням 2-хвилинної та 5-хвилинної АПК одно-, дво-, чи трикратної на контрольних зрізах та на зрізах з наступним проведенням КГД. Отримані результати показали, що в контрольних умовах, без АПК та КГД, кількість ПЙ-позитивних клітин залишалася стабільно низькою як в СА1 так і в СА3 зоні гіпокампа (СА1 – $4,2 \pm 0,8$, СА3 – $2,8 \pm 1,1$) рис. 3.1. Після проведення КГД, кількість ПЙ-позитивних клітин значною мірою зростала, в СА1 зоні на 25 разів ($107,2 \pm 9,2$), а в СА3 на 12 ($55,6 \pm 5,7$), що

показує значно вищу чутливість до ішемічного ушкодження СА1 зони в порівнянні з СА3.

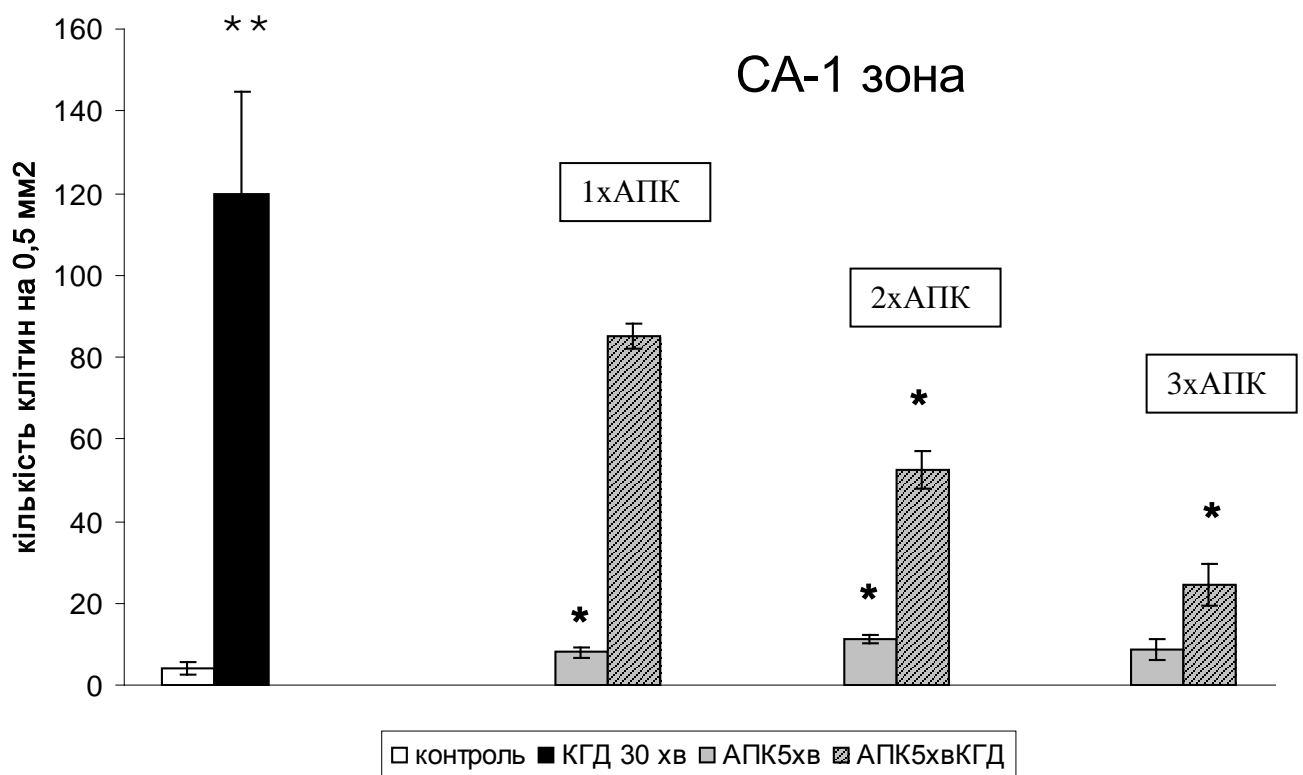


* – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

** – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,01$)

Рис. 3.1. Кількість ПЙ-позитивних клітин на 0,5 мм² в СА1 зоні гіпокампа після проведення 2 хв. АПК, та при комбінуванні 2 хв. АПК з наступним КГД

Без проведення додатково КГД двохвилинне АПК на зрізах не зумовлювало достовірну зміну рівня ушкоджених клітин ні у випадку однократного, дво- чи трикратного повторення (1хАПК – $3,8 \pm 1,9$, 2хАПК – $4,5 \pm 1$, 3хАПК – $6,5 \pm 1,5$ кл/мм²). Двохвилинне АПК в поєднанні з наступною КГД вело до статистично достовірного зниження ушкоджених клітин у випадку двократного та трикратного проведення АПК.



* – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

** – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,01$)

Рис. 3.2. Кількість ПЙ-позитивних клітин на мм² в СА1 зоні гіпокампа після проведення 5 хвилинного АПК, та при комбінуванні АПК з КГД

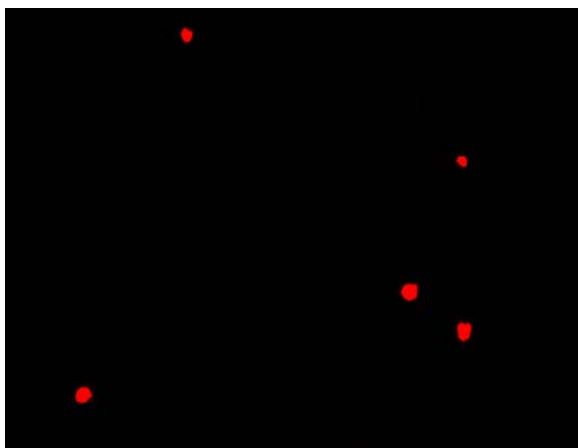
Зниження кількості ушкоджених клітин мало лінійний характер, так наприклад, якщо у випадку однократного повторення зниження кількості ушкоджених клітин ($100 \pm 7,1$ кл/мм²), було не достовірно в порівнянні з експериментом без АПК, а лише з КГД, то вже при двократному АПК кількість ушкоджених клітин статистично достовірно знижувалася не лише до експерименту з КГД, а й до комбінування однократного АПК з КГД ($62,5 \pm 11,8$ кл/мм²), трикратне АПК також вело до зниження кількості ушкоджених клітин ($57,5 \pm 8,5$ кл/мм², див. рис. 3.2).

Одно-, дво- та трикратне п'ятихвилинне АПК вело до незначного зростання кількості ушкоджених клітин (1хАПК – $8 \pm 1,4$, 2хАПК – $11 \pm 2,8$, 3хАПК – $5 \pm 2,6$ кл/мм²). В поєднанні з КГД, двократне та трикратне АПК обумовлювало статистично достовірне зниження кількості ушкоджених клітин в СА1 зоні (2хАПК – $52,5 \pm 4,8$, 3хАПК – $24,5 \pm 5,0$ кл/мм²), в порівнянні з 2 хвилинним дія 5 хвилинного АПК носила яскравіший і вираженіший характер. Поодинокі 5 хвилинне АПК як і 2 хвилинне не вело до статистично достовірного зниження кількості ушкоджених клітин ($85 \pm 2,9$ кл/мм², рис. 3.2)

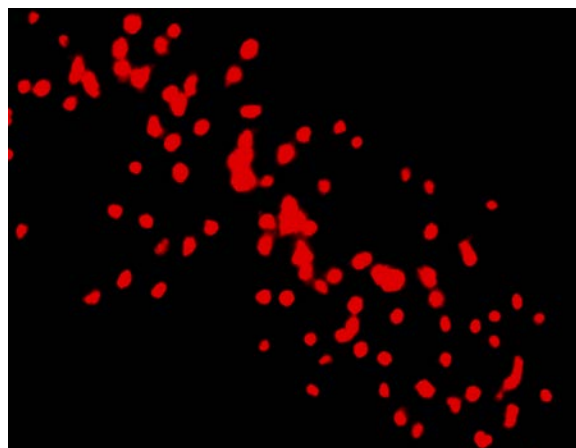
Комбінування АПК з КГД достовірно знижувало кількість ушкоджених клітин. Цей ефект лінійно зростав з кожною наступною експозицією АПК – від недостовірного при однократному АПК до достовірних змін при дво- та трикратному АПК. Крім того повторення 5 хвилинного АПК показало себе ефективнішим ніж таке саме повторення 2 хвилинного АПК. Найбільш ефективним виявилось триразове повторення АПК тривалістю в 5 хвилин, воно не призводило до достовірного зростання рівня ушкоджених нейронів у випадку проведення лише АПК, а в комбінації з КГД обумовлювало зниження рівня ушкодження нейронів на 3 порядки. Цей ефект виявився в 1,7 разів кращим за такий же ефект АПК тривалістю у дві хвилини і у 1,5 разів краще ніж двократне АПК тривалістю 5 хвилин і використовувався в подальшій роботі.

3.2. Оцінка життєздатності нейронів органотипової культури гіпокампа в СА1 та СА3 зонах при КГД, АПК, додаванні інгібітора НІФ-пролілгідроксилаз (ДПД), та при комбінуванні АПК та ДПД з наступною КГД

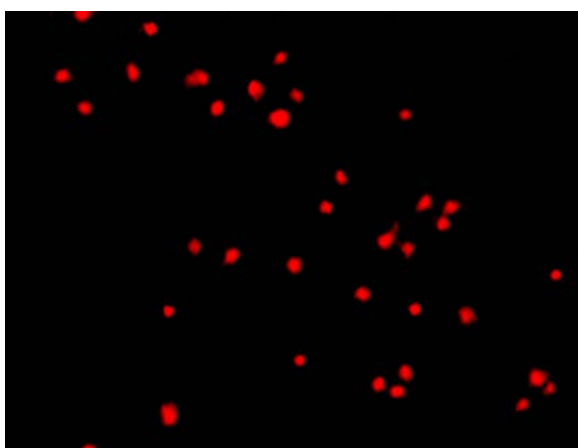
Як було показано вище, кількість ушкоджених клітин після проведення КГД зростала в обох зонах гіпокампа, але носила вираженіший характер в СА1 зоні (рис. 3.1.–3.2).



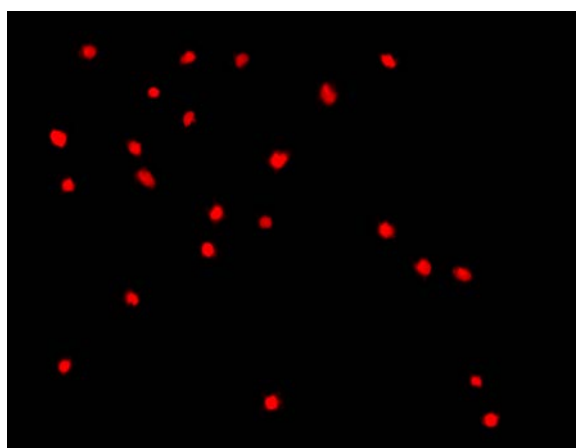
Контроль



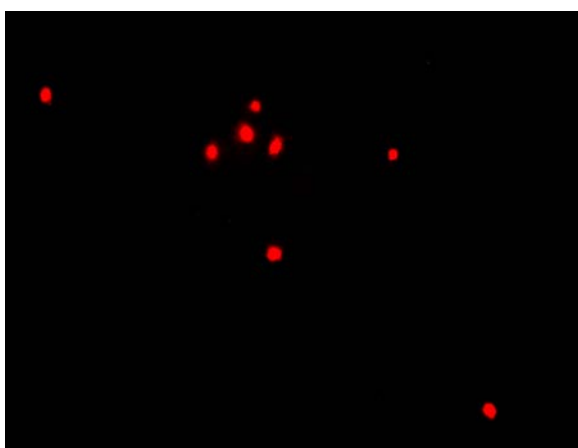
КГД



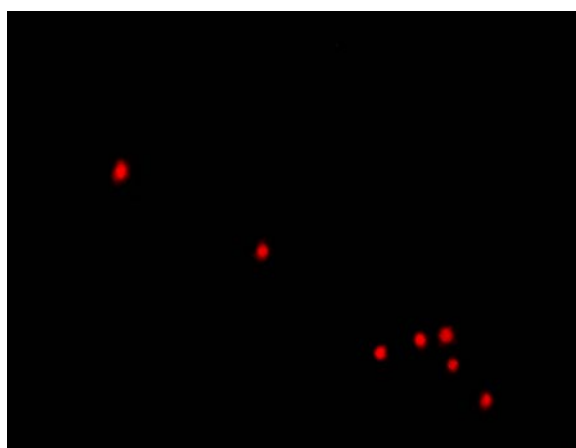
АПК+КГД



ДПД+КГД



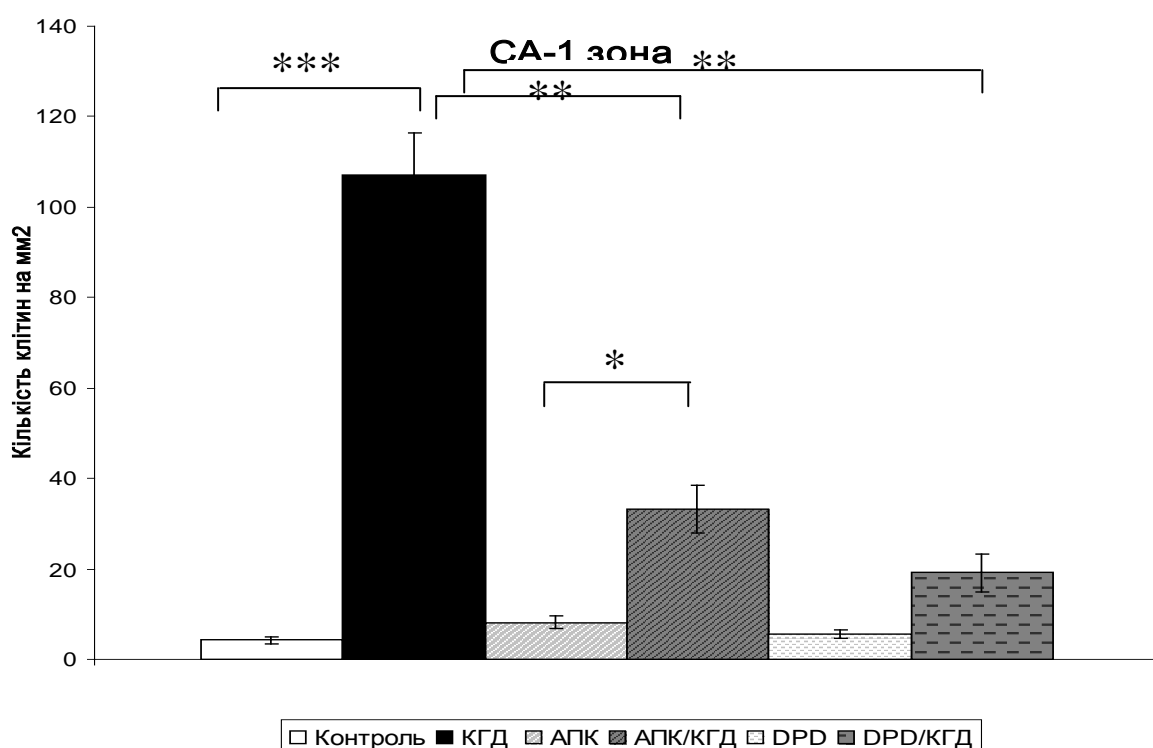
АПК



ДПД

Рис. 3.3. Фарбування органотипових зрізів гіпокампа йодидом пропідію для оцінювання життєздатності нейронів в СА1 зоні гіпокампа за умов АПК, КГД, АПК+КГД, ДПД, ДПД +КГД та в контролі (червоним кольором ПЙ-позитивні клітини)

Проведення 3-ох кратного АПК тривалістю 5 хв. в контрольних умовах не приводило до підвищення кількості ушкоджених клітин ні в СА1 ні в СА3 зоні гіпокампа ($8,2 \pm 1,3$ кл/мм² СА1, $5,4 \pm 0,7$ кл/мм² СА3 зона). В той же час комбінування АПК з КГД вело до статистично достовірного зниження кількості ушкоджених клітин порівняно з групою де проводилося лише КГД, для СА1 зони в 3,2 рази ($33,2 \pm 5,4$ кл/мм², рис. 3.4) і в 2,9 рази для СА3 зони ($19,4 \pm 2,6$ кл/мм², рис. 3.5)



* – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

** – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,01$)

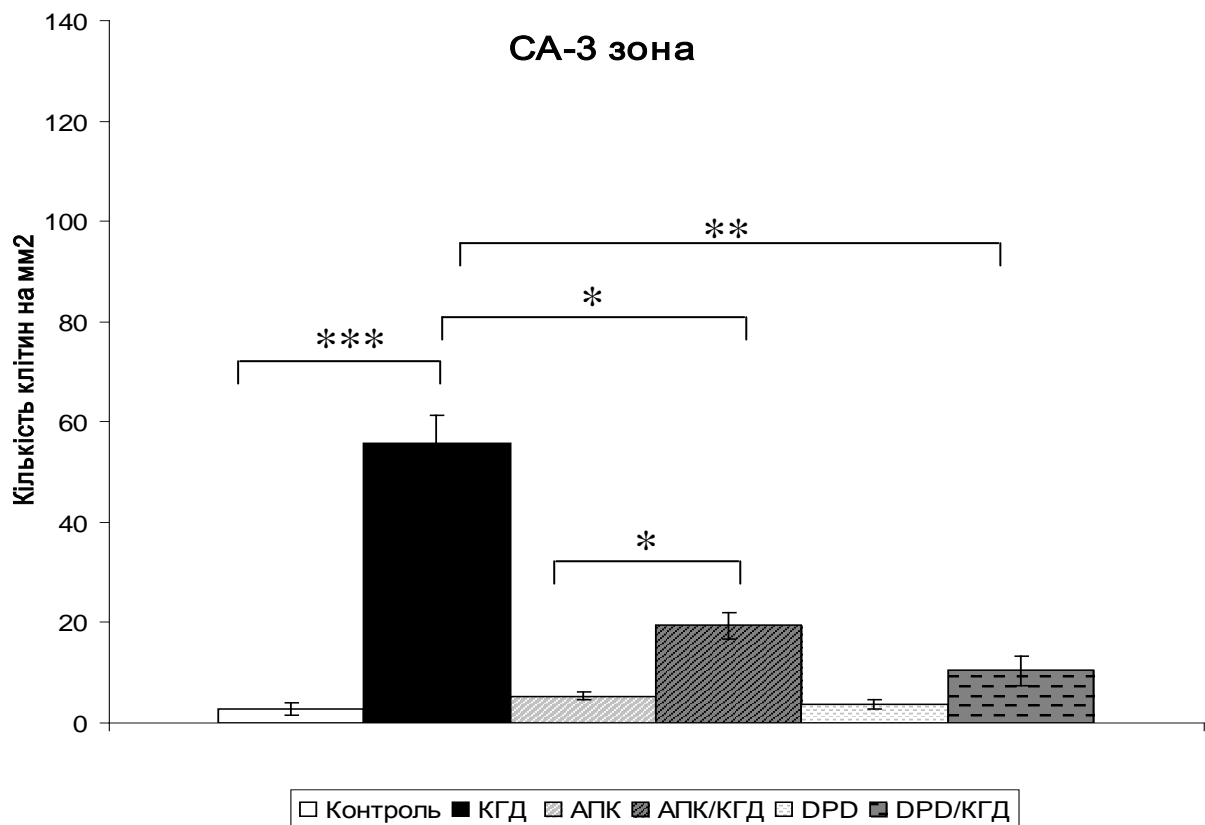
*** – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,001$)

Рис. 3.4. Кількість ПЙ-позитивних клітин на мм² в СА1 зоні в умовах КГД, АПК, КГД+АПК, додавання інгібітора НІF-проліл гідроксилази до середовища культивування (ДПД) та в комбінвції ДПД+КГД

Додавання інгібітора НІF-проліл гідроксилази до середовища культивування без наступного моделювання КГД не спричиняло значного

зростання кількості ПЙ-позитивних клітин як в СА1 ($5,6 \pm 0,9$ кл/мм², рис. 3.4) так і в СА3 ($3,8 \pm 0,9$ кл/мм², рис. 3.5) зонах.

При додаванні інгібітора HIF-проліл гідроксилази до середовища культивування (ДПД) перед проведенням КГД кількість ПЙ-позитивних клітин зменшувалася в 5,6 та 5,3 рази відповідно в СА1 та СА3 зонах.



* – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

** – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,01$)

*** – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,001$)

Рис. 3.5. Кількість ПЙ-позитивних клітин на мм² в СА3 зоні в умовах КГД, АПК, КГД+АПК, додавання інгібітора HIF-проліл гідроксилази до середовища культивування (ДПД) та в комбінвції ДПД+КГД.

3.3. Зміна рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α в поодиноких нейронах гіпокампа при проведенні КГД, АПК, та КГД+АПК

Для дослідження зміни рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α субодиниць HIF-1 в поодиноких нейронах гіпокампа з різних зон (CA1 та CA3) було використано метод ПЛР в реальному часі. Експресія і HIF-1 α , і HIF-3 α субодиниць спостерігалася в CA1 та CA3 зонах контрольних зрізів до проведення експериментальних впливів. Рівень експресії HIF-1 α в нейронах CA1 зони загалом достовірно вищий, ніж в нейронах зони CA3 ($0,268 \pm 0,002$ до $0,245 \pm 0,006$ відповідно; $p < 0,05$).

Рівень експресії HIF-3 α субодиниці по відношенню до експресії субодиниці HIF-1 α ($0,196 \pm 0,009$ в CA1 та $0,194 \pm 0,005$ в CA3), в різних зонах гіпокампа не відрізняється.

Рівень експресії досліджуваних зразків було нормалізовано до рівня експресії гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GADPH). Різниці в рівні експресії GADPH між експериментальними серіями не було виявлено. Всі проби додатково аналізувалися на наявність експресії нейрон-специфічної енолази (NSE, специфічного нейронального маркера); проби в яких не було виявлено NSE, було виключено з подальшого експерименту.

Після проведення КГД рівень експресії HIF-1 α в CA1 зоні достовірно знижується до $0,24 \pm 0,01$ ($p < 0,01$), в той час як у нейронах CA3 зони достовірних змін порівняно з контролем не спостерігалось. Зниження рівня експресії HIF-3 α субодиниці, після КГД, відбувалося в обох зонах, і становило $0,14 \pm 0,01$ ($p < 0,001$) зоні $0,17 \pm 0,01$ ($p < 0,05$), в CA1 та CA3 зонах відповідно (рис. 3.6.–3.7).

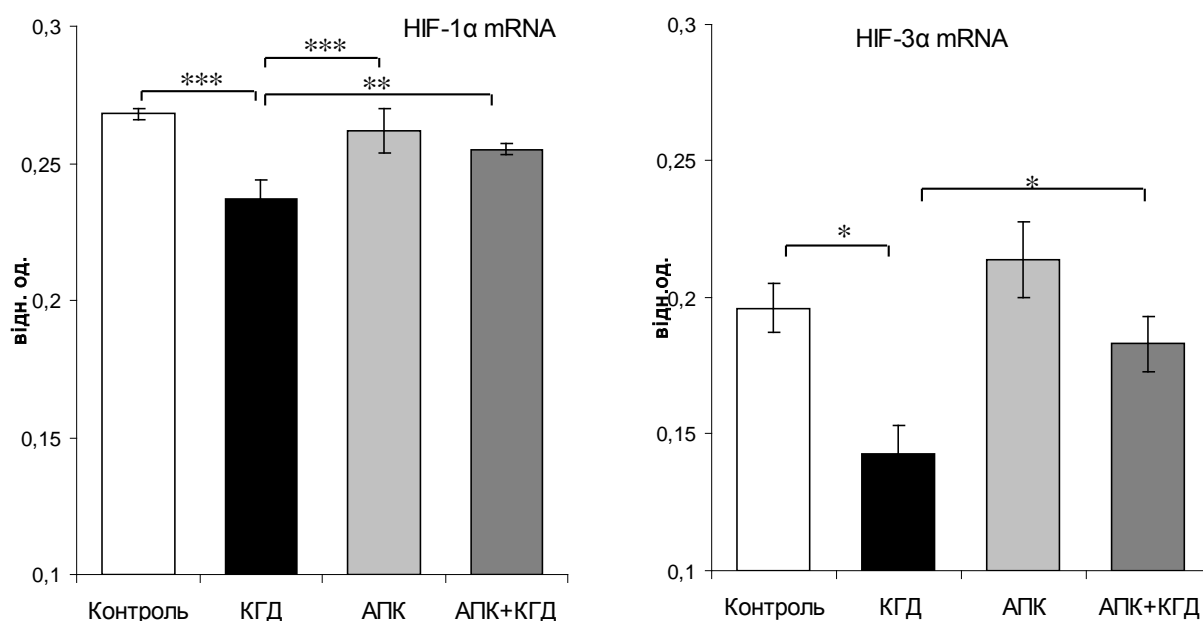


Рис. 3.6. Зміна рівня експресії субодиниць HIF-1 α та HIF-3 α при проведенні експериментальних впливів (контроль, КГД, АПК, АПК+КГД) в поодиноких нейронах CA-1 зони гіпокампа Single-cell real-time RT-PCR. Рівень експресії HIF-1 α та HIF-3 α нормалізовано до рівня експресії гена – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GADPH).

* – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

** – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,01$)

*** – достовірна різниця в порівнянні з контролем ($p < 0,001$)

Проведення АПК без наступної КГД не призводило до суттєвих змін в експресії обох субодиниць, HIF-1 α та HIF-3 α , в CA1 та CA3 зонах. Комбінування ж АПК з КГД вело до зростання рівня експресії HIF-1 α субодиниці в CA3 зоні до $0,254 \pm 0,006$ порівняно з рівнем експресії в цій зоні в групі з АПК $0,234 \pm 0,007$ (рис. 3.7). Також спостерігалось зростання рівня експресії HIF-3 α в CA1 зоні в порівнянні з групою в якій проводилася КГД, рівень HIF-3 α субодиниці зростав до $0,183 \pm 0,010$ з $0,143 \pm 0,010$. Незважаючи на суттєву різницю рівнів експресії HIF-1 α у зрізах, які піддавалися КГД, в нейронах CA1 зони рівень залишився значно нижчим,

ніж в нейронах цієї ж зони контрольних зрізів: $0,255 \pm 0,002$ проти $0,268 \pm 0,002$ ($p < 0,001$), (рис. 3.6).

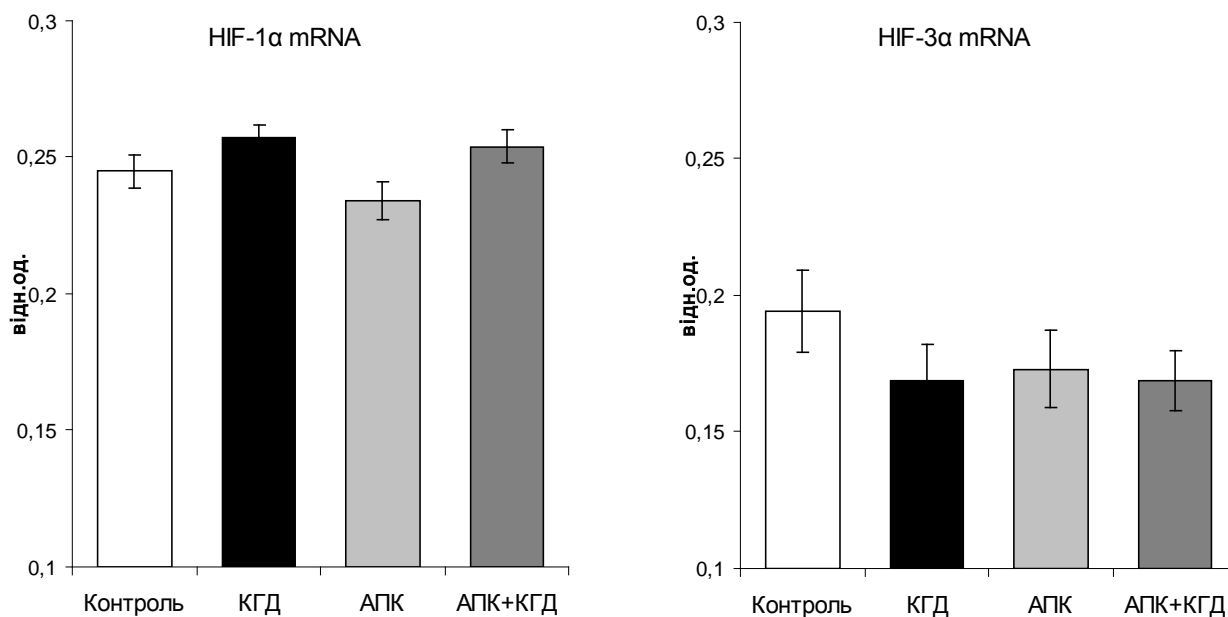


Рис. 3.7. Зміна рівня експресії субодиниць HIF-1α та HIF-3α при проведенні експериментальних впливів (контроль, КГД, АПК, АПК+КГД) в поодиноких нейронах гіпокампа СА3 зони (Single-cell real-time RT-PCR).

3.4 Зміна кальцієвого гомеостазу в нейронах гіпокампа СА1 та СА3 зони, викликана деполяризацією клітинної мембрани

3.4.1 Загальні зміни кальцієвого сигналу та зміни в роботі кальцієвого депо ендоплазматичного ретикулуму в нейронах СА1 та СА3 зони за контрольних умов і після проведення КГД

Однією з важливих характеристик внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу є кінетика кальцієвих транзєнтів, спричинена деполяризацією клітинної мембрани. Вхід кальцію до клітини обумовлений потенціал-залежним каналами характеризується піковими значеннями кальцієвих транзєнтів, а виведення Ca^{2+} з цитозолу відповідно кривими спаду. Функцією мембранного потенціалу є відкриття кальцієвих каналів. Для

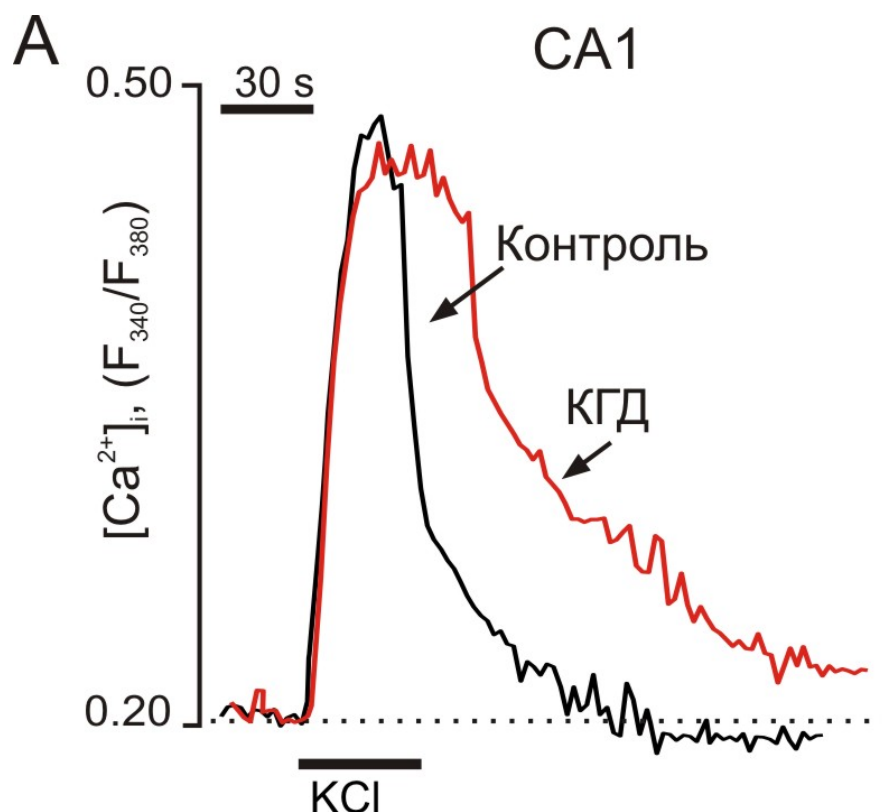


Рис. 3.8. Накладання амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах CA1 зони гіпокампа (аплікація KCl (50 mM, 60 с) за контрольних умов та після проведення 30 хв. КГД з наступною 4 г. реоксигенацією

деполяризації клітини нами використовувалася аплікація гіперкалієвого розчину з концентрацією йонів K^+ - 50 mM, що за літературними даними приводить до деполяризації клітинної мембрани. Аплікація KCl (50 mM, тривалістю 60 с) викликала зростання концентрації йонів $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах як CA1, так CA3 зони (рис. 3.8. – 3.9).

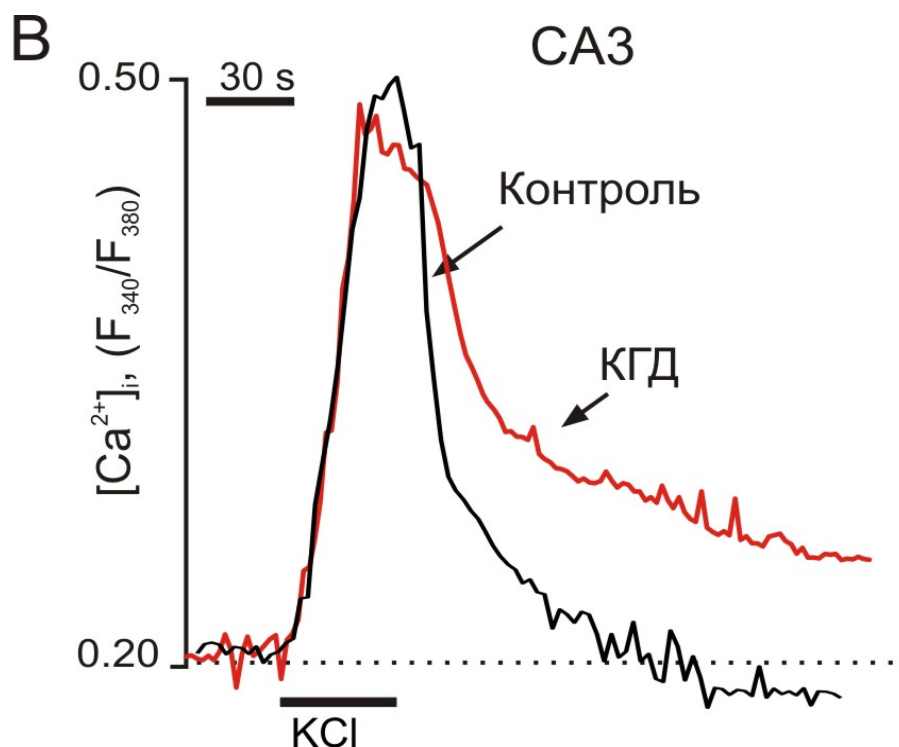


Рис. 3.9. Накладання амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транзєєнтів, індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах СА3 зони гіпокампа (аплікація KCl (50 mM, 60 с) за контрольних умов та після проведення 30 хв. КГД з наступною 4 г. реоксигенацією

Нами не було виявлено достовірних змін в значеннях пікової амплітуди чи часу наростання кальцієвих транзєєнтів, викликаних деполяризацією, у нейронах контрольних зрізів СА1 та СА3 зони за контрольних умов. Амплітуда $[Ca^{2+}]_i$ транзєєнтів склала для нейронів СА1 зони $0,25 \pm 0,03$ ($n = 34$) та для нейронів СА3 зони $0,21 \pm 0,01$ ($n = 29$; $p > 0,18$). Кінетика наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзєєнту становила $22,2 \pm 1,9$ с ($n=31$) для нейронів СА1 та СА3 зони: $20,1 \pm 1,5$ с ($n = 20$). Після проведення КГД у нейронах обох зон також не спостерігалася достовірна різниця амплітуди деполяризації кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транзєєнтів. Так для СА1 зони амплітуда кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транзєєнтів склала $0,23 \pm 0,02$ ($n = 44$); а для СА3 зони амплітуда $[Ca^{2+}]_i$ транзєєнтів склала $0,21 \pm 0,02$, ($n = 23$, рис. 3.10).

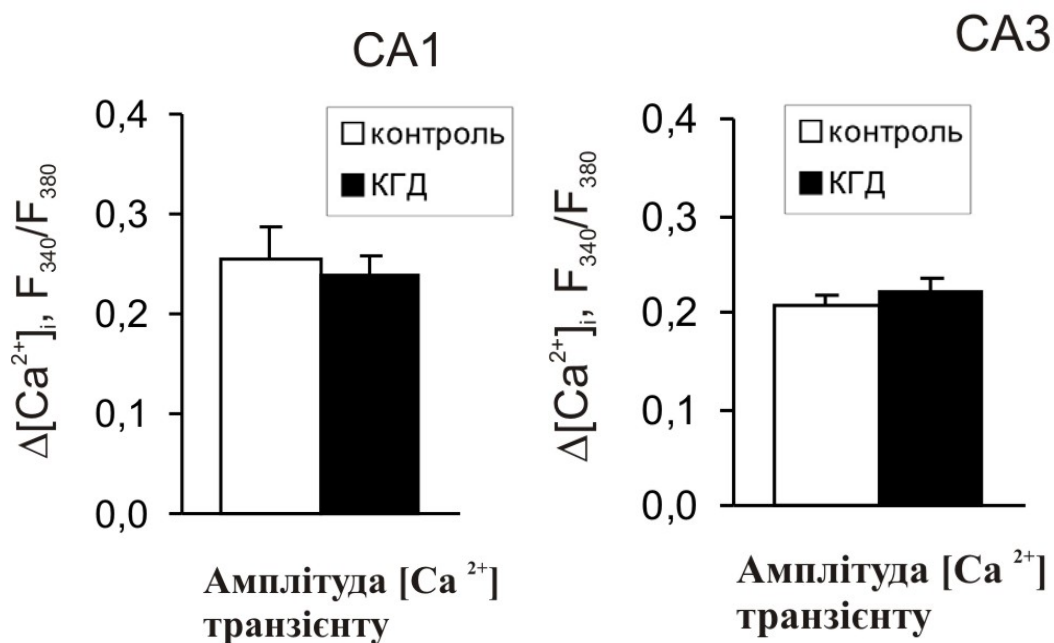


Рис. 3.10. Статистичне зведення амплітуд $[Ca^{2+}]_i$ транзйєнтів індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах CA1 та CA3 зон гіпокампа за контрольних умов та після проведення КГД

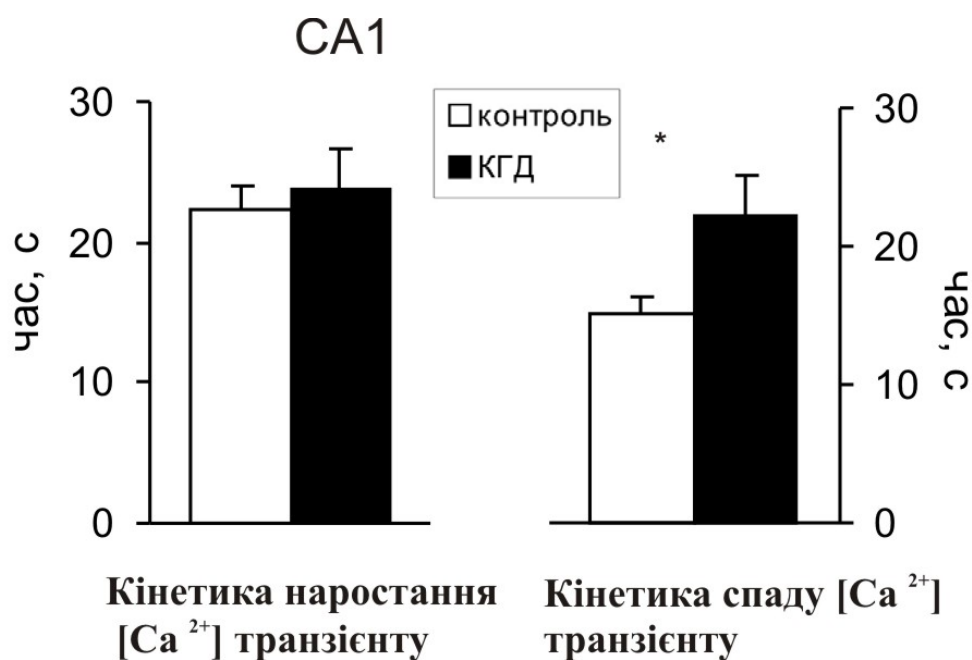


Рис. 3.11. Статистичне зведення даних по кінетиці спаду та наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзйєнту в нейронах CA1 зони гіпокампа за контрольних умов та після проведення КГД; * $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

відповідно $0,22 \pm 0,02$ ($n = 31$; $p > 0,45$ по відношенню до контролю, рис. 3.10). Кінетика кальцієвих транзєнтів $[Ca^{2+}]_i$ після проведення КГД також не змїнювалася.

Кінетика наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзєнту після проведення КГД склала для нейронів СА1 зони $23,8 \pm 2,8$ с ($n = 34$; $p > 0,64$; до контролю, рис. 3.11) та $20,8 \pm 3,0$ с ($n = 20$; $p > 0,82$ до контролю рис. 3.12) для нейронів СА3 зони. В той же час кінетика спаду індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзєнту після проведення КГД сповільнювалася; так в нейронах СА1 зони кінетика спаду достовірно сповільнилася на $47 \pm 6\%$ ($n = 21$; $p > 0,05$, рис. 3.11), в нейронах же СА3 зони після КГД достовірних змін не спостерігалось ($p = 0,2$, рис. 3.12).

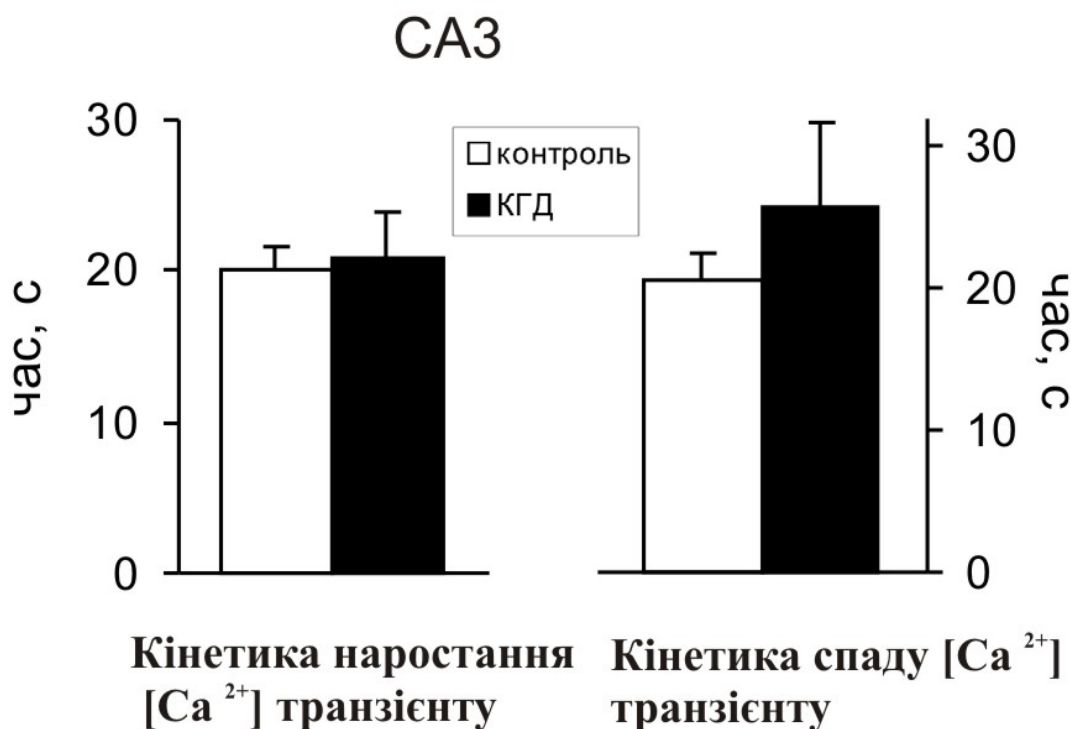


Рис. 3.12. Статистичне зведення даних по кінетиці спаду та наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзєнту в нейронах СА3 зон гіпокампа за контрольних умов та після проведення КГД

Крім того КГД призводила до помітного зростання тривалості відновлення кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзйенту, йндукованого деполяризацією клітинної мембрани, до базового рівня як в нейронах СА1 зони так і в нейронах СА3 зони. З 12 зрізів, що піддавалися КГД, нейрони СА1 зони, у 7 випадках повне відновлення кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзйенту до базового рівня не спостерігалось протягом 4 хвилин, а з 8 зрізів, де досліджувалися нейрони СА3 зони, не відновлювалося 6 зрізів.

Це свідчить про те, що КГД веде до значного сповільнення відновлення йндукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ сигналу в нейронах СА1 та СА3 зони. Отримані нами дані дозволяють стверджувати про наявність порушень кальцій-регулюючих функцій нейронів, а саме значні порушення в роботі Ca^{2+} -транспортних систем, що відповідають за утилізацію високого вмісту йонів Ca^{2+} під час деполяризації мембрани. Шляхів швидкого поглинання і виведення внутрішньоклітинних йонів Ca^{2+} з цитозолу в клітині декілька: це накопичення йонів Ca^{2+} в депо ендоплазматичного ретикулуму, що забезпечується роботою помпи Ca^{2+} -АТРаз мембрани ендоплазматичного ретикулуму (SERCA), виведення надлишку йонів Ca^{2+} за межі клітини, в зовнішньоклітинний простір за рахунок роботи помпи Ca^{2+} -АТРаз плазматичної мембрани, акумуляція йонів Ca^{2+} мітохондріями – NCX, та NCX в плазматичній мембрані.

Для того, щоб з'ясувати, чи КГД зумовлює накопичення йонів Ca^{2+} в депо ендоплазматичного ретикулуму, було проведено дослідження агоніст-йндукованого вивільнення йонів Ca^{2+} з ЕР в нейронах різних зон гіпокампа за контрольних умов та після проведення КГД. Було використано властивість кофеїну активувати ріанодинові рецептори і призводити до вивільнення йонів Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму. Кофеїн (10 mM) йндукує $[Ca^{2+}]_i$ сигнал в нейронах обох зон гіпокампа при базовій аплікації на зріз після припинення деполяризації мембрани розчином з високою калієвою концентрацією для перезавповнення депо ЕР йонами Ca^{2+} . Достовірних даних зміни пікових амплітуд обумовлених кофеїн-

індукованим вивільненням йонів кальцію $[Ca^{2+}]_i$ з ЕР між нейронами контрольних груп СА1 та СА3 зон не було виявлено ($0,044 \pm 0,010$, $n = 13$ для нейронів СА1 зони та $0,033 \pm 0,004$, $n=12$ для нейронів СА3 зони; $p = 0,34$, рис. 3.13 – 3.14). Проведення КГД вело до помітного зниження піку амплітуди кофеїн-індукованого $[Ca^{2+}]_i$ транзйєнту в нейронах СА1 зони ($51 \pm 7\%$, $n = 25$, $p < 0,05$ по відношенню до контролю. Рис. 3.13-3.14). В той же час, КГД не вела до статистично достовірних змін амплітуди кальцієвого транзйєнту обумовленої вивільненням йонів Ca^{2+} з депо ЕР в нейронах СА3 зони ($0,033 \pm 0,004$, $n=12$ за контрольних умов, до $0,041 \pm 0,008$, $n=10$ після КГД $p = 0,38$ рис. 3.14). Отримані результати показують, що КГД веде до сповільнення вивільнення йонів Ca^{2+} специфічно в нейронах СА1 зони. Зниження кофеїн-індукованого вивільнення Ca^{2+} з ЕР також може свідчить, що КГД веде до порушення акумуляції йонів Ca^{2+} в депо ЕР, що призводить до зниження йонів Ca^{2+} всередині ЕР нейронів СА1 зони.

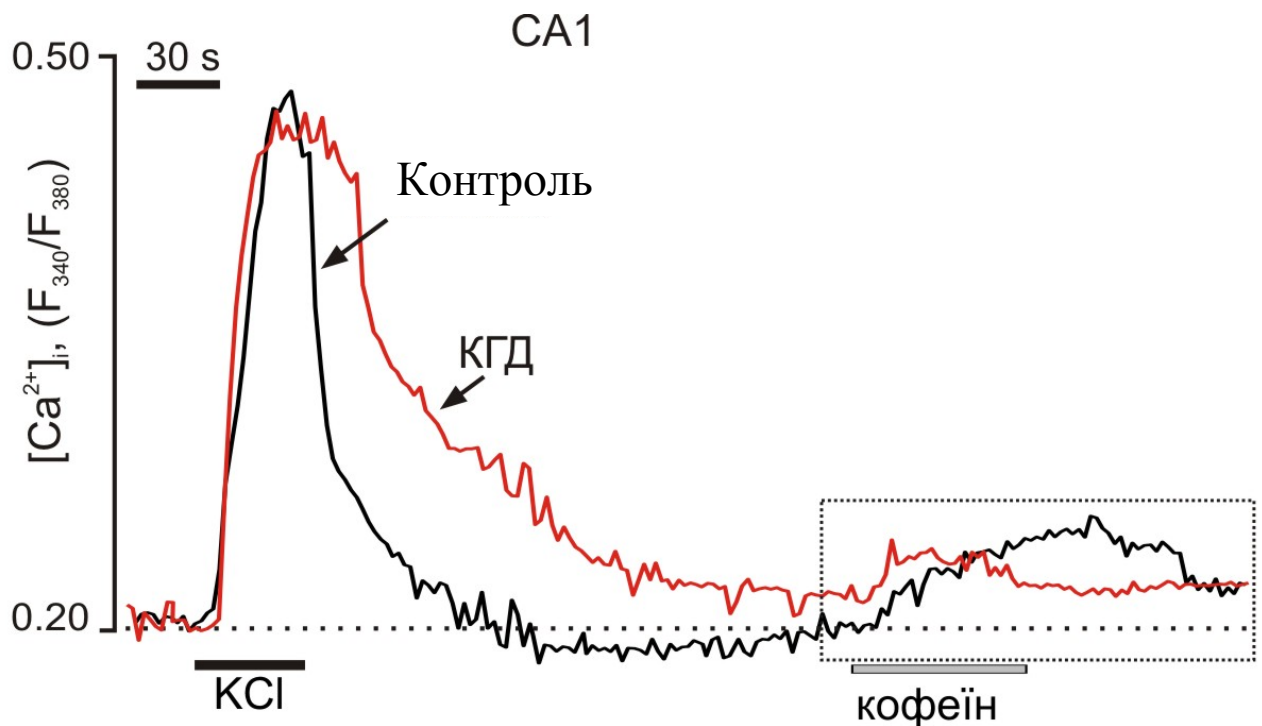


Рис. 3.13. Репрезентативні графіки кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транзйєнтів індукованих аплікацією кофеїну (10 mM) після припинення деполаризації мембрани розчином з високою концентрацією йонів K^+ в нейронах СА1 зони за контрольних умов та після проведення КГД

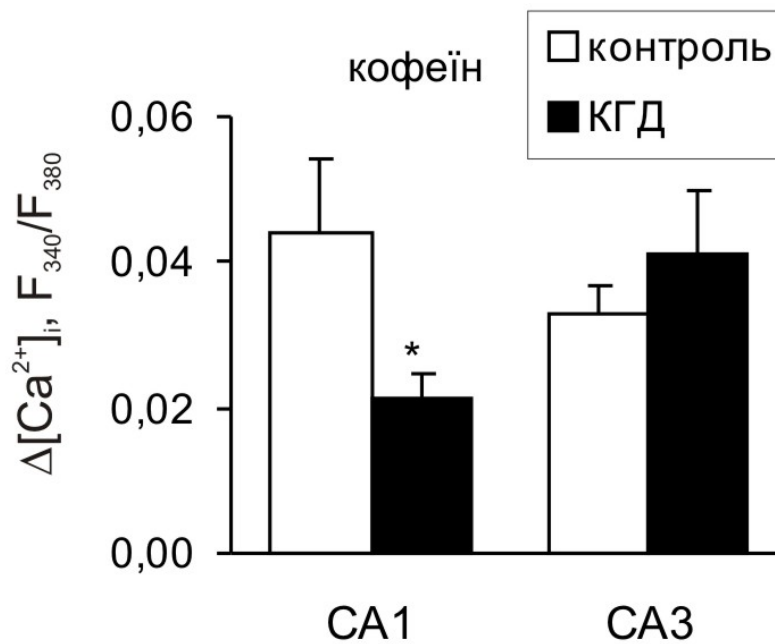


Рис. 3.14. Дані статистичної обробки амплітуди кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транзіїнтів індукованих аплікацією кофеїну (10 mM) в нейронах CA1 та CA3 зон в контролі та при КГД. * $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Для підтвердження цієї гіпотези, депо ЕР спершу було спустошено за допомогою кофеїну, після чого було додано селективний блокатор Ca^{2+} -АТФази ЕР SERCA – тапсигаргін (TG) (рис. 3.15). В контрольних зрізах амплітуда кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзіїнту спричинена дією обох агентів в нейронах CA1 та CA3 зони була схожою ($0,079 \pm 0,015$, $n = 10$ та $0,078 \pm 0,010$, $n = 7$ в нейронах CA1 та CA3 зони, відповідно; $p > 0,9$, рис. 3.16). Це свідчить про схожий рівень акумуляції йонів кальцію Ca^{2+} в ЕР за нормальних умов в нейронах обох зон.

Амплітуда кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзіїнту, обумовленого додаванням кофеїну та TG до зрізів, що піддавалися наступній КГД, була достовірно нижчою в нейронах CA1 зони (на $42 \pm 5\%$, $n = 14$, $p < 0,05$ рис. 3.16). Це свідчить, що кількість накопиченого кальцію Ca^{2+} в ЕР після моделювання ішемічного впливу в нейронах CA1 зони знижується.

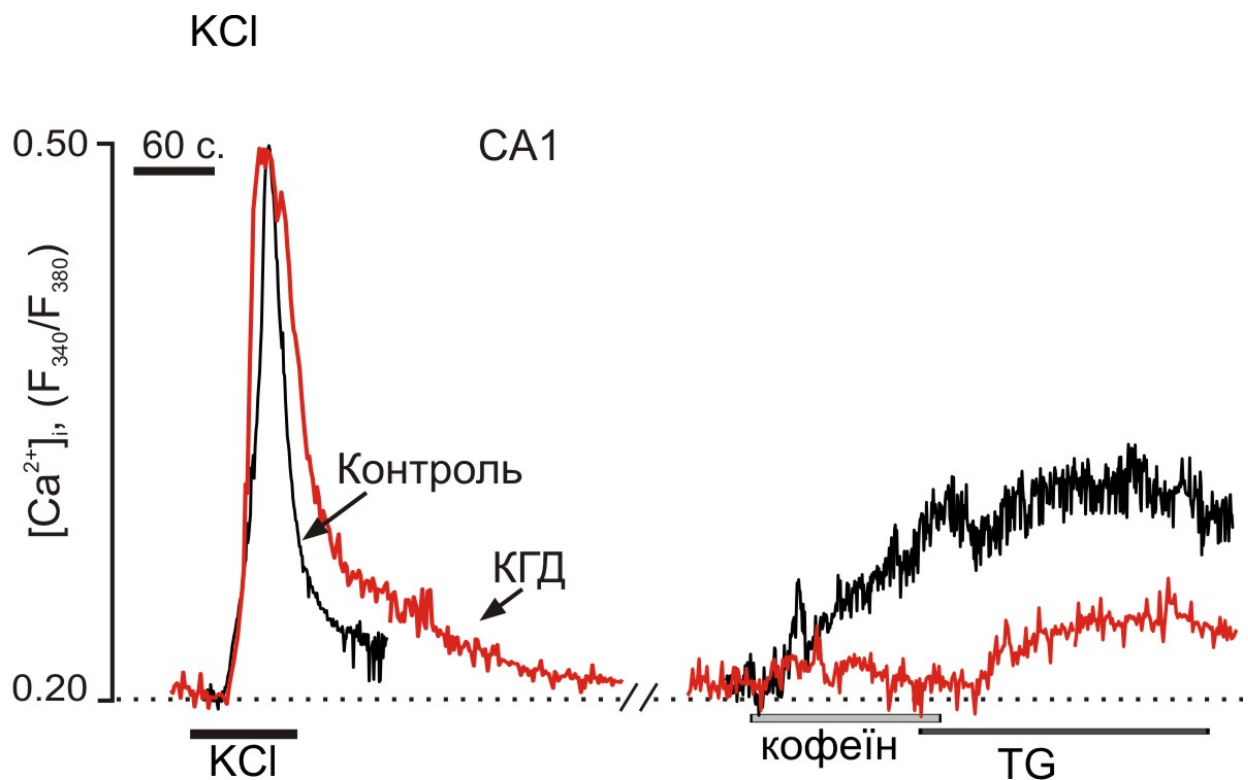


Рис. 3.15. Репрезентативні графіки кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзйенту індукованого аплікацією кофеїну (10 mM) і TG (3 μ M) в нейронах CA1 зони за контрольних умов та після проведення КГД.

Цікаво, що в нейронах CA3 зони статистично достовірних відмінностей амплітуди кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзйенту, обумовленого додаванням кофеїну та тапсигаргіну після КГД не спостерігалось. Амплітуда кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транзйенту складала $0,078 \pm 0,010$ ($n = 7$) за контрольних умов та $0,058 \pm 0,014$ ($n = 6$) після КГД ($p > 0,28$, рис. 3.16). Дані результати показують, що тривале моделювання ішемічного ушкодження не впливає на акумуляцію йонів кальцію Ca^{2+} в депо ЕР та на кількість йонів Ca^{2+} , що зберігаються в ЕР нейронів CA3 зони.

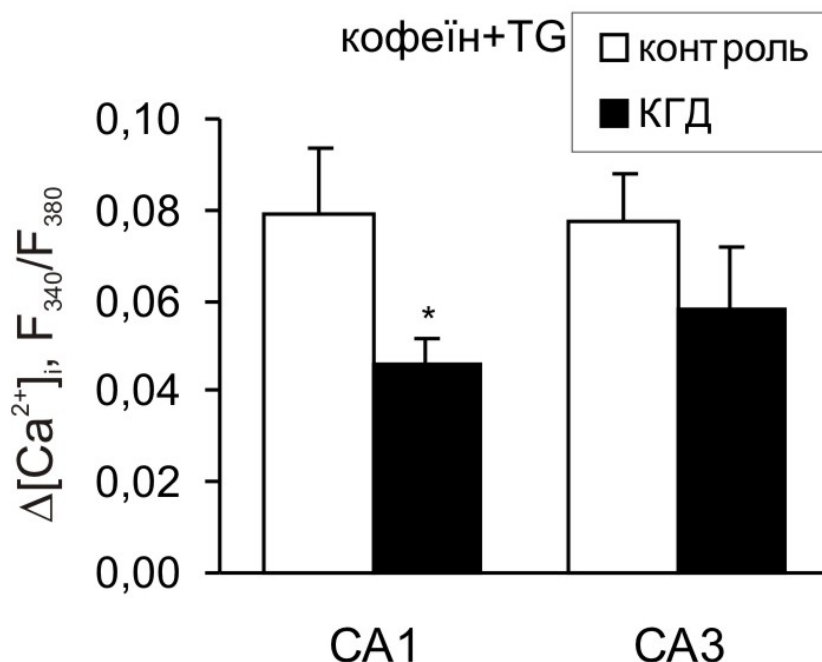


Рис. 3.16. Дані статистичної обробки амплітуди кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих аплікацією кофеїну (10 mM) і TG (3 μ M) в нейронах CA1 та CA3 зон в контролі та при КГД. * $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

3.4.2. Загальні зміни кальцієвого сигналу та зміни в роботі кальцієвого депо ендоплазматичного ретикулуму в нейронах CA1 та CA3 зони в контрольних умов, після АПК, АПК та КГД, та КГД.

Аноксичне прекондиціювання вело до суттєвого зростання амплітуди кальцієвих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$, викликаних деполяризацією в нейронах CA1 зони, але не в нейронах CA3 зони (рис. 3.17. – 3.23). В нейронах CA1 зони АПК зумовлювало зростання амплітуди кальцієвих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$, викликаних деполяризацією мембрани (на $56 \pm 4\%$ по відношенню до контролю, $n = 19$, $p < 0,01$; рис. 3.19) та сповільнення кінетики кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів (кінетика зростання – на $28 \pm 1\%$, кінетика спаду – на $53 \pm 6\%$ $p < 0,05$; рис. 3.21).

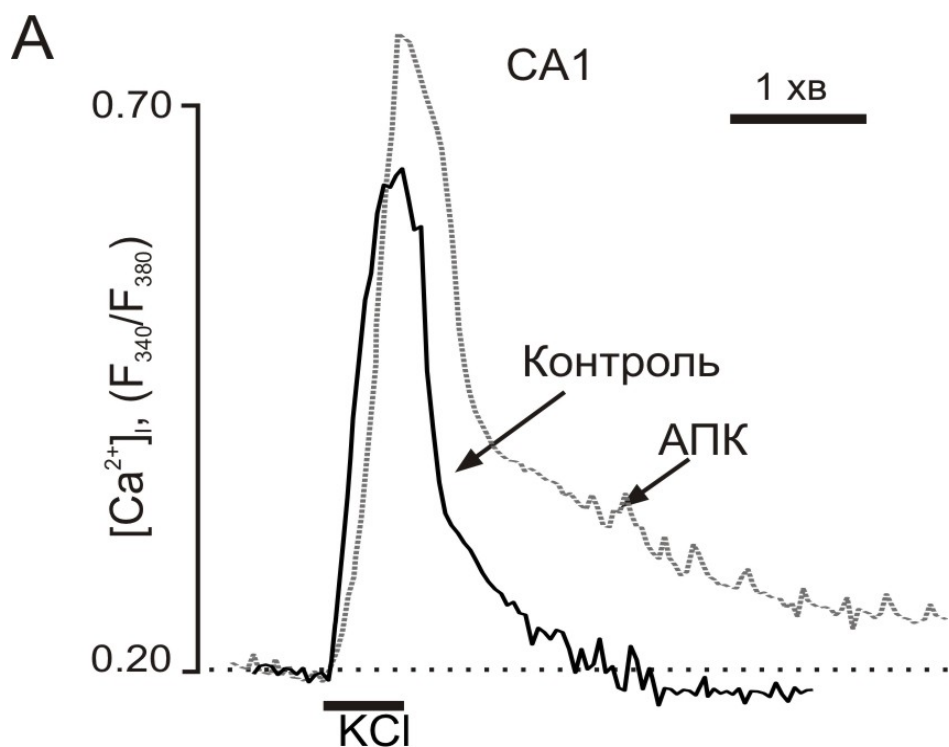


Рис. 3.17. Накладання амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах CA1 зони гіпокампа, за контрольних умов та після проведення АПК

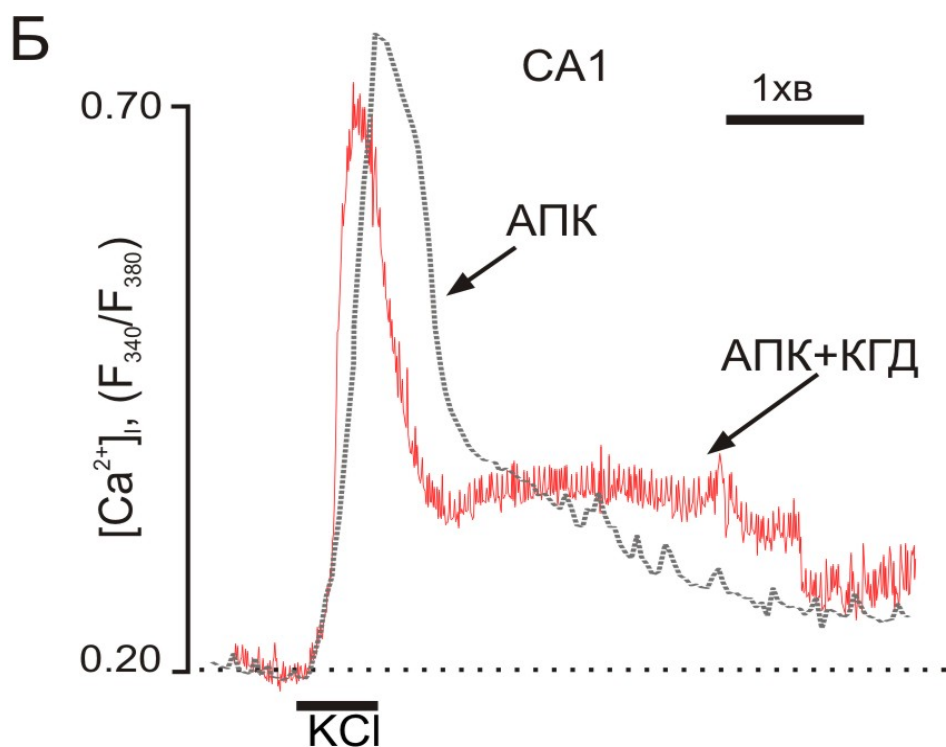


Рис. 3.18. Накладання амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах CA1 зони гіпокампа, за умов АПК та при комбінуванні АПК з наступною КГД

Результати показують, що проведення АПК без наступної КГД в нейронах СА1 зони ведуть до зростання викликаних деполяризацією клітинної мембрани кальцієвих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$. В той же час, АПК не призводить до достовірних змін викликаних деполяризацією клітинної мембрани кальцієвих транз'єнтів в нейронах СА3 зони. Амплітуда кальцієвих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$, викликаних деполяризацією мембрани становила $0,206 \pm 0,011$ в контролі ($n = 29$) та $0,209 \pm 0,022$ в групі з АПК ($n = 24$, $p > 0,91$; рис. 3.20). Кінетика наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту становила 20 ± 2 с. ($n = 20$) для контролю, та 19 ± 2 с. для АПК ($n = 18$, $p > 0,78$), кінетика спаду індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту була 21 ± 2 с ($n = 19$) та 21 ± 2 с, відповідно ($n = 14$; $p > 0,93$; рис. 3.22).

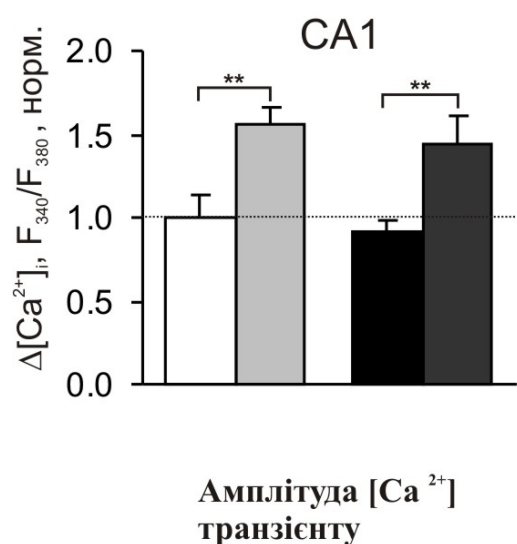
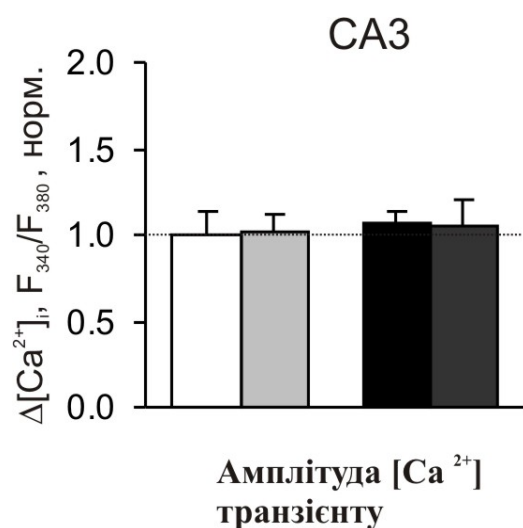


Рис. 3.19. Статистичне зведення нормованих амплітуд $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах СА1 зони гіпокампа до контролю при КГД, АПК та АПК+КГД. ** $p < 0,01$ по відношенню до контролю



□ контроль
 ■ АПК
 ■ КГД
 ■ АПК+КГД

Рис. 3.20. Дані статистичного зведення нормованих амплітуд $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах СА3 зони до контролю при КГД, АПК та АПК+КГД

Комбінування АПК з КГД призводило до схожого ефекту на зміну амплітуди кальцієвих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$, викликаних деполяризацією клітинної мембрани, як і у випадку власне лише АПК. В нейронах СА1 зони пікові значення амплітуди кальцієвих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$, викликаних деполяризацією мембрани зростали на $58 \pm 6\%$ ($n = 11$, $p < 0.01$; рис. 3. 17, рис. 3.19) по відношенню до зрізів, що піддавалися КГД без попереднього АПК. Але АПК не вело до відновлення індукованого КГД сповільнення кальцієвих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах СА1 зони. Достовірних змін не було виявлено при вивченні кінетики як спаду так і наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту в нейронах СА1 зони між групою де проводилася тільки КГД, і групою в якій проводилася КГД в комбінації з АПК (рис. 3.21).

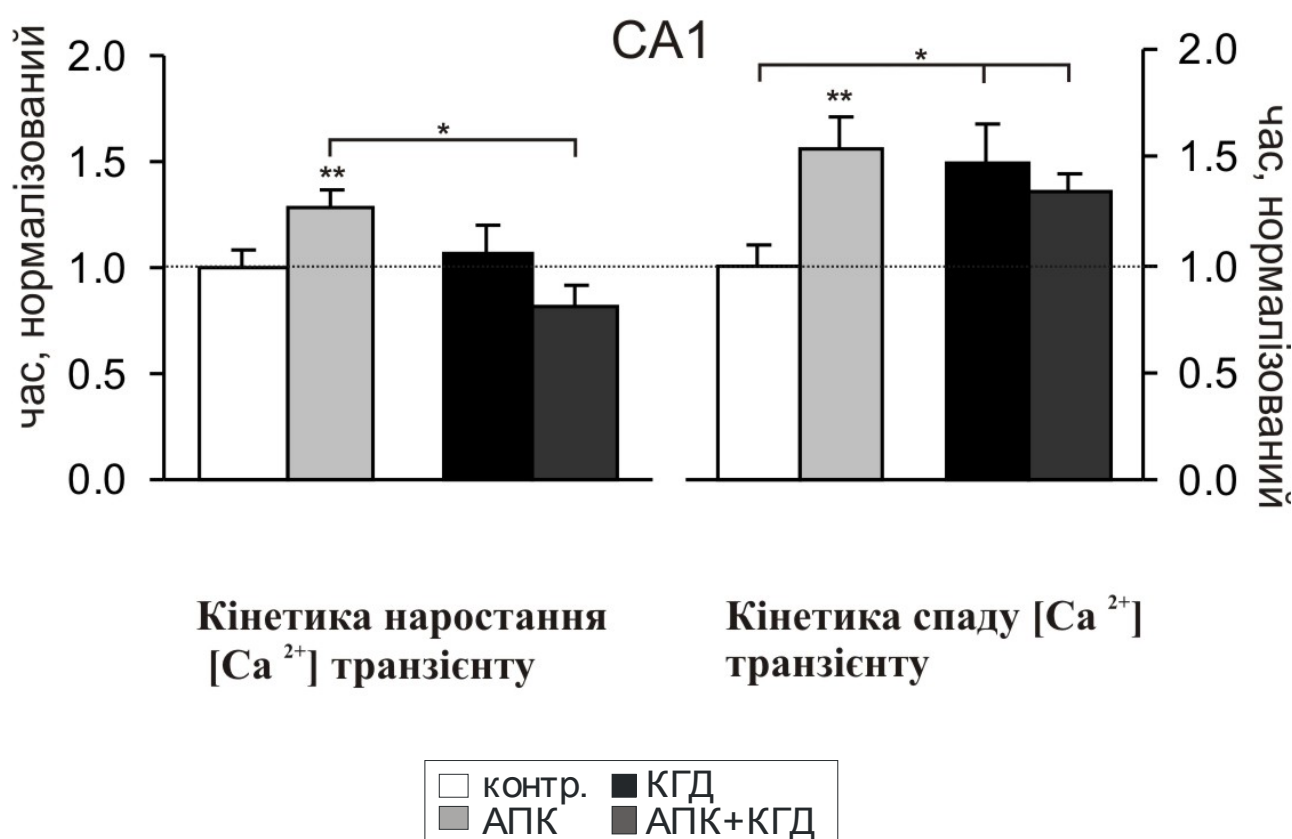


Рис. 3.21. Статистичне зведення даних по кінетиці спаду та наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту в нейронах СА1 зони гіпокампа за контрольних умов, КГД, АПК та АПК + КГД* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по відношенню до контролю.

Проведення АПК з КГД не викликало достовірних змін і при дослідженні кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів зумовлених деполяризацією мембрани нейронів СА3 зони. Амплітуда кальцієвих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$, викликаних деполяризацією мембрани становила $0,222 \pm 0,0015$ ($n = 31$) відносно $0,216 \pm 0,014$ в зрізах з КГД та відповідно КГД з АПК ($n = 18$; $p > 0,81$; рис. 3.20). Кінетика наростання кальцієвих транз'єнтів складала 21 ± 3 с. ($n = 25$) для зрізів з КГД і 18 ± 4 с. для зрізів після АПК в комбінації з КГД ($n = 12$; $p > 0,52$); кінетика ж спаду кальцієвих транз'єнтів становила 31 ± 7 с. ($n = 11$) та 28 ± 7 с. ($n = 25$) відповідно ($n = 8$; $p > 0,55$, рис.3. 22). За даними результатами можна судити, що ні амплітуда, ні кінетика кальцієвих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$, викликаних деполяризацією клітинної мембрани не змінювалася в нейронах СА3 зони при проведенні експериментальних впливів.

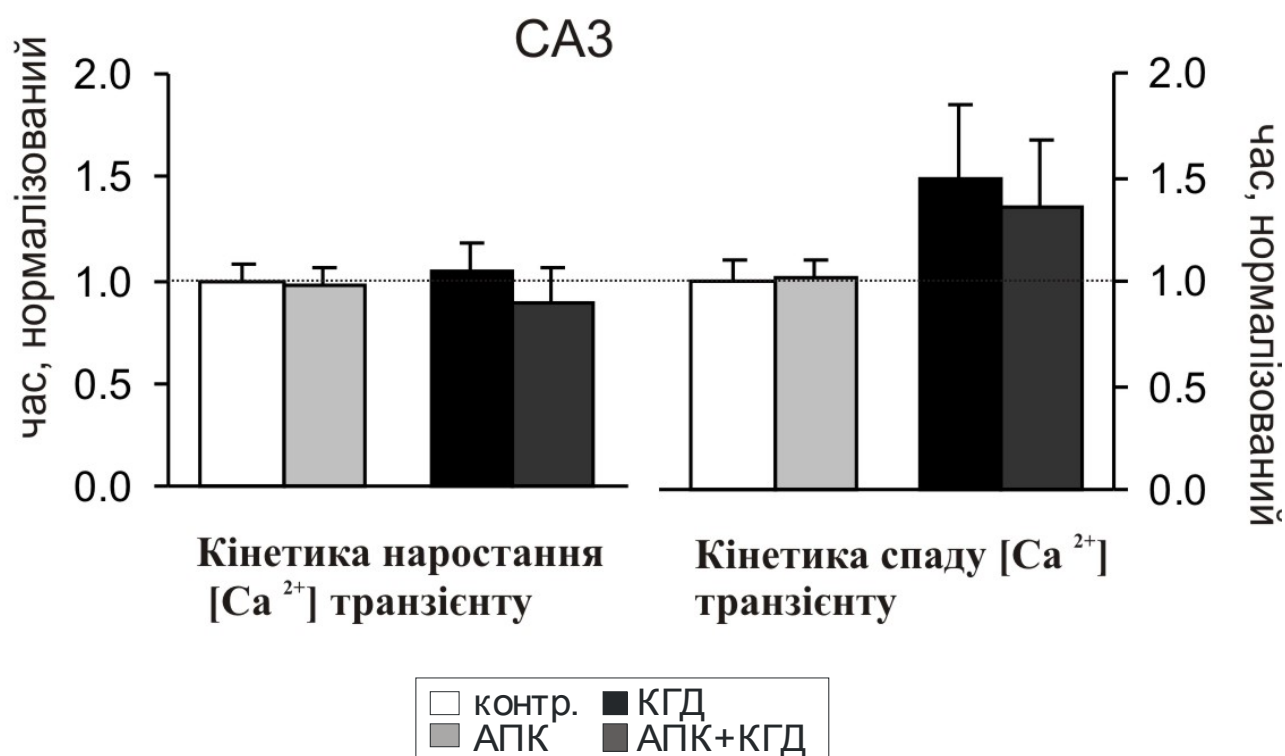


Рис. 3.22. Статистичне зведення даних по кінетиці спаду та наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту в нейронах СА3 зони гіпокампа контроль, КГД, АПК та АПК + КГД.

Для наступного дослідження впливу АПК на зміни кальцієвого гомеостазу в нейронах різних зон гіпокампа, було проведено дослідження впливу АПК на акумуляцію йонів Ca^{2+} в ЕР нейронів СА1 та СА3 зон. Власне АПК не призводило до достовірних змін агоніст-індукованого вивільнення йонів Ca^{2+} з ЕР нейронів ні в СА1, ні в СА3 зонах. Амплітуда індукованих кофеїном кальцієвих $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзіїнтів для СА1 зони становила $0,044 \pm 0,010$ ($n = 12$, контроль)/ $0,039 \pm 0,08$ ($n = 9$, АПК; $p > 0,7$), а для нейронів СА3 зони $0,033 \pm 0,004$ ($n = 13$, контроль)/ $0,034 \pm 0,015$ ($n = 10$, АПК; $p > 0,9$) (рис. 3.23). Але прекодиціювання зрізів вело до зростання кофеїн-індукованого транзіїнту, що характеризує вивільнення йонів Ca^{2+} з ЕР нейронів в СА1 зоні по відношенню до його зниження зумовленого КГД. Амплітуда індукованих кофеїном кальцієвих $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзіїнтів зростала на $69 \pm 5\%$ по відношенню до групи де проводилася КГД

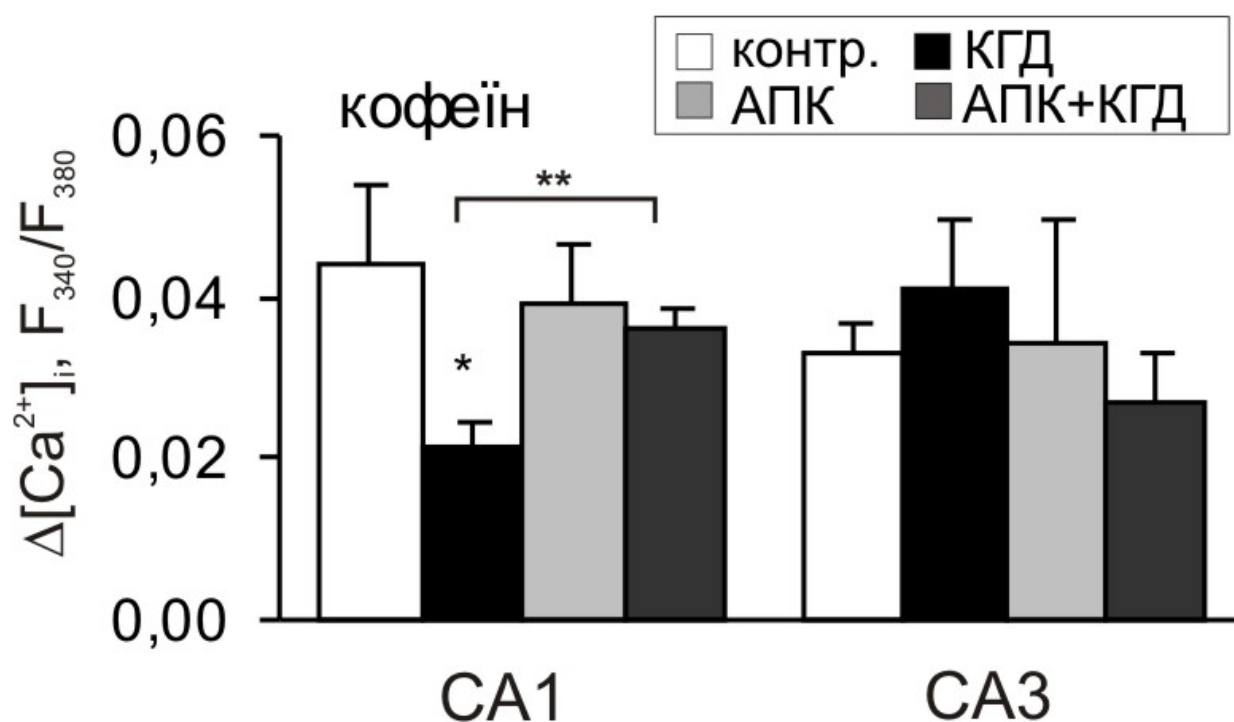


Рис. 3.23. Дані статистичної обробки амплітуди кальцієвих $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзіїнтів індукованих аплікацією кофеїну (10 mM) в нейронах СА1 та СА3 зон в контролі та при КГД. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ по відношенню до контролю.

($n = 8$; $p < 0.001$; середня амплітуда $0,036 \pm 0,002$ після КГД з АПК- $0,021 \pm 0,003$ КГД, рис. 3.24). Це свідчить, що АПК призводить до збільшення вмісту Ca^{2+} в ЕР та, напевно до активації Ca^{2+} -транспортних систем у нейронах CA1 зони.

Для визначення, яким чином ці зміни пов'язані зі зростанням концентрації йонів Ca^{2+} в ЕР при АПК, ми спустошили ЕР за допомогою знову ж таки кофеїну та тапсигаргіну. Амплітуда виходу Ca^{2+} з ЕР під дією обох агентів в нейронах CA1 зони була схожою з групою контрольних зрізів і зрізів з АПК ($0,079 \pm 0,015$, $n = 10$ та $0,089 \pm 0,010$, відповідно $p > 0,6$ рис.3). В той же час, АПК попереджало індукований КГД вихід Ca^{2+} з ЕР і нейронах CA1 зони. За умов комбінування АПК з КГД амплітуда кальцієвого $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзйенту спричинена кофеїном та тапсигаргіном в нейронах CA1 зони була достовірно вищою ніж в групах без АПК ($0,123 \pm 0,022/0,046 \pm 0,005$, $n = 5$, $p < 0,05$ рис. 3.24). Що свідчить про те, що АПК

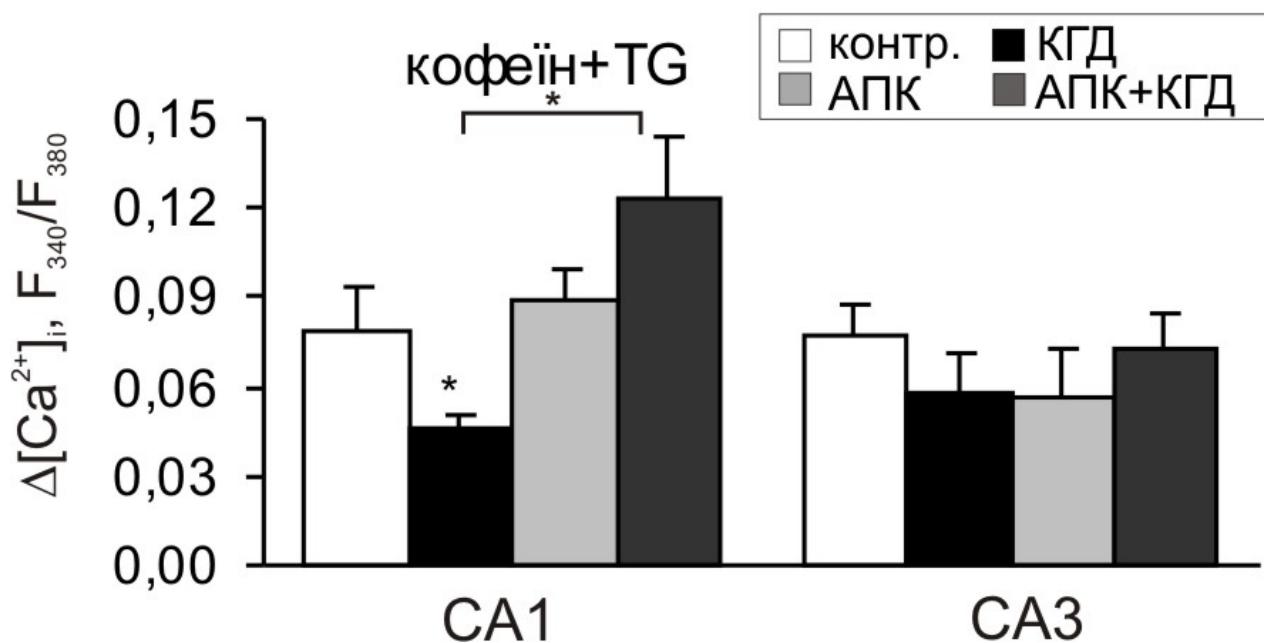


Рис. 3.24. Дані статистичної обробки амплітуди кальцієвих $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзйентів індукованих аплікацією кофеїну (10 mM) і TG (3 μM) в нейронах CA1 та CA3 зон в контролі та при КГД * $p < 0,05$ до контролю.

веде до зростання концентрації йонів Ca^{2+} в ЕР нейронів CA1 при КГД і зумовлює активацію SERCA. В свою чергу, достовірних змін концентрації

йонів Ca^{2+} в ЕР в нейронах СА3 зони зумовлених кофеїном і тапсигаргіном виявлено не було. Амплітуда кальцієвих $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнтів була $0,072 \pm 0,012$ ($n = 12$) в зрізах після КГД в поєднанні з АПК та $0,058 \pm 0,014$ ($n = 6$) після КГД без АПК ($p > 0.44$; рис. 3.24), що показує однакове накопичення йонів Ca^{2+} в нейронах СА3 зони за різних експериментальних умов.

3.4.3. Загальні зміни кальцієвого сигналу та зміни в роботі кальцієвого депо ендоплазматичного ретикулуму в нейронах СА1 та СА3 зони в контрольних умовах, після додавання ДПД, ДПД і КГД, та КГД.

Для вивчення ролі HIF-1 в спричинених КГД змінах кальцієвого гомеостазу в нейронах гіпокампа, нами було використано блокатор HIF-проліл-гідроксилаз, селективний інгібітор ДПД, що попереджує деградацію HIF 1- α субодиниці гетеродимеру (рис. 3.25)

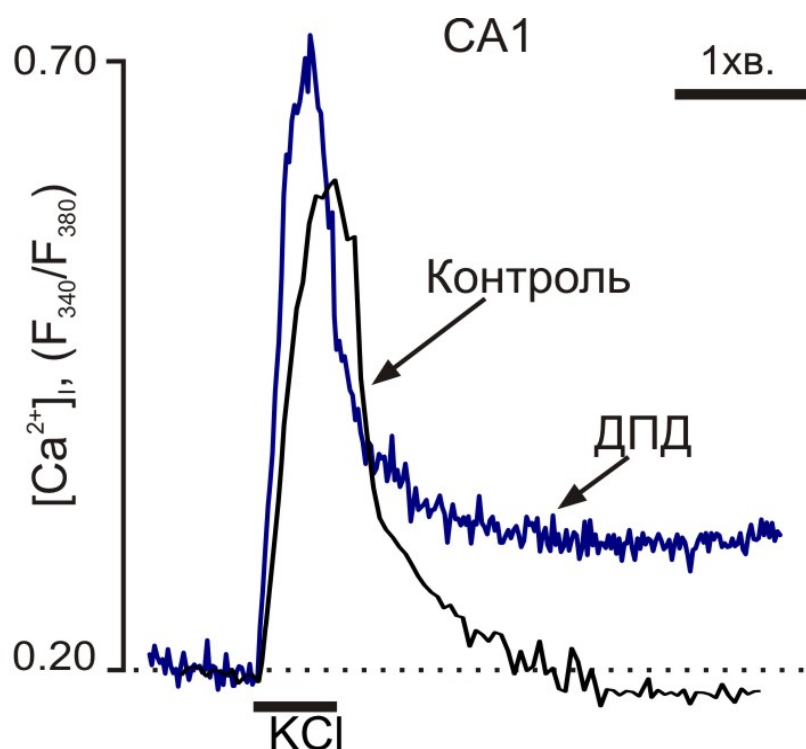


Рис. 3.25. Накладання амплітуди $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнтів, індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах СА1 зони гіпокампа за контрольних умов та після додавання ДПД.

Спершу досліджувався вплив блокування гідроксилування NIF 1- α за допомогою ДПД на кальцієві транзйенти, індуковані деполяризацією клітинної мембрани $[Ca^{2+}]_i$ на нейронах різних зон гіпокампа. Додавання до органотипової культури гіпокампа ДПД вело до зростання амплітуди кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транзйентів викликаних деполяризацією мембрани і в СА1, і в СА3 нейронах гіпокампа (в СА1: на $38 \pm 3\%$, $n = 13$, $p < 0,05$; і в СА3: на $33 \pm 2\%$, $n = 25$, $p < 0,01$ по відношенню до контролю, рис. 3.25.-3.27).

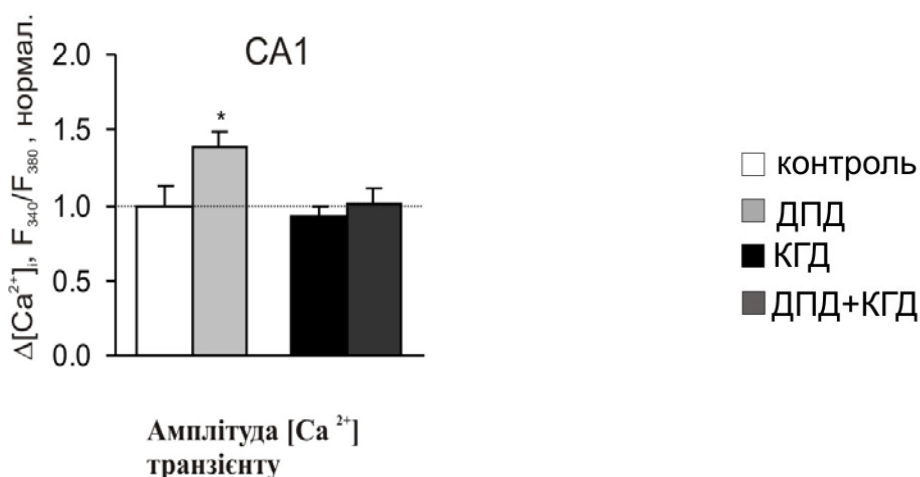


Рис. 3.26. Статистичне зведення амплітуд $[Ca^{2+}]_i$ транзйентів індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах СА1 зони за контрольних умов, КГД, АПК та АПК+КГД. * $p < 0.05$ до контролю

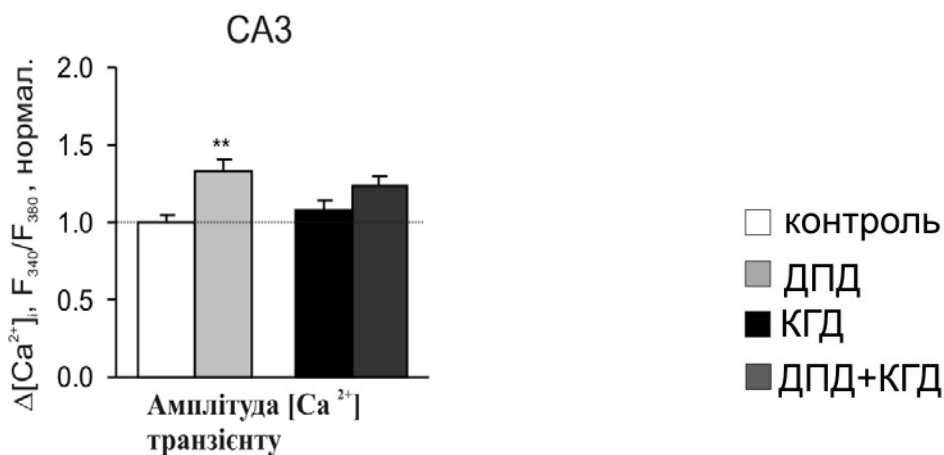


Рис. 3.27. Статистичне зведення амплітуд $[Ca^{2+}]_i$ транзйентів індукованих деполяризацією клітинної мембрани в нейронах СА3 зони. ** $p < 0,01$ по відношенню до контролю

Додавання ДПД також вплинуло на кінетику кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, викликаних деполяризацією мембрани: обумовивши зниження кінетики зростання в нейронах СА1 зони (на $32 \pm 4\%$, $n = 12$, $p < 0.05$; рис. 3.28), та сповільнення кінетики спаду в нейронах СА3 зони (на $85 \pm 11\%$ $n = 15$, $p < 0.01$; рис. 3.29).

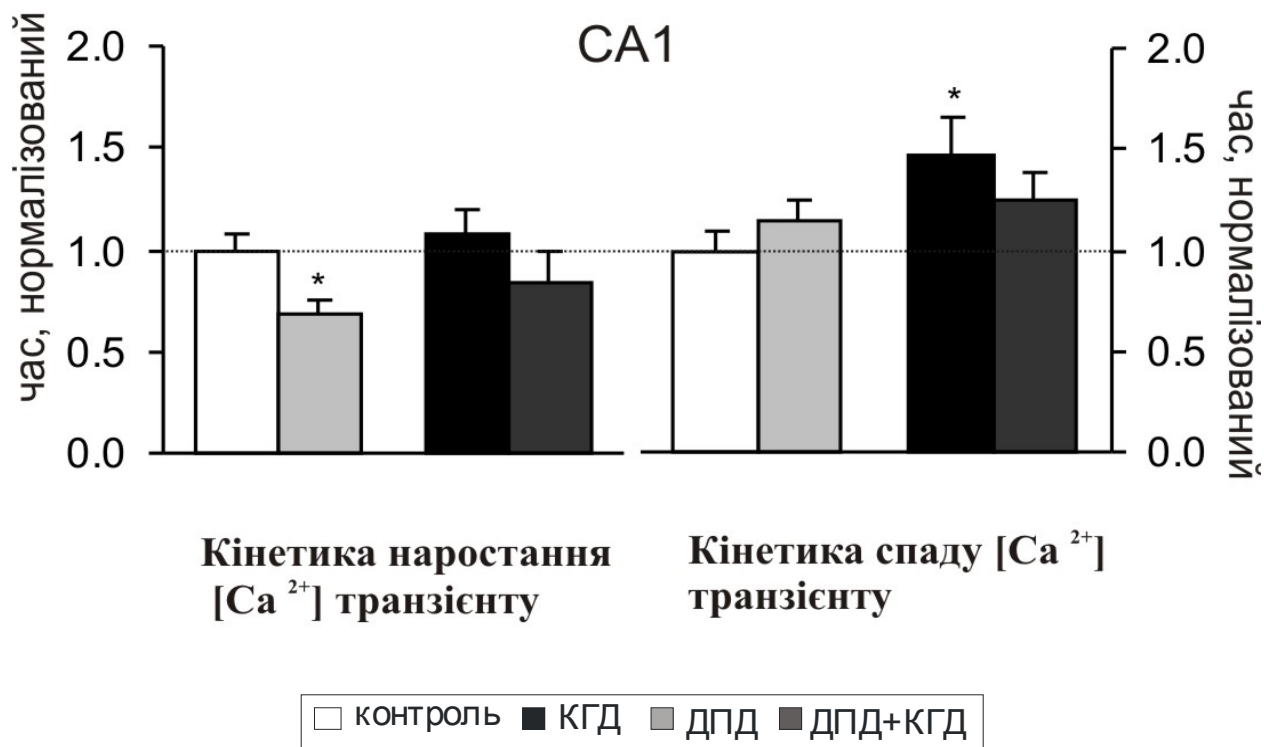


Рис. 3.28. Статистичне зведення даних по кінетиці спаду та наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту в нейронах СА1 зони гіпокампа за контрольних умов, КГД, ДПД та ДПД + КГД. * $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Проте ДПД не впливав на зміни кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, викликаних деполяризацією мембрани, зумовлені проведенням наступної КГД в нейронах гіпокампа. Так в нейронах СА1 зони амплітуда $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів викликаних деполяризацією мембрани складала $0,233 \pm 0,019$ ($n = 44$) по відношенню до зрізів з КГД і додаванням ДПД $0,256 \pm 0,026$ ($n = 19$; $p > 0.47$; рис. 3.26). В нейронах СА3 зони амплітуда була $0,221 \pm 0,015$ ($n = 31$) по відношенню до зрізів після ДПД+КГД $0,254 \pm 0,014$ ($n = 39$; $p > 0.12$; рис. 3.27). Не спостерігалася достовірна відмінність кінетики

кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, обумовленої деполяризацією мембрани, між нейронами зрізів, які піддавалися КГД+ДПД, КГД, наприклад кінетика наростання кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, обумовлених деполяризацією мембрани (КГД 22 ± 3 с. $n = 21$ для СА1, і 31 ± 7 с. $n = 11$ для СА3; ДПД+КГД: 19 ± 2 с. $n = 13$, $p > 0,83$ для СА1 зони і 31 ± 2 с, $n = 26$, $p > 0,71$ для нейронів СА3 рис. 3.28. рис. 3.29). Результати показують що блокада гідроксилування NIF не впливає на КГД індуковані зміни кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів викликаних деполяризацією мембрани. В той же час, додавання ДПД пом'якшує КГД-індуковане зниження агоніст-індукованого вивільнення йонів Ca^{2+} з ЕР в нейронах СА1 зони.

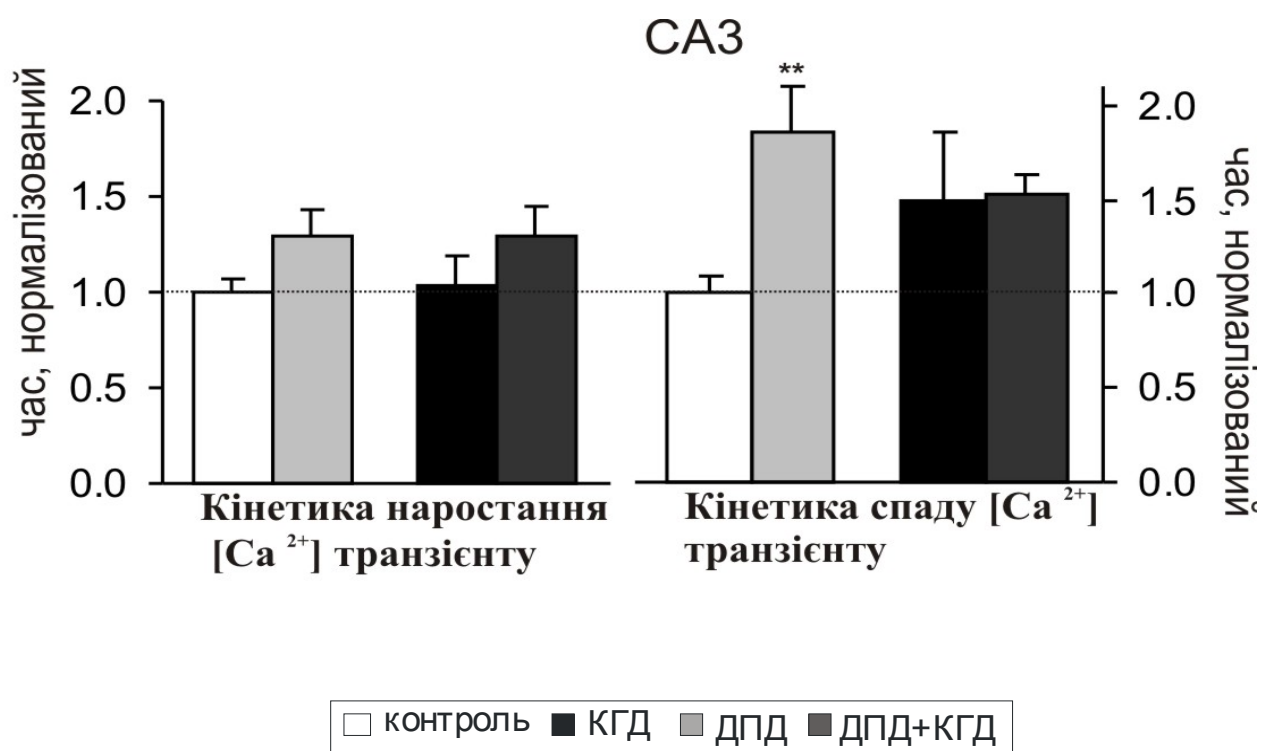


Рис. 3.29. Статистичне зведення даних по кінетиці спаду та наростання індукованого деполяризацією кальцієвого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту в нейронах СА3 зони гіпокампа за контрольних умов, КГД, ДПД та ДПД + КГД. ** $p < 0,01$ по відношенню до контролю.

Амплітуда кофеїн-індукованого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту в нейронах СА1 зони в зрізах ДПД+КГД зростала на $122 \pm 28\%$ порівнянно з КГД ($n = 13$, $p < 0,05$, середня амплітуда: $0,047 \pm 0,011$ КГД+ДПД/ $0,021 \pm 0,003$, рис. 3.30). Власне саме додавання ДПД до зрізів не впливало на амплітуду кофеїн-індукованого $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту ні в нейронах СА1 зони, ні в нейронах СА3 зони: $0,044 \pm 0,010$, ($n = 13$, контроль)/ $0,034 \pm 0,09$ ($n = 6$, ДПД, $p > 0.5$) для нейронів СА1 зони і $0,033 \pm 0,004$ ($n = 12$, контроль)/ $0,027 \pm 0,006$ ($n = 13$, ДПД, $p > 0,4$) для нейронів СА3 зони (рис. 3.3).

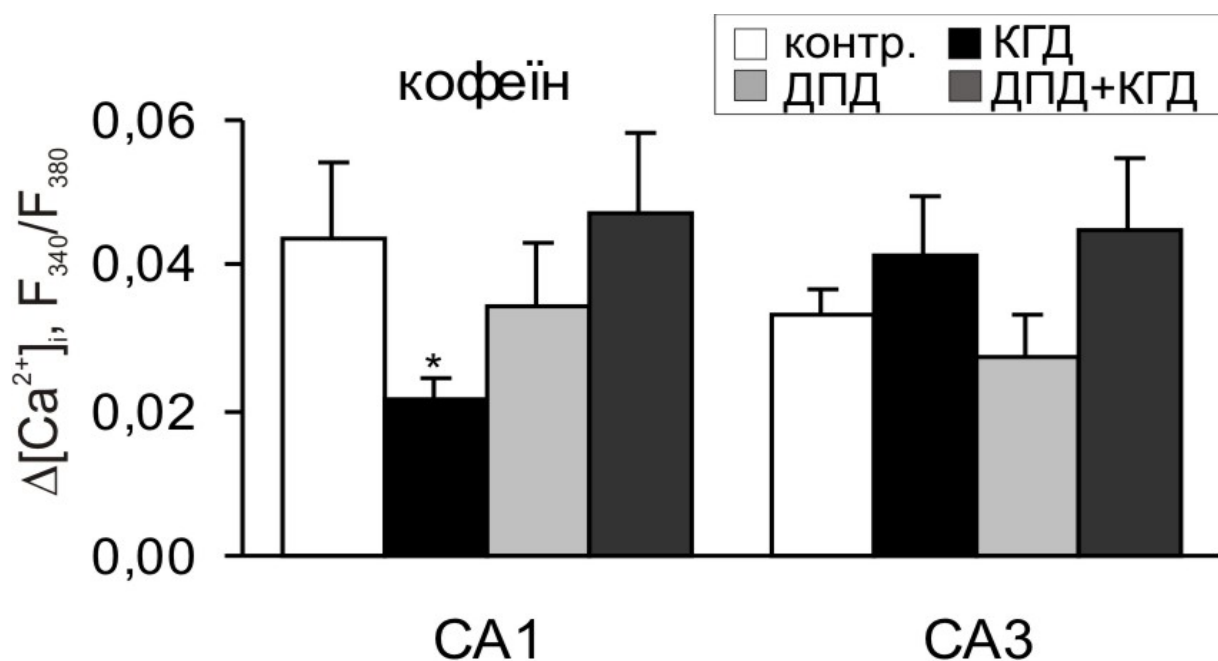


Рис. 3.30. Дані статистичної обробки амплітуди кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів індукованих аплікацією кофеїну (10 mM) в нейронах СА1 та СА3 зон в контролі та при КГД; * $p < 0.05$ по відношенню до контролю

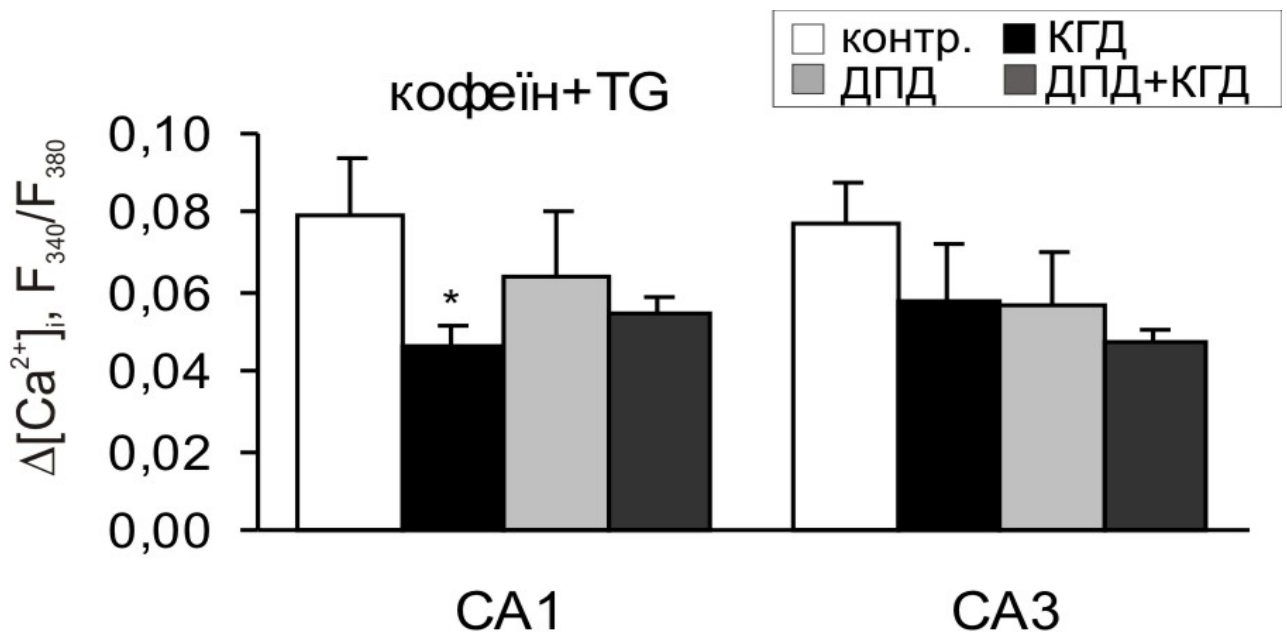


Рис. 3.31 Дані статистичної обробки амплітуди кальцієвих $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів індукованих аплікацією кофеїну (10 mM) і TG (3 μ M) в нейронах CA1 та CA3 зон в контролі та при КГД * $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

Отримані дані свідчать, що блокування деградації HIF 1- α субодиниці попереджає індуковане КГД пригнічення Ca^{2+} -транспортних систем ЕР в нейронах CA1 зони.

3.5. Дослідження зміни рівня експресії підтипів Ca^{2+} -транспортних систем, SERCA та PMCA, у різних зонах гіпокампа за експериментальних умов.

Отримані нами дані свідчать, що КГД суттєво впливає на кальцієвий гомеостаз в нейронах гіпокампа і пригнічує Ca^{2+} -транспортні системи відповідальні за утилізацію високого внутрішньоклітинного рівня йонів Ca^{2+} . Для дослідження Ca^{2+} -транспортних систем, пов'язаних з підтриманням Ca^{2+} гомеостазу, нами було проведено дослідження впливу КГД на зміну рівня експресії підтипів генів, що кодують Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму: PMCA та

SERCA, в різних зонах гіпокампа і здатність попереднього АПК та додавання ДПД впливати на обумовлені КГД зміни.

Відповідно за допомогою ПЛР в реальному часі проводилося дослідження впливу КГД на зміну рівня експресії на рівні мРНК підтипів PMCA та SERCA в CA1 та CA3 зонах гіпокампа, і здатність попереднього АПК та ДПД впливати на КГД-індуковані зміни рівня експресії Ca^{2+} -АТФаз. Увага була зконцентрована на дослідженні зміни рівня експресії PMCA1 та PMCA2 підтипах Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани та SERCA-2b та SERCA-3 підтипах Ca^{2+} -АТФаз ЕР. За літературними даними експресія цих підтипів Ca^{2+} -АТФаз спостерігалася у нейронах різних відділів мозку [84].

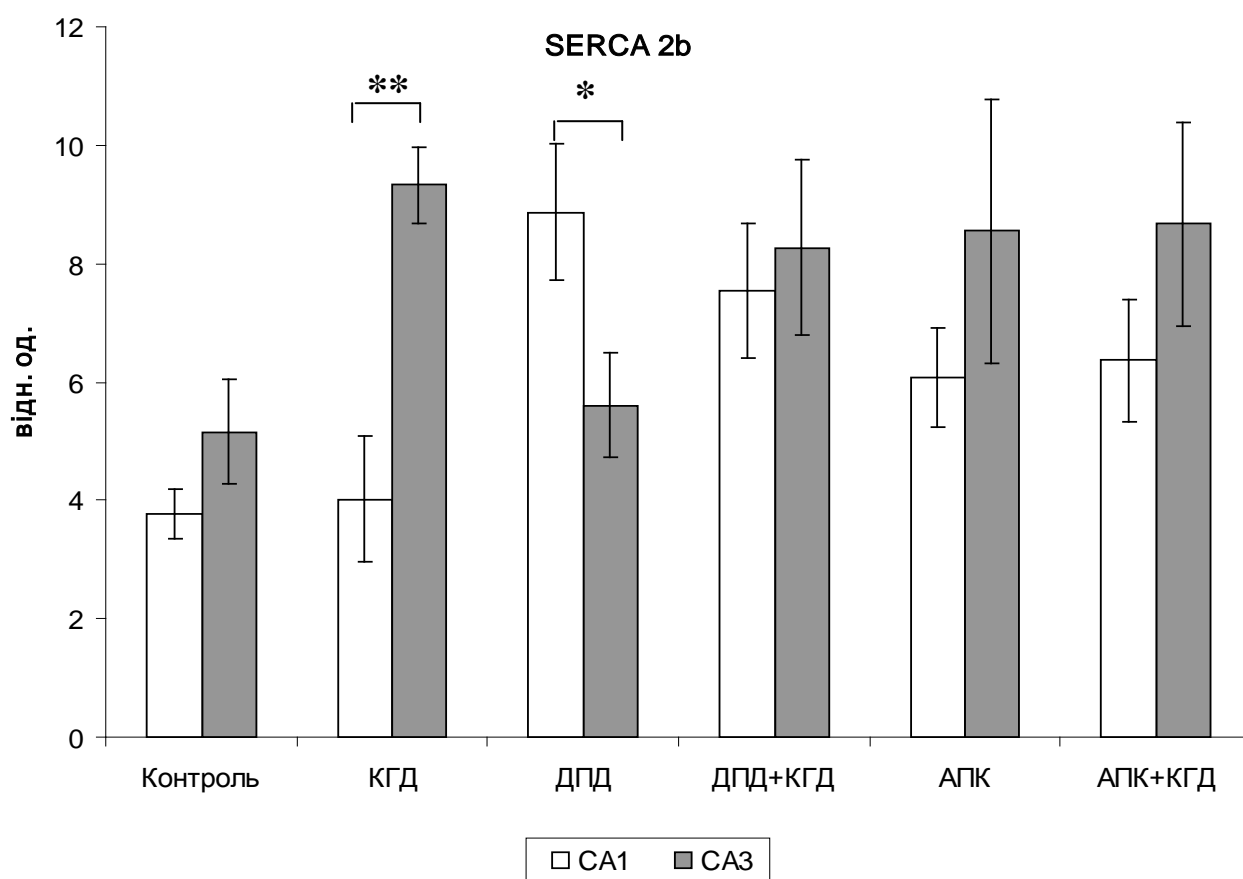


Рис. 3.32 Зміна рівня експресії SERCA2b ізоформи Ca^{2+} -АТФ-ази ендоплазматичного ретикулуму в CA1 та CA3 зонах гіпокампа після проведення експериментальних впливів; ** $p < 0,01$ по відношенню до КГД в CA1 зоні, * $p < 0,05$ по відношенню до ДПД в CA1 зоні.

Ізоформа Ca^{2+} -АТФ-ази ендоплазматичного ретикулулу SERCA3 не є специфічною для нейронів гіпокампа і експресію SERCA3 при проведенні не було виявлено ні за контрольних, ні за експериментальних умов. Рівень же експресії інших підтипів Ca^{2+} -АТФ-аз, SERCA2b, PMCA1, PMCA2, спостерігався в CA1 та CA3 зонах органотипових зрізів та визначався без наступного проведення експериментальних впливів, за контрольних умов.

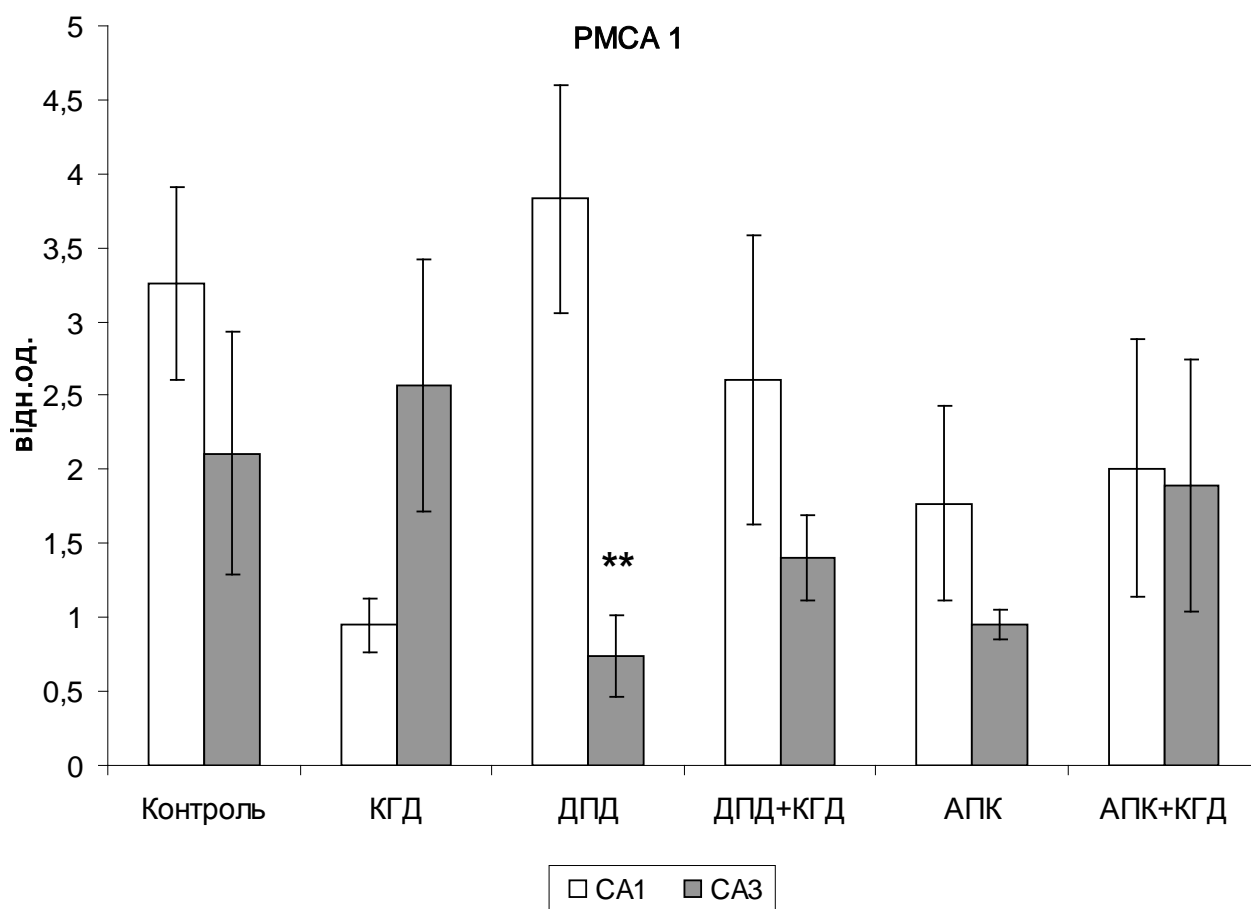


Рис. 3.33. Зміна рівня експресії PMCA1 ізоформи Ca^{2+} -АТФ-ази плазматичної мембрани в CA1 та CA3 зонах гіпокампа після проведення експериментальних впливів. ** $p < 0,01$ по відношенню до ДПД в CA1 зоні

В контрольних дослідках, за умов АПК, АПК+КГД, та комбінування дії інгібітора NIF-проліл гідроксилази з наступною КГД, експресія SERCA2b

змінювалася, але між CA1 та CA3 зонами гіпокампа не відрізнялася. Після проведення КГД рівень експресії SERCA2b в CA3 зоні зростав (на 57% по відношенню до CA1 зони, $p < 0,01$, $n = 7$). Додавання інгібітора HIF-пролілгідроксилази до середовища культивування вело до зниження рівня експресії SERCA2b в CA3 зоні по відношенню до CA1 зони на 58% $p < 0,05$, $n = 7$ (рис. 3.32)

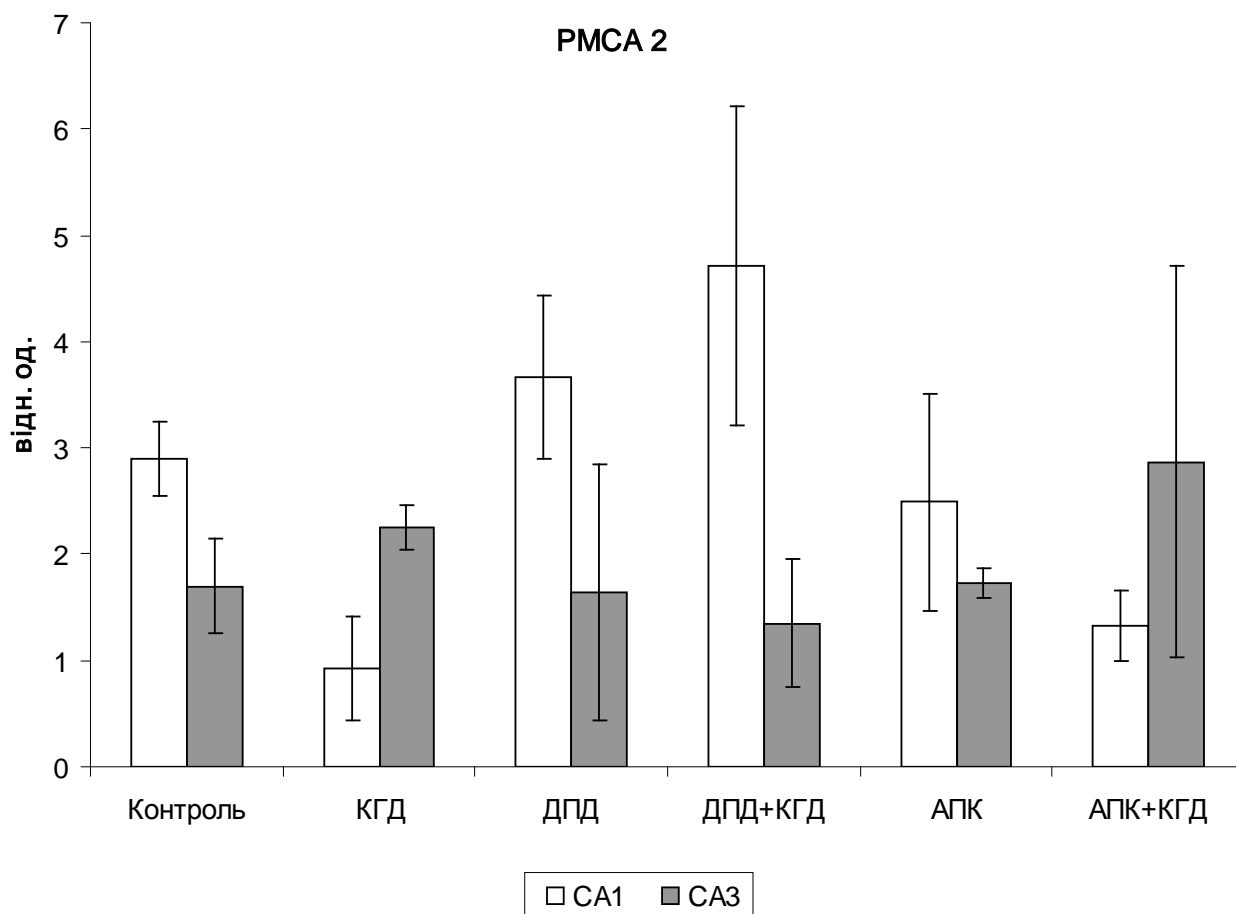


Рис. 3.34. Зміна рівня експресії РМСА2 ізоформи Ca^{2+} -АТР-ази плазматичної мембрани в СА1 та СА3 зонах гіпокампа після проведення експериментальних впливів

Зміна рівня експресії РМСА1 між СА1 та СА3 зоною в контрольних дослідах, за умов проведення АПК з наступом КГД та додавання ДПД в поєднанні з КГД, не спостерігалася. Після проведення КГД спостерігалися тенденції до зниження рівня експресії РМСА1 в СА1 зоні по відношенню до СА3 зони але зміни були не достовірними. Після АПК в СА3 зоні по

відношенню до СА1 зони також спостерігалися тенденції до зростання рівня експресії РМСА1 але дані також не достовірні (рис. 3.33). Цікаво, що в групі з попереднім додаванням ДПД рівень експресії РМСА1 в СА1 зоні значно зростав по відношенню до рівня експресії в СА3 зоні (на 418% $p < 0,01$, $n = 6$) і лише ці зміни мали достовірний характер (рис. 3.33).

В той же час, хоча рівень експресії РМСА2 підтипу Ca^{2+} -АТР-ази плазматичної мембрани за експериментальних умов в різних зонах відрізнявся, та ці зміни не були достовірними. Так, за контрольних умов спостерігалось недостатнє зростання експресії в СА1 зоні по відношенню до СА3 зони близько 70 %. Після КГД рівень експресії РМСА2 зростав не достовірно навпаки у СА3 зоні на 59% по відношенню до рівня експресії в СА1 зоні (рис. 3.34). Додавання інгібітора НІФ-пролілгідроксилази, ДПД, не вело до статистично достовірних відмінностей рівнів експресії РМСА2 в різних зонах, але спостерігалось недостатнє підвищення рівня експресії РМСА в СА1 зоні майже на 125 %, . В експериментальній групі ДПД з наступним КГД достовірні зміни в СА1 зоні по відношенню до СА3 не спостерігалися. Відмінностей в зміні рівня експресії РМСА між СА1 і СА3 зоною в групах де проводилася АПК та АПК+КГД виявлено також не було.

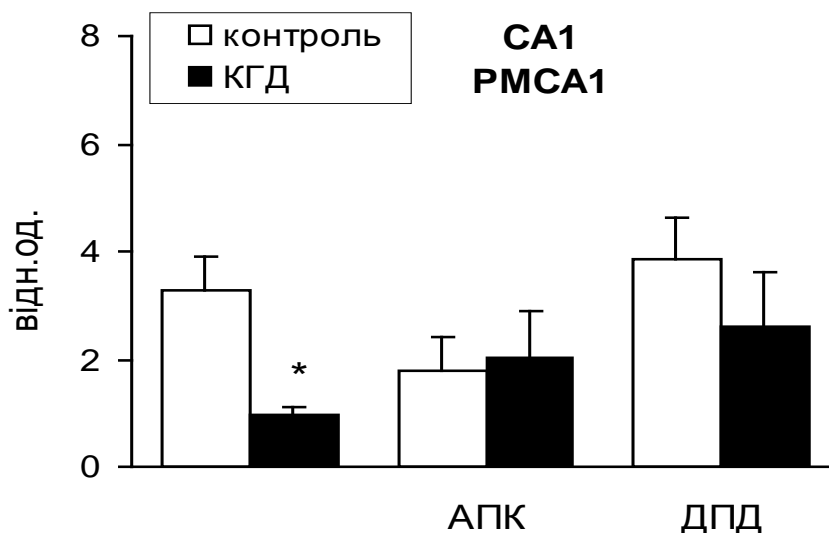


Рис. 3.35. Зміна рівня експресії РМСА1, в СА1 зоні гіпокампа в контрольних умовах, після проведення КГД, АПК, поєднання АПК з КГД, додавання ДПД, та комбінування ДПД з наступним КГД * $p < 0,05$ по відношенню до контролю

За літературними даними [84], КГД призводить до зниження рівня експресії РМСА у СА1 зоні гіпокампа. Рівень РМСА1 та РМСА2 в наших дослідженнях в СА1 зоні після проведення КГД знижувався на 76% ($n = 5$, $p < 0,05$; рис. 3.35-3.36) і на 68% ($n = 4$, $p < 0,01$; рис. 3.35-3.36), відповідно, відносно рівня експресії за контрольних умов ($n = 5$).

Ні проведення попереднього АПК, ні додавання ДПД, без наступного проведення КГД, достовірно не впливало на зміну рівня експресії РМСА1 та РМСА2 в СА1 зоні гіпокампа (рис. 3.35, рис. 3.37). Проте, попереднє додавання ДПД до середовища культивування з наступним проведенням КГД, вело до попередження КГД-індукованого зниження рівня експресії РМСА2 в СА1 зоні (рівень експресії зростає на 41%, $n = 5$, $p < 0,05$ по відношенню до зрізів, що піддавалися КГД без додавання ДПД), до рівня експресії РМСА2 в зрізах після додавання ДПД, але без наступного КГД. (рис. 3.35., 3.37).

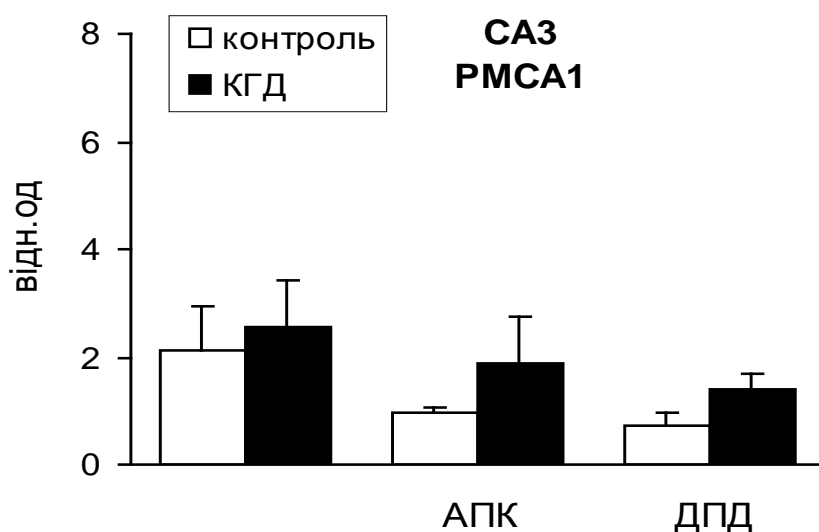


Рис. 3.36. Зміна рівня експресії РМСА1, в СА3 зоні гіпокампа в контрольних умовах, після проведення КГД, АПК, поєднання АПК з КГД, додавання ДПД, та комбінування ДПД з наступним КГД

Варто відмітити що в СА3 зоні гіпокампа достовірних змін рівня РМСА1 та РМСА2 після КГД взагалі не спостерігалось (РМСА1: $2,1 \pm 0,8$, $n = 7$ до $2,6 \pm 0,9$, $n = 7$ для контрольних зрізів і зрізів, що піддавалися КГД,

відповідно, $p > 0,7$; PMCA2: $1,7 \pm 0,4$, $n = 7$ до $2,6 \pm 0,2$, $n = 5$ контроль та КГД відповідно, $p > 0,3$; рис. 3.36., рис.3.38). Ні проведення АПК ні додавання ДПД не впливало на експресію PMCA1 та PMCA2 в цій зоні. (рис. 3.36., рис. 3.38).

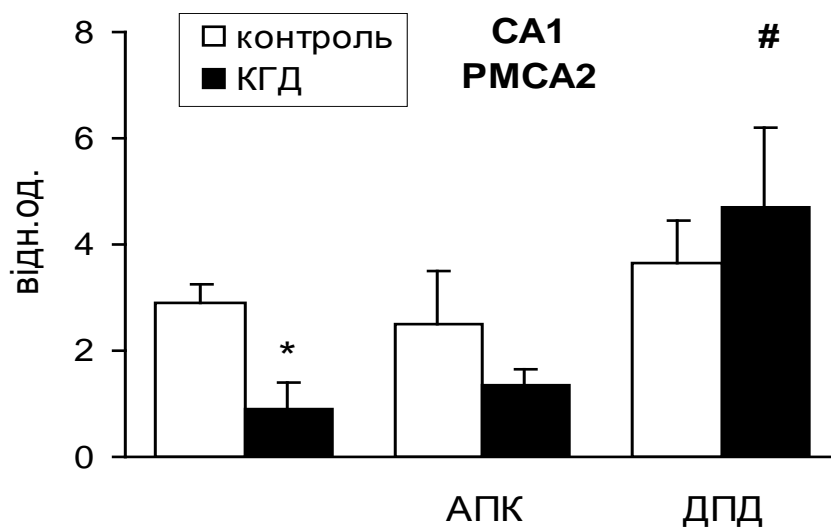


Рис. 3.37. Зміна рівня експресії PMCA2, в CA1 зоні гіпокампа в контрольних умовах, після проведення КГД, АПК, поєднання АПК з КГД, додавання ДПД, та комбінування ДПД з наступним КГД. * – $p < 0,05$ по відношенню до контролю, # $p < 0,05$ по відношенню до КГД

Рівень експресії SERCA-2b в CA1 та CA3 зонах гіпокампа змінювався за різних експериментальних умов. КГД не змінювала рівень експресії SERCA-2b в CA1 зоні гіпокампа (рис. 3.39), але достовірно підвищувала рівень експресії SERCA-2b в CA3 зоні (рис. 3.40). В CA3 зоні після КГД рівень експресії SERCA-2b зростав на 81% ($n = 7$, $p < 0.01$) відносно контролю ($n = 6$, рис. 3.40). Ці дані узгоджуються з отриманими нами результатами по дослідженню акумуляції Ca^{2+} , а саме: відсутності змін в акумуляції Ca^{2+} в ЕР нейронів CA3 зони після проведення КГД, і дають можливість припускати, що зростання рівня експресії SERCA-2b нівелює КГД-індуковані зміни Ca^{2+} гомеостазу в цих нейронах і може лежати в основі виживання і меншої вразливості нейронів CA3 зони при ішемічному ушкодженні.

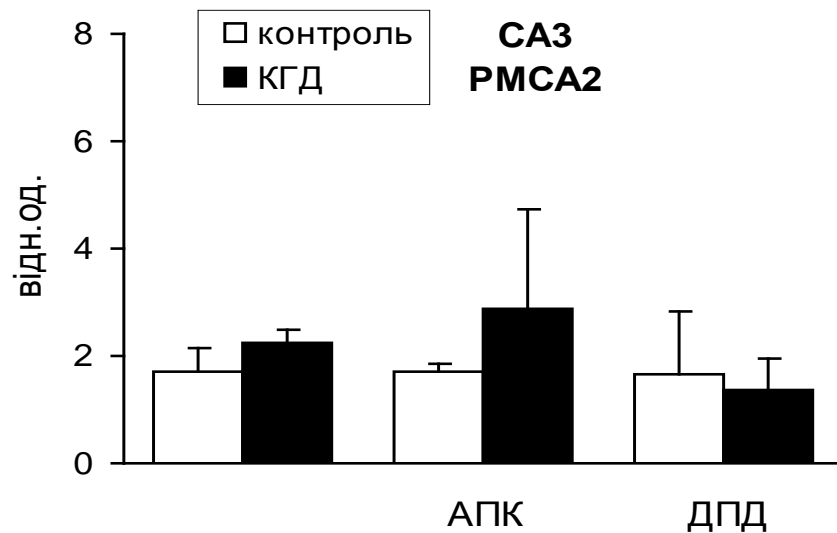


Рис. 3.38. Зміна рівня експресії PMCA2, в CA3 зоні гіпокампа в контрольних умовах, після проведення КГД, АПК, поєднання АПК з КГД, додавання ДПД, та комбінування ДПД з наступним КГД

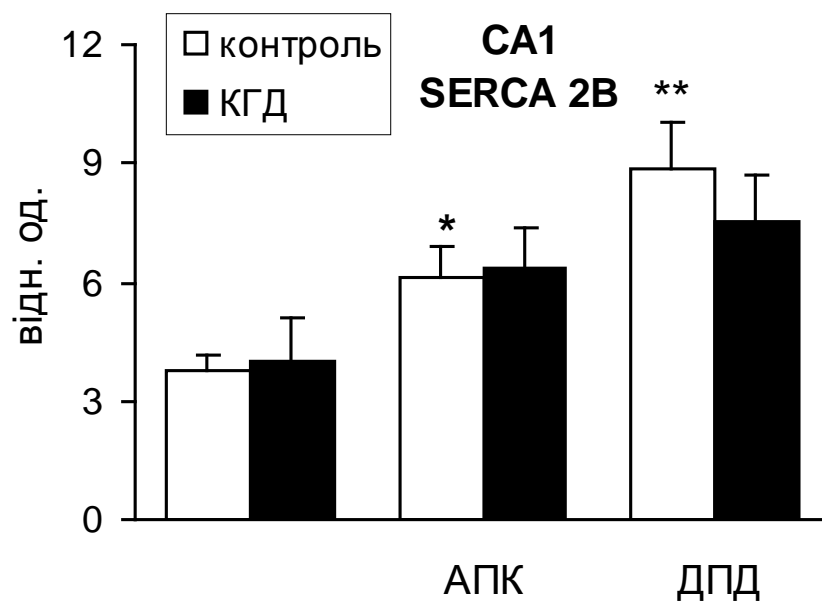


Рис. 3.39. Зміна рівня експресії SERCA2b, в CA1 зоні гіпокампа в контрольних умовах, після проведення КГД, АПК, поєднання АПК з КГД, додавання ДПД, та комбінування ДПД з наступним КГД * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по відношенню до контролю

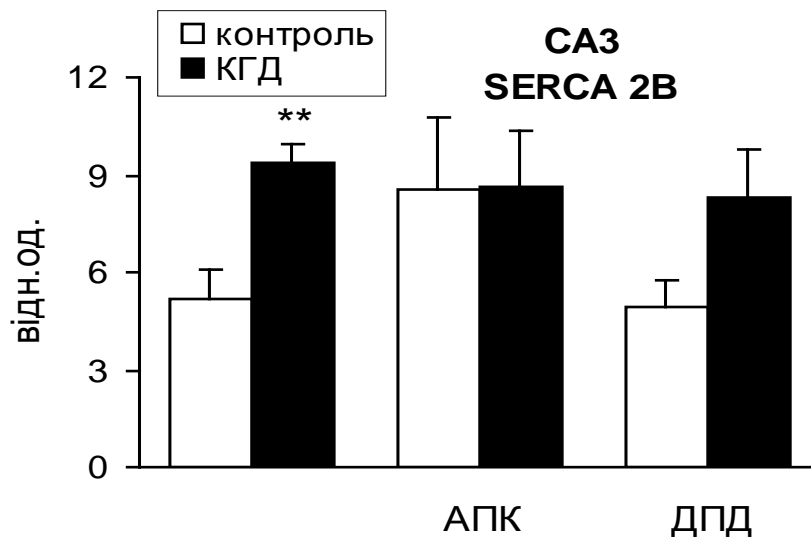


Рис. 3.40. Зміна рівня експресії SERCA2b, в CA3 зоні гіпокампа в контрольних умовах, після проведення КГД, АПК, поєднання АПК з КГД, додавання ДПД, та комбінування ДПД з наступним КГД. ** $p < 0,01$ по відношенню до контролю

Хоча, нами показано, що ні АПК, ні ДПД не веде до змін рівня експресії SERCA-2b в CA3 зоні гіпокампа (рис. 3.40). І проведення попереднього АПК, і додавання ДПД ведуть до зростання рівня експресії SERCA-2b в CA1 зоні (рис. 3.39). Рівень експресії SERCA-2b в CA1 зоні зростав на 62% ($n = 6$, $p < 0.05$) і на 135% ($n = 5$, $p < 0,01$, рис. 3.39) після проведення попереднього АПК і після додавання ДПД, відповідно, по відношенню до контролю ($n = 6$).

Крім того, зростання рівня експресії SERCA-2b спостерігалось в зрізах CA1 зони, які піддавалися КГД в комбінації з АПК, та з ДПД (зростання на 58%, $n = 6$ і на 88% $n = 6$, $p < 0.05$ по відношення до рівня експресії в зрізах після проведення КГД без прекодиціювань; рис. 3.39). Ці результати свідчать, що і АПК і ДПД ведуть до підвищення регуляції рівня експресії

SERCA-2b в нейронах CA1 зони гіпокампа. Отримані нами дані дозволяють припускати, що КГД по різному впливає на експресію PMCA та SERCA в нейронах CA1 та CA3 зони гіпокампа і, що АПК та ДПД селективно регулює рівень експресії Ca^{2+} -АТФаз в нейронах різних зон гіпокампа.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Розробка медичних препаратів та стратегій лікування ішемічного ураження ведеться постійно, але значних зрушень з моменту відкриття рекомбінантного активатору тканинного плазміногену (r-TPA) 20 років тому не було. Використання гепарину, аспірину, дипірамідолу, клопідогрелю не дають виразного лікувального ефекту, а наявність у r-TPA побічних ефектів і обмеженість його використання через трьохгодинне терапевтичне вікно, значно лімітує коло його використання. У нових дослідження значну увагу приділяють молекулярним механізмам ішемічного ураження, та пошуку фармакологічних та терапевтичних засобів, здатних попереджувати чи нівелювати розвиток ураження взагалі [57,58]. Клінічні випробування більшості провідних методів нейропротективного лікування не дають очікуваних ефектів і не відрізняються безпечністю, незважаючи на те, що дослідження, проведені на тваринах були досить успішними [67]. Однією з причин таких невдач може бути неправильно підібраний час для втручання в молекулярні процеси та не повне розуміння процесів загалом [68].

Дослідження механізмів ішемічного ушкодження та пошук терапевтичних методів лікування наслідків, спричинених ішемічним ураженням мозку, одна з важливих проблем сучасності. Висока чутливість до ішемічного інсульту не лише нейронів, а й тканин, що знаходяться в безпосередній близькості до зон ураження, ведуть до незворотних порушень і смерті пацієнта. Масове вивільнення збудливих амінокислот, особливо глутамату, може призвести як до відновлення роботи транспортерів глутамату, так і до Ca^{2+} залежного екзоцитозу [32]. Приєднання глутамату до йонотропних N-метил d-аспартат (NMDA)- і α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолепропіонієвої кислоти (AMPA)- рецепторів сприяє надмірному входу Ca^{2+} в клітину. При цьому надлишок йонів кальцію

активує ряд ферментів: фосфоліпаз, ендонуклеаз, протеаз, які руйнують цитозольні структури і запускають в клітині апоптоз. Вивільнення високих концентрацій глутамату спостерігається в ішемічному ядрі і в зоні пенумбри і веде до смерті клітини [215]. Глутаматіндукована смерть пов'язна з апоптозом, присутня характерна фрагментація ДНК, морфологічні зміни, активація кальпаїну, каспази-3, та транслокація фактору індукованого апоптозом (АІФ) з мітохондрій в цитоплазму і ядро. Припускають, що глутамат у високих концентраціях може індукувати апоптоз, як каспаз-залежним, так і каспаз-незалежним шляхом [33]. Експресія ізоформ РМСА, які не розщеплюються каспазою-3, запобігає розвитку дисбалансу внутрішньоклітинного Ca^{2+} , сповільнює кінетику апоптозу, затримує вторинний некроз, зміщуючи баланс смерті клітин від апоптозу до некрозу [25]. У нейронах розвитку ексайтотоксичності під час ішемічного ушкодження сприяє кальпаїн, що розщеплює NCX, основну систему виведення Ca^{2+} з клітини. Надекспресія кальпаїну (ендогенного інгібітору кальпаїну) або експресія NCX2 ізоформи, що не розщеплюється кальпаїном, попереджає надлишковий вхід кальцію Ca^{2+} і захищає нейрони від ексайтотоксично обумовленої смерті. Навпаки, пригнічення NCX3 РНК-інтерференцією робить нейрони чутливими до надлишку іонів Ca^{2+} та ексайтотоксичності [95].

Фармакологічне інгібування ASIC1a та нокаут гену ASIC1a оберігають мозок від ішемічного пошкодження навіть у присутності NMDA-блокатора [216]. Комбіноване інгібування глутаматопосередкованої ексайтотоксичності і ASIC1a–опосередкованого ацидозу показали нейропротективні результати [217,218].

Для запобігання розвитку ексайтотоксичності намагалися застосовувати блокатори NMDA– та AMPA –рецепторів [219,220], блокувати потенціалкеровані Ca^{2+} канали німодіпіном [54,221,222], стимулювали відкриття K^{+} -каналів [223,224], застосовували інфузійну терапію магнієм, використовуючи його здатність блокувати роботу

потенціалкерованих NMDA та Ca^{2+} каналів [225]. В той час як досліди на тваринах дали позитивний результат, клінічні дослідження очікуваних результатів не принесли.

Зростання входу Ca^{2+} в клітину завдяки надактивації глутаматних рецепторів супроводжується надмірним накопиченням Ca^{2+} в мітохондріях [226,227] порушенням їхньої роботи з наступним виходом Ca^{2+} в цитоплазматичний простір не лише з мітохондрій але й з ендоплазматичного ретикулу, незворотнього накопичення Ca^{2+} в клітині і порушення роботи компартментів: ЕР-стресу та накопичення вільних радикалів [227,228]. Оксидативний стрес – важливий фактор розвитку як некрозу так і апоптозу при ішемічному пошкодженні тканин, особливо при реперфузії [35,36]. Мітохондрії виступають основним джерелом супероксидів в нормальних клітинах, порушення їхньої роботи зумовлює розвиток оксидативного стресу під час і після ішемічного ушкодження [229]. Вільні радикали викликають пошкодження мембрани шляхом перекисного окислення ненасичених жирних кислот фосфоліпідів, що входять до складу клітинних мембран, спричиняючи пошкодження клітинних компонентів: нуклеїнових кислот, генів, включаючи гени відповідальні за відновлення структур [230]. До вільних радикалів здатних спричиняти оксидативний стрес відносять: оксид азоту NO та супероксид-аніон-радикал O_2^- [231]. Токсичність вільних радикалів зростає з утворенням пероксинітриту ONOO^- , який викликає окислення та нітрозилування тирозинових залишків білків [232]. Також до вільних радикалів відносять пероксид водню H_2O_2 та гідроксильні вільні радикали OH [233]. При нормальному функціонуванні клітини вільні радикали продукуються на низькому рівні і контролюються ендогенною антиоксидантною системою яка включає, супероксиддисмутазу (СОД), глутатіонпероксидазу, каталазу та антиоксидантні вітаміни, такі як α -токоферол та аскорбінова кислота. Ішемічне ж ураження сприяє накопичення надлишку NO, зокрема, збільшення глутаматопосередкованої

внутрішньоклітинної концентрації кальцію Ca^{2+} , в результаті кальмодулінзалежної регуляції NO-синтази (NOS) [31]. Активність всіх трьох форм NOS зростає після ішемії та реперфузії. Інактивація ж NOS-1 та NOS-2 має нейропротективний вплив на уражені діянки [234]. Ішемічне пошкодження та реперфузія підвищує рівень активних форм кисню, які ведуть до пошкодження мембранних білків, перокисного окислення докозагексаєнової кислоти, прекурсору нейропротекторних докозаноїдних білків, розщеплення ДНК через гідроксилування гуанінів та метилування цитозинів. Крім цього, вільні радикали можуть блокувати мітохондріальне дихання, інгібуючи комплекс ферментів електрон-транспортного ланцюга та сприяти формуванню мітохондріальної пори, з наступним вивільненням внутрішньомембранного та зовнішньомембранного вмісту мітохондрії, активуючи білки апоптозу [235–238]. Ендоплазматичний ретикулум також вразливий для окислювального стресу, і окисне ушкодження цього компартменту клітини в свою чергу теж сприяє загибелі нейронів після ішемії [239]. Показано, що використання інгібіторів редуктаз – статинів (HMG-CoA-редуктаз), при гострому ІУ впливає на продукцію NO. Проте результати досліджень, що проводяться в цьому напрямку суперечливі. В роботах, що проводилися на мишах *in vivo* було отримано негтивні ефекти від застосування статинів [240], а проведені дослідження на щурах, при введенні статинів після ішемії показали зменшення зони ішемічного ураження на МРТ [241].

Експериментальні дані показують, що у відповідь на ішемічне ушкодження, протягом декількох хвилин активується мікроглія і продукує велику кількість прозапальних медіаторів, активуються фактор некрозу пухлин TNF- α інтерлейкін IL-1 β і фактор активації тромбоцитів через 2 години після ішемії які посилюють пошкодження тканин [21,39,40], але також можуть захищати мозок від ішемічного та ексайтотоксичного ушкодження [41–43] [242] [95] [96] [245–247]. Продукування мікроглією та астроцитами як прозапальних так і протективних факторів в різні періоди

ушкодження додає складності і в розуміння патофізіологічних процесів і в стратегії нейропротекції при ішемічному ушкодженні [85], [86].

Для зменшення наслідків запалення, проходять дослідження блокаторів запалення на будь-якому етапі його розвитку. З використанням мишей з нокаутом генів, кодуючих ICAM, та блокадою його було показано зменшення розміру уражених ділянок *in vivo* [250–254]. Застосовуються антитіла для блокування молекул адгезії [52,78,255–264]. Комбінації анти-ICAM та анти-CD18 з тромболізом дала досить позитивні результати у разі застосування в межах 4 годинного вікна [265].

Всі можливі методи модулювання наслідків ішемічного ураження та відповіді на нього організмом стикаються так чи інакше з однією проблемою: часовим вікном в межах якого будуть актуальні терапевтичні маніпуляції – 3 години. Розробники фармакологічних засобів пом'якшення ІУ все частіше звертаються до необхідності активувати ендogenous нейропротективні механізми мозку. Саме дослідження ендogenous нейропротективних механізмів відповіді різних відділів мозку на ішемічне ураження і селективна чутливість до нього може стати одним з ключових етапів у попередженні розвитку тяжких пошкоджень.

Сьогодні для лікування ішемічного ураження у разі виникнення симптомів в межах 3 годин використовується r-ТРА, через 24 години після застосування r-ТРА, або у випадку звернення до медиків більш ніж через 3 години після прояву симптомів ІУ застосовують аспірин, гепарин, комбінацію аспірину-дипірамідолу з додаванням чи без клопідогрелю. У разі виявлення структурних уражень проводиться хірургічна чи ендovasкулярна терапія [266]. Незважаючи на успіхи використання тромболітичної терапії, через високий рівень кровотеч та реперфузійного пошкодження, пошук альтернативних методів лікування здатних попереджати розвиток запалення, утворення вільних радикалів та апоптозу чи некрозу та ін. не припиняється [267,268].

4.1 Виживання нейронів гіпокампа при попередньому АПК та додаванні ДПД

Добре відомо, що не всі відділи мозку реагують на ішемічне ураження однаково. Нейрони різних зон гіпокампа, мають різну чутливість до гіпоксичних уражень, так звану – "селективну чутливість". За однакових умов нейрони СА1 зони мають вищий рівень смертності, ніж нейрони гіпокампа СА3 зони гіпокампа [14,15,22,23]. Тож саме дослідження молекулярних механізмів відповіді цих популяцій нейронів привертає особливу увагу.

За умов моделювання ішемічного ураження на органотиповій культурі гіпокампа шляхом киснево-глюкозної 30 хв. депривації нами були отримані дані, що свідчили про достовірний вищий рівень смертності нейронів гіпокампа в СА1 зоні (кількість ПЙ-позитивних клітин на одиницю площі зростала у 25 разів по відношенню до контролю), ніж в СА3 зоні (кількість ПЙ-позитивних клітин на одиницю площі зростала у 12 разів по відношенню до контролю). Ці дані співпадають з даними інших робіт по дослідженню високої чутливості нейронів СА1 зони до ішемічного ураження [269,270].

Дослідження ендогенних механізмів нейропротекції показало, що короткі сублетальні епізоди кисневого голодування можуть призводити до підвищення резистентності нейронів при подальшому розвитку тривалої або тяжкої гіпоксії та ішемії [257], [259], [260]. Це явище відоме як аноксичне пре кондиціонування АПК. В нашій роботі ми розробили схему АПК, шляхом емпіричного підбору оптимальної тривалості аноксії для органотипових зрізів гіпокампа та кратності проведення аноксичних впливів. Поодинокі АПК не призводило до достовірної гибелі нейронів ні за умов тривалості АПК 2-хв., чи 5 хв. Прекондиціонування різної тривалості і повторюваності в комбінації ж з моделюванням КГД вело до зниження кількості ушкоджених клітин на одиницю площі з кожним наступним повторюванням аноксичного пре кондиціонування. І 5 хв. пре кондиціонування носило

вираженіший характер, ніж 2 хв. Роботи з дослідження можливих механізмів, що сприяють адаптації нейронів до ішемічного ураження при аноксичному прекодиціюванні, зфокусованні на дослідженні інгібування апоптозу в нейронах, нейрогенезу, та активуванні інших факторів, що сприяють виживанню. В деяких роботах з дослідження впливу АПК на тканини, включаючи мозок, ефект від попередніх прекодиціювань приписують активації фактора, що індукується гіпоксією (HIF-1) – транскрипційного фактора білкової природи, що активується в клітині у відповідь на падіння доступності кисню [72,272,273]. HIF-1 – гетеродимерний комплекс, що в активному стані веде до підвищення виживання клітин, індуюючи експресію багатьох власних генів-мішеней, таких як: ендотеліальний ростовий фактор, транспортери глюкози, антиоксидантні ферменти, білки теплового шоку, антиапоптичні гени та багато інших [72,274,275]. Нас, в нашій роботі, цікавила особливість деградації однієї з субодиниць фактору, а саме HIF- α , за умов доступності кисню, що спричиняла зупинку роботи всього комплексу та процесів, які HIF-1 індукує [14,15,22,23]. Гідроксилування HIF- α субодиниці може бути припинене за гіпоксичних умов, при додаванні хлориду кобальту, та йонів заліза [194,195,276]. За цих умов HIF- α -субодиниця стабілізується і в подальшому гетеродимеризується з β -субодиницею і активується адаптивна генетична відповідь спрямована на компенсацію кисневого дефіциту [111,113,277–281]. HIF-3 α на відміну від HIF-1 α та HIF-2 α слабший транскрипційний фактор [282], хоча HIF-3 α не містить кисень-чутливого і трансактиваційного домену вона працює як домінант-негативний регулятор HIF-субодиниць, пригнічуючи ендогенну експресію VEGF при гіпоксії [127,144]. Дослідження продуктів альтернативного сплайсингу HIF-3 α у людини показує, що HIF-3 α 4 ізоформа, функціонує, як домінант-негативний інактиватор активності HIF-1 [283]. Крім того, відомо, що за низьких концентрацій в клітинах HIF-1 β - субодиниці, HIF-3 α субодиниця здатна зв'язуватися з HIF-1 α та HIF-2 α субодиницями і пригнічувати активацію

геннів мішеней HIF-1 [284]. HIF-1 може запускати як процеси виживання , так і процеси, що сприяють смерті клітин, причина активації тих чи інших процесів, досі не з'ясована [194].

Відомо, що ішемічне ураження веде до інгібування роботи HIF-пролілгідроксилаз і наступного накопичення HIF [4], в роботах Ндубуїзу та співавторів, показано, що з віком адаптивна відповідь HIF-1 на ішемію послаблюється [285]. Цей ефект спричинений зростанням активності HIF-пролілгідроксилаз і не супроводжується зниженням рівня експресії субодиниць HIF-1 [285]. Добре відомо, що ішемічне ураження призводить до зростання рівня HIF-1 α в дослідженнях мозку і *in vivo* і *in vitro* [286–288]. В дослідженнях експресії HIF-1 α в гіпокампі Хайдбредера та співавт., повідомлялося, що помірна гіпоксія не впливає на зміну рівня експресії HIF-1 α , і призводить до зростання рівня експресії HIF-3 α в гіпокампі через 2 год. після проведення [289]. В свою чергу в роботах групи дослідників, що проводили двохсудинну оклюзію на щурах було показано, що низька концентрація HIF-1 α в гіпокампі може сприяти виживанню нейронів після проведення фокальної ішемії [186].

Пригнічення активації експресії генів мішеней HIF за рахунок зв'язування HIF-1 β з HIF-3 α субодиницею було показане в тканинах мозочка, нирок, епітелію рогівки, і в деяких клітинних лініях [14,127,282]. Експресія HIF-3 α субодиниці також стабілізується за ішемічних умов [289], і як і в інших відділах мозку [127,289], в гіпокампі може вести до блокування роботи HIF-1.

В нашій роботі показано, що в нейронах CA1 зони рівень експресії HIF-1 α вищий, ніж в нейронах CA3 зони. Також ми показали, що рівень експресії HIF-3 α достовірно нижчий, порівнюючи з рівнем експресії HIF-1 α і ця різниця спостерігається в обох зонах гіпокампа. Це співпадає з даними інших груп, що показали експресію HIF-1 α за нормальних умов в нейронах гіпокампа мишей [287,290] та щурів [290]. В роботах Хайдбредера та співавт. було детектовано експресію HIF-3 α при нормоксії, ніякої ж різниці

в експресії HIF-1 α та HIF-3 α не виявлено. HIF-1 експресується не лише нейронами, а й астроцитами, епіндемальними клітинами, та ендотелієм [289], в нашій роботі ж, в свою чергу досліджувалися власне пірамідальні нейрони гіпокампа і була показана різниця рівнів експресії HIF-1 α та HIF-3 α в нейронах.

КГД-індуковане пошкодження нейронів супроводжувалося достовірним зниженням рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α в нейронах CA1 зони. Цікаво, що вплив дії КГД на експресію HIF-3 α в CA3 зоні носив вираженіший характер, експресія HIF-3 α після КГД знижувалася по відношенню до контролю. Достовірних змін рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α в CA3 зоні не спостерігалось.

Аноксичне прекодиціювання не впливало достовірно на зміну рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α порівняно з контролем в обох зонах, що співвідноситься з отриманими нами результатами з дослідження рівня ПЙ-позитивних клітин після проведення АПК, і відповідно порівняно з контролем супроводжувалося низькою смертністю клітин в обох зонах гіпокампа. Комбінування АПК з наступним КГД, попереджувало загибель клітин, індуковану КГД. При цьому наші дослідження зміни рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α показали, що в цій експериментальній групі в CA1 зоні рівень експресії субодиниць, достовірно не змінювався, і залишався на рівні співставному з контрольним, хоча й зазнав значного зниження після проведення КГД. Фактично проведення АПК перед КГД не зумовлювало зниження рівня експресії HIF-1 α в CA1 і CA3 зоні. Проте важливою є різниця, що спостерігалася в рівнях експресії HIF-1 α та HIF-3 α в групах з АПК і КГД, або ж тільки з КГД. Зрізи, що піддавалися КГД, мали достовірно нижчий рівень експресії HIF-1 α , ніж ті, в яких попередньо проводилося АПК. Також різниця в рівні експресії HIF-1 α та HIF-3 α між зрізами в яких проводилося тільки АПК і тільки КГД була достовірною. Наші дані свідчать, що попереднє проведення АПК може попереджати КГД-індуковану супресію генів HIF-1 α та HIF-3 α .

В роботах Лі та співавт. показано, що АПК стимулює накопичення HIF-1 активніше, ніж ішемія в мозку [286]. Нами достовірних змін в рівні експресії HIF-1 α та HIF-3 α після АПК виявлено не було. Тому можна зробити висновок, що нейропротективний ефект АПК може частково бути опосередкованим попередженням супресії HIF-1. Можливо, механізм АПК-опосередкованої нейропротекції швидше пов'язаний з запобіганням деградації білка HIF-1, ніж з підвищенням рівня експресії HIF. Одним з таких механізмів є HIF-пролілгідроксилази, які власне і відповідають за деградацію HIF, за нормоксичних умов. В літературі було показано, що додавання HIF-проліл-4-гідроксилаз перед ішемічним ураженням веде до виживання ембріональних коркових нейронів у щурів при окислювальному стресі [195]. Авторами показано, що і додавання HIF-проліл-4-гідроксилаз, і РНК-інтерференція захищають нейрони від окислювального стресу при нормоксії.

В роботі групи дослідників під керівництвом Х.Чавеса [180], при дослідженні зміни експресії HIF-1 α за умов оклюзії середньої мозкової артерії було показане двохфазне хвилеподібне зростання концентрації HIF-1 α після проведення ішемічного ураження. Починаючи з 1 години спостерігалось зростання кількості HIF-1 α , головним чином в нейронах, яке продовжувалося до 1 доби, вдруге зростання концентрації HIF-1 α спостерігалось на 2 д. і тривало до 8 доби. Цікаво, що ці дані добре співвідносяться з роботами в яких досліджувалася динаміка загибелі клітин після проведення ішемічних впливів на гіпокампи [291,292]. Цімер та співавт. 2002 року показали, що в СА1 зоні гіпокампа максимальна кількість ПЙ-позитивних клітин спостерігалася на 24 годині, а достовірна по відношенню до контролю вже на 9 годині, за допомогою фарбування ядер Hoechst ними було показано достовірну деформацію ядер в пірамідальних нейронах гіпокампа вже через 1 годину після 30 хвилинного КГД з повною наступною редукцією розмірів ядер на 6 годину [291]. В роботах же іншої групи дослідників на чолі з Андре Вудом [292]

досліджувалася не тільки кількість ПЙ-позитивних клітин на культурі гіпокампа, а й за допомогою імуноблотингу досліджувалася активність каспаз 1, 2, 3, 8 та 11 на різних проміжках часу після 35 хвилинної КГД, ними не було детектовано активності 1, 2 та 8 каспаз, але в СА1 зоні показана активність каспази 3 та 9. На 12 годині після КГД більшість нейронів СА1 зони були каспаз-3-позитивними, в деяких групах клітин локалізація каспаз-3 спостерігалася в ПЙ-позитивних клітинах, на 24 годині майже всі каспаз-3-позитивні клітини були і ПЙ-позитивними. Активація каспази 9 також зростала через 12 годин після КГД і знижувалася на 24 годинні. Активація каспаз достовірно передувала смерті нейронів. Через добу активність каспази-3 в ПЙ-позитивних клітинах не спостерігалася, що може бути пов'язане з активацією в нейронах каспаз-незалежних шляхів апоптозу на той час [292].

Відомо, що HIF-1 має велику кількість генів-мішеней [106,125,154], [212], [213] які спрямовані на активацію росту судин, еритропоез, гліколіз, апоптоз, підтримання енергетичного метаболізму. Аналіз двохвильового характеру розподілу активації HIF-1 в роботах групи Х.Чавеса [290] показав зростання експресії генів, що відповідають за ферменти гліколізу, проангіогенні білки та гени-мішені HIF-1, пов'язані з апоптозом (bNIP3, Noxa, Nix, and RTP801). Друга фаза активності HIF-1 характеризувалася достовірним підвищенням рівнів експресії генів, задіяних в ангіогенезі (*Vegf*, *Flt-1*, *PAI-1*, *Ang-2*, *Flk*), зберігався також високий рівень експресії Glut-1, енолази, та ЕРО, активації ж генів, що сприяють смерті клітин не відбувалося. Можливо в гострій фазі ішемічного ураження (до 24 год) HIF-1 α стимулює смерть клітин, через активацію про-апоптичних генів-мішеней, а в пізній фазі активує адаптивні механізми, що сприяють виживанню нейронів. В роботі Хілтона на мишах з делецією алелі HIF-1 α , показано, що при гострому ішемічному інсульті, ця делеція має нейропротективний характер [186]. На сьогоднішній день залишається не зрозумілим, яким саме чином регулюється вплив HIF-1 α на подальше виживання чи смерть клітин

після ішемічного ураження мозку [293], можливо, ці процеси залежать від тривалості ішемічного ураження і його тяжкості, проте в нашій роботі ми показали, що застосування прекодиціювання з використанням інгібітора HIF-пролілгідроксилаз мало нейропротективний ефект на нейрони CA1 зони гіпокампа.

4.2 Зміни Ca^{2+} -гомеостазу в пірамідальних нейронах гіпокампа після проведення КГД

Гіпокамп являється найвразливішою до ішемічного ураження структурою мозку з селективною вразливістю нейронів CA1 зони спричиненою індукованою ішемією Ca^{2+} залежною ексайтотоксичністю. В своїй роботі ми вивчали нейрон-специфічні порушення Ca^{2+} -гомеостазу після моделювання ішемічного ураження (КГД) та нейропротективну роль АПК та HIF-1 *in vitro*.

Нейрони CA1 та CA3 переносять гіпоксичні та ішемічні ураження по-різному, що спричиняється порушенням Ca^{2+} -гомеостазу. Після проведення КГД, індукований деполяризацією $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт сповільнювався в обох зонах, але порушення роботи внутрішньоклітинних депо Ca^{2+} спостерігалися виключно в нейронах CA1 зони. Знижувався рівень вивільнення Ca^{2+} з ЕР та рівень його накопичення в депо, що приводило до зростання кількості уражених клітин в CA1 зоні гіпокампа на 4 годину реоксигенації після 30 хв КГД [294]. Уповільнення кінетики $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнту в CA1 та CA3 нейронах після КГД відповідає порушенню процесів утилізації йонів Ca^{2+} з цитозолу під час деполяризації нейронів. Механізмів, відповідальних за утилізацію Ca^{2+} , кілька: акумуляція Ca^{2+} всередині ЕР завдяки SERCA; виведення Ca^{2+} за межі клітини за допомогою PMCA та $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінником (NCX); та акумуляція Ca^{2+} в мітохондріях. Роль мітохондрій та $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінника у зниженні концентрації цитоплазматичного Ca^{2+} в нейронах гіпокампа мінорна, в той час як і PMCA, і SERCA приймають активну участь у стабілізації рівня Ca^{2+} [90].

NCX мітохондрій низькоафінний, але має велику ємність, індукований ішемічним ураженням надмірний вхід Ca^{2+} у мітохондрії та порушення їхньої роботи індукує відстрочену нейродегенерацію в мозку [295,296]. КГД індуковане уповільнення швидкого компоненту транзйенту спостерігається лише в нейронах CA1 зони і вказує на порушення функціонування Ca^{2+} -АТФаз, що підтверджується зниженням агоніст-індукованого виходу Ca^{2+} з ЕР і зниженням акумуляції Ca^{2+} в ЕР нейронів CA1 зони. Зниження рівня обох підтипів РМСА: РМСА-1 та РМСА-2, вказує на порушення роботи Ca^{2+} -АТФаз в нейронах CA1 зони. Зниження експресії РМСА-3, але не SERCA2b, спостерігалось після проведення ішемії переднього мозку [297]. Дисфункція Ca^{2+} транспортних систем після ІУ веде до надмірного входу Ca^{2+} , порушення Ca^{2+} гомеостазу і відстроченої смерті у нейронах вразливих регіонів гіпокампа [18,298,299]. Дисфункція Ca^{2+} -гомеостазу після ішемії в CA1 та CA3 відрізняється і супроводжується диференціальними змінами рівня експресії Ca^{2+} -АТФаз, що вказує на різну природу клітинної відповіді і посттранскрипційного регулювання в нейронах цих зон. Активування експресії SERCA2b в нейронах CA3 зони після КГД та відсутність змін рівня експресії РМСА1 та РМСА2 дає можливість зробити висновки, що Ca^{2+} -АТФаза відіграє важливу роль у виживанні нейронів CA3 зони після КГД-індукованого порушення Ca^{2+} -гомеостазу і індукованої ним Ca^{2+} - залежної ексайтотоксичності.

Активування SERCA2b в нейронах CA3 зони гіпокампа попереджає порушення роботи Ca^{2+} -депо після ішемічного ураження, та принаймні частково пояснює причини виживання нейронів у цій зоні під час індукування ішемією надмірного входу Ca^{2+} , та спричиненої ним ексайтотоксичності.

4.3 Нейропротективний ефект АПК на КГД-індуковані зміни Ca^{2+} -гомеостазу

Короткострокове гіпоксичне або аноксичне прекодиціювання, добре відомий феномен, здатний підвищувати резистентність мозку до наступного

тривалого ішемічного ураження, попереджати загибель нейронів CA1 зони гіпокампа при інсульті [300]. Незважаючи на те, що ключовим регулятором толерантності нейронів до ішемічного ураження вважається мітохондріальний каспаз-індукований сигналінг [295,301], молекулярні механізми зрозумілі лише частково. Ми показали, що крім механізмів пов'язаних з впливом мітохондрій, є принципово інші, завдяки яким прекодиціювання попереджає розвиток порушень після КГД і це опосередковується через активацію Ca^{2+} -АТФаз. Після проведення АПК активується експресія SERCA2b і нейронах CA1 зони гіпокампа, ініціюючи клітинну адаптацію до зниженого рівня доступності кисню на пост-трансляційному рівні. Наші результати показують, що на функціональному рівні нівелюється значною мірою спричинене КГД порушення роботи Ca^{2+} -депо в нейронах CA1 зони: вивільнення Ca^{2+} з ЕР; його накопичення в депо; та вклад ЕР в зниження $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзйенту, обумовлене деполяризацією мембрани після КГД. В нейорнах CA3 зони спостерігалася активація SERCA2b після КГД, яка також супроводжувалася стабільною роботою Ca^{2+} -депо, що підтверджує роль SERCA2b у зниженні вразливості до КГД CA3 зони. Хоча механізми транскрипційного контролю невідомі, прекодиціювання може модулювати експресію гену, кодуєчого Ca^{2+} -АТФази, а також посттрансляційні зміни, індуковані ішемією [302].

Адаптивні відповіді спричинені прекодиціюванням залежать від часового вікна між прекодиціюваннями та індують розвиток толерантності від кількох хвилин до годин чи навіть днів [300,303,304]. Поєднавши короткострокове 5 хвилинне прекодиціювання з його триразовим повторенням з інтервалом 12 годин, ми досягли ефекту активації і генів, і синтезу білка *de novo*, необхідного для тривалої адаптації клітин до наступного ішемічного ураження. Така нейропротективна стратегія дала можливість захистити нейрони CA1 зони від наступного тривалого ішемічного ураження – 30 хв. КГД *in vitro* [294]. Поєднання КГД з АПК спричинює зростання рівня SERCA2b та забезпечує нормальне

функціонування депо ER, і нейропротективний ефект АПК забезпечується саме модуляцією роботи внутрішньоклітинного Ca^{2+} депо [305]. Хоча АПК і спричиняє зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзйенту, обумовленого деполяризацією мембрани в нейронах CA1 зони, це швидше відображає гостру адаптивну відповідь, що обумовлена проникністю іонних каналів, фосфорилуванням білків, чи іншими посттрансляційними модифікаціями [300], АПК не може запобігти уповільненню повільної складової транзйенту в нейронах CA1 та CA3 зони після КГД. З іншого боку, це може бути пов'язане з тим, що АПК не може повністю справитися з багаточисленними системами, що опосередковують збудливість нейронів.

4.4 HIF-1 та Ca^{2+} -гомеостаз в пірамідальних нейронах гіпокампа

Нейропротективні властивості HIF-1 при розвитку гострих чи хронічних ішемічних уражень широко досліджені як в роботах *in vitro*, так і *in vivo* [180,183,306], при цьому зв'язок між HIF-1 та Ca^{2+} -гомеостазом майже не досліджено. В нашій роботі вперше показано роль HIF-1 α у нейронспецифічних змінах Ca^{2+} гомеостазу і механізм HIF-1 α спричиненого попередження розвитку порушень в роботі Ca^{2+} -депо пірамідальних нейронів при КГД.

З огляду на особливості механізмів деградації HIF-1 α за нормоксичних умов [113,307], ми використали інгібітор HIF-пролілгідроксилаз для попередження деградації HIF-1 α субодиниці та активування транскрипційного фактору HIF-1 і транскрипції його генів-мішеней відповідно [108,308]. Сприяючи активації транскрипції генів, що контролюються HIF-1, можна дослідити як саме він впливає, і чи впливає взагалі на експресію SERCA2b та яку відіграє роль в КГД-індукованих порушеннях Ca^{2+} -гомеостазу нейронів гіпокампа. Інгібування деградації HIF-1 α підвищує рівень експресії SERCA2b в нейронах CA1 зони, який залишається підвищеним після КГД, спостерігається, як і у випадку з застосуванням АПК, відсутність порушень в роботі Ca^{2+} -депо в цих

нейронах. І вихід Ca^{2+} з ЕР, і акумуляція всередині депо в нейронах CA1 зони не змінюється після КГД за умов додавання інгібітора ДПД, що разом з підвищенням рівня експресії SERCA2b вказує на залежність цього процесу від активності HIF-1. Хоча свідчень про те, що білки родини SERCA належать до генів-мішеней HIF-1, поки що немає, наші результати вказують на те, що це можливо, оскільки функціональний взаємозв'язок в наших експериментах прослідковується досить чітко. Очевидно, саме це є ще одним механізмом, за допомогою якого HIF-1 опосередковує нейропротективний вплив при ішемічному ураженні та попереджає розвиток Ca^{2+} -залежної ексайтотоксичності, не рахуючи добре відомі [156,309]. Ефекти отримані від стабілізації роботи HIF-1, були аналогічними тим, що отримали при дослідженні нейропротективного механізму АПК [183]. Як і при АПК, інгібування деградації HIF-1 α веде до зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзйенту, обумовленого деполяризацією мембрани пірамідальних нейронів, і, як і у випадку з АПК, інгібування деградації HIF-1 α не впливало на КГД-індуковане зниження кінетики спаду $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Це вказує на швидку активацію іонних каналів/рецепторів, чутливих до рівня кисню, а не на активацію HIF-опосередкованих тривалих адаптативних механізмів, здатних модулювати нейрональну ексайтотоксичність. З іншого боку відомо, що HIF-1 сприяє активації генів, що кодують Ca^{2+} канали Т-типу протягом гіпоксії [310], які в свою чергу можуть приводити до зростання входу $[\text{Ca}^{2+}]_i$, залишаючи питання про те, яка ж насправді роль HIF-1-залежного зростання в клітинах збудливості, для подальших досліджень.

В нашій роботі показано перспективність дослідження молекулярних механізмів прекодиціювань, як для розуміння фундаментальних механізмів ендогенної адаптації, так і для використання при розробці подальших стратегій терапевтичного пом'якшення перебігу ішемічного ураження, та відновлення функціонування гіпокампа. Власне і АПК і інгібування роботи HIF-пролілгідроксилаз сприяють не лише відновленню Ca^{2+} гомеостазу в

клітинах гіпокампа, а й виживанню клітин в цілому після моделювання ішемічного ураження.

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 $[Ca^{2+}]_i$ у нейронах СА1 зони, що супроводжувалось сповільненням відновлення $[Ca^{2+}]_i$ після деполяризації нейронів та зниженням рівня Ca^{2+} у внутрішньоклітинних $[Ca^{2+}]_i$ депо після КГД, тоді як у нейронах СА3 зони таких змін не спостерігалось.

4. Розроблено оптимальну модель короткострокового аноксичного прекондиціювання (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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke / T.M. Woodruff, J. Thundyil, S.-C. Tang [et al.] // *Mol. Neurodegener.* – 2011. – № 1. – P. 11
2. Kneebone I.I. A Framework to Support Cognitive Behavior Therapy for Emotional Disorder After Stroke / I.I. Kneebone // *Cogn. Behav. Pract.* – 2014
3. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia response / M. Heikkilä, A. Pasanen, K.I. Kivirikko [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2011. – № 23. – P. 3885–3901
4. Selective inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl-hydroxylase 1 mediates neuroprotection against normoxic oxidative death via HIF- and CREB-independent pathways / A. Siddiq, L.R. Aminova, C.M. Troy [et al.] // *J. Neurosci.* – 2009. – № 27. – P. 8828–8838
5. NCX1 is a novel target gene for hypoxia-inducible factor-1 in ischemic brain preconditioning / V. Valsecchi, G. Pignataro, A. Del Prete [et al.] // *Stroke.* – 2011. – P. 754–763
6. Loboda A. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical / A. Loboda, A. Jozkowicz, J. Dulak // *Mol. Cells.* – 2010. – № 5. – P. 435–442
7. Huang D. Hypoxia and cancer cell metabolism HIF-1 and Warburg Effect HIF-1 and Lipid Metabolism in Cancer Cells / D. Huang, C. Li, H. Zhang // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* – 2014. – № January. – P. 214–219
8. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and beta-amyloid generation / X. Zhang, K. Zhou, R. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – № 15. – P. 10873–10880
9. López-Hernández B. The endoplasmic reticulum stress and the HIF-1 signaling pathways manage the neuronal damage during chemical hypoxia / B. López-Hernández, V. Ceña, I. Posadas // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – P. n/a–n/a
10. Shi H. Hypoxia inducible factor 1 as a therapeutic target in ischemic stroke / H. Shi // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – № 34. – P. 4593–4600

11. Badawi Y. Hypoxia-inducible factor 1 protects hypoxic astrocytes against glutamate toxicity / Y. Badawi, P. Ramamoorthy, H. Shi // *ASN Neuro.* – 2012. – № 4. – P. 231–241
12. Inhibition of HIF prolyl-4-hydroxylases by FG-4497 reduces brain tissue injury and edema formation during ischemic stroke / S. Reischl, L. Li, G. Walkinshaw [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – № 1
13. Protective effect of HIF-1 α against hippocampal apoptosis and cognitive dysfunction in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage / Y. Dong, Y. Li, D. Feng [et al.] // *Brain Res.* – 2013. – P. 114–121
14. Neuroprotective agents for the treatment of acute ischemic stroke / B. Ovbiagele, C.S. Kidwell, S. Starkman [et al.] // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* – 2003. – P. 9–20
15. Muir K.W. Excitatory amino acid antagonists for acute stroke / K W Muir, K R Lees // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2003. – № 3. – P. CD001244
16. Schmidt-Kastner R. Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia / R. Schmidt-Kastner // *Neuroscience.* – 2015. – P. 259–279
17. Chemokines and the hippocampus: A new perspective on hippocampal plasticity and vulnerability / L.L. Williamson, S.D. Bilbo [et al.] // *Brain. Behav. Immun.* – 2013. – P. 186–194
18. Hardingham G.E. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders / Giles E Hardingham, Hilmar Bading // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2010. – № 10. – P. 682–696
19. Caplan L.R. Caplan's Stroke / L.R. Caplan // *Caplan's Stroke.* – 2009. – 146-217 P.
20. CEREBRAL ISCHEMIA AND STROKE / Dimitri Agamanolis [et al.] // *Neuropathol. An Illus. Interact. course Med. students Resid.* – 2013. – P. 1–5
21. Dirnagl U. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view 4441 / U. Dirnagl, C. Iadecola, M. a Moskowitz // *Trends Neurosci.* – 1999. – P. 391–397
22. Ikonomidou C. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for

- stroke and traumatic brain injury? / Chrysanthy Ikonomidou, Lechoslaw Turski // *Lancet Neurol.* – 2002. – № 6. – P. 383–386
23. General care in the acute phase / H.D. Limpar P [et al.] // *Acute Stroke Treat.* – 2003. – P. 113–122
 24. Majno G. Apoptosis, oncosis, and necrosis An overview of cell death / G Majno, I Joris // *Am. J. Pathol.* – 1995. – № 1. – P. 3–15
 25. Broughton B.R.S. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia / B.R.S. Broughton, D.C. Reutens, C.G. Sobey // *Stroke.* – 2009
 26. Ginsberg M.D. The new language of cerebral ischemia / M.D. Ginsberg // *Am. J. Neuroradiol.* – 1997. – P. 1435–1445
 27. The molecular basis of thrombolysis and its clinical application in stroke / V. Murray, B. Norrving, P. a G. Sandercock [et al.] // *J. Intern. Med.* – 2010. – P. 191–208
 28. Uyttenboogaart M. Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke / M. Uyttenboogaart, J. De Keyser, G. Luijckx // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2009. – № 14. – P. 1285–1290
 29. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke / M. a Moro, A. Almeida, J.P. Bolaños [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – № 10. – P. 1291–1304
 30. Lo E.H. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke / E.H. Lo, T. Dalkara, M. a Moskowitz // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2003. – № May. – P. 399–415
 31. Beal M.F. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases / M.F. Beal // *FASEB J.* – 1992. – P. 3338–3344
 32. Zhang Y. Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens / YueMei Zhang, Bhagu R Bhavnani // *BMC Neurosci.* – 2006. – P. 49
 33. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia / T. Sugawara,

- M. Fujimura, N. Noshita [et al.] // *NeuroRx*. – 2004. – № January. – P. 17–25
34. Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity / D. Bano, K.W. Young, C.J. Guerin [et al.] // *Cell*. – 2005. – P. 275–285
35. Visualization of NMDA receptor-induced mitochondrial calcium accumulation in striatal neurons / T.I. Peng, M.J. Jou, S.S. Sheu [et al.] // *Exp. Neurol.* – 1998. – № 149. – P. 1–12
36. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition / a E. Vercesi, a J. Kowaltowski, M.T. Grijalba [et al.] // *Biosci. Rep.* – 1997. – № 1. – P. 43–52
37. McCulloch J. A radical approach to stroke therapy / J McCulloch, D Dewar // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001. – № 20. – P. 10989–10991
38. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice / K. Gertz, U. Laufs, U. Lindauer [et al.] // *Stroke*. – 2003. – P. 551–557
39. Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage / L. Sironi, M. Cimino, U. Guerrini [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – P. 322–327
40. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury / C. Iadecola // *Trends Neurosci.* – 1997. – P. 132–139
41. Cytotoxicity of microglia / R.B. Banati, J. Gehrmann, P. Schubert [et al.] // *Glia*. – 1993. – P. 111–118
42. Tumor Necrosis Factor- α : A Mediator of Focal Ischemic Brain Injury / F.C. Barone, B. Arvin, R.F. White [et al.] // *Stroke*. – 1997. – № 6. – P. 1233–1244
43. Rothwell N. The Role of Interleukin 1 in Acute Neurodegeneration and Stroke: Pathophysiological and Therapeutic Implications / N. Rothwell, S. Allan, S. Toulmond // *J. Clin. Invest.* – 1997. – № 11. – P. 2648–2652
44. Inhibition of α_4 integrin protects against transient focal cerebral ischemia in normotensive and hypertensive rats / J.K. Relton, K.E. Sloan, E.M. Frew [et al.] // *Stroke*. – 2001. – № 1. – P. 199–205
45. Antibody to the α_4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats / K. Becker, D. Kindrick, J. Relton [et al.] // *Stroke*. – 2001. –

№ 1. – P. 206–211

46. Inflammatory Cell Adhesion Molecules in Ischemic Cerebrovascular Disease / C.J.M. Frijns [et al.] // *Stroke*. – 2002. – № 8. – P. 2115–2122
47. Doyle K.P. Mechanisms of ischemic brain damage / K.P. Doyle, R.P. Simon, M.P. Stenzel-Poore // *Neuropharmacology*. – 2008. – № 3. – P. 310–318
48. Lesion evolution in cerebral ischemia / T. Back, T. Hemmen, O.G. Schüler [et al.] // *J. Neurol.* – 2004. – № 4. – P. 388–397
49. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: I Three-dimensional autoradiographic image-analysis of local cerebral glucose metabolism-blood flow interrelationships during ischemia and early recirculation / L. Belayev, W. Zhao, R. Busto [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1997. – № 12. – P. 1266–1280
50. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia / K.A. Hossmann [et al.] // *Ann. Neurol.* – 1994. – № 4. – P. 557–565
51. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat / J.H. Garcia, Y. Yoshida, H. Chen [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1993. – № 2. – P. 623–635
52. Induction of DNA Fragmentation After 10 to 120 Minutes of Focal Cerebral Ischemia in Rats / Y. Li, M. Chopp, N. Jiang [et al.] // *Stroke*. – 1995. – № 7. – P. 1252–1258
53. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection / L. Galluzzi, E. Morselli, O. Kepp [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* – 2009. – № 5. – P. 402–413
54. Labiche L.A. Clinical trials for cytoprotection in stroke / Lise A Labiche, James C Grotta // *NeuroRx*. – 2004. – № 1. – P. 46–70
55. Love S. Neuronal death in brain infarcts in man / S. Love, R. Barber, G.K. Wilcock // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2000. – P. 55–66
56. Apoptosis is not an invariable component of in vitro models of cortical cerebral ischaemia / P.A. Jones, G.R. May, J.A. McLuckie [et al.] // *Cell Res.* – 2004. – № June. – P. 241–250

57. Clark W. Reperfusion injury in stroke / W. Clark // *Emedicine*. – 2001. – P. 15–18
58. Combination therapy for ischemic stroke: potential of neuroprotectants plus thrombolytics / S.-D. Chen, J.-M. Lee, D.-I. Yang [et al.] // *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. – 2002. – № 5. – P. 303–313
59. Viru A. Early contributions of Russian stress and exercise physiologists / A. Viru // *J. Appl. Physiol.* – 2002. – № 4. – P. 1378–1382
60. “Ischemic tolerance” phenomenon found in the brain / K. Kitagawa, M. Matsumoto, M. Tagaya [et al.] // *Brain Res.* – 1990. – № 1. – P. 21–24
61. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? / J. Moncayo, G.R. de Freitas, J. Bogousslavsky [et al.] // *Neurology*. – 2000. – № 11. – P. 2089–2094
62. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? / M. Weih, K. Kallenberg, A. Bergk [et al.] // *Stroke*. – 1999. – № 9. – P. 1851–1854
63. Brief exposure to hypoxia induces bFGF mRNA and protein and protects rat cortical neurons from prolonged hypoxic stress / T. Sakaki, K. Yamada, H. Otsuki [et al.] // *Neurosci. Res.* – 1995. – № 3. – P. 289–296
64. Dirnagl U. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use / U. Dirnagl, K. Becker, A. Meisel // *Lancet Neurol.* – 2009. – № 4. – P. 398–412
65. О. В.С. Гиппокамп и память / В.С. О. 1975. – 267 . P.
66. Gordon M. Shepherd *Neurobiology* / Gordon M. Shepherd 1988. – P. 689
67. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia / T. Kirino // *Brain Res.* – 1982. – № 1. – P. 57–69
68. Pulsinelli W.A. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia / W.A. Pulsinelli, J.B. Brierley, F. Plum // *Ann. Neurol.* – 1982. – № 5. – P. 491–498
69. Rothman S.M. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage / S M Rothman, J W Olney // *Ann. Neurol.* – 1986. – № 2. – P. 105–

70. Choi D.W. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death / D W Choi, S M Rothman // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1990. – P. 171–182
71. Alterations of potassium currents in ischemia-vulnerable and ischemia-resistant neurons in the hippocampus after ischemia / B. Zou, Y. Li, P. Deng [et al.] // *Brain Res.* – 2005. – P. 78–89
72. The functional genome of CA1 and CA3 neurons under native conditions and in response to ischemia / D. Newrzella, P.S. Pahlavan, C. Krüger [et al.] // *BMC Genomics.* – 2007. – P. 370
73. Kass I.S. Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice / I S Kass, P Lipton // *J. Physiol.* – 1982. – P. 459–472
74. LIPTON, P., K. M. RALEY A.D.L. Long-term inhibition of synaptic transmission and macromolecular synthesis following anoxia in the rat hippocampal slice: interaction between Ca and NMDA receptors In: *Mechanisms of Cerebral Hypoxia and Stroke* / A.D.L. LIPTON, P., K. M. RALEY 1988. – P. 229–249.
75. Carter A.J. Activation of excitatory amino acid receptors cannot alone account for anoxia-induced impairment of protein synthesis in rat hippocampal slices / A J Carter, R E Muller // *J Neurochem.* – 1991. – № 3. – P. 888–96.
76. In vitro ischemia and protein synthesis in the rat hippocampal slice: the role of calcium and NMDA receptor activation / K.M. Raley-Susman, P. Lipton [et al.] // *Brain Res.* – 1990. – № 1-2. – P. 27–38
77. Ischemic brain injury in vitro: protective effects of NMDA receptor antagonists and calmidazolium / R. Pohorecki, G.L. Becker, P.J. Reilly [et al.] // *Brain Res.* – 1990. – № 1. – P. 133–137
78. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat / R.L. Zhang, M. Chopp, N. Jiang [et al.] // *Stroke.* – 1995. – № 8. – P. 1438–1442; discussion 1443
79. Dux E. Ultrastructural localization of calcium in ischemic hippocampal slices:

- the influence of adenosine and theophylline / E. Dux, P. Schubert, G.W. Kreutzberg // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1992. – P. 520–524
80. Recovery of protein synthesis in tolerance-induced hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia / S. Furuta, S. Ohta, T. Hatakeyama [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 1993. – № 4. – P. 329–336
 81. Tombaugh G.C. Mild Acidosis Protects Hippocampal-Neurons from Injury Induced by Oxygen and Glucose Deprivation / G C Tombaugh, R M Sapolsky // *Brain Res.* – 1990. – P. 343–345
 82. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons / P. Lipton // *Physiol. Rev.* – 1999. – № 4. – P. 1431–1568
 83. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: Two phases of glutamate release by different mechanisms / M. Szatkowski, D. Attwell [et al.] // *Trends Neurosci.* – 1994. – № 9. – P. 359–365
 84. Distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump (PMCA) isoforms in the gerbil brain: effect of ischemia-reperfusion injury / J. Lehotský, P. Kaplan, P. Raňay [et al.] // *Neurochem. Int.* – 1999. – № 3. – P. 221–227
 85. Berridge M.J. Elementary and global aspects of calcium signalling / M.J. Berridge // *J. Exp. Biol.* – 1997. – № Pt 2. – P. 315–319
 86. Syntichaki P. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? / Popi Syntichaki, Nektarios Tavernarakis // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2003. – № 8. – P. 672–684
 87. Brini M. Calcium pumps in health and disease / Marisa Brini, Ernesto Carafoli // *Physiol. Rev.* – 2009. – № 4. – P. 1341–1378
 88. Lehotský J. Plasma membrane Ca²⁺-pump functional specialization in the brain - Complex of isoform expression and regulation by effectors / J. Lehotský // *Mol. Chem. Neuropathol.* – 1995. – P. 175–187
 89. Toescu E.C. Region-specific activity of the plasma membrane Ca²⁺ pump and delayed activation of Ca²⁺ entry characterize the polarized, agonist-evoked Ca²⁺ signals in exocrine cells / Emil C. Toescu, Ole H. Petersen // *J. Biol. Chem.* – 1995. – № 15. – P. 8528–8535

90. Mironov S.L. Plasmalemmal and intracellular Ca^{2+} pumps as main determinants of slow Ca^{2+} buffering in rat hippocampal neurones / S.L. Mironov // *Neuropharmacology*. – 1995. – № 9. – P. 1123–1132
91. Calcineurin controls the expression of isoform 4CII of the plasma membrane Ca^{2+} pump in neurons / D. Guerini, X. Wang, L. Li [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – № 5. – P. 3706–3712
92. Differentiation induces up-regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and concomitant increase in Ca^{2+} efflux in human neuroblastoma cell line IMR-32 / Y.M. Usachev, S.L. Toutenhoofd, G.M. Goellner [et al.] // *J. Neurochem.* – 2001. – P. 1756–1765
93. Changes in the expression of plasma membrane calcium extrusion systems during the maturation of hippocampal neurons / S.N. Kip, N.W. Gray, A. Burette [et al.] // *Hippocampus*. – 2006. – № 1. – P. 20–34
94. Oguro K. Histochemical study of Ca^{2+} -ATPase activity in ischemic CA1 pyramidal neurons in the gerbil hippocampus / K. Oguro, M. Nakamura, T. Masuzawa // *Acta Neuropathol.* – 1995. – P. 448–453
95. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis / B.L. Schwab, D. Guerini, C. Didszun [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2002. – P. 818–831
96. Differential effects of sublethal ischemia and chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid on protein expression in gerbil hippocampus / K. Kato, K. Shimazaki, T. Kamiya [et al.] // *Life Sci.* – 2005. – № 23. – P. 2867–2878
97. Activation of the androgen receptor alters the intracellular calcium response to glutamate in primary hippocampal neurons and modulates sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 transcription / C.D. Foradori, S.B. Werner, U.S. Sandau [et al.] // *Neuroscience*. – 2007. – № 1. – P. 155–164
98. Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase / J. Lytton, a. Zarain-Herzberg, M. Periasamy [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1989. – № 12. – P. 7059–7065
99. Evidence for two isoforms of the endoplasmic-reticulum Ca^{2+} pump in pig

- smooth muscle / J.A. Eggermont, F. Wuytack, S. De Jaegere [et al.] // *Biochem. J.* – 1989. – № 3. – P. 757–761
100. Localization of an endoplasmic reticulum calcium ATPase mRNA in rat brain by in situ hybridization / K.K. Miller, A. Verma, S.H. Snyder [et al.] // *Neuroscience.* – 1991. – № 1. – P. 1–9
101. Endoplasmic reticulum dysfunction and Ca²⁺ deregulation in isolated CA1 neurons during oxygen and glucose deprivation / G.A. Larsen, H.K. Skjellegrind, M.C. Moe [et al.] // *Neurochem. Res.* – 2005. – № 5. – P. 651–659
102. Hypoxia-driven sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) downregulation depends on low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-signalling in cardiomyocytes / E. Revuelta-López, R. Cal, A. Herraiz-Martínez [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2015. – P. 25–36
103. Na⁺/Ca²⁺ exchanger subtype (NCX1, NCX2, NCX3) protein expression in the rat hippocampus following 3 min and 8 min durations of global cerebral ischemia / C. Bojarski, B.P. Meloni, S.R. Moore [et al.] // *Brain Res.* – 2008. – P. 198–202
104. NCX1 is a novel target gene for hypoxia-inducible factor-1 in ischemic brain preconditioning / V. Valsecchi, G. Pignataro, A. Del Prete [et al.] // *Stroke.* – 2011. – № 3. – P. 754–763
105. Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger 3 (NCX3) gene leads to a worsening of ischemic brain damage / P. Molinaro, O. Cuomo, G. Pignataro [et al.] // *J. Neurosci.* – 2008. – № 5. – P. 1179–1184
106. Risau W. Mechanisms of angiogenesis / W. Risau // *Nature.* – 1997. – № 6626. – P. 671–674
107. Semenza G.L. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1 / G.L. Semenza // *J. Appl. Physiol.* – 2004. – № 3. – P. 1173–1177; discussion 1170–1172
108. Wenger R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression / R.H. Wenger // *FASEB J.* – 2002. – № 10. – P. 1151–1162

109. Semenza G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via denovo protein-synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation / G L Semenza, G L Wang // Mol. Cell. Biol. – 1992. – № 12. – P. 5447–5454
110. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 and developmentally expressed in blood vessels / I. Flamme, T. Fröhlich, M. Von Reutern [et al.] // Mech. Dev. – 1997. – № 1. – P. 51–60
111. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension / G.L. Wang, B.H. Jiang, E. a Rue [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1995. – № 12. – P. 5510–5514
112. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit / L.E. Huang, Z. Arany, D.M. Livingston [et al.] // J. Biol. Chem. – 1996. – № 50. – P. 32253–32259
113. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway / L.E. Huang, J. Gu, M. Schau [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1998. – № 14. – P. 7987–7992
114. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1 / G. Semenza // Biochem. Pharmacol. – 2002. – № 5-6. – P. 993–998
115. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy / G.L. Semenza // Nat. Rev. Cancer. – 2003. – № 10. – P. 721–732
116. Neurodegenerative pathways in Parkinson's disease: therapeutic strategies / S.M. Cardoso, P.I. Moreira, P. Agostinho [et al.] // Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. – 2005. – № 4. – P. 405–419
117. Inhibition of prolyl hydroxylase protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity Model for the potential involvement of the hypoxia-inducible factor pathway in Parkinson disease / D.W. Lee, S. Rajagopalan, A. Siddiq [et al.] // J. Biol. Chem. – 2009. – № 42. – P. 29065–29076

118. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease / Y. Liu, F. Liu, K. Iqbal [et al.] // FEBS Lett. – 2008. – № 2. – P. 359–364
119. Schubert D. The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide / D. Schubert, T. Soucek, B. Blouw // Eur. J. Neurosci. – 2009. – № 7. – P. 1323–1334
120. Nguyen T. Clioquinol down-regulates mutant huntingtin expression in vitro and mitigates pathology in a Huntington's disease mouse model / T. Nguyen, A. Hamby, S.M. Massa // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2005. – № 33. – P. 11840–11845
121. Yang Y.T. Induction of hypoxia inducible factor-1 attenuates metabolic insults induced by 3-nitropropionic acid in rat C6 glioma cells / Y.T. Yang, T.C. Ju, D.I. Yang // J. Neurochem. – 2005. – № 3. – P. 513–525
122. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing / M. Ivan, K. Kondo, H. Yang [et al.] // Science. – 2001. – № 5516. – P. 464–468
123. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha / S.J. Freedman, Z.-Y.J. Sun, F. Poy [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2002. – № 8. – P. 5367–5372
124. Masson N. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels / Norma Masson, Peter J Ratcliffe // J. Cell Sci. – 2003. – № Pt 15. – P. 3041–3049
125. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 / D.J. Manalo, A. Rowan, T. Lavoie [et al.] // Blood. – 2005. – № 2. – P. 659–669
126. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha / Y.Z. Gu, S.M. Moran, J.B. Hogenesch [et al.] // Gene Expr. – 1998. – № 3. – P. 205–213
127. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression / Y. Makino, R. Cao, K. Svensson [et al.] // Nature. – 2001. –

№ 6863. – P. 550–554

128. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus / Y. Makino, A. Kanopka, W.J. Wilson [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – P. 32405–32408
129. Dominant-negative HIF-3 α suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression / M. a. Maynard, A.J. Evans, W. Shi [et al.] // Cell Cycle. – 2007. – № 22. – P. 2810–2816
130. Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells: Role of Src family kinases-dependent pathway / M. Sato, T. Tanaka, T. Maeno [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2002. – № 1. – P. 127–134
131. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α / T. Uchida, F. Rossignol, M. a Matthay [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – № 15. – P. 14871–14878
132. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs / M.S. Wiesener, J.A.N.S. Ju, C. Warnecke [et al.] // FASEB J. – 2003. – P. 271–273
133. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α / M.S. Wiesener, H. Turley, W.E. Allen [et al.] // Blood. – 1998. – № 7. – P. 2260–2268
134. Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression / M. Heidbreder, F. Fröhlich, O. Jöhren [et al.] 2003. – № 3
135. Ruas J.L. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 α -mediated transactivation Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein / J.L. Ruas, L. Poellinger, T. Pereira // J. Biol. Chem. – 2002. – P. 38723–38730
136. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 α / J.M. Elkins, K.S. Hewitson, L. a McNeill [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – № 3. – P. 1802–1806

137. Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix--loop--helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor / P.J. a Erbel, P.B. Card, O. Karakuzu [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2003. – № 26. – P. 15504–15509
138. Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis / G.L. Semenza [et al.] // Curr. Opin. Genet. Dev. – 1998. – № 5. – P. 588–594
139. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development / M. Ema, S. Taya, N. Yokotani [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1997. – № 9. – P. 4273–4278
140. Tian H. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells / H. Tian, S.L. McKnight, D.W. Russell // Genes Dev. – 1997. – № 1. – P. 72–82
141. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development / H. Tian, R.E. Hammer, A.M. Matsumoto [et al.] // Genes Dev. – 1998. – № 21. – P. 3320–3324
142. Rosenberger C. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 and -2 in Hypoxic and Ischemic Rat Kidneys / C. Rosenberger // J. Am. Soc. Nephrol. – 2002. – № 7. – P. 1721–1732
143. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype / L. Holmquist-Mengelbier, E. Fredlund, T. Löfstedt [et al.] // Cancer Cell. – 2006. – № 5. – P. 413–423
144. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus / Y. Makino, A. Kanopka, W.J. Wilson [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – № 36. – P. 32405–32408
145. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha / N. V Iyer, L.E. Kotch, F. Agani [et al.] // Genes Dev. – 1998. – № 2. – P. 149–162

146. Ryan H.E. HIF-1 is required for solid tumor formation and embryonic vascularization / H.E. Ryan, J. Lo, R.S. Johnson // EMBO J. – 1998. – № 11. – P. 3005–3015
147. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling / J. Peng, L. Zhang, L. Drysdale [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2000. – P. 8386–8391
148. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT / E. Maltepe, J. V Schmidt, D. Baunoch [et al.] // Nature. – 1997. – № 6623. – P. 403–407
149. Huang L.E. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance / L. Eric Huang, H. Franklin Bunn // J. Biol. Chem. – 2003. – P. 19575–19578
150. Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases / J.R. Tuckerman, Y. Zhao, K.S. Hewitson [et al.] // FEBS Lett. – 2004. – № 1-2. – P. 145–150
151. HIF is Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation : Implications for O₂ Sensing / M. Ivan, K. Kondo, H. Yang [et al.] 2001. – № March. – P. 464–468
152. Activation of hypoxia-inducible factor-1; Definition of regulatory domains within the α subunit / C.W. Pugh, J.F. O'Rourke, M. Nagao [et al.] // J. Biol. Chem. – 1997. – № 17. – P. 11205–11214
153. Brahimi-Horn C. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications / C. Brahimi-Horn, N. Mazure, J. Pouyssegur // Cell. Signal. – 2005. – № 1. – P. 1–9
154. Jiang H. The Caenorhabditis elegans hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia / H. Jiang, R. Guo, J. a Powell-Coffman // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2001. – P. 7916–7921
155. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo / A. Minchenko, T. Bauer, S. Salceda [et al.] // Lab. Invest. – 1994. – № 3. – P. 374–9
156. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes

- neovascularization after cerebral ischemia / H.J. Marti, M. Bernaudin, A. Bellail [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2000. – № 3. – P. 965–976
157. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage / M. Sakanaka, T.C. Wen, S. Matsuda [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – № 8. – P. 4635–4640
 158. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death / E. Morishita, S. Masuda, M. Nagao [et al.] // *Neuroscience.* – 1996. – № 1. – P. 105–116
 159. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice / M. Bernaudin, H.H. Marti, S. Roussel [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1999. – P. 643–651
 160. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery / Y. Sadamoto, K. Igase, M. Sakanaka [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – P. 26–32
 161. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury / M.L. Brines, P. Ghezzi, S. Keenan [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – P. 10526–10531
 162. Hypoxia stimulates human preproendothelin-1 promoter activity in transgenic mice / C.R. Aversa, S. Oparil, J. Caro [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1997. – № 17. – P. L848–L855
 163. Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia responsive element / a Minchenko, J. Caro [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2000. – № 1-2. – P. 53–62
 164. Effect of ERN1 knockdown on the expression of MAP3K5, MAP4K3, CIB1, RIPK1, and RIPK2 genes in U87 glioma cells and its hypoxic regulation / D. Minchenko, T. Bakalets, D. Tzymbal [et al.] // *J. Investig. Biochem.* – 2014. – № 3. – P. 101
 165. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of TP53, MDM2, USP7 and PERP gene expressions in U87 glioma cells / M.O. Danilovskyi SV,

- Minchenko DO, Moliavko OS, Kovalevska OV, Karbovskyi LL [et al.] // Ukr Biochem J. – 2014. – № 4. – P. 90–102
166. Nuclear localization of the hypoxia-regulated pro-apoptotic protein BNIP3 after global brain ischemia in the rat hippocampus / R. Schmidt-Kastner, C. Aguirre-Chen, T. Kietzmann [et al.] // Brain Res. – 2004. – № 1-2. – P. 133–142
167. Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia / X.M. Yin, Y. Luo, G. Cao [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – № 44. – P. 42074–42081
168. Temporal profiles of the subcellular localization of Bim, a BH3-only protein, during middle cerebral artery occlusion in mice / M. Shibata, H. Hattori, T. Sasaki [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2002. – P. 810–820
169. Bid is Cleaved by Calpain to an Active Fragment in Vitro and during Myocardial Ischemia/Reperfusion / M. Chen, H. He, S. Zhan [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – № 33. – P. 30724–30728
170. Halterman M.W. HIF-1alpha and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia / M W Halterman, H J Federoff // Exp. Neurol. – 1999. – № 1. – P. 65–72
171. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1 / A. Rolfs, I. Kvietikova, M. Gassmann [et al.] // J. Biol. Chem. – 1997. – № 32. – P. 20055–20062
172. Lok C.N. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene / Chun Nam Lok, Prem Ponka // J. Biol. Chem. – 1999. – № 34. – P. 24147–24152
173. Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers / A.Y. Bobarykina, D.O. Minchenko, I.L. Opentanova [et al.] // Acta Biochim. Pol. – 2006. – № 4. – P. 789–799
174. Ke Q. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) / Qingdong Ke, Max Costa // Mol. Pharmacol. – 2006. – № 5. – P. 1469–1480
175. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers

- and their metastases / H. Zhong, A.M. De Marzo, E. Laughner [et al.] // *Cancer Res.* – 1999. – № 22. – P. 5830–5835
176. Harris A.L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth / A.L. Harris // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – № 1. – P. 38–47
 177. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells / T.N. Seagroves, H.E. Ryan, H. Lu [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – № 10. – P. 3436–3444
 178. Chavez J.C. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1 / J.C. Chavez, J.C. LaManna // *J.Neurosci.* – 2002. – № 20. – P. 8922–8931
 179. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in the brain of rats during chronic hypoxia / F. Agani, P. Pichiule, J.C.L. a Manna [et al.] 2000. – P. 1937–1942
 180. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia / O. Baranova, L.F. Miranda, P. Pichiule [et al.] // *J. Neurosci.* – 2007. – № 23. – P. 6320–6332
 181. The effect of 2-methoxyestradiol, a HIF-1 α inhibitor, in global cerebral ischemia in rats / D. Zhou, G.A. Matchett, V. Jadhav [et al.] // *Neurol. Res.* – 2008. – № 3. – P. 268–271
 182. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition A target for neuroprotection in the central nervous system / A. Siddiq, I. a Ayoub, J.C. Chavez [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – № 50. – P. 41732–41743
 183. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain / M. Bergeron, J.M. Gidday, Y.Y. Aimee [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2000. – № 3. – P. 285–296
 184. Inhibition of HIF prolyl-4-hydroxylases by FG-4497 reduces brain tissue injury and edema formation during ischemic stroke / S. Reischl, L. Li, G. Walkinshaw [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – № 1. – P. e84767
 185. Selective inhibition of early-but not late-expressed HIF-1 α is neuroprotective in rats after focal ischemic brain damage / S.H. Yeh, L.C. Ou, P.W. Gean [et

- al.] // Brain Pathol. – 2011. – № 3. – P. 249–262
186. Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage / R. Helton, J. Cui, J.R. Scheel [et al.] // J. Neurosci. – 2005. – № 16. – P. 4099–4107
 187. Specific inhibition of hypoxia inducible factor 1 exaggerates cell injury induced by in vitro ischemia through deteriorating cellular redox environment / S. Guo, M. Miyake, K.J. Liu [et al.] // J. Neurochem. – 2009. – № 5. – P. 1309–1321
 188. Nitric oxide and reactive oxygen species exert opposing effects on the stability of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in explants of human pial arteries / T.L. Wellman, J. Jenkins, P.L. Penar [et al.] // FASEB J. – 2004. – № 2. – P. 379–381
 189. Glucose up-regulates HIF-1 alpha expression in primary cortical neurons in response to hypoxia through maintaining cellular redox status / S. Guo, O. Bragina, Y. Xu [et al.] // J. Neurochem. – 2008. – № 5. – P. 1849–1860
 190. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin / J. Liu, P. Narasimhan, F. Yu [et al.] // Stroke. – 2005. – № 6. – P. 1264–1269
 191. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning / C. Heurteaux, I. Lauritzen, C. Widmann [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1995. – № 10. – P. 4666–4670
 192. Wardas J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS / J. Wardas // Pol. J. Pharmacol. – 2002. – № 4. – P. 313–326
 193. A central role of connexin 43 in hypoxic preconditioning / J.H. Lin, N. Lou, N. Kang [et al.] // J Neurosci. – 2008. – № 3. – P. 681–695
 194. Prosurvival and prodeath effects of hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in a murine hippocampal cell line / L.R. Aminova, J.C. Chavez, J. Lee [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – № 5. – P. 3996–4003
 195. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-

- inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and ery / K. Zaman, H. Ryu, D. Hall [et al.] // J. Neurosci. – 1999. – № 22. – P. 9821–9830
196. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat / G. Fox, D. Gallacher, S. Shevde [et al.] // Stroke. – 1993. – № 12. – P. 2083–2087
 197. Ginsberg M.D. Rodent models of cerebral ischemia / M. D. Ginsberg, R. Busto // Stroke. – 1989. – № 12. – P. 1627–1642
 198. Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery / K. Kitagawa, M. Matsumoto, G. Yang [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1998. – P. 570–579
 199. Strijbos P.J. Vicious cycle involving Na⁺ channels, glutamate release, and NMDA receptors mediates delayed neurodegeneration through nitric oxide formation / P.J. Strijbos, M.J. Leach, J. Garthwaite // J. Neurosci. – 1996. – № 16. – P. 5004–5013
 200. Histopathological and hemodynamic consequences of complete versus incomplete ischemia in the rat / W.D. Dietrich, R. Busto, S. Yoshida [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1987. – № 3. – P. 300–308
 201. Sodium, ATP, and intracellular pH transients during reversible complete ischemia of dog cerebrum / S.M. Eleff, Y. Maruki, L.H. Monsein [et al.] // Stroke. – 1991. – № 2. – P. 233–241
 202. Crumrine R.C. Regional cerebral metabolites, blood flow, plasma volume, and mean transit time in total cerebral ischemia in the rat / R C Crumrine, J C LaManna // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1991. – № 2. – P. 272–282
 203. Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I Dynamics of early neuronal changes / K. Kawai, L. Nitecka, C.A. Ruetzler [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 1992. – № 2. – P. 238–249
 204. Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology / R. Pluta, A.S. Lossinsky, M.J. Mossakowski [et al.] // Acta Neuropathol. – 1991. –

№ 1. – P. 1–11

205. Strong a J. The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 1 Topography of changes in blood flow, potassium ion activity, and EEG / a J. Strong, G.S. Venables, G. Gibson // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1983. – № 1. – P. 86–96
206. Lobner D. Intracellular calcium levels and calcium fluxes in the CA1 region of the rat hippocampal slice during in vitro ischemia: relationship to electrophysiological cell damage / D Lobner, P Lipton // J. Neurosci. – 1993. – № November. – P. 4861–4871
207. Lactic acidosis and recovery of neuronal function following cerebral hypoxia in vitro / a Schurr, W.Q. Dong, K.H. Reid [et al.] // Brain Res. – 1988. – P. 311–314
208. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia / a. K. Pringle, F. Iannotti, G.J.C. Wilde [et al.] // Brain Res. – 1997. – № 1. – P. 36–46
209. Strasser U. Protection from neuronal damage induced by combined oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures by glutamate receptor antagonists / U. Strasser, G. Fischer // Brain Res. – 1995. – P. 167–174
210. Stoppini L. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue / L. Stoppini, P.A. Buchs, D. Muller // J. Neurosci. Methods. – 1991. – № 2. – P. 173–182
211. Fuller L. Preparation of rodent hippocampal slice cultures / Leah Fuller, Michael E Dailey // CSH Protoc. – 2007. – № 50 mL. – P. pdb.prot4848
212. A new model of ischemic preconditioning using young adult hippocampal slice cultures / G.W. Hassen, D. Tian, D. Ding [et al.] // Brain Res Brain Res Protoc. – 2004. – № 3. – P. 135–143
213. Raval A.P. Estrogen preconditioning protects the hippocampal CA1 against ischemia / A.P. Raval, H. Bramlett, M.A. Perez-Pinzon // Neuroscience. – 2006. – № 4. – P. 1721–1730
214. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and

- propidium iodide fluorescence / J.H. Laake, F.M. Haug, T. Wieloch [et al.] // Brain Res. Protoc. – 1999. – № 2. – P. 173–184
215. Beauchamp N.J. Inflammatory Response Stimulates Leukocyte Migration To / Norman J. Beauchamp, R Nick Bryan // *Ajr.* – 1998. – № July 1998. – P. 73–84
216. Neuroprotective action of halogenated derivatives of L-phenylalanine / T. Kagiya, A. V. Glushakov, C. Sumners [et al.] // *Stroke.* – 2004. – P. 1192–1196
217. Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture / J.Y. Koh, M.P. Goldberg, D.M. Hartley [et al.] // *J. Neurosci.* – 1990. – № February. – P. 693–705
218. Horn J. Calcium antagonists for ischemic stroke: a systematic review / J Horn, M Limburg // *Stroke.* – 2001. – P. 570–576
219. Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review / J. Horn, R.J. de Haan, M. Vermeulen [et al.] // *Stroke.* – 2001. – P. 2433–2438
220. DeGraba T.J. Threshold of calcium disturbances after focal cerebral ischemia in rats Implications of the window of therapeutic opportunity / T.J. DeGraba, P.T. Ostrow, J.C. Grotta // *Stroke.* – 1993. – P. 1212–1216; discussion 1216–1217
221. Jensen B.S. BMS-204352: a potassium channel opener developed for the treatment of stroke / B.S. Jensen // *CNS Drug Rev.* – 2002. – № 4. – P. 353–360
222. Bozik M, Hommel M G.J. Efficacy and safety of Maxi-PostTM in patients with acute stroke / G.J. Bozik M, Hommel M // *J Neurol Sci.* – 2001
223. Neuroprotection in ischemia: Blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels / Z.G. Xiong, X.M. Zhu, X.P. Chu [et al.] // *Cell.* – 2004. – P. 687–698
224. Xiong Z.-G. Ca²⁺ -permeable acid-sensing ion channels and ischemic brain injury / Z.-G. Xiong, X.-P. Chu, R.P. Simon // *J. Membr. Biol.* – 2006. – № 1. – P. 59–68
225. Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to

- ischemic neuronal death / J. Gao, B. Duan, D.G. Wang [et al.] // *Neuron*. – 2005. – P. 635–646
226. Pignataro G. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia / G. Pignataro, R.P. Simon, Z.G. Xiong // *Brain*. – 2007. – P. 151–158
227. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D / E. Basso, L. Fante, J. Fowlkes [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – P. 18558–18561
228. Kannurpatti S.S. Calcium sequestering ability of mitochondria modulates influx of calcium through glutamate receptor channel / S.S. Kannurpatti, P.G. Joshi, N.B. Joshi // *Neurochem. Res.* – 2000. – № 12. – P. 1527–1536
229. Doyle K. Mechanisms of Ischemic Brain Damage – Review Article / K. Doyle, R. Simon, M. Stenzel-poore // *Neuropharmacology*. – 2008. – № 3. – P. 310–318
230. Mehta S.L. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics / S.L. Mehta, N. Manhas, R. Raghubir // *Brain Res. Rev.* – 2007. – P. 34–66
231. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction / J.N. Keller, M.S. Kindy, F.W. Holtsberg [et al.] // *J. Neurosci.* – 1998. – № 2. – P. 687–697
232. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – 449-450 P.
233. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: Multiple neuroprotective opportunities / V.P. Nakka, A. Gusain, S.L. Mehta [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2008. – P. 7–38
234. Warner D.S. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain / D.S. Warner, H. Sheng, I. Batinić-Haberle // *J. Exp. Biol.* – 2004. – P. 3221–3231
235. Love S. Oxidative stress in brain ischemia / S. Love // *Brain Pathol.* – 1999. – P. 119–131

236. Zhao Z.C. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease / Z.C. Zhao, F. Li, K. Maiese // *Prog. Neurobiol.* – 2005. – P. 207–246
237. Membrane dysfunction induced by in vitro ischemia in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons / E. Tanaka, S. Yamamoto, H. Inokuchi [et al.] // *J. Neurophysiol.* – 1999. – № 4. – P. 1872–1880
238. Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells / T. Yamamoto, W. Maruyama, Y. Kato [et al.] // *J. Neural Transm.* – 2002. – № 1. – P. 1–13
239. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals / G.W. Kim, T. Kondo, N. Noshita [et al.] // *Stroke.* – 2002. – P. 809–815
240. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency / K. Murakami, T. Kondo, M. Kawase [et al.] // *J. Neurosci.* – 1998. – № 1. – P. 205–213
241. Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons / T. Hayashi, A. Saito, S. Okuno [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2005. – P. 41–53
242. Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease / M.P. Mattson, S.W. Barger, K. Furukawa [et al.] // *Brain Res. Brain Res. Rev.* – 1997. – № 1-2. – P. 47–61
243. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: Graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function / G. Raivich, M. Bohatschek, C.U.A. Kloss [et al.] // *Brain Res. Rev.* – 1999. – № 1. – P. 77–105
244. Hallenbeck J.M. The many faces of tumor necrosis factor in stroke / J.M. Hallenbeck // *Nat. Med.* – 2002. – № 12. – P. 1363–1368
245. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury

- in the brain / M. Lalancette-Hébert, G. Gowing, A. Simard [et al.] // J. Neurosci. – 2007. – № 10. – P. 2596–2605
246. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice / A. Denes, R. Vidyasagar, J. Feng [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2007. – P. 1941–1953
 247. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice / M. Schilling, M. Besselmann, C. Leonhard [et al.] // Exp Neurol. – 2003. – № 1. – P. 25–33
 248. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia / R. Tanaka, M. Komine-Kobayashi, H. Mochizuki [et al.] // Neuroscience. – 2003. – P. 531–539
 249. Role of T lymphocytes and interferon-?? in ischemic stroke / G. Yilmaz, T. V. Arumugam, K.Y. Stokes [et al.] // Circulation. – 2006. – P. 2105–2112
 250. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke / M. Gelderblom, F. Leypoldt, K. Steinbach [et al.] // Stroke. – 2009. – № 5. – P. 1849–1857
 251. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia / G.J. Del Zoppo, R. Milner, T. Mabuchi [et al.] // Stroke. – 2007. – P. 646–651
 252. Zukin RS, Jover T Y.H. et al. Molecular and cellular mechanisms of ischemia-induced neuronal death In: Stroke: Pathogenesis, Diagnosis, and Management / Y.H. et al. Zukin RS, Jover T 2004. – P. 829–854.
 253. Deficiency of intercellular adhesion molecule 1 attenuates microcirculatory disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia / K. Kitagawa, M. Matsumoto, T. Mabuchi [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1998. – P. 1336–1345
 254. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke / C.J. Prestigiacomo, S.C. Kim, E.S.

- Connolly [et al.] // Stroke. – 1999. – P. 1110–1117
255. to Cerebral Ischemia / Reperfusion Injury / S.G. Soriano, A. Coxon, Y.F. Wang [et al.] 1999. – P. 134–139
 256. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke / E.S. Connolly, C.J. Winfree, T. a. Springer [et al.] // J. Clin. Invest. – 1996. – P. 209–216
 257. Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke / E.S. Connolly, C.J. Winfree, C.J. Prestigiacomo [et al.] // Circ. Res. – 1997. – № 3. – P. 304–310
 258. Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment / W.M. Clark, K.P. Madden, R. Rothlein [et al.] // Stroke. – 1991. – № 7. – P. 877–883
 259. Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule / W.M. Clark, K.P. Madden, R. Rothlein [et al.] // J Neurosurg. – 1991. – № 4. – P. 623–627
 260. Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat / Y. Matsuo, H. Onodera, Y. Shiga [et al.] // Brain Res. – 1994. – № 2. – P. 344–352
 261. Bowes M.P. Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model / M.P. Bowes, J.A. Zivin, R. Rothlein // Exp. Neurol. – 1993. – № 2. – P. 215–219
 262. Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat / H. Chen, M. Chopp, R.L. Zhang [et al.] // Ann. Neurol. – 1994. – № 4. – P. 458–463
 263. Chopp M. The role of adhesion molecules in reducing cerebral ischemic cell damage / M Chopp, R L Zhang, N Jiang // Adv. Neurol. – 1996. – P. 315–317
 264. Chopp M, Zhang RL, Jiang N Z.Z. Anti-adhesion molecule antibodies reduce ischemic cell damage after transient MCAO in the rat / Z.Z. Chopp M, Zhang

- RL, Jiang N // J Cereb Blood Flow Metab. – 1995. – P. S57.
265. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain / M. Chopp, Y. Li, N. Jiang [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1996. – № 4. – P. 578–584
 266. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological changes after 5-min ischemia and long survival times / P. Bonnekoh, a Barbier, U. Oschlies [et al.] // Acta Neuropathol. – 1990. – P. 18–25
 267. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest / C.K. Petito, E. Feldmann, W.A. Pulsinelli [et al.] // Neurology. – 1987. – № 8. – P. 1281–1286
 268. Horn M. Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia / M Horn, W Schlote // Acta Neuropathol. – 1992. – № 1. – P. 79–87
 269. Post-ischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy / G. Pignataro, A. Scorziello, G. Di Renzo [et al.] // FEBS J. – 2009. – № 1. – P. 46–57
 270. Griesemer D. Closed head injury causes hyperexcitability in rat hippocampal CA1 but not in CA3 pyramidal cells / Désirée Griesemer, Angelika M Mautes // J. Neurotrauma. – 2007. – № 12. – P. 1823–1832
 271. Schaller B. Ischaemic tolerance: a window to endogenous neuroprotection? / B. Schaller, R. Graf, A.H. Jacobs // Lancet. – 2003. – № 9389. – P. 1007–1008
 272. The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury / X. Fan, C.J. Heijnen, M. a van der Kooij [et al.] // Brain Res Rev. – 2009. – № 1. – P. 99–108
 273. Chang AY, Chan JY, Cheng HL, Tsai CY C.S. HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1/HEME OXYGENASE 1 CASCADE AS UPSTREAM SIGNALS IN THE PROLIFE ROLE OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 AT ROSTRAL VENTROLATERAL MEDULLA DURING EXPERIMENTAL BRAIN STEM DEATH / C.S. Chang AY, Chan JY, Cheng HL, Tsai CY // Shock. – 2009. – №

6. – P. 651–658
274. Desferroxamine infusion increases cerebral blood flow: a potential association with hypoxia-inducible factor-1 / F.A. Sorond, M.L. Shaffer, A.L. Kung [et al.] // Clin. Sci. (Lond). – 2009. – P. 771–779
275. Dawn B. HO-1 induction by HIF-1: a new mechanism for delayed cardioprotection? / Buddhadeb Dawn, Roberto Bolli // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – № 2. – P. H522–4
276. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-?? and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-?? / Y. Yuan, G. Hilliard, T. Ferguson [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – № 18. – P. 15911–15916
277. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Semenza, P.H. Roth, H.M. Fang [et al.] // J Biol Chem. – 1994. – № 38. – P. 23757–23763
278. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway / P.J. Kallio, W.J. Wilson, S. O'Brien [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – № 10. – P. 6519–6525
279. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 / J.A. Forsythe, B.H. Jiang, N. V Iyer [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 1996. – № 9. – P. 4604–4613
280. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α Modulation of transcriptional activity by oxygen tension / B.H. Jiang, J.Z. Zheng, S.W. Leung [et al.] // J. Biol. Chem. – 1997. – № 31. – P. 19253–19260
281. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia / a. P. Levy, N.S. Levy, S. Wegner [et al.] // J. Biol. Chem. – 1995. – № 22. – P. 13333–13340
282. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 α / S. Hara, J. Hamada, C. Kobayashi [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – № 4. – P. 808–813

283. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma / M. a Maynard, A.J. Evans, T. Hosomi [et al.] // FASEB J. – 2005. – P. 1396–1406
284. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review) / S.-L. Yang, C. Wu, Z.-F. Xiong [et al.] // Mol. Med. Rep. – 2015. – № 2. – P. 2411–2416
285. Ndubizu O.I. Increased prolyl 4-hydroxylase expression and differential regulation of hypoxia-inducible factors in the aged rat brain / O.I. Ndubizu, J.C. Chavez, J.C. LaManna // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2009. – № 1. – P. R158–R165
286. Relationship between HIF-1alpha expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury / L. Li, Y. Qu, J. Li [et al.] // Brain Res. – 2007. – P. 133–139
287. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia / D.M. Stroka, T. Burkhardt, I. Desbaillets [et al.] // FASEB J. – 2001. – № 13. – P. 2445–2453
288. Bilateral molecular changes in a neonatal rat model of unilateral hypoxic-ischemic brain damage / E.R. van den Tweel, a Kavelaars, M.S. Lombardi [et al.] // Pediatr Res. – 2006. – № 3. – P. 434–439
289. Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression / M. Heidbreder, F. Fröhlich, O. Jöhren [et al.] // FASEB J. – 2003. – № 11. – P. 1541–1543
290. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the brain of rats during chronic hypoxia / J.C. Chávez, F. Agani, P. Pichiule [et al.] // J. Appl. Physiol. – 2000. – P. 1937–1942
291. Bonde C. Nuclear shrinkage and other markers of neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures / C. Bonde, J. Norberg, J. Zimmer // Neurosci. Lett. – 2002. – № 1. – P. 49–52
292. Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures / S. Cho, D. Liu, D. Fairman [et al.] // Neurochem. Int. – 2004. – № 1. – P. 117–127

293. Singh N. Hypoxia inducible factor-1: its potential role in cerebral ischemia / N. Singh, G. Sharma, V. Mishra // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2012. – № 4. – P. 491–507
294. Brief anoxia preconditioning and HIF prolyl-hydroxylase inhibition enhances neuronal resistance in organotypic hippocampal slices on model of ischemic damage / I. Lushnikova, M. Orlovsky, V. Dosenko [et al.] // *Brain Res.* – 2011. – P. 175–183
295. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death / C.P. Baines, R.A. Kaiser, N.H. Purcell [et al.] // *Nature.* – 2005. – № 7033. – P. 658–662
296. Riedl S.J. The apoptosome: signalling platform of cell death / Stefan J Riedl, Guy S Salvesen // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – № 5. – P. 405–413
297. Ion transport systems as targets of free radicals during ischemia reperfusion injury / J. Lehotsky, P. Kaplan, M. Matejovicova [et al.] // *Gen Physiol Biophys.* – 2002. – № 1. – P. 31–37
298. Differential NMDA receptor-dependent calcium loading and mitochondrial dysfunction in CA1 vs CA3 hippocampal neurons / R.I. Stanika, C. a. Winters, N.B. Pivovarova [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2010. – № 2. – P. 403–411
299. Szydłowska K. Calcium, ischemia and excitotoxicity / Kinga Szydłowska, Michael Tymianski // *Cell Calcium.* – 2010. – № 2. – P. 122–129
300. Gidday J.M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance / J.M. Gidday // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006. – № 6. – P. 437–448
301. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia / J. Chen, T. Nagayama, K. Jin [et al.] // *J. Neurosci.* – 1998. – № 13. – P. 4914–4928
302. Pavlikova M, Tatarkova Z, Sivonova M, Kaplan P, Krizanov O L.J. Alterations induced by ischemic preconditioning on secretory pathways Ca^{2+} -ATPase (spca) gene expression and oxidative damage after global cerebral ischemia/reperfusion in rats / L.J. Pavlikova M, Tatarkova Z, Sivonova M, Kaplan P, Krizanov O // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2009. – P. 909–916

303. Hypoxic preconditioning: a novel intrinsic cytoprotective strategy / G. Lu, S. Yu, R. Li [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2005. – № 1-3. – P. 255–271
304. Pérez-Pinzón M. a Rapid preconditioning neuroprotection following anoxia in hippocampal slices: role of the K⁺ ATP channel and protein kinase C / M a Pérez-Pinzón, J G Born // *Neuroscience.* – 1999. – № 2. – P. 453–459
305. Inositol 1,4,5-triphosphate receptors and NAD(P)H mediate Ca²⁺ signaling required for hypoxic preconditioning of hippocampal neurons / P.E. Bickler, C.S. Fahlman, J. Gray [et al.] // *Neuroscience.* – 2009. – № 1. – P. 51–60
306. Goda N. HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression / N. Goda, S.J. Dozier, R.S. Johnson // *Antioxid. Redox Signal.* – 2003. – № 4. – P. 467–473
307. Salceda S. Hypoxia-inducible Factor 1a (HIF-1a) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions / Susana Salceda, Jaime Caro // *J. Biol. Chem.* – 1997. – № 36. – P. 22642–22647
308. Semenza G.L. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders / G.L. Semenza // *Annu. Rev. Med.* – 2003. – P. 17–28
309. Cassavaugh J. Hypoxia-mediated biological control / Jessica Cassavaugh, Karen M Lounsbury // *J. Cell. Biochem.* – 2011. – № 3. – P. 735–744
310. Induction of T-type calcium channel gene expression by chronic hypoxia / R. Del Toro, K.L. Levitsky, J. López-Barneo [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – № 25. – P. 22316–22324