

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

ЛУШНІКОВА ІРИНА ВАСИЛІВНА



УДК 612.822.5+576.54

**МІЖКЛІТИННІ ВЗАЄМОДІЇ ТА ЕНДОГЕННІ МЕХАНІЗМИ
НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ У ГІПОКАМПІ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ
ІШЕМІЧНОГО ПОШКОДЖЕННЯ**

03.00.13 - Фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник: член-кореспондент НАН України, доктор медичних наук, професор

Скибо Галина Григорівна

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу цитології

Офіційні опоненти: академік АН ВШ України, доктор біологічних наук, професор

Макарчук Микола Юхимович

ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т.Г. Шевченка,
завідувач кафедри фізіології та анатомії

доктор біологічних наук, професор

Борисова Тетяна Олександрівна

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу нейрохімії

доктор біологічних наук, професор

Квітницька-Рижова Тетяна Юріївна

ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова» НАМН України,
завідувач лабораторії морфології та цитології

Захист дисертації відбудеться 14 травня 2019 р. о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4

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

Автореферат розіслано 10 квітня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ключовим елементом живої тканини є динамічні міжклітинні взаємодії, які забезпечують нормальну роботу органів і організму в цілому. Функціональні системи налаштовані таким чином, щоб ефективно здійснювати специфічні фізіологічні процеси за умов рівноваги зовнішнього середовища, що сформоване еволюційно (Crossin, 2012; Keener et al., 2009). Коливання параметрів зовнішнього середовища у певному діапазоні не викликають явних порушень системи, оскільки на молекулярному рівні у клітинах і тканинах закладені численні механізми, здатні утримувати гомеостаз. Коли поріг резистентності перевищено, то залежно від ступеня та тривалості змін виникає дисбаланс системи, який може бути зворотним або незворотним, що призводить до втрати життєздатності клітин.

Для нервової тканини найбільш критичними чинниками щодо підтримки життєздатності та нормального функціонування є рівні кисню та глюкози, які потребують постійного надходження з течією крові, оскільки активно метаболізуються клітинами. При нестачі кисню та глюкози внаслідок порушень мозкового кровообігу різної етіології розвивається ішемічне пошкодження, що може призвести до загибелі нервових клітин та подальших фатальних наслідків (Madhok et al., 2018; Zhang et al., 2018). Тканина мозку сформована нейронами, гліальними клітинами, складним переплетенням їх відростків, а також кровоносними судинами. Нейрони – спеціалізовані клітини, які еволюційно налаштовані на передачу сигналів. Вони є найбільш вразливими до несприятливих змін зовнішнього середовища і, зокрема, до нестачі кисню і глюкози, що спостерігається при багатьох мозкових патологіях, пов'язаних з порушенням кровообігу (Budman et al., 2018; Navis et al., 2019; Pluta et al., 2018, 2019; Yang et al., 2019). Цей вплив може носити як локальний, так і глобальний характер (фокальна і глобальна ішемія), викликаючи відповідні реакції клітин мозку. Залежно від ступеня і тривалості киснево-глюкозного дефіциту нервові клітини можуть у певних межах виживати завдяки внутрішнім ресурсам і адаптивним механізмам та продовжувати функціонування (Kirschen et al., 2018; Sarkar et al., 2019). В іншому випадку відбуваються незворотні порушення внутрішньоклітинного метаболізму і втрата життєздатності. Здатність до підтримки клітинного та тканинного гомеостазу визначається численними молекулярними механізмами та міжклітинними взаємодіями. Відомо, що клітини мозку мають різну чутливість до нестачі кисню і глюкози, але системних досліджень різних типів клітин за аналогічних умов немає. Найчастіше дослідження спрямовані на розгляд одного типу клітин, однієї функції або одного механізму (Martire et al., 2019; Nada et al., 2018). Ця робота орієнтована на комплексну оцінку стану різних типів клітин та особливостей їх взаємодій при моделюванні ішемічного ушкодження з використанням експериментальних моделей *in vitro*, зокрема культур гіпокампа, оскільки ця мозкова структура є найбільш чутливою до

киснево-глюкозного дефіциту (Schmidt-Kastner, 2015; Ou et al., 2018). Для створення умов, подібних до тих, що відбуваються в ішемізованій тканині, нами була використана тимчасова киснево-глюкозна депривація (КГД) з наступною нормоксичною реоксигенацією. Емпірично був обраний такий режим КГД, який не викликав швидких руйнівних змін, але призводив до відтермінованих ефектів, припускаючи можливість дослідження клітинних та молекулярних механізмів, які задіяні у розвитку ішемічного ушкодження. Отримані результати сприятимуть виявленню нових потенційних мішеней для нейропротекції.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках наукових програм відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (2009-2018 рр.): «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» №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; «Клітинні та молекулярні механізми нейродегенерації та шляхи її корекції» №0113U007273; «Молекулярні та генетичні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології» №UF45.2/001 (на базі державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології).

Мета дослідження: комплексна оцінка стану різних типів клітин у гіпокампальних культурах, виявлення особливостей їх взаємодії та механізмів ендогенної нейропротекції при моделюванні ішемічного ушкодження.

Завдання дослідження:

1. Оцінити життєздатність і мітохондріальну активність основних типів клітин гіпокампа в органотиповій та дисоційованій культурах у нормі та після КГД.
2. Виявити ультраструктурні зміни збудливих і гальмівних синапсів та глії у CA1 зоні гіпокампальних зрізів у початковий період після КГД.
3. Виявити механізми взаємодії пірамідних нейронів і інтернейронів CA1 зони культивованих гіпокампальних зрізів в нормі та після КГД.
4. Дослідити участь гліцинових рецепторів (GlyRs) у забезпеченні виживання CA1 пірамідних нейронів в умовах КГД.
5. Дослідити участь нейронних молекул клітинної адгезії (NCAM) у підтримці життєздатності та синаптичної активності гіпокампальних клітин в нормі та при КГД.
6. Виявити роль синаптичних трансмембранних білків пресеніліну (PS1) і синаптотагміну (Sytl) у координації синаптичної активності.
7. Дослідити взаємозв'язок експресії транскрипційного фактору, що індукується гіпоксією (HIF) з Ca^{2+} -гомеостазом при розвитку ішемічного

ушкодження CA1 пірамідних нейронів та виявити роль цих факторів у нейропротекторних ефектах аноксичного прекодиціювання (АПК).

8. Виявити взаємозв'язок HIF/NCAM-опосередкованих сигнальних шляхів у регуляції стану гіпокампальних клітин після КГД.
9. Дослідити механізми дії мультипотентних мезенхімальних стромальних клітини (ММСК) на органотипові культури в умовах їх контактного і безконтактного співкультивування.

Об'єкт дослідження – міжклітинні взаємодії та ендogenousні механізми нейропротекції у гіпокампі.

Предмет дослідження – функціональні і структурні зміни нервових клітин у гіпокампі при моделюванні ішемічного пошкодження та сигнальні шляхи, що опосередковують резистентність до киснево-глюкозного дефіциту.

Методи дослідження. Для досягнення мети даної роботи були використані методи: культивування зрізів та дисоційованих клітин гіпокампа; моделювання ішемічних ушкоджень гіпокампа; біохімічні, морфологічні і електрофізіологічні методи; ПЛР; імуноцит- та гістохімічні методи на базі світлової, конфокальної та електронної мікроскопії; 3D-реконструювання мікрооб'єктів; морфометричні та статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі представлені результати комплексного дослідження різних типів гіпокампальних клітин, виявлені особливості міжклітинних взаємодій та ендogenousні механізми нейропротекції в умовах моделювання ішемічного ушкодження.

Вперше виявлені особливості морфофункціональних змін пірамідних нейронів, інтернейронів, астрогліальних та мікрогліальних клітин за ідентичних умов КГД.

Вперше детально охарактеризовано зміни пластичності збудливих і гальмівних синапсів та глії у найбільш вразливій CA1 зоні культивованих зрізів гіпокампа у початковий період після КГД з використанням тривимірного реконструювання.

Вперше показано, що у КГД-резистентних ГАМК-ергічних інтернейронах коекспресуються GAD67, $\alpha 7$ -nAChRs та Cx36. Виявлено, що редукція GlyRs асоційована з ушкодженням CA1 пірамідних нейронів в умовах КГД.

Вперше виявлено функціональний взаємозв'язок NCAM-, FGFR- та HIF-опосередкованих механізмів, які здатні протидіяти пошкодженню нейронів в умовах КГД. Показано, що нейропротекторний вплив аноксичного прекодиціювання асоціюється з підвищеним рівнем експресії HIF та стабілізацією роботи Ca-АТФаз (PMCA і SERCA) у нейронах.

Вперше виявлено, що синаптичні трансмембранні білки PS1 і Syt1 в результаті їх взаємодії координують ефективність синаптичної передачі.

Вперше продемонстровано нейропротекторний вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних стовбурових клітин в умовах контактного і безконтактного співкультивування з культивованими зрізами при КГД.

Отримані дані дають нове уявлення про модулюючий вплив інтернейронів і гліальних клітин на життєздатність і функціональну активність пірамідних нейронів в умовах ішемічного пошкодження та висвітлюють важливу роль нейронних молекул клітинної адгезії і фактору, що індукується гіпоксією.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дослідження мають фундаментальне значення для поглиблення відомостей про початкові і відтерміновані ефекти КГД на клітини гіпокампа різних типів та про молекулярні механізми, пов'язані з міжклітинними взаємодіями.

Практичне значення одержаних результатів полягає у знаходженні нових перспективних фармакологічних мішеней у сфері розробки методів комплексної терапії при ішемічному ушкодженні.

Продемонстровані нейропротекторні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних стовбурових клітин вказують на можливість їх використання для терапії при ішемічних пошкодженнях тканин мозку.

Розроблена у дисертаційній роботі експериментальна модельна система *in vitro* може бути використана для дослідження механізмів розвитку мозкових патологій різного генезу та для тестування нейропротекторних засобів.

Особистий внесок здобувача. При виконанні роботи здобувачем проведено науковий пошук та обґрунтування вибраного напрямку досліджень. Сформульовано мету, основні завдання дисертаційної роботи, визначено комплекс методів, організовано і проведено основну частину експериментів, аналіз отриманих результатів, статистичну обробку фактичного матеріалу, його наукову інтерпретацію, узагальнення результатів і формулювання висновків. Особисто здобувачем виконано більшість представлених у роботі експериментів для визначення особливостей міжклітинних взаємодій в умовах моделювання ішемічного ушкодження.

Частково роботу проведено спільно зі співавторами опублікованих робіт, зокрема зі співробітниками відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: к.б.н. Вороніним К.Ю., к.м.н. Маляревським П.Ю., д.б.н. Ніконенко О.Г., к.м.н. Коваленко Т.М., к.б.н. Осадченко І.О., к.б.н. Войтенко Л.П., к.б.н. Пацевою М.А., к.м.н. Орловським М.А., к.б.н. Майстренко А.М., к.б.н. Малєєвою Г.А., к.б.н. Никандровою Є.А., д.б.н. Цупиковим О.М., Сможанік К.Г.

Дослідження ролі NCAM у підтримці життєздатності та синаптичної активності нейронів гіпокампа було проведено на базі лабораторії білка Копенгагенського університету (керівник проф. Е.Бок). Дослідження ультраструктурних змін з використанням тривимірного реконструювання було проведено на базі відділу фармакології Женевського університету у співробітництві з к.б.н. Ніконенко І.Р. (керівник проф. Д.Мюллер).

Дослідження ролі GlyRs у ішемічному ушкодженні було виконано у співпраці зі співробітниками Марсельського Інституту системних нейронаук (керівник проф. П.Д.Брежестовський). Дослідження ролі PS1 і Syt1 у синаптичній пластичності було виконано у співпраці зі співробітниками Гарвардської Медичної Школи (керівник проф. О.Березовська). Дослідження ролі $\alpha 7$ -nAChRs проводилися у співробітництві з лабораторією імунології клітинних рецепторів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ (керівник академік НАНУ, д.б.н. М.В.Скок). Дослідження з використанням ММСК було проведено у співпраці зі співробітниками ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» к.м.н. Кириком В.М., к.б.н. Устименко А.М.

Автор висловлює подяку завідувачу відділом загальної та молекулярної патофізіології д.м.н. В.Є. Досенку за співпрацю у проведенні ПЛР-аналізу. 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 щиро вдячний д.б.н. Ісаєвій О.В., к.б.н. Савотченко А.В. за допомогу в електрофізіологічних дослідженнях. Автор висловлює подяку Лук'янець О.О. за допомогу у роботі з конфокальним мікроскопом.

Автор щиро вдячний науковому консультанту роботи чл.-кор. НАНУ, д.м.н., проф. Скибо Г.Г. за корисні поради під час планування експериментів та обговорення результатів.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації слухали та обговорювали на: 2nd INMED conference, 2003, La Ciotat (France); 17 з'їзді українського фізіологічного товариства, 2006, Чернівці (Україна); FENS, Geneva, 2008 (Switzerland); 8th MC/WG Meeting COST B30 Action: Neural Regeneration and Plasticity, 2009, Larnaca (Cyprus); V Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, 2011, Kyiv (Ukraine); 7th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, 2013, Kosice (Slovakia); XI European meeting on glial cells in health and disease, 2013, Berlin (Germany); Neuroscience 2013, SfN's (Society for Neuroscience) 43rd annual meeting, 2013, San Diego (USA); VI Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv (Ukraine); XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім.П.Г.Костюка, 2014, Київ (Україна); 7th International Congress in Kyiv, 2017, (Ukraine);

Публікації. Результати дисертації викладено у 52 публікаціях: статті – 22 (в тому числі 11 у закордонних виданнях), тези міжнародних та вітчизняних конференцій, симпозіумів, з'їздів – 30.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку використаної літератури та списку опублікованих за темою дисертації праць. Обсяг дисертації становить 310 с. Робота ілюстрована 105 рисунками і 4 таблицями. Список використаної літератури налічує 347 джерел.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних присвячений аналізу сучасних уявлень щодо клітинних та молекулярних механізмів, задіяних у розвитку ішемічного пошкодження гіпокампа. Представлено відомості про пластичні та функціональні зміни пірамідних нейронів, інтернейронів та гліальних клітин при ішемізації тканин мозку. Проаналізовано зміни синаптичного апарату, опосередковані дефіцитом кисню і глюкози. Розглянуто дані щодо ролі NCAM та HIF у процесах ішемічного ушкодження нервових клітин. Описаний феномен відстроченого характеру фатальних змін у мозковій тканині при ішемії, що передбачає так зване «терапевтичне вікно» для запобігання загибелі нервових клітин в умовах дефіциту кисню та глюкози. З цього приводу дослідження клітинних і молекулярних механізмів розвитку ішемічного ушкодження не втрачає своєї актуальності, зокрема з використанням модельних експериментальних систем *in vitro*.

У розділі «**Матеріали та методи досліджень**» представлено методичні підходи, використані під час виконання роботи. Всі експерименти на тваринах виконано з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях, статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки, прийнятих в установах Національної академії наук України.

Експерименти проводилися на *in vitro* моделях з використанням в більшості випадків органотипової культури гіпокампа (культивованих поперечних зрізів).

Для **одержання органотипової культури** використовувалися 7-денні щури лінії Вістар. До проведення експериментальних впливів зрізи гіпокампа культивували протягом 12 діб (період стабілізації) у планшетах на вставках з напівпроникною мембраною (Millicell-CM, Millipore, MA) на межі поживного рідкого (50 % MEM, 25 % Хенкса, 25 % інактивованої кінської сироватки, 10 мМ Трис, 2 мМ NaHCO₃, 12,5 мМ HEPES, 15 мМ глюкози, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, рН 7,2) та газового середовища в атмосфері зі збалансованою концентрацією CO₂ (5%) у повітрі при 35°C (Stoppini et al., 1991). Товщина зрізів становила 350 μm.

Ішемічне пошкодження моделювали методом, що широко використовується в експериментальних дослідженнях за допомогою киснево-глюкозної депривації (Medvedeva et al., 2017; Noraberg et al., 2005). КГД проводили у спеціальній камері, де кисень повітря замінювали на азот шляхом примусової подачі, а поживне середовище – на фосфатно-сольовий розчин без глюкози. Вплив КГД нормували за часом (10–30 хв). Після періоду КГД зрізи повертали у нормальні умови культивування (нормоксична реоксигенація) до часу проведення досліджень.

Життєздатність культур гіпокампа оцінювали декількома альтернативними методами: 1 – спектрофотометричний метод вимірювання відносної кількості цитозольного ферменту лактатдегідрогенази у культуральному середовищі (ЛДГ-тест, набір G1780, Promega, Німеччина); 2 – забарвлення трипановим синім (ТС); 3 – флуоресцентний метод забарвлення пропідіумом йодидом (ПЙ) (Laake et al., 1999).

Мітохондріальну активність у культурах оцінювали прижиттєво двома методами: 1 – спектрофотометричний MTS/формазановий-тест (набір G3582, Promega, Німеччина); 2 - флуоресцентний метод забарвлення MitoTracker Orange CMTMRos (MT) (набір M7510, Invitrogen, США).

Електрофізіологічний метод позаклітинного відведення від CA1 пірамідної зони збудливих постсинаптичних потенціалів дії (ЗПСП), викликаних стимуляцією CA3 колатералей Шафера, використовували для оцінки синаптичної пластичності пірамідних нейронів.

Імуногістохімічне (ІМГХ) виявлення специфічних білків, маркерів різних типів клітин та компонентів синаптичних контактів проводили за загальноприйнятою методикою з модифікаціями, рекомендованими виробниками. Виходячи із завдань, було використано такі специфічні антитіла з відповідними вторинними флуоресцентними маркерами: анти-NeuN – маркер нейронних ядер, анти-GAD67 – ГАМК-ергічних інтернейронів, анти-GFAP – астроглії, анти-Iba-1 – мікроглії, анти-Rip – олігодендроцитів, анти-GAP-43 – нейронних відростків, анти- $\alpha 7$ nAChR - $\alpha 7$ субодиниць нікотинових ацетилхолінових рецепторів, анти-Cx36 – електричних контактів, анти-SPh – синаптофізину (синаптичний білок), анти-GlyR – гліцинових рецепторів, анти-NIF – фактору, що індукується гіпоксією, анти-ГАМК – γ -амніномасляної кислоти. Флуоресценцію візуалізували при збільшенні $\times 200$, $\times 400$ або $\times 600$, використовуючи послідовно відповідні селективні фільтри (488 нм, 555 нм, 495 нм) конфокального мікроскопа FluoView™ FV1000 (Olympus Inc., США) з цифровою фотокамерою, поєднаною з комп'ютером.

Проводили також **подвійне та потрійне ІМГХ** забарвлення експериментальних культур чи **комбіноване гістохімічне/ІМГХ**, використовуючи послідовно прижиттєве забарвлення пропідіумом йодидом (ПЙ) чи мітотрекером (MT), а надалі, після фіксації культур, застосовували відповідні антитіла. У першому випадку рахували кількість ПЙ-забарвлених клітин із загальної кількості ІМГХ-забарвлених клітин на мм^2 . У випадку MT/ІМГХ обчислювали інтенсивність флуоресценції та площу ІМГХ-забарвлення через автоматичний розрахунок середнього значення напівтонів сірого у межах порога вимірювання за допомогою програми ImageJ. Результати виражалися як інтегральна щільність флуоресценції, що асоційована з певним типом клітин, виявлених за допомогою імуногістохімічних маркерів, яка дорівнює добутку інтенсивності флуоресценції та площі MT (за виключенням інтегральної щільності фонові

флуоресценції). Кінцевий показник відповідає даним, нормалізованим до площі ІМГХ-забарвлення.

На підставі **вимірювання швидкості знебарвлення** у зонах синапсів флуоресцентного барвника FM1-43 у результаті гіперкалієвої деполяризації (Molecular Probes, США), оцінювали синаптичну активність нейронів у культурах дисоційованих клітин гіпокампа, отриману за методом Maar (Maar et al., 1997). Результати візуалізували та оцінювали за допомогою конфокального мікроскопа (MultiProbe 2001 laser scanning confocal microscope, збільшення – $\times 840$) і програми ImageSpace (Amersham Biosciences, США).

Світлова мікроскопія застосовувалась на багатьох етапах дослідження як: а) компонент імуногістохімічного дослідження, б) проміжний етап електронно-мікроскопічного дослідження, в) засіб контролю стану культур. Заключення культур у смолу, отримання напівтонких та ультра тонких зрізів проводили за стандартизованою методикою (Fedoroff et al., 2001). Напівтонкі зрізи, забарвлені 1% розчином толуїдинового синього, оцінювали за допомогою світлового мікроскопа Zeiss Jena (збільшення $\times 400$), підраховуючи кількість нормальних, конденсованих та набряклих нейронів у CA1 зоні культивованих зрізів гіпокампа, крім того виявляли зону інтересу для електронної мікроскопії.

Електронна мікроскопія та 3D-реконструювання. Серійні ультратонкі зрізи (60-70 нм завтовшки) були зроблені за допомогою ультрамікротому Ultracut-E (Reichert-Jung, Австрія) у зоні CA1 *stratum radiatum* гіпокампальних зрізів. Зрізи збирали на вкриті формваровою плівкою бленди та контрастували ураніл ацетатом і цитратом свинцю. Ультратонкі препарати аналізували за допомогою електронних мікроскопів Philips CM10, Tecnai G212 (FEI Company, Нідерланди), обладнаного цифровою камерою Mega View III (Soft Imaging Systems, Німеччина) або JEM100-CX (Jeol, Японія). Цифрові фотографії були зроблені із збільшенням $\times 10000$ -23000.

На основі серійних мікрофотографій було проведено 3D-реконструювання та морфометричний аналіз збудливих, гальмівних синапсів і глії з використанням програми Reconstruct, розробленої Fiala та Harris (Harris et al., 2003); <http://synapses.mcg.edu/>, США. Проведено детальний аналіз розподілу синаптичних везикул у збудливих синапсах за допомогою програми UTHSCSA ImageTool версія 3 (Університет Техасу, США) та програми LoClust (Nikonenko et al., 2004).

Кількісний ПЛР-аналіз. Дослідження рівня експресії HIF-1 α та HIF-3 α субодиниць проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі у поодиноких нейронах CA1 та CA3 зон культивованих зрізів гіпокампа (Single-cell real-time RT-PCR). Дослідження зміни рівня експресії Ca²⁺-АТФаз плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму підтипів PMCA1, PMCA2 та SERCA2b проводили за допомогою ПЛР у реальному часі в CA1 зоні. Для ПЛР були використані специфічні праймери, комплементарні унікальним послідовностям нуклеотидів, які утворюються

після вирізання інтронів під час сплайсингу матричної РНК (мРНК). Це дозволяло виключити можливість ампліфікації необхідного продукту з ядерною ДНК, а не з матриці, отриманої внаслідок зворотної транскрипції. β -актин використовували як внутрішній контроль; для експериментів з поодинокими нейронами додатково використовували нейрональний маркер – енолазу (NSE).

Статистичний аналіз результатів. Представлені у роботі експериментальні дані є результатом щонайменше трьох серій незалежних експериментів. Статистичну обробку проводили за допомогою електронних таблиць Excell 2007 (США) та одного з програмних забезпечень: GraphPad Prism 5.01 (США), Origin 8 (США), Statistica версія 5 (США), Clampfit (США), Mini Analysis (версія 5.5, Synaptosoft, Decatur, GA). Дані перевіряли на нормальність за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Результати характеризувалися нормальним розподілом. Імовірність індукування довготривалої потенціації була оцінена за допомогою тесту Фішера. Цифрові дані представлені як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього арифметичного (SEM). Вибірки порівнювали, використовуючи Tukey-тест (ANOVA) або t-критерій Стюдента, а відмінності вважалися достовірними при $p < 0,05$. На діаграмах вірогідні зміни щодо контролю позначені «*», щодо КГД – «#».

Результати досліджень та їх обговорення

Відомо, що гіпокамп є найбільш вразливою структурою мозку при ішемії. Різні клітини гіпокампа мають неоднакову чутливість до ішемічних умов. Багато питань щодо динаміки і механізмів розвитку ішемічного пошкодження та запобігання загибелі нервових клітин залишаються відкритими. Представлена робота орієнтована на комплексний аналіз морфо-функціонального стану різних типів гіпокампальних клітин та міжклітинних взаємодій при моделюванні ішемічного пошкодження *in vitro* з використанням культур гіпокампа. Крім того, досліджено ендогенні механізми забезпечення життєздатності і функціональної активності клітин гіпокампа, що обумовлюють відтермінований характер пошкодження нейронів, зокрема найбільш чутливих до киснево-глюкозного дефіциту пірамідних нейронів CA1 зони (Гусев et al., 2001; Kreisman et al., 2000; Schmidt-Kastner, 2015; Ou et al., 2018).

Характеристика органотипової культури гіпокампа та оптимізація моделі

Протягом 12 днів культивування зрізи очищувалися від клітин, ушкоджених під час виділення і посадки, та досягали стабільного стану. Вони зберігали природну структуру тканини, типи клітин та міжклітинні зв'язки (Рис. 1). Дослідження були акцентовані на CA1 зону гіпокампа, найбільш чутливу до нестачі кисню і глюкози.

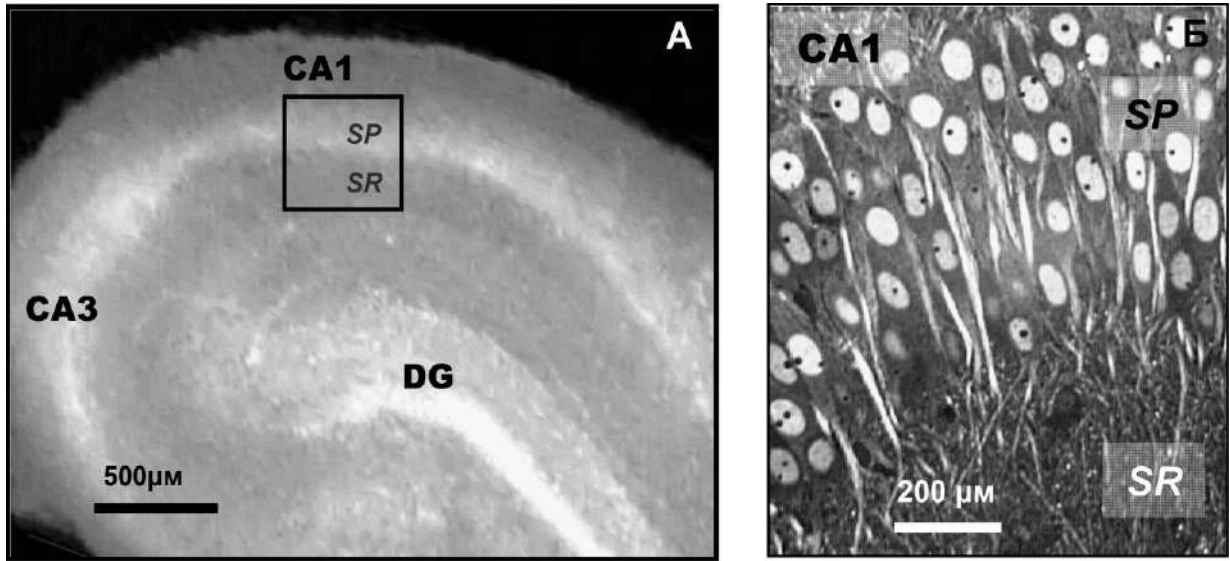


Рис.1. Фото культивованого зрізу гіпокампа (А) та CA1 зони, забарвленого толудіновим синім напівтонкого зрізу (Б), де зображені: ділянка, сформована тілами пірамідних нейронів (*stratum pyramidale* – SP) та ділянка, сформована переплетінням відростків пірамідних нейронів і клітин інших типів (*stratum radiatum* – SR, Нейроніль).

Прижиттєве забарвлення контрольних зрізів вітальними барвниками (трипановим синім або пропідіум йодидом) практично не виявляло ушкоджених клітин, а рівень ЛДГ у культуральному середовищі виражався мінімальними значеннями.

Киснево-глюкозна депривація (КГД) була використана для створення умов, які характерні для ішемії мозку. Схема передбачала тимчасовий період КГД з наступною нормоксичною реоксигенацією (Рис. 2).



Рис. 2. Дизайн дослідження.

Проведено серію експериментів з визначення оптимальних умов КГД і створення придатної моделі для дослідження початкових та відтермінованих ефектів. Оцінку життєздатності органотипових культур гіпокампа проводили відразу після КГД, а також через 1, 4 і 24 год після КГД (нормоксична реоксигенація) за допомогою забарвлення зрізів вітальним барвником трипановим синім (Рис.3).

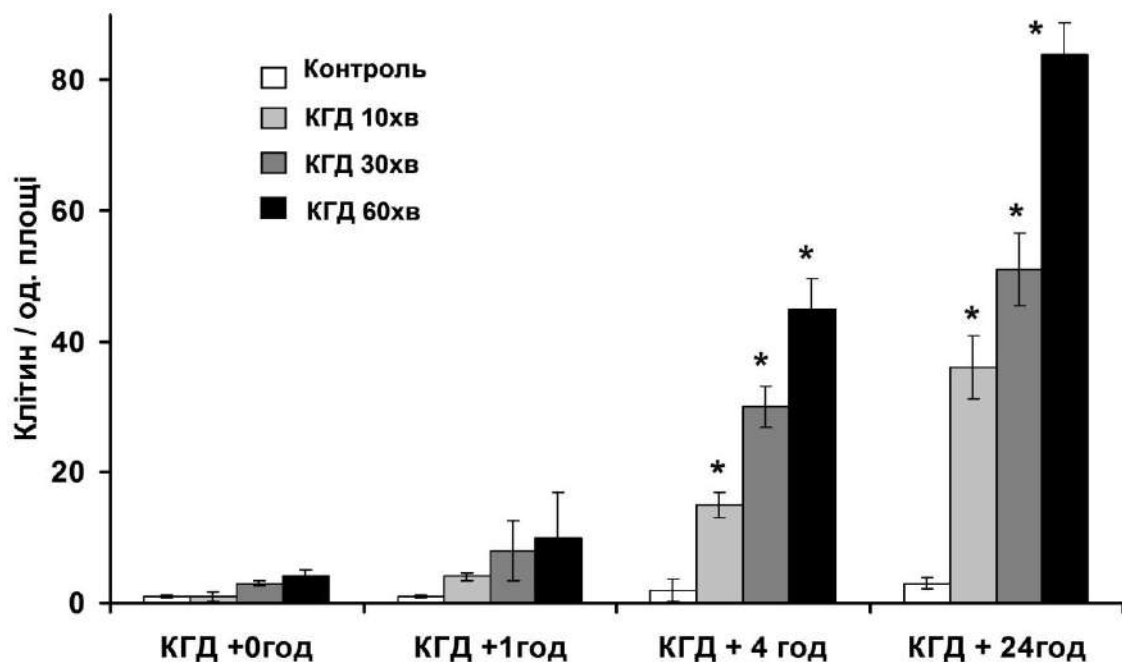


Рис. 3. Кількість забарвлених трипановим синім СА1 нейронів гіпокампа в умовах КГД різної тривалості (10, 30 та 60 хв) та подальшої реоксигенації (1, 4 та 24 год). $n=10$, * – $p<0,05$ до контролю.

За цих експериментальних умов виявлена пряма залежність ступеня ушкодження СА1 пірамідних нейронів від часу КГД та тривалості подальшої реоксигенації. Протягом першої години нейрони зберігали життєздатність. Значні ознаки ушкодження клітин спостерігалися у 4-годинний термін після КГД та посилювалися через 24 год. Таким чином, у використаних варіантах впливів КГД не викликала швидких деструктивних змін, але призводила до відстрочених ефектів. Така експериментальна модель є адекватною для вивчення механізмів розвитку ушкодження нервових клітин в умовах нестачі кисню та глюкози, що є характерним при ішемізації тканин мозку. У подальших експериментах використовували найбільш придатний у цих межах режим, виходячи з конкретної задачі.

Оцінка життєздатності різних типів клітин гіпокампа в умовах КГД

Відомо, що тканина гіпокампа містить такі типи клітин: пірамідні нейрони, інтернейрони, астрогліальні і мікрогліальні клітини та олігодендроцити. Вони тісно взаємодіють і мають різну чутливість до киснево-глюкозного дефіциту. Нами була проведена комплексна оцінка структурних та функціональних змін у основних типах клітин культивованих зрізів гіпокампа за умов КГД.

Пірамідні нейрони, інтернейрони, астрогліальні та мікрогліальні клітини ідентифікували за допомогою специфічних антитіл з урахуванням їх структурного розташування. Пірамідні нейрони є NeuN-імунопозитивні. Їх тіла утворюють щільний пірамідний шар. ГАМК-ергічні інтернейрони – GAD67-

позитивні, астрогліальні клітини – GFAP-позитивні, мікрогліальні клітини – Iba-1-позитивні.

Візуальні спостереження вказують на суттєву втрату пірамідних нейронів СА1 зони та активацію гліальних клітин через 24 год після КГД. Використовуючи комбіноване послідовне прижиттєве забарвлення культивованих зрізів ПЙ, який маркує пошкоджені клітини, та подальше, після фіксації тканини, ІМГХ забарвлення, проаналізовано стан вказаних типів клітин у СА1 зоні після КГД. У контролі клітини не проявляють ознак пошкодження. Через 24 год більшість пірамідних нейронів забарвлювалася ПЙ. Колоколізації ПЙ з маркерами інших клітин практично не спостерігалось, що свідчить про їх більшу стійкість до КГД.

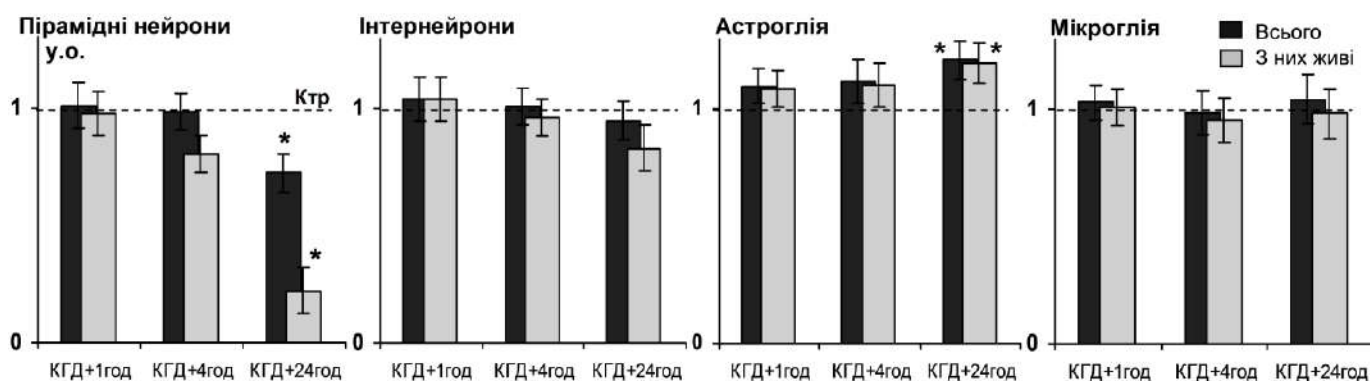


Рис. 4. Гістограми змін кількості різних типів клітин (темний стовпчик – всього, сірий – з них живі): пірамідні нейрони, інтернейрони, астрогліальні клітини, мікрогліальні клітини. $n=10$, * – $p<0,05$ до контролю.

Оцінка кількості та життєздатності основних типів клітин після КГД подана на діаграмах, які ілюструють загальну кількість клітин та кількість живих через 1, 4 і 24 год після КГД відносно контролю (**Рис. 4**). У випадку пірамідних нейронів спостерігається суттєве зниження їх загальної кількості та кількості неушкоджених клітин. Інтернейрони зберігають життєздатність та кількість. Астрогліальні та мікрогліальні клітини також залишаються життєздатними. Кількість астроцитів певною мірою збільшується. Ці результати безперечно вказують, що за рівних умов впливу КГД інтернейрони, астрогліальні та мікрогліальні клітини є відносно резистентними до КГД у порівнянні з пірамідними нейронами.

Зміни мітохондріальної активності у різних типах гіпокампальних клітин культивованих зрізів при КГД

Клітинний метаболізм великою мірою визначається станом мітохондрій, а їх кількість, морфологія та активність значно варіюють. Ключовим індикатором активності мітохондрій є їх мембранний потенціал. Розроблено селективні для мітохондрій флуоресцентні барвники (мітотрекери – МТ), які дають змогу досліджувати активність мітохондрій у живих клітинах при

різних експериментальних впливах (Buckman et al., 2001; Niizuma et al., 2010). Ступінь акумуляції барвника відповідає рівню мітохондріальної активності. Використання в умовах нашої експериментальної моделі МТ у комбінації з іммуногістохімічним забарвленням клітин дозволило оцінити мітохондріальну активність у клітинах різних типів.

Оцінювали МТ-позитивний сигнал, колокалізований з маркером відповідних клітин. Кількісний аналіз середнього рівня мітохондріальної активності клітин CA1 зони культивованих зрізів (пірамідні нейрони, інтернейрони, астроглія, мікроглія) виявив такі зміни після КГД (**Рис. 5**): протягом 1 год – спостерігається підвищення мітохондріальної активності в усіх типах клітин, що вказує на наявність у них певного енергетичного резерву для підтримки клітинного гомеостазу; у пірамідних нейронах – через 4 год активність мітохондрій знижується до контрольного рівня, надалі (через 24 год) стає достовірно нижче; у інтернейронах – мітохондріальна активність залишається високою через 4 год і стабілізується у 24-годинний термін; у астро- і мікрогліальних клітинах – мітохондріальна активність поступово і суттєво підвищується протягом 24 год. Зміни мітохондріальної активності напряду співвідносяться з життєздатністю клітин. Виживання чи загибель нейрональних клітин значною мірою обумовлено станом мітохондрій. Пірамідні нейрони пошкоджуються раніше, інтернейрони більш стійкі стосовно КГД. Коли енергетичні резерви пірамідних нейронів вичерпуються, вони гинуть шляхом апоптозу, в той же час інтернейрони виживають, крім того, спостерігається активація астрогліальних і мікрогліальних клітин.

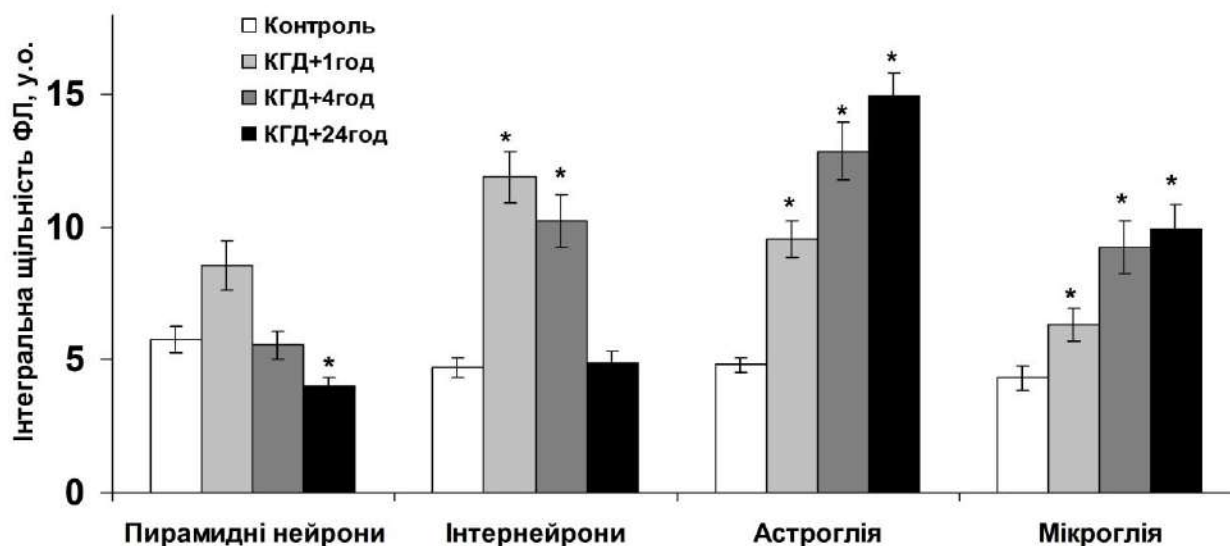


Рис. 5. Кількісна оцінка комбінованого ІМГХ/МТ забарвлення у CA1 зоні культивованих зрізів гіпокампа за нормальних умов та після КГД і подальшої нормоксичної реоксигенації (1, 4 і 24 год). Гістограма ілюструє зміни мітохондріальної активності у різних типах клітин.

$n=10$, * – $p<0,05$ до контролю.

Зниження рівня мітохондріальної активності та кількості пірамідних нейронів у віддалені терміни після КГД має у своїй основі певні функціональні та пластичні зміни у початковий період.

Міжклітинні взаємодії в умовах КГД

У розвитку ішемічного пошкодження в значній мірі задіяні рецептор-опосередковані міжклітинні взаємодії (Hillis, 2005; Weinberg et al., 2016]. Відомо, що нейродегенеративні механізми пов'язані з порушенням клітинної сигналізації та обміну речовин, гіперактивацією збудливих NMDA, AMPA, кайнатних і mGlu рецепторів, глутаматною ексайтотоксичністю, підвищенням внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} , активацією катаболічних ферментів, мітохондріальною дисфункцією і окисним стресом (Hu, 2017; Mattson, 2003). Будь-які внутрішньо- та позаклітинні біохімічні зміни у нервовій тканині викликають зміни функціональної і структурної пластичності нейронів та міжклітинних контактів. Показано, що у гіпокампі короткий період аноксії/гіпоглікемії індукує довготривалу потенціацію (ДП) синаптичної передачі в CA1 зоні (Jourdain et al., 2002; Matsuzaki et al., 2004), і це корелює з динамічними пластичними змінами у морфології синапсів та клітин в цілому (Park et al., 2011; Popov et al., 2004). Цей процес супроводжується значним вивільненням глутамату, активацією глутаматних рецепторів та інтенсивним входом Ca^{2+} у клітини (Ganeshina et al., 2004), що у випадку пролонгованої дії призводить до перезбудження, пошкодження та загибелі нейронів. Морфологічні зміни роблять внесок у модуляцію ефективності синапсів. Більшість морфологічних змін, пов'язаних з пластичністю, були охарактеризовані на рівні постсинаптичних шипиків, тоді як пресинаптичну область досліджено меншою мірою. Ще менше відомо про відростки гліальних клітин, які можуть вважатися третім важливим компонентом синаптичного комплексу. Останні дані свідчать про те, що астроцити регулюють локальне оточення синапсів, впливають на синаптичну активність і, значною мірою координують роботу нейронних мереж. Це призвело до виникнення концепції трьох компонентів збудливого синапсу, що містить сам синаптичний контакт та асоційовану з ним глію (Nedergaard et al., 2012; Theodosis et al., 2008). Дослідження згаданих елементів та модуляція пластичних змін синаптичного комплексу при дефіциті кисню та глюкози мають широкі перспективи для корекції нейропатології.

Аналіз структурної пластичності синапсів CA1 зони проведений нами у ранні терміни після КГД, коли активно задіяні процеси глутамат-опосередкованої сигналізації, зберігається високий рівень метаболізму і життєздатності клітин. У гіпокампі міжнейронні взаємодії в більшості здійснюються через збудливі (між пірамідними нейронами) та гальмівні (між пірамідними нейронами і інтернейронами) синапси. Збудливі глутаматергічні

синапси розташовані переважно у нейропілі, а гальмівні ГАМК-ергічні на поверхні соми пірамідних нейронів (Рис. 6).

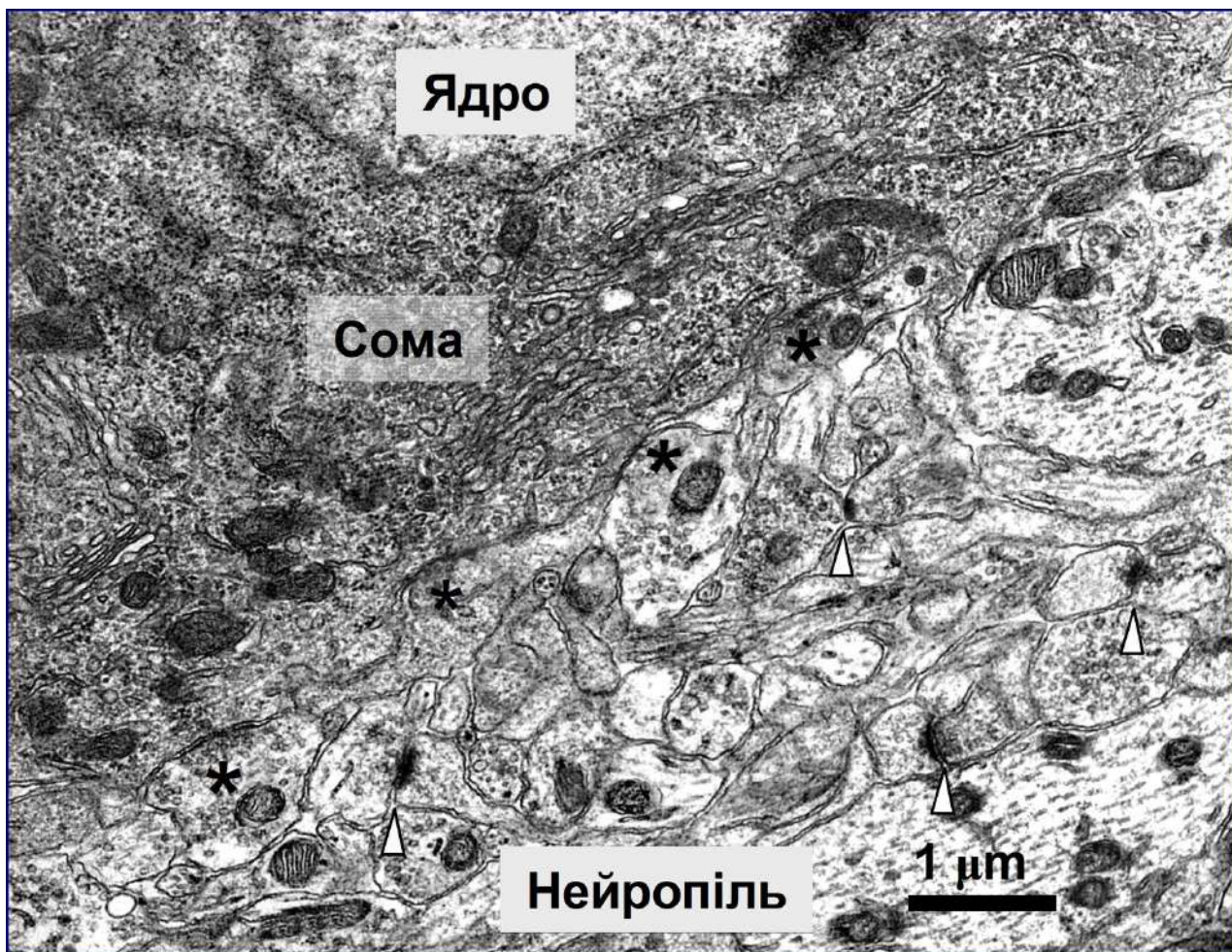


Рис. 6. Електронно-мікроскопічне фото фрагменту пірамідного нейрона та наближеної до нього ділянки нейропілю CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа. Трикутником позначені збудливі синапси, зірочкою – гальмівні синапси.

Синапс складається з пресинаптичної терміналі з синаптичними везикулами, шипика з постсинаптичною щільністю та синаптичної щілини.

Структурні особливості синапсів показано на **Рис. 7**: у збудливих – активна зона має яскраво виражену постсинаптичну щільність асиметричної форми відносно ділянки пресинаптичної терміналі; у гальмівних – активна зона має симетричну форму. Виділяють прості і складні форми синапсів обох типів. Прості мають суцільну постсинаптичну щільність, у складних вона переривчаста.

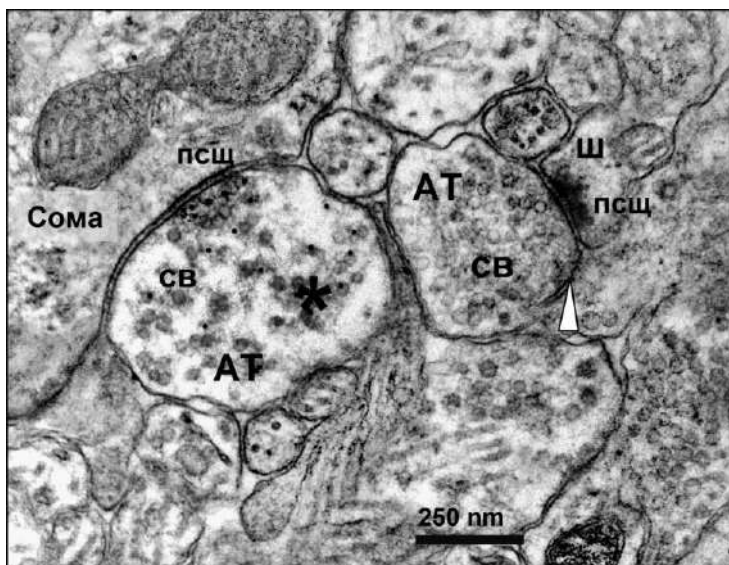


Рис. 7. Електронно-мікроскопічне фото збудливого та гальмівного синапсів.
Позначення:
* – гальмівний симетричний синапс,
Δ – збудливий асиметричний синапс,
АТ – терміналь,
ш – шипик,
псц – постсинаптична щільність,
СВ – синаптичні везикули.

Для дослідження структурної пластичності синапсів, великий інтерес мають об'ємні характеристики, вивчення яких пов'язане з кількісним стереологічним аналізом тривимірних реконструкцій, отриманих з використанням серійних електронно-мікроскопічних зображень синапсів (Рис. 8).

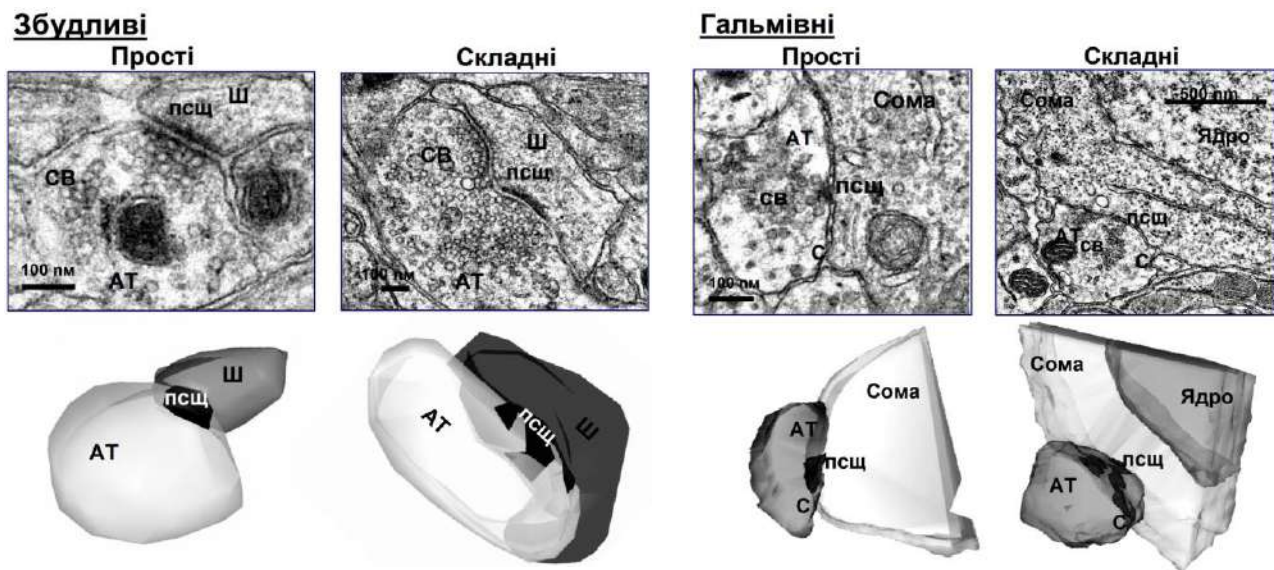
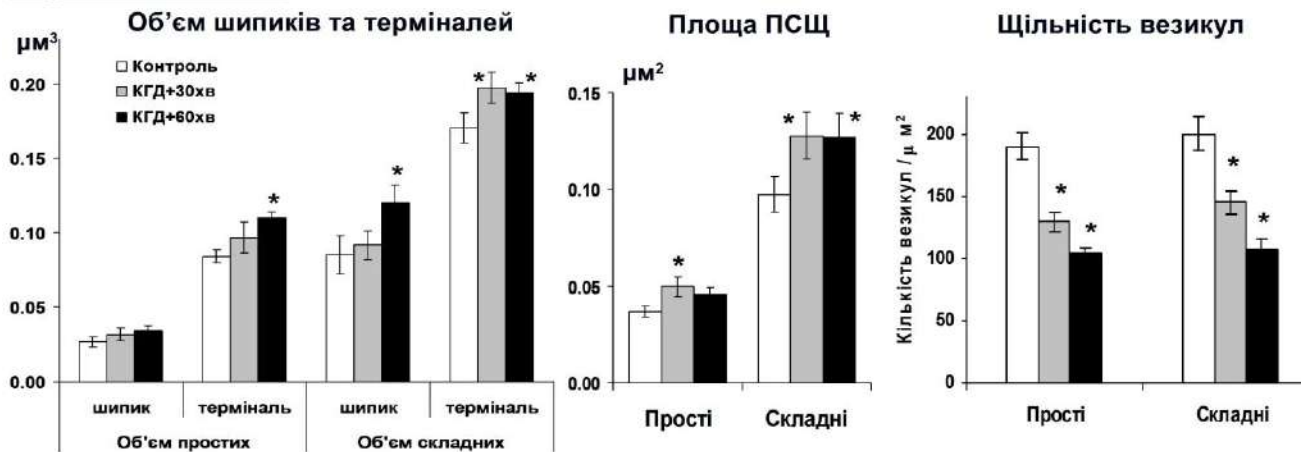


Рис. 8. Тривимірне зображення синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа з фрагментом їх електронно-мікроскопічних зображень (зліва направо): збудливі асиметричні синапси (простий і складний); гальмівні симетричні синапси (простий і складний). Позначення: АТ – аксонна терміналь, Ш – шипик, ПСЦ – постсинаптична щільність, СВ – синаптичні везикули.

Використовуючи технологію тривимірного реконструювання, ми провели морфометричний аналіз збудливих і гальмівних синапсів через 30 і 60 хв після КГД.

У початковий період після КГД загальна кількість синапсів не змінювалася, але були виявлені їх суттєві структурні зміни. Спостерігалися односпрямовані тенденції для збудливих і гальмівних синапсів обох форм (простих і складних). У збудливих виявлено збільшення об'єму пресинаптичних терміналей і постсинаптичних шипиків, збільшення площі ПСЦ та зменшення щільності синаптичних везикул (Рис. 9). У гальмівних виявлено збільшення об'єму пресинаптичної терміналі, площі стикання з сомою та постсинаптичної щільності. Ефекти КГД були більш вираженими у складних синапсах.

Збудливі синапси



Гальмівні синапси

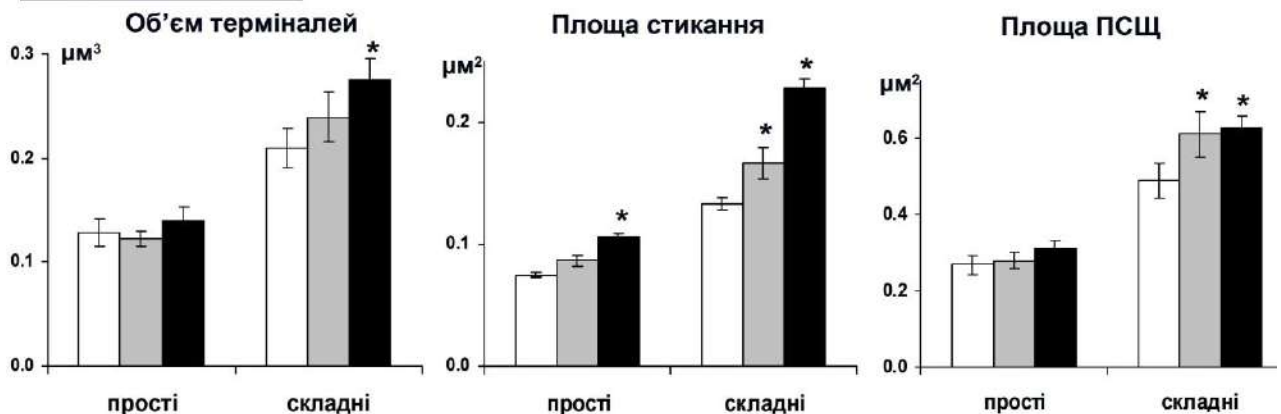


Рис. 9. Кількісний аналіз збудливих і гальмівних синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа через 30 та 60 хв після КГД (прості – $n=30$; складні – $n=20$), * – $p < 0.05$ до контролю.

Третім компонентом синаптичного апарату вважається навколосинаптична глія. Відростки астроцитів ми ідентифікували за їх морфологічними ознаками: відносно світла цитоплазма, неправильна форма, присутність гранул глікогену та типові пучки проміжних філаментів у великих відростках. На основі тривимірних реконструкцій виявлено значне збільшення гліального покриття активованих після КГД збудливих синапсів (**Рис. 10**). Такі результати підтверджують ідею активної участі гліальних клітин у структурній пластичності, що індукована синаптичною активністю. Спостерігається суттєва активація гліальних клітин, найбільш імовірно для вилучення надлишку глутамату з позаклітинного середовища та стабілізації стану нейронів.

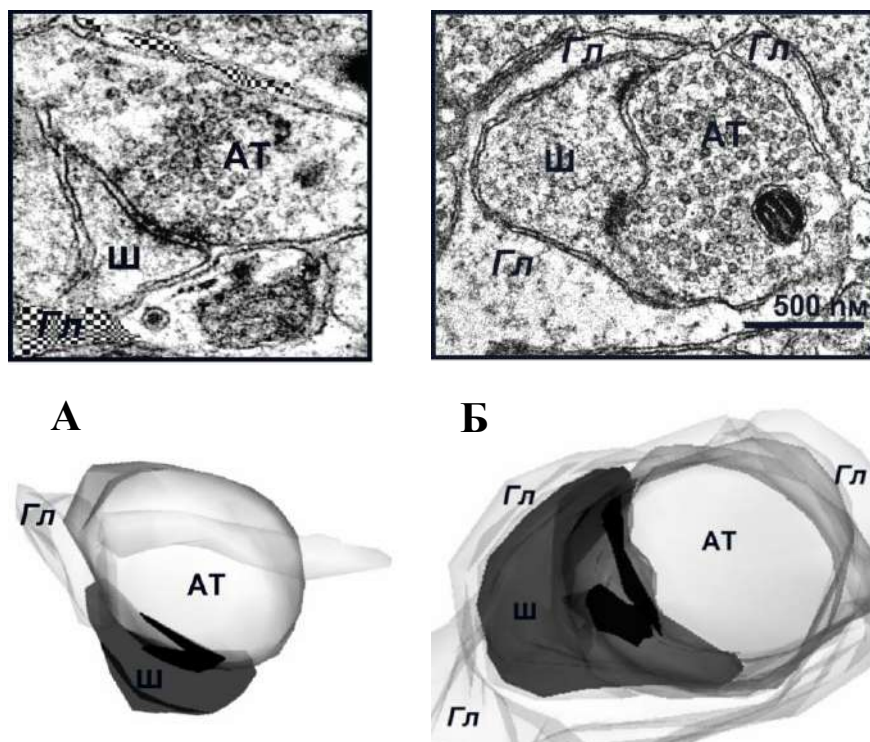


Рис. 10. Електронно-мікроскопічні фото збудливих синапсів та їх тривимірні реконструкції: контрольний простий (А) і складний після КГД (Б). Позначення: АТ – аксонна терміналь, Ш – дендритний шипик, Гл – гліальні відростки.

Був проведений морфометричний аналіз гліальних відростків. Ми акцентували увагу на змінах площі гліальних відростків навколо збудливих синапсів та розташованих поза зони контакту. Виявлено значне збільшення площі глії, що безпосередньо контактує з синапсом через 30 і 60 хв після КГД. Показано, що існує пряма кореляція між площею поверхні синапсу та площею навколосинаптичної глії (**Рис. 11**).

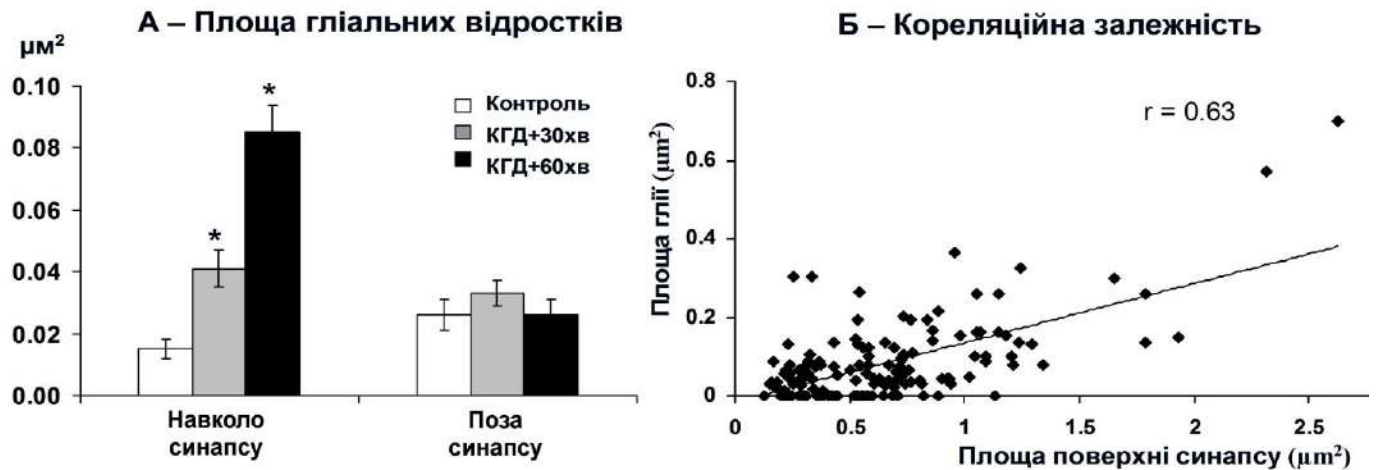


Рис. 11. Зміни площі гліальних відростків, які розташовані навколо збудливих синапсів та поза ними у зоні CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа через 30 та 60 хв після КГД (А). Графік, що демонструє кореляційний зв'язок між площею поверхні збудливих синапсів та площею навколишньої з ним глії (Б). $n=50$, * – $p < 0.05$ до контролю.

Перебудови глії були залежні від активації збудливих глутаматергічних синапсів після КГД, що підтверджувалося в експериментах, де культури обробляли специфічним антагоністом NMDA рецепторів (D-AP5) за 15 хв до та протягом періоду КГД, щоб запобігти потенціації синапсів. У цих умовах параметри всіх синаптичних елементів (об'єм шипику і терміналі, площа ПСЦ, площа навколосинаптичної глії) не відрізнялись від нестимульованого контролю. Це свідчить, що КГД-індуковані структурні зміни збудливих синапсів і гліальних відростків обумовлені переважно активацією NMDA рецепторів. Таким чином, результати структурного аналізу вказують на суттєві пластичні зміни синаптичного апарату у початковий період після КГД.

Електрофізіологічні дослідження змін синаптичної пластичності пірамідних нейронів в умовах КГД були проведені нами, використовуючи метод позаклітинного відведення від CA1 зони потенціалів дії, викликаних стимуляцією колатералей Шафера. Реєстрували сумарну відповідь пірамідних клітин, які одночасно генерують потенціали дії (ПД) – популяційні спайки (ПС). Амплітуда популяційного спайка відображає кількість, амплітуду і синхронізацію одиночних ПД та є мірою збудливості і синхронізації нейронів. Визначали амплітуду ПС та виявляли рівень фасилітації/депресії синаптичної передачі внаслідок дії парної стимуляції (співвідношення $A2/A1$, де $A1$ та $A2$ є амплітудами ПС, викликаними першим і другим імпульсами, відповідно) у культивованих зрізах за нормальних умов та через 1 і 4 год після КГД. Було виявлено, що амплітуда ПС суттєво зменшується у 4-годинний термін після КГД. Через 1 год амплітуда ПС не відрізняється від контролю, але спостерігалася депресія синаптичної передачі (**Рис. 12**).

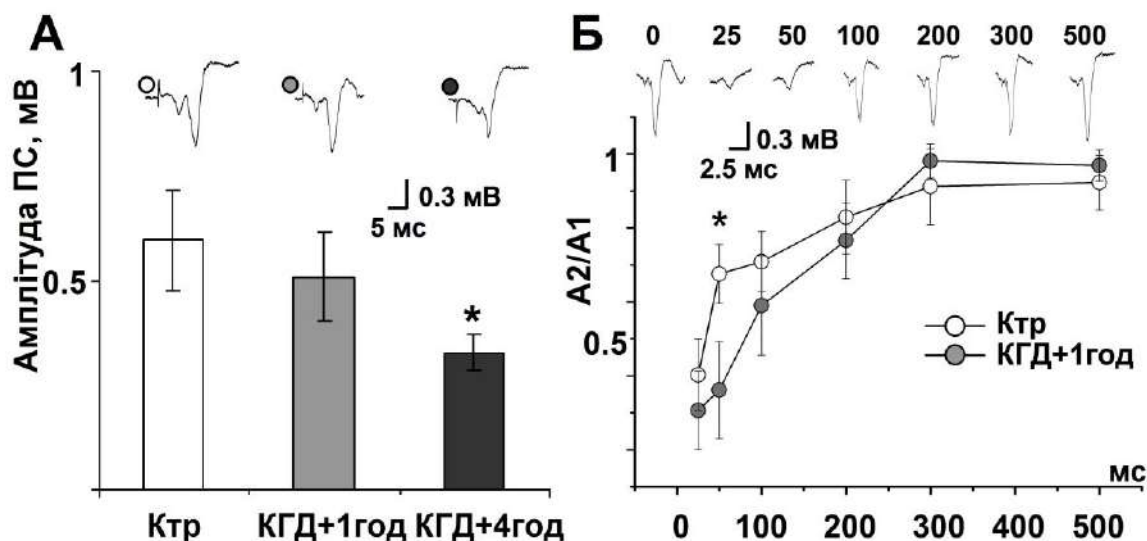


Рис. 12. Зміни синаптичної пластичності CA1 пірамідних нейронів культивованих зрізів гіпокампа після 30 хв КГД та наступної нормоксичної реоксигенації. А – амплітуда ПС; Б – рівень ефективності синаптичної передачі. $n=8$, * – $p<0,05$ до контролю.

Отже, КГД викликає поступове зниження функціональної активності та життєздатності пірамідних нейронів CA1 зони, які корелюють зі змінами синаптичної пластичності.

Роль гальмівних інтернейронів у патогенезі ішемічного пошкодження не повністю зрозуміла і її дослідження не втрачає актуальності. Великий інтерес викликає вивчення властивостей КГД-резистентних інтернейронів та дослідження механізмів, обумовлених взаємодією між CA1 пірамідними нейронами та інтернейронами через гальмівні ГАМК-ергічні рецептори в умовах нашої експериментальної моделі після КГД.

За допомогою специфічних антитіл було виявлено, що більш стійкі до КГД ГАМК-ергічні GAD67-позитивні інтернейрони експресують $\alpha 7$ -нікотинові ацетилхолінові рецептори та специфічний білок електротонічних контактів – конексин 36 (**Рис. 13**), на що вказує колокалізація відповідних білків. Результати свідчать, що ці нейрони ацетилхолінчутливі та мають електротонічні синапси.

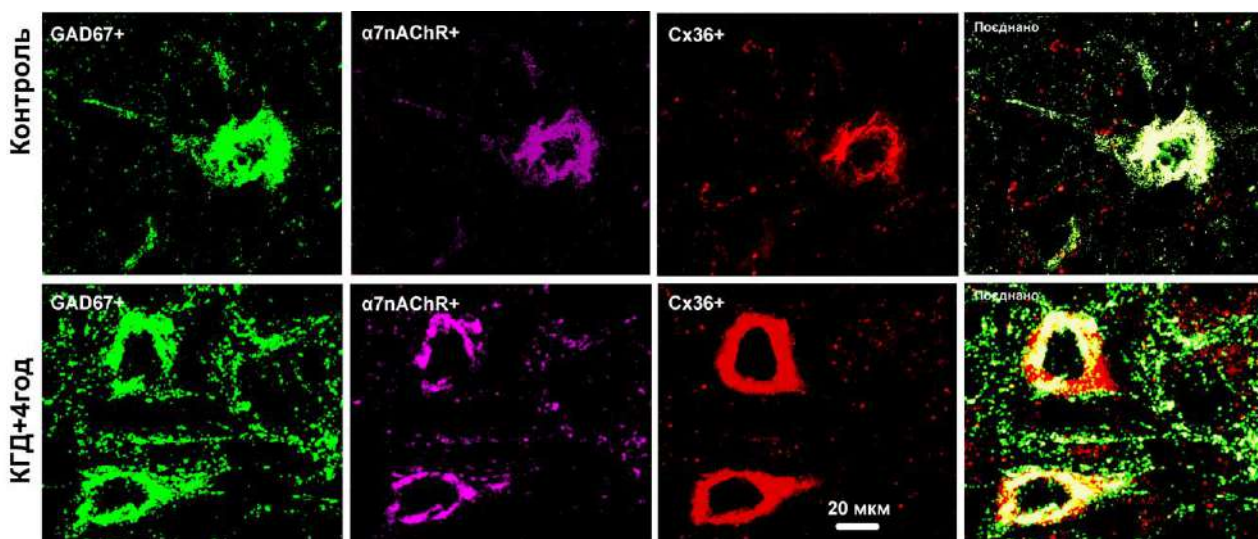


Рис. 13. Фото, що ілюструє колокалізацію GAD67, $\alpha 7$ -nAChR і Cx36 у інтернейронах культивованих гіпокампальних зрізів за нормальних умов та через 4 год після КГД.

Наявність виявленої нами коекспресії зазначених білків у гіпокампальних інтернейронах є важливим фактором їх КГД-резистентності у порівнянні з пірамідними нейронами. Відповідні підтвердження описані в літературі (Kawai et al., 2002; Oguro et al., 2001; Thompson et al., 2006).

Щоб з'ясувати, чи сприяють КГД-стійкі GAD67+ інтернейрони, які експресують $\alpha 7$ -nAChR і Cx36, підтримці життєздатності гіпокампальних CA1 пірамідних нейронів, ми провели експерименти з використанням селективних блокаторів, зокрема габазину (ГБ, блокатор ГАМК-рецепторів), метиллікоконітину (MLA, антагоніст $\alpha 7$ -nAChR) та карбенексолону (КБК, блокатор електричних контактів). Виявлено, що як за нормальних умов, так і при КГД присутність габазину збільшує кількість пошкоджених нейронів (**Рис. 14, А**). Таким чином, життєздатність пірамідних нейронів CA1 зони в значній мірі обумовлена взаємодією з ГАМК-ергічними інтернейронами.

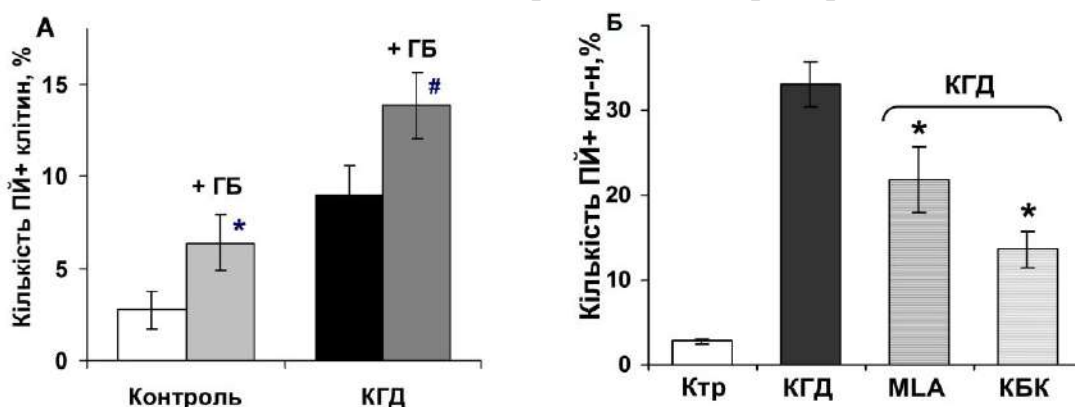


Рис. 14. Вплив блокаторів (А) ГАМК-рецепторів (ГБ) та (Б) $\alpha 7$ -nAChRs (MLA) і Cx36-каналів (КБК) на життєздатність CA1 пірамідних нейронів культивованих гіпокампальних зрізів через 4 год після КГД.

$n=10$, * – $p<0,05$ до контролю, # – $p<0,05$ до КГД.

Нами було виявлено, що при КГД блокада $\alpha 7$ -nAChRs та Cx36-каналів за допомогою MLA та КБК відповідно має певні нейропротекторні ефекти. За умов нашої експериментальної моделі кількість ПЙ+ клітин у CA1 пірамідній зоні була меншою ніж при КГД (Рис. 14, Б). Крім того MLA та КБК стабілізують функціональний стан самих інтернейронів. Показано, що інтернейрони дещо активуються у 4-годинний термін після КГД, оскільки збільшується їх GAD67+ імунореактивність і мітохондріальна активність (Рис. 15, А, Б відповідно). Використання блокаторів значною мірою нормалізує стан інтернейронів. Підвищена життєздатність пірамідних нейронів при дії блокаторів, які координують стан інтернейронів, передбачає певну кооперацію згаданих механізмів у модуляції виживання нейронів в умовах КГД.

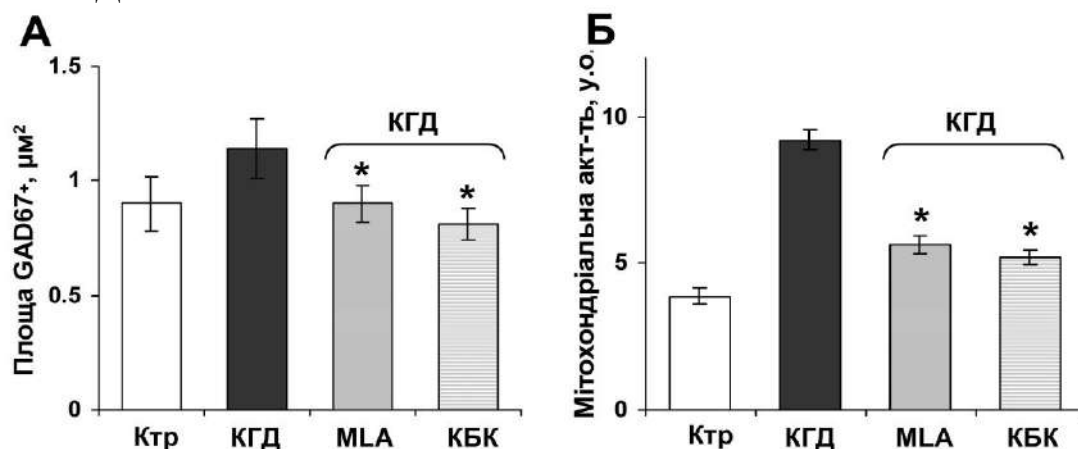


Рис. 15. Вплив блокади $\alpha 7$ -nAChRs (MLA) та Cx36-каналів (КБК) на функціональну активність інтернейронів культивованих гіпокам্পальних зрізів через 4 год після КГД. $n=10$, * – $p < 0,05$ до КГД.

Підвищена експресія GAD розглядається як ознака гіперактивності ГАМК-ергічних інтернейронів (Li et al., 2010). GAD67-імунореактивність і мітохондріальна активність значною мірою визначають метаболічні взаємозв'язки між інтернейронами (Romjin et al., 1994). Показано, що GAD-опосередкований ГАМК-синтез активується на ранньому етапі після КГД і супроводжується підвищеною активністю мітохондрій та надмірним вивільненням ГАМК у гальмівних синапсах (Ivannikov et al., 2013; Jinet et al., 2003; Madl et al., 2000). Ці процеси викликають позаклітинне накопичення ГАМК, яке, залежно від умов ішемії, може або сприяти захисту, як це спостерігається в наших експериментальних умовах, або посилювати ушкодження і загибель пірамідних нейронів.

Нормалізація GAD67-імунореактивності та мітохондріальної активності, які спостерігалися в наших експериментах з блокадою $\alpha 7$ -nAChR або Cx36-каналів при КГД, можуть відображати процеси стабілізації синтезу/обміну ГАМК (Mason et al., 2001), що врешті-решт призводить до значного поліпшення життєздатності пірамідних нейронів. Ці результати

дозволяють припустити, що колокалізація функціональних $\alpha 7$ -nAChR та Cx36-каналів в ГАМК-ергічних інтернейронах забезпечує умови для координування механізмів, пов'язаних з нікотиновими ацетилхоліновими, Cx36-обумовленими електричними та ГАМК-ергічними сигнальними системами, які мають значний потенціал ефективності для захисту від ішемічного ушкодження в гіпокампі.

Роль гальмівних гліцинових рецепторів (GlyRs)

Відомо, що при патологічних станах головного мозку, зокрема при ішемії, задіяні гальмівні гліцинові рецептори. Вони модулюють глутаматергічні, холінергічні, дофамінергічні і ГАМК-ергічні сигнальні шляхи, впливають на збудливість нейронних ланцюгів і значною мірою визначають життєздатність клітин. (Kuenzel et al., 2017; Lévi et al., 2008; Morais et al., 2017). В гіпокампі GlyRs модулюють збудливість нейрональних мереж, клітинного гомеостазу і життєздатності та відіграють важливу роль в модуляції ендогенної нейропротекції (Eichler et al., 2009; Lynch et al., 2017; Xu et al., 2010). GlyRs, в основному, пов'язують з нейронами, але було показано, що вони також виражені у гліальних клітинах (Deleuze et al., 2005; Parouin et al., 2017). Дані про КГД-опосередковані зміни конфігурацій GlyRs, пов'язаних з пошкодженням клітин гіпокампа, практично відсутні.

За допомогою подвійного ІМГХ забарвлення ми оцінили GlyR-імунопозитивний сигнал (GlyR+) окремо для пірамідних нейронів та астрогліальних клітин CA1 зони культивованих гіпокампальних зрізів у нормі та після КГД (Рис. 16).

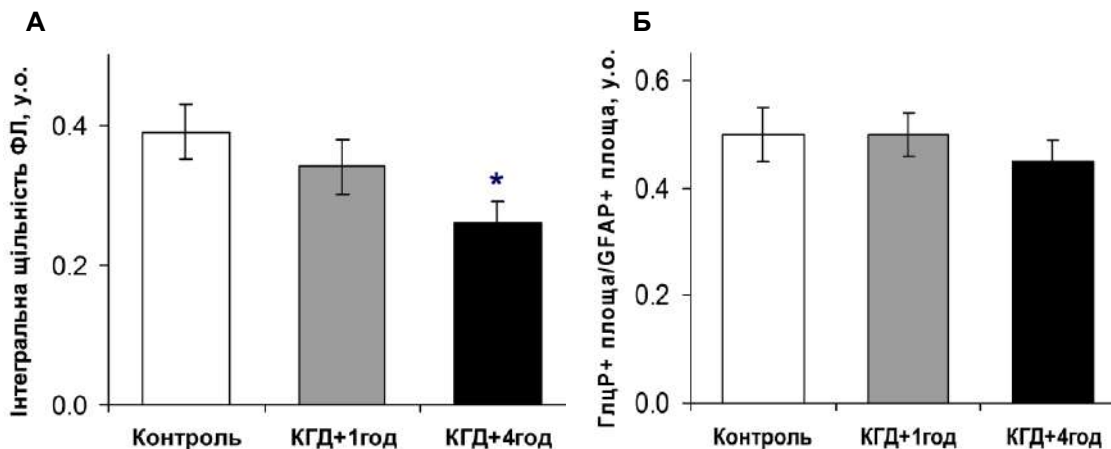


Рис. 16. Діаграми відносних змін GlyR+ сигналу у CA1 зоні культивованих зрізів гіпокампа, асоційованого з: А – CA1 пірамідними нейронами (NeuN+) та Б – астрогліальними клітинами (GFAP+). $n=15$, * – $p<0,05$ до контролю.

Представлені на діаграмах результати засвідчують, що у пірамідному шарі CA1 зони, асоційованому з пірамідними нейронами, GlyR+ сигнал достовірно зменшувався через 4 год після КГД. У випадку астрогліальних клітин змін не відбувалося.

У наших експериментальних умовах у нейронах спостерігається перехід від стану гомеостатичної рівноваги до початкових деструктивних змін клітинного метаболізму, які ще не мають значних морфологічних проявів на рівні тіл нейронів. Неоднакова чутливість клітин до КГД обумовлена основними клітинними програмами та рецептор-опосередкованими міжклітинними взаємодіями. Дисрегуляція експресії рецепторів на поверхні мембран нейронів є однією з важливих подій у розвитку ішемічного ушкодження. Редукція гліцинових рецепторів CA1 пірамідної зони є одним із факторів, що визначають пошкодження нейронів при КГД. Розуміння цього процесу може мати вирішальне значення для підвищення ефективності нейропротекторних стратегій при ішемії головного мозку.

Нейронні молекули клітинної адгезії (NCAM) є важливим фактором міжклітинних взаємодій. NCAM – це багатофункціональний глікопротеїн плазматичної мембрани нейрональних клітин. Позаклітинний домен NCAM залучений до гомофільного (взаємодія NCAM однієї клітини з NCAM іншої клітини) і гетерофільного (взаємодія NCAM з іншими протеїнами) зв'язування, що в значній мірі зумовлює міжклітинні взаємодії, синаптогенез і залежну від функціонування синаптичну пластичність (Berezin, 2010). NCAM відповідають за клітинну адгезію, опосередковують міграцію, проліферацію і виживання клітин. Відомо, що FGFR (рецептор фактору росту фібробластів) є одним з партнерів NCAM, що модулює NCAM-залежну сигналізацію (Francavilla et al., 2007). Дисрегуляція функцій NCAM може мати негативні функціональні наслідки для життєздатності клітин, зокрема при ішемічному ушкодженні мозку (Shichi et al., 2011). Розроблені міметики NCAM, які імітують певні функції NCAM. Для дослідження ролі NCAM у розвитку ішемічного пошкодження ми використовували культуру дисоційованих клітин гіпокампа та синтетичний пептид FGL, міметик гетерофільного зв'язування NCAM. Аналізували синаптичну активність нейронів у культурі дисоційованих клітин гіпокампа за умов КГД з наступною нормоксичною реоксигенацією на підставі вимірювання швидкості знебарвлення флуоресцентного барвника FM1-43 у зонах синапсів в результаті гіперкалієвої деполяризації.

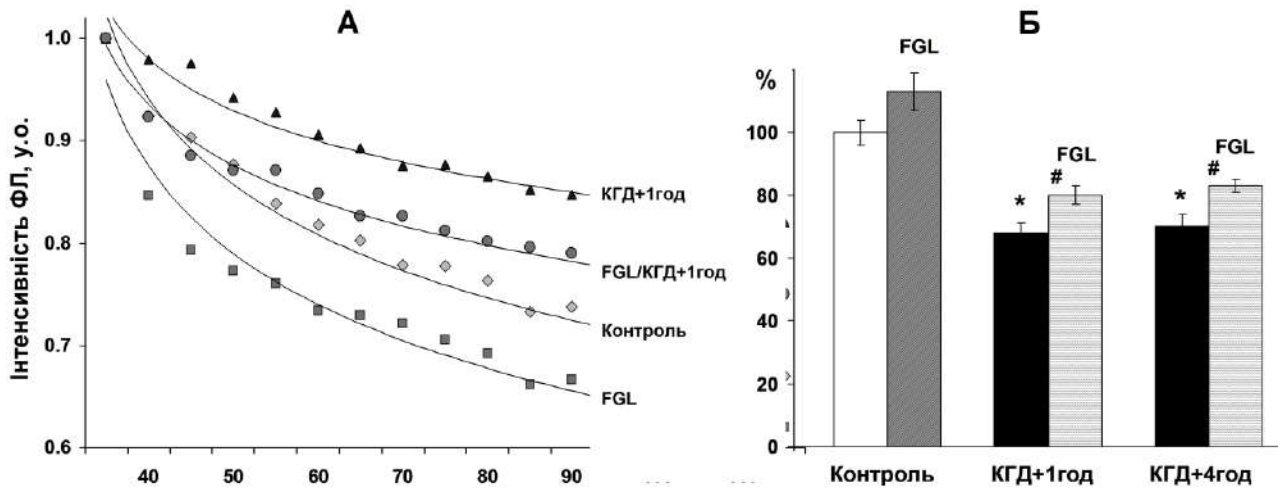


Рис. 17. Графік змін швидкості вивільнення барвника FM1-43 з синаптичних везикул культивованих нейронів (А) та діаграма змін загальної мітохондріальної активності (Б) у дисоційованій гіпокампальній культурі при дії FGL у нормальних умовах та після КГД. $n=10$, * – $p<0.05$ до контролю, # – $p<0.05$ до КГД.

Виявлено, що КГД суттєво знижує швидкість знебарвлення FM1-43 (Рис. 17, А). FGL сприяє підвищенню цього показника в контролі і нормалізує активність синапсів в умовах КГД. Це супроводжується підвищенням рівня загальної мітохондріальної активності (MTS-тест) відносно зниженого рівня після КГД (Рис. 17, Б). Стабілізація функціональної активності нейронів у присутності пептиду FGL свідчить про важливу роль NCAM у механізмах, які певною мірою здатні протистояти ушкодженню в умовах ішемії.

Безпосередню участь у процесі вивільнення вмісту синаптичних везикул з пресинаптичних терміналей відіграють трансмембранні білки пресенілін 1 (PS1) і синаптотагмін 1 (Syt1). PS1 експресується у синаптичних везикулах та забезпечує механізм екзоцитозу, модулюючи синаптичну передачу (Lundgren et al., 2015). Syt1 є Ca^{2+} -зв'язуючим білком, що бере участь в останніх стадіях викиду нейромедіатора в синаптичну щілину, який є Ca^{2+} -залежним (Chapman, 2008). Дослідження щодо структурних та функціональних зв'язків між PS1 та Syt1 важливі з точки зору модуляції синаптичної активності при мозкових порушеннях. Було показано, що взаємодія PS1-Syt1 сприяє екзоцитозу синаптичних везикул у культурі нервових клітин. Інгібування зв'язування PS1-Syt1 за допомогою синтетичного пептиду LNT, призводило до зниження швидкості вивільнення везикул (Zoltowska et al., 2017).

Ми дослідили, які ультраструктурні зміни синаптичних везикул відбуваються в умовах інгібування PS1-Syt1-з'язування. Експерименти проводилися на культурі дисоційованих нервових клітин гіпокампа при індукції синаптичної активності KCl за умов присутності LNT чи без нього (Контроль). При дії LNT були виявлені ознаки везикулярної деструктуризації,

що проявлялася у деформації везикул. Морфометричний аналіз виявив збільшення везикул більшої площі та зменшення їх щільності (**Рис. 18, Б, А, відповідно**). Такі зміни можуть негативно впливати на динаміку рухливості везикул і кінетику вивільнення медіатора.

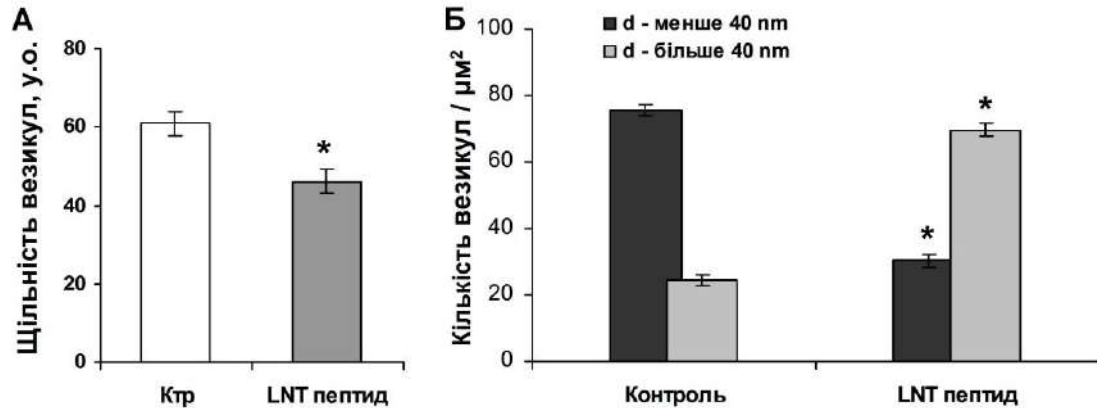


Рис. 18. Кількісний аналіз синаптичних везикул у дисоційованій культурі за нормальних умов та у присутності синтетичного пептиду LNT. А – щільність везикул; Б – співвідношення нормальних і великих везикул. $n=50$, * – $p < 0.001$ до контролю.

Таким чином, КГД призводить до зменшення ефективності синаптичних контактів. Процес взаємодії PS1 і Syt1 може значною мірою координувати синаптичну передачу. Модуляція функціонування трансмембранних білків є важливим елементом для нейропротекції.

Гіпоксія-індуковані фактори (HIF – hypoxia-inducible factor). Вплив нестачі кисню і глюкози призводить до системних змін, орієнтованих на початковому етапі на активацію адаптивних механізмів та ендогенну нейропротекцію, а надалі на усунення ушкодження і утилізацію загинблих клітин. Важливу роль у контролі клітинного гомеостазу при гіпоксії/ішемії відіграють гіпоксія-індуковані фактори – сімейство регуляторів транскрипції. HIF активується у відповідь на зниження концентрації кисню у тканинах та регулює клітинний гомеостаз, модулюючи експресію великої кількості генів, що беруть участь у процесах регуляції обміну речовин, виживання або загибелі клітин в умовах гіпоксично-ішемічного ушкодження головного мозку (Chen et al., 2011; Fan et al., 2009). Внутришньоклітинна кількість білку HIF-1 залежить від активності HIF проліл-гідроксилази – фермента, який каталізує деградацію HIF (Siddiq et al., 2009). HIF-1 α – конститутивно продукований білок, який зазвичай є гідроксильованим і швидко деградує. Коли рівень O_2 знижується, гідроксильовання зменшується, а рівень HIF зростає. Стабілізований HIF безпосередньо активує гени для адекватного реагування клітин на гіпоксію. Відомо, що короткострокова аноксія/гіпоксія сприяє резистентності мозку до більш тривалої ішемії (Dirnagl et al., 2009). Це явище ендогенної

нейропротекції стосовно експериментальних моделей називають аноксичним прекондиціонуванням (АПК).

У нашій роботі представлені результати дослідження механізмів нейропротекторної дії аноксичного прекондиціонування при наступній КГД. Експерименти проводилися на культивованих зрізах гіпокампа. Аноксичне прекондиціонування проводили у камері, де кисень замінювали на азот у режимі, підбраному емпірично: 3-кратно по 5 хв з інтервалом 12 год, надалі проводили 30 хв КГД з наступною нормоксичною реоксигенацією. Досліджували життєздатність та паралельно експресію HIF-1 α у пірамідних нейронах CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа з використанням вітального барвника ПЙ та ПЛР-аналіз поодиноких пірамідних нейронів CA1 зони в реальному часі (single-cell real-time RT-PCR), відповідно. Виявлено, що КГД призводить до зниження експресії HIF (**Рис. 19**). За умов АПК цей показник нормалізувався, що супроводжувалося суттєвим зниженням кількості ушкоджених CA1 нейронів відносно КГД. Блокада HIF проліл-гідроксилази за допомогою селективного інгібітора ДПД, що передбачає підвищення рівня HIF, мала суттєвий нейропротекторний вплив.

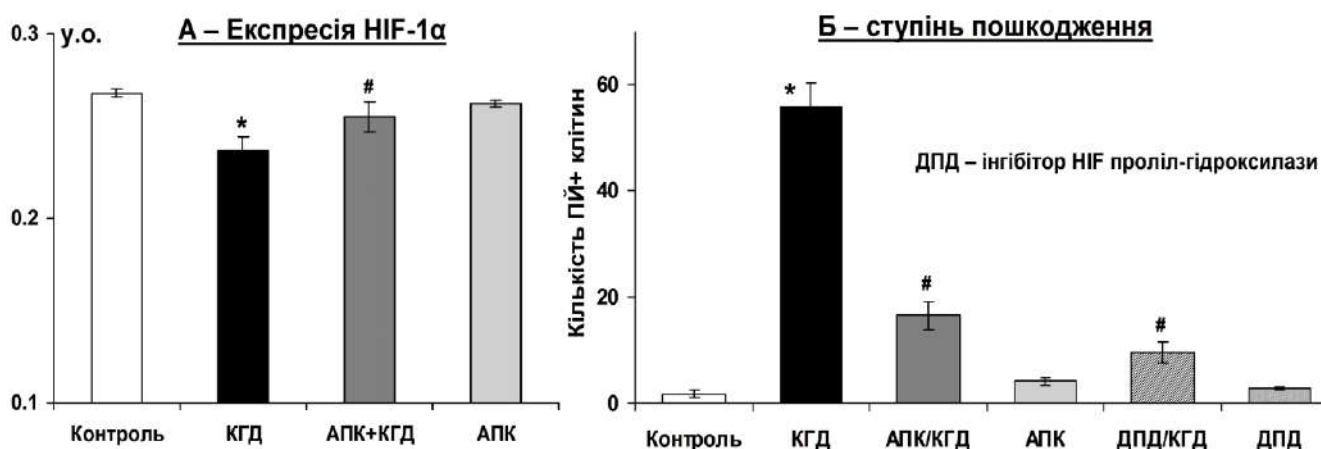


Рис 19. Оцінка експресії HIF-1 α mRNA у пірамідних нейронах CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа через 4 год після КГД і/або АПК (А); ефекти КГД і/або АПК та додавання інгібітора HIF проліл-гідроксилази (ДПД) на життєздатність нейронів CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа (Б). $n=8$, * – $p<0.05$ до контролю, # – $p<0.05$ до КГД.

Таким чином, пошкодження CA1 пірамідних нейронів після КГД корелює зі зниженням рівня експресії HIF у цих клітинах, а нейропротекторний вплив АПК асоціюється з підвищеним рівнем в них HIF. Було досліджено роль Ca²⁺-опосередкованих механізмів у нейропротекторних ефектах аноксичного прекондиціонування. Показано, що після КГД значно зменшується експресія плазматичної Са-АТФази (PMCA). Протекторні ефекти АПК з наступною КГД певною мірою опосередковані стабілізацією роботи PMCA1, PMCA2 (**Рис. 20, А, Б**).

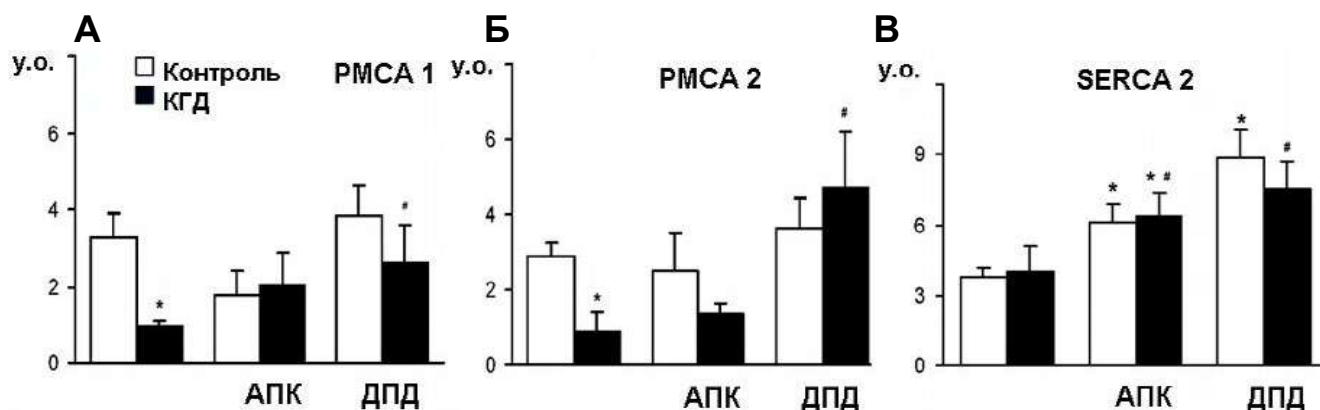


Рис. 20. Зміни рівня експресії *PMCA1* (А), *PMCA2* (Б) і *SERCA2* (В) у *CA1* зоні гіпокампальних зрізів у контролі та через 4 год після КГД за умов АПК та додавання ДПД. $n=8$, * – $p < 0,05$ до контролю, # – $p < 0,05$ до КГД.

Не виявлено змін експресії *SERCA2* після КГД (Рис. 20, В). АПК підвищувало рівень *SERCA2*-експресії за нормальних умов і після КГД. Активуючі ефекти ДПД на *SERCA2*-експресію, вказують на взаємозв'язок активації Ca^{2+} -акумуляції з HIF-опосередкованими сигнальними шляхами. Таким чином, результати свідчать, що Ca^{2+} -АТФази задіяні у розвитку ішемічного ушкодження гіпокампа, а протекторні ефекти АПК значною мірою обумовлені *PMCA*-, *SERCA*-опосередкованими механізмами.

Взаємозв'язок HIF/NCAM-опосередкованих сигнальних шляхів. Механізми виживання клітин передбачають залучення багатьох клітинних механізмів та їх взаємодію (Chen et al., 2011; Singh et al., 2012). Для дослідження взаємозв'язку HIF/NCAM-опосередкованих сигнальних шляхів у процесі забезпечення життєздатності нервових клітин гіпокампа в умовах нестачі кисню та глюкози, нами були проведені дослідження з використанням паралельно органотипової та дисоційованої культур гіпокампа. Суттєва відмінність цих моделей полягає в тому, що в органотиповій культурі зберігаються природні міжклітинні зв'язки, сформовані в організмі, тоді як у дисоційованій культурі всі міжклітинні зв'язки утворені наново, що передбачає активний стан NCAM сигнальних механізмів, які відповідальні за адгезію клітин до субстрату і клітин одна до одної. Функціональний взаємозв'язок HIF/NCAM сигнальних шляхів має еволюційні корені. У процесі адаптації найпростіших одноклітинних і багатоклітинних організмів до змін атмосферного рівня кисню активація HIF-опосередкованої транскрипції сприяла адекватній клітинній відповіді, яка виражалася у модернізації життєзабезпечуючих механізмів з безпосередньою участю молекул клітинної адгезії (Crossin, 2012; Cassavaugh et al., 2001; Zhang et al., 2011). Ці механізми є закріпленими генетично і відіграють важливу роль у організмі ссавців для адаптації до змін оточуючого середовища (.

Ми досліджували роль NCAM-опосередкованої стимуляції FGFR на зміни експресії HIF-1 α в умовах КГД та нормоксичної реоксигенації (24 год), коли ефекти КГД найбільш виражені за умов нашого експерименту. Для FGFR-стимуляції ми використовували міметик NCAM – пептид FGL, що імітує гетерофільне зв'язування між NCAM і FGFR. Раніше було показано, що FGL має нейропротекторні властивості, але не зрозуміло, які механізми задіяні у ці ефекти. За допомогою ПЛР-аналізу (single-cell real-time RT-PCR) ми виявили зниження експресії HIF-1 α у пірамідних нейронах CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа після КГД. У цій серії експериментів для виявлення HIF-1 α ми використовували ІМГХ забарвлення та конфокальну мікроскопію, які підтвердили результати ПЛР. Оцінка інтегральної щільності HIF-1 α + сигналу показала суттєве зниження цього показника у CA1 зоні зрізів гіпокампа після КГД (**Рис. 21, А**). Наявність FGL у культуральному середовищі запобігала зменшенню інтегрованої щільності HIF-1 α + флуоресценції, що опосередковано свідчить про більший рівень HIF-1 α -експресії у культивованих зрізах. Інгібування FGFR з допомогою SU5402 скасовувало позитивний ефект FGL, HIF-1 α + був на рівні КГД.

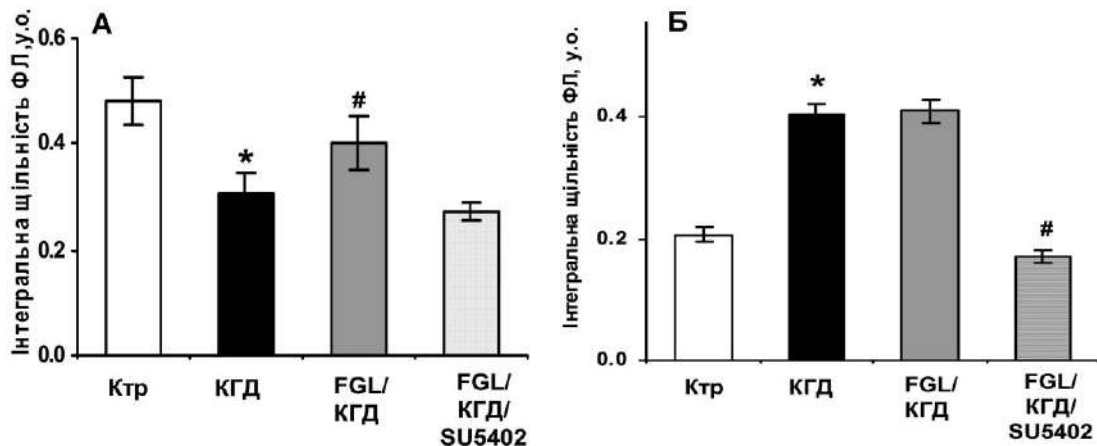


Рис. 21. Оцінка інтегральної щільності HIF-1 α + сигналу в культивованих зрізах, $n=12$ (А) та дисоційованих клітин, $n=40$ (Б) гіпокампа за нормальних умов та через 24 год після КГД в присутності міметика NCAM (FGL) і блокатора FGFR (SU5402); * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

На відміну від культивованих зрізів у дисоційованій культурі виявлено загальне підвищення рівня HIF-1 α + сигналу (**Рис. 21, Б**). Присутність FGL не змінила рівень HIF-1 α +, після КГД він залишався високим, проте інгібування FGFR за допомогою SU5402 за умов КГД стабілізувало цей показник до контрольного рівня.

Виявлені відмінності рівня HIF-1 α корелювали з різницею показників життєздатності та метаболічної активності обох культур при їх паралельному дослідженні за допомогою ЛДГ- та МТС-тестів. Зокрема встановлено, що вивільнення лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральне середовище

збільшувалося, а мітохондріальна активність знижувалася у культивованих зрізах після КГД, що свідчить про значне пошкодження (Рис. 22, А, В).

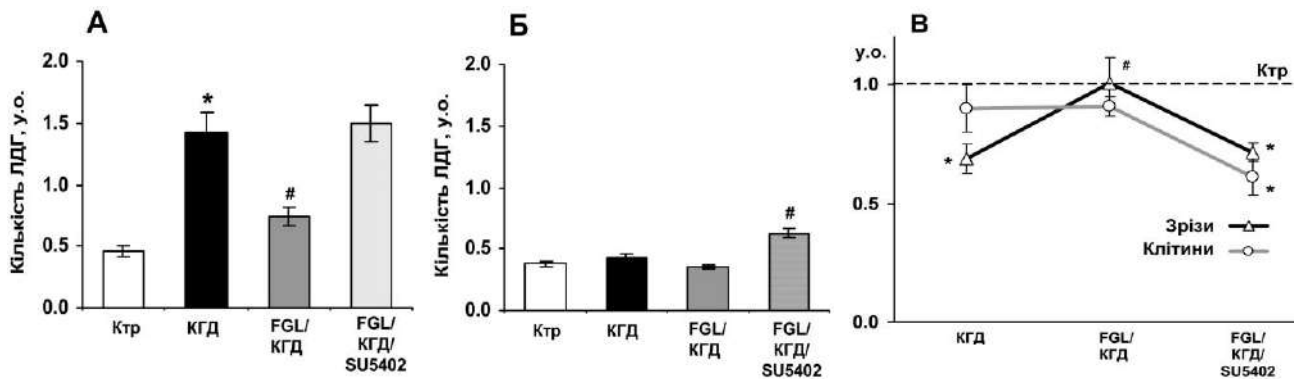


Рис. 22. Оцінка кількості цитозольного ферменту ЛДГ ($n=6$) у культуральному середовищі від культивованих зрізів (А) та дисоційованих клітин (Б) гіпокампа та оцінка загальної метаболічної активності культур ($n=10$) (В) за нормальних умов та через 24 год після КГД в присутності міметика NCAM (FGL) і блокатора FGFR (SU5402); * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

За умов КГД FGL запобігав розвитку ушкодження зрізів, про що свідчить нижчий рівень ЛДГ та збільшення метаболічної активності відносно КГД. Блокада FGFR скасовувала протективний ефект FGL на метаболічну активність зрізів.

У дисоційованій культурі клітини були більш життєздатними, показники рівня ЛДГ незначно перевищували контрольні, а рівень метаболічної активності був певною мірою нормалізованим (Рис. 22, Б, В). У варіанті FGL/КГД показник життєздатності не змінювався, при цьому рівень HIF-1 α був високим, що значною мірою сприяло виживанню клітин у дисоційованій культурі. У той же час блокада FGFR призводила до погіршення стану клітин.

Отримані результати вказують на те, що NCAM-опосередкована стимуляція FGFR корелює з накопиченням HIF-1 α і сприяє механізмам виживання клітин після КГД в обох типах культур. Крім того ми припускаємо, що взаємодія HIF/NCAM сигнальних шляхів відповідає, принаймні частково, за резистентність гіпокампальних клітин до киснево-глюкозного дефіциту і це може бути визначальним механізмом, що певною мірою пояснює феномен відстроченого характеру ішемічного ушкодження. Є свідчення, які вказують на функціональний зв'язок між FGFR та HIF (Blick et al., 2013; Gouaze-Andersson et al., 2016).

Наші результати на моделі ішемічного ушкодження підтверджують, що FGFR є одним із важливих посередників HIF/NCAM-кооперації у контексті забезпечення нейрональної життєздатності.

Отже, існує тісний функціональний зв'язок NCAM-, FGFR- та HIF-опосередкованих механізмів, які здатні у певних межах протидіяти розвитку ішемічного пошкодження. Виявлені механізми відкривають додаткові можливості для розробки комплексних стратегій нейропротекції через модуляцію HIF/NCAM сигнальних шляхів.

Нейропротекторний вплив стовбурових клітин.

Цікавим аспектом стосовно міжклітинних взаємодій при ішемічному пошкодженні є дослідження процесу відновлення нервової тканини завдяки стовбуровим клітинам. Є дані, що у гіпокампі містяться клітини, здатні трансформуватися у клітини різних типів та сприяти відновленню тканин. Крім того вони продукують численні гуморальні фактори, які активно впливають на ушкоджені клітини. Механізми їх дії остаточно не з'ясовані. На теперішній час досліджені закономірності, що передбачають існування взаємозв'язку між HIF-1 α /NCAM-опосередкованими сигнальними шляхами у модуляції функцій нейральних стовбурових клітин (НСК) в умовах киснево-глюкозного дефіциту (Devlin et al., 2011; Huang et al., 2010; Saburi et al., 2005; Wada et al., 2009). Зміни рівня O₂ можна розглядати як елемент регуляції процесів проліферації, диференціації і міграції НСК в умовах *in vitro* і *in vivo*. Відомо, що НСК проліферують переважно при низькому рівні O₂. Підвищення рівня O₂, через посередництво HIF-1 α , призводить до переважання процесів диференціації та NCAM-опосередкованої міграції стовбурових клітин (Ivanovic, 2009; Panchision, 2009; Simon et al., 2008; Studer et al., 2000). Багато питань з приводу функціональної активності НСК, клітинних та гуморальних механізмів їх дії залишаються відкритими.

Ми дослідили вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних стовбурових клітин (ММСК) на стан культивованих зрізів після КГД. Проводили безконтактне співкультивування, коли зрізи знаходяться на поверхні напівпроникної мембрани, а ММСК розташовані на дні планшету та контактне, коли ММСК наносили безпосередньо на культивований зріз. За допомогою ЛДГ-тесту виявлено, що в обох варіантах ММСК мали нейропротекторний вплив на культивовані зрізи в умовах КГД. У цій серії експериментів додатково використовували індуктор нейрозапалення ЛПС (Рис. 23).

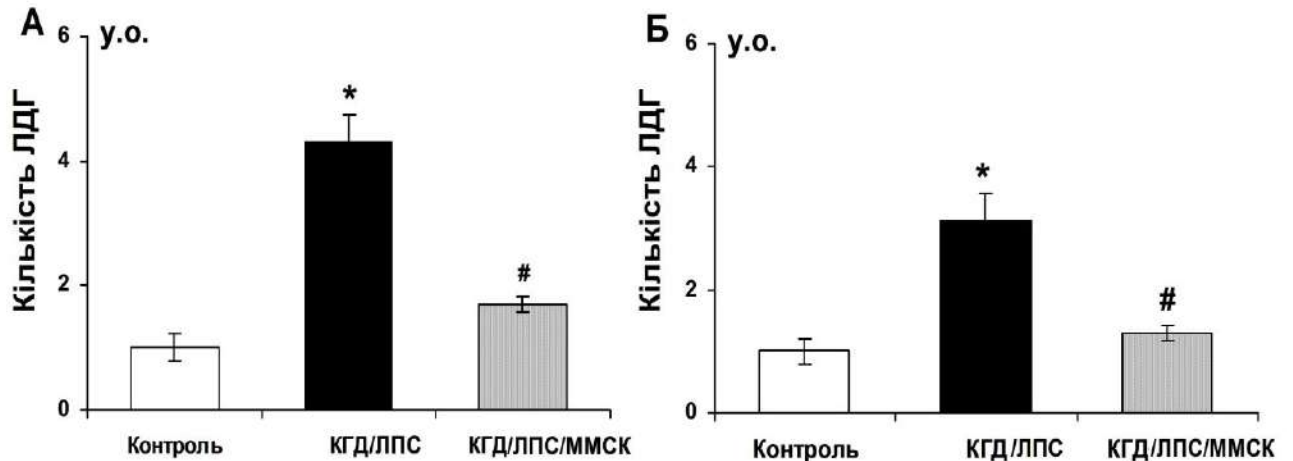


Рис. 23. Відносна кількість ЛДГ у культуральному середовищі органотипових зрізів через 24 год після КГД/ЛПС в умовах безконтактного (А) та контактного (Б) співкультивування з ММСК; $n=4$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД/ЛПС.

Можливі механізми нейропротекторної дії ММСК можуть бути пов'язані як із заміною ушкоджених клітин шляхом диференціації та інтеграції трансплантованих клітин, так і з біоактивними чинниками, здатними модулювати розвиток ушкодження нейрональних клітин.

Для перевірки гіпотези, що нейропротекторні властивості ММСК можуть реалізуватися завдяки гуморальним факторам, ми аналізували вплив ММСК на культивовані зрізи головного мозку після КГД/ЛПС в умовах безконтактного співкультивування.

За допомогою ІМГХ забарвлення оцінювали стан гліальних клітин у культивованих зрізах за нормальних умов та через 24 год після КГД/ЛПС. Виявлено, що через 24 год після КГД/ЛПС інтенсивність забарвлення Рір+ олігодендроцитів зменшувалася, а GFAP+ астроцитів і Iba-1+ мікроглії збільшувалася у порівнянні з контролем (**Рис. 24**). В умовах безконтактного співкультивування з ММСК відбувалася певна стабілізація цих показників.

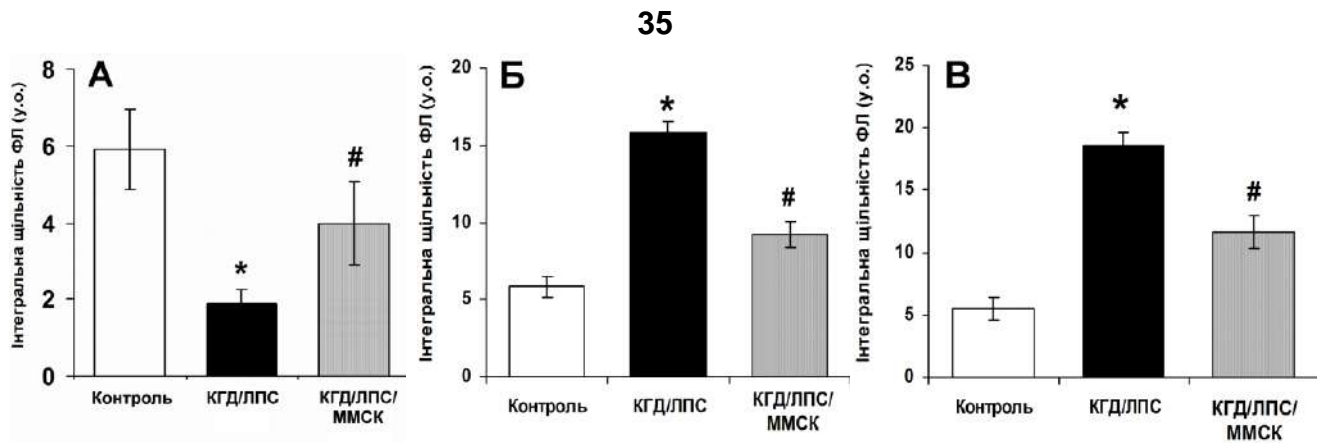


Рис. 24. Гістограма змін інтегральної щільності флюоресценції у культивованих зрізах за нормальних умов та через 24 год після КГД в присутності ЛПС. А – маркування олігодендроцитів, Б – маркування GFAP+ астроцитів, В – маркування Іба-1+ мікроглії. $n=8$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД/ЛПС.

Крім того було проведено ідентифікацію трансплантованих клітин та оцінку їх можливої диференціації в умовах контактного співкультивування після нанесення ММСК на поверхню культивованих зрізів.

ІМГХ аналіз показав, що на 14-у добу GFP-позитивні ММСК зберігали фенотипічні ознаки. Більшість ММСК залишалися у недиференційованому стані, але приблизно 5 % GFP-позитивних ММСК, що прикріпилися до культивованого зрізу, диференціювалися в NeuN-позитивні зрілі нейрони та Рір-позитивні олігодендроцити.

Таким чином, на моделі *in vitro* було показано, що ММСК в умовах як контактного, так і безконтактного співкультивування зі зрізами мають нейропротекторний вплив, суттєво зменшуючи пошкодження клітин. Спостерігалось також зменшення реактивного астро- та мікрогліозу. Крім того виявлено принципову можливість для ММСК диференціюватися за наших експериментальних умов. Це свідчить, що ММСК можуть реалізувати нейропротекторний вплив завдяки як клітинним, так і гуморальним механізмам.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені результати комплексного дослідження різних типів гіпокампальних клітин, виявлені особливості міжклітинних взаємодій та висвітлені певні ендogenousні механізми нейропротекції в умовах моделювання ішемічного ушкодження.

1. Встановлено, що в умовах тимчасової КГД та подальшої нормоксичної реоксигенації найбільш уразливими є пірамідні нейрони СА1 зони гіпокампа, тоді як інтернейрони, астро- та мікрогліальні клітини більш стійкі до нестачі кисню та глюкози. Показано, що ушкодження нейронів при КГД значною мірою пов'язане зі зниженням функціональної активності мітохондрій та глутаматною ексайтотоксичністю.
2. Ультраструктурний аналіз міжклітинних контактів СА1 зони зрізів гіпокампа у початковий період після КГД виявив суттєві зміни структури збудливих і гальмівних синапсів та глії. Показано, що протягом першої години після КГД поступово збільшуються морфометричні показники всіх елементів синаптичного апарату. Спостерігається розширення об'єму гліальних відростків навколо збудливих синапсів.
3. Показано, що інтернейрони мають здатність модулювати життєздатність пірамідних нейронів СА1 зони гіпокампальних зрізів при КГД, і це значною мірою опосередковується ГАМК і $\alpha 7$ -nACh рецепторами та Cx36 імунопозитивними каналами. Підвищена життєздатність інтернейронів та нормалізація в них синтезу/метаболізму ГАМК, викликаних блокадою $\alpha 7$ -nAChRs та Cx36, передбачає певну координовану кооперацію згаданих механізмів.
4. Виявлено, що одним із важливих факторів, що визначають життєздатність СА1 пірамідних нейронів гіпокампа при КГД є GlyRs. Це передбачає додатковий потенціал для розробки ефективних терапевтичних стратегій захисту пірамідних нейронів шляхом модуляції сигнальних шляхів, опосередкованих GlyRs.
5. Отримані нами дані підтверджують, що важливу роль у забезпеченні життєздатності нейронів та їх синаптичної активності в умовах КГД відіграють нейронні молекули клітинної адгезії (NCAM). Вони сприяють передачі сигналів та стійкості нейронів до патологічного впливу. Пептид FGL, міметик гетерофільного зв'язування NCAM, запобігав дестабілізації синаптичних контактів і деструкції нейронів, що свідчить про суттєвий вклад NCAM у підтримку гомеостазу клітин при ішемічному ушкодженні.
6. Встановлено, що взаємодія синаптичних трансмембранних білків пресеніліну (PS1) і синаптотагміну (Syt1) значною мірою координує ефективність синаптичної передачі, а модуляція функціонування цих білків може бути важливим елементом для нейропротекції при мозкових порушеннях.

7. Виявлено, що пошкодження CA1 пірамідних нейронів після КГД корелює зі зниженням рівня експресії HIF-1 α та з недостатньою утилізацією Ca²⁺-АТФазами (PMCA, SERCA) внутріклітинного кальцію, а нейропротекторний вплив аноксичного прекондиціювання з наступною КГД асоціюється з підвищеним рівнем експресії HIF-1 α у клітинах та опосередкований стабілізацією роботи PMCA і SERCA.
8. Встановлене існування тісного функціонального взаємозв'язку NCAM-, FGFR- та HIF-опосередкованих механізмів, які здатні у певних межах протидіяти розвитку пошкодження клітин в умовах КГД.
9. Показано, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) мають нейропротекторний вплив як при контактному, так і безконтактному співкультивуванні з органотиповими культурами мозку в умовах КГД.

Отримані дані дають нове уявлення про клітинні і молекулярні механізми, задіяні у розвитку ішемічного пошкодження нервової тканини внаслідок нестачі кисню і глюкози, та передбачають кооперацію цих механізмів, вказуючи на додаткові можливості для комплексного підходу у напрямку розробки засобів нейропротекції мозкових порушень.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях

1. Skibo G.G., Lushnikova I.V., Voronin K., Berezin V., & Bock E. (2002). The effect of NCAM peptide on structure and metabolic activity in organotypic hippocampal cultures during induced ischemia. *Neurophysiology*, 34(2/3), 245-247. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
2. Lushnikova I.V., Voronin K.Y., Malyarevskyy P.Y., & Skibo G.G. (2004). Morphological and functional changes in rat hippocampal slice cultures after short-term oxygen-glucose deprivation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(2), 241-248. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
3. Лушнікова І.В., Воронін К.Ю., Маляревський П.Ю., Сможанік К.Г., & Скібо Г.Г. (2004). Ефекти киснево-глюкозної депривації різної тривалості на культивовані зрізи гіпокампа. *Фізіологічний журнал*, 50(2), 105-111. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).

4. Skibo G., Lushnikova I., Voronin K., Dmitrieva O., Novikova T., Klementiev B., Vaudano E., Berezin V., & Bock E. (2005). A synthetic NCAM-derived peptide, FGL, protects hippocampal neurons from ischemic insult both *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Neuroscience*, 22(7), 1589-1596. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
5. Kovalenko T., Osadchenko I., Nikonenko A., Lushnikova I., Voronin K., Nikonenko I., Muller D., & Skibo G. (2006). Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus*, 16(10), 814-825. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
6. Лушнікова І.В., Ніконенко І.Р., Ніконенко А.Г., & Скібо Г.Г. (2008). Просторовий розподіл везикул у синапсах CA1 зони гіпокампа при дії короткотривалої аноксії/гіпоглікемії та довготривалої потенціації. *Фізіологічний журнал*, 54(1), 35-44. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
7. Лушнікова І.В. (2008). Функціональна активність нейронів гіпокампа в умовах короткотривалої киснево-глюкозної деривації *in vitro*. *Фізіологічний журнал*, 54(6), 58-65. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
8. Lushnikova I., Skibo G., Muller D., & Nikonenko I. (2009). Synaptic potentiation induces increased glial coverage of excitatory synapses in CA1 hippocampus. *Hippocampus*, 19(8), 753-762. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
9. Лушнікова І.В. (2009). Морфологічна пластичність клітин зони CA1 гіпокампа *in vitro* в умовах короткотривалої аноксії-гіпоглікемії та подальшої реоксигенації. *Фізіологічний журнал*, 55(3), 109-117. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
10. Lushnikova I., Skibo G., Muller D., & Nikonenko I. (2011). Excitatory synaptic activity induces rapid structural plasticity of inhibitory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuropharmacology*, 60(5), 757-764. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).

11. Lushnikova I., Orlovsky M., Dosenko V., Maystrenko A., & Skibo G. (2011). Brief anoxia preconditioning and HIF prolyl-hydroxylase inhibition enhances neuronal resistance in organotypic hippocampal slices on model of ischemic damage. *Brain Research*, 22, 175-183. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
12. Skibo G., Lushnikova I., & Nikonenko I. (2011). Structural plasticity of synapses in hippocampal slices after oxygen-glucose deprivation. *Neurophysiology*, 43(3), 223-226. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
13. Voytenko L., Lushnikova I., Skok M., Lykhmus O., Deuchars J., & Skibo G. (2011). Co-expression of glutamic acid decarboxylase isoform67, membrane nicotinic acetylcholine receptors, and connexin36 in ischemia resistant hippocampal interneurons express. *Neurophysiology*, 43(5), 453-457. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
14. Malieieva G., Lushnikova I., & Skibo G. (2013). Mitochondrial dynamics in oxygen-glucose deprivation on a model cultivated hippocampal slices. *Fiziologichnyj Zhurnal*, 59(4), 44-47. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
15. Voytenko L., Lushnikova I., Savotchenko A., Isaeva E., Skok M., Lykhmus O., Patseva M., & Skibo G. (2015). Hippocampal GABAergic interneurons coexpressing alpha7-nicotinic receptors and connexin-36 are able to improve pyramidal neurons viability under oxygen-glucose deprivation. *Brain Research*, 1616, 134-145. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
16. Kopach O., Maistrenko A., Lushnikova I., Belan P., Skibo G., & Voitenko N. (2016). HIF-1 α -mediated upregulation of SERCA2b: The endogenous mechanism for alleviating the ischemia-induced intracellular Ca²⁺ store dysfunction in CA1 and CA3 hippocampal neurons. *Cell Calcium*, 59(5), 251-261. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних).
17. Tsuprykov O., Lushnikova I., Nikandrova Y., Yatsenko K., Ustymenko A., Kyryk V., Butenko G., & Skybo G. (2016). A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. *Cell and Organ Transplantology*, 4(2), 188-193. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).

18. Tsupykov O.M., Lushnikova I., Nikandrova Y., Yatsenko K., Ustymenko A., Kyryk V., Butenko G., & Skybo G. (2017). Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model *in vitro*. *Cell and Organ Transplantation*, 5(1), 28-32. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
19. Tsupykov O., Lushnikova I., Nikandrova Y., Yatsenko K., Ustymenko A., Kyryk V., Butenko G., & Skybo G. (2017). The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on mouse brain slices at their co-culture in an *in vitro* model of periventricular leukomalacia. *Fiziologichnyj Zhurnal*, 63(5), 3-12. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
20. Lushnikova I., Nikandrova Y., & Skibo G. (2017). Cooperation of HIF- and NCAM-mediated mechanisms in cell viability of hippocampal cultures after oxygen-glucose deprivation. *Cell Biology International*, 41(10), 1119-1126. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
21. Zoltowska K., Maesako M., Lushnikova I., Takeda S., Keller L., Skibo G., Hyman B., Berezovska O. (2017). Dynamic presenilin 1 and synaptotagmin 1 interaction modulates exocytosis and amyloid β production. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 15. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних).
22. Lushnikova I., Maleeva G., & Skibo G. (2018). Glycine receptors are involved in hippocampal neuronal damage caused by oxygen-glucose deficiency. *Cell Biology International*, 42(10), 1423-1431. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

Тези доповідей на найвагоміших наукових конференціях

(в авторефереті вказані 10 з загальної кількості 30)

1. Lushnikova I.V., Voronin K., Malyarevskyy P.Y., Berezin V.A., Bock E., & Skibo G.G. (2003). Effects of mild ischemia on neuronal and synaptic plasticity in cell and slice cultures. 2nd INMED Conference "Transmitters and guiding signals in the formation of cortical networks", La Ciotat (France), 13.
2. Скібо Г.Г., Коваленко Т.М., Лушнікова І.В., Воронін К.Ю., Осадченко І.О., Малярєвський П.Ю., & Мартинюк А.Є. (2006). Нейропротекторна дія L-фенілаланіну в умовах ішемічного ушкодження гіпокампа на моделях *in vitro* та *in vivo*. XVII Фізіологічний з'їзд. Чернівці (Україна), *Фізіологічний журнал*, 52(2), 56.

3. Kovalenko T., Lushnikova I., Osadchenko I. O., Nikonenko A., & Skibo G. G. (2008). Pharmacological correction of ischemia-induced injury of hippocampal CA1 pyramidal neurons. FENS, Geneva (Switzerland), 120. 25.
4. Skibo G., Lushnikova I., Nikonenko I., & Muller D. (2009). Structural plasticity of neuronal cells of CA1 hippocampal area after long-term synaptic potentiation. 8th MC/WG Meeting COST B30 Action: Neural Regeneration and Plasticity, Larnaca (Cyprus), 15.
5. Voytenko L., Lushnikova I., Skok M., Lykhmus O., Deuchars J., & Skibo G. (2011). Ischemia resistant hippocampal interneurons express glutamic acid decarboxylase isoform67, membrane nicotinic acetylcholine receptors and connexin36. V Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv (Ukraine), 71.
6. Skibo G., Voytenko L., & Lushnikova I. (2013). Plasticity of hippocampal cells in ischemic brain. 7th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, Kosice (Slovakia), 164.
7. Voitenko N., Kopach O., Maistrenko A., Lushnikova I., Dosenko V., & Skibo G., (2013). Anoxia preconditioning and block of HIF degradation specifically attenuates ischemia-induced changes in intracellular calcium signaling in CA1 and CA3 hippocampal neurons. Neuroscience, SfN's 43nd annual meeting, San Diego (USA), S6018.
8. Skibo G., Orlovsky M., Maleeva G., Patseva M., & Lushnikova I. (2013). Glial activation following oxygen-glucose deprivation. XI European meeting on glial cells in health and disease. Berlin (Germany). T07-10B.
9. Skibo G., Lushnikova I., Kovalenko T., Osadchenko I., & Nikonenko A. (2014). Structural synaptic plasticity induced by ischemia. VI Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv (Ukraine), 45.
10. Zoltowska K., Lushnikova I., Skibo G. G., & Berezovska O. (2017). Novel role of the Alzheimer's disease linked presenilin 1 at the synapse. 7th International Congress in Kyiv (Ukraine), 66.

АНОТАЦІЯ

Лушнікова І.В. Міжклітинні взаємодії та ендogenousні механізми нейропротекції у гіпокампі при моделюванні ішемічного пошкодження. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2019.

У роботі представлено комплексне дослідження різних типів гіпокампальних клітин, міжклітинних взаємодій та ендogenousних механізмів нейропротекції при моделюванні ішемічного ушкодження *in vitro* з використанням культур гіпокампа та киснево-глюкозної депривації (КГД). Показано, що в умовах, коли пірамідні нейрони ушкоджуються і гинуть, інтернейрони зберігають життєздатність, а астро- та мікроглія активуються. Проаналізовані зміни пластичності збудливих і гальмівних синапсів та гліальних відростків у найбільш чутливій СА1 зоні культивованих зрізів при КГД. Виявлено, що інтернейрони є ацетилхолінчутливими та з'єднані електричними контактами, що може обумовлювати їх КГД-резистентність. Ушкодження СА1 нейронів в умовах КГД може бути пов'язане з редукцією гліцинових рецепторів. Показано, що нейронні молекули клітинної адгезії (NCAM) задіяні у порушеннях синаптичної пластичності. Синаптичні трансмембранні білки пресенілін-1 і синаптотажмін-1 координують ефективність синаптичної передачі. Показано важливу роль гіпоксія-індукованих факторів (HIF) у життєздатності нейронів при КГД. Нейропротекторний вплив аноксичного preconditionування асоціюється з підвищеним рівнем експресії HIF у нейронах та опосередкований стабілізацією роботи Ca^{2+} -АТФаз. Виявлено взаємозв'язок NCAM- та HIF-опосередкованих механізмів. Мультипотентні мезенхімальні стромальні стовбурові клітини мають нейропротекторний вплив при контактному і безконтактному кокультивуванні зі зрізами після КГД. Досліджені молекулярні механізми ішемічного пошкодження можуть бути новими фармакологічними мішенями при ішемії мозку.

Ключові слова: гіпокамп, ішемічне пошкодження *in vitro*, нейропротекція

АННОТАЦИЯ

Лушникова И.В. Межклеточные взаимодействия и эндогенные механизмы нейропротекции в гиппокампе при моделировании ишемического повреждения. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени доктора биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2019.

В диссертационной работе представлены результаты комплексного исследования различных типов гиппокампальных клеток, выявлены особенности межклеточных взаимодействий и исследованы некоторые эндогенные механизмы нейропротекции в условиях моделирования ишемического повреждения *in vitro* с использованием органотипических и клеточных культур гиппокампа, а также кислород-глюкозной депривации (КГД). Используемые режимы КГД (10, 30, 60 мин) не вызывали быстрых деструктивных изменений, но приводили к отсроченным эффектам (после 4 и/или 24 ч нормоксической реоксигенации). Такая экспериментальная модель является адекватной для изучения механизмов развития повреждения нервных клеток в условиях недостатка кислорода и глюкозы, характерных для ишемии мозга. Выявлено, что в условиях, когда пирамидные нейроны повреждаются и погибают, интернейроны сохраняют свою жизнеспособность, а астро- и микроглиальные клетки активируются. Выживание или гибель клеток гиппокампа в значительной степени зависят от состояния митохондрий. Снижение уровня митохондриальной активности и количества пирамидных нейронов в отдаленные сроки после КГД (через 24 ч нормоксической реоксигенации) имеют в своей основе определенные функциональные и пластические изменения в начальный период (в течение первого часа после КГД). Проанализированы изменения пластичности возбуждающих и тормозных синапсов, а также глиальных отростков в наиболее чувствительной СА1 зоне культивируемых срезов в начальные сроки после КГД (через 30, 60 мин). Количественный анализ 3-мерных реконструкций указывает на существенные пластические изменения компонентов синаптического аппарата в этот период (объем терминалей, шипиков, синаптических везикул и околосинаптических глиальных отростков). Выявлено, что тормозные ГАМК-эргические интернейроны являются ацетилхолинчувствительными и соединены между собой электрическими контактами, поскольку в них ко-экспрессируются соответствующие белки (GAD67, $\alpha 7$ -nAChRs и Cx36). Эти свойства могут способствовать резистентности интернейронов к КГД. Показано, что жизнеспособность пирамидных нейронов СА1 зоны в значительной степени обусловлена взаимодействием с ГАМК-эргическими интернейронами. Выявлено, что повреждение СА1 пирамидных нейронов в

условиях КГД может быть связано с редукцией глициновых рецепторов. Стабилизация функциональной активности нейронов и синапсов гиппокампа в присутствии миметика нейронных молекул клеточной адгезии (NCAM) – пептида FGL – свидетельствует о важной роли NCAM в механизмах, которые способны противостоять нарушениям синаптической пластичности и повреждению нейронов в условиях ишемии. Синаптические трансмембранные белки пресенилин-1 и синаптотаксин-1, в результате их взаимодействия, координируют эффективность синаптической передачи. Важная роль в поддержании жизнеспособности нервных клеток при КГД принадлежит гипоксия-индуцируемым факторам (HIF). Показано, что нейропротекторное влияние аноксического preconditionирования ассоциируется с повышенным уровнем экспрессии HIF в нейронах и опосредовано стабилизацией работы плазматической и саркоплазматической Ca^{2+} -АТФазами (PMCA и SERCA). Выявлена функциональная взаимосвязь NCAM- и HIF-опосредуемых механизмов, которые в значительной степени определяют эндогенную нейропротекцию и опосредуют отсроченный характер повреждения нейронов после КГД. Выявлены нейропротекторные свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных стволовых клеток в условиях контактного и бесконтактного кокультивирования со срезами при КГД.

Результаты исследований дают новое представление о начальных и отсроченных эффектах КГД на клетки гиппокампа, а также молекулярных механизмах эндогенной нейропротекции, понимание которых дает новые перспективы для фармакологической модуляции при разработке методов комплексной терапии в условиях ишемического повреждения.

Ключевые слова: гиппокамп, ишемическое повреждение *in vitro*, нейропротекция

ANNOTATION

Lushnikova I.V. Intercellular interactions and endogenous mechanisms of neuroprotection in the hippocampal model of ischemic damage. – Manuscript.

Dissertation for doctor of sciences degree by specialty 03.00.13 – human and animal physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation presents the results of a comprehensive study of various types of hippocampal cells. The intercellular interactions and some endogenous mechanisms of neuroprotection have been studied for ischemic damage *in vitro* model using hippocampal organotypic and cell cultures, as well as oxygen-glucose deprivation (OGD). It is revealed that when pyramidal neurons are damaged and die, interneurons retain their viability, and astro- and microglial cells are activated. Changes in the plasticity of excitatory and inhibitory synapses and glial processes in the most sensitive CA1 area cultured slices were analyzed in the initial period after OGD. It was revealed that the inhibitory GABA-ergic interneurons are acetylcholine-sensitive and interconnected by electrotonic contacts. These properties can cause their OGD-resistance to a great extent. The damage of pyramidal neurons may be associated with the glycine receptors reduction in OGD. It is shown that neuronal cell adhesion molecules (NCAM) are involved in synaptic plasticity disorders. Synaptic transmembrane protein presenilin-1 and synaptotagmin-1 coordinate the effectiveness of synaptic transmission. The important role of hypoxia-induced factors (HIF) in maintaining the viability of nerve cells has been shown in OGD. Neuroprotective effects of anoxic preconditioning are associated with an increased level of HIF expression in neurons and is mediated by the stabilization of Ca^{2+} ATPases. The functional interrelationship of NCAM- and HIF-mediated mechanisms has been identified. The neuroprotective effect of multipotent mesenchymal stromal stem cells was shown in contact and non-contact cocultivation with slices in OGD. The molecular mechanisms of ischemic injury may be new pharmacological targets for brain ischemia.

Keywords: hippocampus, ischemic damage *in vitro*, neuroprotection.

Перелік основних умовних позначень

Габазин – блокатор ГАМК-рецепторів

ГАМК – γ -аміномасляна кислота

ДПД – блокатор пролілгідроксилази

КБК – карбенексолон (блокатор електричних контактів)

КГД – киснево-глюкозна депривація

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

ПЙ – йодид пропідію

Cx36 – connexin36 protein

FGL - NCAM міметик

FM1-43 – флуоресцентний барвник

GAD67 – glutamic acid decarboxylase isoform-67

GFAP – glial fibrillar acis protein

GlyRs – гліцинові рецептори

HIF – hypoxia induced factor

Iba-1 – ionized calcium binding adaptor molecule 1

LNT – інгібітор зв'язування PS1 і Syt1

MT – мітотрекер (флуоресцентний барвник)

MLA – метиллікоконітин, антагоніст $\alpha 7$ -нАЦХ рецепторів

MTS – тетразолієвий барвник

NCAM – нейронні молекули клітинної адгезії

NeuN -- neuronal nuclear antigen,

PS1 – пресенілін 1

SU5402 – блокатор FGF рецепторів

Syt1 – синаптотагмін 1