

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

*Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису*

ЛУШНІКОВА ІРИНА ВАСИЛІВНА

УДК 612.822.5+57.085.23

ДИСЕРТАЦІЯ

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

Спеціальність 03.00.13 - Фізіологія людини і тварин

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне

джерело

 І.В.Лушнікова

Науковий консультант: Скибо Галина Григорівна
Чл.-кор. НАНУ, доктор медичних наук, професор

КИЇВ 2019

АНОТАЦІЯ

Лушнікова І.В. Міжклітинні взаємодії та ендogenousні механізми нейропротекції у гіпокампі при моделюванні ішемічного пошкодження.
– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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 дисертаційній 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). Було підібрано такий режим КГД (зокрема 10, 30 або 60 хв), що не викликав швидких деструктивних змін, але проявлялися відтерміновані у часі ефекти (після 1-, 4- і 24-годинної нормоксичної реоксигенації). Така експериментальна модель є адекватною для вивчення механізмів розвитку пошкодження нервових клітин в умовах нестачі кисню і глюкози, яка є характерною для ішемії мозку.

Показано, що за умов, коли пірамідні нейрони ушкоджуються і гинуть, інтернейрони зберігають життєздатність та функціональну активність, а астрогліальні та мікрогліальні клітини активуються. Виживання або загибель клітин гіпокампа значною мірою залежать від стану мітохондрій. Виявлено зниження рівня мітохондріальної активності і кількості пірамідних нейронів у віддалені терміни після КГД (через 24 год нормоксичної реоксигенації). Відтермінована загибель нейронів має в своїй основі певні функціональні і пластичні

зміни у початковий (протягом першої години) період культивування після КГД.

Нами було проаналізовано зміни пластичності збудливих і гальмівних синапсів та гліальних відростків у найбільш чутливій CA1 зоні культивованих зрізів гіпокампа через 30 і 60 хв після КГД. Проведений морфометричний аналіз тривимірних реконструкцій на основі електронно-мікроскопічних зображень вказує на суттєві пластичні зміни компонентів синаптичного апарату у цей період, а саме спостерігається збільшення об'єму терміналей, шипиків і навколосинаптичної глії та площі постсинаптичної щільності, а також зменшення кількості синаптичних везикул.

Виявлено, що гальмівні ГАМК-ергічні інтернейрони гіпокампа є ацетилхолінчутливими та з'єднані між собою електричними контактами, оскільки ці клітини коекспресують відповідні специфічні білки (GAD67, $\alpha 7$ -nAChRs і Cx36). Це може бути ключовим фактором резистентності інтернейронів до КГД. Показано, що життєздатність пірамідних нейронів CA1 зони значною мірою обумовлена їх взаємодією з ГАМК-ергічними інтернейронами та кооперацією $\alpha 7$ -nAChRs- і Cx36-опосередкованих сигнальних шляхів.

Нами було отримано дані, які вказують на певний взаємозв'язок ушкодження CA1 нейронів в умовах КГД з редукцією соматичних гліцинових рецепторів.

Показано, що нейронні молекули клітинної адгезії (NCAM) задіяні у порушеннях синаптичної пластичності. Стабілізація функціональної активності нейронів і синапсів гіпокампа у присутності NCAM-міметика пептиду FGL свідчить про ключову роль NCAM у механізмах, які здатні протистояти порушенням синаптичної пластичності і пошкодженню нейронів при ішемії. Крім того, виявлено, що ефективність синаптичної передачі координують синаптичні

трансмембранні білки пресенілін-1 і синаптотагмін-1, взаємодія між якими є необхідним фактором вивільнення синаптичних везикул. Згадані сигнальні молекули можуть розглядатися як нові перспективні мішені для нейропротекції.

Важливу роль у підтримці життєздатності нейронів за умов КГД відіграють гіпоксія-індуковані фактори (HIF). Нейропротекторний вплив аноксичного прекодиціювання асоціюється з підвищеним рівнем експресії HIF у нейронах та опосередкований стабілізацією роботи плазматичної і саркоплазматичної Ca^{2+} -АТФаз. Виявлено взаємозв'язок NCAM- та HIF-опосередкованих механізмів, які значною мірою визначають ендogenous нейропротекцію та обумовлюють відтермінований характер ушкодження нейронів після КГД.

Виявлено, що за умов нашого експерименту мультипотентні мезенхімальні стромальні стовбурові клітини проявляють нейропротекторні властивості при контактному і безконтактному кокультивуванні зі зрізами.

Представлені у дисертаційній роботі результати розширюють уявлення про міжклітинні взаємодії та механізми, що задіяні у розвиток пошкодження нервових клітин гіпокампа внаслідок нестачі кисню і глюкози, а також певною мірою забезпечують ендogenous нейропротекцію. Отримані дані вказують на перспективні фармакологічні мішені для корекції розвитку нейродегенерації за умов ішемічного пошкодження. Наша модельна система може бути використана для тестування нейропротекторних засобів.

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

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

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., Malyarevsky 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 гіпокампу. *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., & Скибо 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 СА1 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. Tsupikov O., Lushnikova I., Nikandrova Y., Yatsenko K., Ustymenko A., Kyryk V., Butenko G., & Skibo 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. Tsupikov O.M., Lushnikova I., Nikandrova Y., Yatsenko K., Ustymenko A., Kyryk V., Butenko G., & Skibo G. (2017). Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model *in vitro*. *Cell and Organ Transplantology*, 5(1), 28-32. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).
19. Tsupikov O., Lushnikova I., Nikandrova Y., Yatsenko K., Ustymenko A., Kyryk V., Butenko G., & Skibo 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).

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Lushnikova I.V., Voronin K., Malyarevsky 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. Skibo G.G., Lushnikova I., Berezin V., Bock E. (2003). Neuroprotective effect of FGL in different in vitro models of brain ischemia. Summer Meeting for The Protein Laboratory, Copenhagen (Denmark), 31.
3. Skibo G.G., Lushnikova I.V., Voronin K., Berezin V., & Bock E. (2004). Neuroprotective effect of a synthetic peptide mimetic of NCAM (P2) in an in vitro model of ischemic damage. 29th FEBS Congress, Warsaw (Poland), S4.10, 0834.

4. Voronin K., Lushnikova I.V., Berezin V., Bock E., & Skibo G.G. (2004). Neuroprotective effect of a synthetic peptide mimetic of NCAM (FGL) in hippocampal cell and slice cultures exposed to oxygen-glucose deprivation. FENS Forum, Lisbon (Portugal), A228.19.
5. Malyarevskyy P.Y., Lushnikova I.V., Voronin K.Y., Martynyuk A.E., Skibo G.G. (2005). Neuroprotective action of L-Phenylalanine in rat hippocampal slice cultures. 5th international symposium on experimental and clinical neurobiology. Tatranska Lomnica (Slovak Republic), 65.
6. Voronin K.Y., Lushnikova I.V., Skibo G.G., Berezin V.A., Bock E. (2005). Neuroprotective effect of a synthetic peptide mimetic of neural cell adhesion molecule, P2, in an in vitro model of ischemic damage. The journal of the European college of Neuropsychopharmacology. Moscow (Russia) 15(2), P5.103, S259.
7. 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 гіпокампу на моделях in vitro та in vivo. XVII Фізіологічний з'їзд. Чернівці (Україна), *Фізіол.Журн.*, 52(2), 56.
8. Лушнікова І.В., Орловський М.О., Досенко В.Є., & Скібо Г.Г. (2008). Адаптація до короткотривалої гіпоксії підвищує резистентність нейронів гіпокампа in vitro. Наукова конференція з міжнародною участю «Високогірна гіпоксія і геном». Терскол (Росія), *Фізіол. Журн.*, 54(4), 76.
9. 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.

10. 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.
11. Skibo G., Lushnikova I., Muller D., & Nikonenko I. (2010). Ischemia induces changes in astroglial-synaptic interactions. 6th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, Restorative Neurology and Neuroscience, Rostock (Germany), 28(5), 638.
12. Lushnikova I.V., Kyrychenko K.A., Orlovsky M.A., Maistrenko A.M., Dosenko V.E., & Skibo G.G. (2011). Endogenous mechanisms of adaptation under oxygen-glucose deficiency. Матеріали 2 Міжнародної наукової конференції «Високогірна гіпоксія і геном» Терскол, (Росія), *Фіз.журн.*, 58(4), 70.
13. Maistrenko A., Lushnikova I., Orlovsky M., Dosenko V., & Skibo G. (2011), Expression of HIF mediates endogenous neuroprotection of hippocampal neurons during the ischemic and anoxic precondition. *Acta Biochimica Polonica* (VIII Parnas Conference, Warsaw, (Poland), 58, 32.
14. Maistrenko A., Lushnikova I., Orlovsky M., Dosenko V., & Skibo G. (2011), Neuroprotection induced by preconditioning in hippocampal slices are dependent upon hypoxia-inducible factors HIF expression and degradation. V Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv (Ukraine), 67.
15. Maistrenko A., Lushnikova I., Orlovsky M., Dosenko V., & Skibo G. (2011). Role of hypoxia-inducible factors in anoxia-mediated neuroprotection of hippocampal neurons. Cost Action TD0901: Hypoxia sensing, signalling and adaptation “Oxygen 2011”, Davos (Switzerland), 52.

16. Skibo G.G., Lushnikova I.V., & Nikonenko I.R. (2011). Synaptic activity induced structural plasticity of excitatory and inhibitory synapses in hippocampus. V Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv (Ukraine), 33.
17. 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.
18. Voitenko N., Kopach O., Maistrenko A., Lushnikova I., Dosenko V., & Skibo G., (2012). Neuronal subtyped specificity of altered calcium signaling during ischemia, anoxia preconditioning, and blockage of HIF degradation in hippocampal organotypic slices. Neuroscience, SfN's 42nd annual meeting, New Orleans (USA), S6018.
19. Kopach O., Maistrenko A., Lushnikova I., Skibo G., Dosenko V., & Voitenko N. (2012). Neuronal subtyped specificity of altered calcium signaling during ischemia, anoxia preconditioning, and blockage of HIF degradation in hippocampal organotypic slices. 8-th FENS forum of Neuroscience, Barcelona (Spain), 396.
20. Malieieva G.V., Lushnikova I.V., & Skibo G.G. (2013). Mitochondrial dynamics in oxygen-glucose deprivation on a model cultivated hippocampal slices. X Anniversary Ukrainian - Polish - Belorussian Conference "Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications", Kyiv (Ukraine), 21.
21. 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.

22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Maistrenko A., Kopach O., Lushnikova I., Dosenko V., Voitenko N., & Skibo G. (2014). Anoxia preconditioning and block of HIF degradation specifically attenuates ischemia-induced changes in intracellular calcium signaling in CA1 and CA3 hippocampal neurons. FEBS-EMBO Conference, Paris (France).
26. Скибо Г.Г., Коваленко Т.М., Ніконенко А.Г., Лушнікова І.В., Осадченко І.О., Орловський М.О., Пацева М.А., Майстренко А.М., Савчук О.І., Гончарова К.О., & Малєєва Г.В. (2014). Структурна пластичність нервових клітин в умовах нестачі кисню та глюкози. Матеріали XIX з'їзду Укр. Фізіол. Тов. ім.П.Г.Костюка, Київ (Україна), *Фізіол.журн.* 60(3), 18-19.
27. 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, Kyiv (Ukraine), 66.

28. Maleeva G., Lushnikova I., & Skibo G. (2017). Influence of oxygene-glucose deprivation on surface expression of glycine receptors by hippocampal cells. The 4th International Scientific Conference «Current problems of biochemistry and cell biology», Dnipro (Ukraine), 113-114.
29. Turchyna Y., Lushnikova I., Nikandrova Y., & Skibo G. (2017). Pharmacological protection of hippocampal damage induced by oxygen-glucose deficit. The 4th International Scientific Conference «Current problems of biochemistry and cell biology», Dnipro (Ukraine), 42.
30. Цупиков О.М., Лушнікова І.В., Пацева М.А., & Скибо Г.Г. (2018). Протекторний ефект мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини мишей на моделі перивентрикулярної лейкомаляції in vitro. 2nd Neurobiology and Rehabilitation International Symposium: “Neuroregeneration”, Kyiv (Ukraine), 19.

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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ	– 24
ВСТУП	– 27
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Особливості міжклітинних комунікацій у гіпокампі	– 37
1.2. Клітинні і молекулярні механізми ішемічного ушкодження	
1.2.1. Чутливість гіпокампа до ішемічного впливу	– 48
1.2.2. Некроз, апоптоз та аутофагія за умов ішемії	– 50
1.2.3. Молекулярні механізми, задіяні у розвитку ішемічного пошкодження	– 55
1.2.4. Структурні зміни у гіпокампі при розвитку ішемічного пошкодження	– 59
1.2.5. Роль нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChR) при розвитку ішемічного пошкодження гіпокампа	– 62
1.2.6. Роль NCAM при ішемічному ушкодженні	– 63
1.2.7. Роль NIF при ішемічному ушкодженні	– 64
1.2.8. Пов'язані з ішемією реакції гліальних клітин	– 67
Заключення	– 70
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Обґрунтування вибору об'єктів дослідження	– 71
2.2. Виділення тканин та отримання культур	
2.2.1. <i>Культитивування зрізів гіпокампа</i>	– 73

2.2.2. Виділення та культивування дисоційованих клітин гіпокампу	– 76
2.2.3. Отримання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової клітковини GFP-позитивних мишей.	– 77
2.3. Проведення киснево-глюкозної депривації	
2.3.1. Умови КГД	– 78
2.3.2. Хід виконання КГД для культивованих зрізів гіпокампа	– 79
2.3.3. Хід виконання КГД для культури дисоційованих клітин	– 80
2.3.4. Проведення аноксичного прекондиціонування (АПК)	– 80
2.4. Методи оцінки життєздатності органотипової чи дисоційованої культури гіпокампа	
2.4.1. Вимірювання відносної кількості цитозольного ферменту лактатдегідрогенази у культуральному середовищі	– 82
2.4.2. Забарвлення культур трипановим синім	– 83
2.4.3. Оцінка життєздатності та стану ядер у клітинах гіпокампа за допомогою флуоресцентних барвників	– 84
2.4.3.1. Забарвлення йодидом пропідію (ПЙ)	– 84
2.4.3.2. Комбіноване забарвлення Хехстом/ПЙ	– 84
2.5. Оцінка мітохондріальної активності у органотиповій та дисоційованій культурі гіпокампа	
2.5.1. MTS/формазановий-тест	– 85

2.5.2. Оцінка функціональної активності мітохондрій методом забарвлення <i>MitoTraker Orange</i>	– 86
2.6. Електрофізіологічні дослідження <i>Умови та реєстрація збудливих постсинаптичних потенціалів (ЗПСП)</i>	– 87
2.7. Імуногістохімічні (ІМГХ) методи досліджень	
2.7.1. ІМГХ забарвлення з використанням флуоресцентних маркерів та конфокальної мікроскопії	– 89
2.7.2. ІМГХ забарвлення з використанням електронної мікроскопії проведене після заключення у епоксидну смолу	– 92
2.8. Флуоресцентний метод оцінки ефективності вивільнення нейромедіатора	– 93
2.9. Світлова та електрона мікроскопія	
2.9.1. Підготовка препаратів для світлового та електронно- мікроскопічного морфологічного аналізу	– 95
2.9.2. Морфологічний ультраструктурний аналіз та тривимірне реконструювання	– 98
2.9.3. Забарвлення тіоніном	– 102
2.10. Проведення ПЛР-аналізу в реальному часі поодиноких CA1 пірамідних нейронів культивованих зрізів гіпокампа (Single-cell real-time RT-PCR)	– 102
2.11. Проведення кількісного ПЛР-аналізу в реальному часі тканини CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа	– 106

2.12. Вимірювання концентрації малонового діальдегіду (МДА) в культуральному середовищі	– 109
2.13. Статистичний аналіз результатів	– 110
2.14. Діючі речовини	– 110
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	– 112
3.1. Обґрунтування предмету дослідження	
3.2. Характеристика гіпокампальних культур та оцінка їх стану за нормальних умов та після киснево-глюкозної депривації	– 114
3.2.1. Органотипова культура гіпокампа	– 114
3.2.2. Оптимізація умов киснево-глюкозної депривації	
3.2.2.1. Оцінка життєздатності культивованих зрізів гіпокампу при КГД різної тривалості	– 115
3.2.2.2. Життєздатність нервових клітин у CA1 та CA3 зонах культивованих зрізів гіпокампа при КГД	– 119
3.2.3. Оцінка життєздатності культивованих дисоційованих гіпокампальних клітин при КГД	– 120
3.2.4. Оцінка активності метаболізму гіпокампальних органотипових та дисоційованих культур після КГД за допомогою MTS-тесту	– 122
3.2.5. Морфологічні зміни у пірамідній CA1 зоні гіпокампальних зрізів після КГД	– 125

3.2.6. Особливості життєздатності різних типів гіпокампальних клітин у культивованих зрізах після КГД	– 128
3.3. Дослідження механізмів, задіяних при розвитку пошкодження гіпокампальних клітин в умовах КГД	
3.3.1. Зміни мітохондріальної активності у різних типах гіпокампальних клітин культивованих зрізів при КГД	– 133
3.3.2. Зміни перекисного окислення ліпідів у культивованих зрізах гіпокампа після КГД	– 140
3.4. Міжклітинні взаємодії в умовах КГД	– 143
3.4.1. Ультраструктурні зміни синаптичного апарату нейронів CA1 зони та глії у культивованих зрізах гіпокампа при моделюванні ішемічного ушкодження	
3.4.1.1. Ультраструктурні зміни збудливих синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа у нормі та після КГД	– 146
3.4.1.2. Ультраструктурні зміни відростків гліальних клітин у зоні CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа у нормі та після КГД	– 154
3.4.1.3. Ультраструктурні зміни елементів синаптичного апарату нейронів гіпокампа при КГД	– 162
3.4.1.4. Ультраструктурні зміни гальмівних синапсів зони CA1 культивованих зрізів гіпокампа у нормі та після КГД	– 172
3.4.2. Модуляція функціонального стану CA1 пірамідних нейронів культивованих зрізів гіпокампа за участі інтернейронів	– 180

3.4.3. Роль гліцинових рецепторів при розвитку ішемічного ушкодження	– 192
3.5. Роль NCAM при розвитку ішемічного ушкодження	– 201
3.6. Дослідження впливу PS1-Syt1 взаємодії на ультраструктуру синаптичних везикул	– 218
3.7. Роль HIF при розвитку ішемічного ушкодження та деякі механізми нейропротекторних ефектів аноксичного preconditioning	– 222
3.8. Взаємозв'язок HIF/NCAM сигнальних шляхів	– 234
3.9. Дослідження впливу стовбурових клітин на культивовані зрізи мозку за умов розвитку ішемічного ушкодження	– 241
3.10. Узагальнення результатів дослідження	– 255
ВИСНОВКИ	– 263
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	– 266

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

АПК - аноксичне прекондиціювання

АФК - активні форми кисню

ВАЗ - відстань до активної зони

ВНС - відстань до найближчого сусіда

Габазин - блокатор ГАМК-рецепторів

ГАМК - γ -амніномасляна кислота

ДПД - інгібітор NIF-пролілгідроксилаз - 2,4- піридиндикарбоксильний оксид діетилового естеру

ДТП - довготривала потенціація

ЗПСП - збудливий постсинаптичний потенціал

ІЩФ - інтегральна щільність флуоресценції

КБК - карбенексолон (блокатор електротонічних контактів)

КГД - киснево-глюкозна депривація

ЛДГ - лактат дегідрогеназа

ЛПС - ліпополісахарид

ММСК – мультипотентні мезенхімальністромальні клітини

ПД - потенціал дії

ПЙ – йодид пропідію

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція

ПОЛ - перекисне окислення ліпідів

ПС - популяційні спайки

ПСЩ - постсинаптична щільність

СВ - синаптичні везикули

СК – стовбурові клітини

СП - синаптична пластичність

ТС - трипановий синій

TT - трис-тритоновий буфер

ACSF - artificial cerebrospinal fluid

$\alpha 7$ nAChR - $\alpha 7$ subunits of the nicotinic acetylcholine receptors,

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

AP5 - антагоніст глутаматних рецепторів

BDNF - brain-derived neurotrophic factor - нейротрофічний фактор мозку

Cx36 - connexin36 protein

DG - dentate gyrus

FGL – NCAM-міметик

FM1-43 - флюоресцентний барвник

GAD67 - glutamic acid decarboxylase isoform-67

GAP-43 - growth associated protein,

GFAP - glial fibrillar acid protein, маркер астроглії

GlyRs - гліцинові рецептори

HIF - hypoxia induced factor

Iba-1 - ionized calcium binding adaptor molecule 1, маркер мікроглії

LNT - інгібітор зв'язування PS1 і Syt1

MT - MitoTracker

MLA - метиллікоконітин алколоїд (конкурентний антагоніст $\alpha 7$ -нікотинових ацетихолінових рецепторів)

MK-801 - блокатор глутаматних рецепторів

MTS (MTS - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium])

NCAM - нейронні молекули клітинної адгезії

NeuN - neuronal nuclear antigen, маркер нейронних ядер

NMDA - N-метил-D-аспартат

PMCA – Ca^{++} -АТФаза плазматичної мембрани

PS1 - пресеніліну 1

Rip – білок, маркер олігодендроцитів

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

SERCA – Ca^{++} -АТФаза ендоплазматичного ретикулуму

SNAP-25 - synaptosomal associated protein

SP - stratum pyramidale

SPh - synaptophysin.

SR - stratum radiatum

SU5402 - блокатор FGF рецепторів

Syt1 - синаптоагмін 1

U-74389G - лазароїдний інгібітор ПОЛ

ВСТУП

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 [68, 140]. 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 [184, 343]. 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 [52, 210, 234, 235, 334]. 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 [143, 259]. 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 [102, 191]. 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 [223, 63]. 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 (Syt1) 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 ендогенні 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 культованими 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);
- Summer Meeting for The Protein Laboratory, 2003, Copenhagen (Denmark)
- 29th FEBS Congress, 2004, Warsaw (Poland);
- FENS Forum, 2004, Lisbon (Portugal);
- 8-th ECNP Regional meeting, 2005, Moscow (Russia);
- 5th international symposium on experimental and clinical neurobiology, 2005, Tatranska Lomnica (Slovak Republic);
- 17 з'їзді українського фізіологічного товариства, 2006, Чернівці (Україна);
- НК «Високогірна гіпоксія і геном», 2008/2011, Терскол (Росія);
- FENS, Geneva, 2008 (Switzerland);
- 8th MC/WG Meeting COST B30 Action: Neural Regeneration and Plasticity, 2009, Larnaca (Cyprus);
- 6th Internanional Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, 2010, Rostock (Germany);
- VIII Parnas Conference, 2011, Warsaw, (Poland);

- V Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, 2011, Kyiv (Ukraine);
- COST TD0901: HypoxiaNet OXYGEN, 2011, Davos (Switzerland);
- Neuroscience 2012, SfN's (Society for Neuroscience) 42nd annual meeting, 2012, New Orleans (USA);
- 8-th FENS forum of Neuroscience, 2012, Barcelona (Spain);
- X Anniversary Ukrainian - Polish - Belorussian Conference, 2013, 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, 2014, Kyiv (Ukraine);
- FEBS-EMBO Conference, 2014, Paris (France);
- XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім.П.Г.Костюка, 2014, Київ (Україна);
- 7th International Congress, Kyiv, 2017, (Ukraine);
- 4th International Scientific Conference «Current problems of biochemistry and cell biology», 2017, Dnipro, (Ukraine);
- 2nd Neurobiology and Rehabilitation International Symposium: “Neuroregeneration”, 2018, Kyiv (Ukraine).

Публікації. Результати дисертації викладені 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.

У першому розділі наведено аналіз сучасних наукових літературних джерел, щодо стану вивчення механізмів розвитку ішемічного ушкодження головного мозку.

У другому розділі «Матеріали і методи дослідження» описані експериментальні *in vitro* моделі ішемічного ушкодження гіпокампа, методи оцінки життєздатності та функціональної активності культур гіпокампа, ПЛР-аналіз, методи імуноцито- та гістохімії, методи світлової і електронної мікроскопії та тривімірного реконструювання.

У третьому розділі наведено результати та обговорення експериментальних досліджень, статистичний аналіз результатів та їх узагальнення.

На основі отриманих результатів зроблено висновки.

Список використаної літератури налічує 347 джерел.

Обсяг дисертації становить 310 сторінок.

Робота ілюстрована 105 рисунками і 4 таблицями.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості міжклітинних комунікацій у гіпокампі

Гіпокамп є частиною лімбічної системи головного мозку та відіграє важливу роль у консолідації багатьох сигнальних шляхів, приймає участь у механізмах навчання, пам'яті, формування емоцій та просторовій орієнтації. Гіпокамп має структуровану архітектуру розташування пірамідних нейронів, які функціонально диференційовані на зони CA1, CA2 та CA3 але без чітких меж (Рис.1.1).

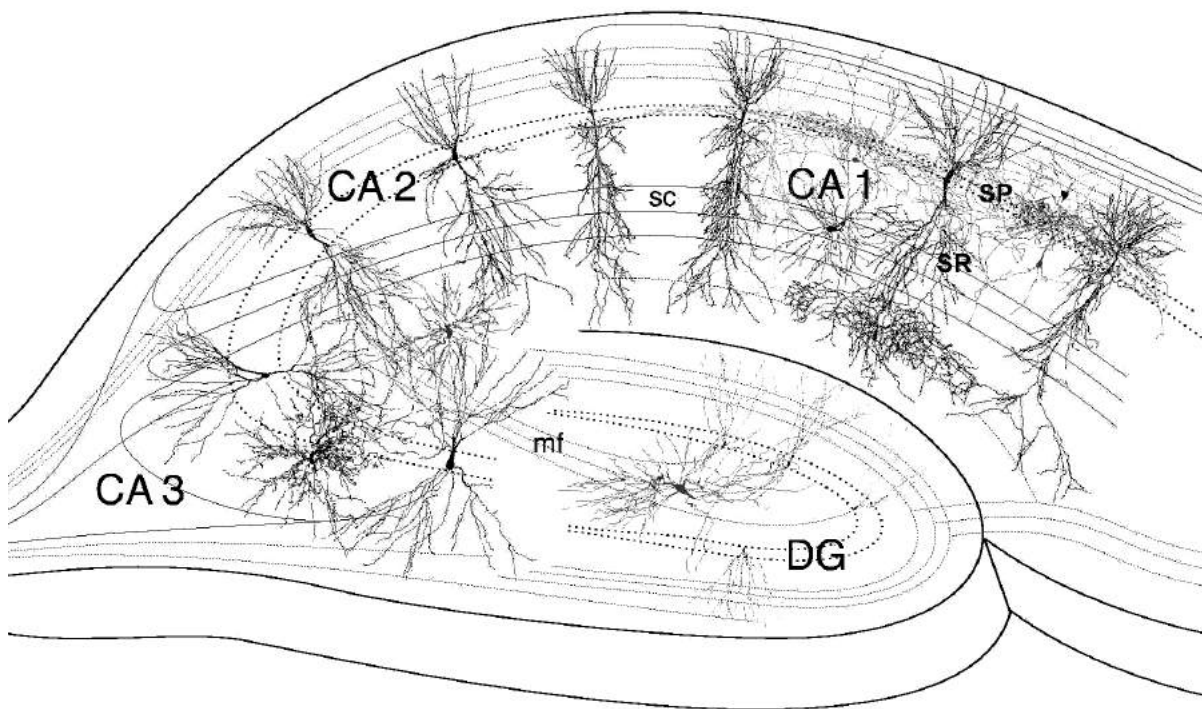


Рис.1.1. Схематичне зображення поперечного зрізу гіпокампа.

Зони: *cornu ammonis* – CA1, CA2, CA3, *dentate gyrus* – DG.

Шари: *stratum pyramidale* – SP, *stratum radiatum* – SR.

Сигнальні шляхи: *mossy fiber* – mf, *Schaffer collateral* – sc (адаптовано з сайту <http://integral-options.blogspot.com/2014/05/modulation-of-adult-hippocampal.html>).

У пірамідному шару (*stratum pyramidale* – SP) щільно розташовані тіла нейронів пірамідної форми, у радіальному шарі (*stratum radiatum* – SR) їх відростки, які утворюють між собою численні контакти. Від енторинальної кори йдуть проєкції до зубчастої звивини (dentate gyrus – DG), від DG через моховиті волокна до CA3 і CA2 зон та завершуються у радіальній CA1 зоні так званими Шаферовими колатераліями [50, 130]. Одже, пірамідалі CA1 нейрони мають асоціативні зв'язки з іншими рівнями гіпокампа, а також аферентацію від субкортикальних структур. Взаємодії між пірамідними нейронами здійснюються переважно через хімічні збудливі синапси, в яких глутамат та/або аспартат є основними нейромедіаторами. Крім пірамідних, в усіх шарах гіпокампа розташовані проміжні гальмівні інтернейрони з найбільшою локалізацією у DG, куди надходять сигнали перфорантного шляху від енторинальної кори [222, 282]. Гальмівними нейромедіаторами є γ -аміномасляна кислота (ГАМК) і гліцин. Інтернейрони модулюють функції пірамідних нейронів. Значною мірою комунікації між інтернейронами відбуваються за допомогою електричних контактів [202].

Важливе значення для нормального функціонування гіпокампа мають гліальні клітини, зокрема астрогліальні, мікрогліальні клітини та олігодендроцити. Астрогліальні клітини мають широко розгалужену структуру зірчастої форми і тісно пов'язані з пірамідними нейронами. Це багатофункціональні клітини, які значною мірою забезпечують простір та умови для нормального функціонування нейронів і гіпокампа в цілому. Функції астроглії (опорно-розмежувальна, гомеостатична, трофічна, сигнальна, ростова, репаративна, підтримка клітинної міграції та гематоенцефалічного бар'єру, регуляція кровотоку) широко досліджуються і нерідко їй надають головуючу роль у модуляції функціонування нейронів [307]. Мікрогліальні

клітини виконують роль макрофагів ЦНС та мають регулюючу та захисну функції [206]. Олігодендроцити відповідають за мієлінізацію нервових волокон та виконують регуляторну функцію.

Всі клітини гіпокампа формують єдину функціональну систему, а їх невід'ємною властивістю є пластичність, що проявляється у мобільних модифікаціях нейронних реакцій, внутрішньоклітинних трансформаціях і структурних перебудовах, які забезпечують зміни ефективності міжнейронних зв'язків та оптимізують функціональну активність гіпокампа [130, 138]. Властивість нейронів і синапсів та глії до пластичних змін лежить в основі когнітивних функцій [37].

Міжнейронні взаємодії у гіпокампі відбуваються через синапси за участю нейрохімічної передачі (нейротрансмісії). Найбільш поширеними у гіпокампі є хімічні синапси, які формуються пресинаптичною зоною, де накопичуються везикули з хімічним медіатором, синаптичною щілиною, в якій відбувається дифузія медіатора і постсинаптичною зоною з чутливими до медіатора рецепторами (Рис.1.2). Хімічні синапси здійснюють односторонню передачу сигналу шляхом екзоцитозу нейромедіатора під впливом електричного сигналу з пресинаптичних везикул у зоні стикання з постсинапсом (активною зоною синапсу). Молекули нейромедіатора дифундують крізь синаптичну щілину і зв'язуються з рецепторами на мембрані постсинаптичного нейрона. У постсинапсі виділяють постсинаптичну щільність (ПСС) за рахунок накопичення там функціональних білків. У постсинаптичній зоні відростків нервових клітин утворюються тимчасові чи/або довгострокові філоподійподібні структури (шипикі) різноманітної форми [34, 235]. Нейромедіатори в цілому розділяють на два типи, відповідно до впливу на нейрони: збудливі – викликають деполяризацію постсинаптичної мембрани нервової клітини, генеруючи потенціал дії; гальмівні –

гіперполяризують мембрану, перешкоджаючи передачі електричного імпульсу. Нейротрансмісія забезпечується злагодженою дією численних білків по обидві сторони синаптичного контакту. Ефективність синаптичної передачі обумовлена властивостями як претак і постсинаптичних клітин. Функціонування нейронів залежить від тонкої рівноваги між збудливими і гальмівними процесами, а порушення такої рівноваги може мати патологічні наслідки.

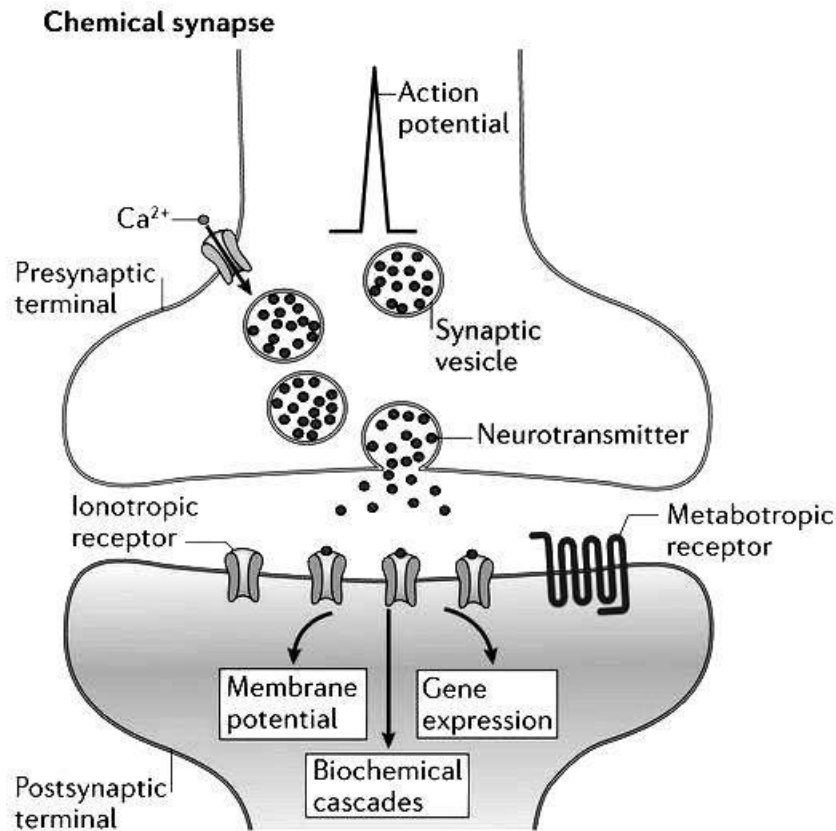


Рис. 1.2. Схематичне зображення хімічного синапсу (адаптовано зі статті Pereda A.E. et al. doi: 10.1038/nrn3708).

Синаптична пластичність (СП) асоціюється зі змінами секреції нейромедіатора і чутливості постсинаптичних рецепторів та супроводжується структурними трансформаціями. Залежно від умов функціонування синапсу переважає або полегшення, або депресія синаптичної передачі. Виділяють короточасну і довгочасну

потенціацію. Довготривалі види пластичності поширені у гіпокампі і лежать в основі навчання і пам'яті, просторової і часової орієнтації та інших когнітивних функцій. Показано, що ініціація довготривалих форм СП збудливих синапсів відбувається в результаті активації глутаматних рецепторів (іонотропних і метаботропних) і надходження іонів Ca^{2+} в клітину. Це викликає активацію внутрішньоклітинних протеїнкіназ і фосфорилування численних білків, в наслідок чого відбуваються значні молекулярні і структурні трансформації у клітинах, які призводять до змін функціональної активності, зростання і розгалуження нервових відростків, утворення нових синапсів, збільшення кількості рецепторів на постсинаптичній мембрані та ін. [185]. Структурні зміни елементів синапсів корелюють зі змінами їх активності. Виділяють дві основні категорії хімічних синапсів: асиметричні з вираженою ПСЩ, які у переважній більшості є глутаматергічними, збудливими синапсами та симетричні з менш вираженою ПСЩ, до яких відносяться ГАМК-ергічні і гліцинергічні гальмівні синапси [144]. У гіпокампі збудливі синапси у більшості розташовані на дендритах і дендритних шипиках, у той час як гальмівні синапси концентруються переважно на сомі клітин та початковому сегменті аксона. Дендрити, аксони і гліальні відростки утворюють своєрідне сито нейропіля SR, де знаходиться більшість синаптичних контактів і здійснюється взаємодія між клітинами [130].

Збудливі аксошипикові синапси є найбільш типовими синапсами для SR гіпокампа, де більшість пресинаптичних аксонів починаються від CA3 пірамідних клітин і утворюють синапси з шипиками, що відходять від апікальних дендритів CA1 пірамідних клітин (Рис. 1). CA3 аксони формують пресинаптичні розширення – терміналі, у яких накопичуються везикули, наповнені нейромедіатором [167]. Синаптичні везикули (СВ) утворюються з ендоплазматичного

ретиккулуму і цистерн апарату Гольджі, після чого транспортуються у пресинаптичну зону. Висока концентрація медіатора в дрібних синаптичних везикулах (близько 100 ммоль/л) досягається наявністю в мембрані везикули активних транспортних систем. Електрохімічний градієнт, що утворюється завдяки роботі протонної помпи, забезпечує активний транспорт медіатора з цитоплазми до везикули. Пресинаптичні термінали збудливих синапсів у гіпокампі містять заповнені глутаматом везикули переважно круглої форми, діаметром 35-40 нм. Такі структурні характеристики синаптичного контакту як кількість та просторовий розподіл СВ прямо пов'язані з ефективністю синаптичної передачі. Найближчі до активної зони синапсів везикули мають найвищу готовність до вивільнення. Більш віддалені від зон вивільнення везикули є резервним пулом та можуть бути задіяні в умовах надлишкової стимуляції [286]. Перший пул включає запас доступного медіатора, який може звільнитися протягом короткого проміжку часу (5-12 с), а другий пул – це мобілізаційний резерв, який з певною швидкістю відновлює запаси везикул першого пулу. Окремо виділяють рецикуючий пул, що перебуває у спокої і може бути задіяним у випадку гіперактивації. Розмір пулу СВ визначає ефективність роботи синапсу, а положення СВ по відношенню до активної зони синапсу обумовлює вірогідність вивільнення кванту нейромедіатора з везикули. Після електричної потенціації і вивільнення медіатора у синаптичну щілину, везикулярна мембрана відновлюється шляхом клатрин-опосередкованого ендоцитозу та здійснюється зворотне захоплення медіатора [17, 246].

Синаптична щілина - проміжок шириною приблизно 20 нм між пре- та постсинаптичними мембранами синапсу, який заповнений електронно-щільним матеріалом, що містить білки екстраклітинного матриксу і спеціалізовані синаптичні протеїни.

Постсинаптична щільність (ПСЩ) розташована безпосередньо напроти активної зони пресинаптичної терміналі і може мати суцільну або переривчасту (перфоровану) форму. ПСЩ складається з цитоскелетного каркасу, у якому закріплені білки, зокрема рецептори нейромедіаторів, іонні канали та адапторні білки. Типова ПСЩ є дископодібною структурою з діаметром 200-500 нм і товщиною 30 - 60 нм. Перфорації ПСЩ асоціюється зі зменшенням гранулярного матеріалу у цитоплазматичній зоні з боку протилежної пресинаптичної мембрани. Існує широка варіабельність у формі та розмірі ПСЩ. У разі шипикових синапсів СА1 зони гіпокампа, площа ПСЩ сягає від 0,008 до 0,54 мкм². Розмір ПСЩ визначається як внутрішніми властивостями нейронів, так і активністю окремих синапсів [105].

У гіпокампі, притаманна збудливим синапсам розширена ПСЩ має асиметричну форму відносно активної зони пресинаптичної терміналі і у більшості випадків є стабільним місцем взаємодій між пірамідними нейронами, у той же час структурні компоненти гальмівних синапсів є зонами короткотривалих тимчасових міжнейронних комунікацій [144]. Гальмівні синапси найчастіше розташовані на сомі нейрона, аксонному горбку, меншою мірою вони розподіляються серед збудливих синапсів вздовж дендритів [86, 87, 202]. ПСЩ гальмівних синапсів має симетричну форму по відношенню до активної зони пресинапсу. Важливу роль у формуванні ПСЩ гальмівних ГАМК-ергічних синапсів відіграє білок гефігін. Попередником гальмівного медіатора виступає глутамат, який перетворюється на ГАМК за участю ферменту глутаматдекарбоксилази. Тривалий час вважалося, що ця амінокислота пов'язана виключно з синаптичним гальмуванням, але на ранніх етапах розвитку мозку ГАМК опосередковує і синаптичне збудження. У дорослому мозку переважає гальмівна функція ГАМК.

Окрім глутамата і ГАМК, у гіпокампі виділяють ряд різних за хімічною природою нейромедіаторів (ацетилхолін, моноаміни, пурини та ін.), які здійснюють модулюючий вплив на синаптичну активність.

Нейромедіатори активують відповідні їм рецептори не тільки у зонах синапсів, а й позасинаптично. У синаптичній щілині концентраційні зміни хімічного медіатора відбуваються швидко (~ 1 мс), що забезпечує високу швидкість нейротрансмісії. Позасинаптична концентрація нейромедіаторів змінюється повільніше і залежить від швидкості дифузії [17, 18, 210, 310]. Обидва процеси обумовлюють загальну збудливість нервової клітини та її метаболічний стан. З функціональної точки зору синаптична передача може бути охарактеризована як система швидкої передачі інформації по ланцюжку нейронів, яка визначається станом збудливої і гальмівної сигналізації у кожний момент часу. Позасинаптична дифузна нейропередача може одночасно змінювати активність цілої групи клітин, що мають відповідні рецептори. Позасинаптичні рецептори є свого роду «детекторами» позаклітинної концентрації медіаторів та регуляторами збудливості нейронів [314].

Координована робота синаптичного апарату, зокрема процесів збудження/гальмування за умов балансу нейромодуляторів є основою ефективної обробки та передачі сигналів у гіпокампі [229, 327].

Окрім хімічної синаптичної передачі у гіпокампі присутня і електрична [227, 231]. Передача сигналу між нейронами через електричні синапси відбувається без участі медіатора та опосередкована щілинними контактами (gap junction), які є кластерами міжклітинних каналів, що безпосередньо з'єднують дві сусідні клітини (Рис. 1.3).

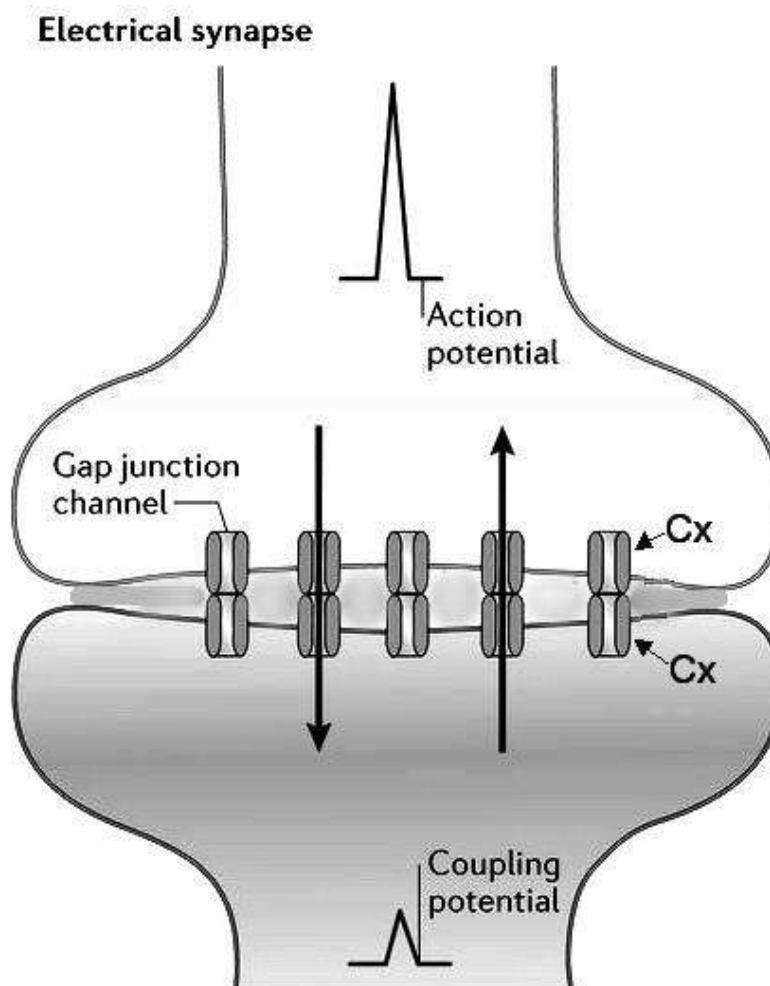


Рис. 1.3. Схематичне зображення електричного синапсу. Cx – конексин, (адаптовано зі статті Pereda A.E. et al. doi: 10.1038/nrn3708).

Електричним синапсам властива дуже вузька синаптична щілина (до 5 нм) і низький питомий опір пре- і постсинаптичних мембран. Низький опір обумовлений наявністю поперечних каналів діаметром ~1 нм, які пересікають обидві мембрани та з'єднують клітини між собою [82, 322]. Канали формуються шляхом стикання гідрофобних гексамерних структур білків сімейства конексинів (Cx) і забезпечують двостороннє проходження електричних струмів і малих молекул (зокрема, кальцію, циклічного АМФ, АТФ, низькомолекулярних

пептидів та ін.). Більшість електричних синапсів є збудливими. У гіпокампі такі контакти характерні для комунікацій між інтернейронами, вони забезпечують велику швидкість і синхронізацію передачі сигналу [204].

Важливим елементом синаптичного комплексу вважається навколосинаптична нейроглія. Нейрогліальні клітини – це велика популяція клітин в мозку, які за чисельністю перевищують кількість нейронів. До них відносяться астрогліальні і мікрогліальні клітини та олігодендроцити. Вони є складовою частиною нейронних мереж, мають сому і мобільні розгалужені відростки. У межах гіпокампа вони розподілені відносно рівномірно, мають здатність до міграції та кластеризації у разі потреби. Встановлена визначальна роль гліальних клітин у підтримці іонного гомеостазу нервових клітин, модуляції нервової сигналізації, рециркуляції нейромедіаторів, участі у підтримці гомеостазу нервової тканини та захисті нервових клітин за патологічних умов [249, 252].

Астроцити контролюють баланс іонів і нейромедіаторів в синаптичній щілині та відповідають за підтримку структури мозку і рівновагу метаболізму нервових клітин [196, 211, 212]. Відомо, що вони синтезують нейромедіатори, зокрема глутамат та ГАМК і залучені у їх транспортування (Рис. 1.4) [113, 312]. Астрогліальні клітини виконують трофічну функцію, відповідають за позаклітинний гомеостаз іонів, критичний для збудливості нейронів і підтримки позаклітинного значення рН. Ці функції забезпечуються численними мембранними транспортерами, зокрема Na^+/K^+ -АТФаза, Na^+/H^+ і $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ обмінниками. Між астрогліальними клітинами і нейронами можуть утворюватися щілинні контакти, які забезпечують їх швидку взаємодію та модулюють збудливість нейронів [36, 111, 249, 316].

Показано, що між астроцитами і нейронами може відбуватися прямий обмін компонентами клітин шляхом ендцитозу/екзоцитозу [103, 344].

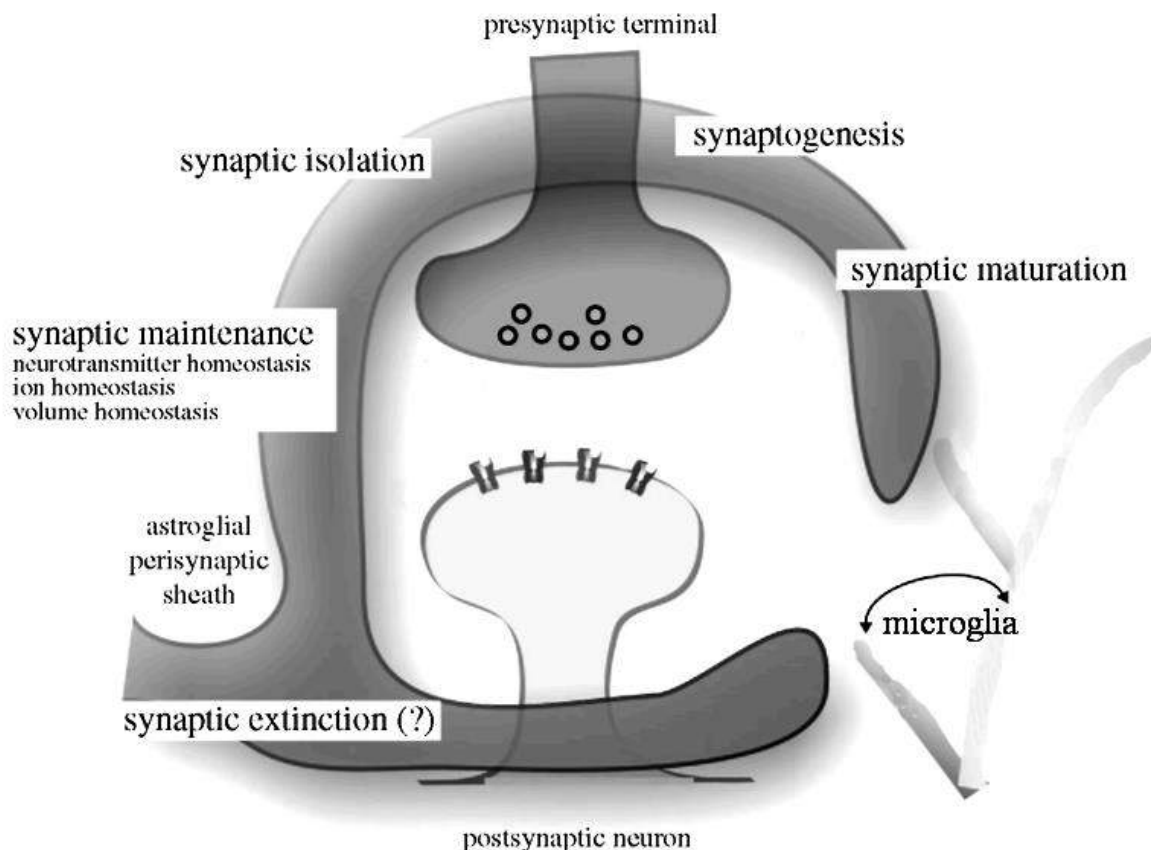


Рис. 1.4. Схематичне зображення розташування навколосинаптичної глії. (адаптовано зі статті Verkhatsky A. et al. doi: 10.1098/rstb.2013.0595).

Мікрогліальні клітини виконують функції макрофагів, модулюючи нейронну активність і життєздатність через вивільнення біоактивних факторів. Активація цих клітин пов'язана з сигнальними молекулами, здебільшого є рецептор-опосередкованою і передбачає міграцію цих клітин у ділянки мозкової тканини де виникає така потреба. Продукуючи численні цитокіни, мікроглія відіграє важливу роль у регуляції пластичності нервової тканини шляхом підтримки

нейро- і синаптогенезу, а також сприяє процесам активації і проліферації астроцитів [221, 252, 316].

Олігодендроцити є активними партнерами для нейронів, вони продукують мієлін, забезпечуючи ізоляцію аксонів і швидке поширення електричних сигналів. Крім того, ці гліальні клітини здійснюють трофічну підтримку нейронів, впливають на структуру аксонів і можуть змінювати електричні властивості нейронів шляхом регуляції діаметру аксонів, а також кластеризації іонних каналів. Олігодендроцити експресують ростові фактори, які приймають участь у підтримці структури нейронних мереж [249, 316].

Отже, клітини гіпокампа є високоспеціалізованими, тісно взаємодіють між собою та утворюють складну функціональну систему з певним рівнем стабільності її роботи за нормальних умов навколишнього простору та деякою мірою при патологічних впливах.

1.2. Клітинні і молекулярні механізми ішемічного ушкодження

1.2.1. Чутливість гіпокампа до ішемічного впливу

Відомо, що тканини головного мозку і особливо гіпокамп є вельми чутливі до порушень кровообігу, оскільки нейрони еволюційно налаштовані на ефективне здійснення сигнальної функції, але мають мінімальні ресурси для підтримки фізіологічної рівноваги на клітинному і тканинному рівні [184]. Порушення функціонування системи на будь-якому рівні призводить до розвитку багатьох нейродегенеративних захворювань, серед яких ішемія, хвороба Альцгеймера та Паркінсона, шизофренія, епілепсія та ін. [2, 3] Нервові клітини активно споживають енергію, основним джерелом якої є аеробний розпад глюкози. Вони потребують постійного надходження

глюкози і кисню з зовнішнього кровотоку. Навіть короткочасна гіпоглікемія/гіпоксія призводить до дефіциту АТФ та ішемізації нервової тканини, що викликає патологічні прояви, які можуть мати широкий спектр градацій в залежності від ступеню та тривалості зниження чи відсутності мозкової мікроциркуляції крові [6, 172, 334, 343]. Додатковим патологічним чинником є постішемична реперфузія, яка виникає після періоду тимчасової ішемії та подальшого відновлення мозкового кровообігу [85]. За цих умов спостерігається феномен відстроченого пошкодження мозкових тканин, що проте дає так зване «терапевтичне вікно», для запобігання загибелі нервових клітин при дефіциті кисню та глюкози [75, 217]. Дослідження клітинних і молекулярних механізмів розвитку ішемічного ушкодження не втрачає своєї актуальності, зокрема з використанням модельних експериментальних систем *in vivo* і *in vitro*.

Нестача кисню та глюкози призводить до зниження активності мітохондріального дихального ланцюга та синтезу АТФ [255]. Розвиток енергетичного дефіциту і лактат-ацидозу в умовах критичної ішемізації мозкової тканини, запускає каскад патологічних реакцій на клітинному і молекулярному рівні [242, 253, 269].

Відповідь тканини головного мозку на ішемію визначається, перш за все її тривалістю. Після довготривалої ішемії, тканина мозку швидко переходить у стан інфаркту. Коли ішемічний стан триває коротко патологічних наслідків може не виникнути. Різні структури головного мозку мають різну чутливість до ішемії. Виявлено, що гіпокамп є найбільш чутливою до киснево-глюкозного дефіциту. Крім того, встановлена селективна гіперчутливість пірамідних нейронів зони СА1 гіпокампа до ішемічних умов. Показано, що загибель нейронів є повільним процесом, що триває 2-3 дні перш ніж виникнуть кардинальні морфологічні зміни [143].

1.2.2. Некроз, апоптоз та аутофагія за умов ішемії

Коли клітини знаходяться у несприятливих умовах довгий час і їх внутрішні резерви вичерпуються, вони втрачають здатність підтримувати фізіологічну рівновагу і гинуть, раніше або пізніше. Надпорогові негативні впливи викликають швидку деструкцію клітин через некроз, який характеризується руйнуванням клітинних мембран та набуханням клітин. Цей процес локально незворотній і супроводжується денатурацією внутрішньоклітинних протеїнів та ферментативним розщипленням загиблених клітин. Некроз клітини ініціює виснаження ресурсів АТФ, порушення проникності мембран та витік ферментів і реактивних молекул за межі клітини, що викликає запалення оточуючих тканин [334, 336].

В умовах допорогового ішемічного впливу спостерігається більш фізіологічний тип клітинної смерті – апоптоз (програмувана клітинна смерть), який супроводжується конденсацією ядра і цитоплазми та активацією механізмів утилізації пошкоджених клітин [79, 195].

Апоптоз представляє собою упорядковану серію змін у експресії генів та активності білків. На відміну від некрозу, при апоптозі не відбувається руйнування цитоплазматичної клітинної мембрани, а вміст клітини не потрапляє в позаклітинний простір і не викликає запалення нервової тканини.

Клітини, що гинуть шляхом апоптозу, можна розпізнати за рядом морфологічних ознак. Вони стають меншими і більш щільними (пікноз), у них руйнується цитоскелет, розпадається ядерна мембрана, хроматин конденсується і фрагментується [242]. Якщо клітини достатньо великі, то вони розпадаються на оточені мембранами фрагменти – апоптичні тільца.

В апоптичних клітинах крім морфологічних відбувається також велика кількість біохімічних змін. Характерною ознакою апоптозу є фрагментація ДНК у міжнуклеосомальних ділянках за допомогою специфічної ендонуклези, що активується каспазами (caspase activated DNAase) [244, 245]. Показано, що негативно заряджений фосфоліпід фосфатиділсерін, який за нормальних умов міститься тільки у внутрішньому (повернутому до цитозолу) шарі мембрани, під час апоптозу переміщується на зовнішню поверхню і слугує сигналом «з'їж мене» для фагоцитів та гліальних клітин. При апоптозі відбувається утворення апоптичних тілець, які можуть містити цілі органели і фрагменти ядерного хроматину. Ці тільца утилізуються астрогліальними і мікрогліальними клітинами в результаті фагоцитозу. Фосфатиділсерін-індуковане поглинання апоптичних клітин, на відміну від інших типів фагоцитозу, не призводить до виділення медіаторів запалення. Навіть при великій кількості апоптозних клітин, запалення не спостерігається [263].

У молекулярних механізмах апоптозу приймають участь білки родини каспаз. Це протеази, які мають в активному центрі залишок цистеїну, і розрізають субстрат по специфічному залишку аспарагінової кислоти. Каспази синтезуються у вигляді неактивних прокаспаз, які можуть ставати субстратами для інших, вже активованих каспаз, що ріжуть їх в одному або двох місцях по залишку аспартату. Два утворені фрагменти з'єднуються між собою, формуючи димер, а два димери формують тетраметр, який і є активною протеазою. Набір каспаз, необхідний для проходження апоптозу, залежить від типу тканини і шляху за яким активується клітинна смерть [244].

Клітина може отримувати сигнал, що індукує апоптоз з зовні. У такому випадку активується так званий зовнішній шлях, що починається з рецепторів смерті – трансмембранних білків, які

належать до родини фактора некрозу пухлин (ФНП), зокрема сам ФНП-рецептор або Fas-рецептор. Вони формують гомотримери, в яких кожен мономер має позаклітинний ліганд-зв'язувальний, трансмембранний і цитоплазматичний домени, який індукує активацію прокаспаз [15, 161, 245].

Апоптоз також може запускатися із середини клітини, зокрема у випадку її травмування, пошкодження ДНК, нестачі кисню, поживних речовин. У хребетних цей сигнальний шлях називається внутрішнім або мітохондріальним, а ключовою подією у ньому є вивільнення певних молекул із міжмембранного простору мітохондрій. До таких молекул зокрема належить цитохром *c*, що за звичайних умов входить до електрон-транспортного ланцюга мітохондрій. Вивільнення цитохрому *c* із мітохондрій у цитозоль може бути маркером апоптозу. Під час загибелі клітин шляхом апоптозу мітохондрії втрачають електричний потенціал, що за нормальних умов існує на внутрішніх мембранах. Коли цитохром *c* вивільнюється з мітохондрій, відбувається його зв'язування з адаптерним білком АРАФ (apoptotic protease activating factor-1), що викликає утворення апоптосом. Зовнішній шлях апоптозу активує внутрішній, який регулюється білками родини Bcl-2 [61].

Відтермінована загибель нейронів має риси, що з морфологічної точки зору є спільними з апоптозом. Наприклад, нейрони зона СА1, що гинуть такою смертю демонструють формування апоптотичних тілець, що складаються з фрагментованих компонентів клітин та їх ядер. Передбачають, що механізми клітинної смерті, які задіяні при апоптозі, відіграють значну роль у відтермінованій клітинній смерті нейронів в умовах ішемії [4]. Показано, що типовий ефектор апоптозу каспаза 3 активується у нейронах зони СА1 після ішемії, а інгібітори цього ферменту мають певний протекторний ефект на нейрони.

Імуносупресанти (зокрема циклоспорин А та FK506), які закривають проникні мітохондріальні пори, захищають нейрони зони СА1 від загибелі. Оскільки мітохондрії відіграють важливу роль у процесах апоптозу, вважають, що певні аспекти відтермінованої нейронної смерті мають молекулярні механізми, які можуть бути асоційованими з апоптозом [339].

При ішемічному ушкодженні у ряді випадків поряд з апоптозом у тканинах виявляють віддалені у часі вторинні ознаки некрозу [156]. Програмована клітинна смерть і механізми некрозу пов'язані з глутаматною ексайтотоксичністю і можуть запускатися паралельно в ішемізованому мозку. Показано, що некроз розвивається як правило у центрі ішемічного інфаркту, а апоптоз виявляється у віддалених від центру зонах "ішемічної напівтіні" (пенумбри). Експериментальними дослідженнями встановлено, що в ішемізованому мозку переважаючий між некрозом і апоптозом механізм визначається тяжкістю ішемії, чутливістю нейронів, активністю клітинного метаболізму та трофічних процесів [60, 61, 214, 343]. Формування більшої частини ядра інфаркту за умов гострої фокальної ішемії закінчується через 3-6 год з моменту появи клінічних симптомів інсульту. Процеси, які виникають у перші години захворювання та обумовлені глутамат-кальцієвим каскадом (зміни іонного транспорту, вільнорадикальні реакції, перекисне окислення ліпідів, надмірне утворення оксиду азоту, ейкозаноїдів, фактора активації тромбоцитів і ін.) надалі стають критичними, особливо при великих розмірах зони ішемічного ураження. Вони індукують віддалені наслідки ішемії: реакції на рівні геному, молекулярні програми, пов'язані з астро- і мікрогліальними клітинами; локальне запалення в осередку ішемії; порушення мікроциркуляції і гематоенцефалічного бар'єру та ін. Всі ці процеси обумовлюють "доформування", або розширення інфаркту мозку за рахунок

збільшення пошкодження у зоні пенумбри від центру до периферії. У віддалені терміни після ішемії виникають генералізовані зміни нейроендокринної і імунної системи. Тривалість періоду деструктивних змін має індивідуальний характер [172].

Крім некрозу і апоптозу, механізми загибелі клітин включають аутофагію та гібридні форми клітинної смерті [325]. Зазвичай аутофагія є фізіологічним процесом, необхідним для рециркулювання білків з пошкоджених органел, але було продемонстровано, що фокальна ішемія асоціюється з підвищеною експресією регулятора аутофагії Beclin 1 та зміною розподілу маркеру аутофагії LC3 у клітинах [244, 245]. Виявлено, що деякі клітини у пенумбрі демонструють риси гібридних форм клітинної смерті, що комбінують апоптотичні, некротичні та аутофагічні зміни: значну активацію каспази-3, конденсацію/фрагментацію ядер, набряк цитоплазми, ушкодження органел та порушення мембран [326].

У деяких дослідженнях показано можливість відновлення клітин у зоні пенумбри після епізоду порушення кровотоку [100]. Такі спостереження мають важливе практичне значення, оскільки припускають відсутність жорстких меж «терапевтичного вікна» і актуалізують пошуки нових ефективних методів нейропротекції, які базуються на можливості корекції механізмів розвитку ушкодження нервової тканини на початкових стадіях.

1.2.3. Молекулярні механізми, задіяні у розвитку ішемічного пошкодження

Нестача кисню та глюкози викликає пригнічення продукції АТФ у клітині та призводить до порушення функції Na^+/K^+ - та Ca^{2+} -АТФазної ферментної системи з подальшим розладом трансмембранних іонних градієнтів. Внаслідок цього запускається каскад глутамат-кальцієвих реакцій, які відіграють ключову роль у виникненні та розвитку пошкоджень нервової тканини в умовах ішемії мозку [124]. Порушення активного іонного транспорту призводить до відтоку K^+ з клітин та входу Ca^{2+} у клітини (Рис.1.5), внаслідок чого відбувається деполяризація плазматичних мембран та подальший приплив Ca^{2+} у клітини через потенціалзалежні кальцієві канали [32]. Накопичення H^+ у клітинах призводить до значного вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій і саркоплазматичного ретикулуму [323]. Зростання концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} в пресинаптичних нейронах викликає неадекватне нефізіологічне вивільнення збудливих амінокислот глутамату та аспартату в міжклітинний простір, одночасно з цим відбувається порушення зворотного захвату медіатора. Глутамат, які вивільнюються у великій кількості спричиняє перезбудження постсинаптичних рецепторів. Цей процес називається глутаматною ексайтотоксичністю і розвивається при багатьох мозкових патологіях [34, 48].

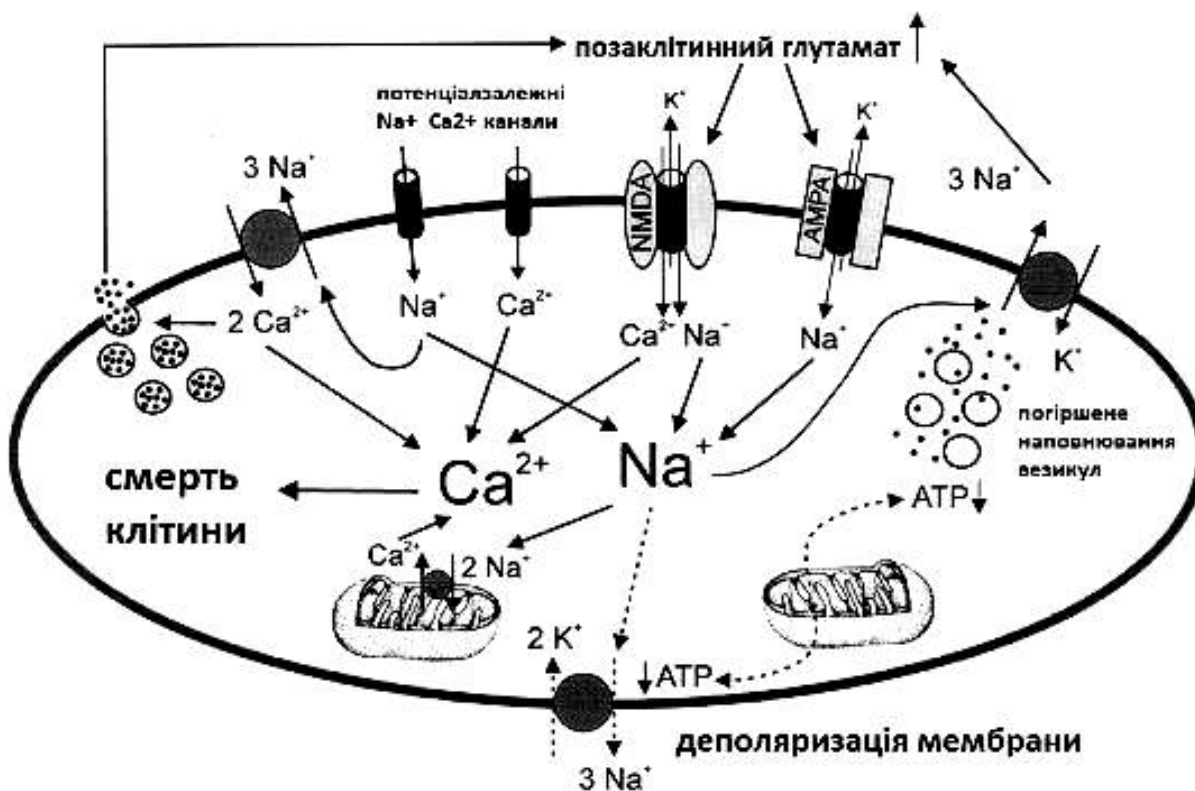


Рис.1.5. Схема механізму ексайтотоксичності (з сайту *Cell Biology of Disease and Exercise* <http://pt851.wikidot.com/stroke-cell-bio>).

У розвитку ішемічного пошкодження значною мірою задіяні рецептор-опосередковані міжклітинні взаємодії [85, 114; 327]. Основою феномену ексайтотоксичності є порушення проникності іонотропних рецепторів, які регулюють іонний склад у внутрішньоклітинному та позаклітинному просторі. Частіше за все відбувається активація NMDA рецепторів (N-метил-D-аспартату-рецептори), які є гетерогенною популяцією, що включає іонотропні (NMDA, AMPA і кайнатні) та метаботропні глутаматні рецептори. Відомо, що іонотропні рецептори відіграють провідну роль у здійсненні збудливої синаптичної передачі і беруть участь у запуску патобіохімічного каскаду за умов церебральної ішемії [189, 190]. Їм належить важлива роль у патогенезі багатьох мозкових захворювань, зокрема епілепсії, судомних станів та ін. [65, 217, 222].

У фізіологічних умовах NMDA-рецептори активуються мілімолярними концентраціями глутамату, що присутній у синаптичній щілині протягом декількох мілісекунд. За патологічної умов виникає посилення потенціації та активація рецепторів протягом значно більшого проміжку часу [17, 18, , 29, 30]. Перезбудження саме NMDA-рецепторів глутаматом призводить до «шокового» відкриття кальцієвих каналів, масивного припливу Ca^{2+} у нейрони та значного збільшення його вмісту в клітинах. Активація AMPA-рецепторів спричиняє зміну проникності постсинаптичної мембрани для K^+ та Na^+ , підсилення входу Na^+ у клітину та короточасну деполяризацію постсинаптичної мембрани, що викликає додаткове збільшення припливу Ca^{2+} у клітину через потенціалзалежні канали [322, 336].

Вважається, що надходження іонів Ca^{2+} у клітини через канали NMDA-рецепторів є ключовою подією в реалізації токсичних ефектів глутамату. Приток Na^+ супроводжується входом у клітини води та Cl^- , що надалі призводить до набухання відростків та лізису нейронів [48, 223]. У період посилення ішемії головного мозку ступінь деструктивних змін нейронів корелює з рівнем глутамату. Глутаматопосередковане «кальцієве перевантаження» викликає Ca^{2+} -опосередковану активацію численних ферментів, зокрема протеаз, кіназ, ендонуклеаз, ліпоксигеназ, фосфоліпаз та ін., що викликає значні порушення метаболізму і генетичного апарату клітини. [102, 109]. При ішемії порушується баланс між активацією та інгібіцією протеаз. За цих умов у CA1 зоні гіпокампа надмірну експресію каспази-3 пов'язують переважно з дегенеруючими пірамідними нейронами, у сомі яких проявляються ознаки фрагментації. Пригнічення активності цього ферменту суттєво зменшує клітинну смерть, викликану ішемією [244, 245].

Руйнівний розпад фосфоліпідів відбувається як у зовнішніх клітинних мембранах, так і у мембранах внутрішньоклітинних органел. При цьому масивно вивільнюється арахідонова кислота, метаболізм якої пов'язаний із утворенням простагландинів, тромбоксанів, гідрокси- та гідропероксижирних кислот, лейкотрієнів і реактивних вільних радикалів. Відбувається внутрішньоклітинне накопичення активних форм кисню, значно інтенсифікуються процеси окислення, що призводить до розвитку оксидантного стресу, який є одним із універсальних механізмів пошкодження тканин організму, в тому числі нервової [61, 210].

Серед чинників, що опосередковують трансформацію фокальної церебральної ішемії в інфаркт, відзначають запалення і автоімунні реакції на власні антигени мозку [15, 61]. Окрім дії на клітини, прозапальні цитокіни і медіатори запалення здійснюють негативний вплив на міжклітинні структури та судинні стінки. Зменшується щільність міжэндотеліальних контактів і порушується гематоенцефалічний бар'єр [127].

Функціональні зміни викликані ішемією спостерігаються на різних рівнях організації нервової тканини. Для дослідження механізмів розвитку ішемічного пошкодження запропоновані моделі *in vivo* та *in vitro* [168, 273]. Якщо ішемічний епізод є відносно коротким, пошкодження клітин може не бути або виникати відстрочено, у той час як тривала ішемія викликає сильно виражені та швидкі деструктивні зміни клітин. У експериментах *in vitro* виявлено, що коротка киснево-глюкозна депривація (КГД), яка широко використовується для моделювання ішемічного пошкодження, індукує довготривалу потенціацію синаптичної передачі, а більш тривала – депресію [217, 133].

Було показано, що ішемія головного мозку пригнічує синтез білків. Збільшення кількості так званих стресових гранул, у яких накопичуються елементи білкового синтезу спостерігали у початковий період реперфузії. Рівень синтезу білка незворотно пригнічувався у центрі та значно зменшувався у пенумбрі через декілька годин після ішемії [139, 343].

1.2.4. Структурні зміни у гіпокампі при розвитку ішемічного пошкодження

Проведені електронно-мікроскопічні дослідження показали, що у постішемичний період у нейронах гіпокампа спостерігаються суттєві зміни мембранної організації мітохондрій, дезагрегація полірибосом, зменшення ширшавого ендоплазматичного ретикулуму та апарату Гольджі, а відновлення клітин пов'язують з суттєвим збільшенням площі гладенького ендоплазматичного ретикулуму [85, 184].

Показано, що ішемичний вплив викликає деструкцію і набухання мітохондрій [149, 279]. У певних межах мітохондрії здатні відновлювати свою нормальну форму у період реперфузії. Хоча короткострокова гіпоксія/гіпоглікемія знижує мітохондріальне дихання на короткий час, але це може призвести до значних негативних ефектів, оскільки підвищується рівень внутрішньоклітинного кальцію. Виявлено зміни у контактних точках внутрішніх мітохондріальних мембран, підвищення рівню цинку всередині мітохондрій, активація каналів та утворення пор, які порушують функціональну цілісність зовнішніх мітохондріальних мембран у нейронах гіпокампа у постішемичний період [42, 262].

Нормальна структура і кількість синапсів відіграють вирішальну роль у формуванні, підтримці та функціонуванні нейронних мереж.

Цитоплазматичні Ca^{2+} -залежні цистеїнові протеази – кальпаїни грають важливу роль у процесах ремоделювання структури клітинних і внутрішньоклітинних компонентів. Залежна від кальпаїнів деградація нейронів починається на ранніх стадіях після ішемії [51, 338].

Виявлено, що при різних неврологічних захворюваннях морфологія і функція синаптичних з'єднань і нейронів суттєво змінюється. Навіть короткострокова глобальна ішемія викликає вибірккову деструкцію і загибель нейронів гіпокампа, зокрема більше 90% CA1 пірамідних нейронів гинуть через 3-5 днів після ішемічного впливу [229]. Початкові зміни морфології синапсів, які спостерігаються вже через 20-60 хв після ішемічного епізоду, є Ca^{2+} -залежними та опосередковані гіперактивацією NMDA рецепторів. Паралельно з цим відбувається деградація шипиків і дендритів, набряк терміналей та руйнування плазматичних мембран. Після нетривалої ішемії спостерігається зміна експресії білків SNAP-25 і синаптофізину, які приймають участь у формуванні та вивільненні синаптичних везикул у пресинапсі [120]. Виявлено збільшення протеолітичної активності кальпаїнів та деградація білків цитоскелету може бути асоційовано з порушення транспорту СВ. Показано, що пов'язана з ішемією активація протеаз веде до часткової деградації таких білків ПСЦ, як спектрин та MAP2. Крім цього, денатуровані білки можуть робити структуру ПСЦ більш дифузною [192]. Підвищена кількість матеріалу ПСЦ у постішемічному головному мозку, може бути сформована денатурованими та агрегованими білками. Показано, що білки ПСЦ у зоні CA1 гіпокампа надмірно убиквітовані, вказуючи на їх деградацію [118]. Такі події спричиняють зниження ефективності синаптичної передачі та роблять відповідний внесок у початкові і віддалені ефекти ішемії щодо пошкодження нейронів.

Інтернейрони гіпокампа є більш стійкими ніж пірамідні клітини до нестачі кисню і глюкози та ексайтотоксичності, завдяки перш за все відмінностям у складі і рівні експресії їх рецепторів [30, 108]. У гіпокампі ГАМК-ергічні (нейромедіатор – гама-аміномасляна кислота) інтернейрони формують гальмівні синапси на сомі і перисоматичній ділянці дендритів пірамідних нейронів. Соматостатин- та нейропептидY-позитивні (SST- і NPY-, відповідно) інтернейрони, локалізовані у зубчастій фасції, кальретин-позитивні інтернейрони у зоні CA3 та у шарі моховитих волокон [89, 131, 154]. Відростки SST-позитивних інтернейронів йдуть у зовнішній молекулярний шар, де завершуються на дендритах гранулярних клітин зубчастої фасції, які розташовані біля входу перфорантного шляху. Кальретин-позитивні інтернейрони зони CA3, які відомі характерними дендритами з великою кількістю шипиків, отримують більшу частину інервації також з зубчастої фасції. Інтернейрони зменшують виразність розвитку довготривалої потенціації та надмірної збудливості пірамідних нейронів гіпокампа [66, 292].

Інтернейрони виявляють меншу вразливість за умов ішемії. Показано, що на відміну від пірамідних нейронів, ГАМК-ергічні інтернейрони, NPY-позитивні інтернейрони та парвальбумін-позитивні клітини у зонах CA1 та CA3 гіпокампа виживають після ішемії [130]. Активація ГАМК-ергічної нейротрансмісії може обумовлювати відстрочений характер загибелі пірамідних нейронів, що викликана ішемічним впливом і ексайтотоксичністю [163]. Виявлено, що деградація інтернейронів відбувається значно пізніше у порівнянні з відносно швидкою загибеллю пірамідних нейронів зони CA1 після ішемічного впливу [130, 154, 343].

Інтернейрони гіпокампа формують між собою електричні синапси за рахунок специфічних конформацій молекул Cx36

(конексин36). Показано, що кількість Cx36+ електричних контактів збільшується в нейронних мережах гіпокампа в ішемічних умовах. Їх роль у ефектах NMDA-залежної ексайтотоксичності у гіпокампі остаточно не визначена, однак виявлено, що NMDA-опосередкована загибель нейронів зменшується при фармакологічній блокаді електричних синапсів і знижується у мишей, у яких відсутній специфічний білок електричних контактів Cx36. Результати вказують на те, що електричні синапси задіяні у систему реакції нервової тканини на NMDA-залежну ексайтотоксичність і відіграють значну роль у виживанні/загибелі нейронів при ішемії [90, 322].

1.2.5. Роль нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChR) при розвитку ішемічного пошкодження гіпокампа

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR) – це лігандзалежні іонні канали, що експресуються переважно у збудливих, але і у багатьох незбудливих клітинах. Вони локалізуються на плазматичній і мітохондріальній мембранах, відіграють важливу роль у міжклітинних взаємодіях та приймають участь у забезпеченні функціонування нервових клітин як за нормальних умов, так і при розвитку нейродегенеративних захворювань [275]. Показано, що nAChR (а саме, $\alpha 7$ nAChR) експресуються як пірамідними нейронами, так і інтернейронами гіпокампа. Вони можуть бути розташовані інтра- і екстрасинаптично та виконують модулюючу роль [21, 138, 199, 280]. nAChR належать до родини пентамерних ліганд-залежних іонних каналів. Це глікопротеїд пентамерний комплекс з молекулярною масою близько 300 кДа. Утворена $\alpha 7$ nAChR іонна пора має вирішальне значення для селективності і провідності каналу. Амінокислотні залишки внутрішнього устя каналу є негативно заряджені, що

забезпечує проходження катіонів через канал. У відкритому стані канал проникний для одно- та двовалентних іонів (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) [20]. Лігандами nAChR можуть бути речовини, які синтезуються в організмі (ацетилхолін, холін) та природні речовини (нікотин, епібатидин, цитизин, токсини). У гіпокампі $\alpha 7$ nAChR приймають участь у регуляції життєздатності, диференціації і міграції нейронів. Вони відіграють важливу роль у когнітивних процесах, таких як пам'ять і здатність до навчання, а також у розвитку нікотинової залежності. Виявлено, що дисфункція або дефіцит нейронних $\alpha 7$ nAChR спостерігається у патогенезі нейродегенеративних захворювань, зокрема при епілепсії, аутизмі, шизофренії, хворобі Альцгеймера та Паркінсона. Роль $\alpha 7$ nAChR у ішемічному пошкодженні гіпокампа остаточно не з'ясована. Виявлено, що інгібування ацетилхолінестерази (фермент, який розщиплює ацетилхолін) певною мірою запобігає ефектам ексайтотоксичності глутамату і розвитку ішемічного ушкодження та уповільнює атрофію гіпокампа, передбачаючи позитивну регулюючу роль $\alpha 7$ nAChR при ішемії [87, 209, 277]. Отже, $\alpha 7$ nAChR задіяні у механізмах ендогенної нейропротекції і можуть розглядатися як перспективні мішені для фармакологічної корекції мозкових патологій.

1.2.6. Роль NCAM при ішемічному ушкодженні

Відомо, що пластичність нервової тканини та міжклітинні взаємодії значною мірою обумовлена нейронними молекулами клітинної адгезії (NCAM, від англ. neural cell adhesion molecule) як у нормальних, так і патологічних умовах. Позаклітинний домен NCAM залучений до гомофільного (взаємодія NCAM однієї клітини з NCAM іншої клітини) і гетерофільного (взаємодія NCAM з іншими протеїнами) зв'язування, що зумовлює міжклітинні взаємодії,

синаптогенез і залежну від функціонування синаптичну пластичність [11, 35]. Проведені численні дослідження *in vivo*, які виявили важливу роль NCAM у навчанні та пам'яті [144, 168, 239]. Показано суттєвий стимулюючий вплив NCAM на нейритогенез та активність синапсів, які значно пошкоджуються в умовах ішемії мозку. Показана причетність комплексу NCAM-PSA (полісиалові кислоти) у процесах синаптогенезу [76, 207]. Виявлено вплив NCAM-опосередкованих структурних перебудов на синаптичну збудливість, що зумовлює зміни швидкості передачі сигналів від клітини до клітини. Зв'язуючись з FGF-рецепторами (рецептор фактора росту фібробластів), NCAM запобігає зниженню синаптичної активності та життєздатності культивованих нейронів при КГД через запуск низки молекулярних механізмів, які відповідальні за підтримку гомеостазу нервових клітин [35, 145]. Виявлені суттєві структурні синаптичні перебудови у гіпопампі, які відбуваються як у пресинаптичних терміналях, так і у постсинаптичних шипиках. На молодих та старих тваринах показане значне NCAM-опосередковане збільшення ефективності збудливих синапсів, які найбільш поширені у гіпокампі [35]. Дослідження ролі NCAM у розвитку ішемічного ушкодження на теперішній час тривають і мають певні перспективи для нейропротекції.

1.2.7. Роль HIF при ішемічному ушкодженні

Транскрипційний фактор, що індукується гіпоксією (hypoxia-inducible factor, HIF) називають кисневим сенсором клітин, оскільки його експресія активується при зниженні напруженості кисню у тканині [125]. HIF-1 є гетеродимерним комплексом, що складається з α - та β -субодиниць. Ідентифіковані 3 підтипи α -субодиниці (HIF-1 α , HIF-2 α та HIF-3 α) та 3 підтипи β -субодиниці (HIF-1 β , HIF-2 β та HIF-3 β), які кодуються різними генами та характеризуються певними

особливостями молекулярно-структурної організації і функціональної ролі. Клітинні та молекулярні механізми в яких задіяний HIF-1 багатогранні і активно досліджуються. Це обумовлено необхідністю розуміння молекулярних і генетичних механізмів, які опосередковує HIF-1 у нормі і при патології з метою ефективно модулювати процес фізіологічної адаптації до гіпоксичних умов, тканинах та організму в цілому. Дослідження генів-мішеней, які активуються HIF-1, сприяє розумінню механізмів розвитку нейродегенерації різної етіології [84, 60].

Експресії субодиниць HIF-1 притаманна тканинна специфічність. Субодиниця HIF-1 α експресується у різних типах тканин, однак найвищий рівень її експресії виявлено у нервовій тканині, зокрема у нейронах [159, 186, 198, 227]. HIF-1 α певною мірою постійно експресується у клітинах за нормоксичних умов та має короткий період напіврозпаду (~5 хв). Внутрішньоклітинні ферменти родини пролілгідролаз каталізують гідроксилування та деградацію HIF-1. Показано, що активація пролілгідролаз забезпечує нейтралізацію субодиниці HIF-1 α та попереджає подальшу активацію транскрипції генів [197, 268]. Відомо більше 100 генів-мішеней, які активуються HIF-1 та кодують експресію численних функціональних білків. Різноманіття генів-мішеней, які активуються HIF-комплексом, відображає неоднозначність ефектів, які опосередковуються HIF [58, 84, 99, 162].

Клітинні ефекти, які пов'язані з HIF-1 у нервовій тканині в умовах ішемії мають суперечливий характер. Численні дослідження демонструють, що вже через годину після ішемічного епізоду спостерігається акумуляція білка HIF-1 α у тканинах мозку. Підвищений рівень HIF-1 α у нервовій тканині зберігався протягом тижня після ішемічного інсульту. Експериментальні дослідження

виявили, що зміни рівня експресії HIF-1 α при ішемічному ураженні нейронів мали фазний характер [282]. Він може зростати і знижуватися протягом 24 год після ішемічного впливу, а також у подальшому. Виявлено, що в інтервалі 1–24 год відбувається активація генів-мішеней, які кодують експресію ферментів гліколізу, білків проангіогенезу та факторів, задіяних у програмованій загибелі клітини. HIF індукує активацію механізмів, які компенсують дефіцит кисню, що передбачає протекторний вплив [293, 297].

Селективне пригнічення експресії HIF-1 α у нейронах шляхом генетичного нок-дауну призводило до зростання ушкоджень тканин мозку на моделі оклюзії середньої церебральної артерії і зменшення кількості клітин, що вижили після ішемічного ушкодження. Інгібування експресії HIF-1 α призводило до зростання ступеню ушкодження CA1 зони гіпокампа за умов ішемічного ураження на моделі двосудинної оклюзії. Нейропротекторна роль HIF-1 α підтверджується тим, що активація HIF-1 α сприяла виживанню нейронів у експериментах *in vitro* і *in vivo* [161, 227] у випадку додавання активаторів як перед так і після моделюванням ішемічного ушкодження [344]. Крім того, виявлено, що стабілізація рівня HIF-1 α інгібіторами пролілгідроксилаз призводила до підвищення рівня виживання клітин [268].

У той же час є дані, які демонструють, що в експериментах *in vitro* генетичне пригнічення експресії HIF-1 α попереджало глутаматну токсичність, а активація HIF-1 α сприяла розвитку глутаматної інтоксикації та загибелі нейронів [26]. Різнострамованість HIF-опосередкованих клітинних ефектів істотно ускладнює узагальнення його ролі, передбачаючи необхідність подальших досліджень.

Показано взаємозв'язок HIF-опосередкованих механізмів з реактивними формами кисню (reactive oxygen species, ROS). Було

виявлено, що ROS індують деградацію HIF-1 α у нейронах за умов гіпоксії [339]. Показано, що ROS опосередковує не тільки деградацію HIF-1 α субдиниці, а й зниження рівня експресії HIF-1 α при ішемії [186].

Виявлено зв'язок між HIF і внутрішньоклітинною сигналізацією, яка пов'язана з Ca²⁺-залежними ефекторними механізмами. Показано, що HIF-1 α опосередковує механізми які забезпечують зменшення Ca²⁺-індукованої цитотоксичності [158, 205].

Показано, що HIF-1 значною мірою обумовлює позитивні ефекти гіпоксичного пре- та постпрекондиціювання – феномену підвищення толерантності органів і тканин до дії тривалої гіпоксії при попередньому помірному гіпоксичному впливі [75, 99, 232].

Велика увага приділяється дослідженню молекулярних партнерів HIF-1, які приймають участь у індукції внутрішньоклітинних процесів адаптації. Розуміння сигнальних шляхів, які опосередковують виживання чи загибель клітин при ішемії, надасть можливість модулювати HIF-опосередковану нейропротекцію при ішемічних ураженнях мозку.

1.2.8. Пов'язані з ішемією реакції гліальних клітин

Дисфункція головного мозку при ішемії значною мірою обумовлена пошкодженням нейронів, але гліальні клітини також відіграють важливу роль у цих процесах. Астроцити та мікрогліальні клітини більш толерантні до нестачі кисню і глюкози і виконують нейропротективні функції при мозкових порушеннях [115, 297], але гіперактивація цих клітин є патологічним чинником. При ішемічному ураженні мозку певна активація гліальних клітин є функціонально доцільним для посилення трофічної підтримки ушкоджених нейронів,

ізоляції ураженої ділянки від решти тканини, активації регенеративних процесів в місці пошкодження, але за умов гіперактивації, глія спричиняє деструктивний вплив та може винищити нейрони шляхом фагоцитозу (Рис.1.6) [221, 287, 347].

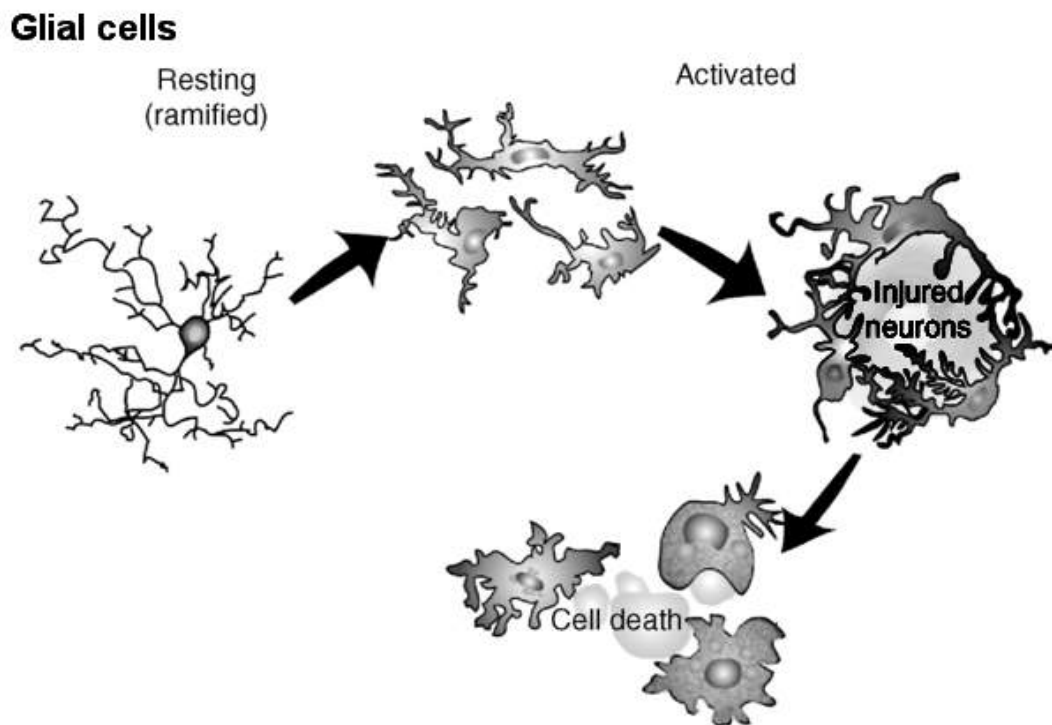


Рис. 1.6. Схематичне зображення активації гліальних клітин і фагоцитозу пошкодженого нейрону (адаптовано зі статті Ohsawa K. et al. doi: 10.1098/rstb.2013.0595).

При розвитку ішемічного ушкодження, який призводить до загибелі клітин та нейрологічного дефіциту у випадку ішемії або інсульті, астроглія значною мірою визначає прогрес захворювання і його результат [344]. В залежності від глибини і тривалості ішемічного впливу астроглія може зменшувати або посилювати пошкодження.

У порівнянні з нейронами астроцити є більш резистентними до ішемічного впливу через властивість використовувати анаеробний спосіб метаболізму. Вони здатні певною мірою запобігати накопиченню надмірної кількості глутамату і гіперактивації нейронів [297].

Астроцити є основним продуцентом глутатіону і аскорбінової кислоти, які є поглиначами реактивних продуктів кисню, запобігаючи загибелі нейронів, що зумовлена токсичною дією активних кисневих радикалів. Астроцити також є основними клітинними, які стримують деполяризацію нейронів та зменшують ефекти ексайтотоксичності шляхом видалення надлишку позаклітинного K^+ [147, 312].

Одним з механізмів ендогенної нейропротекції є здатність до прямого обміну клітинними компонентами шляхом ендцитозу/фагоцитозу. Показано, що за умов ішемії пошкоджені мітохондрії можуть переходити з нейронів до астроцитів для їх утилізації, а функціонально активні мітохондрії можуть направлятися у нейрони [103].

Ці нейропротекторні функції мають особливе значення для зони пенумбри, яка оточує ішемічне ядро. На теперешній час астроцити розглядаються як перспективні мішені для терапії патологій мозку [252].

Виявлено, що олігодендроцити високочутливі до нестачі кисню та глюкози. Ішемія викликає значне ушкодження цих клітин і зменшення їх кількості та площі у гіпокампі на відміну від астроцитів та мікроглії [249, 297, 322].

Показано, що мікроглія здійснює моніторинг функціонального стану синапсів, активно проліферує і мігрує до пошкоджених ділянок тканин та регулює очищення і відновлення у ураженій ішемією тканині головного мозку шляхом фагоцитозу та продукції численних біологічно активних молекул, які сприяють ре моделюванню мозкової тканини [316, 317, 320]. Фагоцитарна функція мікрогліальних клітин має переважно протекторний характер, але їх надмірна активація впливає негативно на перебіг подій [129].

Таким чином, гліальні клітини можуть бути факторами як ендогенної нейропротекції та відновлення, так і посилення пошкодження. Модуляція функцій гліальних клітин, зокрема при ішемії має певні перспективи для нейропротекції і потребує подальших досліджень.

Заключення

Розуміння ендогенних механізмів, які задіяні у функціонування тканин мозку в умовах киснево-глюкозного дефіциту, надає великі перспективи для нових стратегій у нейропротекції при ішемії. Розробка експериментальних моделей *in vivo* і *in vitro* є одним з важливих завдань нейронауки для вивчення механізмів розвитку пошкодження нервових клітин та пошуку шляхів запобігання їх загибелі. Використані методи надали змогу дослідити особливості міжклітинних взаємодій і молекулярних механізмів, які значною мірою забезпечують фізіологічну рівновагу нервової тканини у нормі і за умов киснево-глюкозної депривації та обґрунтувати перспективні напрямки для нейропротекції.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Обґрунтування вибору об'єктів дослідження

Для вивчення механізмів міжклітинних взаємодій при розвитку ішемічного пошкодження нами були використані модельні системи *in vitro*, зокрема, органотипові та дисоційовані культури гіпокампа. Одна з поширених причин, що викликає або сприяє ушкодженню і загибелі нервових клітин, є нестача кисню та глюкози, яка обумовлює чи супроводжує більшість нейродегенеративних захворювань, зокрема ішемію мозку. Ішемічні умови *in vitro* найчастіше моделюються за допомогою киснево-глюкозної депривації з використанням спеціальної камери, в якій кисень повітря замінюється на азот, а в середовищі культивування глюкоза замінюється на сахарозу.

Дослідження *in vitro* можливо здійснювати на гострих тканинних зрізах, дисоційованих клітинних або органотипових культурах. Кожна з цих моделей має свої переваги та недоліки. Здатність гострих зрізів мозку, які були інкубовані в сольовому розчині зберігати життєздатність вперше була продемонстрована у 1924 році [1]. Протягом наступних 30 років цей метод використовувався для вивчення процесів дихання, гліколізу, провідності нейронних мереж, процесів обміну речовин нормальної та патологічно зміненої нервової тканини. Ці роботи виявили значне співпадіння метаболічних та електрофізіологічних характеристик тканини інтактного мозку та його зрізів *in vitro*. Але гострі зрізи мають обмежений (~8 год) період для досліджень, після чого швидко втрачають життєздатність.

Дисоційовані нейронні культури отримують шляхом механічної чи ферментативної дисоціації тканини мозку, в результаті чого утворюється суспензія відокремлених клітин, які відновлюють свою

природну структуру та наново утворюють міжклітинні контакти і формують нейронні мережі. Така культура дає можливість досліджувати окремі типи клітин та спостерігати особливості їх безпорядних реакцій на різні впливи. Дані властивості роблять дисоційовані культури особливо цінними для вивчення механізмів розвитку нейродегенеративних процесів на клітинному рівні. [108].

Органотипові культури мозку чи гіпокампа широко використовуються у сучасних дослідженнях. Це культивовані шматочки (зрізи) мозкової тканини, що мають певні переваги, а саме:

- збереження природної життєздатності клітин та структури тканини, а саме, типів клітин та шарів, первинних міжклітинних зв'язків, синаптичної організації, розташування рецепторів, характерних для мозкової тканини *in vivo* [51, 207, 260, 286];
- під безпосереднім візуальним контролем, можлива локальна електрична чи хімічна стимуляція різних ділянок нервової тканини та окремих клітин (тіла, аксонів чи дендритів);
- можливі тонкі експериментальні маніпуляції зі зрізами.

В умовах культивування присутній прямий доступ до позаклітинного простору, що дозволяє з одного боку легко контролювати та стандартизувати умови життєдіяльності клітин і тканин (склад солей та метаболітів, рН, газове насичення та ін.), а з іншого – надає можливість дослідження прямого впливу на культури патологічних факторів та потенційно нейропротекторних речовин.

Об'єктом теперешнього дослідження були культивовані зрізи (органотипова культура) та дисоційовані клітини (дисоційована культура) гіпокампа щурів у нормі та за стандартизованих умов тимчасової аноксії/гіпоглікемії чи киснево-глюкозної депривації (КГД). Метою даної роботи було дослідження морфо-функціональних змін та особливостей міжклітинних взаємодій у органотипових і

дисоційованих культурах гіпокампа щурів після КГД та подальшої нормоксичної реоксигенації.

2.2. Виділення тканин та отримання культур

Усі експерименти виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Strasbourg, 1986), статті 26 Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" (від 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки.

Маніпуляції, пов'язані з вилученням тканинного матеріалу для отримання культур, а також наступні експериментальні процедури з культурами проходили з урахуванням правил роботи у стерильних умовах.

2.2.1. Культивування зрізів гіпокампа

Для одержання органотивної культури використовувались семиденні щури лінії Вістар. Культивування зрізів гіпокампа проводилося за методом Stoppini коли тканина розташована на межі поживного рідкого та газового середовища [86, 286].

Для виділення мозкової тканини використовували комбіноване середовище для виділення, яке містило:

- 50% мінімального поживного середовища MEM (Cat. № 41200-015, Gibco);
- 5 ммоль Tris (T-1378, Sigma);
- 2 ммоль NaHCO₃ (Cat. № 25080-060, Gibco);
- 12,5 ммоль Hepes (Cat. № 15630-056, Gibco);

- 15 ммоль D-глюкози (G-7021, Sigma);
- 25 % сольового розчину HBSS (Cat. № 14180-038, Gibco);
- 100 од./мл пеніциліну (Cat. 15140-122, Gibco), 100 мг/мл стрептоміцину (Cat. 26050-088, Gibco);
- 25% деіонізованої води.

pH середовища - 7,3.

Культивування проводили у 6-лункових планшетах, використовуючи додатково спеціальні вкладиші з напівпрониклою мембраною, яка забезпечує проходження розчинних речовин. На дно кожної лунки додавали 1 мл середовища культивування, змочуючи внутрішню сторону вкладишу.

Середовище культивування для зрізів мало такий склад:

- 50% мінімального поживного середовища MEM;
- 2,5 ммоль Tris;
- 2 ммоль NaHCO₃;
- 12,5 ммоль Hepes;
- 15 ммоль D-глюкози;
- 25 % сольового розчину HBSS;
- 100 од./мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину;
- 25 % кінської сироватки (Cat. № 26050-047, Gibco);

pH середовища - 7,2.

Щурів декапітували, мозок обережно видаляли з черепної коробки та перекладали в попередньо охолоджене середовище виділення. Сагітальним розтином через Sulcus Inter-hemisphericum мозок розділяли на дві півкулі. Відсікали таламус та базальні ганглії, розташовані над гіпокампом, знімали м'яку мозкову оболонку та виділяли гіпокамп. Далі робили поперечні зрізи гіпокампа використовуючи спеціальний прилад для нарізання тканинних зрізів - чопер (McIlwain tissue chopper, Англія). Товщина зрізів становила 300-

400 мкм. За допомогою обрізаної пастерівської піпетки зрізи переносилися до чашки Петрі з середовищем виділення. Під візуальним контролем за допомогою мікроскопа ретельно відбираються зрізи, що не мають ніяких ознак ушкодження для подальшого культивування. Відібрані зрізи розташовували на проникній мембрані по чотири в одній лунці 6-лункового планшету. Планшет ставили до CO₂-інкубатора зі збалансованою концентрацією CO₂ (5%) у повітрі та температурою 35°C. Середовище культивування замінювалося наступного дня та надалі двічі на тиждень. Розвиток культивованих зрізів контролювався з допомогою інвертованого світлового мікроскопа Zeiss Telaval 31. На 12-14 день зрізи набували стабільного стану і були готові для проведення експерименту. Візуально культивовані зрізи мали однорідну на просвіт та опалесцюючу фактуру (Рис. 2.1).

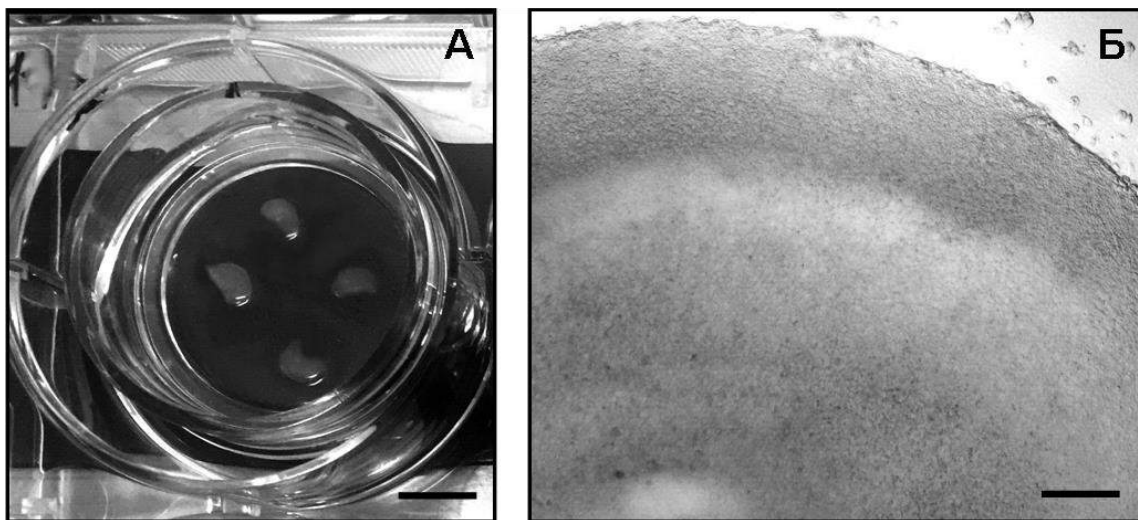


Рис. 2.1. Фото гіпокампальних зрізів на 12 день культивування. А – фото однієї з лунок 6-лункового планшету з зрізами, розташованими на поверхні полупрониклої мембрани вставки; масштаб – 5 мм. Б – фазово-контрасне зображення культивованого зрізу (наживо); масштабна лінія – 200 мкм.

У серії експериментів з культивуванням зрізів мозку новонароджених мишей використовували аналогічний протокол з деякими модифікаціями.

2.2.2. Виділення та культивування дисоційованих клітин гіпокампа

Дисоційовану культуру нейронів гіпокампа отримували з гіпокампа новонароджених щурів за методом описаним Мааг з співав [183]. Коротко, тканину гіпокампа подрібнювали, трипсинізували (10 хв.), ресуспендували пастеровською піпеткою та відокремлювали від поруйнованих клітин за допомогою центрифугування (200 g) у розчині Кребса з 20 ммоль Нерес та 0.3 % BSA. Клітини наносили на оброблені полі-L-лізином 8-лункові планшети зі скляним або пластиковим дном (15-20 тисяч клітин/см²) та культивували при 37°C в атмосфері з 5 % CO₂.

Середовище культивування для клітин містило (всі складові від Invitrogen, Sigma, США):

- 100% DMEM;
- 2 % B27;
- 20 ммоль/л HEPES;
- 0,5 ммоль/л Glutamax;
- 100 од./мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину.

pH середовища - 7,2.

Середовище культивування змінювали на другий день інкубації та далі двічі на тиждень. Протягом 12 днів нейрони в культурі стабілізувалися та утворювали синаптичні зв'язки між собою. На мікрофотографії показаний початковий вигляд дисоційованих гіпокампальних клітин та після 12-денного культивування, коли

відновлюється типова структура та взаємозв'язки між клітинами (Рис. 2.2, А, Б, відповідно)

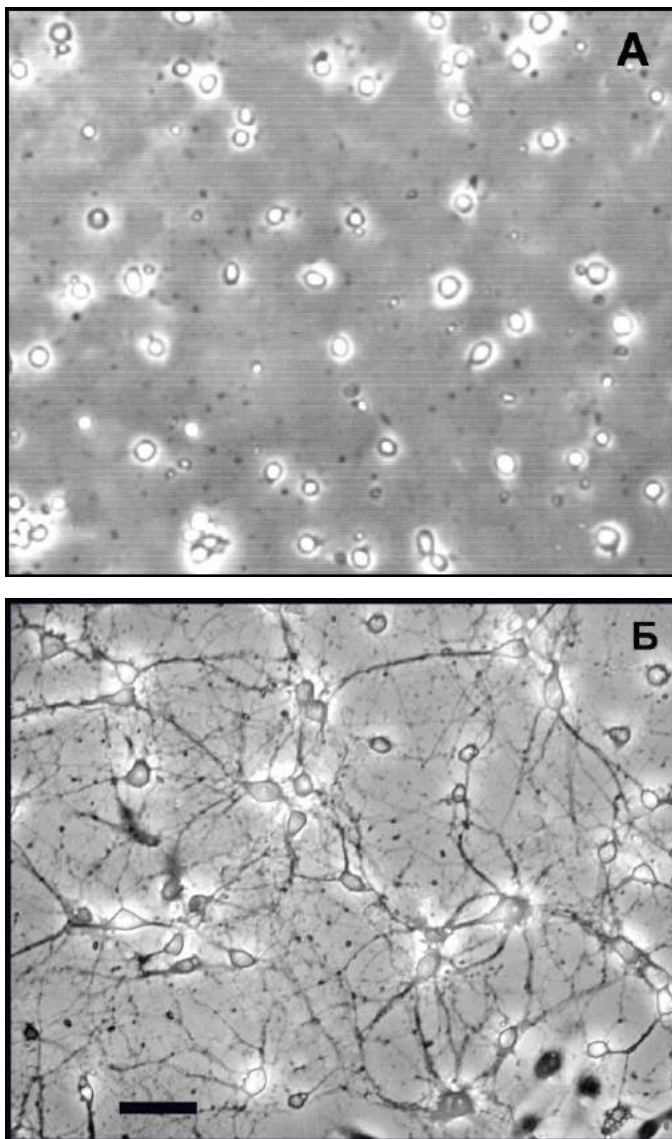


Рис. 2.2. Фазово-контрасне зображення культури дисоційованих гіпокампальних клітин на 2 та 12 день культивування (А і Б, відповідно); масштабна лінія – 200 мкм.

2.2.3. Отримання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з жирової клітковини GFP-позитивних мишей.

Підшкірна жирова клітковина мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном GFP була використана для

отримання ММСК. Клітинна суспензія культивувалась у повному поживному середовищі DMEM-LG, яке містило 15 % ФБС (HyClone, USA), антибіотики (пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1:100 незамінні амінокислоти (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі + 37 °C.

Фенотипічні характеристики ММСК визначали методом проточної цитометрії. До тестових зразків, які були переведені за допомогою розчину трипсину у стан суспензії, додавали антитіла проти поверхневих мембранних антигенів CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117, кон'юговані з флуорохромами (0.5 мкг/мл). Рівень флуоресценції виявляли за допомогою лазерного проточного цитофлуориметра-сортера. Визначали відносну кількість мічених флуорохромом живих клітин. Мультипотентні властивості МСК визначали при додатковому культивуванні зразків у спеціальних середовищах. Для кокультивування з органотиповими культурами використовували клітини 2-3 пасажів.

2.3. Проведення киснево-глюкозної депривації

2.3.1. Умови КГД

Для створення КГД використовували закриту термостатовану камеру, де кисень заміняли на азот, а середовище культивування на сольовий розчин без глюкози (натомість, для підтримки відповідної осмолярності розчину, додавали сахарозу, яка не метаболізується клітинами в культурі) та кисню.

КГД-розчин містив:

- 124 ммоль/л NaCl,
- 1.6 ммоль/л KCl,
- 2.5 ммоль/л CaCl₂,
- 1.5 ммоль/л MgCl₂,
- 24 ммоль/л NaHCO₃,
- 1.2 ммоль/л KН₂PO₄,
- 2 ммоль/л Аскорбинова кислота,
- 12,5 ммоль/л Hepes,
- 15 ммоль/л D-сахарози,
- 2,5 ммоль/л CaCl₂.

pH - 7,2.

КГД-розчин кип'ятили незадовго до проведення експерименту, для вивільнення з нього кисню.

Контрольний сольовий розчин містив 15 ммоль/л глюкози та був насичений киснем повітря.

2.3.2 Хід виконання КГД для культивованих зрізів гіпокампа

Перед КГД експериментальні культури відмивали у КГД-розчині від глюкози, яка входить у склад середовища культивування. Далі вкладиші з культурами переносили в чашку Петрі з 1 мл КГД-розчину та розміщали її без кришки у спеціальній термостатованій камері (+35°C), де в газовому середовищі кисень був замінений на азот. Через 10, 30 хв (в залежності від задачі) зрізи повертали до нормальних умов культивування на 1, 4 або 24 год (в залежності від задачі) – період нормоксичної реоксигенації. У вказані терміни досліджували стан культур з використанням методів, що будуть описані нижче.

Контрольні культури утримували 30 хв при температурі $+35^{\circ}\text{C}$ у насиченому киснем повітря сольовому середовищі з глюкозою.

2.3.3. Хід виконання КГД для культури дисоційованих клітин

Дисоційовані культури відмивали у КГД-розчині від глюкози. КГД проводили шляхом утримання планшетів з культурами без кришки під тонким шаром безкисневого та безглюкозного КГД-розчину у закритій термостатованій камері ($+35^{\circ}\text{C}$), де в газовому середовищі кисень був замінений на азот. Після 30 хв КГД культури повертали до нормальних умов культивування та надалі проводили тестування через 1, 4 і 24 год (в залежності від задачі) – період нормоксичної реоксигенації. Контрольні культури утримували 30 хв при температурі $+35^{\circ}\text{C}$ у насиченому киснем повітря сольовому середовищі з глюкозою.

Загальна схема експерименту зображена на Рис. 2.3.



Рис. 2.3. Схематичне зображення експериментального протоколу.

2.3.4. Проведення аноксичного прекондиціювання (АПК)

Серія експериментів з АПК проводилася на органотиповій культурі гіпокампа.

Хід виконання:

Культивовані зрізи переносили в чашку Петрі з 1 мл середовища культивування та розміщували у термостатованій камері, в якій повітря було замінено газовою сумішшю (95%NO₂/5%CO₂). Для оптимізації схеми експерименту проводили 1-, 2- чи 3-кратне АПК на 2 або 5 хв. Після АПК зрізи повертали до нормальних умов культивування. При 1-кратному АПК (2 чи 5 хв) зрізи досліджували через 12 год. За умов 2-кратного АПК (2 та 5 хв) через 12 год повторно проводилося АПК, і надалі досліджували через 12 год. 3-кратне АПК проводилося аналогічно. Через 12 год після АПК зрізи піддавали 30-хв КГД та проводили тестування через 1 і 4 год (Рис.2.4).



Рис. 2.4. Основна схема експерименту з АПК та КГД.

Контрольні культури утримували 30 хв при температурі +35°C у сольовому середовищі з глюкозою, насиченому киснем повітря.

2.4 Методи оцінки життєздатності органотипової чи дисоційованої культури гіпокампа

2.4.1. Вимірювання відносної кількості цитозольного ферменту лактатдегідрогенази у культуральному середовищі

Фермент ЛДГ у нормі знаходиться у цитоплазмі клітин, а при пошкодженні клітинної мембрани вивільнюється у зовнішнє середовище. Таким чином кількість ЛДГ у культуральному середовищі обернено пропорційні життєздатності культур [73].

Визначення змін відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі проводилося як для органотипових, так і для дисоційованих культур за допомогою kit G1780 (Promega, США) колориметричним методом для визначення ступеню пошкодження клітинних мембран. До його складу входять солі тетразолія блідо-рожевого кольору, які в присутності ферменту ЛДГ відновлюються і перетворюються в формазан, що має червоне забарвлення.

Після проведення експерименту з різними варіантами впливів в умовах КГД та без КГД для дослідження відбирали аліквоту культурального середовища з кожної лунки планшетів. Додавали рівний об'єм субстрату для визначення ЛДГ. Проби інкубували при кімнатній температурі в недосяжному для світла місці 30 хв. Далі додавали розчин, що зупиняв реакцію (0.1 % оцтова кислота). Оптичну щільність проб вимірювали за допомогою EIA Microplate Reader (Sigma) або спектрофотометру uniSPEC 2 (LLG, Німеччина) при довжині хвилі 492 нм. Контролем слугували: 1 – середовище культивування з лунки, де не було органотипової культури гіпокампа; 2 – середовище культивування з лунки, де знаходилися необроблені КГД культури.

Зміни відносної кількості ЛДГ виражали в умовних одиницях, що відповідали одиницям оптичної щільності розчину або у % від максимального пошкодження клітин органотипової культури гіпокампа. Для визначення максимального пошкодження клітини культивованих зрізів гіпокампа піддавали лізісу, розміщуючи їх на 10 хвилин в чашці Петрі з 1 мл лізуючого розчину, який входить до складу kit G1780. Далі відбирали для дослідження 50 мкл культурального середовища. Проби для визначення рівня ЛДГ в усіх випадках відбиралися в дублях та визначали середнє з двох значень.

2.4.2. Забарвлення культур трипановим синім

Після проведення експерименту життєздатність культивованих зрізів у ряді експериментів оцінювали за допомогою вітального барвника трипанового синього [219]. Відомо, що трипановий синій проходить через плазматичну мембрану клітин у разі її пошкодження та забарвлює компоненти цитоплазми у синій колір. Таким чином, кількість клітин, забарвлених трипановим синім, обернено пропорційна життєздатності культур.

Трипановий синій додавали до культурального середовища у кінцевій концентрації 0,2 %. Після відмивання у фізіологічному розчині зрізи фіксували 2,5 % формальдегідом та підраховували за допомогою інвертованого світлового мікроскопа “Zeiss Telaval 31” (збільшення $\times 200$) кількість забарвлених клітин у CA1 зоні культивованих гіпокампальних зрізів, розташованих у межах прямокутної зони фіксованого розміру – 4000 мкм².

2.4.3. Оцінка життєздатності та стану ядер у гіпокампальних клітинах за допомогою флуоресцентних барвників

2.4.3.1. Забарвлення йодидом пропідію (ПЙ)

Поглинання клітинами ПЙ використовувалось для оцінки рівня ушкодження клітин в культурі гіпокампальних зрізів [153]. ПЙ стійкий флуоресцентний барвник, що проникає в клітину в разі пошкодження плазматичної мембрани. Потрапивши в клітину ПЙ взаємодіє з ДНК та набуває червоної флуоресценції, у зв'язку з чим ядра пошкоджених клітин забарвлюються в червоний колір. ПЙ (Sigma) у кінцевій концентрації 2 $\mu\text{моль}$ додавали у середовище культивування на 10 хв необхідного терміну. Зображення отримували за допомогою стандартного флуоресцентного мікроскопа обладнаного родамінним фільтром (XSP-139A-TP, Китай) і цифровою камерою (Canon Power Short G-6). Кількість ПЙ-позитивних клітин в підраховували в межах площі фіксованого розміру та виражали у кількості забарвлених клітин у мм^2 .

2.4.3.2. Комбіноване забарвлення Хехстом/ПЙ

Подвійне забарвлення Хехстом 33342 і пропідіум йодид, які зв'язуючись з ДНК, набуваючи зеленого і червоного кольору, відповідно, використовували для прижиттєвої оцінки стану нейронів та їх ядер у дисоційованій гіпокампальній культурі [43]. Хехст 33342 вільно проходить через плазматичну мембрану живої клітин та забарвлює їх ядра. Інтенсивність забарвлення індекатує ступінь конденсації ядер. ПЙ забарвлює ядра тільки у разі пошкодження клітинної мембрани.

Культури інкубували 10 хв в присутності ядерних барвників Хехст 33342 та ПЙ у кінцевій концентрації 2 $\mu\text{моль/л}$, які додавали до

культурального середовища у необхідні терміни. Зажиттєво спостерігали наявність чи відсутність забарвлення клітин (збільшення – $\times 200$, селективні фільтри – 500-560 нм для Хехст 33342 та 600-640 нм для пропідіума йодиди) за допомогою стандартного флюорисцентного мікроскопа (XSP-139A-TP, China) і цифровою камерою (Canon Power Short G-6). Дані представлені як процентне співвідношення ушкоджених і неушкоджених нейронів.

2.5. Оцінка мітохондріальної активності у органотиповій та дисоційованій культурі гіпокампа

2.5.1. MTS/формазановий-тест

MTS-тест (Promega, Німеччина) дає можливість прижиттєво виявляти мітохондріальну активність, оскільки жовтий тетразолій MTS (MTS - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]) відновлюється до пурпурного водорозчинного формазанового продукту за рахунок роботи мітохондріальних ферментів.

Для проведення MTS-тесту культури відмивали фізіологічним фосфатно-сольовим розчином (HBSS, Sigma), інкубували з MTS-реактивом (з розрахунку 40 мкл/200 мкл середовища культивування) 40 хв при 37°C та колориметрично визначена оптичну щільність розчину при довжині хвилі 450 нм. Кількість формазанового продукту прямо пропорційна величині мітохондріальної активності у гіпокампальних культурах. Результати виражали в умовних одиницях, що відповідали одиницям оптичної щільності розчину або у відсотках по відношенню до контролю.

2.5.2. Оцінка функціональної активності мітохондрій методом забарвлення MitoTracker Orange

Для оцінки стану мітохондрій нами було використано метод забарвлення зрізів за допомогою флуоресцентного мітохондріального маркеру [49], який дозволяє визначити рівень мембранного потенціалу мітохондрій за інтенсивністю його флуоресценції. Зміни потенціалу мітохондріальної мембрани характеризує рівень функціональної активності мітохондрій.

Для мічення мітохондрій культивовані зрізи гіпокампа інкубувалися з MitoTracker Orange CMTRos (M7510, Invitrogen), що дифундує через плазматичну мембрану активних мітохондрій та акумулюється в них за рахунок формування тіольних кон'югатів з мітохондріальними білками. Після забарвлення культури фіксували, для подальшого кількісного аналізу.

Для отримання зрізів гіпокампа забарвлених MitoTracker (MT) проводили наступну послідовність дій:

1. Відмивали зрізи середовищем без сироватки
2. Проводили забарвлення зрізів Mitotracker Orange (кінцева концентрація 50 нМ, 30 хв. при температурі 37C)
3. Відмивали зрізи PBS – 2 рази по 5 хв.
4. Проведення забарвлення контролювали з допомогою інвертованого мікроскопа
5. Фіксували зрізи 4% параформальдегідом у фосфатному буфері протягом 30 хв.
6. Відмивали зрізи в PBS -2 рази по 15 хв.
7. Відділяли зрізи від підкладки

8. Переносили на предметне скельце і заключали у спеціальному середовищі, що призначене для візуалізації флуоресценції (Dako, Denmark)
9. Конфокальна мікроскопія.

Отримані препарати аналізували за допомогою конфокального мікроскопа FV1000-BX61WI (“Olympus”, Японія, magnification – $\times 600$)

Оцінювали відносні зміни мітохондріальної активності у CA1 зоні культивованих гіпокампальних зрізів через 1 та 4 год після КГД. Оцінювали пірамідні нейрони і гліальні клітини окремо. Інтенсивність флуоресценції вимірювалась через автоматичний розрахунок середнього значення напівтонів сірого у межах порога вимірювання за допомогою програми ImageJ. Результати виражалися як інтегральна щільність флуоресценції, яка дорівнює добутку інтенсивності флуоресценції та площі МТ (за виключенням інтегральної щільності фонові флуоресценції).

2.6. Електрофізіологічні дослідження

Умови та реєстрація збудливих постсинаптичних потенціалів (ЗПСП):

Гіпокампальні зрізи переносили в інкубаційну камеру в якій перфузувався насичений киснем ACSF зі швидкістю 2 мл/хв (22-24°C).

ACSF містив (реактиви Sigma, США):

- 12,4 ммоль NaCl;
- 0,16 ммоль KCl;
- 2,4 ммоль KH_2PO_4 ;
- 0,12 ммоль NaHCO_3 ;
- 0,2 ммоль Аскорбінова кислота;

- 2 ммоль $MgCl_2$;
- 2 ммоль $CaCl_2$;
- 1 ммоль Глюкоза.

Для реєстрації пластичності CA1 синапсів, здійснювали подразнення колатералей Шафера на рівні зони CA3 та відводили популяційні збудливі постсинаптичні потенціали у *stratum pyramidale* зони CA1 гіпокампальних зрізів (Рис. 2.5). Для реєстрації використовували позаклітинні скляні мікроелектроди (1-2 МО), заповненими ACSF, з використанням підсилювача патч-затиску (PC 501A, Warner Instruments Corp., Hamden, CT). Стимулюючі та реєструючі електроди поміщали на відстані приблизно 400 мкм один від одного.

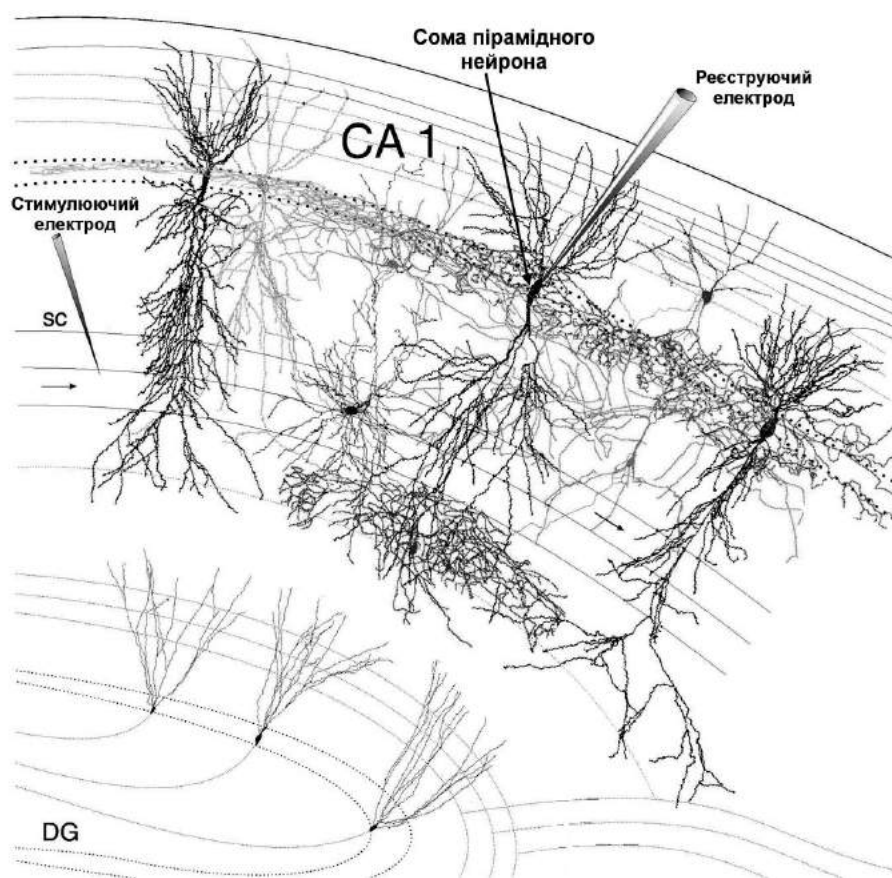


Рис. 2.5. Схематичне зображення розташування стимулюючого та реєструючого електродів (адаптовано з сайту <https://web.stanford.edu/group/maciverlab/hippocampal.html>).

Стимуляцією колатералей Шафера проводили за допомогою концентричного біполярного стимулюючого електроду (FHC Inc., Bowdoin ME), підключеного до гнучкого стимулятора (ISO-Flex, A.M.P Instruments, Jerusalem, Israel). Інтенсивність стимуляції була від 150 до 400 мкА. Стимуляція застосовувалася кожні 20 секунд при інтенсивності, достатній для виявлення 30% максимальної відповіді. Реєстрували сумарну відповідь пірамідних клітин, які одночасно генерують потенціали дії (ПД) – популяційні спайки (ПС). Протокол стимуляції для індукції синаптичної пластичності застосовувався після 10-15 хвилин стабільного запису базового рівня. Визначали амплітуду ПС CA1 синапсів у культивованих зрізах після експериментальних впливів.

Виявляли такі форми синаптичної пластичності як фасилітація (полегшення) чи депресія (уповільнення) синаптичної передачі внаслідок дії парної стимуляції. Для цього два стимули здійснювали з інтервалом імпульсу 25-500 мсек. Фасилітацію/депресію визначали як співвідношення $A2/A1$, де $A1$ та $A2$ є амплітудами ПС, викликаних першим і другим імпульсами, відповідно.

2.7. Імуногістохімічні методи досліджень

2.7.1. Імуногістохімічне забарвлення з використанням флуоресцентних маркерів та кофокальної мікроскопії

Для проведення імуногістохімічних (ІМГХ) досліджень культури фіксували 4% розчином формальдегіду 1 год, відмивали PBS та протягом 1 год обробляли 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну, для запобігання неспецифічного зв'язування антитіл. Для

кращого проникнення антитіл через клітинну мембрану використовували обробку у 0,3% розчині Triton X-100 або використовували перміабілізацію шляхом трикратного при -20°C заморожування/розморожування у спеціальному розчині для кріопротекції (20% DMSO, 2% гліцерин на PBS; з попереднім отриманням 60 хв). У суміші первинних антитіл тканини інкубували протягом 24 год при температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Залежно від поставлених завдань у роботі були використані антитіла, що вказані у Таблиці 1:

Таблиця 2.1

Назва	Виробник	Розведенн я
Mouse anti-NeuN, clone A60	Chemicon	1:500
Rabbit anti-NeuN	Millipore	1:500
Rabbit anti-GFAP	DakoCytomation	1:500
Chicken anti-GFAP	DakoCytomation	1:1000
Rabbit anti-Iba-1	Wako	1:1000
Mouse anti-Rip	Abcam	1:1000
Mouse anti-GAD-67	Millipore	1:1000
Rabbit anti-nAChR (d 1-208)	Lykhus O., 2010	1:200
Mouse anti- $\alpha 7$ nAChR	SigmaAldrich	1:500
Mouse anti-Cx36	Chemicon	1:200
Rabbit anti-GAP-43	Chemicon	1:500
Mouse anti-SPH	DakoCytomation	1:1000
Mouse anti-GlyR	Synaptic Systems	1:500
Mouse anti-HIF-1a	Abcam	1:500
Mouse anti-ГAMK, c A60	Sigma	1:200

Абревіатури використані у таблиці:

GAD67 - glutamic acid decarboxylase isoform-67,

$\alpha 7$ nAChR - $\alpha 7$ subunits of the nicotinic acetylcholine receptors,

Cx36 - homologous connexin 36 protein,

GFAP - glial fibrillary acidic protein,

NeuN - neuronal nuclear antigen,

Iba-1 - ionized calcium binding adaptor molecule 1,

Rip - receptor interacting protein,

GAP-43 – Growth Associated Protein,

SPH – synaptophysin,

GlyR – glycine receptor,

HIF – hypoxia induced factor,

ГАМК – γ -амніномасляна кислота.

Після утримання у первинних антитілах культури відмивали PBS та обробляли сумішшю відповідних вторинних антитіл протягом 1 год: мавпячі антимишачі Fab Alexa Fluor-555-кон'югованих (Invitrogen, США, 1:500) - червоний колір, мавпячі антикролячі Fab Alexa Fluor-488-кон'югованих (Invitrogen, USA, 1:500) - зелений колір, козячі антикурячі Fab Alexa Fluor-495-кон'югованих (Invitrogen, США, 1:500) - червоний колір.

Надалі відмивали культури PBS та заключали у середовищі для флуоресцентних препаратів (Дакко, Данія) під покривним склом. 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., USA) з цифровою фотокамерою поєднаною з комп'ютером.

В певних випадках проводили подвійне та потрійне ІМГХ забарвлення експериментальних культур чи комбіноване гістохімічне/ІМГХ, використовуючи послідовно прижиттєве ПЙ чи МТ забарвлення, а надалі, після фіксації культур, використовували відповідні антитіла. У першому випадку рахували кількість ПЙ-забарвлених клітин з загальної кількості ІМГХ-забарвлених клітин у мм^2 . У випадку МТ/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 МТ (за виключенням інтегральної щільності фонові флуоресценції). Кінцевий показник відповідає даним, нормалізованим до площі ІМГХ-забарвлення.

2.7.2. Імуногістохімічне забарвлення з використанням електронної мікроскопії проведене після закладання у епоксидну смолу

Після закладання органотипових гіпокампальних культур у епоксидну смолу (як буде описано нище у п.2.9.1) було проведено імуногістохімічне забарвлення з використанням анти-ГАМК первинних та вторинних мічених колоїдним золотом антитіл для ідентифікації на електронограмах гальмівних ГАМК-ергічних синапсів, як описано Buckmaster з співавторами [50]. Ультратонкі епоксидні зрізи, які розташовували на нікелевих сітках, покритих фармваром, промивали у Трис-Тритоновому (ТТ) буферному розчині, що містить 0,05 ммоль Трис і 0,1% тритону X-100 (pH, 7,6). Надалі зрізи інкубували в блокуючому розчині (10% нормальної козячої сироватки на ТТ)

протягом 1 год, і в первинних антитілах (мишачий моноклональний анти-ГАМК, Sigma, 1: 200 в ТТ з 2% коз.сиров.) протягом ночі, при 4 ° С. Після ретельної промивки сітки інкубували протягом 1 год анти-мишачим IgG, кон'югованим до 10 нм частинок золота (BB International, 1:40 в ТТ, що містить 1% BSA, рН, 8,2) і надалі тричі промивали ТТ. Після контрастування ураніл ацетатом і цитратом свинцю, ультра тонкі зрізи аналізували за допомогою електронних мікроскопів Philips CM10, Теснаї G212 («FEI Company», Нідерланди), обладнаного цифровою камерою Mega View III («Soft Imaging Systems», Німеччина) чи JEM100-CX (Jeol, Японія). Зображення мічених синапсів були зроблені при збільшенні 23000. Позитивно міченими вважалися синапси, де виявлялося щонайменше 3 електронно щільні частинки золота.

2.8. Флуоресцентний метод оцінки ефективності вивільнення нейромедіатора

Синаптичну активність гіпокампальних нейронів *in vitro* оцінювали у дисоційованих культурах на підставі вимірювання швидкості знебарвлення флюоресцентного барвника FM1-43 (Molecular Probes, США). Відомо, що FM1-43 обернено зв'язується з пресинаптичною мембраною та під час деполяризації шляхом ендцитозу поглинається синаптичними везикулами [106]. Після відмивання культур у ході вивільнення вмісту синаптичних везикул під час наступної деполяризації мембрани нейрона, FM1-43 втрачає флуоресценцію. Швидкість цього знебарвлення характеризує пресинаптичну активність та може бути кількісно виміряна. Завантаження барвником здійснювали посиленням спонтанного ендцитозу за допомогою гіперкалієвої деполяризації (70 ммоль/л KCl,

90 сек) у присутності 10 мкмоль/л FM1-43. Далі культури відмивали розчином HBSS з 1 ммоль/л Ca^{2+} 10 хв. FM1-43 флуоресценцію спостерігали при збільшенні $\times 400$ (селективний фільтр – 500-560 нм) та фіксували зображення, використовуючи цифрову камеру поєднану з комп'ютером. Проводили повторну гіперкалієву деполяризацію та через 120 сек фіксували зображення того ж поля зору відростків культивованих нейронів (Рис. 2.6).

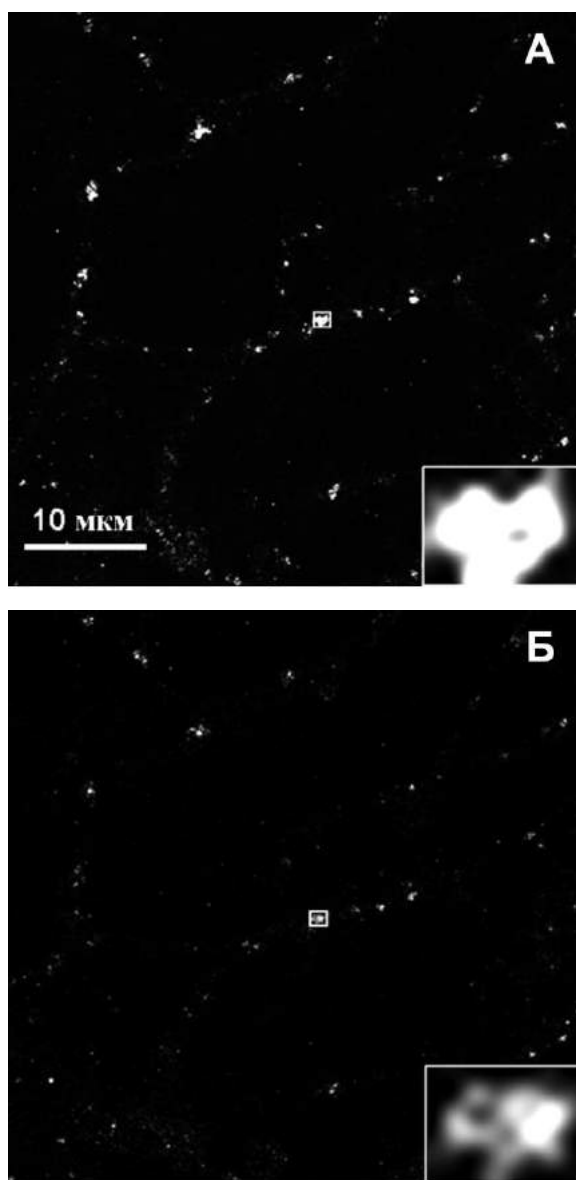


Рис. 2.6. Ілюстрація зміни інтенсивності флуоресценції при прижиттєвому FM1-43-забарвленні синапсів у дисоційованій культурі

до і після деполаризації (А і Б, відповідно); винесені вставки – збільшений одного фрагменту синаптичної зони, забарвленої FM1-43.

Зміна інтенсивності флуоресценції за фіксований час відповідає певній швидкості знебарвлення синапсів та характеризує ефективність їх функціонування. Результати оцінювали за допомогою програми ImageJ. Результати виражали як швидкість знебарвлення за 1 хв. Представлені дані є підсумком аналізу щонайменш 10 культур у кожній експериментальній групі.

2.9. Світлова та електрона мікроскопія

Світлова мікроскопія застосовувалась на багатьох етапах дослідження як: а) компонент іммуногістохімічного дослідження, б) проміжний етап електронно-мікроскопічного дослідження, в) засіб контролю стану культивованих клітин та зрізів гіпокампа. Для цього використовували світлові мікроскопи звичайної та інвертованої конфігурації.

2.9.1. Підготовка препаратів для світлового та електронно-мікроскопічного морфологічного аналізу

Заключення культивованих зрізів у смолу, отримання напівтонких та ультра тонких зрізів проводили за наступною процедурою [86]:

- фіксація в 2,5 % розчині глутаральдегіда та 2% розчині параформальдегіду на 0,1 моль/л фосфатному буфері (ФБ) з рН 7,4 протягом 1 год при кімнатній температурі;
- промивка у 0,1 моль/л ФБ, рН 7,4;

- фіксація в 1 % розчині OsO₄ на 0,1 моль/л ФБ протягом 1 год при кімнатній температурі;
- поступова дегідратація у спиртах (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 96 % абсолютний спирт) протягом 1 год;
- додаткова дегідратація у 100 % ацетоні протягом 1 год;
- заключення у епоксидну смолу (kit 45359, Fluka: Epon 812 (Cat. 45345) – 52 %; DDSA (Cat. 44160) – 18,5 %; MNA (Cat. 45347) – 29,3 %; DMP-30 (Cat. 45348) – 0,2 %) проводили ступінчасто протягом 2 год у суміші 100% ацетону та епоксидної смоли у співвідношенні один до одного. Дві години у співвідношенні один до трьох. 24 год органотипові гіпокампульні зрізи знаходилися у чистій епоксидній смолі;
- завершували заключення у смолу полімеризацією між двома пластиковими листами (плоске заливання) при 56°C протягом 48 год;
- прикріплення заключних у смолу препаратів до плоскої поверхні смоляних блоків за допомогою клею;
- Напівтонкі зрізи (1-2 μ m) нарізалися на ультрамікротомі Ultracut-E («Reichert-Jung», Австрія) або LKB Bromma 8800, Sweden;

Забарвлення напівтонких зрізів відбувалось розчином на основі 0,1 моль/л фосфатного буфера, який містив: 1 % толуїдинового, 0,5 % метиленового синього, 1 % тетраборнокислого Na. Крім того, вони слугували для виявлення розташування середньої частини радіального шару зони CA1 (*stratum radiatum CA1*) в якій синапси найбільш поширені (Рис.2.7).

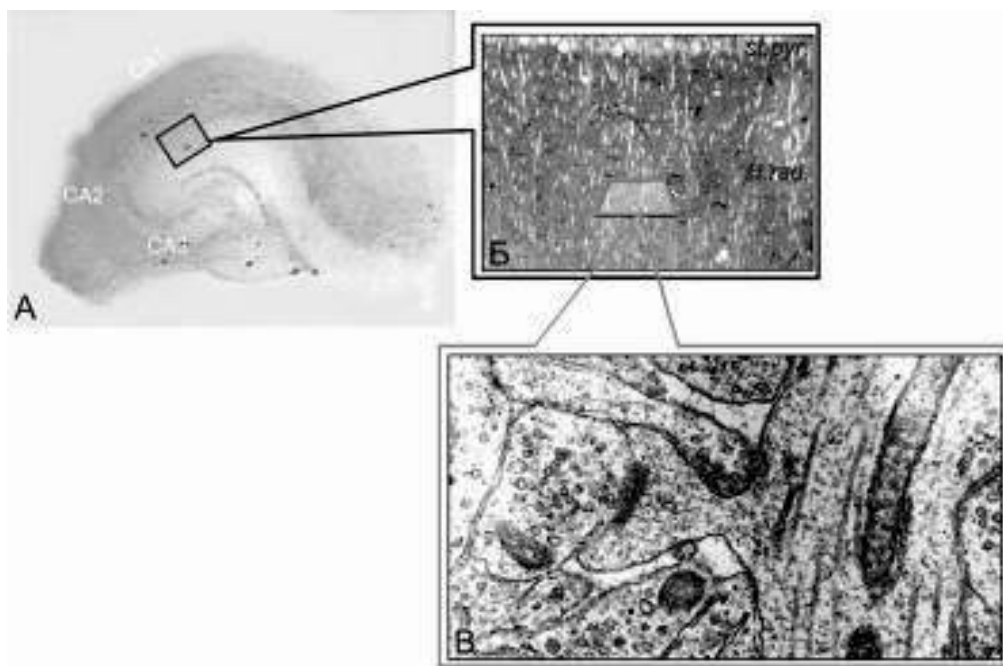


Рис. 2.7. Зображення локалізації зони інтересу. А – фіксований гіпокампальний зріз; Б – напівтонкий зріз гіпокампа, на якому визначають зону електронно-мікроскопічного дослідження; В – мікрофотографія відповідної зони.

Для електронної мікроскопії та 3D-реконструювання, серійні ультратонкі зрізи (60-70 нм завтовшки) були зроблені за допомогою ультрамікротому Ultracut-E («Reichert-Jung», Австрія) або LKB Bromma 8800 (Швеція) у відповідній зоні CA1 *stratum radiatum* гіпокампальних зрізів. Тонкі зрізи збирали на вкриті формваровою плівкою бленди або на спеціальні сітки та контрастували ураніл ацетатом і цитратом свинцю.

2.9.2. Морфологічний ультраструктурний аналіз та тривимірне реконструювання

Оцінку напівтонких зрізів проводили за допомогою світлового мікроскопа Zeiss Jena (збільшення $\times 400$). Підраховували кількість нормальних, конденсованих та набряклих нейронів у CA1 зоні культивованих зрізів гіпокампа.

Ультратонкі препарати аналізували за допомогою електронних мікроскопів Philips CM10, Теснаї G212 («FEI Company», Нідерланди), обладнаного цифровою камерою Mega View III («Soft Imaging Systems», Німеччина), JEM100-CX (Jeol, Японія) чи ПЕМ-125 (Суми) з відеокамерою DX 2, KAPPA. Цифрові фотографії були зроблені із збільшенням $\times 10000$ - 23000 в залежності від задач.

Для 3D-реконструювання збудливих, гальмівних синапсів та глії були зроблені цифрові серійні мікрофотографії. На основі цих зображень реконструювали відповідні структури з використанням програми Reconstruct (<http://synapses.mcg.edu>, США) [107]. На рис.2.8 показані основні етапи підготовки матеріалу.

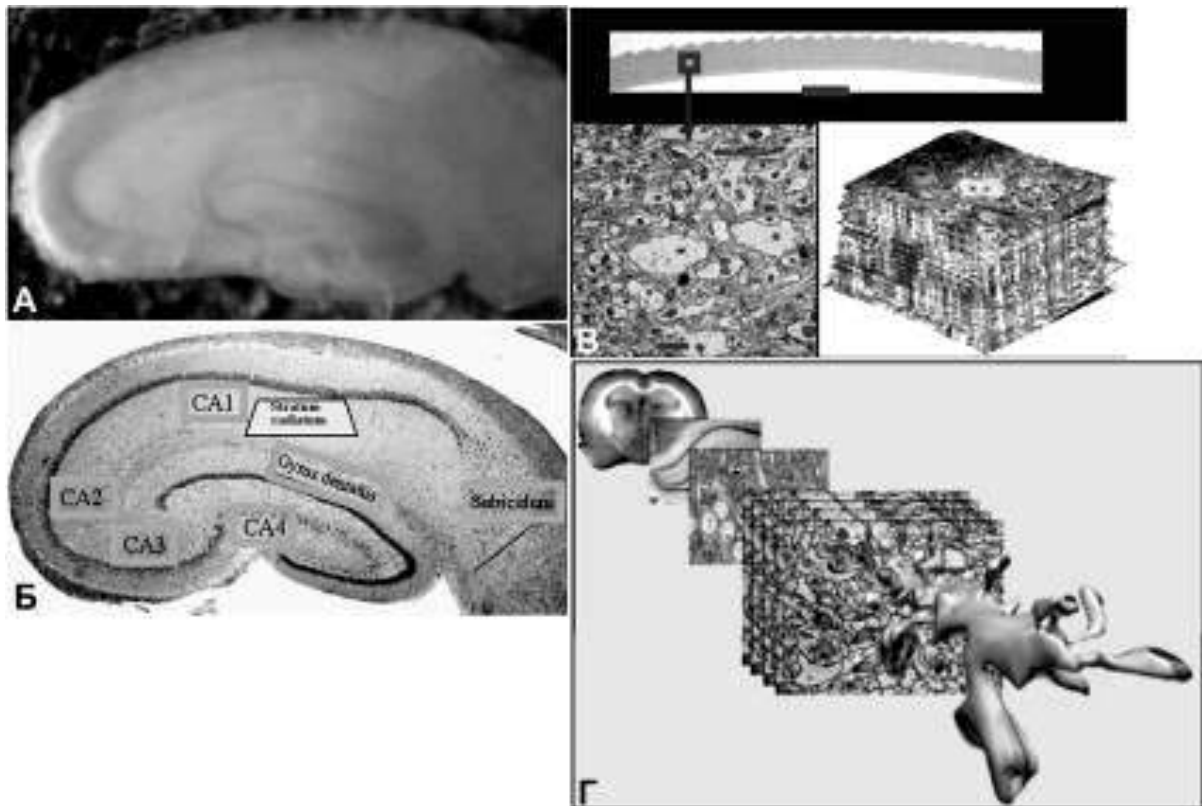


Рис. 2.8. Основні етапи отримання зображення 3D-реконструкції на основі наборів серійних тонких зрізів. А – вібраторний зріз гіпокампа; Б – фарбований, напівтонкий зріз тканини гіпокампа, на якому визначають зону майбутньої реконструкції; В – виготовлення серійних зрізів; Г – тривимірна реконструкція структур ділянки дендриту (адаптовано з <http://synapses.mcg.edu>).

Збудливі (асиметричні) та гальмівні (симетричні) синапси визначали за наявністю та формою постсинаптичної щільності (ПСЩ), навпроти якого знаходилось щонайменше 3 синаптичні везикули (СВ). Для подальшого аналізу випадковим чином було відібрано синапси на шипиках вторинних дендритів у збудливих синапсах пірамідних нейронів та гальмівні синапси на поверхні апікальної частини соми між пірамідними нейронами та інтернейронами. Було проаналізовано дві групи синапсів, класифікованих за конфігурацією ПСЩ. Прості, або

макулярні, синапси мали суцільну ПСЦ. Перфоровані синапси визначали за переривчастою ПСЦ (Рис. 2.9).

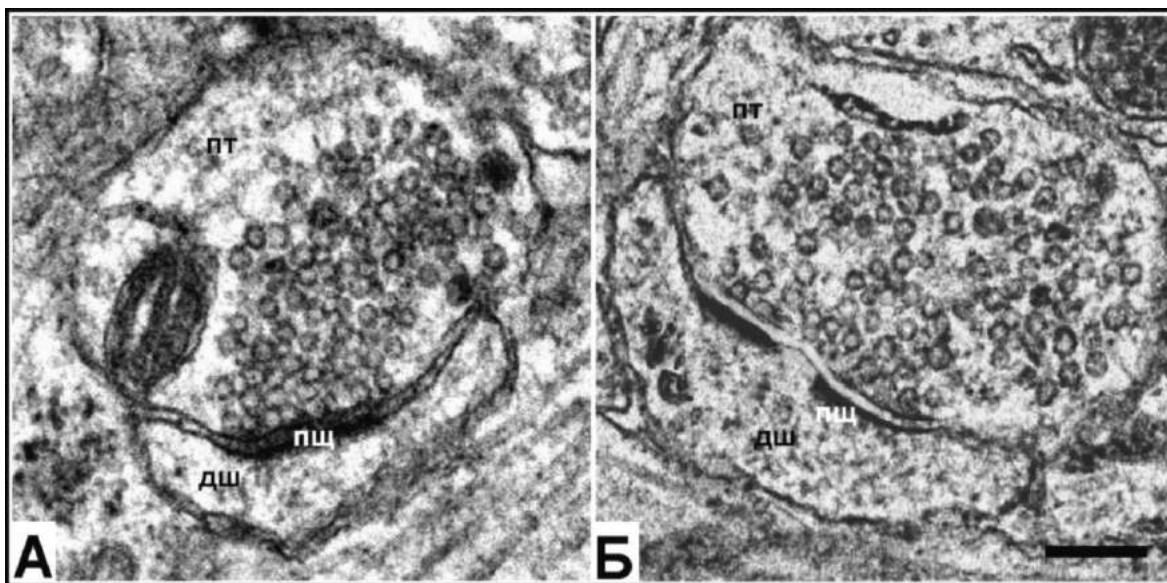


Рис. 2.9. Електронограми синапсів радіального шару зони CA1 гіпокампа з різною конфігурацією постсинаптичної щільності (А – простий, Б - перфорований). Позначення: дш - дендритний шипик, пт - пресинаптична терміналь, пц - постсинаптична щільність. Масштабна лінія = 200 нм.

Кожен синапс було ідентифіковано на декількох послідовних електронограмах, а для аналізу розподілу СВ було відібрано ті з них, на яких довжина ПСЦ була найбільшою. В експериментах було проаналізовано 300 синапсів, відібраних за критерієм наявності кальцієвих преципітатів. У кожній з експериментальних груп (контроль, 30 та 60 хвилин після КГД) було проаналізовано по 20 перфорованих та 30 простих синаптичних контактів.

З метою кількісного аналізу просторового розподілу СВ координати центрів профілів везикул та точок, що позначали профіль активної зони, визначали на цифрових мікрофотографіях за

допомогою програми UTHSCSA ImageTool версія 3 (Університет Техасу, США). Файли з координатами об'єктів обробляли за допомогою комп'ютерної програми LoClust [215], яка для кожної везикули дозволяє визначати відстань до активної зони синапсу (ВАЗ) та відстань до везикули-найближчого сусіда (ВНС) (Рис. 2.10).

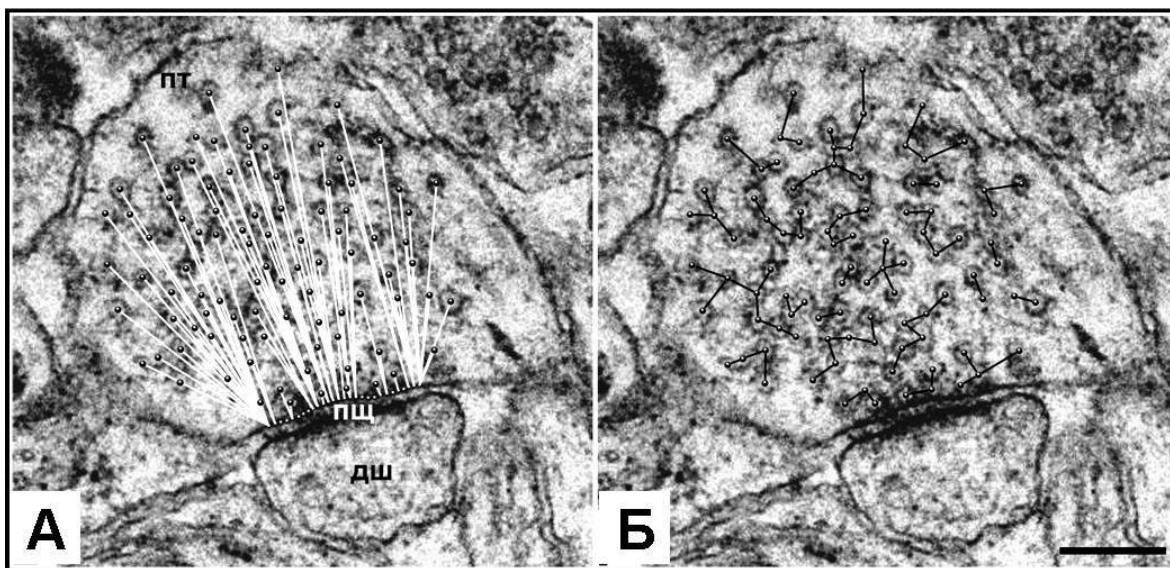


Рис. 2. 10. Електронограми синапсів радіального шару зони CA1 культивованих гіпокампальних зрізів. Зображення, що ілюструють метод аналізу просторового розподілу синаптичних везикул (А - визначення відстані до активної зони синапсу, Б – визначення відстані до везикули-найближчого сусіда). Масштабна лінія = 200 нм .

Щільність СВ визначали як кількість везикул на одиницю площі перерізу терміналі. Везикули, центр яких був розташований на відстані не більше ніж 70 нм від активної зони, вважали активними (готові до вивільнення медіатора та рецикуючі). Везикули, розташовані на відстані більше 70 нм, вважали резервними. Кількість везикул представлена у таблиці не містить похибки від середнього значення оскільки підраховувалася виходячи з загального пулу.

2.9.3. Забарвлення тіоніном

Тіонінове забарвлення використовували для візуалізації стану клітин CA1 зони у фіксованих органотипових культурах гіпокампа. Зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером, обезжирювали та гідратували за допомогою обробки градуїтованим рядом етанолових спиртів (50%, 70%, 96% протягом 2 хв у кожному), висушували при 37° С і забарвлювали протягом 30 сек у спиртовому (70 %) розчині 0,02% тіоніну (T-409, Fisher Scientific). Потім шматочки промивали протягом 1хв., використовуючи 70% та 96% етанол, висушували при 37° С, розміщували на предметних скельцях та покривали покрівними, заключаючи у суспензію Pertex (Leica Biosystems, США). Зображення знімали з роздільною здатністю 1744×1308, використовуючи конфокальний мікроскоп FluoView™ FV1000 (Olympus Inc., США) та фазово-контрастний об'єктив (60 ×).

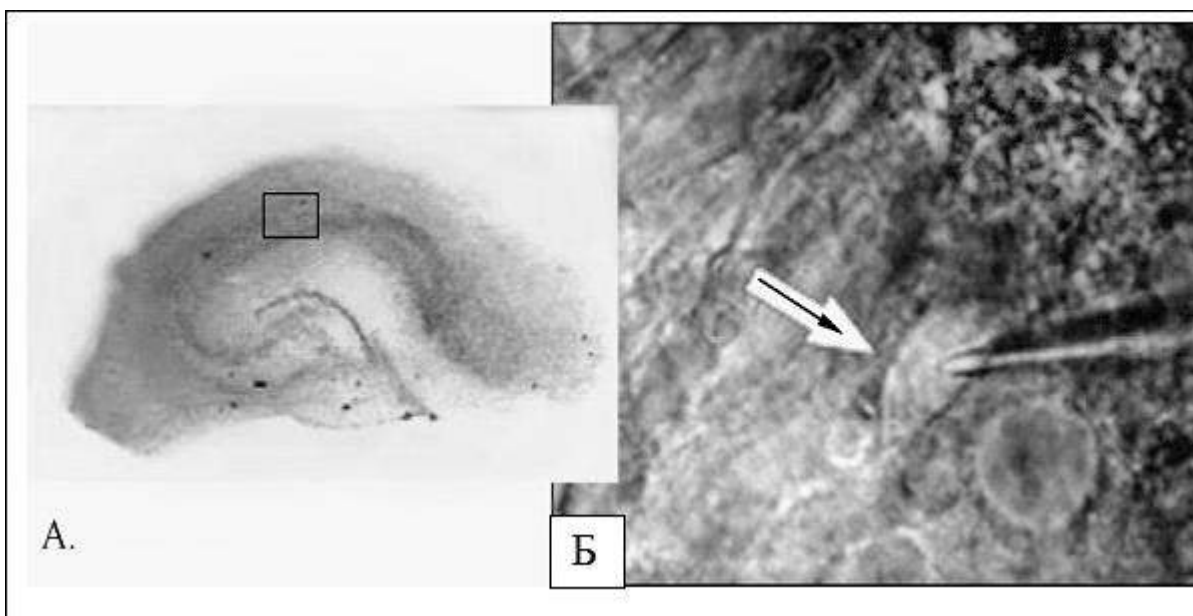
2.10. Проведення ПЛР-аналізу в реальному часі поодиноких CA1 пірамідних нейронів культивованих зрізів гіпокампа (Single-cell real-time RT-PCR)

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

Були використані специфічні інтронстягуючі праймери, комплементарні унікальним послідовностям нуклеотидів, які утворюються після вирізання інтронів під час сплайсингу матричної РНК (мРНК). Це дозволяло виключити можливість ампліфікації необхідного продукту протягом ПЛР з ядерної ДНК, а не з матриці, отриманої внаслідок зворотної транскрипції (ЗТ). ЗТ проводили за

допомогою зворотної транскриптази M-MLV (Promega, США) протягом 1 год при 37°C з використанням оліго-dT-праймерів і випадкових гексамерних праймерів. Отримана внаслідок ЗТ кодуюча ДНК (кДНК) піддавалася генспецифічній ПЛР-ампліфікації.

Клітина засмоктувалася, використовуючи мікроманіпулятор під видимим світлом мікроскопа (x200) (Рис. 2.11) в мікропіпетку, яка вміщувала 4 мкл внутрішньоклітинного розчину, і для проведення ЗТ переносилася у спеціальний буферний розчин, котрий містив у собі наступні компоненти (у мілімолях на літр): 50 Tris-HCl; 50 KCl; 4 MgCl₂; 40 дитриетол; 40 ОД суміш чотирьох нуклеотидфосфатів („Fermentas”, Литва); 0.2 мкг випадковий гексамерний праймер („Fermentas”, Литва); Зрізи були попередньо пофарбовані ПЙ, щоб уникнути екстракції ушкоджених клітин.



2.11. Зображення процесу виділення поодиноких нейронів гіпокампа А. Нативний органотиповий зріз гіпокампа забарвлений толуїдиновим синім Б. Екстракція нейрону СА1 зони за допомогою мікропіпетки.

Проби зберігалися при 4°C протягом 3-4 год, після чого одночасно до всіх зразків додавали 20 ОД М-MuLV зворотної транскриптази („Fermentas”, Литва), та інкубували проби протягом 4 год при температурі 42°C. Отриману таким чином одноланцюгову кДНК поодиноких клітин гіпокампа використовували для проведення двох раундів ПЛР із застосуванням інтронстягуючих праймерів для HIF та гену β-актину (внутрішній контроль) послідовності наведені у таблиці.

Таблиця 2.2.

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

Ген	Послідовність	ПЛР розм. прод.	Кат.№ ген. банку
HIF-1α	5'-AGA AAC CGC CTA TGA CGT G-3' 5'-CCA CCT CTT TTT GCA AGC AT-3'	301	AF057308
HIF-3α	5'-AGA GAA CGG AGT GGT GCT GT-3' 5'-ATC AGC CGG AAG AGG ACT TT-3'	301	NM022528
β-actin	5'-AAC CCT AAG GCC AAC CGT GAA A-3' 5'-TCA TGA GGT AGT CTG TCA GGT C-3'	300	NM031144.3
Neuron-specific enolase (NSE)	5'-TGT GGT GGA GCA GGA GAA GC-3' 5'-GAT GCA TCG GGA AGG GTC AG-3'	564	AF019973

Ампліфікаційна суміш вміщувала такі компоненти: 5 мкл п'ятиразового PCR-буферу з NH_4Cl ; 2.5 мМ MgSO_4 ; 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидфосфаті („Fermentas”, Литва); по 5 пМ кожного з праймерів для першого раунду або 20 пМ однієї з пар праймерів при проведенні другого раунду та 0.5 ОД рекомбінантної Taq-полімерази (Fermentas, Литва). Об'єм зразка доводили до 25 мкл деіонізованою водою.

При проведенні другого раунду ПЛР в окремі пробірки додавали по 4 мкл продукту першого раунду мультиплексної ПЛР для ампліфікації специфічних ферментів генів і використовували ті ж самі компоненти суміші. Перший раунд ампліфікації складався з 15 циклів з наступними етапами: денатурація – 94°C, 60 с ; приєднання праймерів – 58°C, 80 с; елонгація – 74°C, 60 с;

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

Продукт першого раунду ПЛР використовували для кількісної оцінки експресії відповідних генів за допомогою 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, США). Суміш для ампліфікації складалася з 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, США) та 30 пМ відповідних праймерів. Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації починалася після попередньої активації AmpliTaq ДНК-полімерази протягом 10 хв при 94°C та складалася з 40 циклів: денатурація - 94°C, 15 с, приєднання праймерів та елонгація - 60°C, 1 хв.

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

Ампліфікат розділяли в 2.5%-вому агарозному гелі, що вміщував бромистий етідій. Візуалізація та оцінка яскравості ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (170 В протягом 40 хв) проводилися за допомогою трансільюмінатора та програмного забезпечення ViTran („Біоком” РФ). Результати представлені в умовних одиницях.

2.11. Проведення кількісного ПЛР-аналізу в реальному часі тканини CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа

Для дослідження рівня експресії SERCA-2b, SERCA 3, PMCA1, PMCA2 проводилася полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі тканини CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа.

Зрізи гіпокампа переносилися в робочу зону під хірургічним бінокуляр, де під видимим світлом на збільшенні x7, відбиралася тканина CA1 зони. З допомогою пластикових піпеток тканина переносилася в пробірки, в яких містилося 0,3 мл розчину innuSOLV RNA (Analytic Jena, Германія) для наступного виділення РНК.

Виділення РНК: проби інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв; додавали 0,1 мл хлороформу і суспендували вміст пробірки на вортексі протягом 10 сек; інкубували на льоду 3-10 хв; центрифугували на 13 500 x g (14 000 rpm) при температурі 4° С 5 хв до розділення проби на фази: червона фаза на дні – органічна фаза, біла – середня фаза, і найвища –50 прозора, водна фаза; РНК знаходиться і найвищий прозорій водній фазі, ДНК та білки знаходяться в проміжній фазі. Водна фаза займає 60% загального об'єму проби; обережно відбиралася водна фаза в нову пробірку для центрифугування; додавали 0,15 мл ізопропанолу; інкубували пробу за температури 4° С 15 хв; центрифугували на максимальній швидкості за температури 4° С 10 хв.; обережно відбирали супернатант та додавали в пробірку 0,3 мл

75% етанолу, центрифугували 10 хв на 13 500 об. за хв.; пункт 10 повторювали двічі; відбирали 75% спирт та підсушували осад за температури 65° С 5-10 хв.; додавали 30 мкл деіонізованої води та суспендували пробу на вортексі 15-20 с. залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв, та ще раз суспендували; виділену РНК зберігали при температурі -70 ° С або використовували негайно. Концентрація та якість отриманої РНК вимірювалася за допомогою NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. USA).

Зворотня транскрипція проводилася з використанням M-MuLV зворотної транскриптази (див. розчини та реактиви, розчин №5 „Fermentas”, Литва). Отриману таким чином одноланцюгову кДНК тканин різних зон гіпокампа використовували для проведення кількісної реакції ПЛР у реальному часі із застосуванням праймерів для SERCA-2b, SERCA 3, PMCA1, PMCA2 та гену β -актину (внутрішній контроль), послідовності яких наведені у таблиці. (Таблиця 2.3)

Таблиця 2.3.

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

Ген	Послідовність	ПЛР р. п.	Кат.№ ген. Банку
SERCA2b ATP2A2	5'-AAACCCTCCTGCTCCCTGTC-3' 5'- GCTCTAGACCCAGACCACCAG-3'	90	AF043106.1
SERCA3 ATP2A3	5'-ACTCAGCCACCTGTCTCCTG-3' 5'- CCAGAGCTGTAGGGAGGACA-3'	109	NM012914.1
β -actin ACTB	5'-AAGTCCCTCACCTCCCAAAG- 3'5'-AAGCAATGCTGTACCTTCCC-3'	97	V01217.1
PMCA-1 ATP2B1	5'-ACGTTAACACACTAGCCGCA-3' 5'- AAGAACGCCATCTTGTCCGT-3'	83	NM053311.1
PMCA-2 ATP2B2	5'-CTCTGCTCCTGAGGAAACCTTA-3' 5'-GATGAGGGTTAGCTGGTAGACG-3'	101	NM012508.5

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

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

2.12. Вимірювання концентрації малонового діальдегіду (МДА) в культуральному середовищі.

Активність перекисного окислення ліпідів оцінювали по накопиченню в культуральному середовищі одного з його кінцевих продуктів – МДА – колориметричним методом в мікромодифікації. Принцип методу полягає в тому, що при високій температурі в кислому середовищі МДА реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою з утворенням забарвленого триметинового комплексу. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації МДА, що відповідає ступеню активності процесу перекисного окислення ліпідів [337].

Хід виконання:

Для дослідження в скляну пробірку відбирали 800 мкл культурального середовища з кожної лунки. Контролем слугували: 1 – середовище культивування з лунки, де не було органотипової культури гіпокампа; 2 – середовище культивування з лунки, де знаходилися необроблені КГД культури. В кожену пробірку додавали 400 мкл суміші, що містила: 0,4 % тіобарбітурової кислоти, 10 % трихлороцтової кислоти, 0,25 Н НСІ. Проби ретельно перемішували та кип'ятили 45 хвилин. Після охолодження у проби додавали 1200 мкл бутанолу та ретельно перемішували протягом 30 секунд. Суміш центрифугували при 500 g протягом 10 хвилин; 200 мкл аліквоти переносили в 96-луночний планшет для вимірювання оптичної густини за допомогою EIA Microplate Reader (Sigma, США) при довжині хвилі 450 нм. Проби для вимірювання концентрації МДА в культуральному середовищі в усіх випадках відбиралися в дублях. Зміни кількості МДА у культуральному середовищі виражали в одиницях екстинції.

2.13. Статистичний аналіз результатів

Представлені у роботі експериментальні дані є результатом щонайменш трьох незалежних експериментів. Статистична обробка і опрацювання результатів 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). Результати характеризувалися нормальним розподілом, що визначали за допомогою тесту Шапіро-Вілکا. Імовірність індукування ДП була оцінена за допомогою тесту Фішера. Цифрові дані надані як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього арифметичного (SEM). Вибірки порівнювали, використовуючи Tukey-тесту (ANOVA) або t-критерій Стюдента, а відмінності вважалися достовірними при $p < 0,05$. На діаграмах вірогідні зміни щодо контролю позначені «*», щодо КГД – «#». Число “n” вказано у підписах до рисунків і відповідає кількості вимірів у кожній експериментальній групі.

2.14. Діючі речовини

- AP5 (к.к. – 100 мкмоль) – антагоніст глутаматних рецепторів
- DPD – блокатор пролілгідроксилази
- FGL – NCAM міметик
- LNT – інгібітор зв’язування PS1 і Syt1
- МК-801 (к.к. – 10 мкмоль) – блокатор глутаматних рецепторів
- SU5402 – блокатор FGF рецепторів
- U-74389G (к.к. – 25 мкмоль) – лазароїдний інгібітор перекисного окислення ліпідів

- Габазин - блокатор ГАМК-рецепторів
- Карбенексалон (CBX) – блокатор електротонічних контактів
- Метилликаконитин (MLA) – антагоніст $\alpha 7$ -субодиниці нікотинових ацетилхолінових рецепторів

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Обґрунтування предмету дослідження

Найбільш критичним для нормального функціонування мозку є постачання нервових клітин киснем і глюкозою. Мозкові патології, зокрема ішемія, крім специфічних в кожному випадку проявів, супроводжуються порушенням кровообігу та киснево-глюкозним дефіцитом, що призводить до пошкодження нервових клітин [168, 184, 210]. У разі киснево-глюкозного дефіциту, певний час клітини здатні зберігати життєздатність, а загибель нервових клітин має відстрочений характер. Деякий час ендogenousні механізми орієнтовані на адаптацію до змінених умов, а надалі на відновлення клітинного і тканинного гомеостазу чи утилізацію пошкоджених клітин [242]. Здатність різних клітин мозку протистояти киснево-глюкозному дефіциту різниться і великою мірою обумовлена рівнем мітохондріальної активності [255]. Вивчення і розуміння механізмів розвитку нейродегенерації та ендogenousної нейропротекції при киснево-глюкозному дефіциті, зокрема пов'язаних з міжклітинними взаємодіями, націлені на пошук нових потенційних фармакологічних мішеней для запобігання пошкодження нервових клітин.

У гіпокампі розрізняють такі основні типи клітин: пірамідні нейрони, інтернейрони та гліальні клітини (астроглія, мікроглія, олігодендроцити). Найбільш уразливими до КГД є нейрони [4, 200], гліальні клітини є більш стійкими [201,312] і мають значний потенціал у підтримці фізіологічної стабільності та здатні модулювати функції найбільш спеціалізованих, орієнтованих на передачу сигналів нервових клітин [103, 347].

Ступінь ушкодження та можливість запобігти загибелі нервових клітин залежать від інтенсивності і тривалості ішемічного впливу та часу постішемічного періоду [234, 235]. Відомо, що тривала ішемія призводить до сильних та швидких ушкоджень або загибелі нервових клітин; у випадку короткострокової ішемії нейродегенеративні зміни бувають менш виражені але розвивається відстрочена загибель клітин. Показано, що пірамідні нейрони CA1 зони гіпокампа, найбільш чутливі і вразливі до гіпоксії та гіпоглікемії [143, 150], але багато питань щодо динаміки і механізмів розвитку ішемічного пошкодження та запобігання загибелі нервових клітин залишаються відкритими. Відомо про значну модулюючу роль інтернейронів у функціонуванні пірамідних нейронів за нормальних умов і при киснево-глюкозному дефіциті [88, 130, 154, 343].

Теперішня робота орієнтована на аналіз морфо-функціонального змін різних типів гіпокампальних клітин та деяких механізмів міжклітинних взаємодій у гіпокампі при моделюванні ішемічного ушкодження з використанням довгострокових культур гіпокампа і КГД. В залежності від завдань, що ставилися в експериментах, об'єктом була культури гіпокампальних зрізів або культури дисоційованих клітин гіпокампа, оскільки кожен варіант має певні переваги, що описані у п.2.1. Дослідження акцентовані на розуміння клітинних і молекулярних механізмів, що задіяні у забезпеченні життєздатності і функціональної активності гіпокампальних клітин за нормальних умов і при КГД.

3.2. Характеристика гіпокампальних культур та оцінка їх стану за нормальних умов та після киснево-глюкозної депривації

3.2.1. Органотипова культура гіпокампа

Протягом 12 днів гіпокампальні культури обох типів очищувалися від клітин, ушкоджених під час виділення і посадки та досягали стабільного стану. Мікроскопічний аналіз тканини гіпокампальних зрізів показав, що типова топографія клітинних шарів і зон, які характерні для гіпокампа у природних умовах, зберігається у культивованих зрізах (Рис. 3.1). При перпендикулярному розрізі культури на ділянці CA1 зони видно, що пірамідні нейрони розташовуються в середині відповідної зони, а з усіх сторін їх оточують клітини глії. Тонкий шар гліальних клітин прилягає до напівпроникної мембрани та вкриває поверхню зрізу. Вони забезпечують фіксацію культивованих зрізів на мембрані і виконують трофічну та захисну функції.

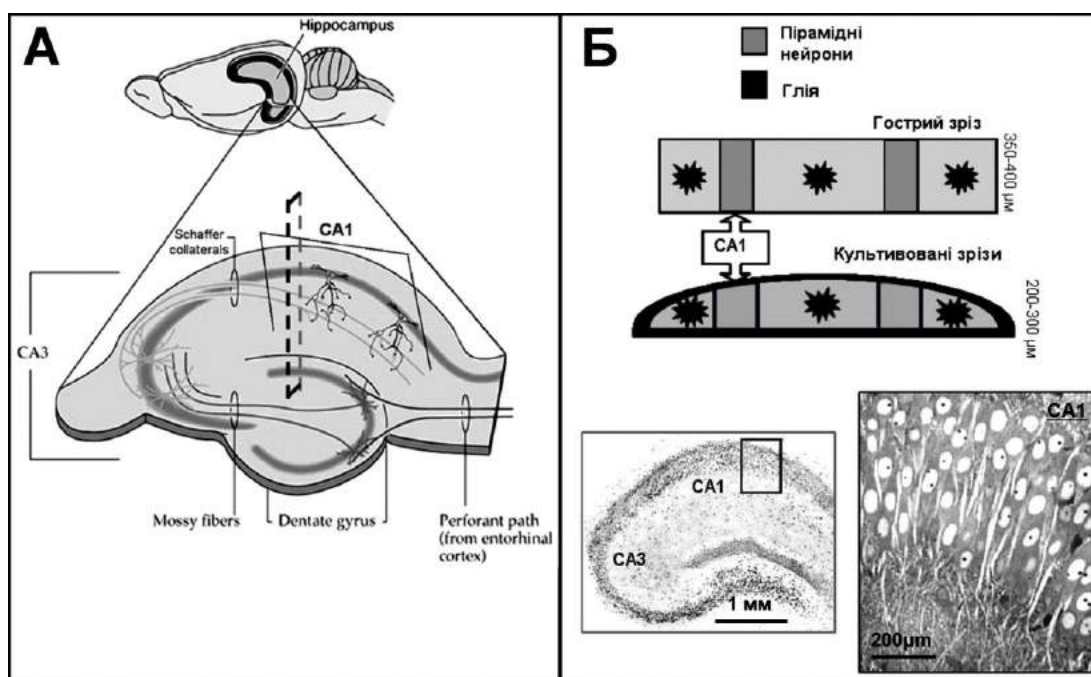


Рис. 3.1. Схематичне зображення зрізів гіпокампа: А - адаптовано з сайту <https://brainstuff.org/blog/how-does-ltp-work-at-the-hippocampal-synapse>; Б – автентичні зображення.

Були розроблені критерії оцінки стану культур, оптимізована та стандартизована схема експерименту для вирішення поставлених завдань. 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.

3.2.2. Оптимізація умов киснево-глюкозної депривації

3.2.2.1 Оцінка життєздатності культивованих зрізів гіпокампа при КГД різної тривалості

Киснево-глюкозна депривація була використана для створення умов, які мають місце при ішемії мозку. Проведена серія експериментів по визначенню оптимальних умов КГД і створення придатної моделі для подальших досліджень.

З цією метою культивовані зрізи утримували в умовах КГД 10, 30 та 60 хв, після чого повертали їх до нормальних фізіологічних умов і продовжували культивування (нормоксична реоксигенація). Оцінку життєздатності органотипової культури зрізів гіпокампа проводили відразу після КГД, а також через 1, 4 і 24 год після КГД за допомогою вимірювання кількості цитозольного ферменту ЛДГ у культуральному середовищі та забарвлення зрізів вітальним барвником трипановим синім.

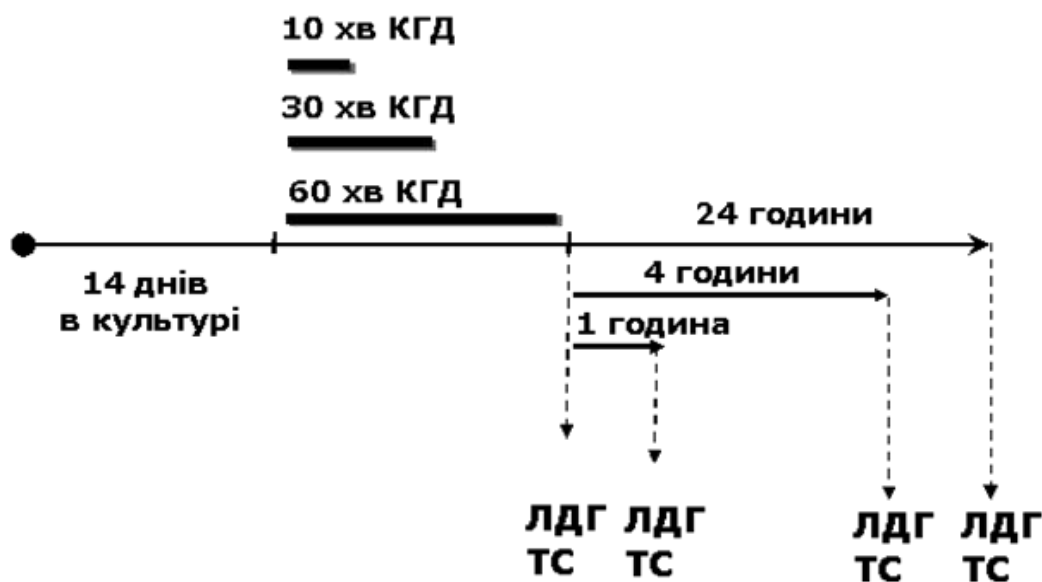


Рис. 3.2. Схема експерименту по визначенню оптимальних умов КГД та критеріїв оцінки культур для моделювання ішемічного ушкодження.

Зміни кількості ЛДГ у культуральному середовищі виражали в % від максимального пошкодження клітин органотипової культури гіпокампа. Відразу після КГД рівень ЛДГ у культуральному середовищі достовірно не відрізнявся від контролю. Через одну годину реоксигенації кількість ЛДГ в культуральному середовищі від зрізів, що піддавалися впливу 10-хвилинної КГД, був несуттєво вищий у порівнянні з контрольними. Прогігом 4 та 24 год ушкодження розвивалося і відносна кількість ЛДГ досягала $32,1 \pm 8,2$ ($p < 0,05$) та $60,1 \pm 1,5$ ($p < 0,001$) відсотків, відповідно. Вплив 30- та 60-хвилинної КГД проявлявся вже протягом першої години. Рівень ЛДГ складав $45,4 \pm 9,6$ ($p < 0,01$) і $62,1 \pm 9,9$ ($p < 0,01$), відповідно. Через 4 та 24 год показники кількості ферменту значно збільшувалися: до $60,8 \pm 12,4$ і $90,5 \pm 1,9$ ($p < 0,001$) після 30-хв КГД; та до $64,2 \pm 8,7$ і $98,6 \pm 1,4$ ($p < 0,001$) після 60-хв. Таким чином результати продемонстрували чітку залежність ушкодження клітин від часу депривації і реоксигенації (рис. 3.3).

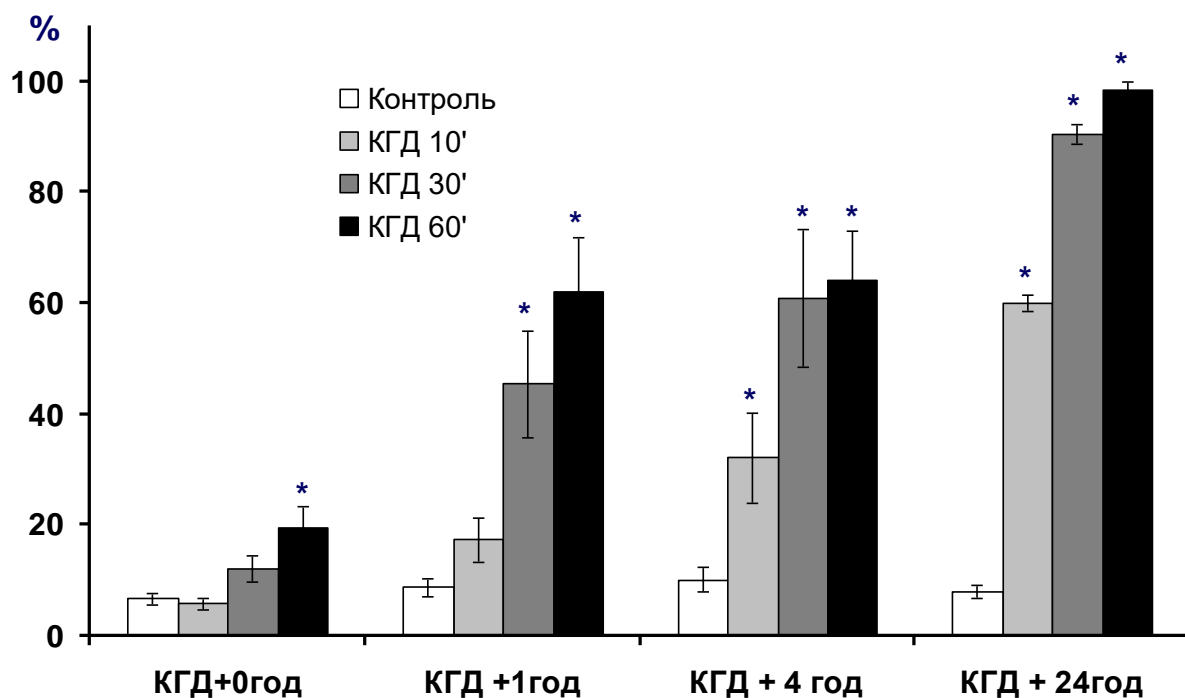


Рис. 3.3. Відносна кількість ферменту ЛДГ в культуральному середовищі органотипових зрізів гіпокампа в умовах КГД різної тривалості (10, 30 та 60 хв) та подальшої реоксигенації (1, 4 та 24 год); $n=10$, * – $p < 0,05$ до контролю.

Аналогічні тенденції мали і результати підрахунку числа ушкоджених клітин при забарвленні вітальним барвником трипановим синім. У контрольних зрізах кількість забарвлених клітин була незначною та майже не змінювалась за час експерименту. Відразу по закінченні КГД не виявлено достовірної різниці в кількості пошкоджених нейронів. Проведена кількісна оцінка динаміки їх ушкодження (Рис. 3.4).

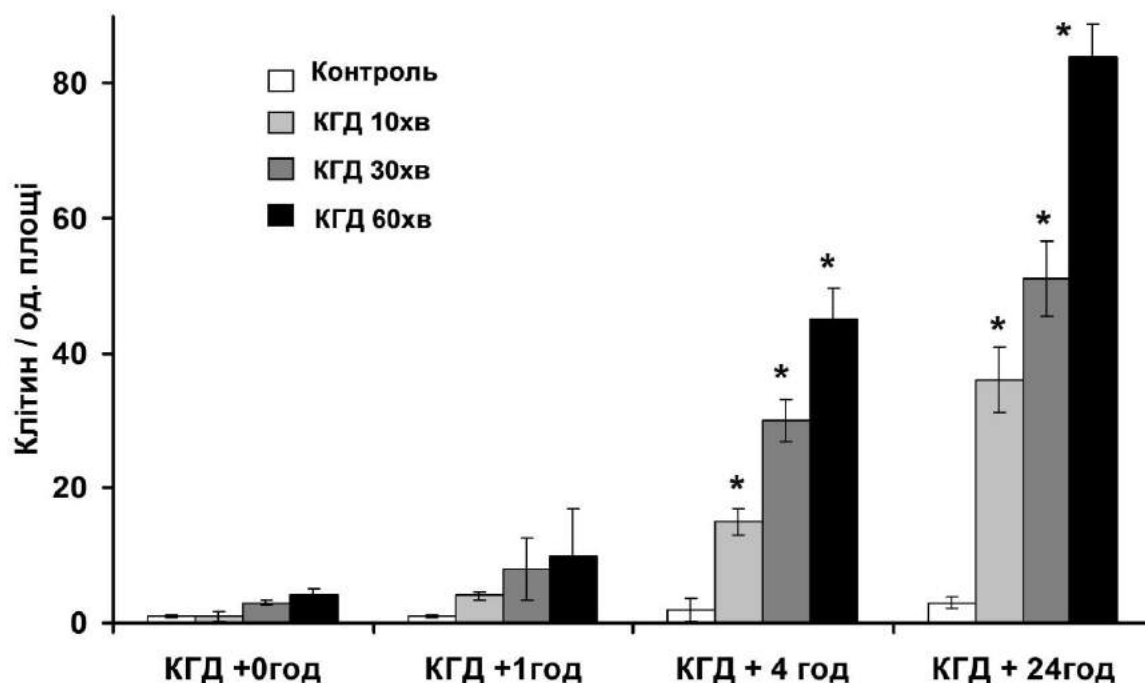


Рис. 3.4. Кількість забарвлених трипановим синім CA1 нейронів гіпокампа в умовах КГД різної тривалості (10, 30 та 60 хв) та подальшої реоксигенації (1, 4 та 24 год);
 $n=10$, * – $p < 0,05$ до контролю.

Поступове збільшення кількості клітин, забарвлених трипановим синім та рівня цитозольного ферменту ЛДГ в культуральному середовищі свідчить про порушення з часом цілісності клітинних мембран.

Така експериментальна модель є адекватною для вивчення механізмів розвитку ушкодження нервових клітин в умовах нестачі кисню та глюкози, що спостерігається при ішемії мозку, і може бути застосована для тестування нейропротективних засобів. У подальших експериментах використовували найбільш придатну, у цих межах, схему експерименту, яку обирали емпірично, виходячи з методологічних особливостей.

3.2.2.2. Життєздатність нервових клітин у СА1 та СА3 зонах культивованих зрізів гіпокампа при КГД

За допомогою альтернативного до трипанового синього ПЙ-зabarвлення показано, що клітини саме пірамідної СА1 зони найбільш уразливі до КГД. Проаналізована кількість ПЙ-зabarвлених клітин у СА1 та СА3 зоні гіпокампальних зрізів після 30-хв КГД та подальшої нормоксичної реоксигенації. У контрольній серії експериментів наявність ПЙ-позитивних клітин була незначною, а їх кількість не перевищувала 5 % від загальної. Протягом 24 год кількість зabarвлених клітин значно зростала (Рис. 3.5). Пошкоджуючий ефект розвивався поступово в обох зонах. Найбільш вираженими були зміни у СА1 зоні культивованих зрізів, що вказує на більшу чутливість СА1 нейронів, по відношенню до СА3.

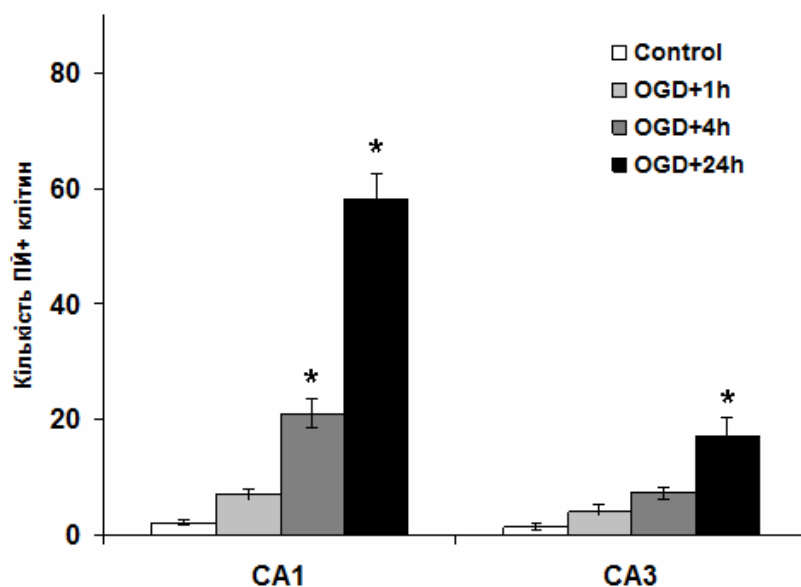


Рис. 3.5. Кількісна оцінка життєздатності нейронів СА1 та СА3 зон культивованих зрізів гіпокампа за нормальних умов та в умовах 30 хв КГД 1-, 4- та 24-годинної реоксигенації, $n=10$, * – $p < 0,05$ до контролю.

Таким чином, в органотиповій культурі пірамідні нейрони, як і в умовах організму, є також найбільш вразливі до нестачі кисню і глюкози. У подальших дослідженнях основна увага приділялася змінам, які відбуваються саме у CA1 зоні гіпокампальних зрізів.

3.2.3. Оцінка життєздатності культивованих дисоційованих гіпокампальних клітин при КГД

Для дослідження механізмів функціонування нервових клітин та особливостей розвитку їх ушкодження у патологічних умовах, широко використовуються культури дисоційованих нервових клітини. Така модельна система надає більше можливостей для спостереження окремих нейронів та вивчення міжклітинних взаємозв'язків, оскільки при довготривалому утриманні в культурі відновлюються нейронні відростки і синаптичні контакти. Тимчасове видалення з середовища кисню та глюкози моделює умови подібні тим, що виникають при ішемії мозку. Метою даної серії досліджень була оцінка змін життєздатності культивованих гіпокампальних клітин за умов 20-хв КГД та подальшого періоду нормоксичної реоксигенації.

Після 12 днів культивування нервові клітини гіпокампа стабілізувалися, відновлювали свої відростки і синаптичні контакти (Рис. 3.6 а) та ставали функціонально активними.

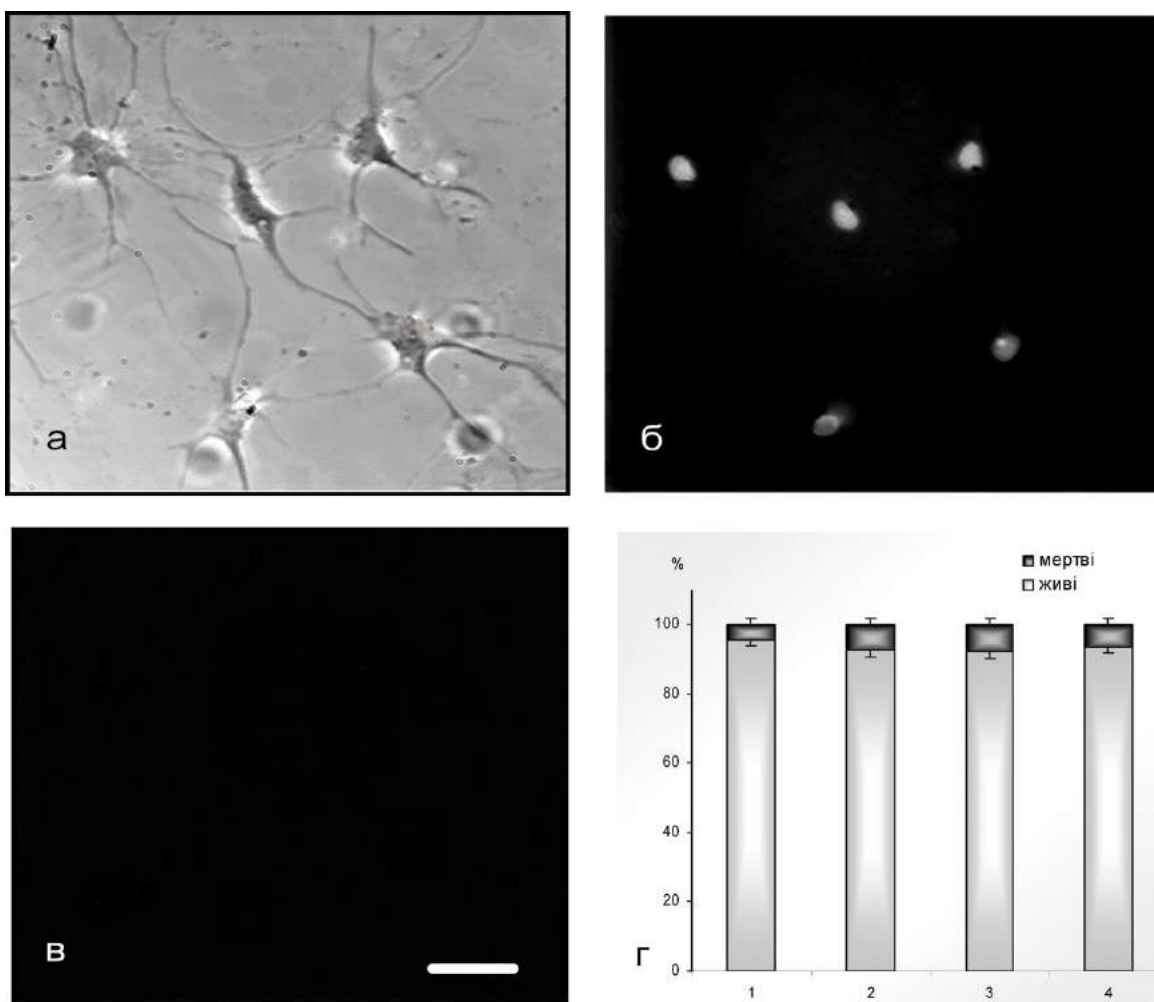


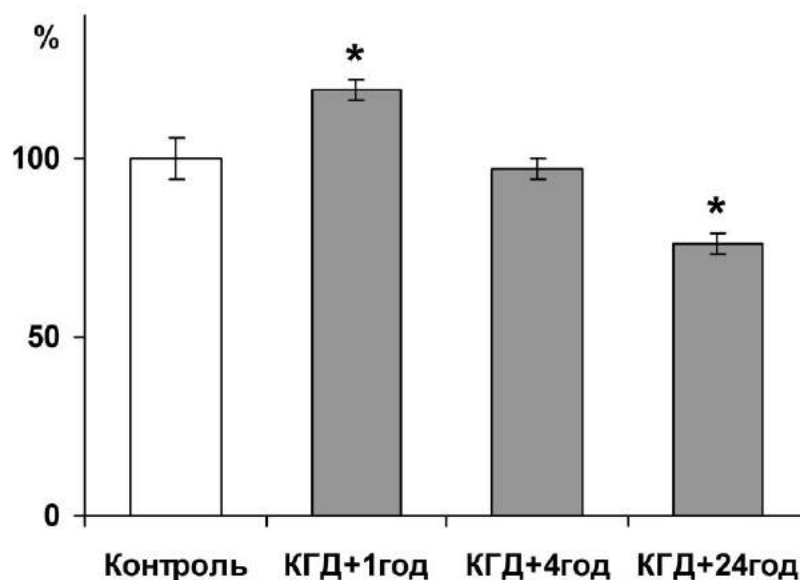
Рис. 3.6. Життєздатність нервових клітин у культурі дисоційованих гіпокампальних клітин після 20-хв КГД в умовах подвійного одночасного прижиттєвого забарвлення Хехстом 33342 пропідіумом йодідом: а – фазово-контрасне зображення, б – зображення нейронів, забарвлених Хехстом 33342, в – забарвлення пропідіумом йодидом (а, б, в – одне поле зору), г – діаграма, що відображає кількість живих і мертвих нейронів у гіпокампальній культурі після 20-хв КГД та 0, 1, 4 і 24 год нормоксичної реоксигенації (стобчики 1, 2, 3, 4 відповідно), $n = 8$. Масштабна лінія – 100 мкм.

Забарвлення інтактних культур барвником Хехст 33342 показало, що клітини розташовані рівномірно і мають нормальні неушкоджені

ядра (Рис. 3.6 б). Проведена оцінка життєздатності гіпокампальних дисоційованих культур, акцентуючись на нейронах, які ідентифікували за морфологічними ознаками. Забарвлення пропідіумом йодиду в цих умовах практично не виявляло забарвлених нейронів, що свідчить про стабільність та високу життєздатність культивованих клітин (Рис. 3.6 в, 3.6 г). За нормальних умов кількість забарвлених пропідіумом йодидом клітин з конденсованими ядрами складала $4,4 \% \pm 1,6 \%$. Після короткотривалої (20 хв) КГД ці показники не мали статистично достовірних відмінностей від контролю і складали $7,3 \% \pm 1,9 \%$, $7,9 \% \pm 1,9 \%$ та $6,5 \% \pm 1,7 \%$ від загальної кількості клітин через 1, 4 і 24 год після КГД, відповідно. Виходячи з цього можна сказати, що в умовах нашого експерименту не виявляється сильно виражених нейродегенеративних змін, тобто після 20-хвилинної КГД клітини здатні підтримувати свою життєздатність. Хоч у цих умовах нейрони зберігали цілісність мембран, нестача кисню і глюкози викликала суттєві функціональні зміни, про які йдеться далі.

3.2.4. Оцінка мітохондріальної активності органотипових та дисоційованих культур гіпокампа після КГД за допомогою MTS-тесту

Проведена оцінка загальної мітохондріальної активності культур після 30-хв КГД. Виявлено певні особливості реакції різних типів культур при аналогічних умовах експерименту. Спостерігалось збільшення цього показника у культивованих зрізах у період першої години після КГД (Рис. 3.7), який суттєво знижувався у 4 год термін і залишався зниженим через 24 год культивування після 30-хв КГД.



*Рис. 3.7. Зміни мітохондріальної активності (MTS-тест) культивованих зрізів гіпокампа щурів після 30-хвилинної КГД. Результати виражені у % від середнього значення в контролі; $n = 10$, * – $p < 0,05$ до контролю.*

Цей ефект можна трактувати декількома шляхами. По-перше, з літературних даних відомо, що церебральна ішемія викликає швидку активацію гліальних клітин [14, 136], отже збільшення загального рівня метаболізму у культивованих зрізах може відбуватися за рахунок активації глії. По-друге, КГД індукує процеси апоптозу, що потребує енергії [307]. Крім того, показано, що при аноксії-гіпоглікемії відбуваються значні пластичні перебудови у терміналях нервових клітин [133, 207, 216], для чого також потрібна енергія. Одже, у нашому випадку протягом першої години після КГД у органотиповій культурі, де зберігаються стабільні та стійкі міжклітинні зв'язки, клітини активно функціонують і це супроводжується підвищенням загальної мітохондріальної активності, яка зберігається на відносно високому рівні і у 24-годинний термін.

На відміну від органотипових, у дисоційованих гіпокампальних культурах, де нановоутворені міжклітинні взаємзв'язки менш стійкі, спостерігалось уповільнення метаболізму через 1 та 4 год після КГД (Рис. 3.8). У 24-годинний термін цей показник певною мірою відновлювався.

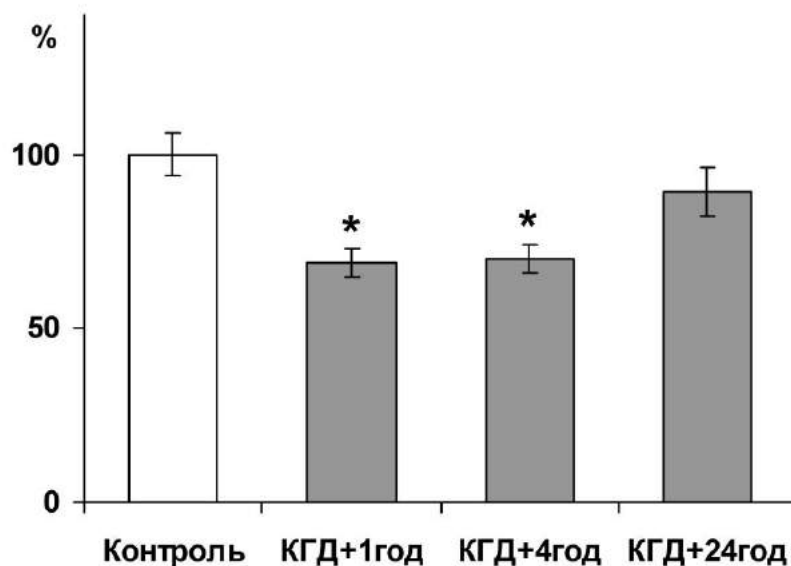


Рис. 3.8. Зміни мітохондріальної активності (MTS-тест) у дисоційованій культурі гіпокампа після 30-хвилинної КГД. Результати виражені у % від середнього значення в контролі; $n = 10$, * – $p < 0,05$ до контролю.

Надалі будуть розглянуті деякі молекулярні механізми, які певною мірою допоможуть трактувати описані особливості змін мітохондріальної активності у різних типах гіпокампальних культур.

3.2.5. Морфологічні зміни у пірамідній CA1 зоні гіпокампальних зрізів після КГД

Функціональні зміни за нормальних та патологічних умов мають певні морфологічні кореляти [43, 214]. Мікроскопічний аналіз напівтонких зрізів органотипових культур гіпокампа показав, що через 1 год не спостерігається значних морфологічних змін, через 4 год деяка кількість нейронів мали конденсовану цитоплазму та ядро, суттєві структурні зміни пірамідних клітин зони CA1 виявляються через 24 год після 30 хв КГД (рис. 3.9). Ушкодження CA1 нейронів культивованих зрізів гіпокампа у більшості проявлялося як конденсація ядер і цитоплазми, що є ознакою апоптичних процесів, та меншою мірою, як набряклість клітин, що є ознакою некротичних процесів.

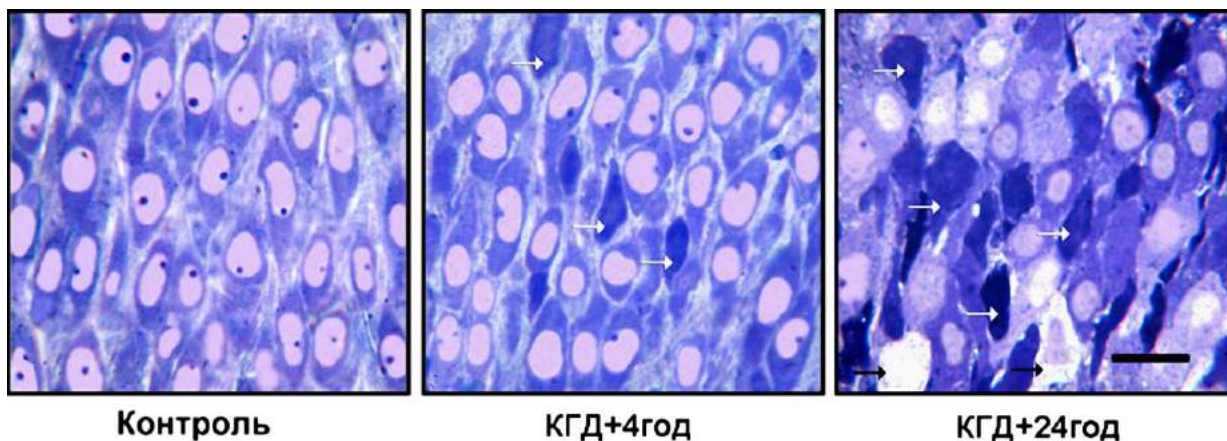


Рис. 3.9. Ефекти КГД на морфологічні ознаки пірамідних клітин у культивованих зрізах гіпокампа (напівтонкі зрізи тканини, залитої у епон). Репрезентативні зображення зони CA1 культивованих зрізів гіпокампу. Машиабна лінія – 50 мкм. Відмічені темні конденсовані (біла стрілка) та набряклі (чорна стрілка) пірамідні клітини

Кількісний аналіз напівтонких зрізів також показав, що морфологічні зміни пірамідальних клітин СА1 зони культивованих гіпокампальних зрізів виявляються не відразу, а у віддалені терміни (Рис. 3.10). За першу годину реоксигенації після КГД кількість нормальних СА1 нейронів становила $79,62 \pm 0,3$ відносно загальної кількості клітин у зоні підрахунку ($97,35 \pm 0,88$ у контролі, $p < 0,001$), кількості конденсованих клітин збільшувалася з $2,65 \pm 0,88$ у контролі до $18,04 \pm 0,3$ після КГД ($p < 0,001$), з'являлася незначна кількість набряклих клітин. Після 4 год реоксигенації зміни у співвідношенні різних типів клітин були ще більш виражені: $25,49 \pm 3,6$ - нормальні ($p < 0,001$), $58,83 \pm 1,59$ - конденсовані ($p < 0,001$) та $15,68 \pm 1,64$ - набряклі ($p < 0,01$) СА1 нейрони. Через 24 год культивування після КГД, спостерігалось збільшення на $65 \pm 8\%$ кількості конденсованих клітин, та на $10 \pm 5\%$ - кількості набряклих клітин.

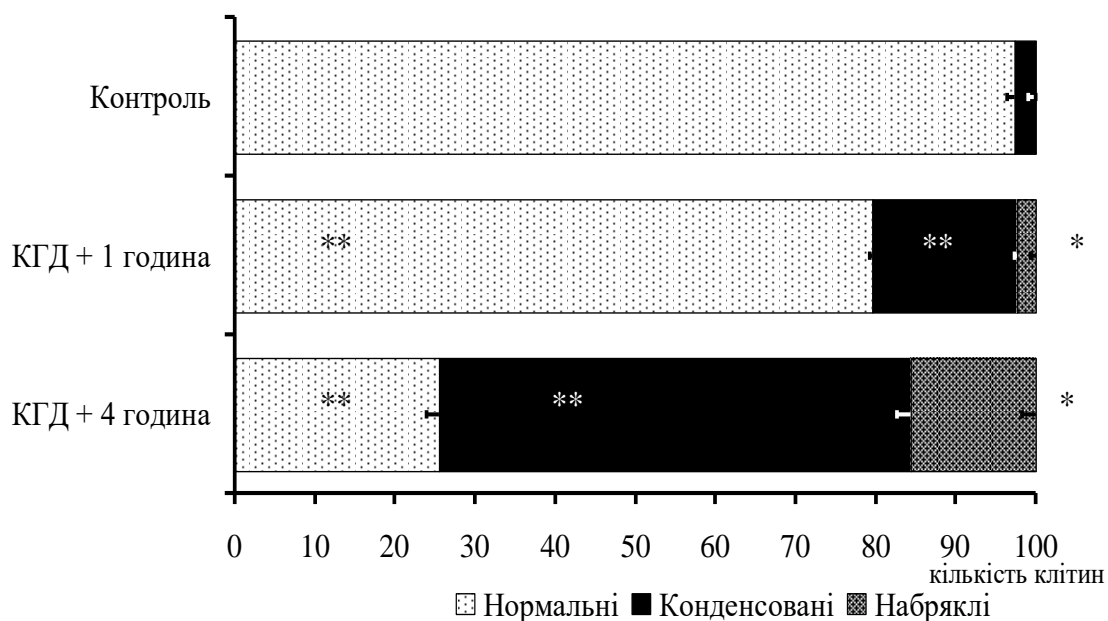


Рис. 3.10. Аналіз співвідношення нормальних, конденсованих та набряклих СА1 нейронів зрізів гіпокампа після КГД;

$n = 10$, * – $p < 0,01$ до контролю, ** – $p < 0,001$ до контролю.

Описані морфологічні зміни вказують на те, що у наших експериментальних умовах переважає більш фізіологічний апоптичний тип загибелі клітин. Електронно-мікроскопічні дослідження культур, що піддавалися КГД, виявив різні дегенеративні структурні зміни соми СА1 пірамідальних клітин. Найбільш поширено була проявлена конденсація клітин, набряк клітин спостерігався доволі рідко. У конденсованих клітинах була затемнена та ущільнена цитоплазма, зменшені мітохондрії, конденсовані і фрагментовані ядра (Рис. 3.11,Б). У набряклих нейронах спостерігалось набухання і вакуолізація цитоплазми, деструкція мітохондрія та аксонних терміналей (рис. 3.11,В).

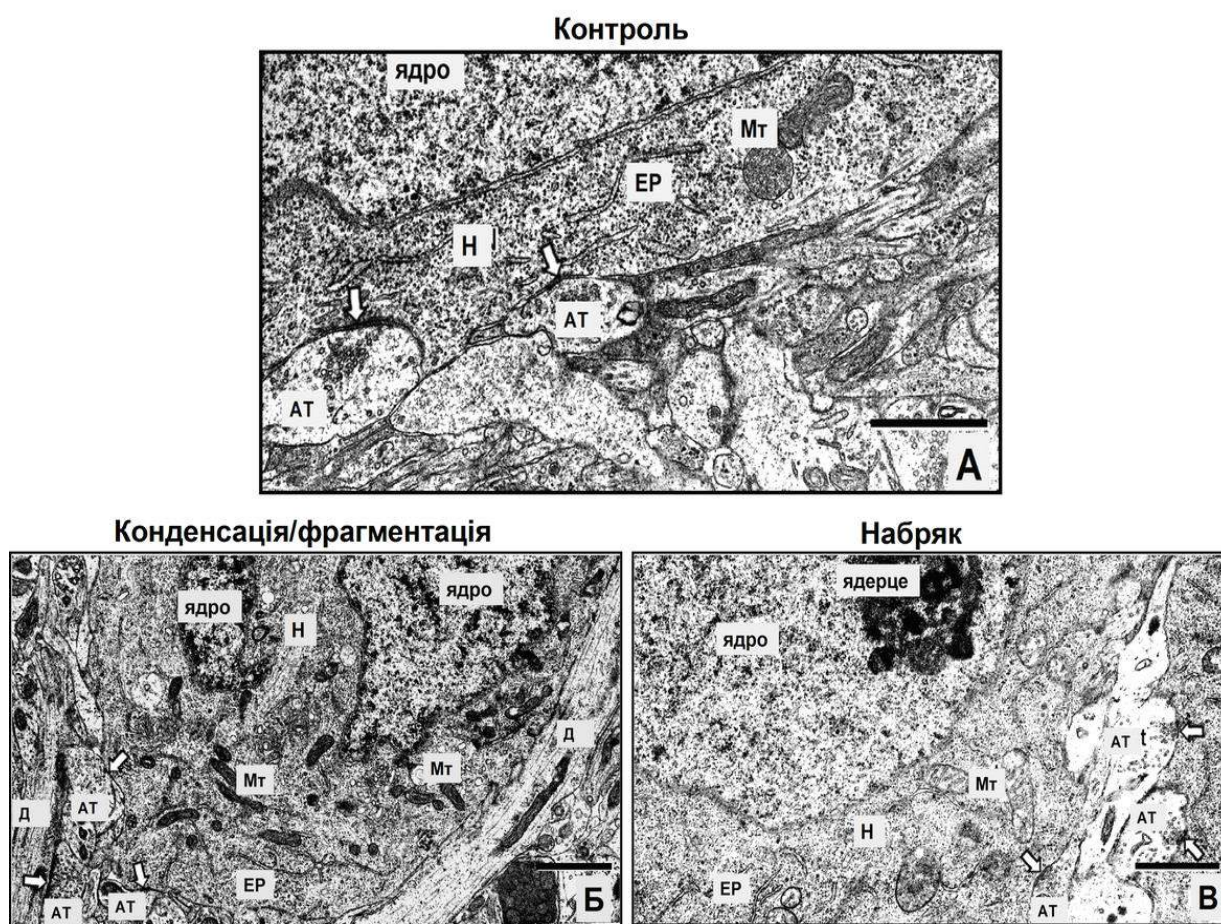


Рис. 3.11. Електронно-мікроскопічні фотографії соми пірамідального нейрону СА1 зони гіпокампальних культур у контролі (А) та через 24 год після КГД: (Б) конденсація – темна цитоплазма, конденсоване і фрагментоване ядро, численні конденсовані мітохондрії, (В) набряк – просвітлена цитоплазма та ядро, численні набряклі мітохондрії та аксонні термінали навколо соми. Скорочення: Н – сома нейрону; АТ – аксонна терміналь; Д – дендрит; Мт - мітохондрії; ЕР - ендоплазматичний ретикулум; стрілки вказують на синаптичні контакти. Масштабна лінія – 1 мкм.

Одже, отримані морфологічні дані з використанням культивованих гіпокампальних зрізів демонструють, що КГД-індукований розвиток ушкодження СА1 нейронів має поступовий характер. Достовірні зміни спостерігаються через 1 год реоксигенації та стають більш вираженими через 4 год.

3.2.6. Особливості життєздатності різних типів гіпокампальних клітин у культивованих зрізах після КГД

Тканина гіпокампа включає такі основні типи клітин: пірамідні нейрони, інтернейрони, астрогліальні і мікрогліальні клітини та олігодендроцити. Вони функціонально спеціалізовані, знаходяться у тісній взаємодії і мають різну чутливість до киснево-глюкозного дефіциту [143, 168, 259]. Використана нами модель культивованих зрізів дозволила провести деференційовану оцінку структурних та функціональних змін у різних типах гіпокампальних клітин в умовах КГД.

Даний розділ акцентований на дослідженні життєздатності пірамідних нейронів, інтернейронів, астрогліальних і мікрогліальних

клітин CA1 зони гіпокампальних зрізів при 30 хв КГД. Спостереження проводили через 1, 4 та/або 24 год після КГД. За допомогою специфічних антитіл були ідентифіковані пірамідні нейрони, інтернейрони, астрогліальні та мікрогліальні клітини (Рис. 3.12). NeuN-позитивне забарвлення з урахуванням специфічної цитоархітекtonіки гіпокампальних зрізів та особливостей клітинної морфології, дозволило виділити пірамідні нейрони CA1 зон (на рис. 3.12 зелений колір). GAD67-позитивне забарвлення дозволило виявити інтернейрони, оскільки GAD67 експресується саме у цих клітинах (на рис. 3.12 синій псевдо корілі). GFAP – специфічний білок утворює проміжні філаменти і виявляє астрогліальні клітини (на рис. 3.12 червоний колір). Iba-1 – специфічно експресується у мікрогліальних клітинах (на рис. 3.12 білий псевдо колір).

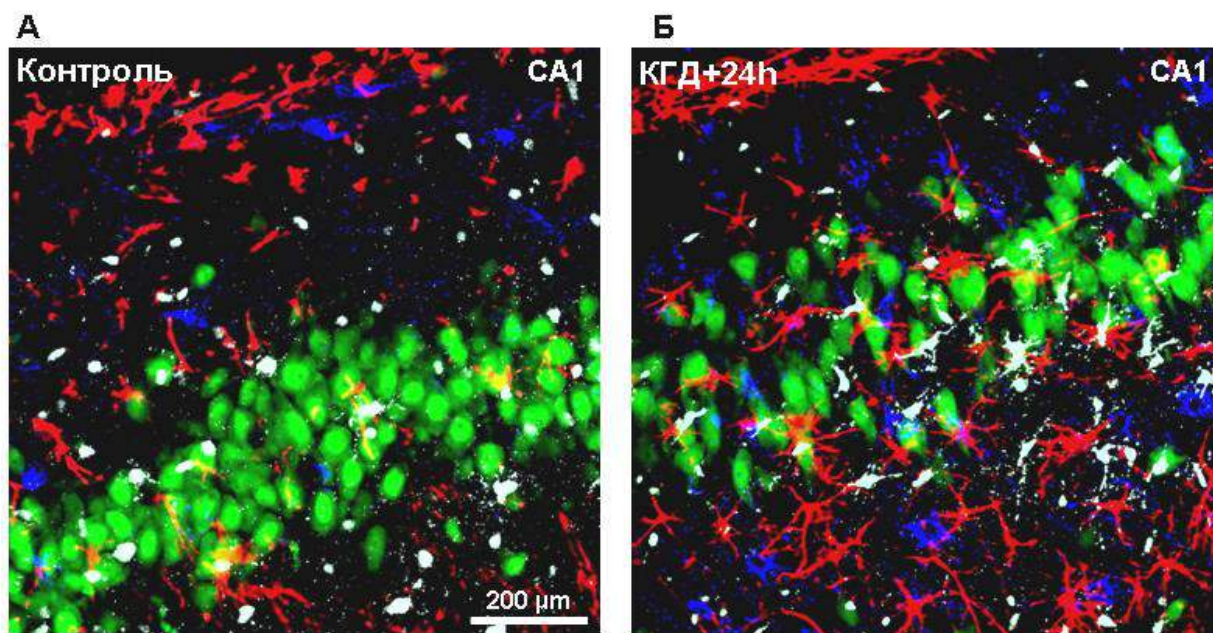


Рис. 3.12. Репрезентативні фотозображення нейронів та гліальних клітин у CA1 зоні культивованих зрізів гіпокампа в нормальних умовах (А) та через 24 год після КГД (Б), отриманих за допомогою ІМЦХ забарвлення: NeuN – пірамідні нейрони (зелений колір), GAD67 – інтернейрони (синій псевдо колір), GFAP – астроглія (червоний колір), Iba-1 – мікроглія (білий псевдо колір).

Використовуючи комбіноване послідовне прижиттєве ПЙ-забарвлення культивованих зрізів та подальше, після фуксування тканини, ІМГХ забарвлення, проаналізовано індивідуальні відповіді клітин вказаних типів у СА1 зоні після 30-хв КГД. Такий методичний підхід дозволив оцінити розподіл різних типів клітин у тканині гіпокампальних зрізів, їх загальну кількість та кількість ушкоджених клітин відповідного типу. Виявлено, що у той час як тіла пірамідних СА1 нейронів локалізуються щільним шаром і значною мірою ПЙ-позитивно забарвлені, інтернейрони, астрогліальні і мікрогліальні клітини розподілені рівномірно у тканині зрізів та проявляють більшу стійкість до КГД, оскільки ПЙ-позитивність у комбінації з маркерами цих клітин практично не виявлялася навіть через 24 год нормоксичної реоксигенації після КГД (Рис. 3.13).

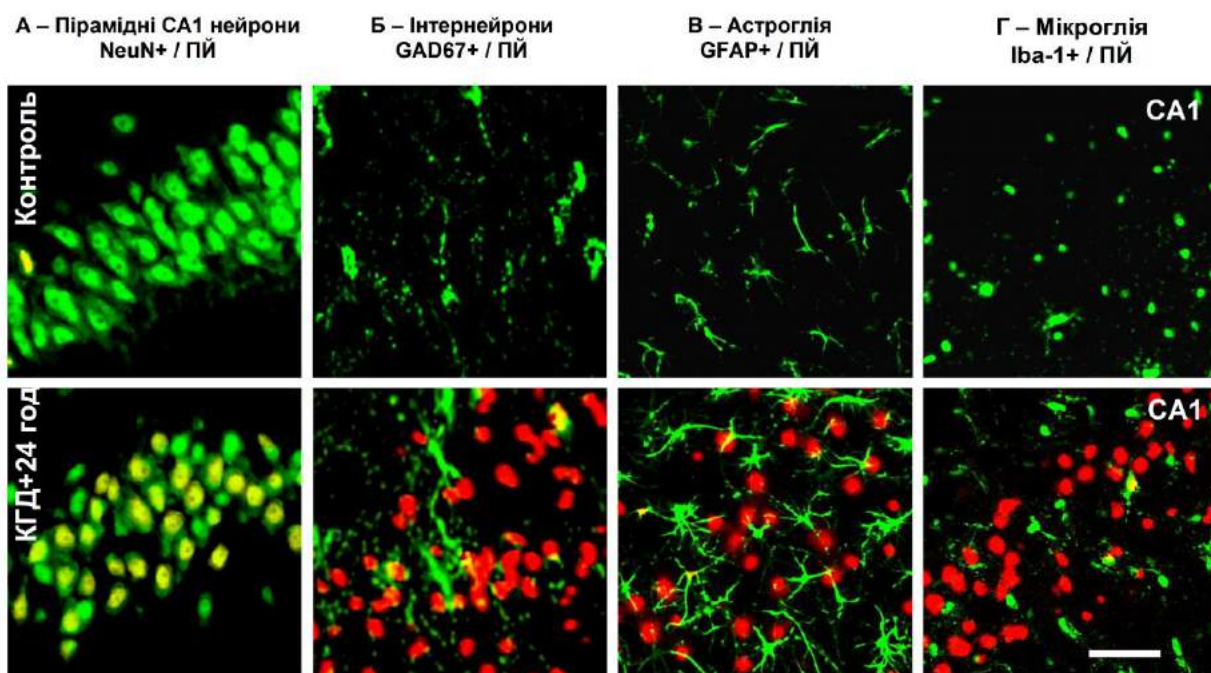


Рис. 3.13. Репрезентативні мікрофотографії СА1 зони, що ілюструють комбіноване ІМГХ (зелений колір) / ПЙ (червоний колір) забарвлення культивованих зрізів гіпокампа за нормальних умов та після 30-хв КГД і 24-год нормоксичної реоксигенації з використанням антитіл, специфічних для різних типів гіпокампальних клітин. А – пірамідні нейрони; Б – інтернейрони; В – астрогліальні клітини; Г – мікрогліальні клітини. Колокалізація ІМГХ/ПЙ забарвлення візуалізується як жовтий колір. Масштабна лінія – 200 мкм.

Виходячи з аналізу комбінованого ПЙ/ІМГХ забарвлення, проведена оцінка кількості різних типів гіпокампальних клітин на одиницю площі та ступінь їх виживання після 30-хв КГД та нормоксичної реоксигенації 1, 4 та 24 год. Дані представлені як результат нормалізації до відповідного контролю. Показано, що тільки у 24-год термін після нормоксичної реоксигенації суттєві закономірні зміни відбувалися у загальній кількості різних типів клітин та кількості з них не ушкоджених (Рис. 3.14). Виявлено, що СА1 пірамідних нейронів ставало значно менше як у загальній кількості, так і відносно неушкоджених клітин у порівнянні з контрольним рівнем. Кількість інтернейронів дещо зменшувалася, але достовірних відмінностей відносно контролю не було виявлено у досліджувані терміни. На відміну від нейронів, кількість астрогліальних клітин поступово зростала і достовірно збільшувалося (в середньому на 20 %) через 24 год. Кількість мікрогліальних клітин залишалася у межах контрольних значень за період досліджень.

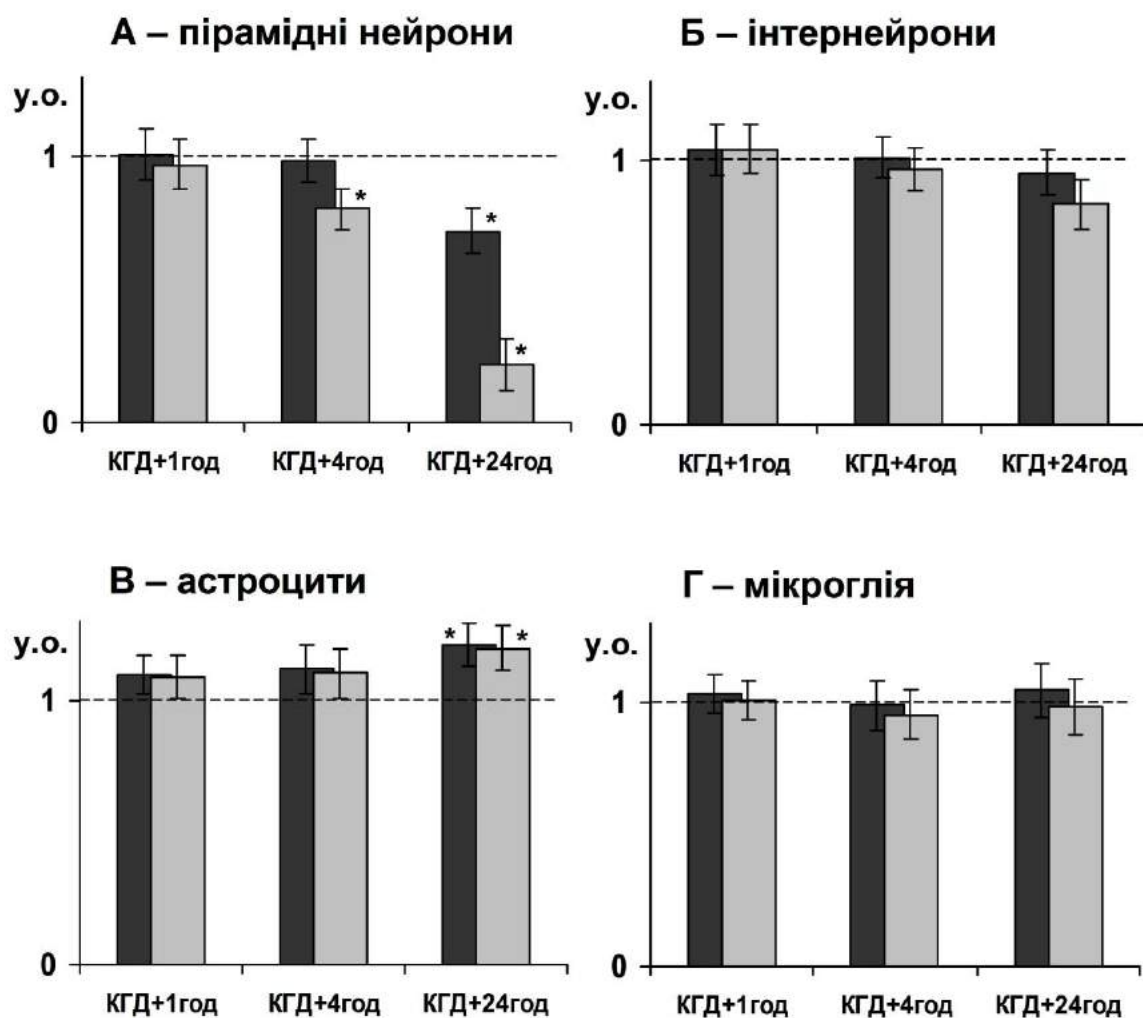


Рис. 3.14. Гістограми, що ілюструють зміни кількості гіпокампальних клітин різних типів у СА1 зоні культивованих зрізів гіпокампа після 30 хв КГД та 1-, 4- та 24-годинної реоксигенації: А – пірамідні нейрони, Б – інтернейрони, В – астрогліальні клітини, Г – мікрогліальні клітини. Темні стопчики відповідають загальній кількості клітин, світлі – кількості неушкоджених; $n=10$, * – $p < 0,05$ до контролю.

Ці результати безперечно вказують, що за рівних умов впливу КГД, інтернейрони, астрогліальні та мікрогліальні клітини відносно резистентні до КГД у порівнянні з пірамідними нейронами.

Основні результати **розділу 3.2** опубліковані у таких статтях:

[7, 9, 10, 176].

3.3. Дослідження механізмів, задіяних у розвитку пошкодження гіпокампальних клітин в умовах КГД

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

Баланс клітинного метаболізму великою мірою визначається мітохондріями [214, 255, 307]. Кількість, морфологія та активність мітохондрій значно варіюють. Ключовим індикатором мітохондріальної активності є їх мембранний потенціал. Розроблено спеціальні флуоресцентні барвники, селективні для мітохондрій (мітохондріальні зонди), які дозволяють досліджувати локалізацію, кількість та активність мітохондрій в живих клітинах при різних експериментальних впливах. Мітохондріальні зонди є ліпофільними, легко проникають через клітинну і мітохондріальну мембрану та накопичуються в мітохондріях залежним від мембранного потенціалу чином [49]. В наших дослідженнях на культивованих гіпокампальних зрізах було використано мітохондріальний флуоресцентний зонд MitoTracker Orange (MT), який формує тіолові кон'югати з білками в активно дихаючих мітохондріях. Ступінь акумуляції барвника відповідає певній величині мембранного потенціалу мітохондрій та рівню мітохондріальної активності, що дозволяє опосередковано оцінити активність метаболізму окремих клітин базуючись на аналізі MT-забарвлення з використанням світлової флуоресцентної мікроскопії.

В умовах нашої експериментальної моделі проведено прижиттєве MT забарвлення культивованих зрізів у комбінації з наступним, після фіксації тканини, імуноцитохімічним забарвленням. Такий методичний підхід дозволив оцінити активність метаболізму у клітинах

різних типів та виявити особливості їх реакції на КГД. Досліджень щодо порівняльного аналізу функціонального стану мітохондрій різних типів клітин у тканині гіпокампа в ідентичних експериментальних умовах, зокрема при нестачі кисню та глюкози, дотепер не проводилося. У даній серії досліджень для культивованих гіпокампальних зрізів використовували такий режим КГД, який не викликав незворотніх патологічних змін, а призводив до відстрочених ефектів унаслідок активації ендогенних механізмів, обумовлених, у тому числі і міжклітинними взаємодіями. Проведено моніторинг змін мітохондріальної активності безпосередньо у пірамідних нейронах, інтернейронах, астрогліальних та мікрогліальних клітинах гіпокампа після 30-хв КГД та нормоксичної реоксигенації 1, 4 та 24 год. Виявлені певні особливості реакції основних гіпокампальних клітин на тимчасову КГД. Відповідні репрезентативні мікрофотографії, графіки та діаграми динаміки змін мітохондріальної активності представлено на рисунках 3.15 – 3.19.

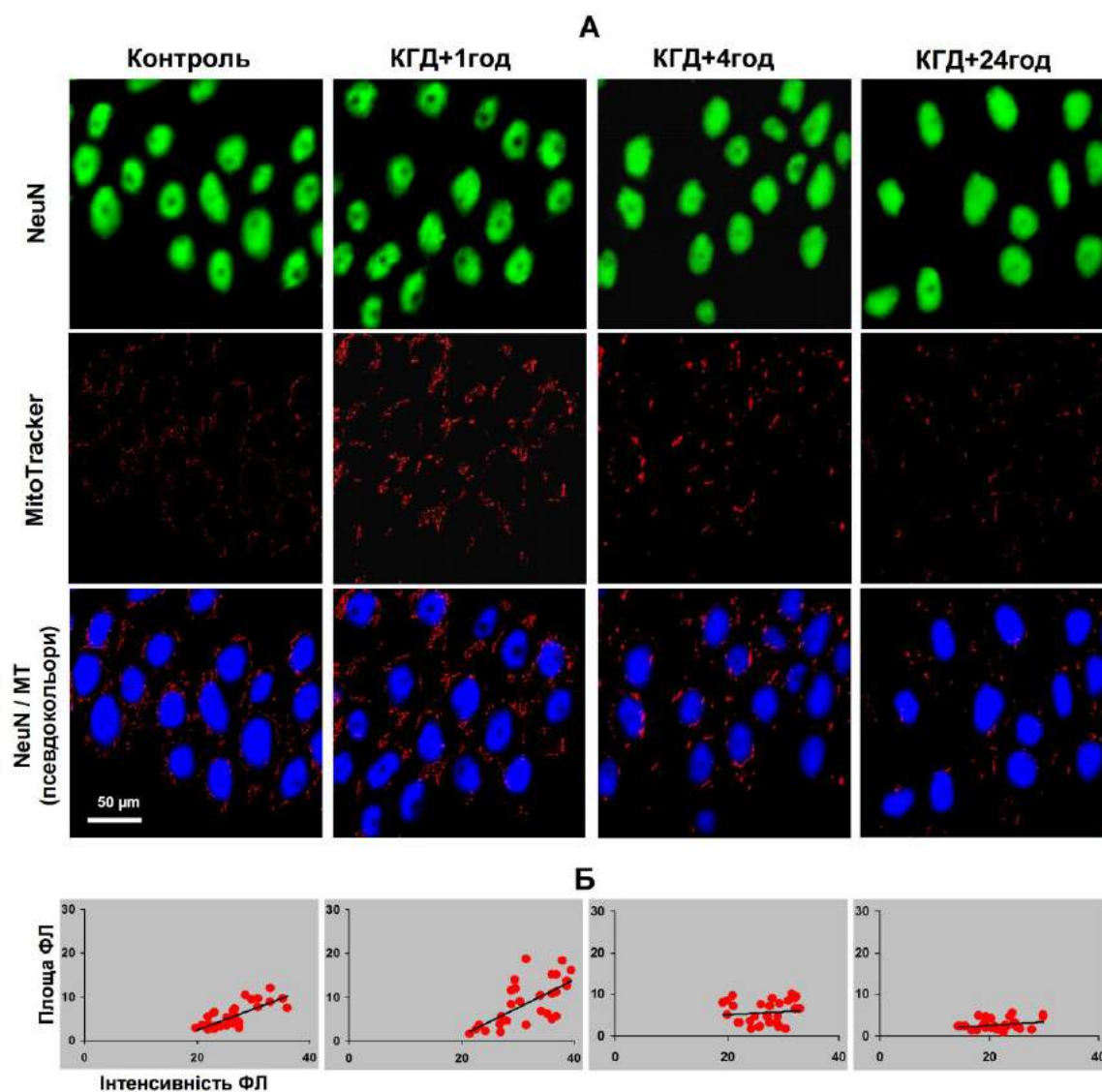


Рис.3.15. Ілюстрація змін мітохондріальної активності пірамідних нейронів СА1 зони культивованих гіпокампальних зрізів у контролі та після 30-хв КГД та 1-, 4- та 24 год нормоксичної реоксигенації. А – репрезентативні фото комбінованого ІМГХ/МТ забарвлення; Б – відповідні точкові графіки залежності площі та інтенсивності ФЛ.

Звертає на себе увагу той факт, що у першу годину після 30-хв КГД у зоні розташування СА1 пірамідних нейронів спостерігається збільшення площі і інтенсивності МТ-флуоресценції у навколоядерній зоні (Рис. 3.15), що відповідає розташуванню цитозоллю нейронів, оскільки тут вони формують щільний шар нейронних тіл, який

здебільшого складається з пірамідних нейронів. Через 4 год активність мітохондрій пірамідних нейронів дещо зменшується. В подальшому, у 24-годинний термін, спостерігається суттєве зниження мітохондріальної активності вказаних нейронів, яке було достовірно нижчим у порівнянні з контрольними значеннями, що наглядно ілюструють і точкові графіки.

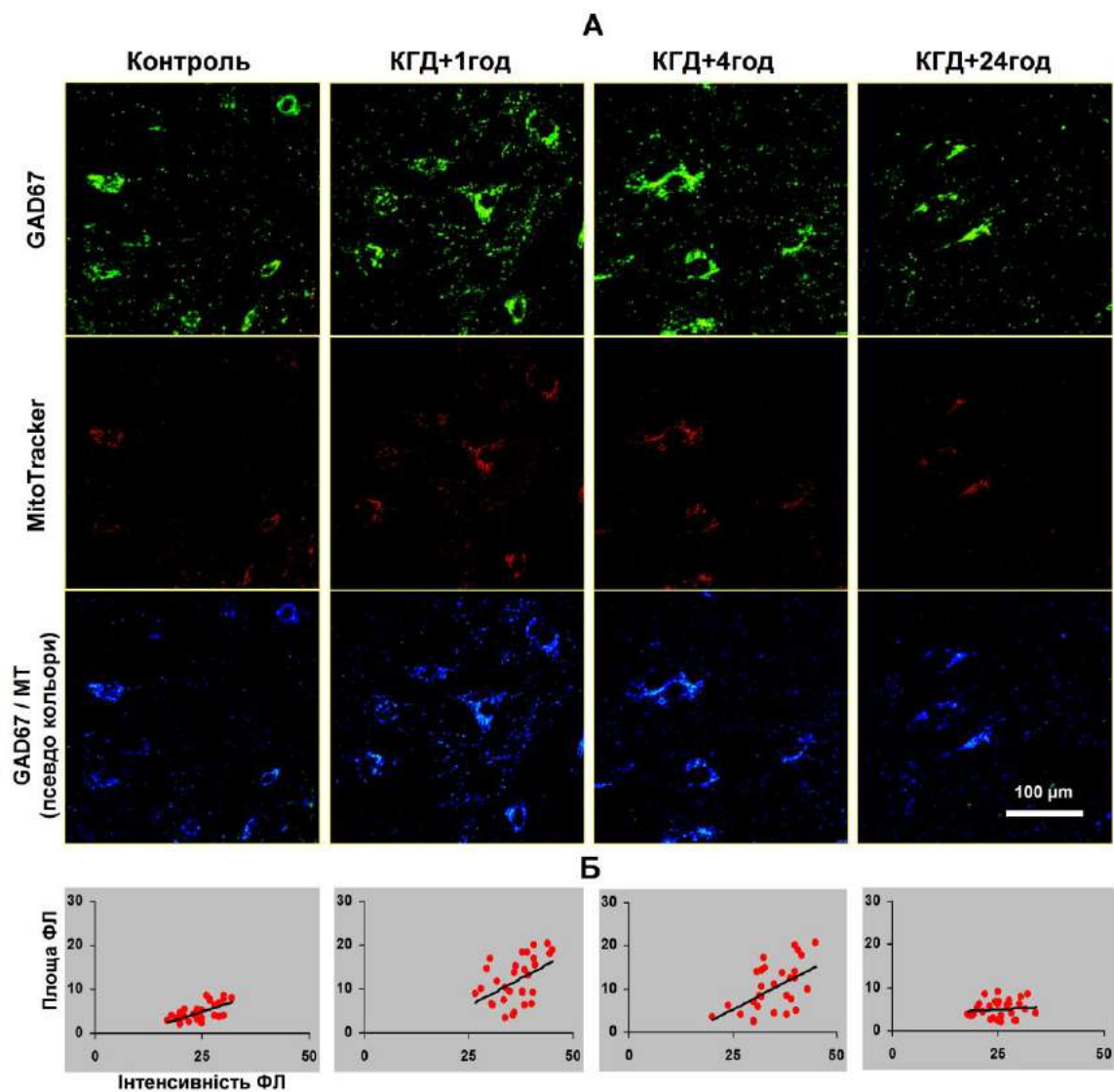


Рис. 3.16. Ілюстрація змін мітохондріальної активності інтернейронів СА1 зони культивованих гіпокампальних зрізів у контролі та після 30-хв КГД та 1-, 4- та 24-годинної нормоксичної реоксигенації. А – репрезентативні фото комбінованого ІМГХ/МТ забарвлення; Б – відповідні точкові графіки залежності площі та інтенсивності ФЛ.

Мітохондріальна активність інтернейронів також підвищується впродовж першої години після 30-хв КГД, залишається на високому рівні у 4-годинний термін та нормалізується до контрольного через 24 год нормоксичної реоксигенації (Рис. 3.16). Виходячи з цих результатів, можна стверджувати, що інтернейрони мають більшу резистентність до КГД, у порівнянні з пірамідними нейронами.

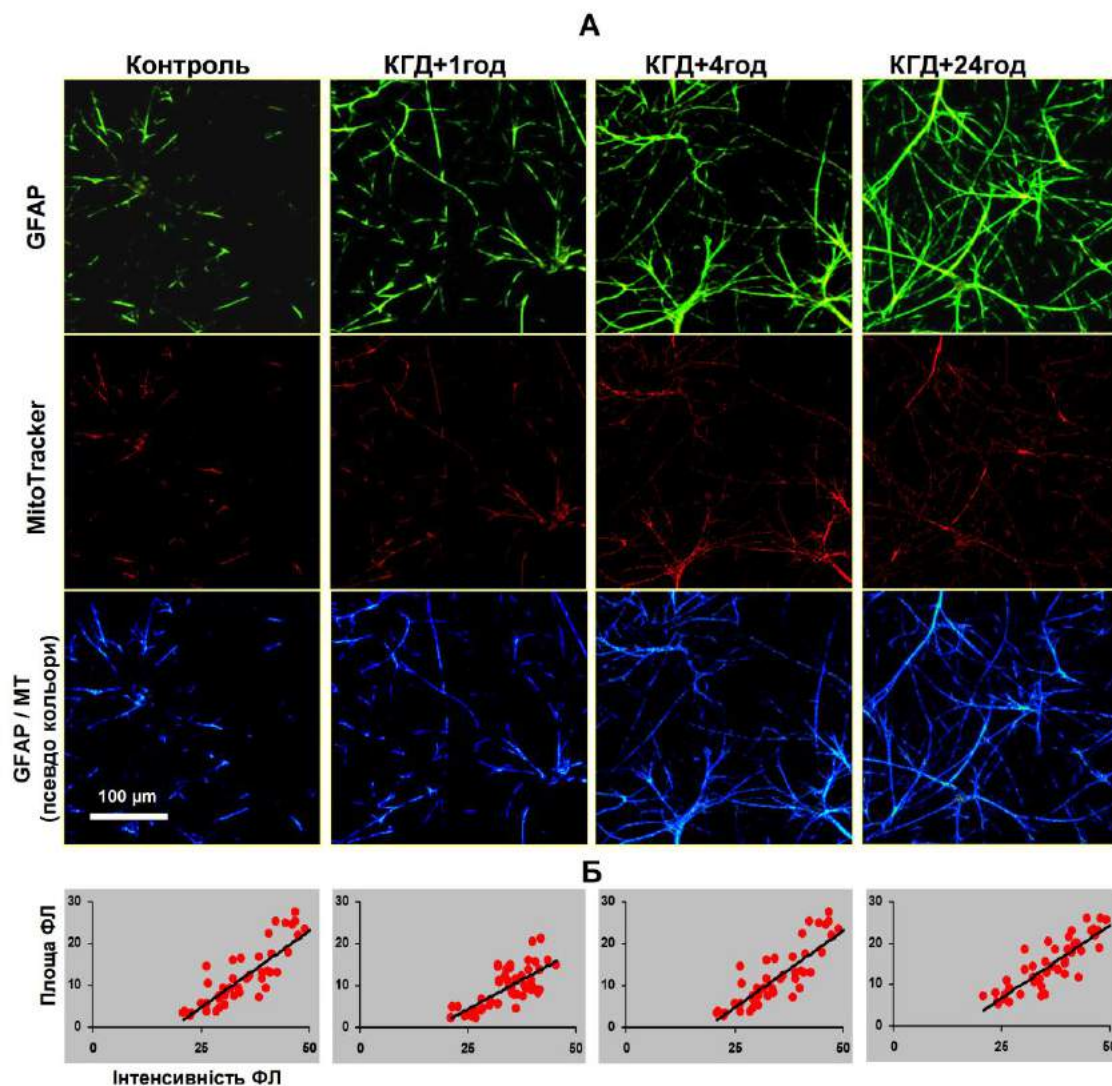


Рис. 3.17. Ілюстрація змін мітохондріальної активності астрогліальних клітин CA1 зони культивованих гіпокампальних зрізів у контролі та після 30-хв КГД та 1-, 4- та 24-год нормоксичної реоксигенації. А – репрезентативні фото комбінованого ІМГХ/МТ забарвлення; Б – відповідні точкові графіки залежності площі та інтенсивності ФЛ.

На відміну від пірамідних нейронів та інтернейронів, у астрогліальних клітинах рівень мітохондріальної активності поступово зростає протягом всього періоду спостережень (Рис. 3.17).

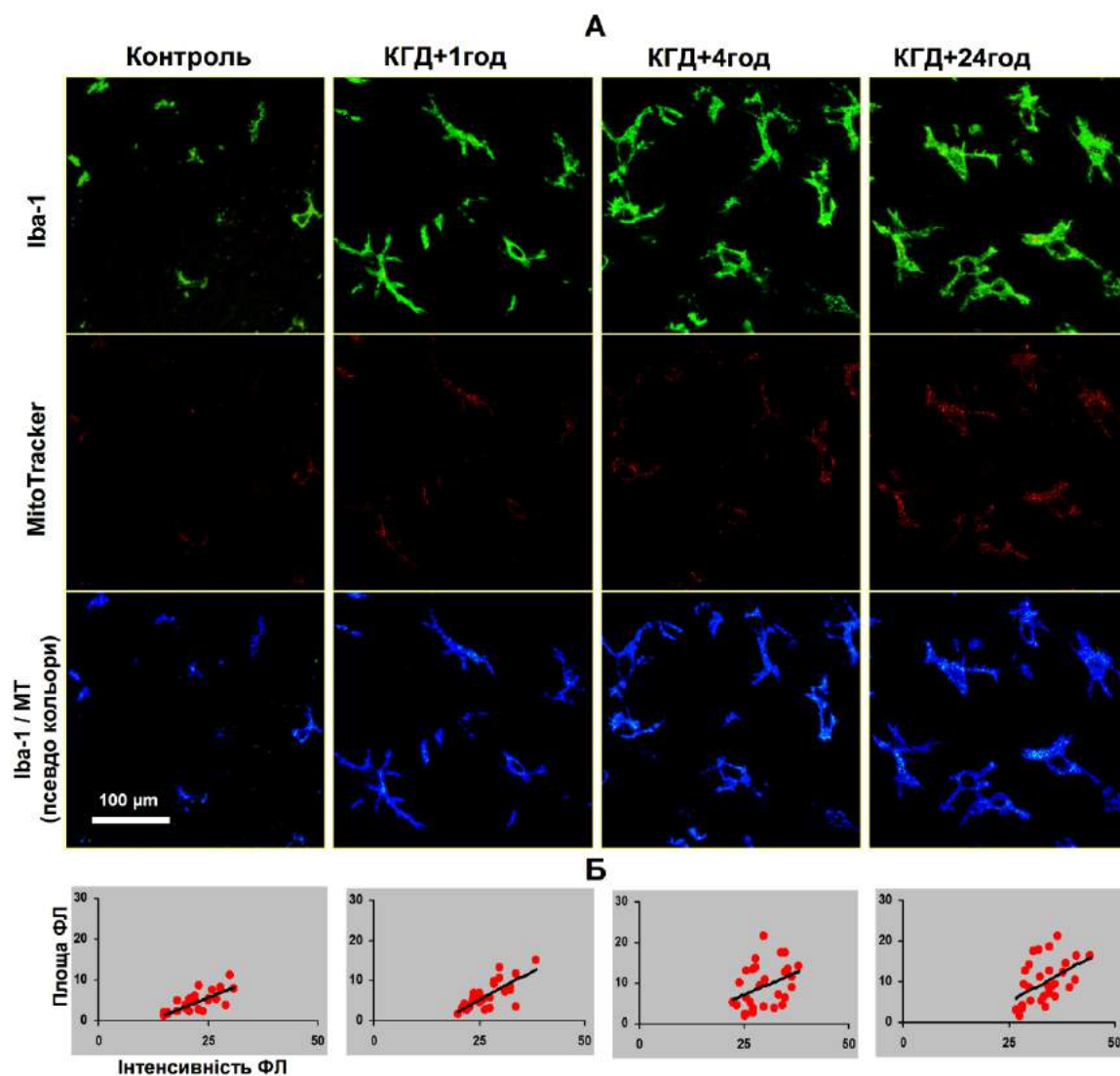


Рис. 3.18. Ілюстрація змін мітохондріальної активності мікрогліальних клітин СА1 зони культивованих гіпокампальних зрізів у контролі та після 30-хв КГД та 1-, 4- та 24-год нормоксичної реоксигенації. А – репрезентативні фото комбінованого ІМГХ/МТ забарвлення; Б – відповідні точкові графіки залежності площі та інтенсивності ФЛ.

Схоже з астрогліальними клітинами, мітохондріальна активність мікрогліальних клітин також суттєво зростає вже на першій годині та знаходилася на високому рівні протягом подальшого періоду нормоксичної реоксигенації (Рис. 3.18).

Проведено кількісну оцінку динаміки змін інтегральної щільності флуоресценції (ІЩФ) диференційовано у основних типах клітин культивованих гіпокампальних зрізів після 3-хв КГД та 1-, 4- та 24-годинної нормоксичної реоксигенації (Рис. 3.19).

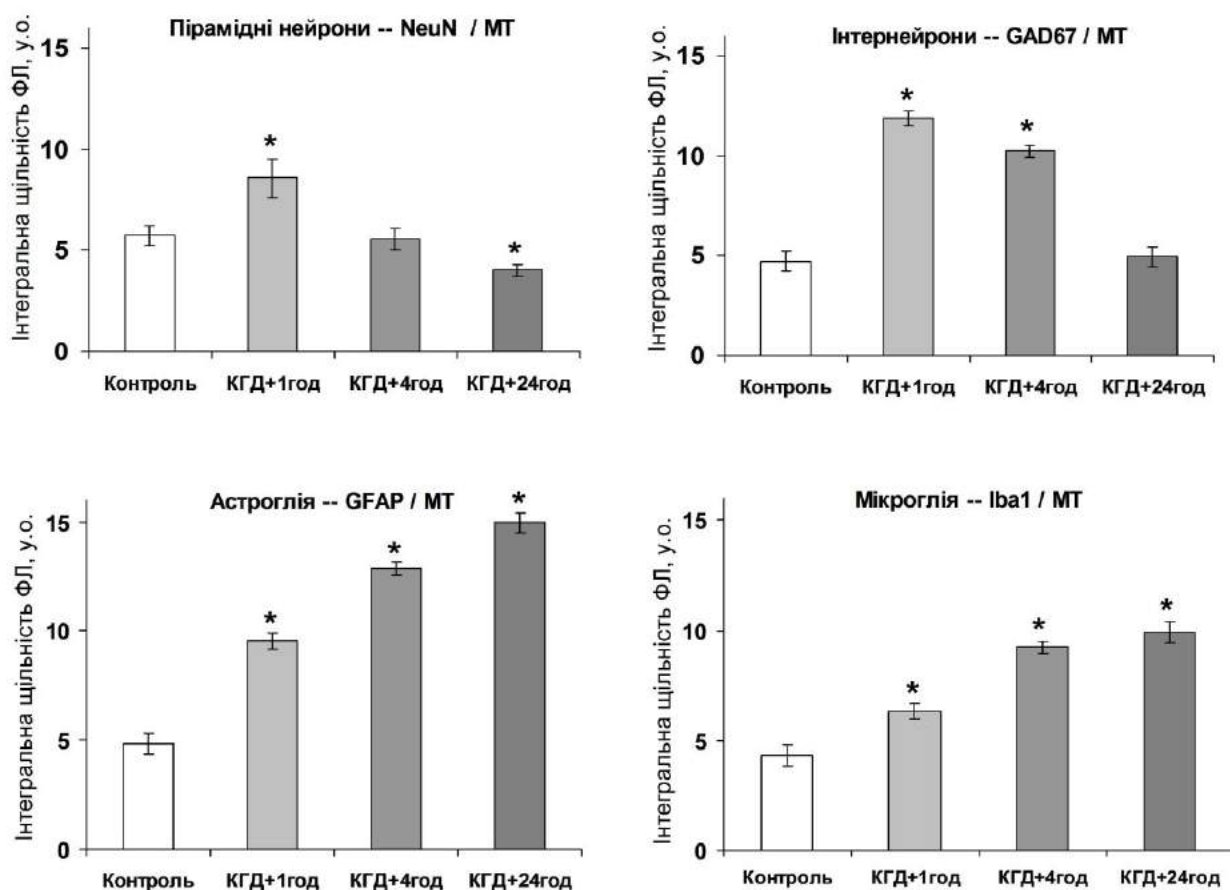


Рис.3.19. Діаграми змін мітохондріальної активності пірамідних нейронів, інтернейронів, астрогліальних та мікрогліальних клітин культивованих зрізів гіпокампа за нормальних умов чи після 30-хв КГД та нормоксичної реоксигенації 1,4 та 24 год;

$n = 20$, * – $p < 0,05$ до контролю.

Ці дослідження характеризують індивідуальну динаміку реагування пірамідних нейронів, інтернейронів, астрогліальних та мікрогліальних клітин на 30-хв КГД. Через 1 год ІЩФ підвищена в усіх типах клітин, що вказує на наявність у них певного енергетичного резерву, для підтримки клітинного гомеостазу. Надалі, ІЩФ знижується в першу чергу у пірамідних нейронах у 4 год і стає достовірно меншою у 24-годинний термін. ІЩФ мітохондрій інтернейронів підтримується на високому рівні протягом 4 год, згодом відбувається нормалізація цього показника до значень у контролі. У випадку астро- та мікрогліальних клітин ІЩФ підвищена в усі терміни дослідження після КГД.

Отримані результати щодо мітохондріальної активності різних типів клітин корелюють з описаними вище змінами життєздатності, загальної мітохондріальної активності та морфології нервових клітин у СА1 зоні культивованих зрізів гіпокампа при КГД. Крім того, додатково вказують на активацію основних типів клітин у початковий період після тимчасової КГД. Виживання чи загибель нейронних клітин значною мірою обумовлена станом мітохондрій. Пірамідні нейрони пошкоджуються раніше, інтернейрони більш стійкі у відношенні КГД. В подальшому, коли енергетичні резерви пірамідних нейронів вичерпується, вони гинуть переважно шляхом апоптозу. В той же час, інтернейрони виживають, крім того, спостерігається активація астрогліальних і мікрогліальних клітин.

3.3.2. Зміни перекисного окислення ліпідів у культивованих зрізах гіпокампа після КГД

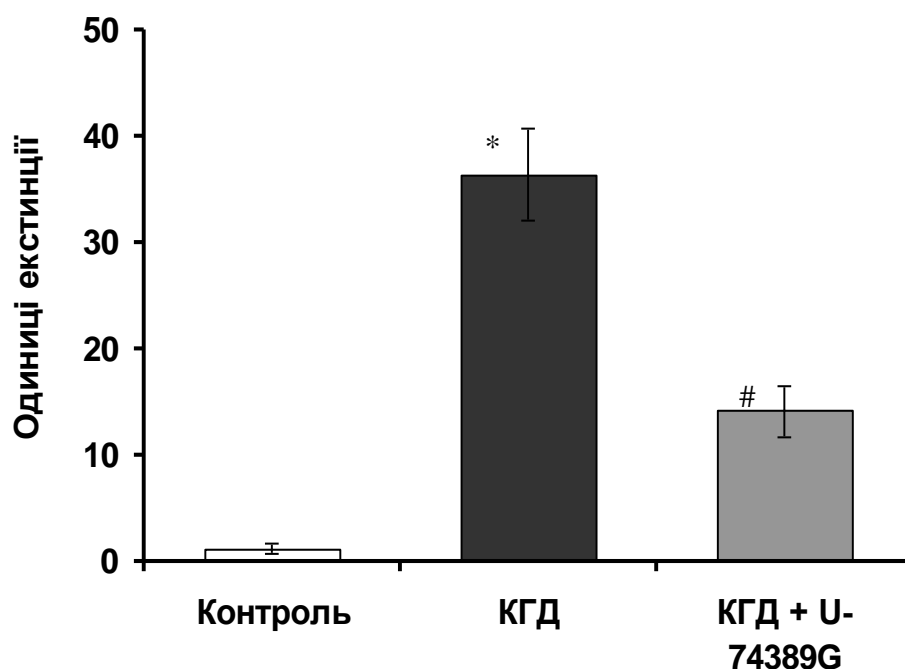
Мітохондріальна функція є життєво важливою для нормальних клітинних процесів. Пошкодження мітохондрій значною мірою

пов'язані з генерацією та накопиченням активних форм кисню (АФК), які є головними факторами, що сприяють окислювальному стресу та розвитку нейродегенерації. Окислювальний стрес викликаний дисбалансом між виробництвом АФК та їх окисленням, що може впливати на функцію мітохондріального дихального ланцюга, змінюючи тим самим проникність мембрани і гомеостаз кальцію разом із ослабленням мітохондріальних систем захисту [2, 5, 6]. Деякі цільові стратегії регуляції функцій мітохондрій, такі як підвищення біодоступності антиоксидантів за допомогою нових систем доставки, дослідження сигнальних шляхів мітохондріального біогенезу та динаміки та визначення ефективних природних продуктів є потенційно ефективними для протидії мітохондріальним дисфункціям.

Окрім дихального мітохондріального ланцюга, АФК утворюються у ферментативних реакціях, при аутоокисненні моноамінів, синтезі простагландинів та лейкотриєнів. У зв'язку з тим що більшість цих реакцій є кальцій залежними, характерна їх значна активація на фоні ішемії. Високореакційні АФК викликають окислення біомакромолекул, а також ініціюють ланцюгові процеси перекисного окислення ліпідів в мембранах, пряме окислювальне ушкодження нуклеїнових кислот та білків [3, 4, 6]. Гідроперекиси, які утворилися в процесі перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), нестійкі, їх розпад призводить до появи вторинних та кінцевих продуктів ПОЛ (малоновий діальдегід, дієнові кон'югати, шиффові основи та ін.), що являють собою високотоксичні сполуки, які пошкоджують мембрани та клітинні структури [5]. Як наслідок утворюються зшивки біополімерів, відбувається набрякання мітохондрій, роз'єднання окислювального фосфорилування, інактивація тілових ферментів (що приймають участь у диханні і гліколізі), подальше руйнування ліпідної основи мембран [61, 210]. Вихід великої кількості жирних кислот активує цикл

арахідонової кислоти, яка здатна додатково інгібувати мітохондріальне дихання, а також проявляти безпосередню цитотоксичну дію.

Було проведено оцінку перекисного окиснення ліпідів в умовах нашої моделі за допомогою вимірювання рівня МДА у культуральному середовищі через 4 год після 30-хв КГД з та без додавання інгібітора ПОЛ U-74389G. Ця речовина належить до групи лазароїдів (21-аміностероїдів), та здатна знижувати перекисне окиснення ліпідів. Механізм дії лазароїдів пояснюється перешкоджанням окисненню полієнових ліпідів мембран подібно до природного антиоксиданту α -токоферола. Лазароїди мають великий мембрано-стабілізуючий ефект завдяки власній високій спорідненості до ліпідного бішару та здатності вбудовуватись у клітинну мембрану, знижуючи тим самим її плинність [137]. За літературними даними, U-74389G використовувався на моделях *in vitro*, з метою інгібування процесів ПОЛ [78, 314]. В своїх експериментах ми додавали U-74389G (25 мкМ) в культуральне середовище за 30 хвилин до КГД. Виявлено, що в умовах КГД перекисне окиснення ліпідів значно підсилюється (Рис. 3.20.). Присутність U-74389G у культуральному середовищі перешкоджає підвищенню рівня ПОЛ.



*Рис. 3.20. Зміни рівню МДА у культуральному середовищі органотипових зрізів гіпокампа в умовах КГД та подальшої реоксигенації 4 год в присутності інгібітора перекисного окислення ліпідів U-74389G; $n = 8$, * – $p < 0,05$ до контролю, # – $p < 0,05$ до КГД.*

Дані результати свідчать про наявність в умовах нашої моделі активації процесів ПОЛ та певний вклад вільних радикалів на розвиток ушкодження нервових клітин при КГД.

Основні результати **розділу 3.3** опубліковані у таких статтях: [7, 9, 10, 188, 318, 319].

3.4. Міжклітинні взаємодії в умовах КГД

Залежно від діапазону та тривалості коливань стану навколоклітинного середовища, наслідки можуть мати фізіологічний або патологічний характер. У експериментах *in vitro* та *in vivo* було показано, що навіть короткотривала КГД з подальшою реоксигенацією

призводять до відставлених у часі, ефектів патологічного характеру [133, 149]. Ці деструктивні зміни мають у основі певні первинні молекулярні та клітинні механізми, які передують ушкодженню нервових клітин.

У патогенезі багатьох патологій мозку, в тому числі при ішемії задіяні рецептор-опосередковані міжклітинні взаємодії [28, 40, 80, 110, 195, Pilorge; Weinberg]. Відомо, що нейродегенеративні механізми в основному пов'язані з порушенням клітинної сигналізації та обміну речовин, гіперактивацією збудливим NMDA, AMPA, каїнатних і mGlu рецепторів, глутаматною ексайтотоксичністю, підвищенням внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} , активацією катаболічних ферментів, мітохондріальною дисфункцією і окисним стресом [118, 195]. Будь-які внутрішньо- та позаклітинні біохімічні і молекулярні зміни у нервовій тканині викликають зміни функціональної і структурної пластичності нейронів та міжклітинних контактів.

Показано, що у гіпокампі, короткий період аноксії/гіпоглікемії індукує тривале посилення визваних електричних відповідей в CA1 зоні, тобто довготривалу потенціацію (ДП) синаптичної передачі [133, 194, 216] і це корелює з динамічними пластичними змінами у морфології синапсів та клітин вцілому [229, 238, 240]. Цей процес супроводжується значним вивільненням глутамату, активацією глутаматних рецепторів та інтенсивним входом Ca^{2+} у клітини [94, 95], що у випадку пролонгованої дії призводить до перезбудження, пошкодження та загибелі нейронів. Для розуміння первинних механізмів численних мозгових порушень великий інтерес має вивчення функціональних і структурних змін нервових клітин у патологічних умовах, зокрема при нестачі кисню та глюкози.

Збудливі і гальмівні синапси є динамічними структурами, що змінюють свою структуру та функції в залежності від їх активності та у

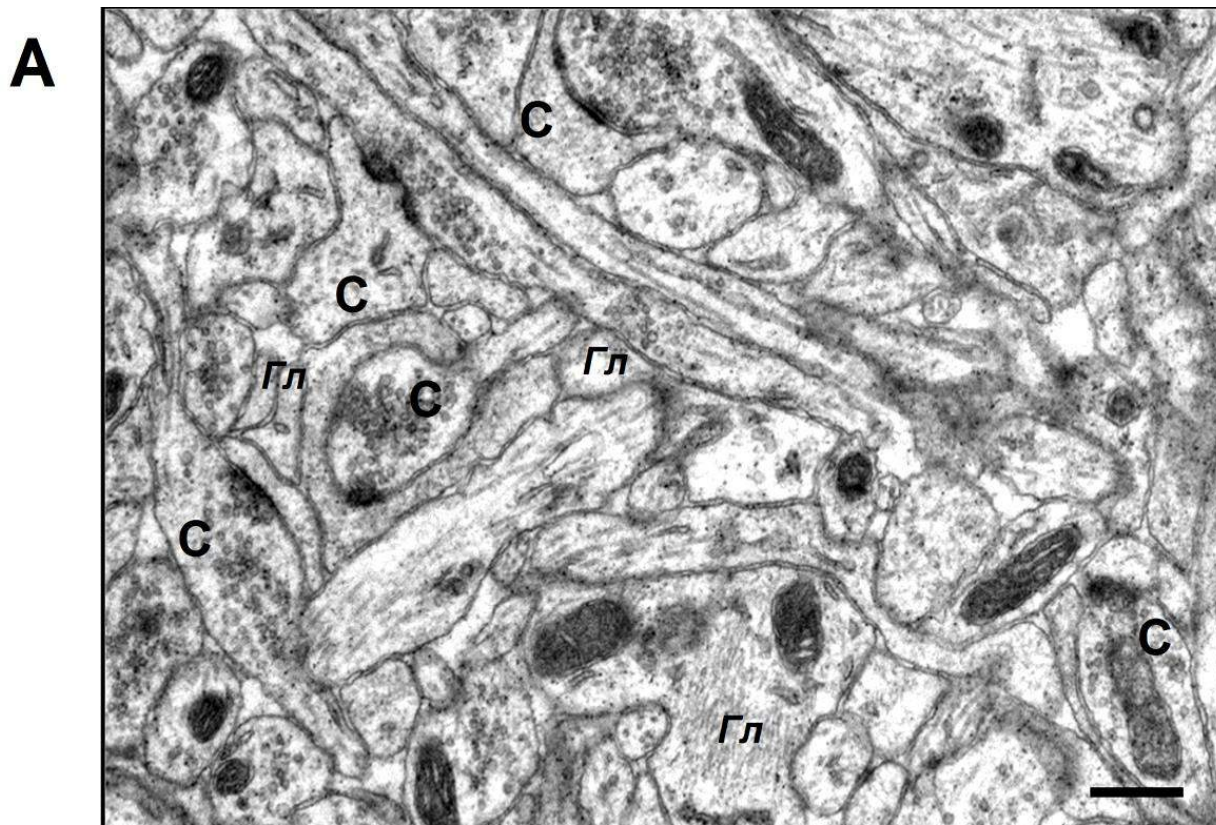
патологічних умовах [44, 107, 167]. Було показано, що індукція довготривалої потенціації (ДП) синаптичної передачі корелює з динамічними перебудовами морфології синапсів, зокрема зі збільшенням розміру голівки шипику, а також зі змінами відносної кількості синапсів різних типів [229, 285].

Подібні ультраструктурні перебудови спостерігались також після нетривалих епізодів киснево-глюкозної депривації (КГД), що не викликає негайних пошкоджень клітин, але призводить до тривалого збільшення збудливих постсинаптичних потенціалів (ЗПСП), що нагадують класичну LTP [133, 149]. Вважають, що такі морфологічні зміни роблять внесок у модифікації ефективності синапсів, що залежать від їх активності. Однак, більшість цих, пов'язаних з пластичністю, морфологічних змін були охарактеризовані на рівні постсинаптичних шипиків, тоді як пресинаптичну зону досліджено значно менше. Ще менше відомо про відростки гліальних клітин, які можуть вважатися третім важливим компонент синаптичного комплексу. Останні дані свідчать про те, що астроцити можуть регулювати локальне оточення синапсів, приймати участь у генерації сигналів нейронами, впливати на синаптичну активність і, таким чином, робити внесок у координацію роботи нейронних мереж. Це призвело до виникнення концепції трьох компонентів збудливого синапсу, що включають сам синаптичний контакт та асоційовану з ним глію [276, 315]. Така концепція отримує підтримку з боку спостережень за допомогою конфокального мікроскопа щодо високої динаміки відростків гліальних клітин та їх можливої участі у процесах синаптичної пластичності [101, 295]. Дослідження деталей взаємодії згаданих елементів та пластичні зміни синаптичного комплексу при дефіциті кисню та глюкози мають широкі перспективи.

3.4.1. Ультраструктурні зміни синаптичного апарату нейронів CA1 зони та глії у культивованих зрізах гіпокампа при моделюванні ішемічного ушкодження

3.4.1.1. Ультраструктурні зміни збудливих синапсів зони CA1 *stratum radiatum* культивованих зрізів гіпокампа у нормі та після КГД

Нами був проведений аналіз ультраструктурних модифікацій всіх трьох компонентів синаптичного комплексу (дендритного шипику, пресинаптичної терміналі збудливих синапсів та асоційованих з ними відростків астроглії) у період що передує вираженим морфологічними та функціональними змінами після епізоду КГД, а саме через 30 і 60 хв нормоксичної реоксигенації. Дослідження були акцентовані на ділянці нейропілю зони CA1 *stratum radiatum* культивованих зрізів гіпокампа у нормі та через 30 і 60 хв після КГД (Рис. 3.21).



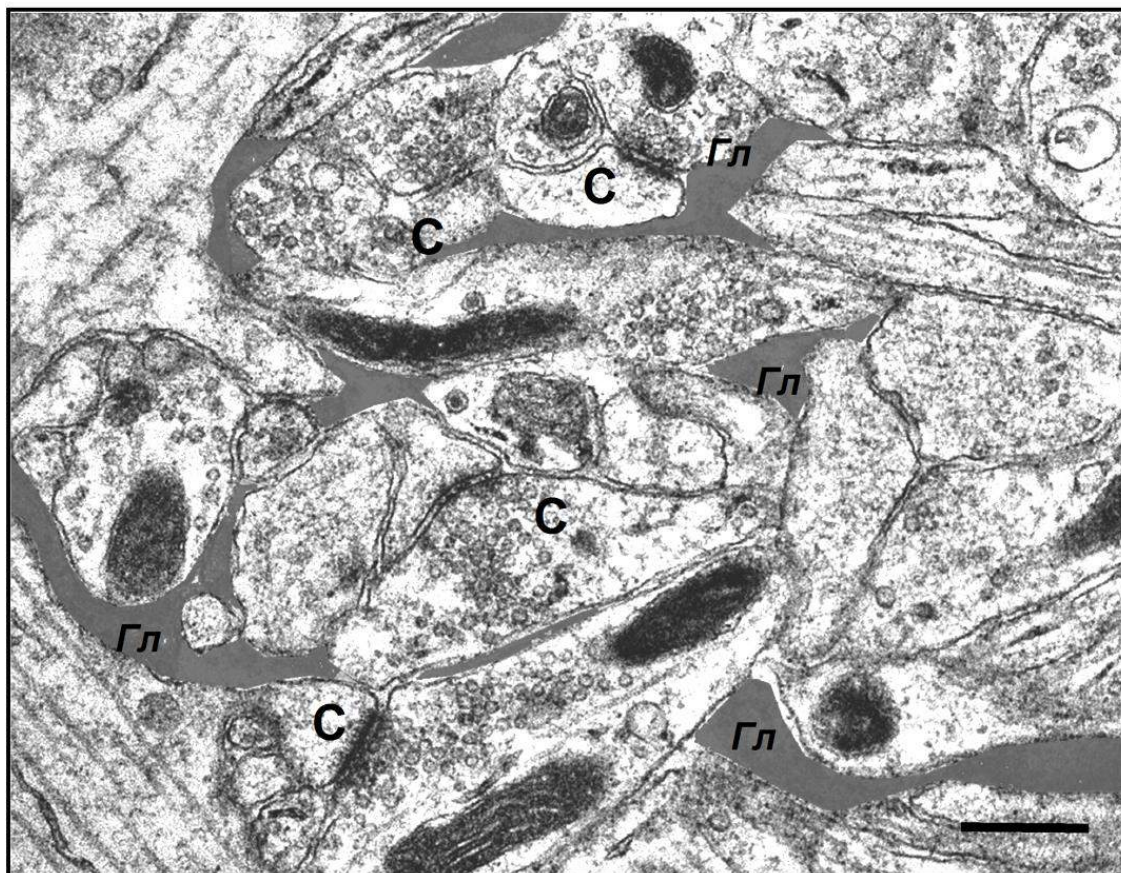
Б

Рис. 3.21. Електронограма, що ілюструє нейроніль зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа у нормі (А) та через 60 хв після КГД (Б). Позначки: С – збудливий асиметричний синапс, Гл – вівідростки гліальних клітин. Масштабні лінії – 500 нм.

За допомогою електронної мікроскопії, морфометричного аналізу об'єктів у двовимірному просторі (2В) були детально дослідженні зміни ультраструктури збудливих синапсів та довколишніх гліальних відростків. У роботі Jourdain з співавт. показано, що залежно від часу аноксії/гіпоглікемії/реоксигенації шипіки та терміналі CA1 нейронів гіпокампа можуть кількісно і якісно змінюватися. Авторами виявлено збільшення кількості перфорованих синапсів через 30 хв після 10 хв киснево-глюкозної депривації, що асоціюється з активацією нейронів. Протягом подальших 2 год спостерігалася їх нормалізація і зменшення.

За цих же умов виявлені коливання числа шипиків на дендритах CA1 нейронів. Ефекти були кальцій-залежними та відмінялися у присутності антогоністів глутаматних рецепторів [133, 283].

За наших експериментальних умов протягом 60 хв після КГД не відбувалося суттєвих змін загальної кількості збудливих синапсів у визначеній зоні. Співвідношення кількості простих синапсів з суцільною постсинаптичною щільністю (ПСЩ) та складних з переривчастою ПСЩ залишалося на рівні контролю (Рис. 3.22), що свідчить про достатню стійкість синапсів у цей термін дослідження.

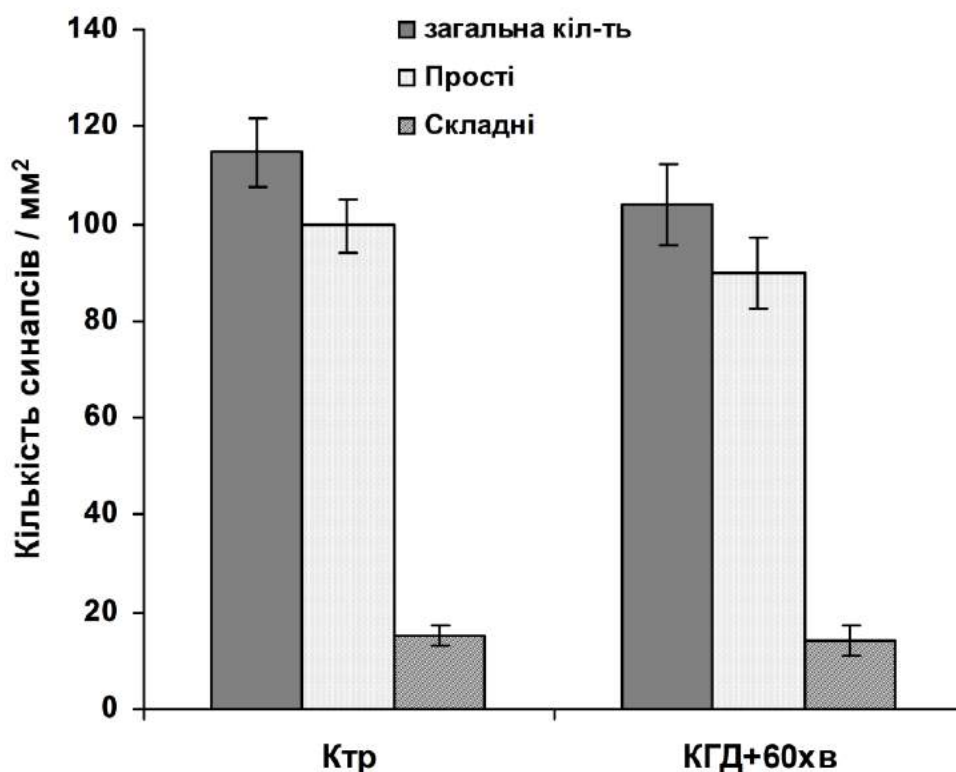


Рис. 3.22. Кількісна оцінка збудливих синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа у нормі та через 30 та 60 хв після КГД. Для простих синапсів $n=30$, для складних – $n=20$;

* – $p < 0.05$ до контролю.

Віддалені деструктивні наслідки мають в своїй основі певні первинні реакції та механізми, що включаються у відповідь на нестачу кисню і глюкози, зокрема цілий патобіохімічний каскад, пов'язаний з дефіцитом аденозин-трифосфату (АТФ), порушенням іонного обміну, значним вивільненням глутамату, накопиченням Ca^{2+} у клітинах, посиленням окислювальних процесів та інш [240, 313]. Неминуче відбуваються певні зміни синаптичної пластичності та відповідні структурні перебудови у синапсах.

Для вивчення структурної пластичності синапсів, великий інтерес представляють об'ємні характеристики, вивчення яких пов'язане з кількісним стереологічним аналізом тривимірних реконструкцій клітин, їх відростків та синапсів, використовуючи серійні електронно-мікроскопічні зображення. Тривимірні зображення синапсів мають фіксовані просторові координати, що дозволяє з великою точністю оцінювати такий параметр, як об'єм. Збудливі синапси складаються з постсинаптичного дендритного шипику з асиметричною ПСЩ та пресинаптичної аксонної терміналі, де накопичуються везикули з нейромедіатором. У залежності від форми ПСЩ визначають прості або макулярні та складні або перфоровані синапси. На рис. 3.23 представлені фрагменти серійних зображень обох згаданих типів синапсів та їх тривимірні реконструкції.

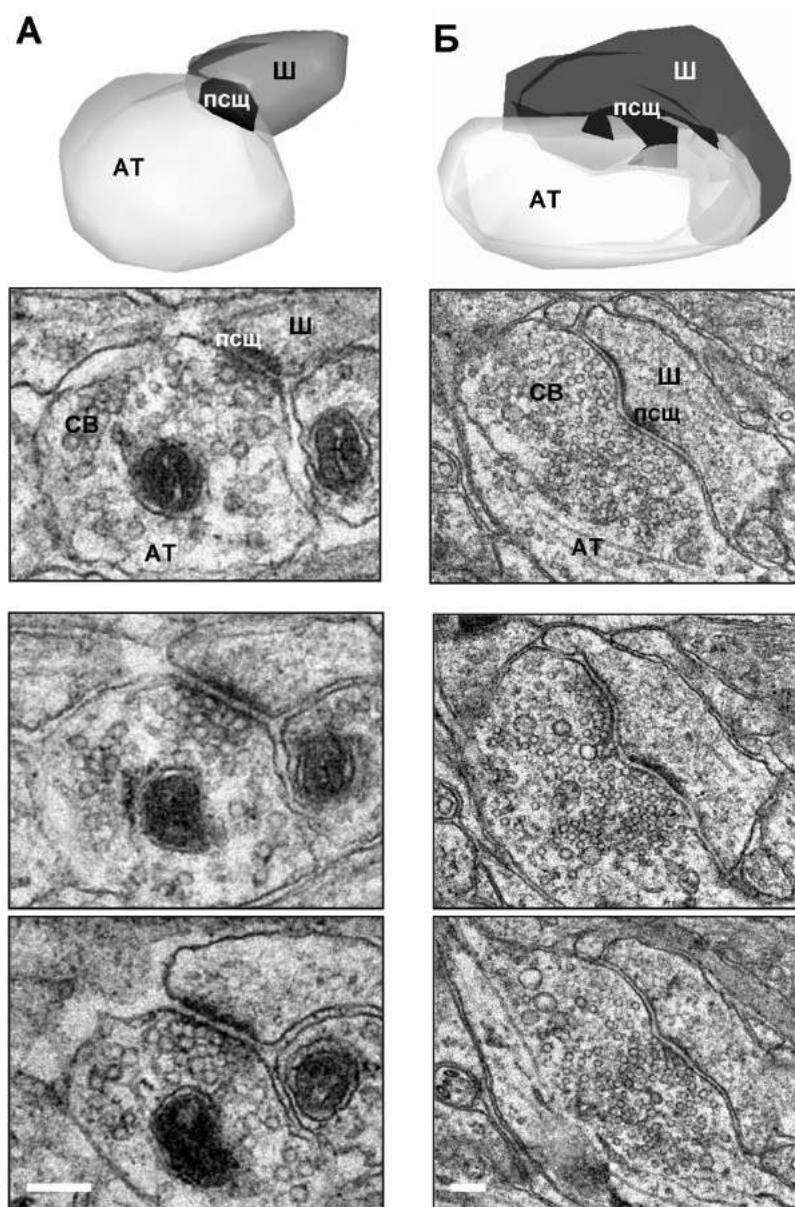


Рис. 3.23. Тривимірне зображення збудливих асиметричних синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа з фрагментом серії їх електронно-мікроскопічних зображень: А – простий синапс з макулярною постсинаптичною щільністю. Б – складний синапс з перфорованою постсинаптичною щільністю. Позначення: АТ – аксонна терміналь, Ш – дендритний шипик, ПСЩ – постсинаптична щільність, СВ – синаптичні везикули. Масштабна лінія – 100 нм.

Детальний морфометричний аналіз показав, що у збудливих асиметричних синапсах збільшується об'єм пресинаптичних

терміналей і постсинаптичних шипиків (Рис. 3.24). Найбільш виражений ефект спостерігався у складних синапсах, де через 60 хв після КГД об'єм шипіка зростав в середньому на 29,2 %, терміналі – на 11.8 %.

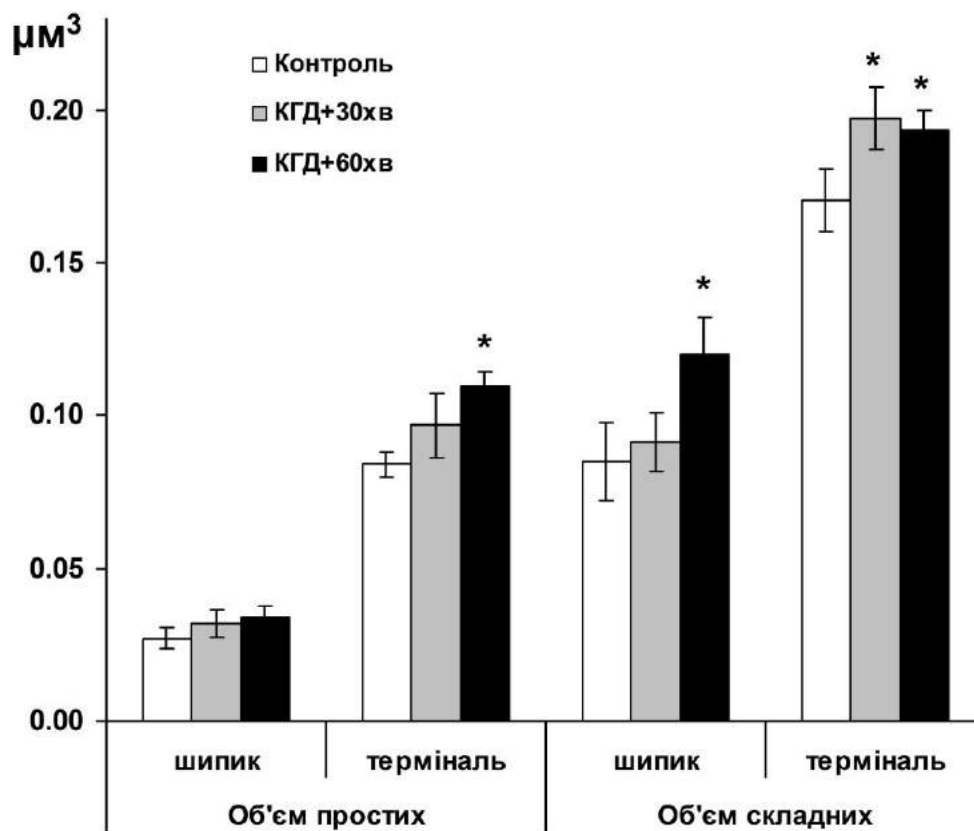


Рис. 3.24. Зміни об'єму шипиків та терміналей простих ($n=30$) і складних збудливих ($n=20$) синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа через 30 та 60 хв після КГД.

* – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Спостерігається значне збільшення товщини ПСЩ як через 30, так і через 60 хв (Рис. 3.25). Ці зміни однаково проявляються як у простих, так і у складних асиметричних синапсах. Відомо, що ПСЩ формується за рахунок накопичення великої кількості сигнальних

білків через які у нейронах запускаються численні молекулярні процеси, які забезпечують їх функції [94, 95].

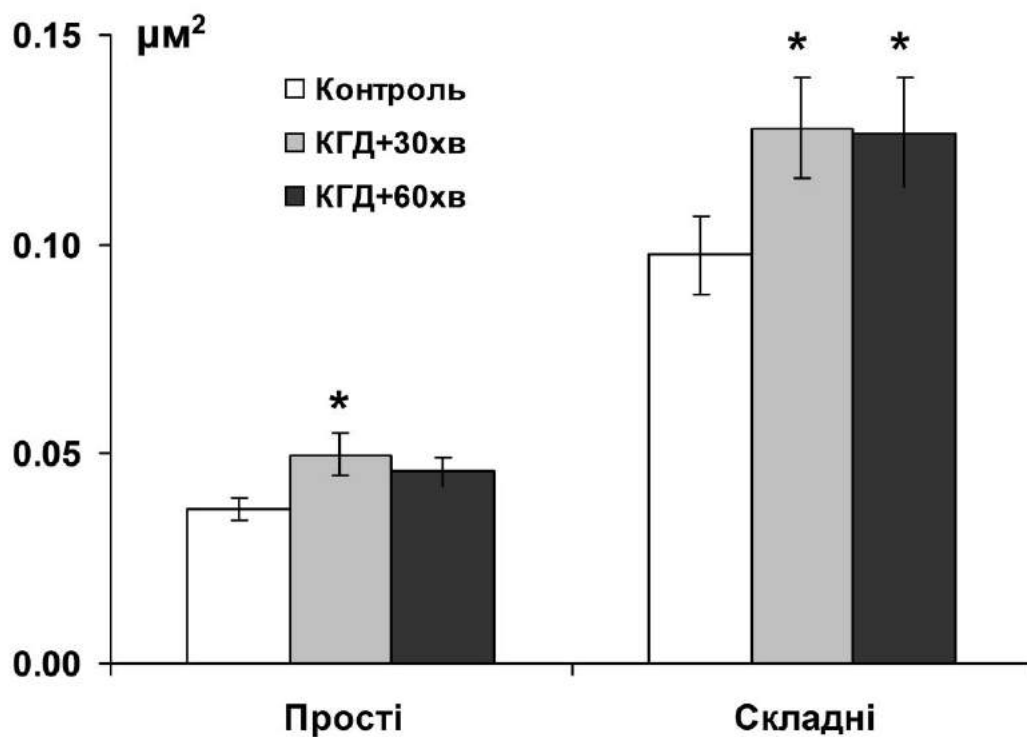


Рис. 3.25. Зміни площі ПСЦ у простих ($n=30$) і складних збудливих ($n=20$) синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа через 30 та 60 хв після КГД. * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Продемонстровано кореляційний зв'язок між морфологічними параметрами синапсів гіпокампа, зокрема між площею постсинаптичної щільності і об'ємом дедритного шипика та об'ємом пресинаптичної терміналі і об'ємом шипика (Рис. 3.26).

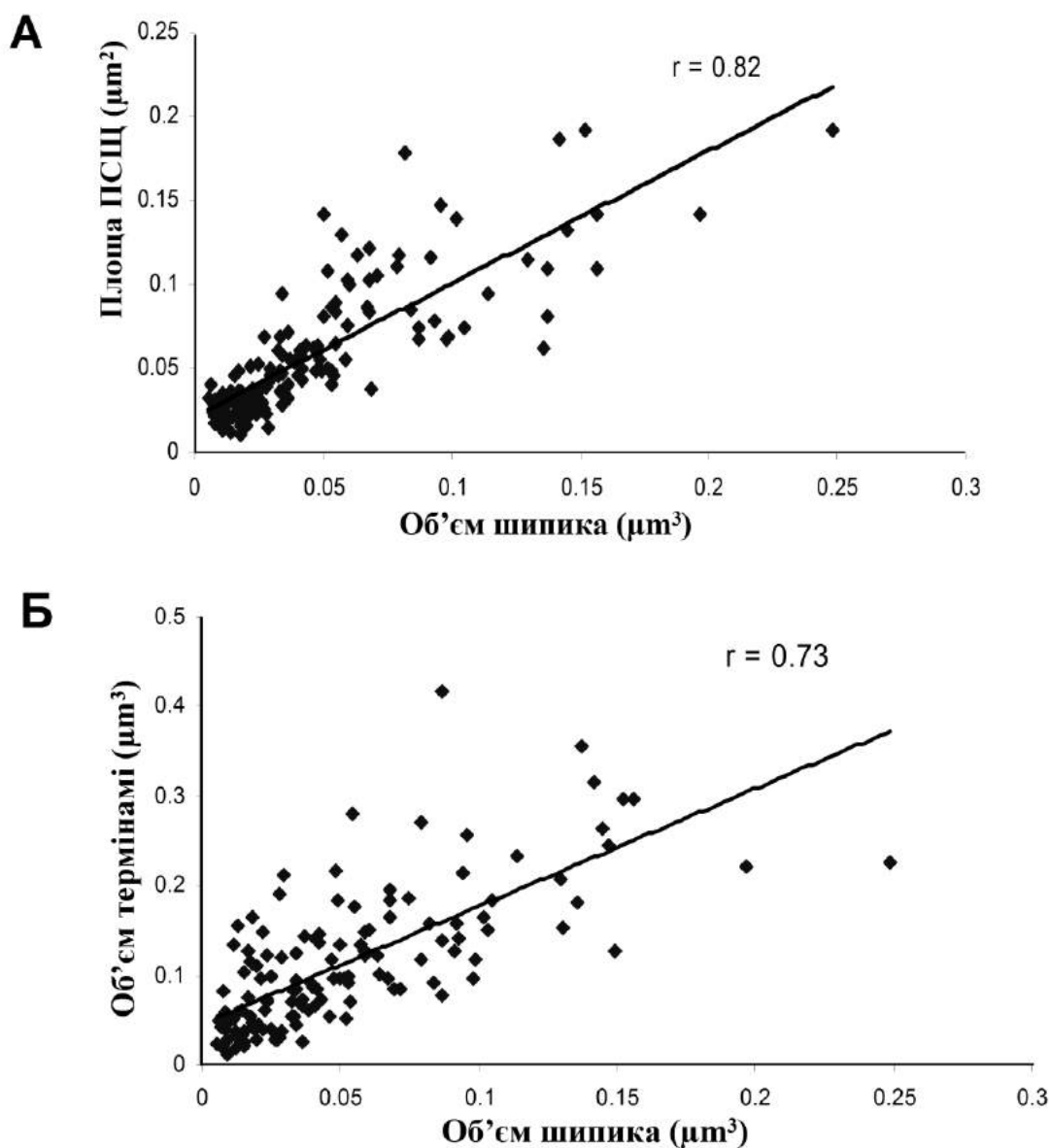


Рис. 3.26. Графіки, що демонструють кореляційний зв'язок між морфологічними параметрами збудливих синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа. (А) площею постсинаптичної щільності та об'ємом дедритного шипика; лінія показує лінійну регресію. (Б) об'ємом пресинаптичної терміналі та об'ємом шипика; $n=50$.

Ці результати свідчать про те, що індукція потенціації збудливих синапсів в умовах КГД стимулює розвиток важливих змін пре- та постсинаптичних елементів синапсів.

3.4.1.2. Ультроструктурні зміни відростків гліальних клітин у зоні CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа у нормі та після КГД

Відомо, що велике значення в координації функціонування нейронів та модулюванні синаптичної пластичності за нормальних і патологічних умов мають гліальні клітини [295, 312, 331]. Показана значна активація гліальних клітин у гіпокампі при моделюванні глобальної ішемії мозку *in vivo*. Автори спостерігали збільшення як кількості астроцитів, так і площі їх відростків [12, 13]. Даних, щодо проявлення глії при короткотривалій аноксії/гіпоглікемії на теперешній час в літературі не має, тому представляло інтерес з'ясувати як проявляють себе ці клітини в умовах нашого експерименту на культивованих зрізах.

Відростки астроцитів ідентифікували за їх морфологічними ознаками: відносно світла цитоплазма, неправильна форма, присутність гранул глікогену та типові пучки проміжних філаментів у більш товстих відростках (Рис. 3.27).

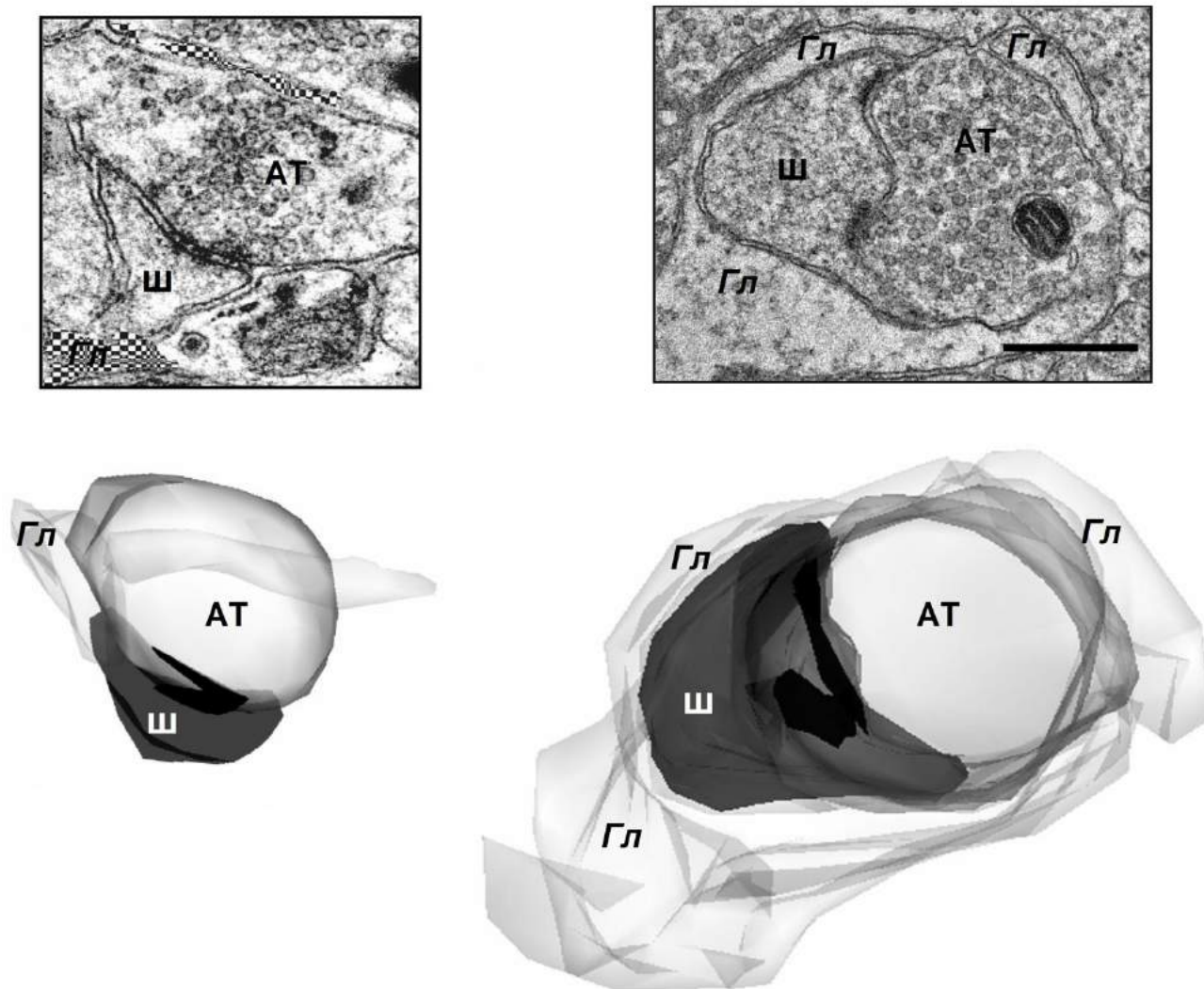


Рис. 3.27. Електронно-мікроскопічні зображення збудливих асиметричних синапсів (простого і складного) та їх тривимірні реконструкції. Масштабна лінія 500 нм. Позначення: АТ – аксонна терміналь, Ш – дендритний шипик, Гл – відростки гліальних клітин. Масштабна лінія – 100 нм.

Були виявлені значні зміни у гліальному покритті активованих синапсів. Такі результати підтверджують ідею щодо активної участі відростків гліальних клітин у структурній пластичності, що індукована синаптичною активністю. Ми акцентували увагу на змінах структурних параметрів гліальних відростків навколо збудливих синапсів, що були

досліджені у наших експериментальних умовах. Виявлене значне збільшення загального об'єму глії, що примикає до синапсів через 30 хв і ще більше зростання через 60 хв після КГД (Рис. 3.28). Тобто спостерігається суттєва активація гліальних клітин, що очевидно має своєю метою корекцію надмірного збудження нейронів шляхом, наприклад, вилучення надлишку глутамату з позаклітинного середовища та стабілізацію стану нейронів. Таким чином, гліальні клітини мають здатність до модуляції синаптичної пластичності і функціонального стану нейронів в умовах КГД.

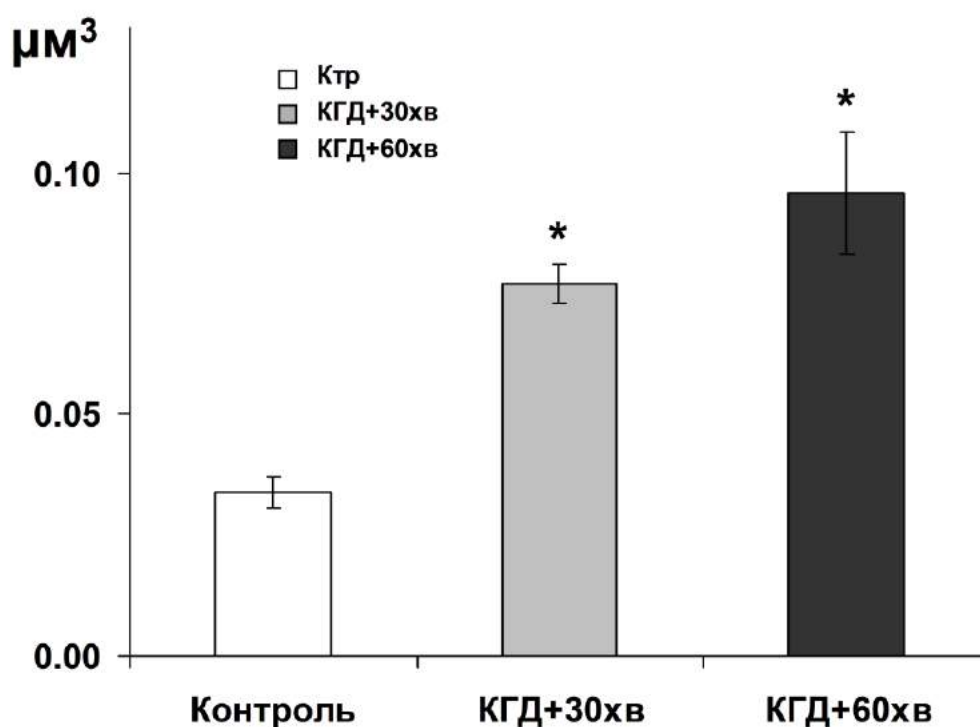


Рис. 3.28. Зміни об'єму глії навколо асиметричних синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа через 30 та 60 хв після КГД; $n=50$, * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Проведений більш детальний аналіз відростків гліальних клітин навколо шипиків і терміналей простих та складних збудливих синапсів (Рис. 3.29). В цьому дослідженні покриття було визначено як присутність прямої опозиції мембран відростка гліальної клітини та

постсинаптичного шипика або пресинаптичної терміналі. У середньому, з простим синапсом контактували $1,22 \pm 0,08$ відростка гліоцитів, в той час як кількість таких контактів зі складним синапсом складала $1,68 \pm 0,08$.

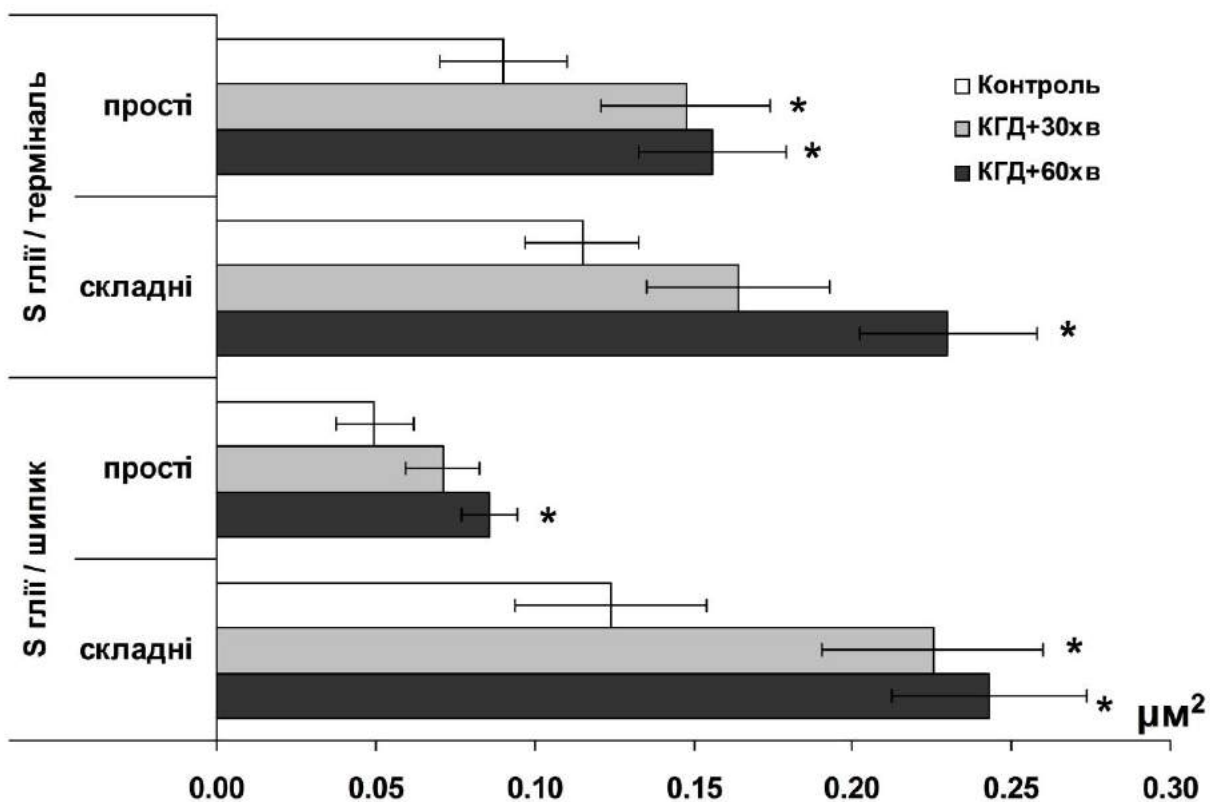


Рис. 3.29. Зміни площі глії навколо асиметричних простих ($n=30$) і складних ($n=20$) збудливих синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа через 30 та 60 хв після КГД;

* – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

У простих синапсах середня площа астроцитарних контактів з голівкою шипику та пресинаптичною терміналлю складала відповідно $0,087 \pm 0,014$ мкм² та $0,053 \pm 0,007$ мкм², що перевищувало розміри ПСЦ. У великих складних синапсах площа покриття гліоцитами була також збільшеною ($0,127 \pm 0,017$ мкм² та $0,132 \pm 0,012$ мкм² площі контактів з

голівкою шипику та терміналлю, відповідно), пропорційно до збільшення розміру синаптичних елементів. Загалом, відносна частина поверхні голівки шипику, вкрита відростками гліальних клітин (відношення площі гліального покриття / площі поверхні голівки) була подібною для простих та складних синапсів ($14,3 \pm 2,0\%$ та $11,8 \pm 1,1\%$), а площа, зайнята контактами гліальних клітин з голівкою шипику корелювала з розміром шипику (Рис. 3.30).

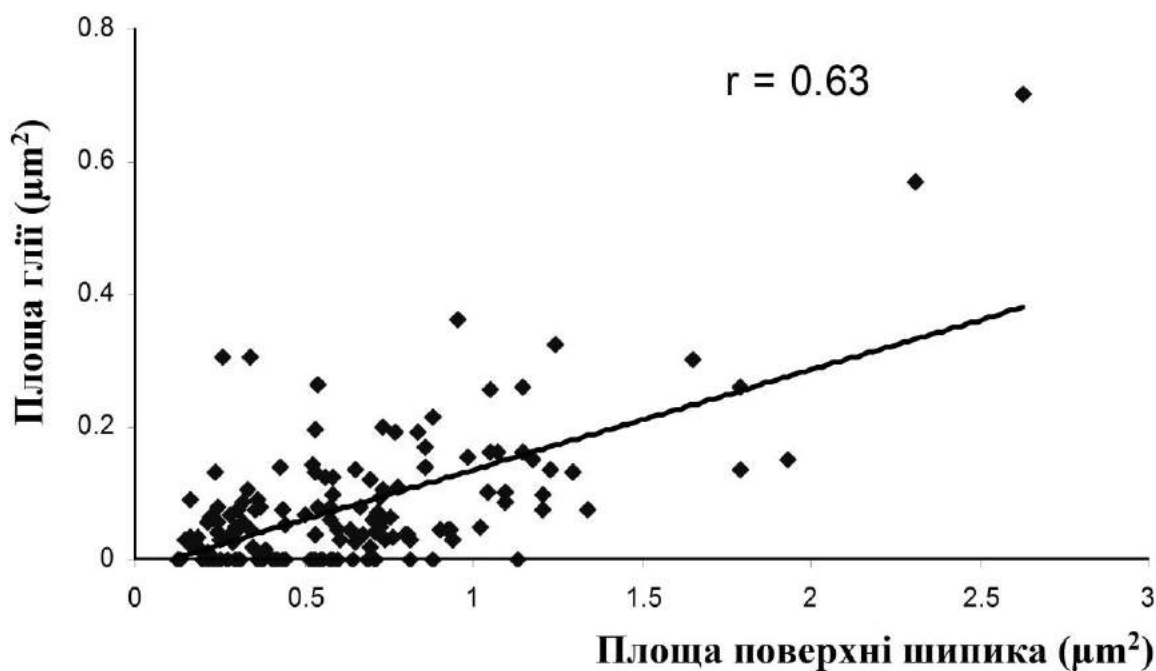


Рис. 3.30. Графік, що демонструє кореляційний зв'язок між морфологічними параметрами збудливих синапсів зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа, зокрема площею поверхні шипика та площею навколишньої з ним глії; $n=50$.

Були виявлені відмінності змін структури гліальних відростків, що безпосередньо контактують з синапсами з тими, які не контактують (Рис. 3.31). Як видно з графіку, за наших експериментальних умов збільшується площа гліальних відростків, які розташовані саме навколо збудливих синапсів.

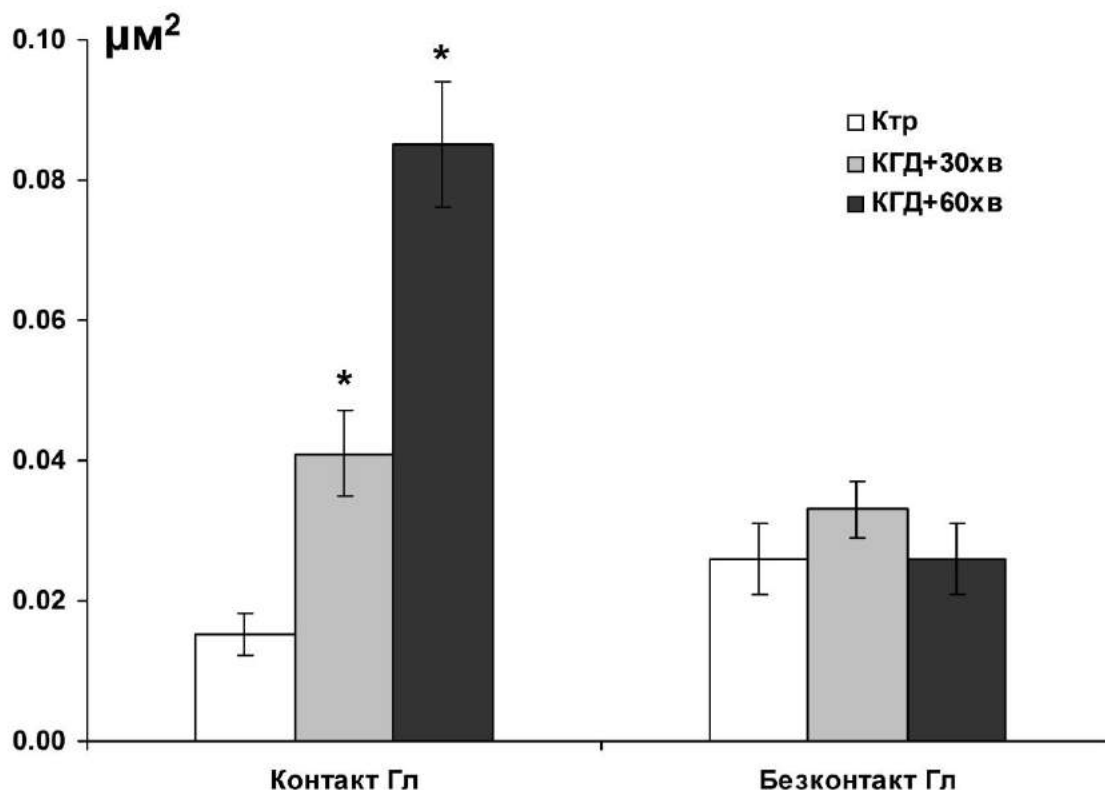


Рис. 3.31. Зміни площі глії, що контактує чи не контактує зі збудливими синапсами зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа через 30 та 60 хв після КГД; $n=50$,

* – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Перебудови глії були залежні від активності збудливих синапсів, що підтверджувалося у експериментах, де культури обробляли специфічним антагоністом NMDA рецепторів, D-AP5, за 15 хвилин до та протягом періоду КГД, з метою запобігти потенціації синапсів, викликаних КГД. У цих умовах, параметри всіх синаптичних елементів (об'єм шипику, площа ПСЩ, об'єм терміналі) не відрізнялись від нестимульованого контролю та зрізів, які обробляли лише одним D-AP5 (Рис. 3.32).

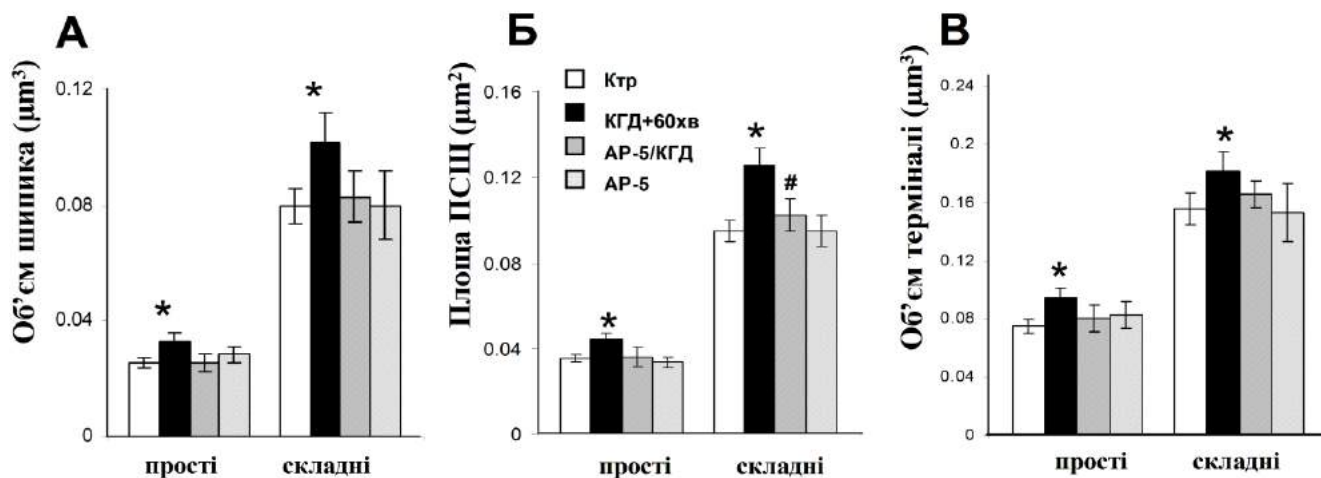


Рис. 3.32. Зміни основних структурних параметрів простих і складних збудливих синапсів через 30 та 60 хв після КГД у присутності AP-5: А – об'єм шипиків; Б – площа ПСЦ; В – об'єм терміналей. Для простих синапсів $n=30$, для складних – $n=20$; * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

AP-5 також запобігало збільшенню гліального покриття синапсів після КГД (Рис. 3.33). Площа контактів між відростками гліальних клітин та голівками шипиків або пресинаптичними терміналями, а також кількість гліальних відростків на синапс не демонстрували значних змін. Також, частка поверхні пре- та постсинаптичних елементів, вкрита гліальними клітинами, залишалась у діапазоні значень контролю і складала від 10 до 15%. Це свідчить, що індуковані синаптичною активністю перегрупування гліальних клітин, яке спостерігаються після КГД, обумовлені активацією NMDA рецепторів.

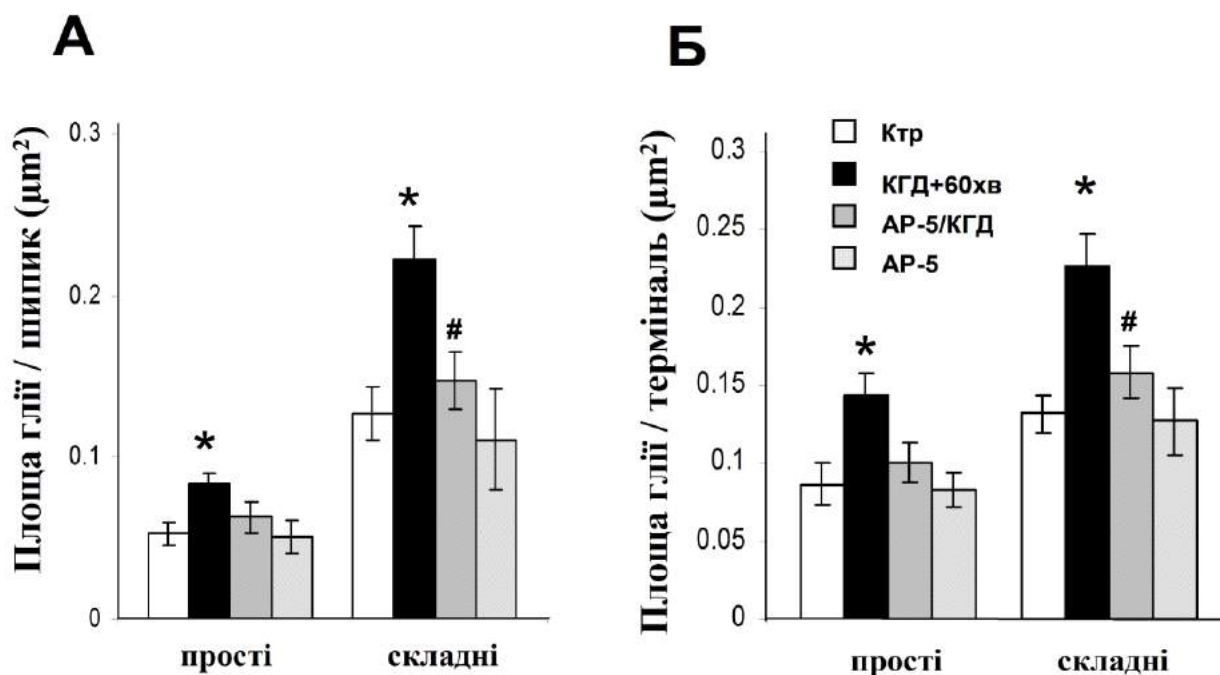


Рис. 3.33. Зміни структурних параметрів відростків гліальних клітин, розташованої навколо збудливих синапсів CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа в нормі та через 30 та 60 хв після КГД у присутності AP-5: А – площа глії, що примикає до шипика; Б – площа глії, що примикає до терміналі. Для простих синапсів $n=30$, для складних – $n=20$; * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Таким чином, в наших експериментальних умовах протягом 1 год після КГД відбуваються суттєві зміни архітекtonіки збудливих синапсів зони CA1 *stratum radiatum*, особливо виражені у складних синапсах. Виявлене збільшення об'єму глії навколо збудливих синапсів свідчить про здатність цих клітин до модуляції синаптичної пластичності та життєздатності нейронів в умовах нестачі кисню і глюкози, а активна реакція гліальних клітин певною мірою може опосередковувати відстрочений характер ушкодження нейронів при ішемії.

3.4.1.3. Ультаструктурні зміни елементів синаптичного апарату нейронів гіпокампа при КГД

Основним компонентом хімічного синапсу є наповнені нейромедіатором синаптичні везикули (СВ), які розташовані у пресинаптичній терміналі та під впливом певних сигналів вивільнюють свій вміст у синаптичну щілину. Функціональні характеристики пресинаптичної терміналі значною мірою залежать від їх кількості та готовності до вивільнення нейромедіатора. СВ можна умовно розділити на три взаємопов'язані пули, в залежності від їх відстані до активної зони синапсу та потенційної здатності до екзоцитозу. Пул, органели якого здатні до швидкого екзоцитозу, знаходиться найближче до активної зони синапсу, за ним іде пул, що рециклює, і найвіддаленішим є резервний пул СВ [288]. Було показано, що у стимульованих синапсах СВ розташовані ближче до активної зони, ніж у нестимульованих [27]. Таким чином, просторовий розподіл СВ може бути важливим корелятом потенційної здатності цих органел до вивільнення нейромедіатора. Іншою важливою структурною характеристикою хімічного синапсу є формування кластеру СВ, особливо навколо активної зони. Везикули, що розташовані у серцевині кластеру, на його периферії або поза його межами, можуть мати різні функціональні якості, і цим може зумовлюватись їх здатність до транспорту у зону екзоцитозу [248]. Тому аналіз просторового розподілу СВ може дати цінну інформацію про функціональний стан синапсу.

У цій роботі ми вивчали просторовий розподіл СВ у синапсах зони CA1 *stratum radiatum* культивованих зрізів гіпокампа, де досить детально досліджено довготривалу потенціацію (ДТП) викликаних постсинаптичних потенціалів. Вважається що феномен ДТП складає

основу механізмів навчання та запам'ятовування [169]. Водночас ДТП є дуже чутливою до ішемії, яка викликає селективне та відкладене у часі ураження пірамідальних нейронів [104]. Якщо ішемічний епізод у зоні CA1 триває недовго, він здатний викликати довготривалу постсинаптичну потенціацію схожу на класичний варіант цього феномена [133].

Для аналізу змін стану СВ у наших експериментальних умовах, прості і складні синапси було відібрано випадковим чином і за критерієм наявності кальцієвих преципітатів, що є ознакою активного стану синапсу. Кожен синапс було ідентифіковано на декількох послідовних серійних електронограмах, і для аналізу розподілу СВ було відібрано ті з них, на яких довжина постсинаптичного ущільнення була найбільшою. В експериментах проаналізовано 148 синапсів. У кожній з дослідних груп (контроль, 30 та 60 хв після киснево-глюкозної депривації або класичної ДТП) було проаналізовано по 20 перфорованих та 30 простих синаптичних контактів.

З метою кількісного аналізу просторового розподілу СВ координати центрів профілів везикул та точок, що позначали профіль активної зони, визначали на цифрових мікрофотографіях, що дає змогу визначати відстань до активної зони синапсу та до найближчої везикули. Щільність СВ визначали як кількість везикул на одиницю площі перерізу терміналі. Везикули, центр яких був розташований на відстані не більше ніж 25 нм від активної зони, вважали готовими до вивільнення медіатора.

Аналіз показав, що в умовах контролю щільність СВ була майже однаковою в обох досліджених типах синапсів, складаючи $190,3 \text{ од/мкм}^2 \pm 10,6 \text{ од/мкм}^2$ (тут і далі одиниця відповідає одній везикулі) у простих та $192,2 \text{ од/мкм}^2 \pm 13,2 \text{ од/мкм}^2$ – у складних синапсах (Рис. 3.34). На відміну від цього, кількість СВ, найближчих до активної зони,

була суттєво нищою у складних – $9,5 \text{ од} \pm 0,6 \text{ од}$, ніж у простих синапсах – $6,9 \text{ од} \pm 0,5 \text{ од}$ ($p < 0,05$). Можливим поясненням таких відмінностей можуть бути більші сумарні розміри перфорованої активної зони.

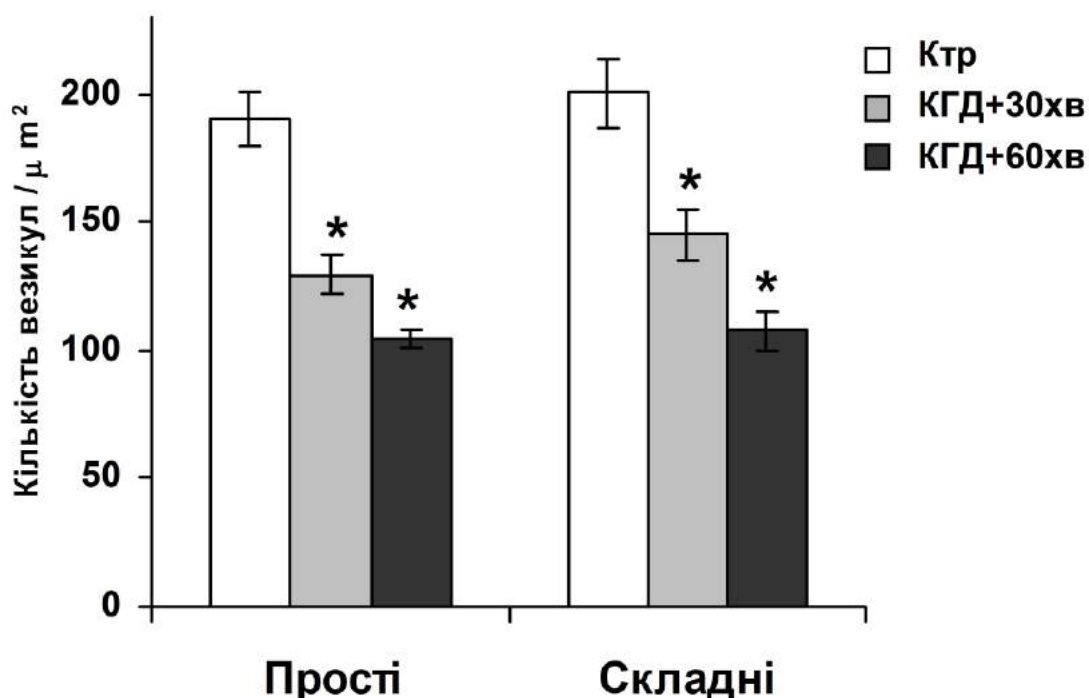


Рис. 3.34. Зміни щільності везикул у збудливих асиметричних синапсах зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа через 30 та 60 хв після КГД; $n=50$, * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Через 30 хв після КГД щільність СВ у пресинаптичній терміналі знижувалась на 32 % (до $129 \text{ од/мкм}^2 \pm 7,4 \text{ од/мкм}^2$) у простих та на 27 % (до $145,2 \text{ од/мкм}^2 \pm 9,8 \text{ од/мкм}^2$) у складних синапсах ($p < 0,001$). При цьому кількість везикул, найближчих до активної зони, зменшувалася у порівнянні з контролем приблизно вдвічі: до $3,7 \text{ од} \pm 0,3 \text{ од}$ у простих та до $5,1 \text{ од} \pm 0,4 \text{ од}$ – у перфорованих синапсах. Середня відстань до активної зони зменшувалася на 7 % у простих та на 2,5 % у перфорованих синапсах (Таблиця 1). Не зважаючи на невеликий

діапазон змін, відмінності між показниками були статистично вірогідними ($p < 0,001$).

Таблиця 3.1.

Зміни середніх значень кількісних показників просторового розподілу везикул у збудливих синапсах зони СА1 культивованих зрізів гіпокампа щурів після КГД

	Відстань до активної зони, нм		Відстань до найближчої везикули, нм	
	Прості синапси	Перфоровані синапси	Прості синапси	Перфоровані синапси
Контроль	225,3±4,7 (n=1569)	253,3±5,4 (n=1445)	38,5±0,4 (n=1569)	40,5±0,4 (n=1445)
КГД + 30 хв	209,0±4,1* (n=1351)	246,9±4,1* (n=1495)	44,5±0,5* (n=1351)	45,4±0,5* (n=1495)
КГД + 60 хв	253,7±5,3* (n=1089)	212,3±5,2* (n=902)	49,6±0,6* (n=1089)	45,8±0,7* (n=902)

Число «n» відповідає кількості везикул;

* – $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Через 60 хв після КГД щільність СВ у пресинаптичних терміналях у порівнянні з контролем знижувалася на 45 % (до $104,3 \text{ од/мкм}^2 \pm 3,9 \text{ од/мкм}^2$) у простих та на 44 % (до $107,7 \text{ од/мкм}^2 \pm 7,6 \text{ од/мкм}^2$) у складних синапсах. Кількість СВ у найближчому до активної зони пулі зменшувалася на 62 % від рівня контролю (до $2,6 \text{ од} \pm 0,2 \text{ од}$) у простих та на 55 % (до $4,3 \text{ од} \pm 0,4 \text{ од}$) у складних синапсах. При цьому середня відстань до активної зони синапсу у порівнянні з

контролем збільшувалася приблизно на 13 % у простих та зменшувалася на 16 % у складних синапсах.

КГД впливала також на взаємне розташування СВ. Середня відстань до найближчої везикули через 30 хв після такої депривації у порівнянні з контролем збільшувалося на 15 % у простих та на 12 % у перфорованих синапсах (див. таблицю). Через 60 хв цей показник продовжував збільшуватися. У порівнянні з контролем підвищення склало майже 29 % у простих та 13 % у складних синапсах. Точкові графіки, що в кожному випадку містять дані сумарної популяції органел для 30 простих синапсів, яскраво ілюструють описані вище зміни просторового розподілу СВ (Рис. 3.35). Загалом можна зазначити, що КГД викликає суттєве зменшення загальної кількості СВ у пресинаптичній терміналі та порушення структури їх просторових кластерів.

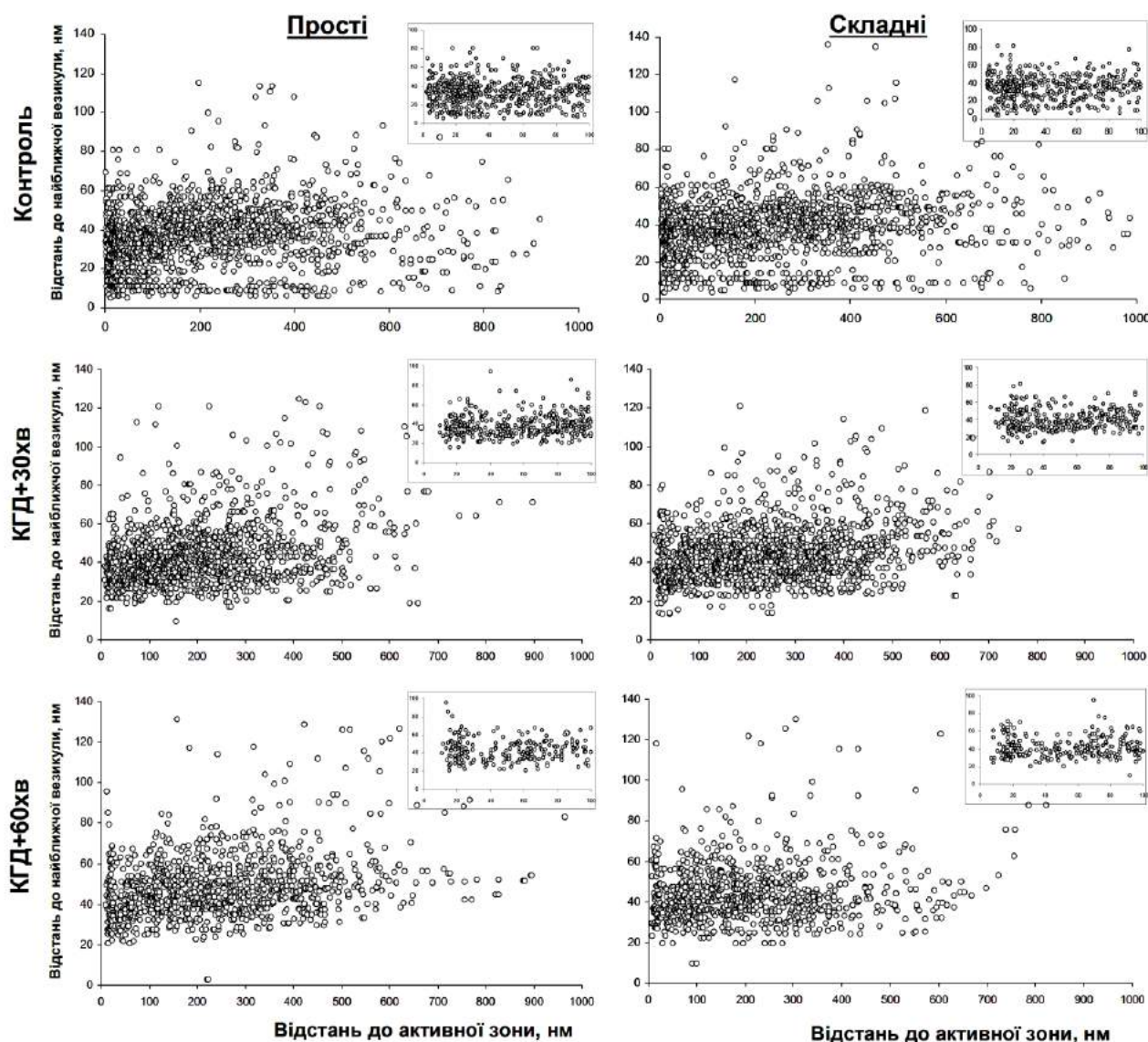


Рис. 3.30. Точкові графіки, що ілюструють розподіл синаптичних везикул (показники: відстань від синаптичної везикули до активної зони синапсу та до другої найближчої везикули) у простих і складних синапсах зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа через 30 та 60 хв після КГД. Виділені фрагменти відповідають розподілу пулу везикул, розташованих на відстані до 100 нм від активної зони синапсу.

СВ вважається морфологічним корелятом кванта нейромедіатора, що вивільнюється при надходженні нервового імпульсу або спонтанній

активації синапсу, хоча остаточних доказів цього твердження все ще бракує. У синапсах пірамідальних нейронів гіпокампа кількість і просторовий розподіл СВ корелюють з вірогідністю вивільнення нейромедіатора в процесі стимуляції синапсу [256]. Життєвий цикл СВ включає численні етапи, такі як транспорт та «пришвартування» цих органел до активної зони синапсу, злиття СВ з мембраною, що запускається іонами кальцію, ендоцитоз та утворення нових везикул [288]. Модифікація будь-якого з етапів циклу СВ може вплинути на здатність синапсу відповідати на повторну стимуляцію, модельним аналогом якої є ДТП.

Існують дані про те, що через 20 хв після індукції ДТП у синапсах, сформованих колатераліями Шафера у гіпокампі, значно збільшується кількість СВ, що контактують з мембраною активної зони, а також знаходяться біля неї. При цьому збільшується загальна щільність СВ та розміри дендритних шипиків [27]. Крім того припускають, що розміри активної зони синапсу є одним із факторів, що визначають вірогідність вивільнення нейромедіатора [261].

Після індукції ДТП у синапсах, що сформовані колатераліями Шафера у зоні CA1 гіпокампа щурів, спостерігали помітне зменшення відносної кількості СВ з депозитами кальцію. Такі зміни тривали не менше однієї години після індукції ДТП, і їх не спостерігали у зрізах, ДП яких була блокована антагоністом НМДА-рецепторів 2-аміно-5-фосфовалератом. Ці дані підтверджують, що ДТП може викликати довготривалі зміни у балансі кальцію та зменшення кількості СВ в результаті посиленого вивільнення нейромедіатора [203], що узгоджується з отриманими нами результатами.

Зміни просторового розподілу СВ та, відповідно, їх готовності до вивільнення нейромедіатора можуть бути зумовлені модифікаціями численних білків, що задіяні у процесах життєвого циклу цих органел.

У попередніх дослідженнях було показано, що рівень фосфорилювання білків СВ змінюється у різних фізіологічних чи патологічних ситуаціях. Так, SNAP-25 (від англ. synaptosomal associated protein), який відіграє ключову роль у екзоцитозі СВ, фосфорилюється після індукції ДТП чи епілептоформної активності [96]. Показано, що SNAP-25 бере участь у механізмах формування пам'яті [117]. Ще один білок СВ, синапсин, бере участь у регуляції кругооберту СВ через дисоціацію-реасоціацію з органелами в залежності від рівня фосфорилювання. Після ішемії були відмічені зміни у фосфорилюванні синапсину I, що іммобілізує СВ на актинових філаментах або на мембрані активної зони [41, 134]. Іншою родиною білків СВ є синаптотагміни, які беруть участь у процесах екзоцитозу та вивільнення нейромедіатора, викликаних деполяризацією та іонами кальцію. Рівень експресії синаптотагміну IV у гіпокампі значно підвищувався [338], а кількість білку *mint1* зменшувалася [218] після короткотривалої церебральної ішемії. *Mint1* та *mint2* беруть участь у транспортуванні СВ до активної зони, а також у транспорті мембранних білків до постсинаптичного ущільнення.

Дефіцит ще двох важливих білків СВ, синаптофізину та синаптогірину, значно послаблює коротко- та довготривалу синаптичну пластичність, незважаючи на те, що ці білки не беруть безпосередньої участі у вивільненні нейромедіатора. Отримані також дані про регулювальну роль BDNF (від англ. brain-derived neurotrophic factor) у високочастотній передачі сигналу через полегшення мобілізації та/чи «пришвартування» СВ, можливо, завдяки регуляції розподілу специфічних синаптичних білків [240].

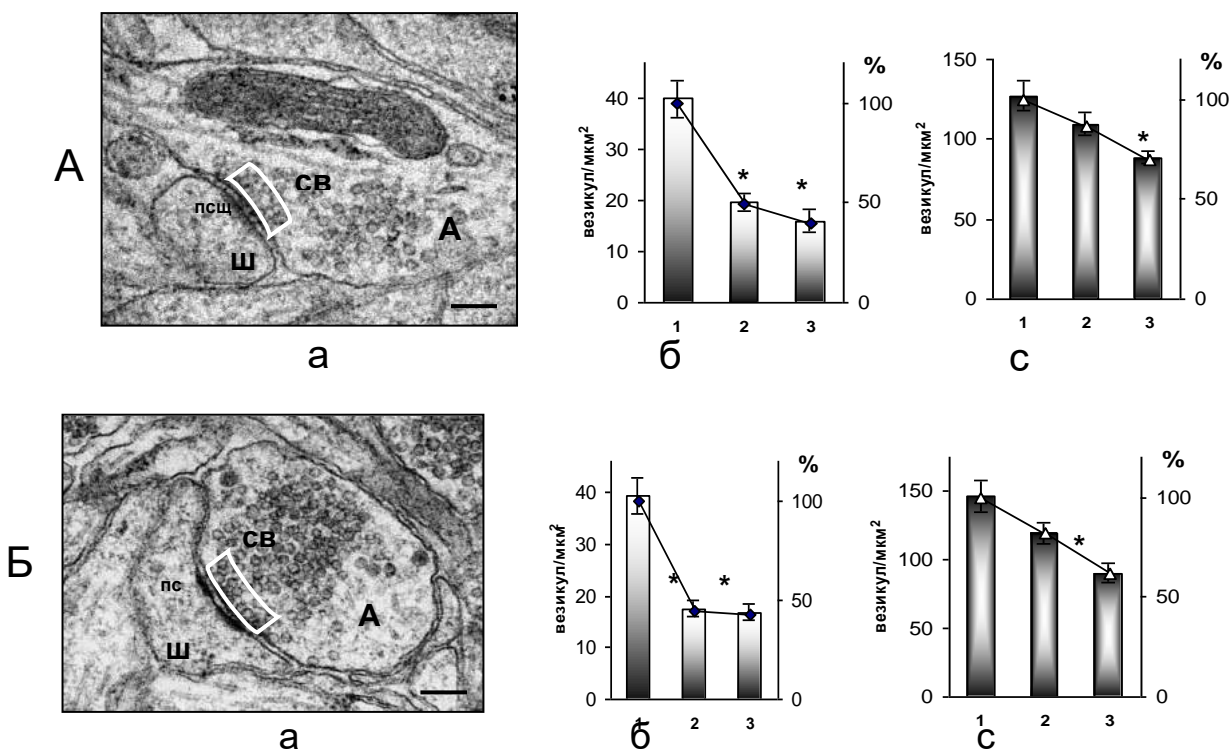
Наведені дані свідчать про те, що реактивна спроможність синапсу значною мірою визначається низкою складних біохімічних і структурних перебудов, що лежать в основі циклу пересування СВ.

Логічно припустити, що значна складність координації цього циклу у часі та просторі визначає його високу чутливість до фізіологічних і патологічних впливів. Зміни характеристик циклу СВ можуть сигналювати необхідність подальших пластичних трансформацій нейронних мереж.

У терміналях відбувається постійний перерозподіл везикул, тому представляє інтерес розгляд динаміки структурних перебудов окремих кластерів СВ. Накопичені у терміналі везикули розділяють на три основні пули: причалені везикули або готові до вивільнення, які безпосередньо примикають до мембрани активної зони терміналі (складають 1-2 % від всіх везикул); рецикуючі, які розсіяні переважно поблизу активної зони синапсу і поповнюються за рахунок зворотнього захвату медіатора або з резерву (10-20 %); третій – резервний пул, який кластеризується і не завжди буває задіяний у клітинну відповідь за нормальних фізіологічних умов (80-90 %) [248, 261]. Перші два пули характеризуються високою мобільністю у відношенні циркуляції усередині бутону та здатності до вивільнення медіатора, третій – представляє собою більш статичне накопичення СВ.

В цьому дослідженні СВ були умовно поділено на дві групи (Рис. 3.36): I – активні, що припустимо увібрали в себе перші дві описані групи (причалені та рецикуючі) і були розташовані на відстані 70 нм від активної зони синапсу, II – резервні, відстань до яких була більш ніж 70 нм. Оцінювали динаміку змін щільності СВ протягом 1 год після 10-хв КГД у простих та складних синапсах. Виявлено, що у 30 хв термін щільність СВ першої групи значно знижується як у простих, так і у складних синапсах. Напротязі наступних 30 хв ці показники змінюються не суттєво. Тобто спочатку везикули активно вивільнювалися, після чого їх рівень у цій зоні підтримувався на певному постійному рівні. Динаміка змін щільності СВ другої

резервної групи мала інший характер. Відбувалося рівномірне, більш повільне зниження цього показника протягом 60 хв дослідження. Динаміка змін у простих і складних синапсах була подібною. Ці дані підтверджують високу мобільність СВ першої групи і меншу – другої. Крім того, вони свідчать про поступовий перехід везикул з резервного пулу у активний. Враховуючи суттєве зниження протягом години після КГД загальної кількості СВ у синапсах обох типів (на 36 % і 46 % відповідно), можна казати про значну ступінь спустошення аксональних бутонів. У дослідях на культивованих нейронах гіпокампа нами виявлене поступове зниження швидкості вивільнення медіатора після короткотривалої КГД, що може бути пов'язано як з рухливістю везикул, так і здатністю мембрани реалізовувати екзо- та ендоцитоз медіатора.



*Рис. 3.36. Зміни щільності різних пулів синапситних везикул у збудливих синапсах зони CA1 stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа в умовах КГД та подальшої нормаксичної реоксигенації (1 – контроль, 2, 3 – 30, 60 хв після 10-хв КГД, відповідно) у простих (А) та складних (Б) синапсах: а – електроннограмми синапсів (білим контуром відмічена зона активного пулу везикул – 70 нм від активної зони синапсу), б – діаграма, що ілюструють зміни щільності синапсів активного пулу везикул, с – діаграма резервного пулу; n=50, * – $p < 0.05$ до контролю. Позначення: АТ – аксонна терміналь, Ш – дендритний щипик, ПСЩ – постсинаптична щільність, СВ – синаптичні везикули. Масштабна лінія – 100 нм.*

Результати наших досліджень свідчать про те, що КГД призводять до зменшення загальної кількості СВ у пресинаптичних терміналях, зниження їх щільності, а також виснаження пулу органел, готових до екзоцитозу. Зміни мають односпрямований характер як для простих, так і для складних синапсів. Всі ці події мають суттєвий вплив на синаптичну пластичність і свідчать про певну ступінь виснаження збудливих синапсів в умовах КГД, що може бути причиною подальшого розвитку функціональних порушень у CA1 нейронах. Отримані результати розширюють уявлення про ультраструктурні зміни в умовах активного функціонування синапсів при КГД.

3.4.1.4. Ультраструктурні зміни гальмівних синапсів зони CA1 культивованих зрізів гіпокампа у нормі та після КГД

Гальмівні синапси у гіпокампі, як правило, формуються між пірамідними нейронами і інтернейронами. У цьому розділі будуть розглянуті питання про ультраструктуру, локалізацію ГАМК-ергічних

гальмівних синапсів та зміни їх конформації у культивованих зрізах гіпокампа в нормі протягом першої години після КГД.

ГАМК-ергічні гальмівні синапси на сомі пірамідних нейронів і мають характерну симетричну форму ПСЩ, на відміну від асиметричної ПСЩ збудливих синапсів (Рис. 3.37, А).

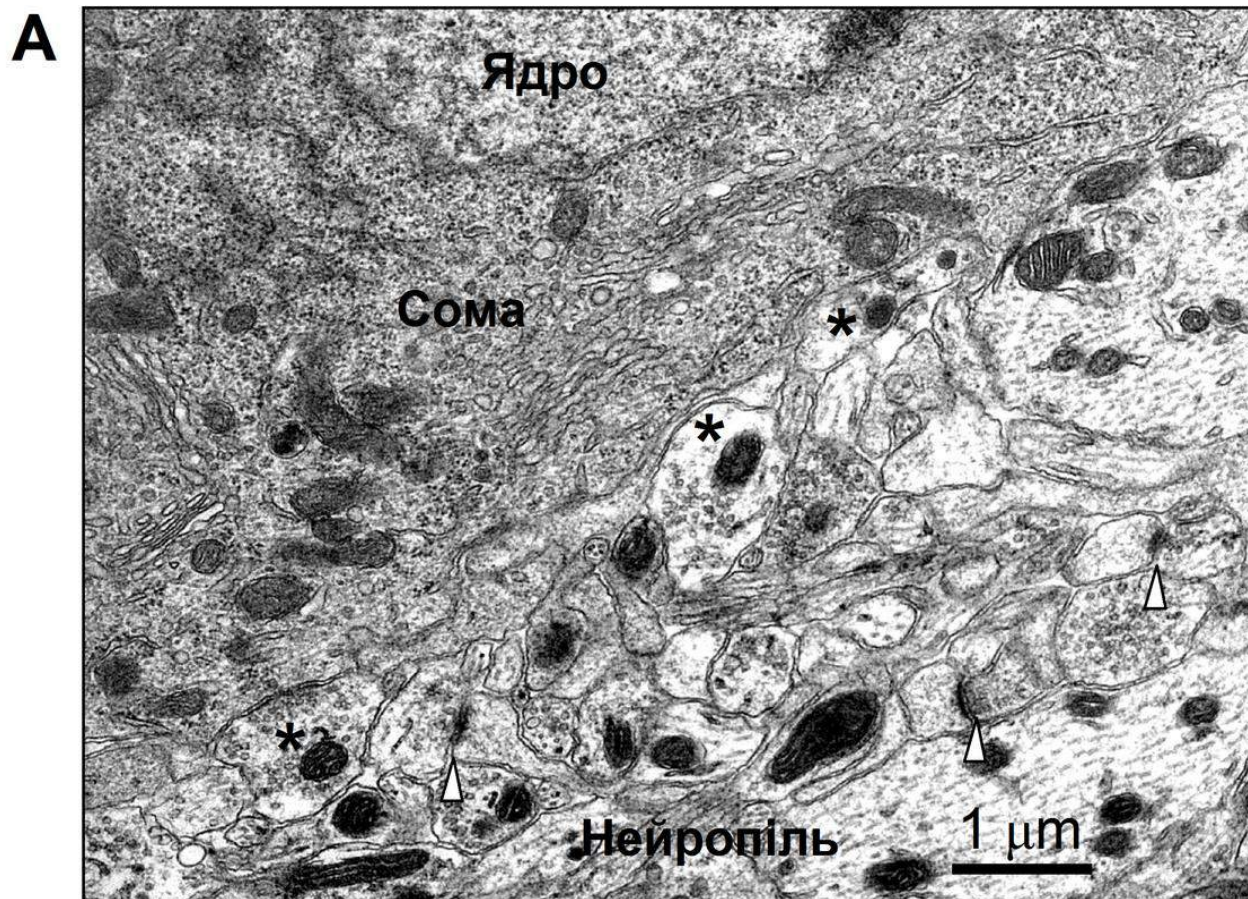
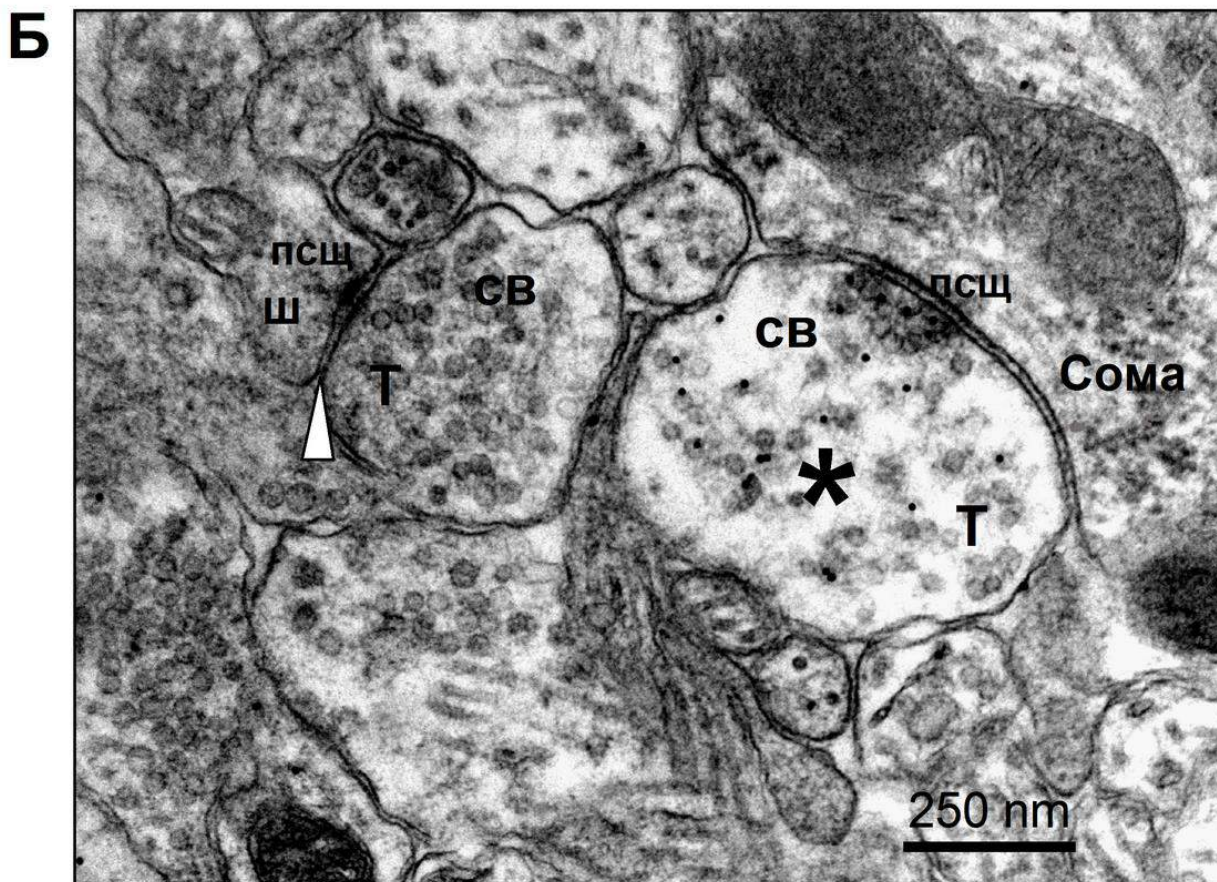


Рис. 3.37, А. Електронно-мікроскопічне фото, що ілюструє розташування гальмівних синапсів на сомі пірамідного нейрону зони CA1 культивованих зрізів гіпокампа.

Для їх ідентифікації на електроннограмах використовували ІМГХ метод з застосуванням специфічних анти-ГАМК антитіл, та вторинних антитіл, мічених колоїдним золотом (Рис. 3.37, Б). Це дало змогу виявити і охарактеризувати локалізацію цих гальмівних рецепторів.



*Рис. 3.37, Б. Електронно-мікроскопічне зображення збудливого і гальмівного синапсу після ІМГХ з анти-ГАМК антителами міченими колоїдним золотом (10 нм) Позначки: * – гальмівний симетричний синапс, Δ – збудливий асиметричний синапс, Т – терміналь, ш – шипик, псщ – постсинаптична щільність, СВ – синаптичні везикули.*

На основі серійних зображені ГАМК-ергічні гальмівні синапси були реконструйовані (Рис. 3.38). Виявлено, що, як і у випадку збудливих синапсів, їх ПСЩ може бути суцільною чи перфорованою/сегментованою. Виходячи з цього, гальмівні синапси були віднесені до категорії простих чи складних, відповідно.

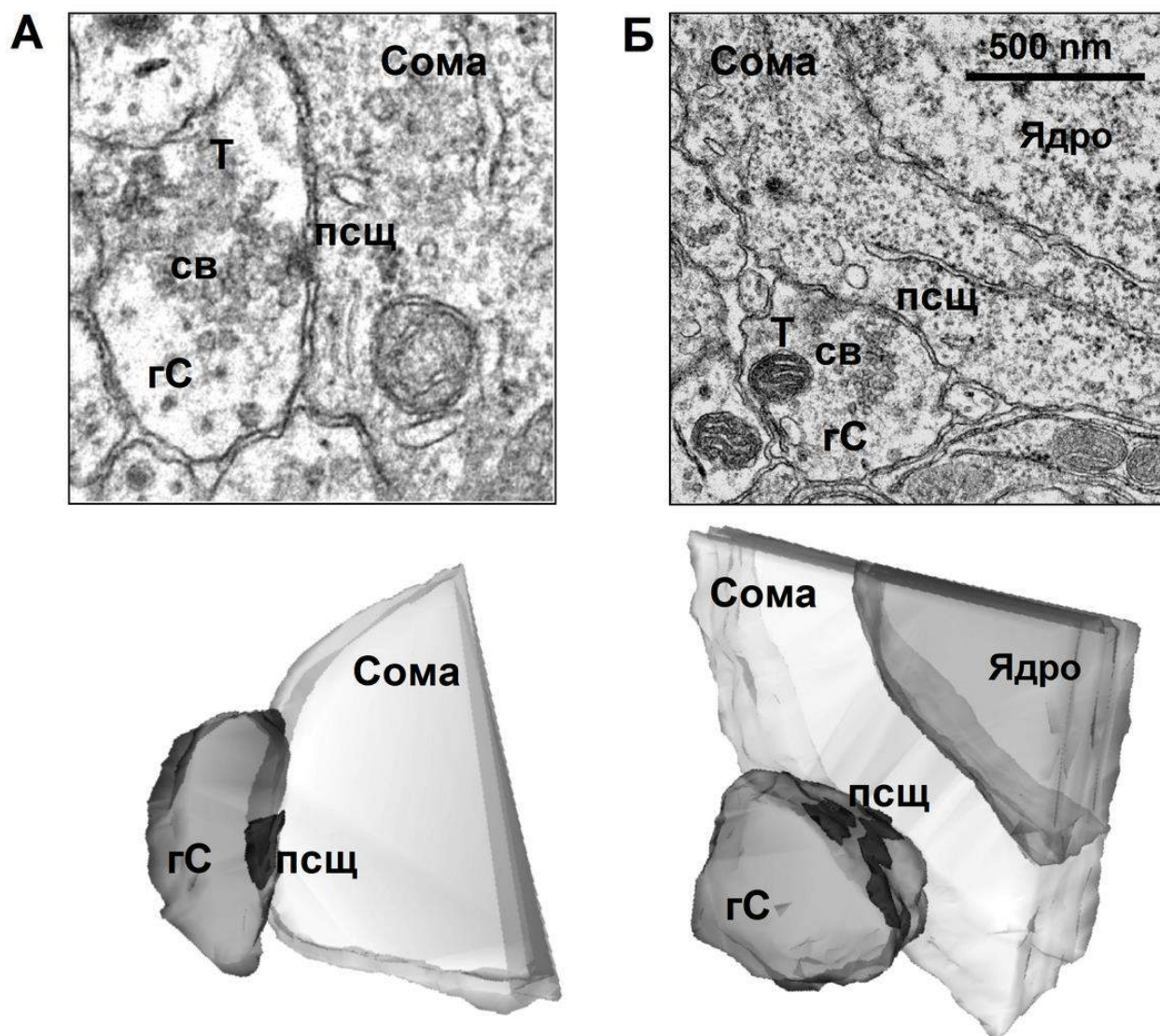


Рис. 3.38. Електронно-мікроскопічні фото аксо-соматичних контактів та тривимірні реконструкції гальмівних симетричних простого (А) і складного (Б) синапсів. Масштабна лінія 500 нм. Позначки: гс – гальмівний симетричний синапс, Т – терміналь, псщ – постсинаптична щільність, СВ – синаптичні везикули.

Проведено детальний морфометричний аналіз ультраструктурних параметрів ГАМК-ергічних гальмівних симетричних синапсів, розташованих на сомах пірамідних нейронів зони СА1 культивованих зрізів гіпокампа через 30 і 60 хв після КГД.

Оцінювали середню кількість синапсів на одиницю площі соми, об'єм терміналей інтернейронів, площу касання терміналі з сомою нейрону та площу ПСЦ.

Результати свідчать, що на проязі першої години після КГД середня кількість гальмівних синапсів достовірно не відрізняється від контрольних значень, у 60-хвилинний термін спостерігається певна тенденція до підвищення (Рис. 3.39). При аналізі співвідношення кількості простих і складних синапсів відмічалася чітка закономірність щодо зниження кількості простих і підвищення складних гальмівних синапсів.

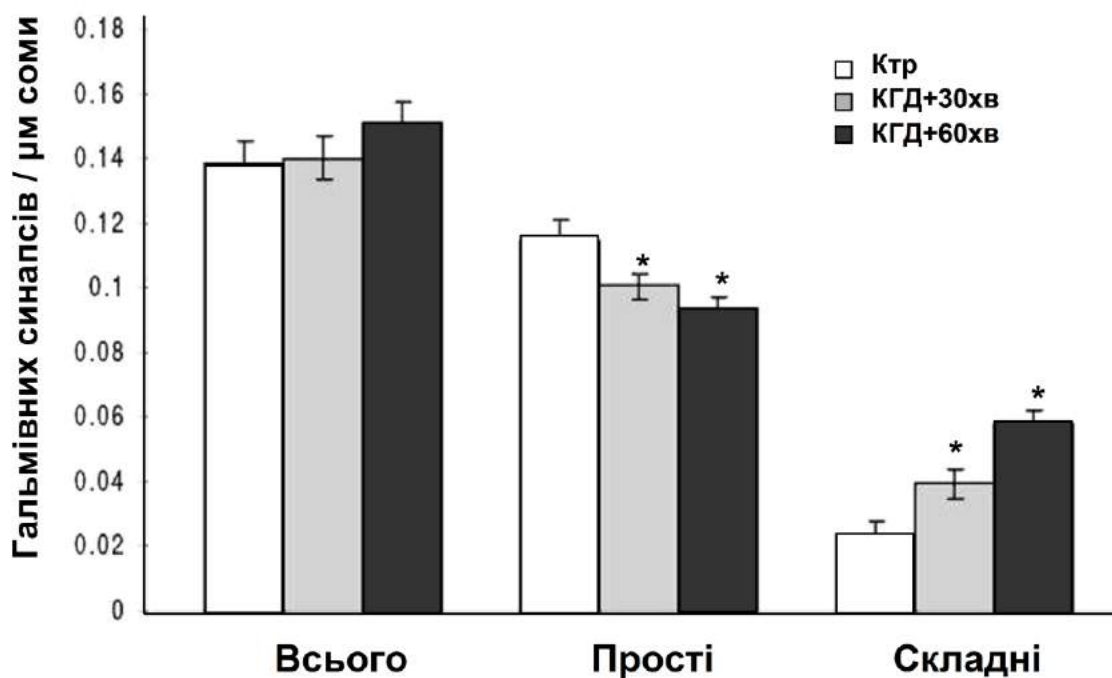


Рис. 3.39. Кількісна оцінка гальмівних синапсів CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа у нормі та через 30 та 60 хв після КГД. Для простих синапсів $n=30$, для складних – $n=20$.

* – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Об'єм терміналей простих синапсів не змінюється, але певною мірою збільшується об'єм терміналей складних через 30 хв після КГД. Через 60 хв підвищення цього показника було достовірним по відношенню до контрольних значень (Рис. 3.40).

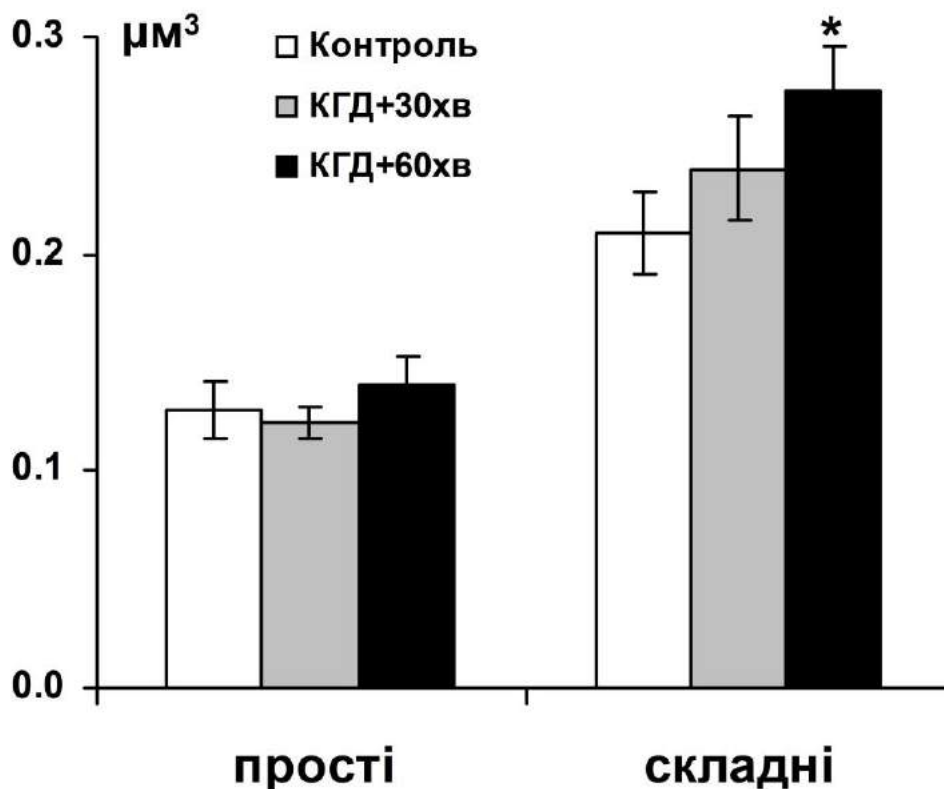


Рис. 3.40. Зміни об'єму терміналей гальмівних синапсів зони CA1 культивованих зрізів гіпокампа в нормі та через 30 та 60 хв після 10 хв КГД. Для простих синапсів $n=30$, для складних – $n=20$;

* – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Відповідно до об'єму, збільшувалася площа торкання терміналі інтернейрону з сомою пірамідного у випадку складних гальмівних синапсів (Рис. 3.41), яке складало 22,3 % і 24 % від контролю через 30 і 60 хв після КГД, відповідно.

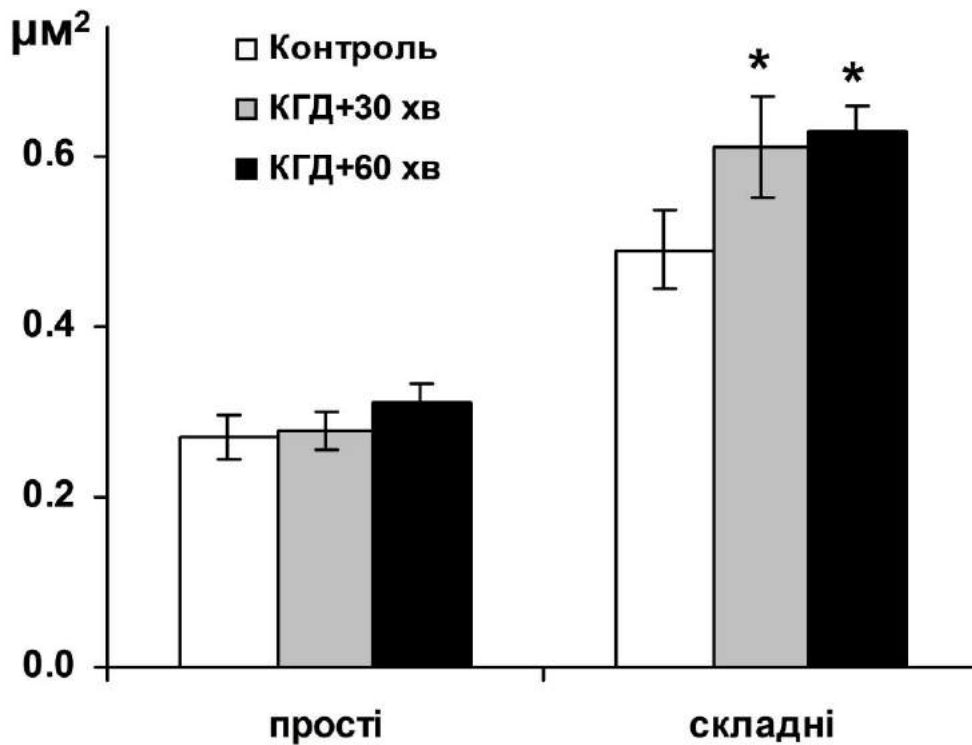


Рис. 3.41. Зміни площі торкання гальмівних синапсів з тілом пірамідних CA1 нейронів (А) у культивованих зрізах гіпокампа в нормі та через 30 та 60 хв після КГД. Для простих синапсів $n=30$, для складних – $n=20$; * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Звертає на себе увагу значне збільшення площі ПСЦ гальмівних синапсів за наших експериментальних умов, особливо виражене у випадку складної форми синапсу (Рис. 3.42).

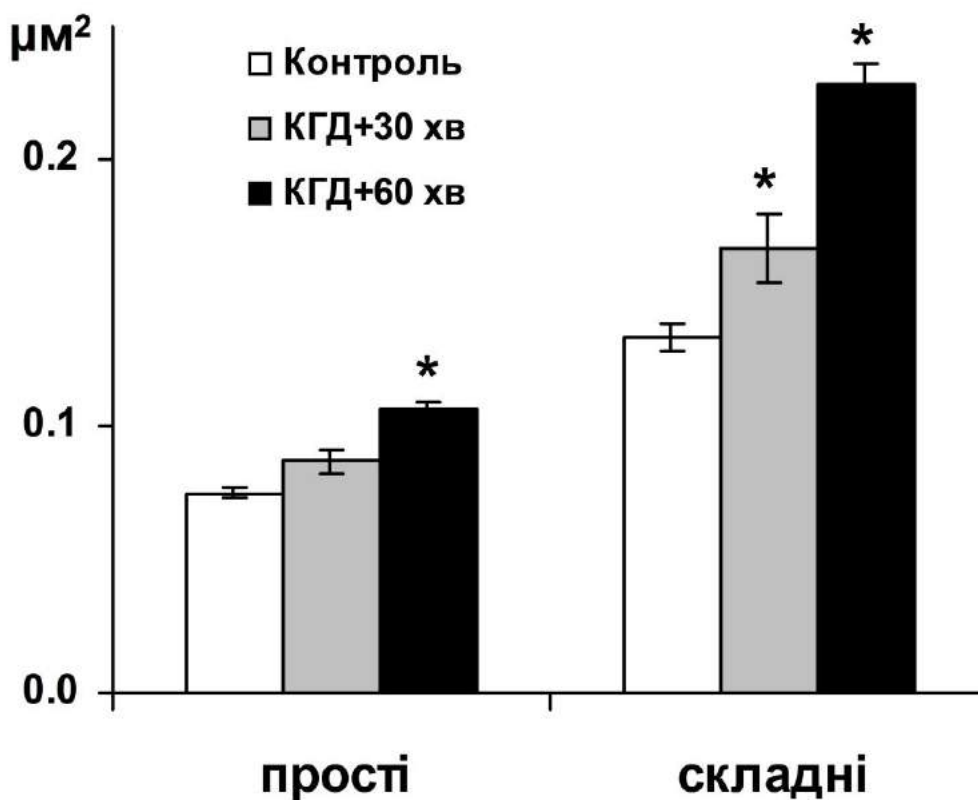


Рис. 3.42. Зміни площі ПСЩ гальмівних синапсів СА1 зони культивованих зрізів гіпокампа в нормі та через 30 та 60 хв після КГД. Для простих синапсів $n=30$, для складних – $n=20$;

* – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Враховуючи всі описані ультраструктурні зміни можна сказати, що протягом першої години після КГД відбувається активація ГАМК-ергічних гальмівних синапсів у зоні контактів інтернейронів з сомою СА1 пірамідних нейронів. Цей ефект виникає за рахунок розширення зони контактів, яка набуває неправильних перфорованих/сегментованих форм, що може свідчити про трансформацію простих синапсів у складні, згідно нашої класифікації.

Можна припускати, що такий механізм формування активної зони синапсів, аналогічним чином відбувається і у випадку збудливих

синапсів, а набування складної форми ПСЩ є ознакою активації синапсу.

Особливе розташування гальмівних синапсів інтернейронів на сомі пірамідних нейронів та їх активація після КГД свідчить про суттєвий вклад інтернейронів у модуляції функціонування та життєздатності найбільш спеціалізованих, орієнтованих на передачу сигналів пірамідних нейронів в умовах їх гіперактивації при КГД. Певною мірою інтернейрони можуть опосередковувати відстрочений характер ушкодження нейронів при ішемії.

3.4.2. Модуляція функціонального стану CA1 пірамідних нейронів культивованих зрізів гіпокампа за участі інтернейронів

Нестача кисню та глюкози призводить до системних змін у гіпокампальній тканині та активації механізмів ауторегуляції, зокрема обумовлених взаємодіями між пірамідними нейронами і інтернейронами [56, 57, 290], дослідження яких перспективно з точки зору можливості спрямованої корекції стану нервових клітин в умовах ішемічного ушкодження.

Роль інгібіторних інтернейронів у патогенезі ішемії мозку не повністю зрозуміла, і її дослідження не втрачає актуальності. Даний розділ акцентований на дослідженні механізмів, обумовлених взаємодією між CA1 пірамідними нейронами та інтернейронами через гальмівні ГАМК рецептори в умовах нашої експериментальної моделі після КГД.

Спеціалізовані пірамідні нейрони гіпокампа орієновані на передачу електричних сигналів за допомогою збудливих глутаматергічних синапсів, тоді як інтернейрони мають модулюючу функцію і є ГАМК-ергічними [164, 185], але розуміння їх взаємодії в

умовах нестачі кисню та глюкози неповне. Ми досліджували зміни синаптичної пластичності CA1 пірамідних нейронів, використовуючи метод позаклітинного відведення від CA1 пірамідної зони потенціалів дії, викликаних стимуляцією CA3 колатералей Шаффера. Реєстрували сумарну відповідь пірамідних клітин, які одночасно генерують потенціали дії (ПД) – популяційні спайки (ПС). Амплітуда популяційного спайка відображає кількість, амплітуду і синхронізацію одиночних ПД і служить мірою збудливості і синхронізації нейронів. Оцінювали амплітуду ПС та виявляли рівень фасилітація/депресія синаптичної передачі внаслідок дії парної стимуляції у культивованих зрізах за нормальних умов та через 1 і 4 год після 30-хв КГД, коли клітинний метаболізм культивованих гіпокампальних зрізів перебуває у відносно активному стані, а процес розвитку ішемічного ушкодження CA1 пірамідних нейронів перебуває на початковій стадії і має середню ступінь проявленості щодо впливу на їх функціональний стан. Фасилітацію/депресію визначали як співвідношення $A2/A1$, де $A1$ та $A2$ є амплітудами ПС, викликаних першим і другим імпульсами, відповідно.

Виявлено, що зниження життєздатності CA1 пірамідних нейронів, яке в наших експериментальних умовах певною мірою спостерігалось у 4-годинний термін (Рис. 3.5), супроводжувалося суттєвим зниженням амплітуди ПС (Рис. 3.43, А) та ефективності синаптичної відповіді, яка проявлялася як депресія (уповільнення) синаптичної передачі, і була найбільш вираженої при міжстимульному інтервалі 50 мВ у 1-годинний термін після КГД (Рис. 3.43, Б).

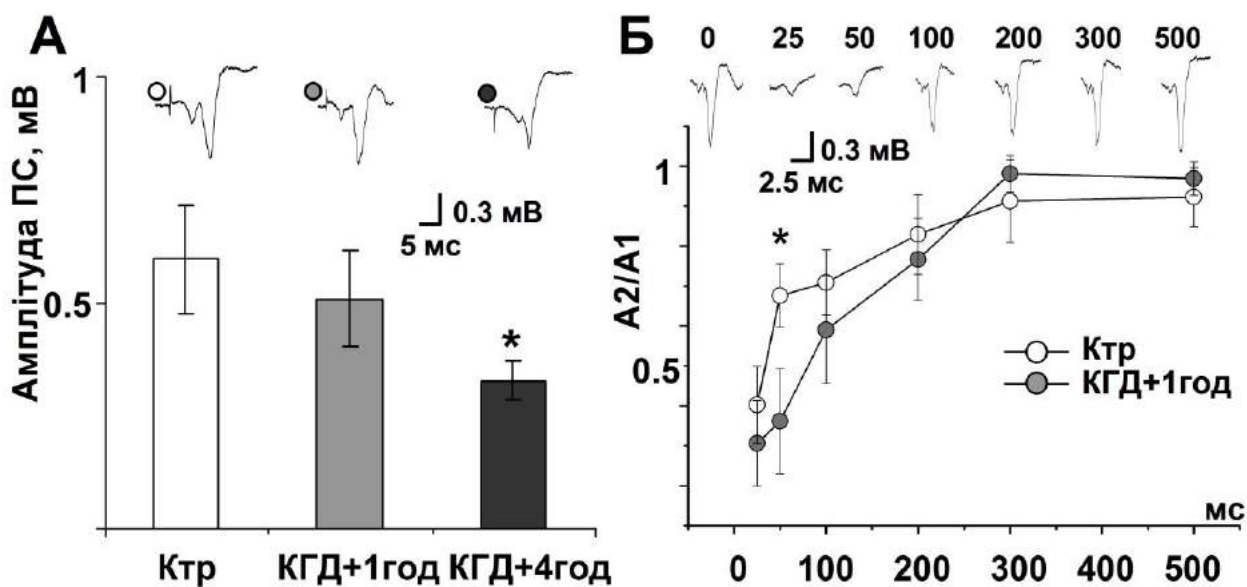


Рис. 3.43. Зміни синаптичної пластичності CA1 пірамідних нейронів культивованих зрізів гіпокампа після 30-хв КГД та наступної нормоксичної реоксигенації. А – амплітуда ПС; Б – рівень ефективності синаптичної передачі; $n=8$,

* – $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

Значною мірою ушкодження CA1 пірамідних нейронів опосередковане гіперактивацією збудливих глутаматергічних синапсів та глутаматною ексайтотоксичністю [195]. Цей феномен має місце в умовах нашої експериментальної моделі. У даній серії експерименту МК-801 (10 мкмоль/л) був присутній у культуральному середовищі за 30 хв до КГД протягом всього періоду культивування. Виявлено, що блокада глутаматних рецепторів МК-801 суттєво зменшує кількість ушкоджених клітин у пірамідній CA1 зоні гіпокампальних зрізів при КГД (Рис. 3.44). Тобто, в умовах нашої експериментальної моделі, підвищення кількості ушкоджених клітин певною мірою опосередкований глутаматною ексайтотоксичністю.

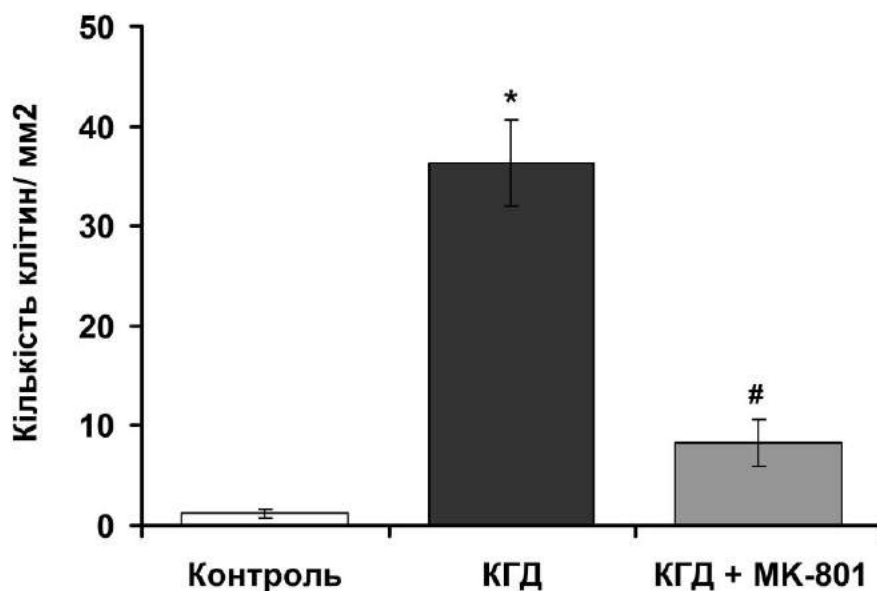


Рис. 3.20. Зміни кількості забарвлених трипановим синім СА1 нейронів гіпокампа в умовах КГД та подальшої реоксигенації 4 год в присутності МК-801; $n=10$, * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю, # – $p < 0.05$ по відношенню до КГД.

Інтернейрони, які є більш резистентними до КГД, модулюють функціональний стан пірамідних нейронів за умов їх надлишкової активації. Виявлено, що блокада ГАМК-рецепторів (ГАМК-Р) призводить до пошкодження СА1 пірамідних нейронів за нормальних умов та посилює ефекти КГД у наших експериментальних умовах (Рис. 3.45).

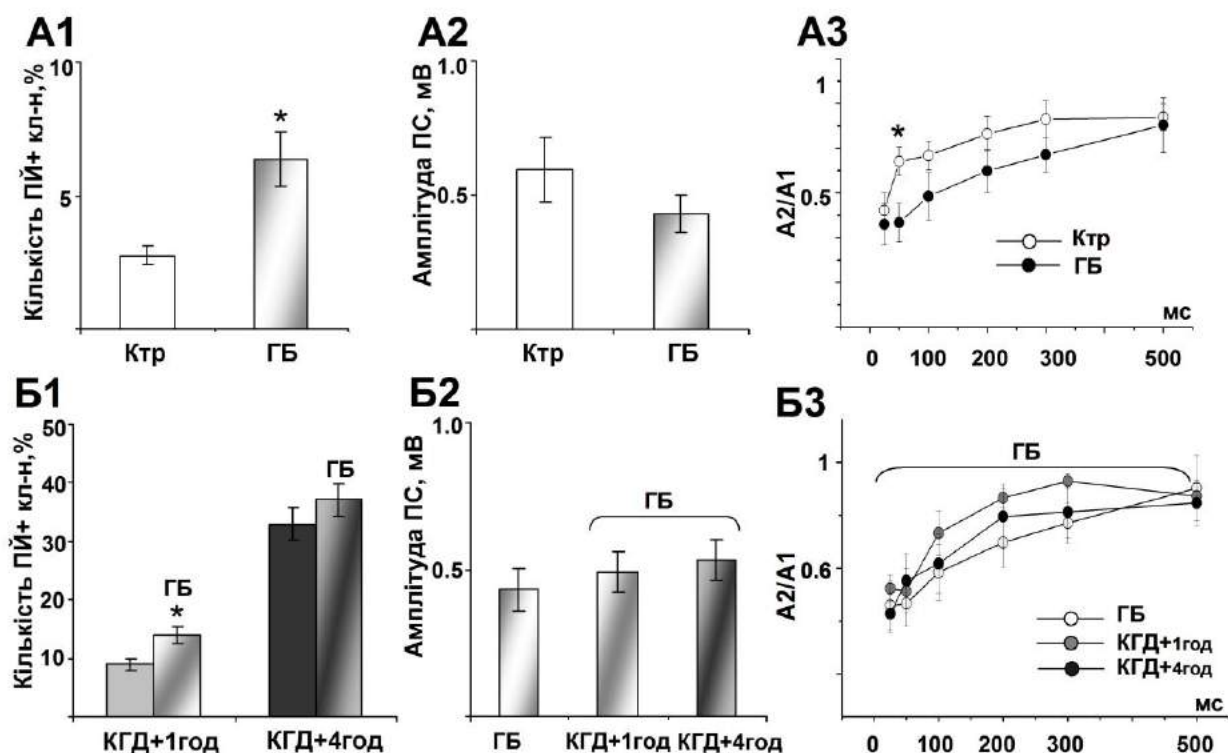


Рис. 3.45. Вплив блокади ГАМК-рецепторів на життєздатність та синаптичну пластичність СА1 пірамідних нейронів за нормальних умов (А1-А3) та після 30-хв КГД та нормоксичної реоксигенації 1 і 4 год (Б1-Б3); $n=10$; * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Для блокування гіпокампальних ГАМК-Р, які експресуються пірамідальними нейронами і інтернейронами, ми використовували габазін (ГБ), який є конкурентним антагоністом ГАМК-зв'язування і аллостеричним інгібітором хлорних каналів та інгібує гіперполяризацію клітинної мембрани [304].

У контролі блокада ГАМК-Р суттєво збільшувала кількість ПИ+ клітин у пірамідальному шарі СА1 зони до 6,39% від загальної кількості клітин, порівняно з контролем 2,76% (Рис. 3.45, А1). За цих умов амплітуда ПС істотно не змінювалася (Рис. 3.45, А2), але значно переважала синаптична депресія у співвідношенні А2/А1 ПС при

інтервалі 50 мс (Рис. 3.45, А3). Застосування ГБ за 30 хв до КГД призвело до збільшення кількості ПЙ+ клітин (Рис. 3.45, В1), яке становило 13,86 % та 35,26 % від загальної кількості клітин через 1 та 4 год після КГД, відповідно, перевищуючи ефекти КГД. Амплітуда ПС суттєво не змінювалася (Рис.3.45, Б2, Б3).

Нестача кисню та глюкози призводить до системних змін у клітинах гіпокампа та активації ендогенних механізмів, які опосередковані численними міжклітинними взаємодіями та внутрішньоклітинними сигнальними молекулами [168, 195, 201]. В даній роботі представлені результати щодо ролі деяких з таких молекул, які експресуються у гіпокампальних інтернейронах та приймають участь у модуляції життєздатності CA1 пірамідних нейронів, зокрема GAD67 (ізоформи-67 декарбоксилази глютамінової кислоти), $\alpha 7$ -nAChR ($\alpha 7$ -нікотинові ацетилхолінові рецептори) та Cx36 (конексин 36 – специфічний білок, характерний для електротонічних контактів). Ці сигнальні молекули відіграють важливу роль у реалізації і синхронізації механізмів ендогенної нейропротекції за умов розвитку нейродегенерації при нестачі кисню та глюкози.

Інтернейрони гіпокампа дуже різноманітні за хімічними характеристиками і неоднозначні що стосується чутливості до церебральної ішемії [56, 264]. Є дані про експресію у ГАМК-ергічних інтернейронах $\alpha 7$ nAChRs чи Cx36 окремо [21, 220, 138, 280, 328]. На культивованих зрізах гіпокампа нами вперше показано, що інтернейрони, які взаємодіють з пірамідними нейронами і більш стійкі до КГД, є ГАМК-ергічними, ацетилхолінчутливими (за рахунок експресії $\alpha 7$ -nAChR) та з'єднані між собою електротонічними контактами (Cx36+), оскільки у них спостерігається коекспресія відповідних білків (Рис. 3.46). Забарвлення не проявлялося в зоні CA1 пірамідних нейронів.

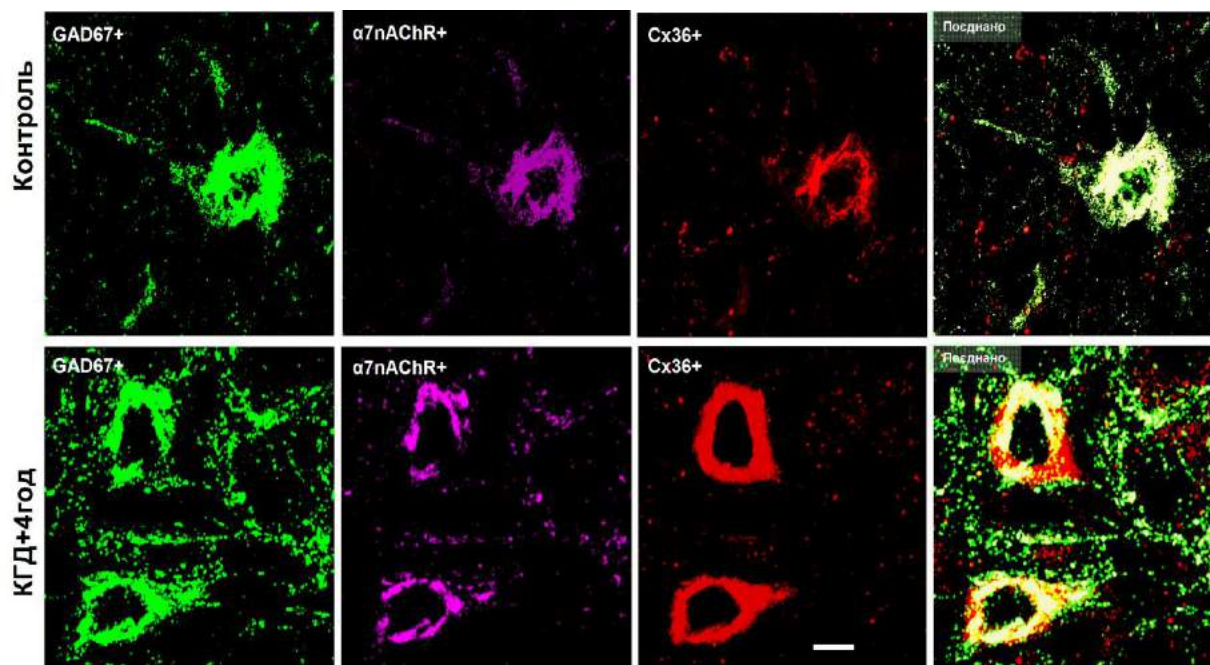


Рис. 3.46. Репрезентативні фото, що ілюструють колоколізацію GAD67, $\alpha 7$ -nAChR і Cx36 у інтернейронах культивованих гіпокампальних зрізів за нормальних умов та через 4 год після КГД. Масштабна лінія – 20 мкм.

Традиційно, КГД-стійкі інтернейрони характеризуються присутністю Ca^{2+} -зв'язуючих білків (наприклад, парвальбуміну) та меншою збудливістю порівняно з пірамідними нейронами [23, 340, 341]. Короткий час відкриття і швидка десенсибілізація $\alpha 7$ -nAChR інтернейронів обмежує ток Ca^{2+} у клітини [305]. Електричні Cx36+-канали, що формуються за рахунок самої структури білку, та метаболічні зв'язки між ГАМК-ергічними інтернейронами сприяють виживанню інтернейронів як за нормальних умов, так і у ранній період після ішемії [24, 220, 229].

В літературі є дані про те, що Cx36 експресується ГАМК-ергічними інтернейронами у гіпокампі ссавців [116, 246, 296, 311, 328].

Було показано, що за умов ішемії мозку, спостерігається високий рівень експресії $\alpha 7$ -nAChRs у ГАМК-ергічних інтернейронах [21, 83, 138]. Тільки деякі CA1 пірамідальні нейрони експресують $\alpha 7$ -nAChR, які здатні генерувати тимчасову періодичну деполяризацію і іноді викликати сплески потенціалів дії [135, 199, 289]. Є дані про модуляцію функцій пірамідних нейронів опосередковану $\alpha 7$ nAChRs гліальних клітин [201, 228].

Наявність виявленої нами коекспресії зазначених білків у гіпокампальних інтернейронах є важливим фактором їх КГД-резистентності у порівнянні з пірамідними нейронами. Щоб оцінити, чи КГД-стійкі GAD67+ інтернейрони, які експресують $\alpha 7$ -nAChR і Cx36, сприяють підтримці життєздатності гіпокампових CA1 пірамідальних нейронів, ми провели експерименти з використанням відповідних блокаторів, зокрема MLA – алкалоїд метиллікоконітин, антагоніст $\alpha 7$ -nAChR та КБК – карбенексолон, блокатор електричних контактів. На рис. 3.47 зображено схему, що ілюструє взаємодії між пірамідними нейронами і інтернейронами, які пов'язані з ГАМК і $\alpha 7$ -nACh рецепторами та Cx36+ електротонічними контактами: ГАМК-ергічні інтернейрони контактують з пірамідальними нейронами і один з одним через ГАМК-Р; $\alpha 7$ -nAChRs на GAD67+ інтернейронах посилюють ГАМК-трансмісію і викликають гальмування або розгальмування пірамідальних нейронів; Cx36-контакти забезпечують електричний та метаболічний зв'язок між інтернейронами [21, 24, 311].

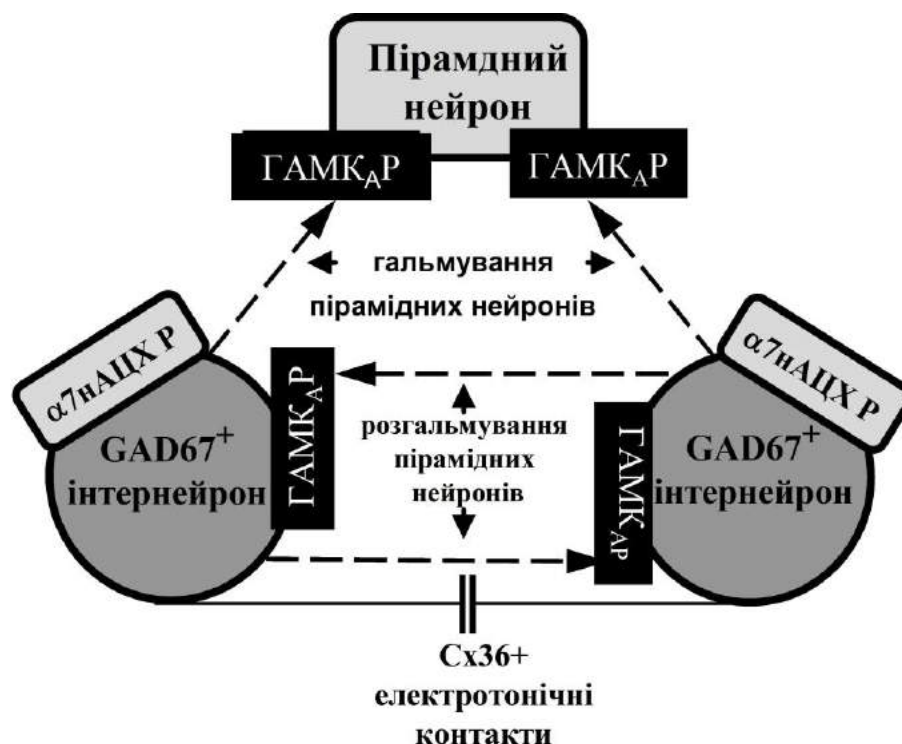


Рис. 3.47. Схема, що ілюструє взаємодії між пірамідними нейронами і інтернейронами, які пов'язані з ГАМК і $\alpha 7$ -nACh рецепторами та Сх36+ електротонічними контактами. Стрілки вказують на зв'язки пірамідальних нейронів та GAD67/ $\alpha 7$ -nAChR/Сх36 позитивних інтернейронів гіпокампа.

Нами було виявлено, що блокада $\alpha 7$ -nAChRs та Сх36-каналів за допомогою MLA та КБК [69, 71], відповідно, мають певні нейропротекторні ефекти (Рис. 3.48). За умов нашої експериментальної моделі кількість ПЙ+ клітин у СА1 пірамідній зоні була меншою ніж при КГД (4-годинний термін).

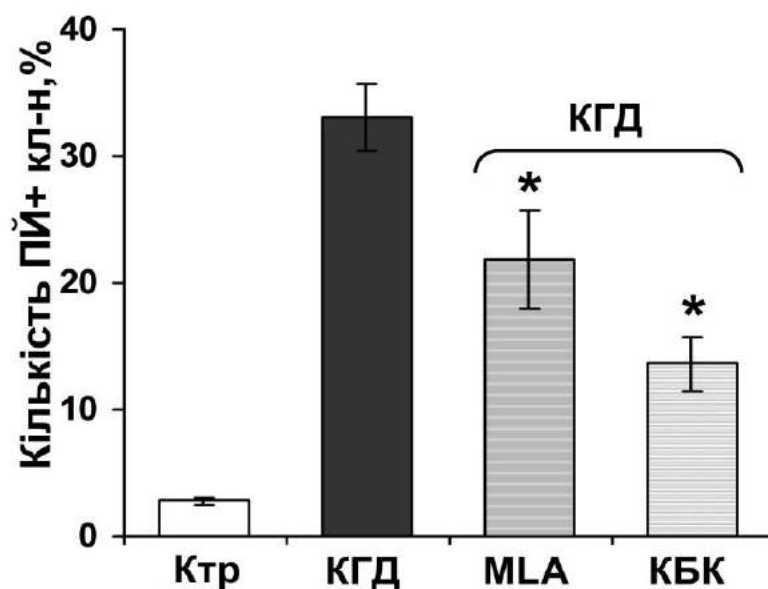


Рис. 3.48. Вплив блокади $\alpha 7$ -nAChRs (MLA) та Cx36-каналів (КБК) інтернейронів на життєздатність CA1 пірамідних нейронів культивованих гіпокампальних зрізів через 4 год після 30-хв КГД; $n=10$, * – $p < 0.05$ по відношенню до КГД.

Вплив $\alpha 7$ -nAChR та Cx36-каналів вважається модулюючим для інтернейронів у нормі та при ішемії [97]. Передбачається, що ці механізми здатні впливати на ГАМК-передачу гальмівних синапсів між пірамідними нейронами та інтернейронами [22, 87, 92, 264, 296, 305, 340]. Наші експериментальні дані підтверджують, що блокада $\alpha 7$ -nAChR та Cx36-каналів, які експресуються ГАМК-ергічними інтернейронами, може бути ефективним засобом нейропротекції для пірамідальних нейронів при розвитку ішемічного ушкодження.

Крім того, ми спостерігали, що КГД-стійкі інтернейрони дещо активуються у 4-годинний термін після 30 хв КГД, оскільки збільшується GAD67+ імунореактивність і мітохондріальна активність інтернейронів за наших експериментальних умов (Рис. 3.49, А, Б, відповідно). Використання блокаторів значною мірою нормалізує стан інтернейронів.

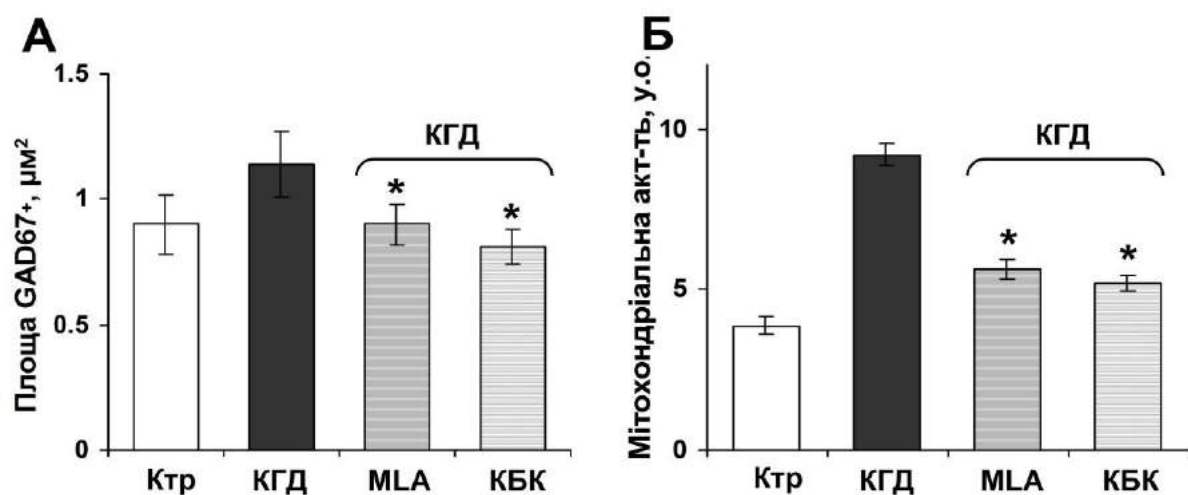


Рис. 3.49. Вплив блокади $\alpha 7$ -nAChRs (MLA) та Cx36-каналів (КБК) у моделі культивованих гіпокампальних зрізів на функціональний стан інтернейронів через 4 год після 30 хв КГД. А – площа GAD67+ імунореактивності. Б – рівень мітохондріальної активності; $n=10$, * – $p < 0.05$ по відношенню до КГД.

GAD67-імунореактивність і мітохондріальна активність значною мірою визначають метаболічні взаємоз'язки між інтернейронами [251]. Підвищена експресія GAD розглядається як ознака гіперактивності ГАМК-ергічних інтернейронів [163]. GAD-опосередкований ГАМК-синтез активується на ранньому етапі після КГД і супроводжується підвищеною активністю мітохондрій та надмірним вивільненням ГАМК у гальмівних синапсах [126, 185, 264]. Ці процеси викликають позаклітинне накопичення ГАМК, яке залежно від умов ішемії може або сприяти захисту, як це спостерігається у наших експериментальних умовах, або посилювати ушкодження і загибель пірамідальних 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 [122, 126, 193], що врешті-решт призводить до значного поліпшення життєздатності пірамідних нейронів. Ці результати дозволяють припустити, що колокалізація функціональних $\alpha 7$ -nAChR та Cx36-каналів у ГАМК-ергічних інтернейронах забезпечує умови для координування механізмів, пов'язаних з нікотиновими ацетилхоліновими, електротонічними та ГАМК-ергічними сигнальними системами, які мають значний потенціал ефективності для захисту від ішемічного ушкодження у гіпокампі.

Одже, ми можемо зробити висновок, що певний час після КГД, гіпокампульні інтернейрони, що експресують GAD67, $\alpha 7$ -nAChRs і Cx36, були резистентними до КГД, крім того у них спостерігалася активація синтезу/обміну ГАМК. ГАМК-Р та 7α -nAChRs та Cx36-канали мають здатність диференційовано модулювати виживання нейронів у CA1 пірамідальному шарі гіпокампульних зрізів в умовах КГД. Підвищена життєздатність інтернейронів та нормалізація синтезу/метаболізму ГАМК, викликаних блокадою $\alpha 7$ -nAChRs та Cx36, передбачає певну координовану кооперацію згаданих механізмів при КГД.

3.4.3. Роль гліцинових рецепторів у розвитку ішемічного ушкодження

Відомо, що у патогенезі головного мозку, зокрема при ішемії, задіяні гліцинові рецептори (GlyRs) [28, 40, 110, 233, 327]. GlyRs є гальмівними хлор-прониклими іонними каналами, що активуються гліцином. У центральній нервовій системі (ЦНС) вони переважно представлені у спинному мозку і стовбурі мозку, але також застрічаються у вищих ділянках головного мозку, включаючи гіпокамп [45, 112, 182, 308]. Роль інгібіторних рецепторів у патології мозку не повністю зрозуміла, і її дослідження не втрачає актуальності. У більшості випадків, швидке синаптичне гальмування в нормі і при патології, зокрема у гіпокампі, асоційоване з ГАМК-рецепторами [66, 202, 281], тоді як GlyRs привертають значно менше уваги дослідників. Було показано, що GlyRs грають важливу роль в модуляції ендогенної нейропротекції [160, 173, 182, 321]. GlyRs, в основному, пов'язують з нейронами, але було показано, що вони також виражені у гліальних клітинах [74, 206, 308]. Інтрасинаптично локалізовані GlyRs модулюють глутаматергічні, холінергічні, дофамінергічні і ГАМК-ергічні сигнальні шляхи. Відомо, що вони впливають на збудливість нейронних ланцюгів, обробку сенсорної інформації та приймають участь у контролі руху [31, 342, 333]. Екстрасинаптично локалізовані GlyRs беруть участь у нейрон-гліальних взаємодіях і значною мірою визначають життєздатність клітин. Активація GlyRs призводить до змін мембранного потенціалу, що, в свою чергу, модулює потік кальцію та наступні фізіологічні ефекти в клітинах [74, 151, 206]. Порушення іонного гомеостазу - це найбільш ранні зміни, які лежать в основі пошкодження клітин внаслідок дефіциту кисню та глюкози, що супроводжує більшість мозкових патологій, зокрема при ішемії [118,

141]. В гіпокампі GlyRs модулюють збудливість нейронних мереж, клітинного гомеостазу та життєздатності [80, 151, 182 333]. Незважаючи на те, що локалізація GlyRs була показана для нейронів і глія у гіпокампі [201, 228], дані про КГД-опосередковані зміни конфігурацій GlyRs, пов'язаних з пошкодженням клітини гіпокампа, відсутні.

У цьому дослідженні ми оцінювали GlyR-імунопозитивний сигнал (GlyR+) окремо для пірамідальних нейронів у CA1 пірамідній зоні (stratum pyramidale – SP) і у області, яка примикає до неї (stratum radiatum – SR) для аналізу астрогліальних клітин культивованих гіпокампальних зрізів (Рис. 3.50) у нормі та після КГД.

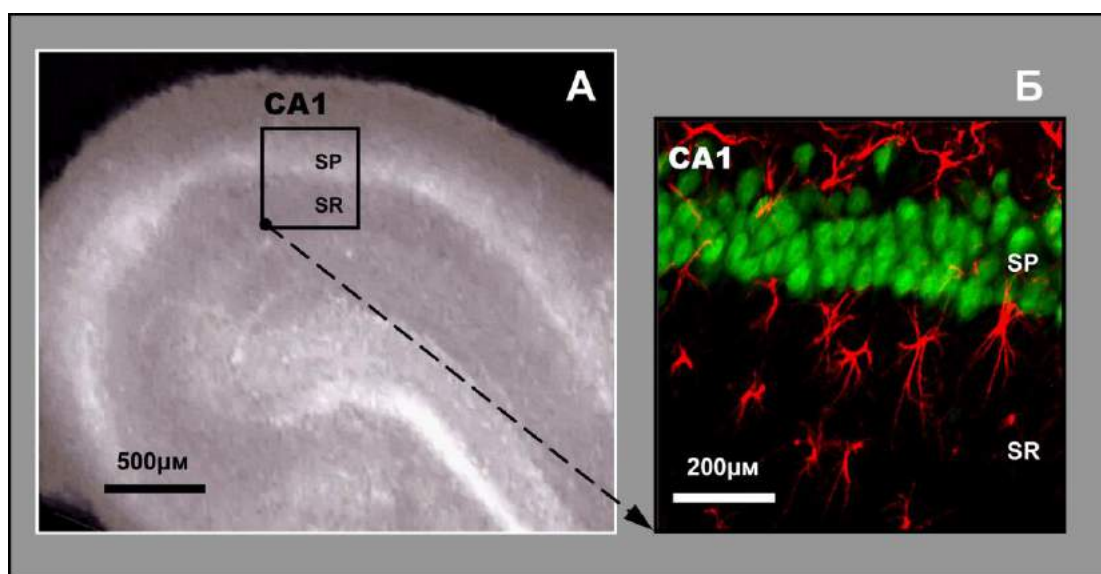


Рис. 3.50. Фото, що ілюструють зону інтересу для імуногістохімічного дослідження GlyRs у культурі гіпокампальних зрізів. А – досліджена ділянка CA1 зони позначена чорним квадратом на фазовому контрастному зображенні і включає CA1 пірамідний шар (stratum pyramidale – SP) та суміжної зони (stratum radiatum – SR). Б – конфокальне зображення подвійного NeuN (зеленого кольору) та GFAP (червоного кольору) забарвлення CA1 зони у контрольній групі.

Показано, що у зоні CA1 SP, GlyR⁺ сигнал локалізується переважно навколо NeuN⁺ ядра пірамідного нейрона (Рис. 3.51, A2, B2). У наших дослідженнях, хоча і виявлені порушення клітинних мембран та суттєві морфологічні зміни у регіоні CA1 SP через 24 год після КГД (Рис. 3.9), у 4-годинний термін тіонінове забарвлення показало, що значних змін морфології клітин та їх ядер у пірамідальних нейронах ще не відбувалося порівняно з контролем (Рис. 3.51 A1, B1).

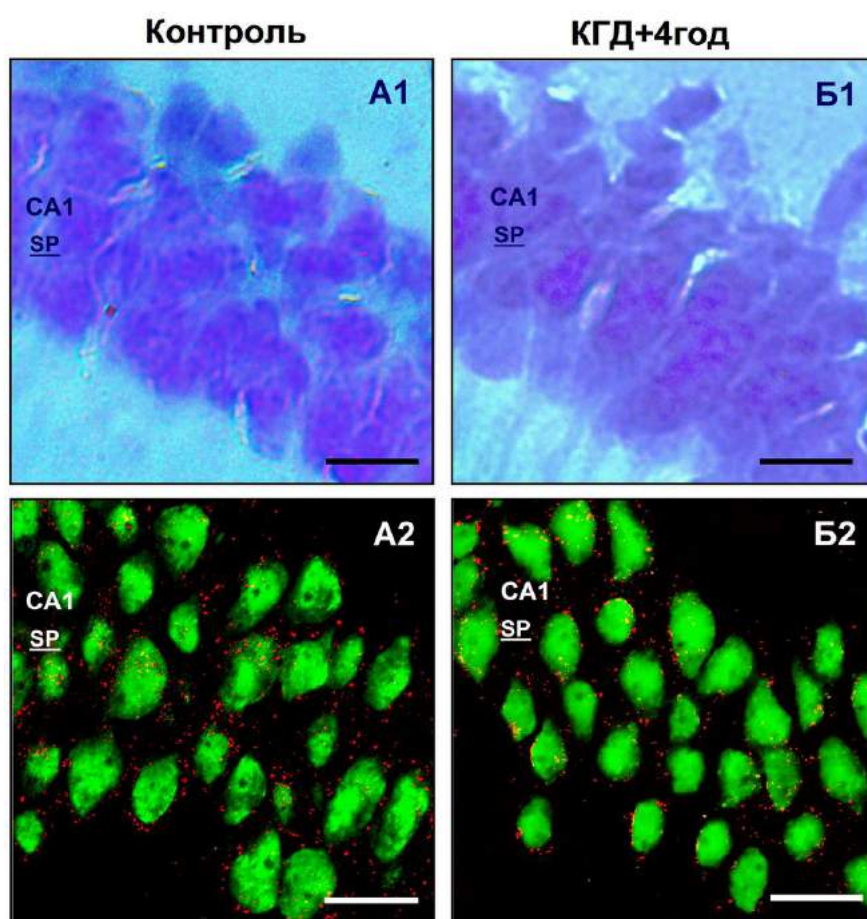


Рис.3.51. Фото, що ілюструють GlyR⁺ забарвлення у зоні CA1 SP культивованих зрізів гіпокампа у нормі та після 30-х КГД і 4-годинної нормоксичної реоксигенації. A1, B1 – фазово-контрасні зображення після забарвлення тіоніном. A2, B2 – конфокальні зображення подвійного GlyR (червоного) / NeuN (зеленого) іммунозабарвлення. Масштабна лінія – 50 мкм.

Вплив 30-хв КГД на експресію поверхневих GlyRs у культурі гіпокампальних зрізів оцінювали через 1 і 4 год. Показано, що у контролі інтегральна щільність GlyR+ флуоресценції становила $0,39 \pm 0,04$ (у.о.) у контролі, через 1 год після КГД вона знижувалася до $0,34 \pm 0,04$ (у.о.). У 4-годинний термін реоксигенації ми спостерігали посилення ефекту КГД - інтегральна щільність GlyR+ флуоресценції зменшувалася ще більше до $0,26 \pm 0,03$ (у.о.) (Рис. 3.52).

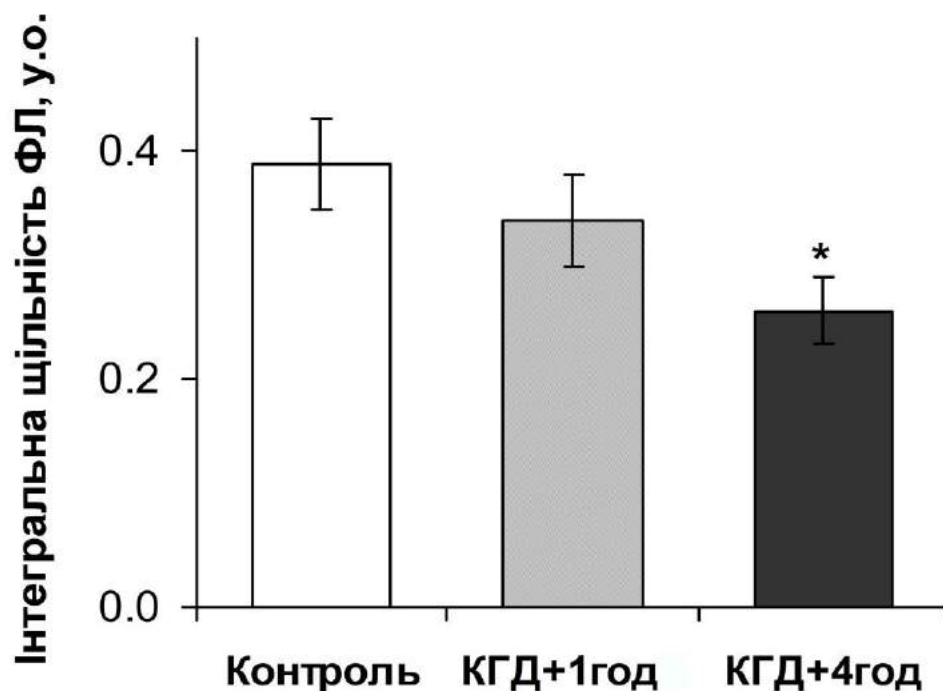


Рис. 3.52. Діаграма, що демонструють зниження імунореактивності GlyR+ у зоні CA1 SP культивованих зрізів гіпокампа через 4 год після КГД; $n=15$, * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

У подальших дослідженнях подвійне GlyR+/GFAP+ імуногістохімічне забарвлення виявило значну ко-локалізацію цих маркерів у CA1 SR культивованих зрізів гіпокампа (Рис. 3.53).

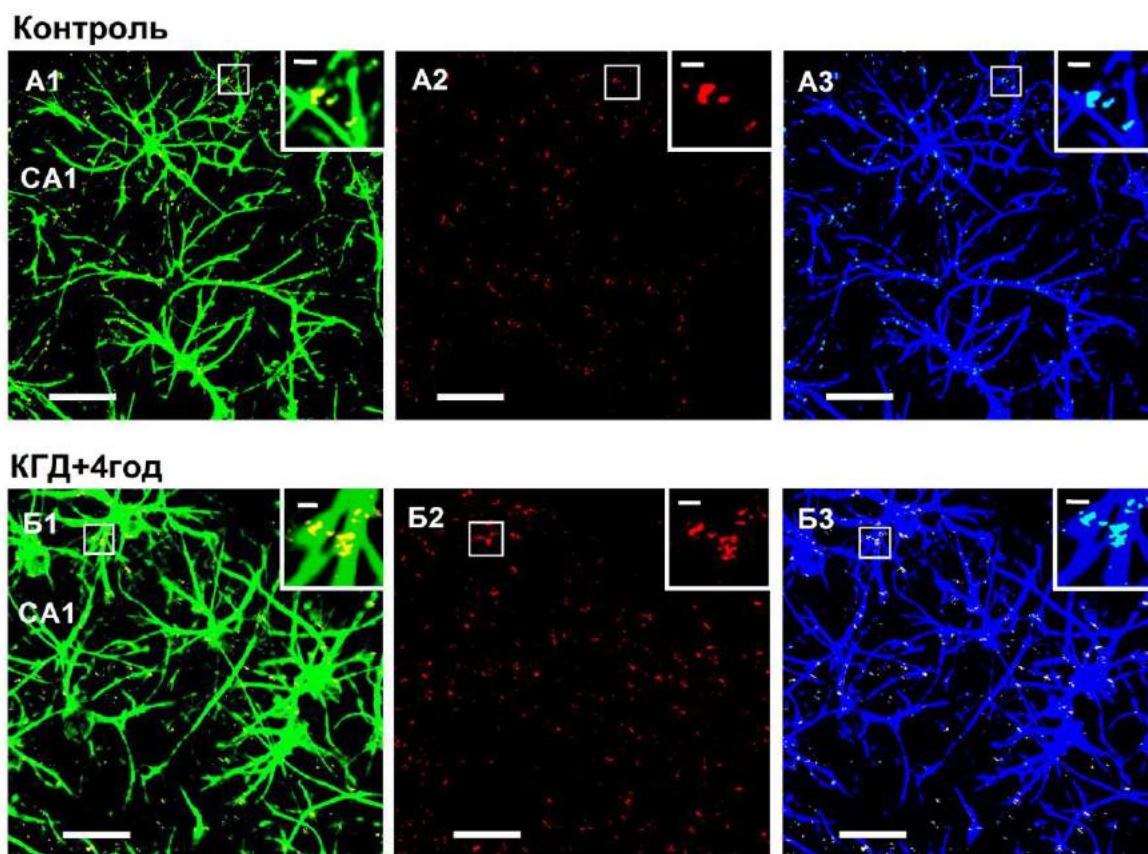


Рис. 3.53. Фото, що ілюструють подвійне GlyR+, асоційоване з астрогліальними клітинами у CA1 SR зоні культивованих зрізів гіпокампа за нормальних умов і після КГД. А – конфокальні зображення іммунозабарвлення у контролі: А1 – поєднано GFAP+/GlyR+ (зелений/червоний, відповідно; колокалізація - жовтий), А2 – окремо GlyR+ (червоний) та А3 – поєднано GFAP+/GlyR+ (псевдоколір, синя гама). В – теж саме іммунозабарвлення через 4 год після 30 хв КГД. Масштабна лінія – 100 мкм. Збільшені фрагменти виділено білим квадратом на всіх зображеннях (масштаб – 10 мкм).

Оцінка ефектів КГД на астрогліальні клітини показала збільшення GFAP+ площі через 1 і 4 год нормоксичної реоксигенації (Рис. 3.54, А). Хоча КГД призвело до активації астроглії, відносна кількість GlyRs, асоційованих з цими клітинами, не змінилася. Співвідношення інтегральної щільності GlyR+флуоресценції до GFAP+

площі не показало значних змін через 1 та 4 год після КГД (Рис. 3.54, Б).

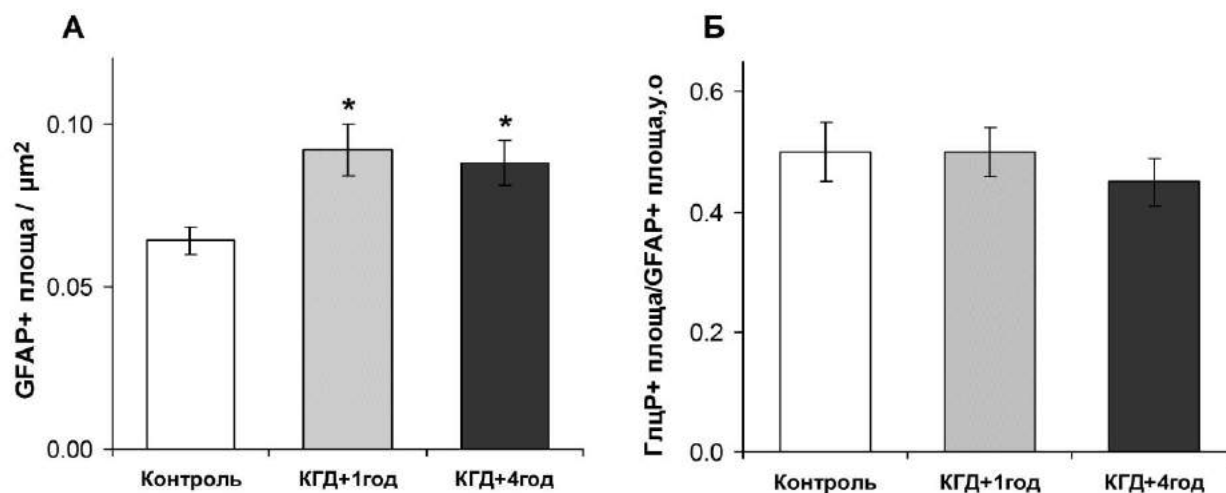


Рис.3.54. Кількісна оцінка GFAP+ площі (А) та співвідношення GlyR+/GFAP+ імунозабарвлення за нормальних умов та після КГД і нормоксичної реоксигенації 1 та 4 год; $n=15$,

* – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

У нашій експериментальній моделі відбувається перехід від стану гомеостатичного рівноваги до появи початкових ознак пошкодження клітин, коли порушення клітинного метаболізму відбуваються без прояву морфологічних змін у тілах нейронів. Різна чутливість клітин до КГД може бути обумовлена генетичними програмами та міжклітинними взаємодіями, що залежать у тому числі від стану рецепторного апарата. Використовуючи комбінованого ПЙ/ІМГХ забарвлення, ми показали, що астрогліальні клітини, на відміну від пірамідних нейрони були більш стійкими і не забарвлювалися ПЙ протягом періоду дослідження (Рис. 3.12). Показано їх суттєву активацію у наших експериментальних умовах за даними комбінованого GFAP/MT забарвлення (Рис. 3.16). Дослідження механізмів, що беруть участь у розвитку нейродегенерації на ранньому

етапі, є важливими, оскільки в цей час гомеостатичний баланс клітин гіпокампа зберігається, забезпечуючи так зване "терапевтичне вікно", коли фармакологічні втручання можуть запобігти пошкодженням клітин. Модуляція активності GlyRs має певний потенціал для розробки стратегій нейрозахисту, оскільки вони впливають на функціональну активність багатьох клітин.

Раніше було показано, що кластери GlyRs локалізуються дифузно у пірамідальних нейронах гіпокампа та астроглії як в сомах, так і у відростках [31, 45]. Перші з них переважно модулює життєздатність клітин, а другі - передачу сигналів. В умовах КГД гіперактивація NMDA-рецепторів, перенасичення збудливих клітин Ca^{2+} призводить до дисрегуляції іонів та енергетичного метаболізму. Подальший каскад ексайтотоксичних внутрішньоклітинних реакцій призводять до того, що нервові клітини пошкоджуються і гинуть [32, 141]. Показано, що ці процеси можуть певною мірою регулюватися гальмівними ГАМК-рецепторам і подальшою гіперполяризацією клітинної мембрани, оскільки підвищення ефективності ГАМК-Р у короткі терміни після ішемічного епізоду обмежує поширення деполяризаційної хвилі та вивільнення глутамату у зрізах мозку [66, 264].

Роль гліцинових рецепторів у процесах, що відбуваються у тканинах нейронів в умова дефіциту кисню і глюкози, вивчена недостатньо. Показано, що активація GlyRs може мати цитопротекторний ефект у постішемічний період. Агоністи GlyRs, гліцин і таурин мали нейропротекторний ефект, що сприяло відновленню ЗПСП у зрізах гіпокампа миші. Застосування конкурентного антагоніста GlyRs стрихніну відміняло цей ефект [294]. Активація ГАМК-Р та GlyRs таурином знижувало показник неврологічного розладу, об'єм інфаркту та втрату нейронів кори головного мозку та гіпокампа в умовах ішемії. Нейропротекторний

ефект таурину був блокований при застосуванні бікукуліну та стрихніну [321]. Стимулювання GlyRs після ішемії виявилось протективним не тільки у нервовій тканині. Порушення тканин тонкої кишки, викликаной ішемією-реперфузією, зменшувалося при введенні агоніста GlyRs β -аланіну [46].

Проте ефект гліцину в умовах ОГД може бути неоднозначним. На *in vivo* і *in vitro* моделях ішемії мозку гліцин мав різну роль, залежно від його концентрації. Додавання гліцину у низькій концентрації посилює пошкодження нейронів шляхом підвищення функціональної активності NMDARs, у той час як при високій концентрації гліцин демонструє нейропротекторний ефект [336]. Це явище можна пояснити неоднозначністю гліцину, як нейромедіатора: водночас він є агоністом інгібуючих GlyRs та співактиватором збудливих NMDARs [131]. Таким чином, підтримка високого рівня експресії поверхневих GlyRs у клітинах гіпокампа може бути важливою для збереження рівноваги збудження/гальмування у нейронних ланцюгах. Імовірно, коли кількість GlyRs зменшується гліцин, більшою мірою буде взаємодіяти з NMDAR, провокуючи зміну балансу концентрації іонів та надмірне збудження мережі. Таким чином, зменшення кількості GlyRs на поверхні пірамідальних клітин, яке було продемонстровано у даному дослідженні, може впливати на розвиток шкідливого впливу КГД, сприяючи поширенню NMDA екситотоксичності та пошкодження нервових клітин.

Дисрегуляція експресії нейромедіаторних рецепторів на поверхні мембран є одним з важливих подій у розвитку ішемічного ушкодження. Розуміння цього процесу має вирішальне значення для розробки ефективного лікування при ішемії головного мозку. Показано, що після КГД рівень поверхневої експресії глутаматних рецепторів змінюється та збільшується внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} [230]. Експресія

ГАМК-Р знижується при КГД, що сприяє загибелі нервових клітин [119, 202]. Було показано, що кортикальний інфаркт супроводжується зниженням експресії ГАМК-Р, що було пов'язано з підвищенням збудливості нейронів. Фармакологічне потенціювання ГАМК-Р демонструвало нейропротективний ефект у випадку ішемічної ураження головного мозку *in vivo* [264]. Стимуляція активності GlyRs специфічними модуляторами може мати нейропротекторний ефект.

Модулююча роль інгібіторних синапсів залежить як від концентрації медіатора, так і від кількості рецепторів. У наших експериментальних умовах виявлено, що КГД призводить до зменшення GlyR⁺ рецепторів, локалізованих у зоні CA1 пірамідальних нейронах у культивованих зрізах гіпокампа у 4-годинний термін після КГД. Зниження кількості GlyRs може сприяти посиленню пошкоджень пірамідних нейронів. Відносно астрогліальних клітин, можна сказати, що їх активація, яка спостерігалася у наших експериментах не вплинула на відносну експресію GlyRs у цих клітинах після КГД. Ці результати узгоджуються з дослідженнями, які демонструють, що астроцити менш схильні до впливу КГД ніж нейрони [25]. Підтримка високого рівня експресії поверхневих GlyRs у клітинах гіпокампа може бути важливим для збереження рівноваги збудження/гальмування у нейронних ланцюгах після КГД та більшій життєздатності нервових клітин.

Таким чином, ми припускаємо, що GlyRs є одним з важливих факторів, що визначають життєздатність CA1 пірамідальних нейронів гіпокампа при КГД. Розуміння ендогенних нейродегенеративних процесів може виявити додатковий потенціал для розробки ефективних терапевтичних стратегій нейрозахисту шляхом модуляції сигнальних шляхів, опосередкованих, у тому числі GlyRs. Фармакологічну корекцію GlyRs можна вважати перспективним напрямком для

усунення негативних ефектів, зумовлених дефіцитом кисню та глюкози.

Основні результати **розділу 3.4** опубліковані у таких статтях:

[8, 149, 177, 179, 181, 274, 318, 319].

3.5. Роль NCAM у розвитку ішемічного ушкодження

Одним з ключових факторів, що впливають на функціонування та пластичність нервової тканини у нормальних умовах та при патології є нейронні молекули клітинної адгезії (NCAM, від англ. neural cell adhesion molecule). NCAM – це багатофункціональний глікопротеїн плазматичної мембрани нервових 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 значною мірою зумовлює міжклітинні взаємодії, синаптогенез і залежну від функціонування синаптичну пластичність [35, 55]. NCAM відповідають за клітинну адгезію, опосередковують міграцію, проліферацію і виживання клітин. Відомо, що FGFR (рецептор фактора росту фібробластів) є одним з партнерів NCAM, що модулює NCAM-залежну сигналізацію [91]. Дисрегуляція функцій NCAM може мати негативні функціональні наслідки для життєздатності клітин, зокрема при ішемічному ушкодженні мозку [81, 267]. Проведені численні дослідження *in vivo*, які виявили модулюючу роль NCAM у навчанні та пам'яті, показаний значний внесок синаптичної пластичності у цих процесах [168, 207, 239]. Даних, щодо впливу NCAM на життєздатність та структурні перебудови нервових клітин у процесі розвитку при ішемічному ушкодженні, недостатньо.

Синтезовані штучні пептиди, які повторюють послідовність амінокислот подібну частині молекули NCAM та імітують різні типи зв'язування цієї молекули [77]. Показаний їх суттєвий стимулюючий вплив на нейритогенез, синаптогенез та активність синапсів. Виявлено, що один з таких пептидів FGL, який складається з 15 амінокислот і є міметиком гетерофільного зв'язування NCAM з FGFRs, які ініціюють численні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, запобігав зниженню активності та життєздатності нейронів [144, 145]. Для виявлення ролі NCAM у розвитку ішемічного ушкодження в умовах нашої експериментальної моделі використовували синтетичний пептид FGL та агоніст FGFRs [37].

Виявлено, що додавання у середовище FGL за 24 год до КГД запобігало ушкодженню нейронів культивованих зрізів. Достовірно зменшувалася кількість CA1 нейронів з ознаками пошкодження плазматичної мембрани, за результатами забарвлення ПЙ, у 4- та 24-годинний термін дослідження (Рис. 3.55).

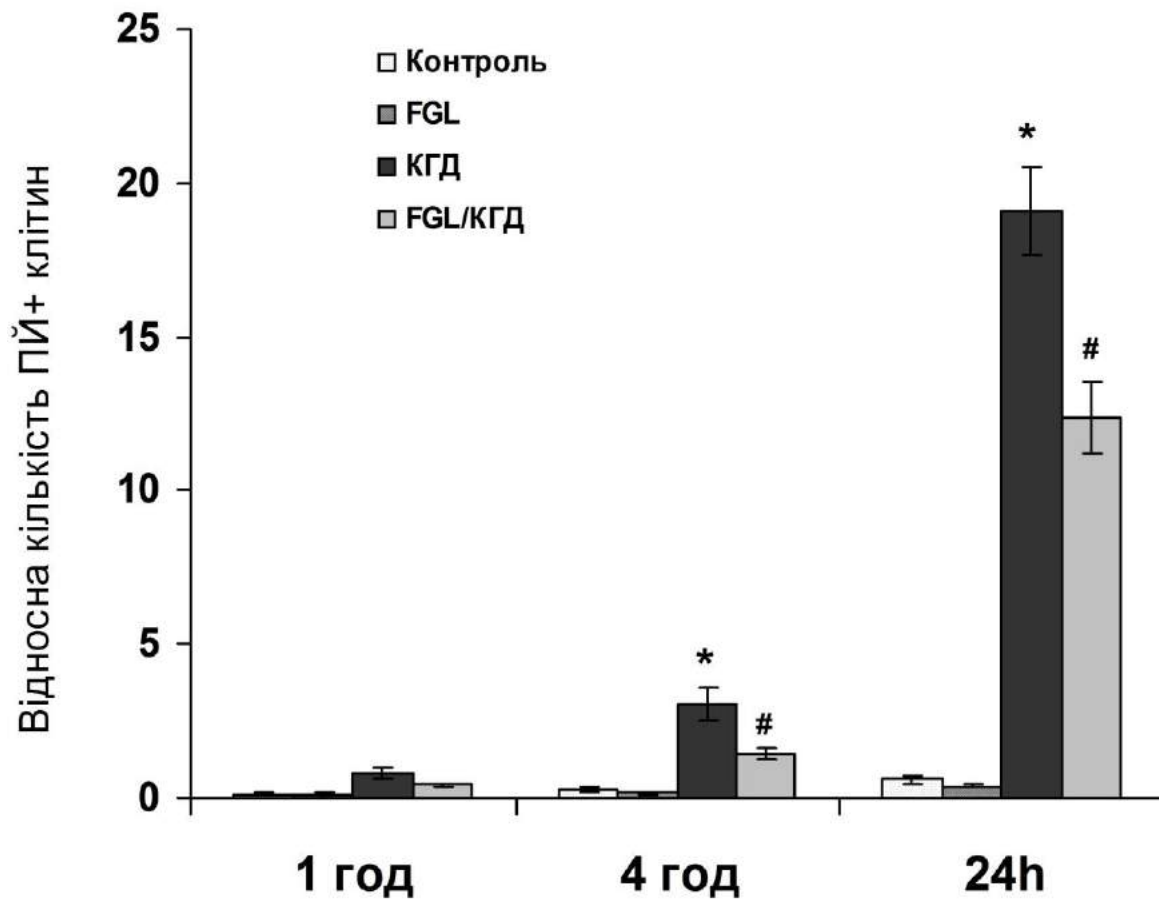


Рис. 3.55. Зміни життєздатності культивованих зрізів гіпокампа за забарвленням вітальним барвником пропідіумом йодідом, при дії синтетичного пептидного міметика NCAM – FGL у нормальних умовах та після КГД; $n=10$, * – $p<0.01$ відносно контролю, # – $p<0.01$ відносно КГД.

Спостерігалася стабілізація клітинного метаболізму. За даними МТС-тесту, загальна мітохондріальна активність гіпокампальних культур була достовірно більшою у порівнянні з КГД (Рис. 3.56). Інкубація культур з контрольним пептидом (Контроль П), в якому одна амінокислота була замінена на аланін, не впливала на рівень МТС клітин ні в нормальних, ні в аноксичних умовах. Ефекти FGL не проявлялися при одночасному додаванні блокатора FGF рецептора -

SU5402. Це свідчить про те, що дія FGL реалізується через FGF рецептор.

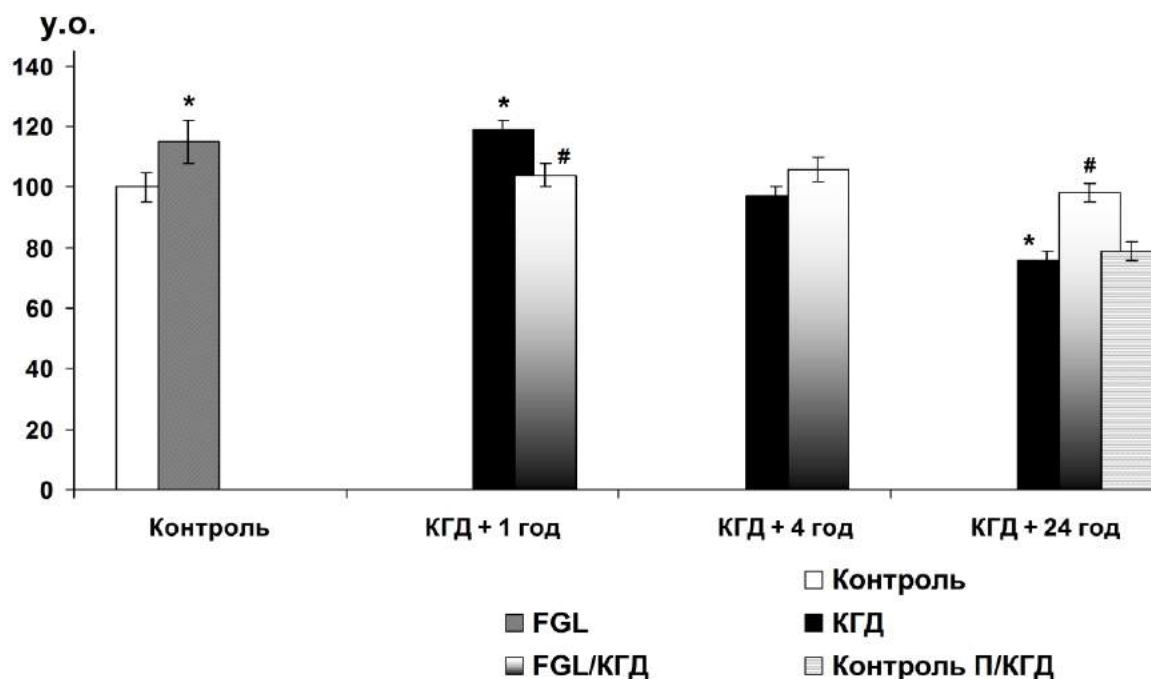


Рис. 3.56. Зміни загальної мітохондріальної активності культивованих зрізів гіпокампа при дії FGL за нормальних умов та після КГД ; $n=10$, * – $p < 0.05$ відносно контролю, # – $p < 0.05$ відносно КГД.

Проведена морфологічна оцінка пірамідальних нейронів CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа. На напівтонких зрізах, забарвлених метиленовим синім, за допомогою світлової мікроскопії оцінювали кількість конденсованих і набряклих клітин при дії FGL як у нормальних умовах так і після КГД. Показано поступове зростання у часі ушкодження гіпокампальних зрізів після КГД та подальшої реоксигенації 1, 4 та 24 год. Кількість конденсованих і набряклих клітин зростала і була найбільш вираженою у 24-годинний термін.

Внесення у культуральне середовище пептиду FGL призводило до зменшення ушкоджених клітин (Рис. 3.57).

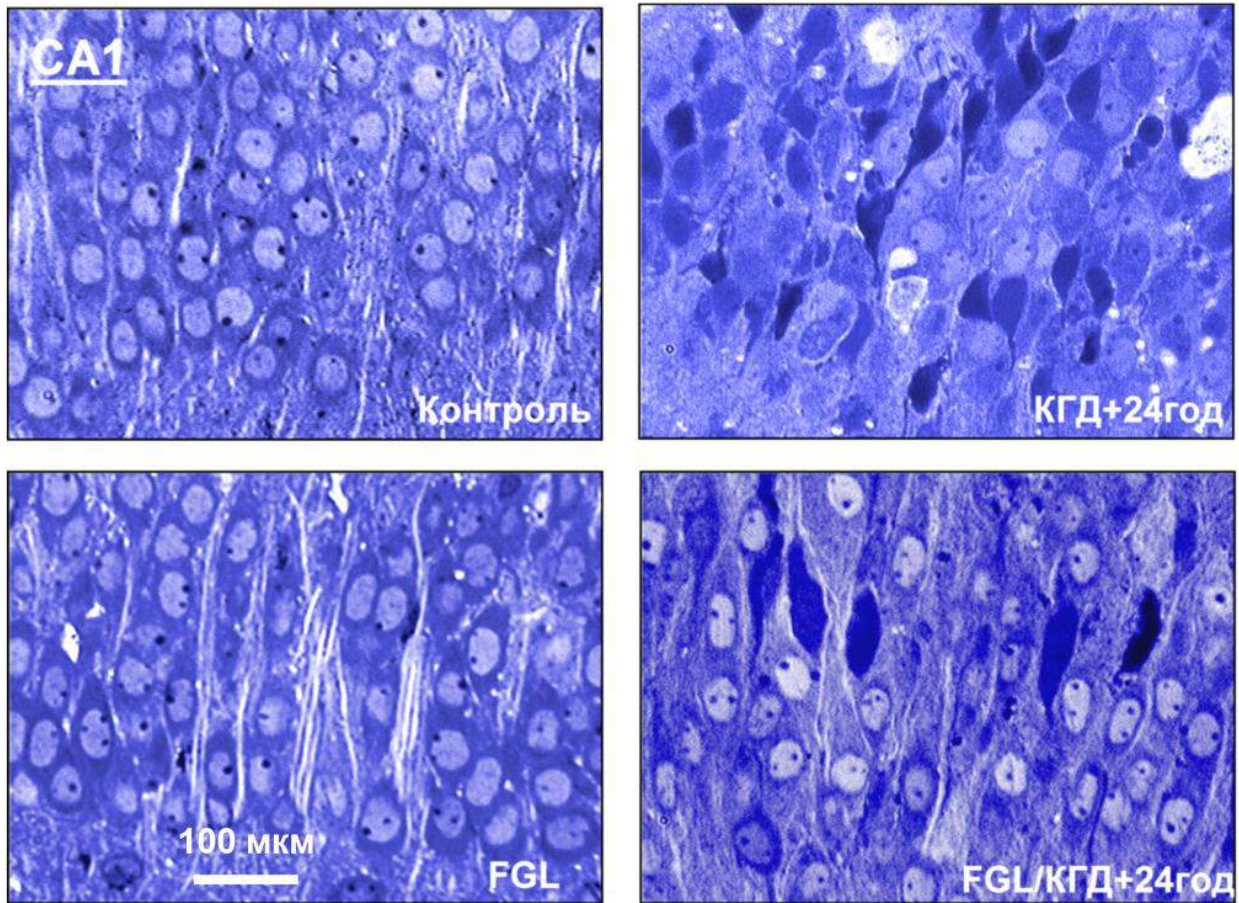


Рис. 3.33. Мікрофотографії напівтонких зрізів гіпокампа забарвлених метиленовим синім, що ілюструють ефекти FGL через 24 год після КГД.

Відмінності були достовірними у разі 4 та 24 год нормоксичної реоксигенації після КГД (Рис. 3.58).

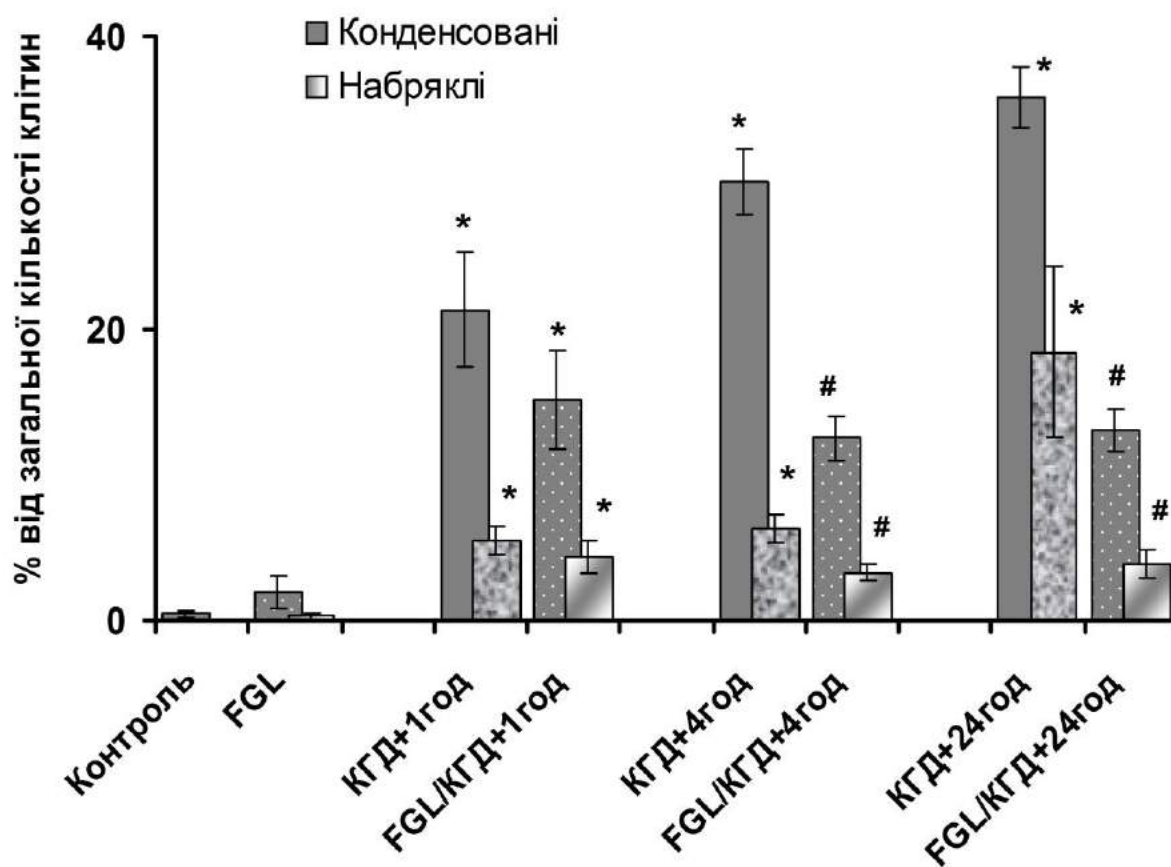


Рис. 3.58. Вплив FGL на кількість конденсованих та набряклих CA1 нейронів культивованих зрізів гіпокампа за нормальних умов та після КГД; $n=10$, * – $p<0.01$ відносно контролю, # – $p<0.01$ відносно КГД.

Враховуючи відставлений характер ефектів КДГ, які спостерігаються у наших експериментальних умовах, можна передбачити, що ці ефекти значною мірою пов'язані зі змінами білкового синтезу, у тому числі синтезу NCAM, та проявляються у структурних трансформаціях нейронів. Є дані про ключову роль NCAM у міжклітинних взаємодіях і передачі сигналів через посередництво синапсів, які суттєво потерпають в умовах патології, зокрема при ішемії мозку [11]. Знайдені переконливі відомості про причетність адгезивних молекул до синаптогенезу та важливої ролі

комплексу NCAM-PSA (полісиалові кислоти) у цьому процесі [76, 207, 239]. Авторами показаний вплив функціональних структурних перебудов на синаптичну збудливість, що зумовлює зміни швидкості передачі сигналів від клітини до клітини. В умовах дисоційованих культурах показано, що міметики NCAM, зв'язуючись з FGF-рецепторами, запобігає зниженню синаптичної активності нейронів через запуск низки молекулярних механізмів, які відповідальні за підтримку гомеостазу та функціонування або розвиток ушкодження та загибель клітин [144, 145]. В експериментах *in vivo* виявлено залучення NCAM у суттєві структурні синаптичні перебудови у гіпоампі, які відбуваються як у пресинаптичних терміналях, так і у постсинаптичних шипиках. На молодих та старих крисах показане збільшення кількості шипиків грибовидної форми з перфорованою постсинаптичною щільністю, що передбачає більшу активність збудливих синапсів, які найбільш поширені у гіпокампі, оскільки на цих структурах утворюються додаткові AMPA та NMDA рецептори [94, 95, 213, 239]. Це свідчить про те, що NCAM значною мірою модулюють синаптичну пластичність і зумовлюють морфологічні та функціонуванні зміни нейронів гіпокампа при ішемії.

Нами було проаналізовано кількісні морфологічні показники збудливих асиметричних синапсів CA1 зони *stratum radiatum* культивованих зрізів гіпокампа за умов нашої експериментальної моделі. Розрізняли три типи синаптичних контактів: прості, перфоровані та множинні (Рис. 3.59). Прості синапси характеризуються суцільною постсинаптичною щільністю (ПСЩ), перфоровані – переривчастою, множинні – це випадки, коли до однієї терміналі підходить декілька постсинаптичних структур.

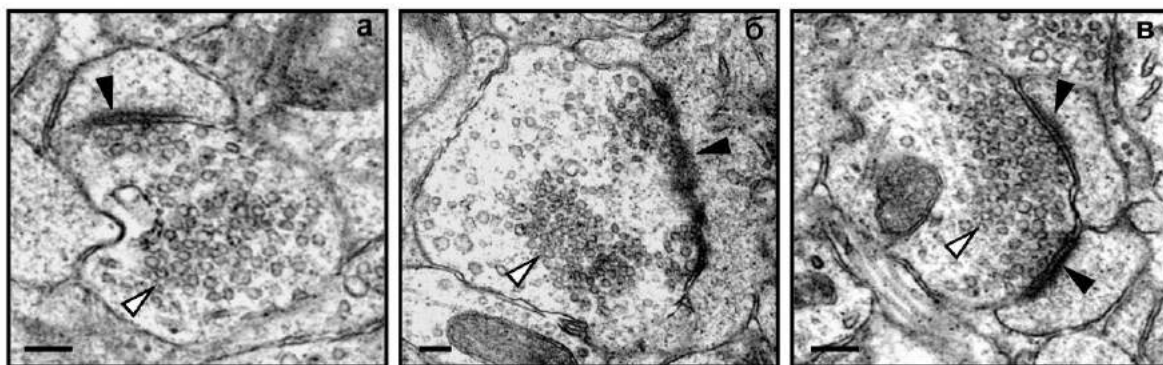


Рис. 3.59. Електронограми CA1 зони stratum radiatum культивованих зрізів гіпокампа. Фрагменти нейроніля з виділеними синапсами різних типів: а – простий, б – перфорований, в – множинний. (чорними стрілками позначена постсинаптична щільність, білими – синаптичні везикули). Масштабна лінія – 200 нм.

Оцінювали загальну кількість асиметричних синапсів та співвідношення простих, перфорованих та множинних синаптичних контактів. Виявлено, що КГД та 4 год реоксигенація призводила до значних змін у кількості та якості синапсів, зокрема зменшувалася їх загальна кількість на одиницю площі по відношенню до контролю (Рис. 3.60). Присутність FGL пептиду у цих умовах нормалізувала цей показник.

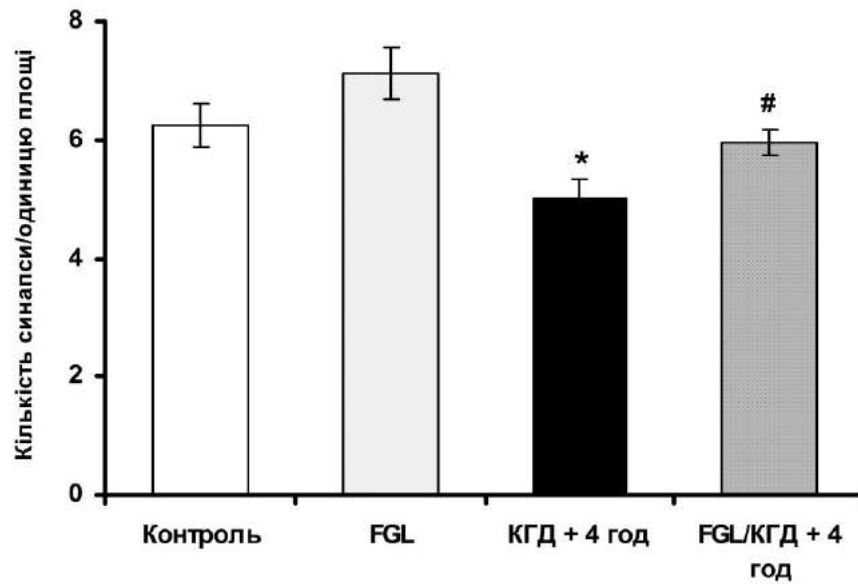


Рис. 3.60. Вплив FGL на кількість синапсів на одиницю площі *stratum radiatum* CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа за нормальних умов та після КГД і нормоксичної реоксигенації 4 год; $n=50$,
 * – $p < 0.01$ відносно контролю, # – $p < 0.01$ відносно КГД.

Крім того, показано, що при КГД збільшується кількість синапсів з перфорованою ПСЩ, що свідчить про активацію пластичних змін у цих збудливих синапсах (Рис. 3.61). Дані представлені у відсотках від загальної кількості синапсів.

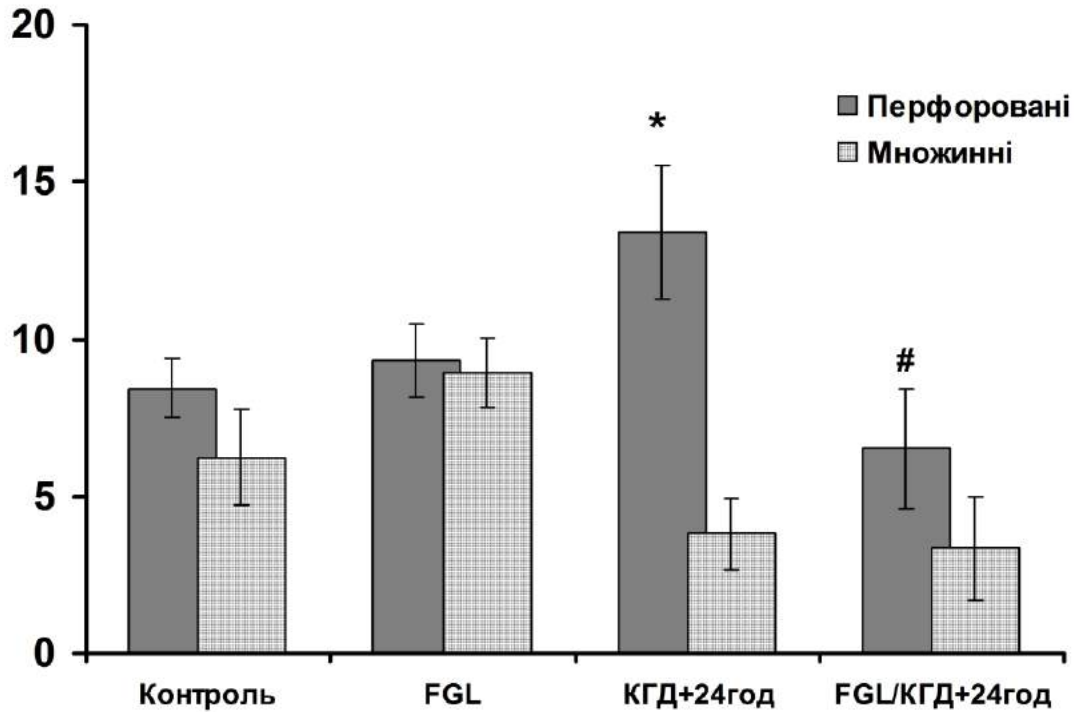


Рис. 3.61. Вплив FGL на кількість перфорованих та множинних синапсів CA1 зони *stratum radiatum* культивованих зрізів гіпокампа за нормальних умов та після КГД і нормоксичної реоксигенації 4 год; $n=50$, * – $p < 0.01$ відносно контролю, # – $p < 0.01$ відносно КГД.

Таким чином, перерозподіл різних типів синапсів у напрямку збільшення перфорованих контактів компенсує відсутність необхідної для передачі інформації кількості синапсів у несприятливих умовах КГД, які впливають на загальний метаболізм нейронів. Присутність у середовищі культивування FGL перешкоджала дестабілізації синапсів, викликаній КГД, що свідчить про суттєву роль NCAM у підтримці життєздатності нейронів та їх синаптичної активності при нестачі кисню та глюкози. Крім того, наші дані свідчать, що пептид FGL за нормальних умов призводить до збільшення кількості синапсів, причому за рахунок множинних, коли на одній терміналі утворюються

контакти з декількома дендритними шипиками, що передбачає підвищення збудливості нейронів та прискорення передачі сигналів.

Нами були проведені дослідження ефективності сигнальних процесів при дії FGL пептиду за умов 20-хв КГД та подальшого періоду нормоксичної реоксигенації з використанням культур дисоційованих гіпокампальних клітин, оскільки в цих умовах синапси можливо візуалізувати на рівні світової конфокальної мікроскопії та проаналізувати окремі синапси.

Багатозначність факторів, які впливають на міжнейронні взаємодії, визначає велику чутливість цього процесу до будь-яких патологічних впливів, зокрема до нестачі кисню та глюкози. Тривалість дії ішемії та подальшої реперфузії обумовлює ступінь деструктивних змін на клітинному рівні [4, 168, 325]. У досліджах *in vivo* і *in vitro* показано, що довготривала ішемія або КГД призводить до масивної загибелі нервових клітин, в умовах же короткотривалого впливу негайного ушкодження не виникає, але індукуються певні функціональні зміни, які мають віддалені деструктивні наслідки [2, 133, 149, 174].

Умови КГД для дисоційованої гіпокампальної культури були оптимізовані у пілотних дослідженнях. Як описано у п.п. 3.2.3 та 3.2.4, за даними ПЙ-забарвлення та MTS-тесту, не виявлено значних змін життєздатності нейронів. Проте, оцінка загальної мітохондріальної активності за допомогою MTS-тесту, виявила значне уповільнення метаболізму через 1 та 4 год після КГД. У 24-годинний термін цей показник певною мірою відновлювався (Рис. 3.6, 3.8), що імовірно пов'язано з активацією гліальних клітин, які також присутні у культурі.

У даній серії експериментів ми аналізували синаптичну активність гіпокампальних нейронів на підставі вимірювання швидкості знебарвлення флуоресцентного барвника FM1-43 [106].

Реєстрували динаміку знебарвлення у зонах синапсів протягом фіксованого періоду часу (120 сек) після гіперкалієвої деполяризації нейронів. Існує закономірність, що чим більше різниця між інтенсивністю флуоресценції синаптичних контактів після деполяризації, тим більше активність синапсів. У наших експериментах виявлено, що через 1 год після КГД активність синаптичного екзоцитозу суттєво зменшувалася, через 4 год цей показник залишався низьким та нормалізувався у 24-годинний термін. Таким чином, деструктивний вплив КГД на культивовані гіпокампальні нейрони у дисоційованій культурі мав недовгострокові прояви (Рис. 3.62) для клітин, які зберегли свою життєздатність.

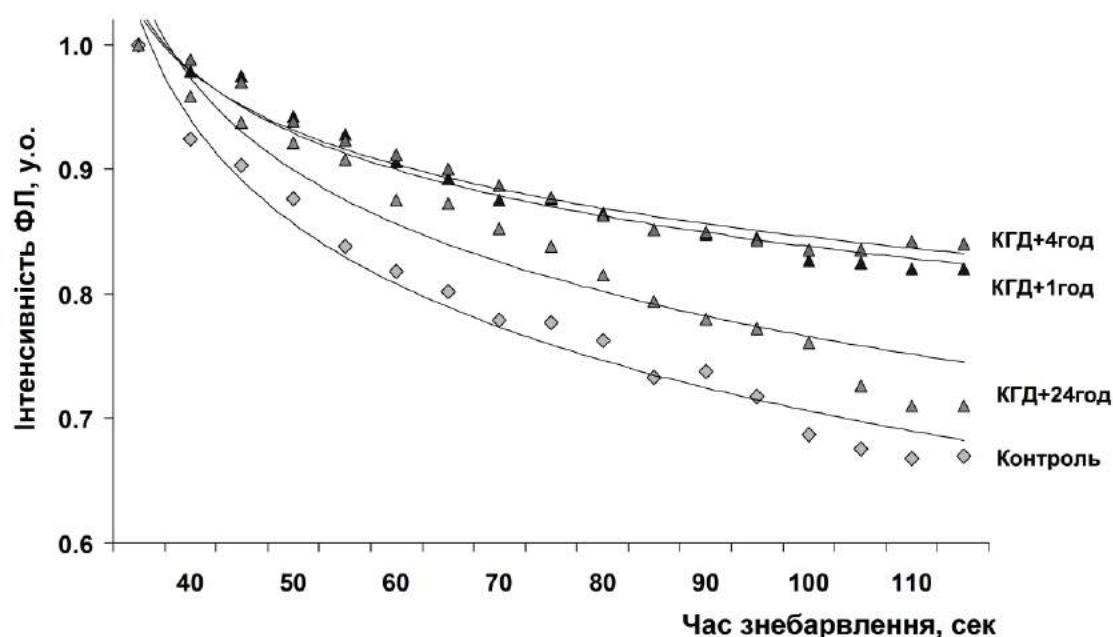


Рис. 3.62. Графік змін швидкості вивільнення барвника FM1-43 з синаптичних везикул культивованих нейронів у нормальних умовах та після КГД; $n=20$.

За допомогою подвійного імуногістохімічного забарвлення білків GAP-43 та SPh (синаптофізину) нами було оцінено кількість синапсів на одиницю довжини відростку нейрона в нормальних умовах та після КГД. Використання у наших експериментах маркеру відростків

нейронів GAP-43 надало змогу візуалізувати у дисоційованій гіпокампальній культурі чітку нейронну мережу, яка була розподілена однаково рівномірно як у контрольних культурах, так і після КГД. Подвійне ІМГХ забарвлення GAP-43 та білку пресинаптичних терміналей SPh [141] показало їх значну колоколізацію у дисоційованій культурі і дало змогу провести кількісну оцінку SPh+ синапсів, асоційованих з гіпокампальними нейронами (Рис. 3.63, А-Г). Виявлене суттєве зниження щільності синапсів в умовах КГД, у контролі кількість синапсів становила (од./мм): 247.8 ± 7.9 , через 4 год після КГД – 152.6 ± 6.6 .

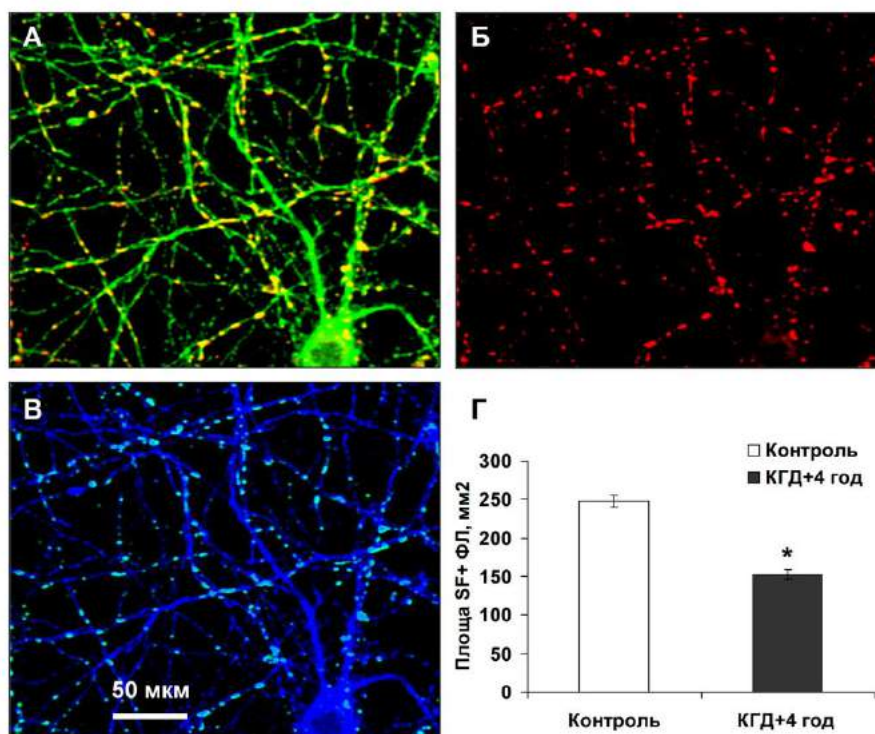


Рис. 3.63. Імуноцитохімічне забарвлення нейронів у дисоційованій культурі гіпокампа: А – подвійне GAP-43 (зелений колір) та SF (червоний колір) ІМГХ забарвлення контрольних культур; Б – SPh (червоний колір окремо) ІМГХ забарвлення синапсів; В – поєднане зображення GAP-43/SF ІМГХ забарвлення у псевдо кольорах; (А-В – одне поле зору); Г – діаграма змін щільності синапсів після КГД; $n=20$, * – $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

Щадний характер моделі ішемічного ушкодження, використаної у цій серії експериментів, дозволяє виявляти початкові деструктивні зміни, які можуть бути першопричиною подальшої нейродегенерації клітин, зокрема пов'язані з екзо- та ендоцитозом синаптичних везикул [248, 288]. Зміни активності хімічних синапсів зумовлені складними морфологічними і молекулярними перебудовами, що забезпечуються численними білками, такими як синаптобrevін, синптотагмін, синапсини, SNAP-25 (від англ. synaptosomal associated protein) [41, 96, 134]. Важливу регуляторну роль мають rab3, mint1 і mant2, BDNF (від англ. brain-derived neurotrophic factor). Синаптофізин приймає участь у формуванні тимчасової пори для вивільнення та захоплення нейромедіатора [54, 218, 240]. NCAM, разом з іншими факторами, значною мірою забезпечують ефективність синаптичної передачі [11, 76, 207, 239].

Нами було досліджено вплив синтетично пептиду FGL (міметика NCAM) на синаптичну активність гіпокампальних нейронів після КГД за допомогою FM1-43 забарвлення. Було виявлено, що присутність FGL у культуральному середовищі активує процес вивільнення барвника у нормальних умовах та нормалізує цей показник після КГД (Рис. 3.64).

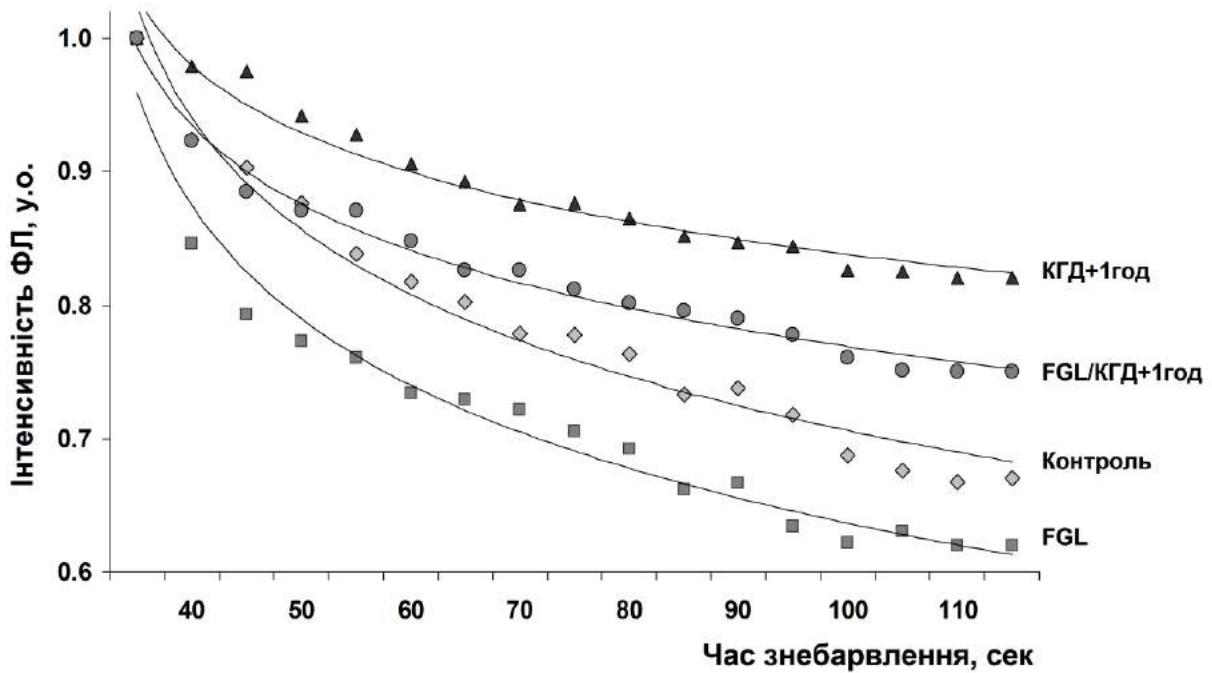


Рис. 3.64. Графік змін швидкості екзоцитозу з синаптичних везикул культивованих нейронів гіпокампа при дії синтетичного пептидного міметика NCAM – FGL у нормальних умовах та через 1 год після КГД; $n=20$.

Ефекти FGL мали достовірну різницю по відношенню до впливу КГД у 1- та 4-годинний терміни дослідження. На рис. 3.65 представлені загальні результати у вигляді констант FM 1-43 знебарвлення.

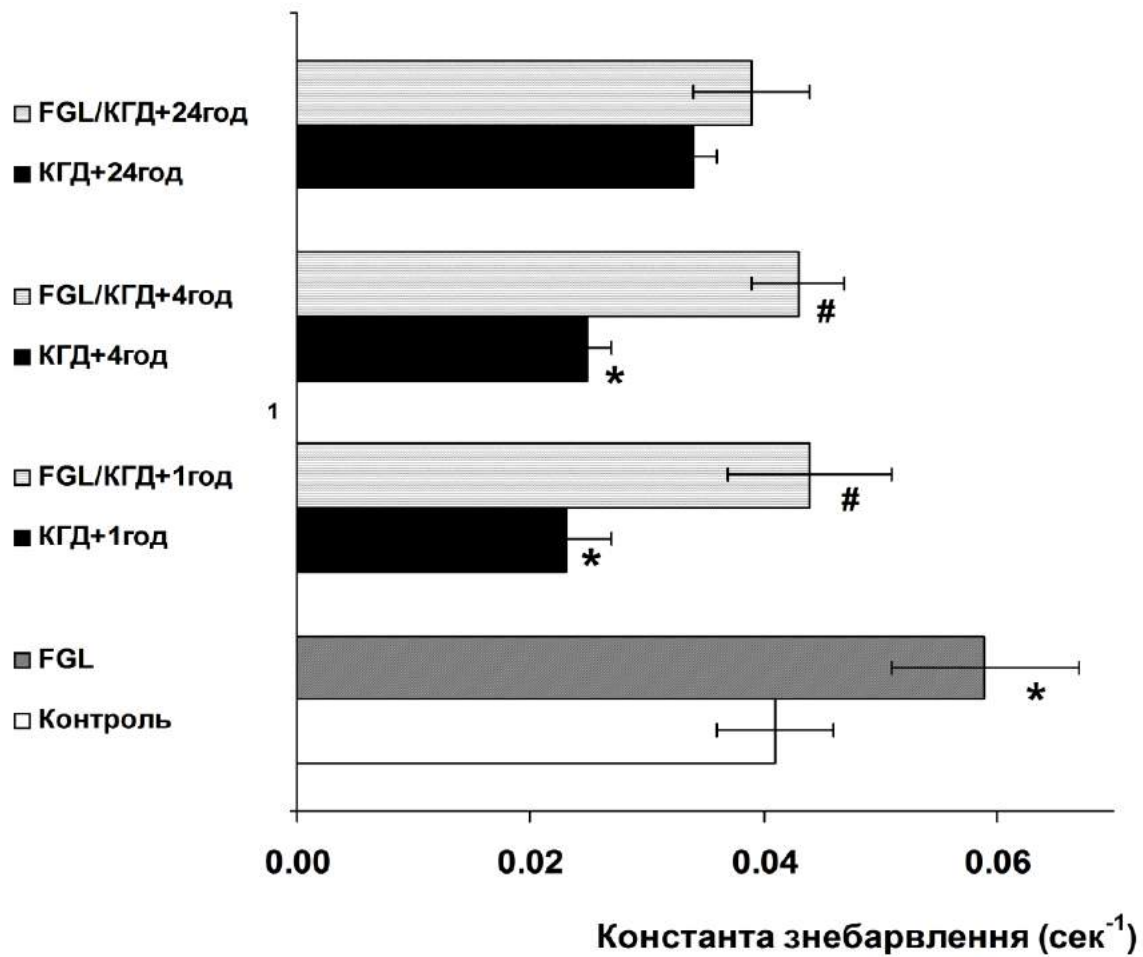


Рис. 3.65. Діаграма змін швидкості знебарвлення FM 1-43 у синаптичних везикул культивованих нейронів гіпокампа при дії синтетичного пептидного FGL у нормальних умовах та через 1, 4 та 24 год після КГД; $n=20$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

Молекулярні механізми, задіяні у функціонуванні синапсів є енергозалежними і тісно пов'язані з активністю клітинного метаболізму. В умовах нашого експерименту, виявлено, що у присутності FGL загальна мітохондріальна активність значною мірою нормалізується (Рис. 3.66). Використання контрольного пептиду не впливало на цей показник.

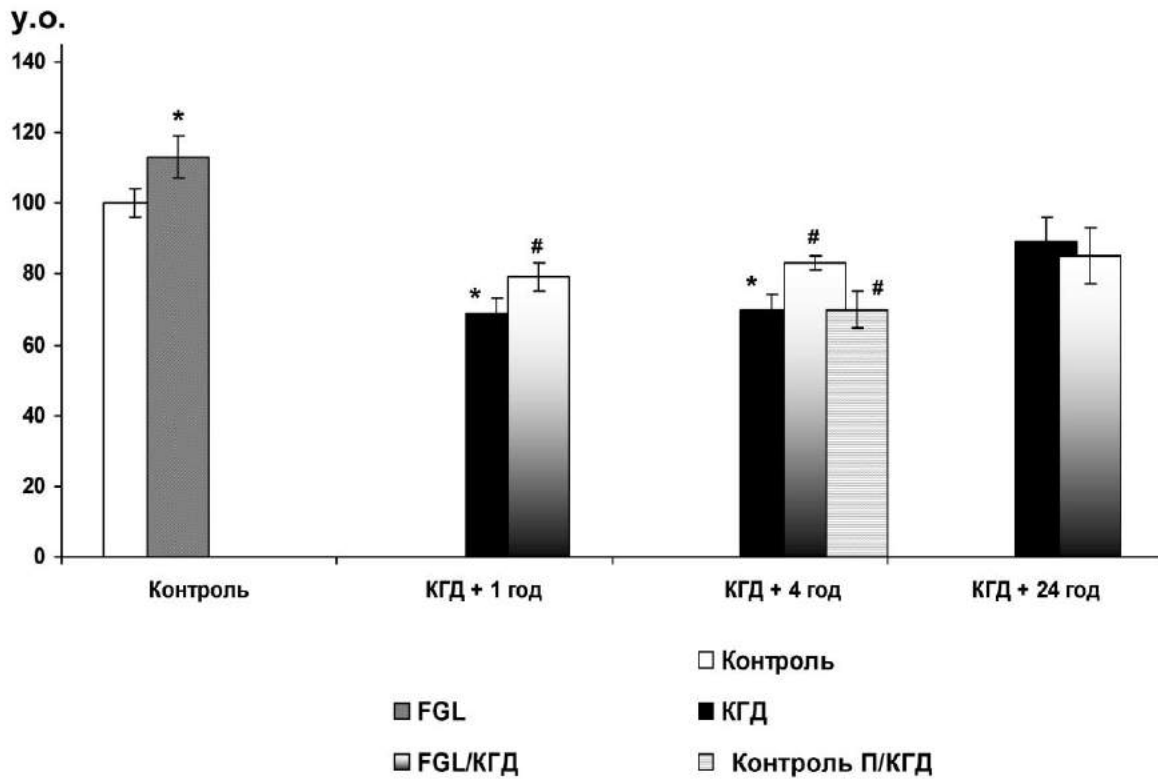


Рис. 3.66. Зміни загальної мітохондріальної активності у дисоційованій гіпокампальній культурі при дії FGL у нормальних умовах та після КГД; $n=10$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

Наша експериментальна модель дозволила виявити деякі первинні механізми, які за певних умов можуть бути задіяні в процесі розвитку ушкодження нейронів, зокрема показано, що протягом декількох годин після короткотривалої КГД, відбувається зниження загальної активності метаболізму культивованих клітин, кількості та ефективності синапсів.

Можна припустити, що уповільнення клітинних та молекулярних механізмів у дисоційованій культурі гіпокампа обумовлює виявлене зниження швидкості екзоцитозу у зонах синаптичних контактів. Напевно, описані процеси можуть бути відповідальними за порушення

передачі сигналів між нейронами і виникнення нейродегенеративних змін при нестачі кисню та глюкози. Відновлення функціональної активності нейронів у присутності синтетичного пептиду FGL свідчить про важливу роль NCAM у механізмах, які певною мірою здатні протистояти ушкодженню в умовах ішемії.

Основні результати **розділу 3.5** опубліковані у таких статтях:

[272, 273].

3.6. Дослідження впливу PS1-Syt1 взаємодії на ультраструктуру синаптичних везикул

Трансмембранні білки пресенілін 1 (PS1) і синаптотагмін (Syt1) приймають безпосередню участь у процесі вивільнення вмісту синаптичних везикул з пресинаптичних терміналей нервових клітин при передачі сигналу від клітини до клітини через хімічні синапси. PS1 експресується у синаптичних везикулах та забезпечує механізм екзоцитозу синаптичних везикул, модулюючи синаптичну передачу [33, 175]. Syt1 є Ca^{2+} -зв'язуючим білком, що бере участь в останніх стадіях викиду нейромедіатора в синаптичну щілину, який є Ca^{2+} -залежним [59]. Він зв'язується з нейрексином і SNAP-25, здійснюючи утримання секреторної везикули близь пресинаптичної мембрани, і бере участь у викиді нейромедіатора за рахунок регуляції SNARE комплексу при підвищенні концентрації кальцію. Дослідження щодо структурних та функціональних зв'язків між PS1 та Syt1 мають певні обмеження [Roden], мало вивченими і важливі з точки зору модуляції синаптичної активності при мозкових порушеннях.

Використовуючи специфічні блокатори PS1-Syt1-зв'язування та трансгенні технології, було продемонстровано, що Syt1 служить чинником, який сприяє відкриванню конформації PS1 для йонів [171, 303].

Було показано, що взаємодія PS1-Syt1 сприяє екзоцитозу синаптичних везикул у культурі нервових клітин, аналізуючи вивільнення глутамату, викликаного активацією KCl. Інгібування зв'язування PS1-Syt1 за допомогою синтетичного пептиду LNT, специфічного для Syt1, призводило до зниження швидкості вивільнення везикул [346].

В нашій роботі було досліджено, які ультраструктурні зміни синаптичних везикул відбуваються в умовах інгібування PS1-Syt1-зв'язування. Експерименти проводилися на культурі дисоційованих нервових клітин, при індукції синаптичної активності KCl за умов присутності LNT чи без нього (Контроль). Виявлено ознаки везикулярної деструктуризації при дії інгібітора PS1-Syt1-зв'язування LNT (Рис. 3.67), що проявлялася у деформації везикул та їх перерозподілу.

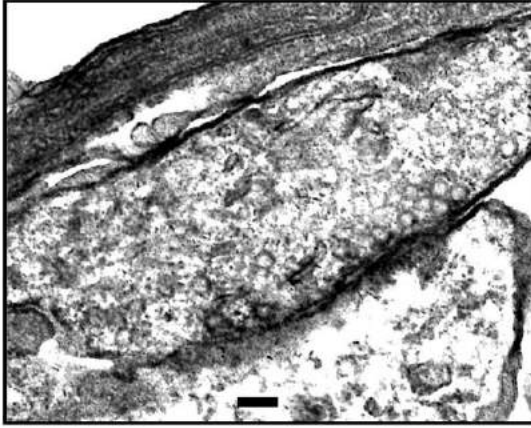
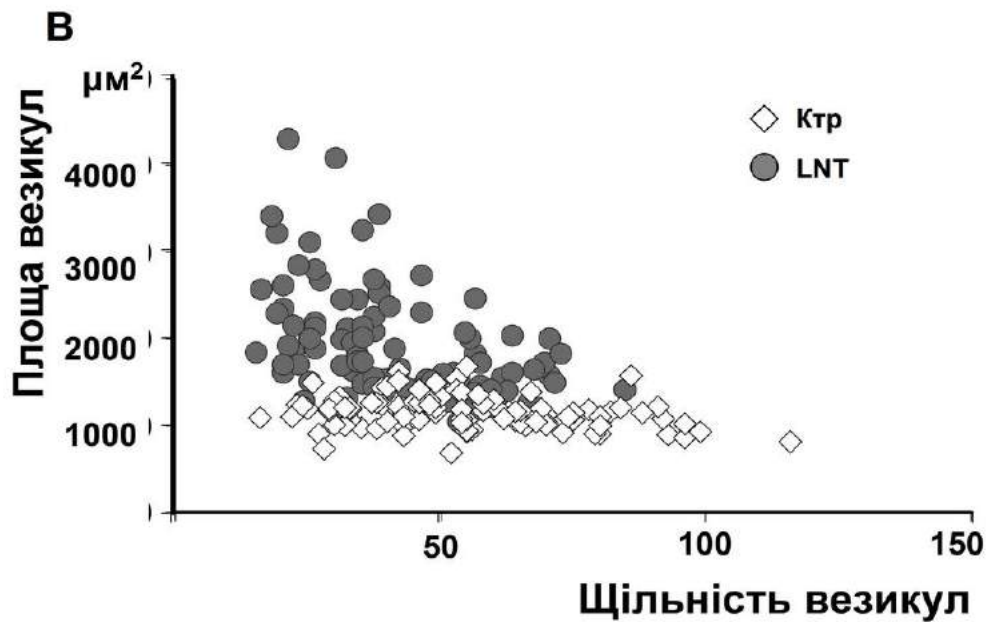
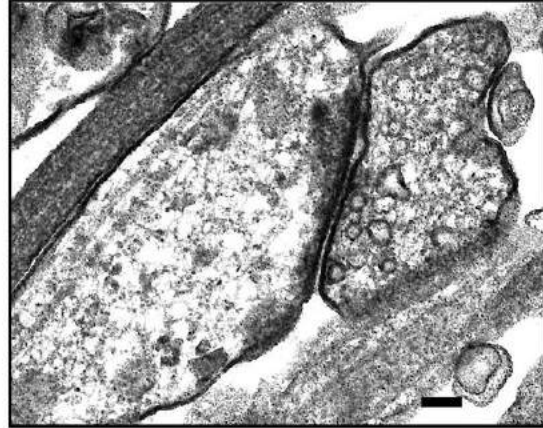
А - Контроль**Б -LNT пептид**

Рис. 3.67. Ультраструктурні зміни синаптичного апарату у культурі дисоційованих нервових клітин за нормальних умов та в присутності пептиду LNT. А, Б – мікрофотографії синапсів; В – точковий графік, що характеризує розподіл синаптичних везикул.

Масштабна лінія – 100 нм; $n=50$.

Морфометричний аналіз виявив збільшення везикул більшої площі та зменшення їх щільності (Рис. 3.68, А, Б, відповідно).

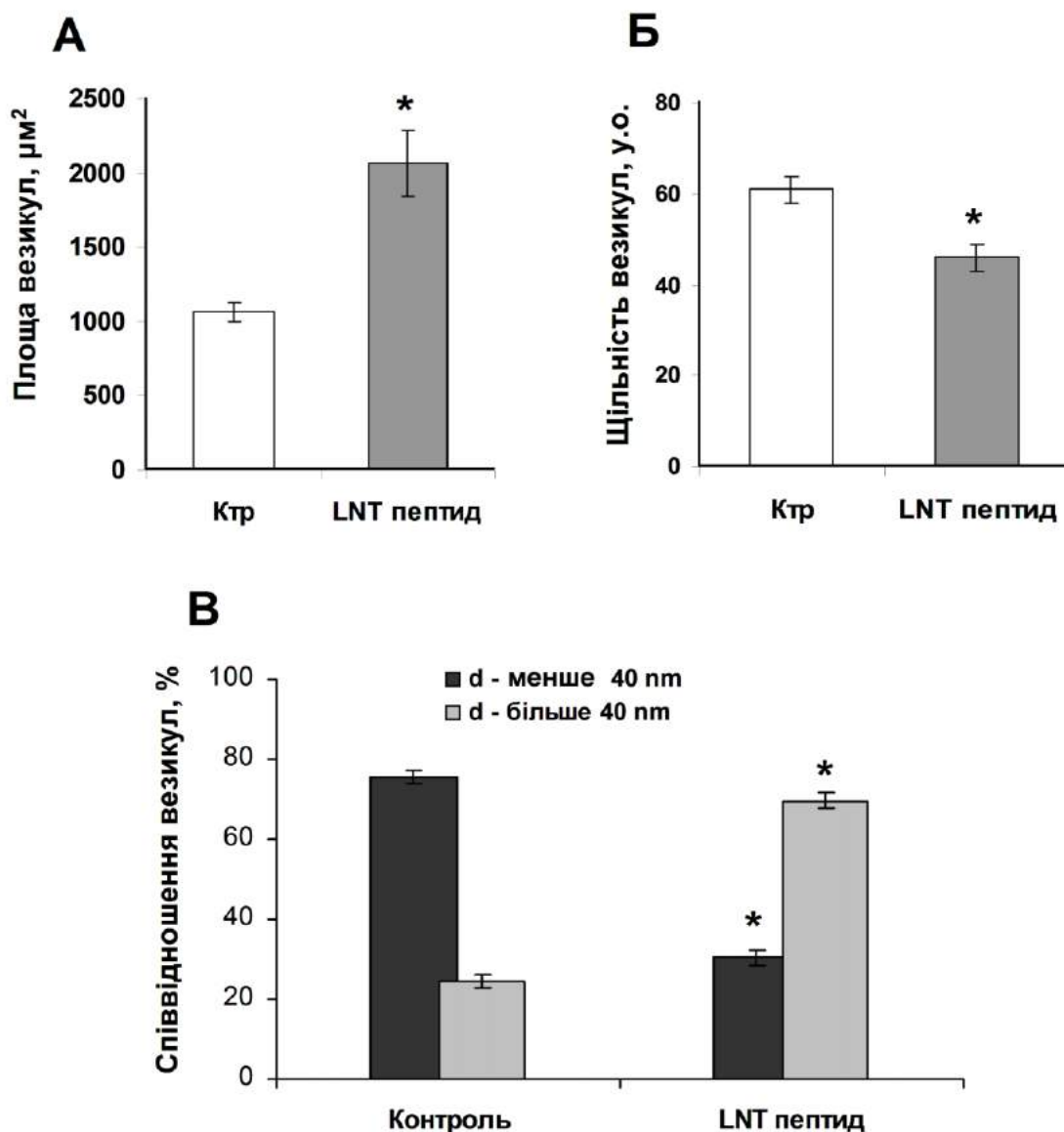


Рис. 3.68. Кількісний аналіз синаптичних везикул у дисоційованій культурі за нормальних умов та у присутності синтетичного пептиду LNT. А – середнє значення площі везикул; Б – щільність везикул (у.о. – відношення кількості до площі синапсу); В – співвідношення нормальних і великих везикул; $n = 50$, * – $p < 0.001$ по відношенню до контролю.

За нормальних умов середній діаметр більшості синаптичних везикул складає 40 нм. Тільки невелика кількість перевищує цю величину. В умовах блокади PS1-Syt1-з'язування, діаметр більшості

везикул перевищує 40 нм, тобто їх структура зазнає кординальних змін у бік їх укрупнення (Рис. 3.68, В). Враховуючи, що при цьому зменшується щільність везикул, можна припускати, що в цих умовах спостерігається тенденція до злиття кількох везикул. Такі зміни можуть негативно впливати на динаміку рухомості везикул у синаптичних терміналях і кінетику вивільнення медіатора. Таким чином, процес взаємодії PS1 і Syt1 може значною мірою координувати синаптичну передачу, а модуляція функціонування цих трансмембранних білків є важливим елементом для нейропротекції при мозкових порушеннях.

Основні результати **розділу 3.6** опубліковані у статті: [346].

3.7. Роль HIF при розвитку ішемічного ушкодження та деякі механізми нейропротекторних ефектів аноксичного прекодиціювання

Вплив нестачі кисню та глюкози призводить до системних змін, орієнтованих на початковому етапі на активацію адаптивних механізмів та ендогенну нейропротекцію, а надалі на усунення ушкодження і утилізацію загинувих клітин. Важливу роль у цих процесах відіграють гіпоксія-індуковані фактори (HIF – hypoxia-inducible factor) – сімейство гетеродимерних 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, зокрема в умовах гіпоксично-ішемічного ушкодження головного мозку [60, 84]. Внутришньоклітинна кількість білку HIF-1 залежить від активності HIF проліл-гідроксилази – фермента, який каталізує HIF-гідроксилювання,

маркуючи її для убіквітин-залежної протеосомної деградації [197, 268]. HIF-1 α – конститутивно продукований білок, який зазвичай є гідроксильованим HIF-пролілгідроксилазами, тобто швидко деградує. Коли рівень O₂ знижується, гідроксилювання зменшується, а рівень HIF зростає. Стабілізований HIF безпосередньо трансактивує гени для адекватного реагування клітин на гіпоксію, зокрема активніше синтезуються білки, які беруть участь у гліколізі, еритропоезі та ангіогенезі [159, 186, 198]. Показано, що HIF-1 α -опосередковані процеси активуються в широкому діапазоні фізіологічної напруженості O₂, та найбільше його рівень зростає в умовах, що відповідали гіпоксії/ішемії *in vivo* [125]. Таким чином, HIF є своєрідним індикатором рівня O₂ і функціонально задіяний у забезпечення гомеостазу O₂ в клітинах і організмі для адаптації клітинного метаболізму до киснево-глюкозного дефіциту. Відомо, що HIF-1 підвищує життєздатність клітин через індукцію експресії ендотеліального фактору росту, транспортерів глюкози, антиоксидантних ферментів, білків теплового шоку, антиапоптичних генів та інш. HIF-1 також приймає участь у проліферації клітин-попередників нервових клітин [58, 99, 162, 282].

Відомо, що короткострокова аноксія/гіпоксія сприяє резистентності мозку до більш тривалої ішемії [75, 232]. Це явище ендогенної нейропротекції, стосовно до експериментальних моделей, називають аноксичним прекодиціюванням (АПК).

У цьому розділі представлені результати дослідження ролі HIF-1 α при розвитку ішемічного ушкодження після КГД та впливу аноксичного прекодиціювання, використовуючи культивовані зрізи гіпокампа.

Експерименти включали такі серії: контрольні необроблені культивовані зрізи гіпокампа (Контроль); зрізи, що отримувалися при

короткостроковій аноксії (АПК); зрізи, піддані 30-хвилинній КГД та зрізи після комбінації впливів АПК+КГД. Досліджували життєздатність та паралельно експресію HIF-1 α пірамідних нейронах CA1 і CA3 зон культивованих гіпокампальних зрізів з використання вітального барвника ПЙ та ПЛР-аналіз поодиноких клітин в реальному часі (Single-cell real-time RT-PCR), відповідно.

Використовуючи ПЙ-забарвлення, попередньо було проведене тестування впливу різних за тривалістю та кратністю варіантів АПК на життєздатність CA1 пірамідних нейронів для оптимізації умов експерименту. Були задіяні 2-хв та 5-хв АПК одно-, дво- та трикратно з інтервалом 12 год та наступна за цим 30-хв КГД та 4-годинної нормоксичної рексигенації. В усіх випадках нейропротекторний ефект АПК був проявленим (Рис. 3.69). Для подальших досліджень використовували варіант АПК, який показав найбільш виражену нейропротекторну дію, а саме, трикратне 5-хв АПК з інтервалом 12 год. Використання такого режиму АПК без КГД не викликало суттєвого збільшення кількості ушкоджених нейронів.

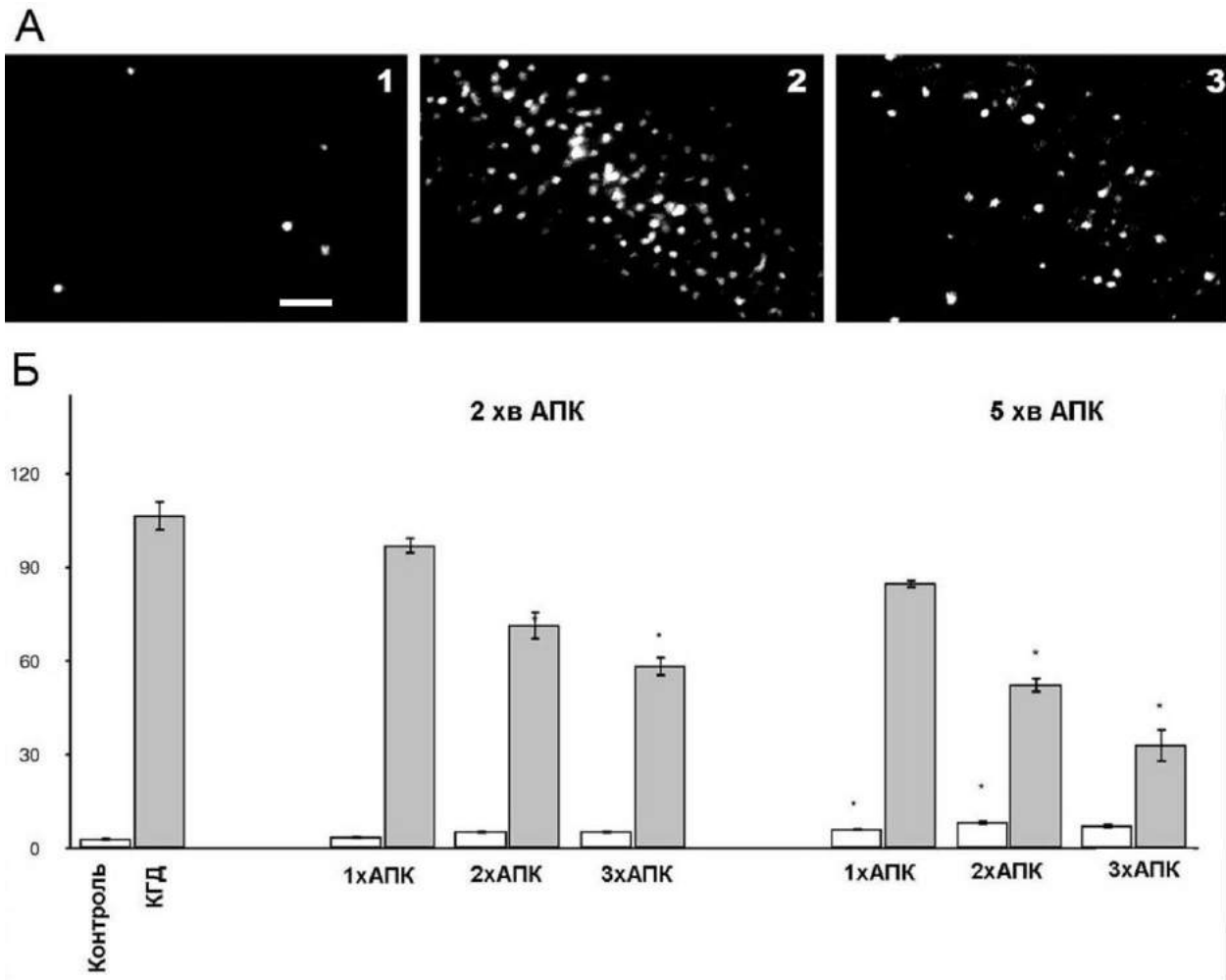


Рис 3.69. Оцінка життєздатності CA1 нейронів в культивованих зрізах гіпокампа в умовах КГД, різних режимів АПК та комбінації АПК+КГД: А – фото ПЙ-зabarвлених клітин (1 – Контроль, 2 – КГД, 3 – АПК/КГД); Б – діаграма кількісного аналізу ступеню ушкодження; $n=4$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД. Масштабна лінія – 100 мкм.

Таким чином, розроблено оптимальний варіант режиму застосування АПК в умовах нашого експериментальної моделі. Схема експериментального протоколу зображена на рис. 3.70.

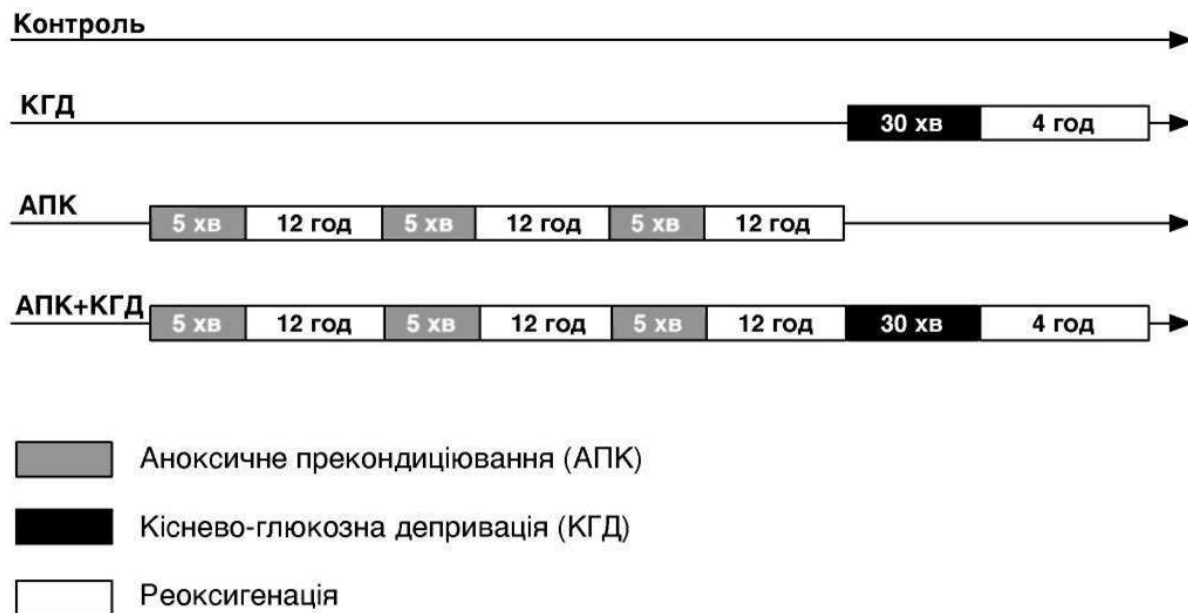


Рис 3.70. Схема експерименту (HIF, КГД, АПК).

Оцінка життєздатності гіпокампальних нейронів показала, що ефект 30-хв КГД більше виражений у СА1 і менше у СА3 зоні, що підтвердило більшу чутливість СА1 нейронів до КГД. Протективний ефект АПК проявлявся в обох зонах культивованих зрізів гіпокампа. Кількість ушкоджених клітин через 4 год після утримання клітин в умовах КГД (АПК+КГД) була значно меншою, ніж без попереднього впливу АПК (Рис. 3.71).

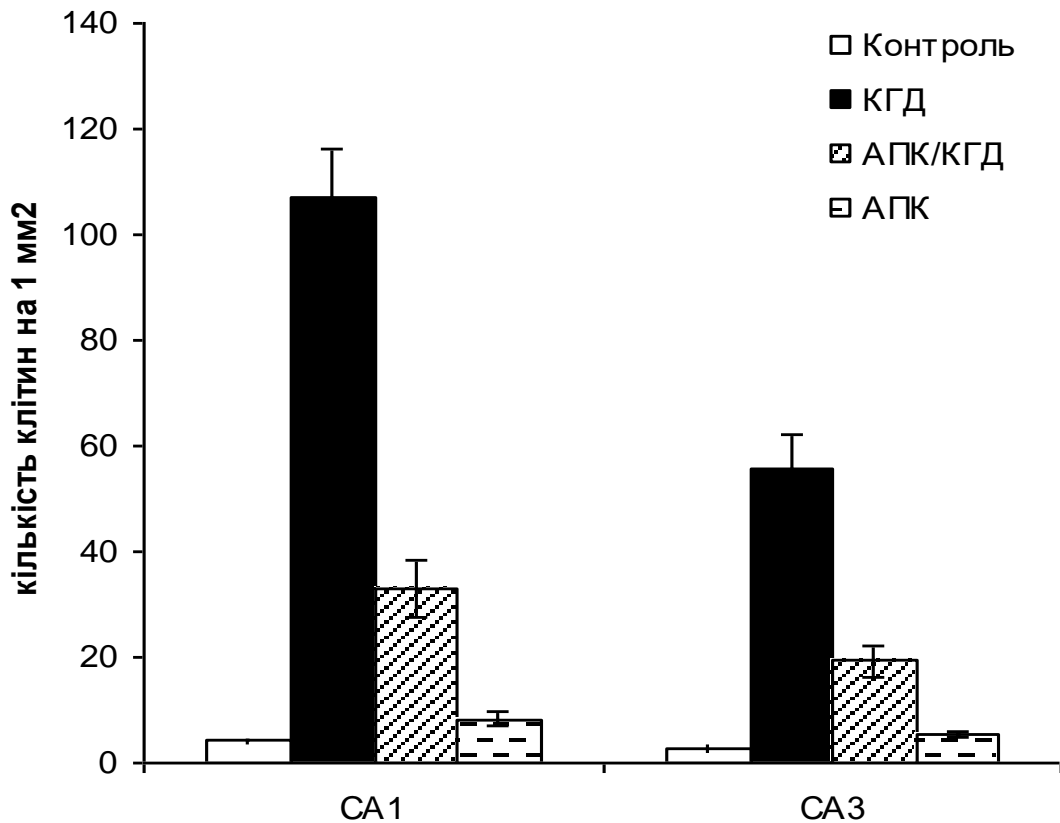


Рис. 3.71. Кількісна оцінка життєздатності нейронів CA1 та CA3 зони культивованих зрізів гіпокампа в умовах КГД, АПК та комбінації АПК/КГД; $n=4$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

Специфічні механізми толерантності клітин при АПК не з'ясовані. Представляє інтерес, як в умовах АПК у комбінації з ішемією змінюється експресія HIF-1, та яку роль ці зміни мають для індукції АПК-нейропротекції. Залишаються відкритими багато питань щодо неоднозначності ефектів тих факторів, експресію яких HIF індукує. Деградація однієї з субодиниць фактору, а саме HIF- α за умов доступності кисню може спричиняти зупинку процесів, які HIF-1 індукує. Показано, що гідроксилування HIF1- α субодиниці може бути припинене за гіпоксичних умов [336]. При цьому HIF1- α стабілізується і надалі активується адаптивна генетична відповідь, спрямована на

компенсацію ефектів кисневого дефіциту [125, 265]. HIF-3 α , на відміну від HIF-1 α та HIF-2 α , не містить кисень-чутливого і трансактиваційного домену, а функціонує як домінант-негативний регулятор активності HIF-1 субодиниць [105]. HIF-1 може запускати як процеси виживання, так і процеси, що призводять до запрограмованої смерті клітин [26].

В нашій роботі за допомогою ПЛР-аналізу було оцінено зміни експресії HIF-1 α HIF-3 α мРНК при АПК, КГД та їх комбінації АПК+КГД у CA1 та CA3 зонах культивованих зрізів гіпокампа. Було виявлено, що за нормальних умов експресія HIF-1 α мРНК активніша у CA1 нейронах зони, у порівнянні з CA3 (Рис 3.72). Відносно вищий рівень експресії HIF-1 α мРНК в цій зоні може обумовлювати більшу чутливість CA1 пірамідних нейронів до нестачі кисню та глюкози. За умов нашої експериментальної схеми, КГД призводила до суттєвого зниження експресії як HIF-1 α так і HIF-3 α саме у CA1 нейронах, на відміну від цього у CA3 зоні де коливання рівня експресії були недостовірними відносно контролю. АПК запобігало зниженню КГД-індукованої експресії як HIF-1 α так і HIF-3 α у CA1 нейронах, що може певною мірою обумовлювати ефекти АПК на життєздатність. Саме по собі АПК не викликало суттєвих змін експресії HIF у пірамідних нейронах CA1 і CA3 зон культивованих гіпокампальних зрізів.

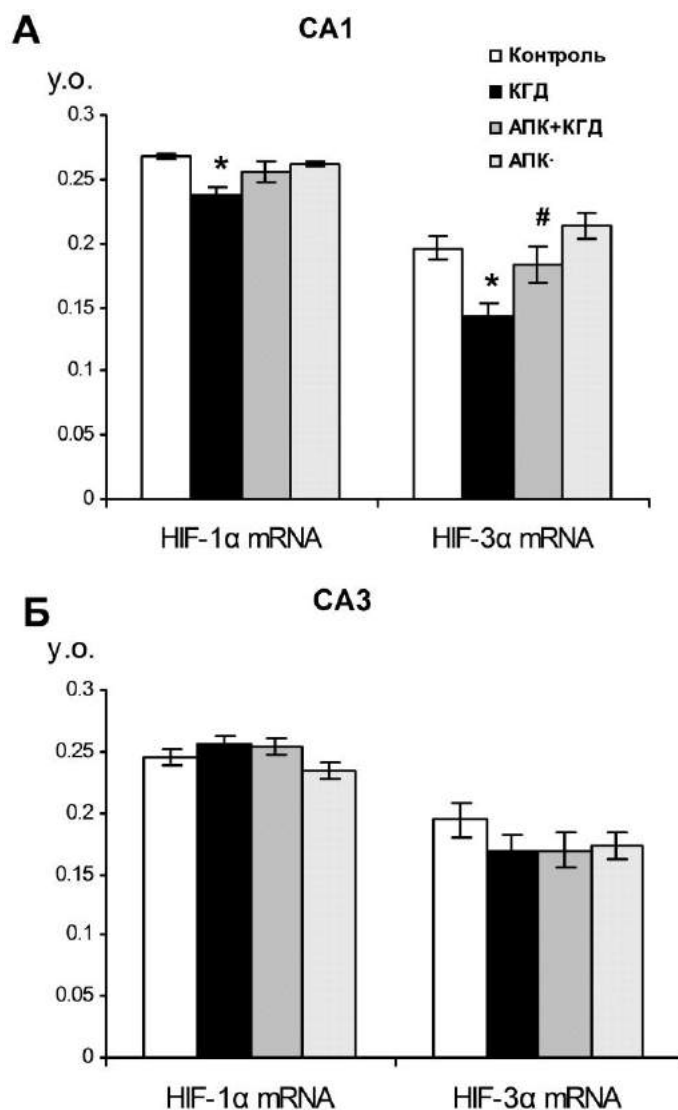


Рис 3.72. Оцінка експресії HIF-1α та HIF-3α mRNA у поодиноких нейронах CA1 і CA3 зон культивованих зрізів гіпокампа через 4 год після КГД, АПК та комбінації АПК/КГД; $n=8$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

Механізми КГД ефектів і АПК-опосередкованої нейропротекції можуть бути обумовлені змінами як експресії, так і деградацію HIF за участю HIF пролил-гідроксилази, яка таким чином модулює функції HIF за нормальних та патологічних умов [268]. Є дані про те, що інгібіція HIF пролил-гідроксилази захищає нейрони від нормоксичного

оксидативного пошкодження [336]. У наших експериментах на культивованих зрізах було досліджено вплив селективного інгібітора згаданого ферменту [243] – ДПД (діетилового ефіру 2,4 піридиндикарбонової кислоти) на життєздатність CA1 пірамідних нейронів через 4 год після КГД. Результати свідчать про значне зменшення кількості пошкоджених клітин CA1 (Рис. 3.73) при додаванні у культуральне середовище 5 мкмоль/л ДПД за 30 хв до КГД і пролягом 4 год нормоксичної реоксигенації.

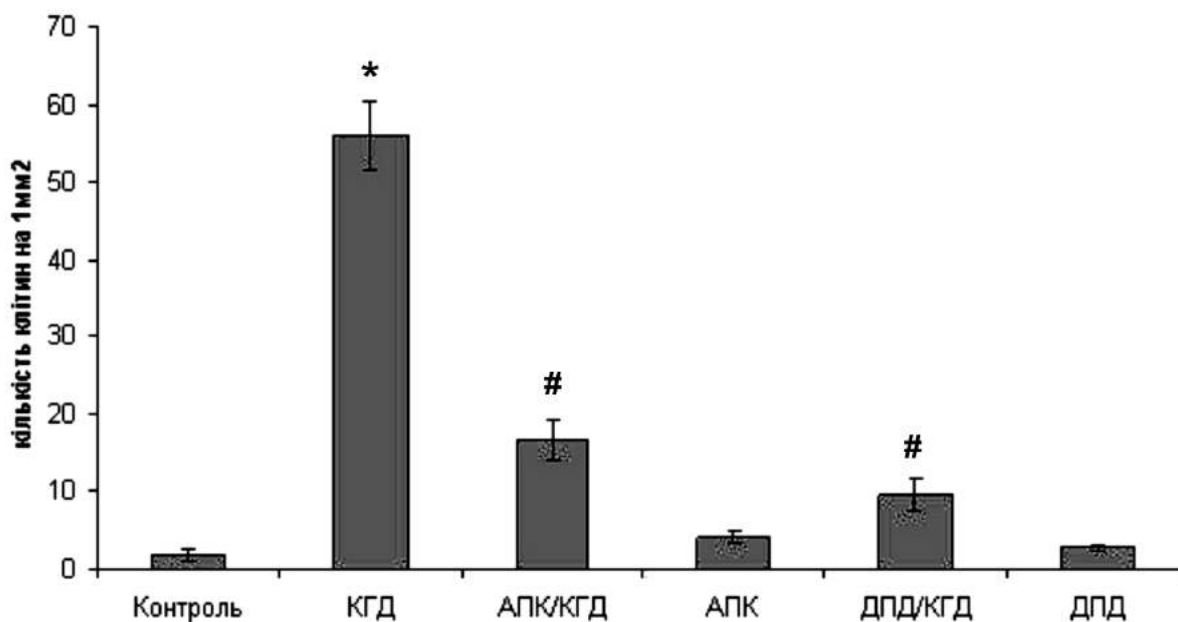


Рис. 3.73. Ефект інгібітора НІФ проліл-гідроксилази – ДПД на життєздатність нейронів CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа; $n=8$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

Таким чином, у наших експериментальних умовах, пошкодження CA1 пірамідних нейронів після КГД корелює зі зниженням рівня експресії НІФ у цих клітинах, а нейропротекторний вплив АПК асоційований з підвищеним рівнем в них НІФ [37, 98].

HIF є багатофункціональним фактором ендогенної регуляції, який значною мірою опосередковує резистентність та ушкодження нейронів до нестачі кисню і глюкози та взаємопов'язаний з багатьма клітинними механізмами. Однією з важливих ланок у процесі забезпечення життєздатності є підтримка внутріклітинного Ca^{2+} гомеостазу, зокрема при нестачі кисню і глюкози [47]. У нейронах важливу роль в утилізації надлишку Ca^{2+} з внутрішньоклітинного простіру відіграють Са-АТФази плазматичної мембрани (PMCA) та саркоплазматичного ретикулуму, які здійснюють виведення Ca^{2+} за межі клітини або акумуляцію Ca^{2+} у ретикулумі (SERCA), відповідно [205]. Дестабілізація PMCA- SERCA-іонтранспортних систем значною мірою обумовлює ушкодження клітин.

За допомогою ПЛР-аналізу ми дослідили зміни рівня експресії підтипів Ca^{2+} -АТФаз [47, 158], зокрема PMCA1, PMCA2 та SERCA-2b, у CA1 пірамідній зоні культивованих зрізів гіпокампа за умов нашої експериментальної схеми та з точки зору залучення цих Ca^{2+} -регулюючих механізмів до ефектів КГД і АПК та виявлення їх зв'язку з HIF-опосередкованими сигнальними шляхами.

Виявлено, що КГД призводить до суттєвого зниження рівня експресії PMCA1 та PMCA2 у CA1 нейронах гіпокампальних зрізів (Рис. 3.74). Це опосередковано вказує, що пошкодження клітин, виявлене нами у цій зоні, може бути пов'язане з недостатньою утилізацією внутріклітинного Ca^{2+} . За умов АПК одного, PMCA1- та PMCA2-експресія утримувалася на рівні контрольних значень. КГД після АПК не викликало суттєвої дестабілізації згаданих АТФ-аз. Ці результати вказують на те, що протекторні ефекти АПК з наступною КГД певною мірою опосередковані стабілізацією роботи PMCA1, PMCA2. Простежується взаємозв'язок HIF-опосередкованого підвищення життєздатності CA1 нейронів при КГД (у варіанті

ДПД/КГД) з РМСА, оскільки у присутності ДПД (блокатора НІФ проліл-гідроксилази) з наступною КГД виявлено суттєве підвищення рівня експресії РМСА1, РМСА2, відносно КГД (Рис. 3.74, А,Б).

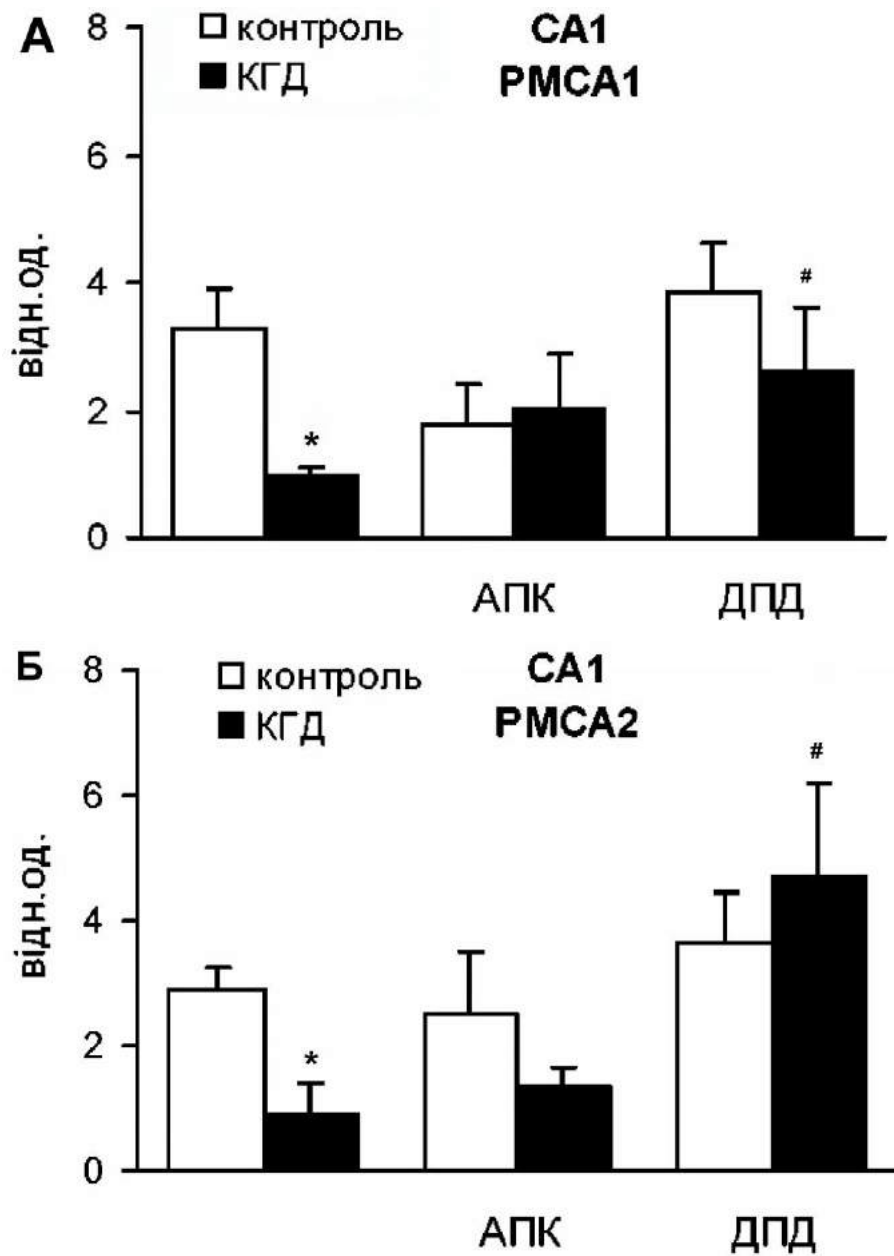


Рис. 3.74 Зміни рівня експресії РМСА1 (А) і РМСА2 (Б) у СА1 зоні гіпокампальних зрізів у контролі та через 4 год після КГД за умов АПК та додавання ДПД; $n=8$, * – $p < 0,05$ по відношенню до контролю, # – $p < 0,05$ по відношенню до КГД.

В умовах нашого експерименту не виявлено змін експресії SERCA-2b, при КГД, відносно контролю (Рис. 3.75). На відміну від того, попереднє АПК підвищувало рівень SERCA-2b-експресії. Крім того, він підтримувався на вискому рівні і у варіанті АПК/КГД. Ці результати вказують на те, що протекторні ефекти АПК значною мірою обумовлені активацією прецесу SERCA-опосередкованої акумуляції надлишку Ca^{2+} у депо саркоплазматичного ретикулуму.

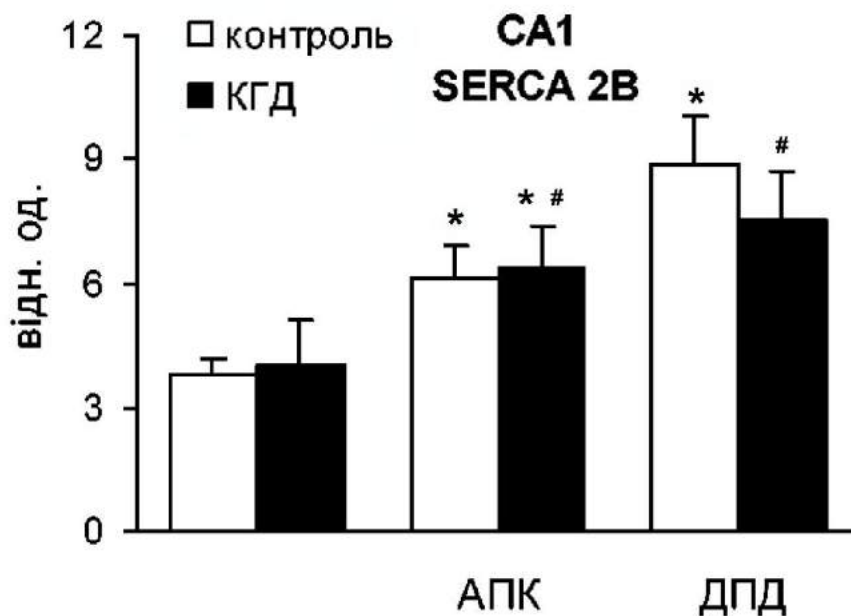


Рис. 3.75. Зміни рівня експресії SERCA-2b у CA1 зоні гіпокампальних зрізів у контролі та через 4 год після КГД за умов АПК та додавання ДПД; $n=8$, * – $p < 0,05$ по відношенню до контролю, # – $p < 0,05$ по відношенню до КГД.

Ще більш виразними та односпрямовано підвищеними зміни були проявлені у присутності ДПД як за нормальних умов, так і при наступній КГД. Активуючі ефекти ДПД на SERCA-2b-експресію, вказують на взаємозв'язок активації Ca^{2+} -акумуляції з

HIF-опосередкованими сигнальними шляхами у процесі забезпечення життєздатності CA1 нейронів при КГД.

Основні результати **розділу 3.7** опубліковані у таких статтях: [148, 178].

3.8. Взаємозв'язок HIF/NCAM сигнальних шляхів

Функціональний взаємозв'язок HIF/NCAM сигнальних шляхів, про які йшлося раніше (п.п. 3.4.4, 3.5), має еволюційні коріння. 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 [53, 68, 265]. Ці механізми генетично закріплені і відіграють важливу роль у організмі савців для адаптації до киснево-глюкозних коливань у нормі та при патології.

Механізми виживання клітин передбачають залучення багатьох клітинних механізмів та їх взаємодію [35, 271]. Для виявлення ролі HIF/NCAM сигнальних шляхів у процесі забезпечення життєздатності нервових клітин гіпокампа в умовах нестачі кисню та глюкози, нами були проведені дослідження з використанням паралельно 2-х *in vitro* моделей, органотипової та дисоційованої культур гіпокампа. Суттєва відмінність цих моделей полягає в тому, що у органотиповій культурі зберігаються природні стабільні 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.

Досліджували роль NCAM-опосередкованої стимуляції FGFR на зміні експресії HIF-1 α в умовах 30-хв КГД та нормоксичної реоксигенації 24 год, коли ефекти КГД найбільш виражені за умов нашого експерименту. Для FGFR-стимуляції ми використовували синтетичний міметик NCAM – пептид FGL, що імітує гетерофільне зв'язування між NCAM і FGFR [37, 98]. Раніше (п. 3.4.4) було показано, що FGL демонструє нейропротективні та протизапальні властивості, але не зрозуміло, які механізми задіяні у ефекти FGL. Крім того, за допомогою ПЛР-аналізу на культивованих гіпокампальних зрізах було показано, що за наших експериментальних умов експресія знижується (п. 3.5). У цій серії експериментів для виявлення HIF-1 α ми використовували ІМГХ забарвлення та конфокальну мікроскопію, які підтвердили попередні результати ПЛР. Оцінка інтегральної щільності HIF-1 α ⁺ сигналу показала суттєве зниження цього показника у CA1 зоні зрізів гіпокампа після КГД (Рис 3.76). 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 скасувало позитивний ефект FGL, HIF-1 α ⁺ був на рівні КГД.

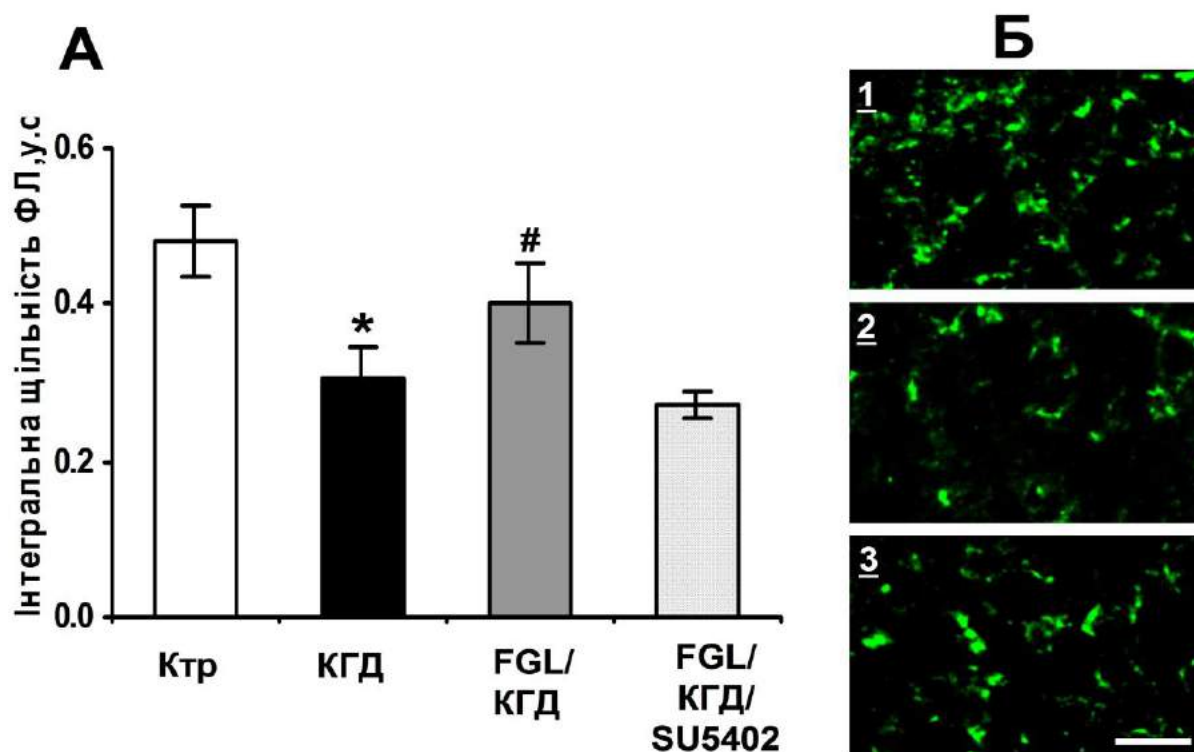


Рис. 3.76. Оцінка інтегральна щільність $HIF-1\alpha^+$ сигналу у культивованих зрізів гіпокампа за нормальних умов та через 24 год після 30-хв КГД у присутності синтетичного пептидного міметика NCAM (FGL) і блокатора FGFR (SU5402) – А. Зображення $HIF-1\alpha^+$ імуногістохімічного забарвлення у контролі (1), після КГД (2) та FGL/КГД (3) – Б. Масштабна лінія – 350 мкм; $n=12$,
* – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

На відміну від культивованих зрізів, у дисоційованій культурі виявлено підвищення рівня $HIF-1\alpha^+$ сигналу (Рис. 3. 77). Присутність FGL не змінила рівень $HIF-1\alpha^+$, після КГД він залишався високим, проте інгібування FGFR за допомогою SU5402 за умов КГД, стабілізувало цей показник до контрольного рівня.

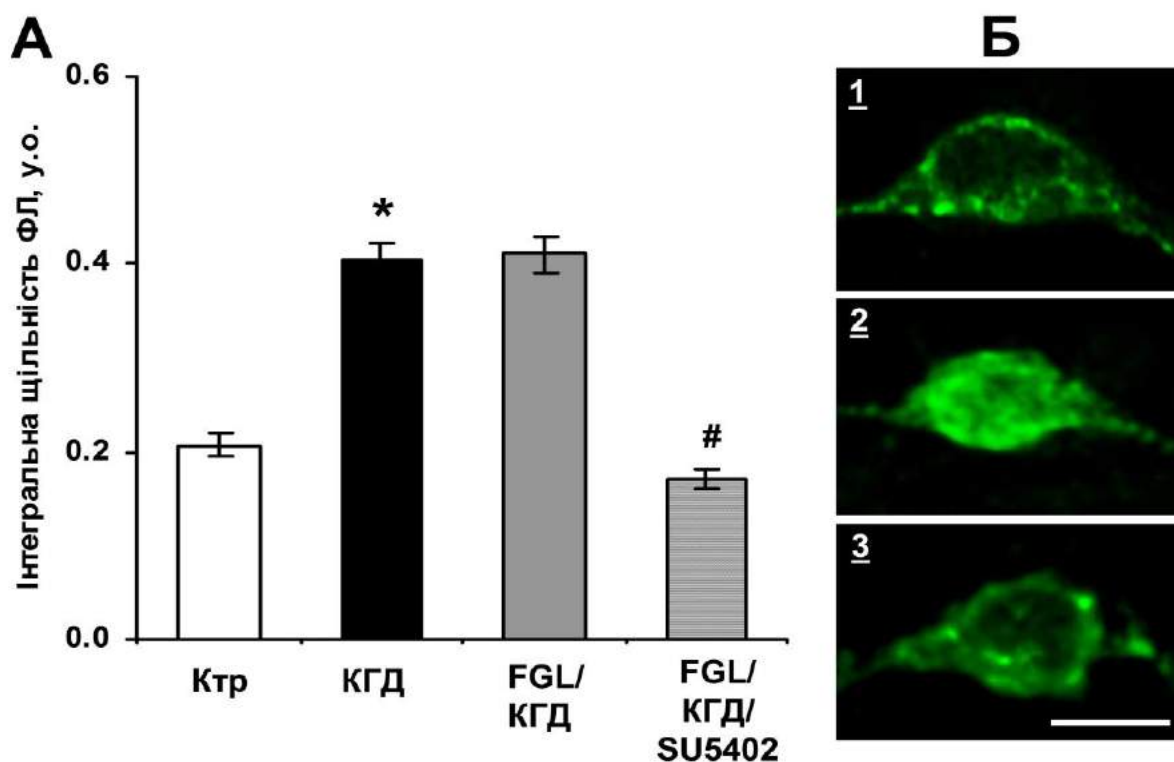


Рис. 3.77. Оцінка інтегральна щільність $HIF-1\alpha^+$ сигналу у культивованих дисоційованих клітинах гіпокампа за нормальних умов та через 24 год після 30-хв КГД в присутності синтетичного пептидного міметика NCAM (FGL) і блокатора FGFR (SU5402) – А. Зображення $HIF-1\alpha^+$ імуногістохімічного забарвлення у контролі (1), після КГД (2) та FGL/КГД (3) – Б. Масштабна лінія – 350 мкм; $n=40$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

Виявлені відмінності рівня $HIF-1\alpha$, корелювали з різницею показників життєздатності та мітохондріальної активності обох культур при їх паралельному дослідженні за допомогою ЛДГ- та МТС-тестів.

Встановлено, що вивільнення ЛДГ у культуральне середовище було збільшене, а мітохондріальна активність знижувалася у

культивованих зрізах через 24 год після 30 хв КГД, що свідчить про значне пошкодження клітин (Рис. 3.78, А).

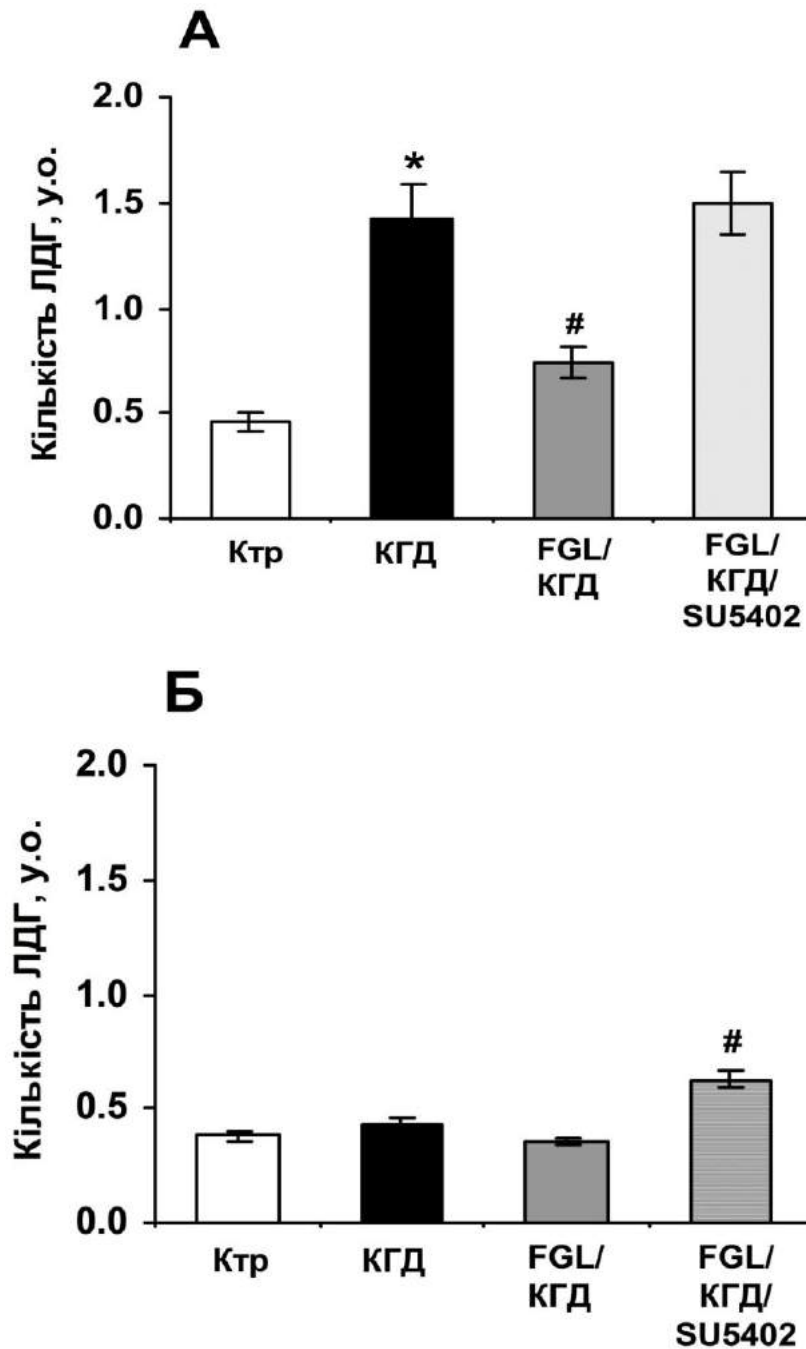


Рис. 3.78. Оцінка кількості цитозольного ферменту ЛДГ у культуральному середовищі від культивованих зрізів (А) та дисоційованих клітин (Б) гіпокампа за нормальних умов та через 24 год після 30-хв КГД у присутності синтетичного пептидного міметика NCAM (FGL) і блокатора FGFR (SU5402);

$n=10$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

FGL за умов КГД запобігав розвитку ушкодження зрізів, про що свідчить нижчий рівень ЛДГ та збільшення мітохондріальної активності, по відношення зниження при КГД (чорна лінія на графіку) (Рис. 3.79). Блокада FGFR скасовувала протективний ефект FGL на мітохондріальну активність зрізів.

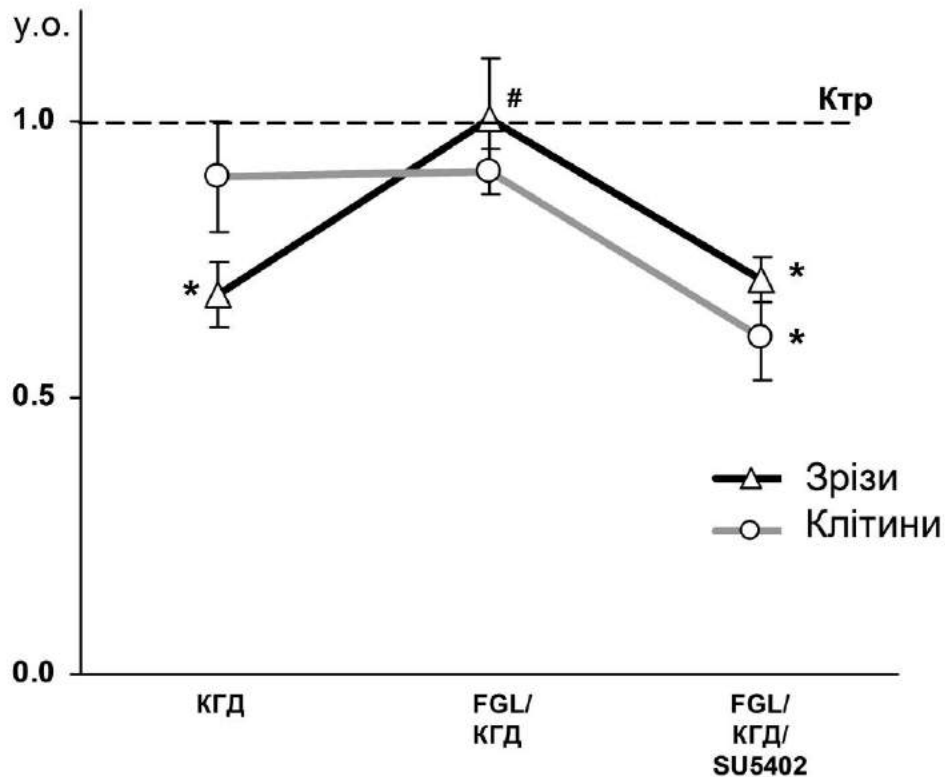


Рис. 3.79. Оцінка загальної мітохондріальної активності гіпокампальних культур за нормальних умов та через 24 год після 30-хв КГД у присутності синтетичного пептидного міметика NCAM (FGL) і блокатора FGFR (SU5402);

$n=10$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД.

У дисоційованій культурі клітини були більш життєздатними і як було показано раніше (п. 3.4.4), у 24-годинний термін дослідження, показники рівня ЛДГ незначно перевищували контрольні (Рис. 3.78, Б), а рівень мітохондріальної активності був певною мірою

нормалізований (Рис. 3.79). У варіанті FGL/КТД показник життєздатності не змінювався, при цьому рівень HIF-1 α був високим, що сприяло виживанню клітин у дисоційованій культурі. У той же час, блокада FGFR призводила до погіршення стану клітин та значно підвищувала ушкодження клітин.

Отримані результати вказують на те, що NCAM-опосередкована стимуляція FGFR корелює з накопиченням HIF-1 α і сприяє механізмам виживання клітин після КТД в обох типах культур. Крім того, ми припускаємо, що взаємодія HIF/NCAM сигнальних шляхів принаймні частково відповідає за резистентність гіпокампальних клітин до киснево-глюкозного дефіциту, і це може бути визначальним механізмом, який певною мірою пояснює феномен відстроченого характеру ішемічного ушкодження. Є свідчення, отримані здебільшого на дослідженнях канцерогензу, які вказують на функціональний зв'язок між FGFR та HIF [37, 98, 266]. Наші результати на моделі ушемічного ушкодження підтверджують, що FGFR є одним з важливих посередників HIF/NCAM-кооперації у контексті забезпечення життєздатності клітин.

Таким чином, 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.

Основні результати **розділу 3.8** опубліковані у статті: [180].

3.9. Дослідження впливу стовбурових клітин на культивовані зрізи мозку за умов розвитку ішемічного ушкодження

Цікавим аспектом стосовно особливостей міжклітинних взаємодій при ішемічному ушкодженні мозку є дослідження процесу відновлення нервової тканини після ішемії за рахунок стовбурових клітин у місцях пошкодження. Останнім часом все більше уваги приділяється дослідженню можливості використання стовбурових клітин у комплексному лікуванні та реабілітації пацієнтів з захворюваннями ЦНС.

Певні закономірності, що досліджено на теперешній час, передбачають існування тісного взаємозв'язку між HIF-1 α /NCAM-опосередкованими сигнальними шляхами у модуляції функцій нейронних стовбурових клітин (НСК) в умовах киснево-глюкозного дефіциту [67, 236]. 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 [123, 225, 270, 287]. Багато питань з приводу функціональної активності НСК, їх клітинних та гуморальних механізмів дії залишаються відкритими.

Однією з актуальніших напрямків досліджень у сучасній неврології є пошук шляхів лікування перинатальних уражень ЦНС, зокрема ураження білої речовини півкуль головного мозку у недоношених новонароджених – перивентрикулярна лейкомаляція (ПВЛ). Основними причинами ПВЛ є гіпоксично-ішемічні ураження головного мозку дитини, внутрішньоутробні інфекції, нейрозапалення,

аутоімунні процеси та ін [155, 323]. ПВЛ призводить до різноманітних неврологічних розладів, у тому числі моторних та когнітивних порушень, і майже у 90 % випадків стає причиною розвитку дитячого церебрального паралічу [38]. Клітинна терапія із використанням стовбурових клітин має широкі перспективи для лікування захворювань ЦНС, зокрема ПВЛ [165, 258]. Для вивчення механізмів розвитку ПВЛ, а також шляхів нейропротекції головного мозку, зокрема з використанням НСК, розроблені різноманітні *in vivo* та *in vitro* експериментальні моделі [93, 152, 254].

При моделюванні ПВЛ *in vivo* найчастіше використовують гіпоксично-ішемічну модель ураження білої речовини головного мозку новонароджених гризунів [62, 170]. Було показано, що найбільш чутливими клітинами, які пошкоджуються при ПВЛ, є олігодендроцити. Тому у більшості випадків, у якості *in vitro* моделі ПВЛ, використовується культура олігодендроцитів або попередників олігодендроцитів із додаванням ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС) – індуктора нейрозапалення – у культуральне середовище [157, 161, 226]. Але така модельна система не враховує реакцію інших нервових клітин. Органотипові культури зрізів головного мозку є адекватною моделлю для дослідження впливу трансплантації НСТ на стан нервової тканини при моделюванні мозкових пошкоджень [70, 330]. Така експериментальна система надає можливість дослідження механізмів дії трансплантованих стовбурових клітин в умовах моделювання ушкодження мозку.

Вважають, що в патогенезі перинатальних уражень головного мозку суттєву роль відіграє дисфункція резидентних прогеніторів, при активації або заміщенні яких можна сподіватись на позитивний терапевтичний ефект [64, 291, 306]. Незважаючи на численні дослідження у цьому напрямку, відкритим залишається питання не

тільки про допоміжну роль клітин трансплантату у регенерації, але й про можливість трансдиференціювання інших, відмінних від нейральних стовбурових клітин, наприклад мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), у нейрони або нейроглію [121, 298]. ММСК мають тропність до зони пошкодження та можуть впливати на перебіг процесів запалення і репарації у ній [16]. Вони забезпечують толерантність імунної системи реципієнта до алогенних клітин, власне для самих себе. Використання аутологічних ММСК дозволяє вирішити питання імунологічної сумісності трансплантованого матеріалу і тестування його на інфекції, а також уникнути етичних та юридичних проблем з приводу фетального донорського матеріалу [63]. Було показано, що при трансплантації ММСК жирової клітковини на моделі геморагічного інсульту у щурів послаблюється неврологічний дефіцит, знижується атрофія мозку, істотно зменшується зона ішемічного інфаркту та зростає кількість дрібних судин [142]. На *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції було продемонстровано нейропротекторний ефект трансплантації ММСК жирової клітковини [299]. Проте, розкриття механізмів, за допомогою яких трансплантовані ММСК сприяють виживанню клітин потребує додаткових досліджень.

У цьому розділі представлені результати дослідження впливу ММСК на життєздатність органотипової культури зрізів головного мозку новонароджених мишей лінії FVB при контактному і безконтактному співкультивуванні ММСКзі зрізами в умовах КГД/ЛПС (30-хв КГД та 100 нг ЛПС) та подальшої реоксигенації протягом 24 год.

Ізольований мозок постнатальної миші був розділений на дві частини по середній лінії і порізаний на фронтальні шматочки. Культивування проводили за стандартизованим протокол, описаним у

методах (п.2.1). Для безконтактної кокультивування вставки з культурами зрізів мозку були поміщені в 6-лункові планшети з заздалегідь підготовленою культурою ММСК, які були адгезовані і розпластані на дні планшету. (Рис. 3.80).

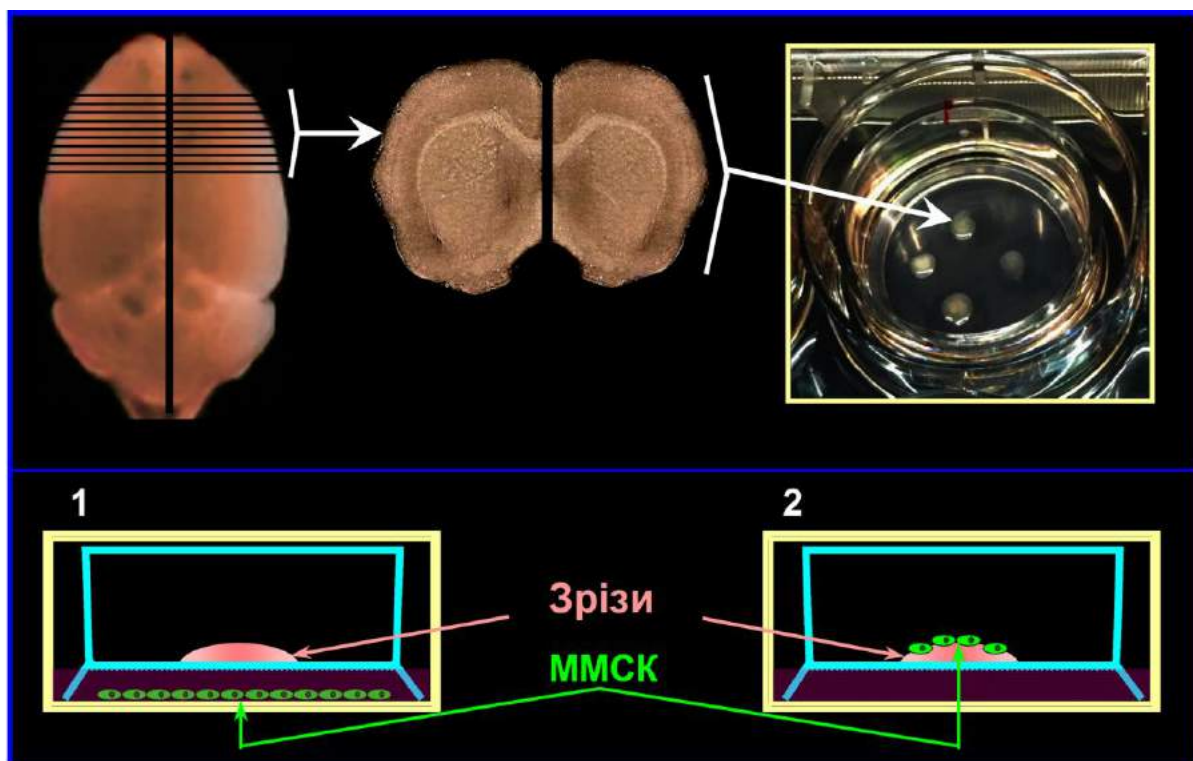


Рис. 3.80. Схема, що ілюструє експериментальні умови дослідження органотипових зрізів новонароджених мишей при контактному (2) та безконтактному (1) співкультивуванні з ММСК.

У цих експериментах використовували ММСК отримані з жирової клітковини мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном GFP. Для контактного співкультивування ММСК зі зрізами головного мозку мишей використовували GFP-позитивні ММСК 2-3 пасажів, які наносили безпосередньо на культивований зріз мозку перед КГД/ЛПС (Рис. 3.80, 2). GFP-позитивні ММСК завдяки природній флуоресценції зеленого кольору візуалізували за допомогою

кофокального мікроскопа. Близько 10% нанесених на зріз GFP-позитивних клітин прикріплялися до культивованого зрізу (Рис. 3.81). Решта ММСК розподілялися на поверхні пористої мембрани.

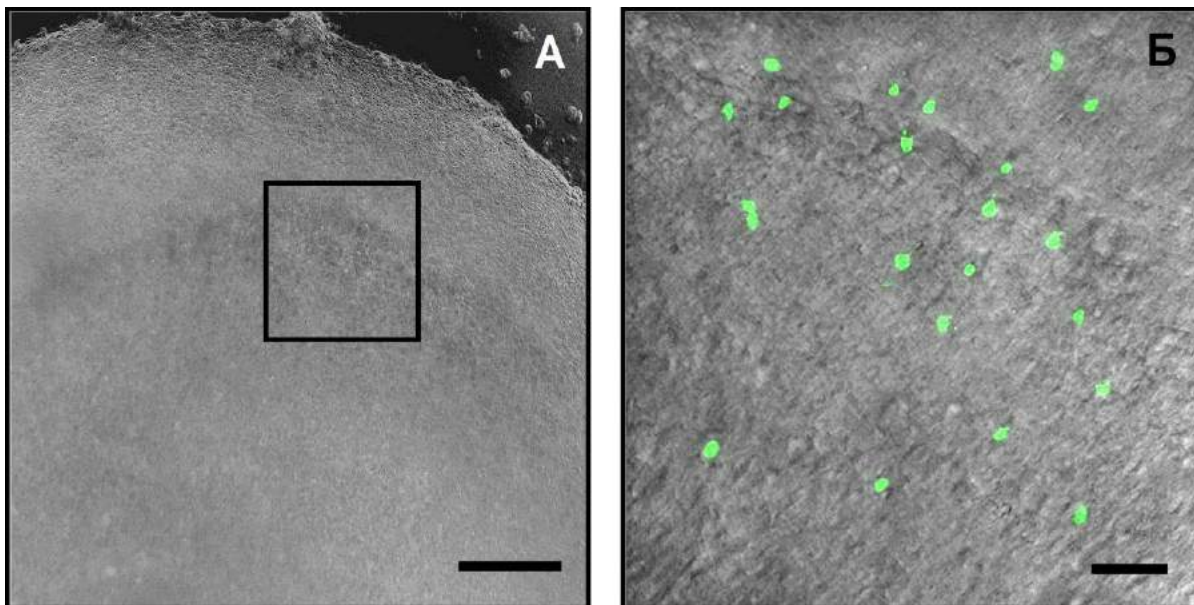


Рис. 3.81 Мікрофотографія культивованого зрізу головного мозку миші А – фазово-контрасне зображення. Квадратом позначена ділянка, яка показана на Б. Б – GFP-позитивні ММСК (зелений колір) після нанесення на культивований зріз у поєднанні з фазовим контрастом. Масштабна лінія: А – 500 мкм, Б – 50 мкм.

Для аналізу ступеня пошкодження культивованих зрізів в процесі КГД/ЛПС та ефекту співкультивування ММСК зі зрізами мозку на цій моделі вимірювали кількість ЛДГ у культуральному середовищі за допомогою ЛДГ-тесту.

Виявлено, що через 24 та 48 год після КГД/ЛПС відносна кількість ЛДГ збільшувалася порівняно із контрольними зрізами в 3,1 рази та 4,3 рази, відповідно (Рис. 3.82). Співкультивування з ММСК достовірно

зменшувало кількість ЛДГ порівняно із КГД/ЛПС, як після 24, так і після 48 год реоксигенації (у 2,4 рази, та в 1,9 рази, відповідно).

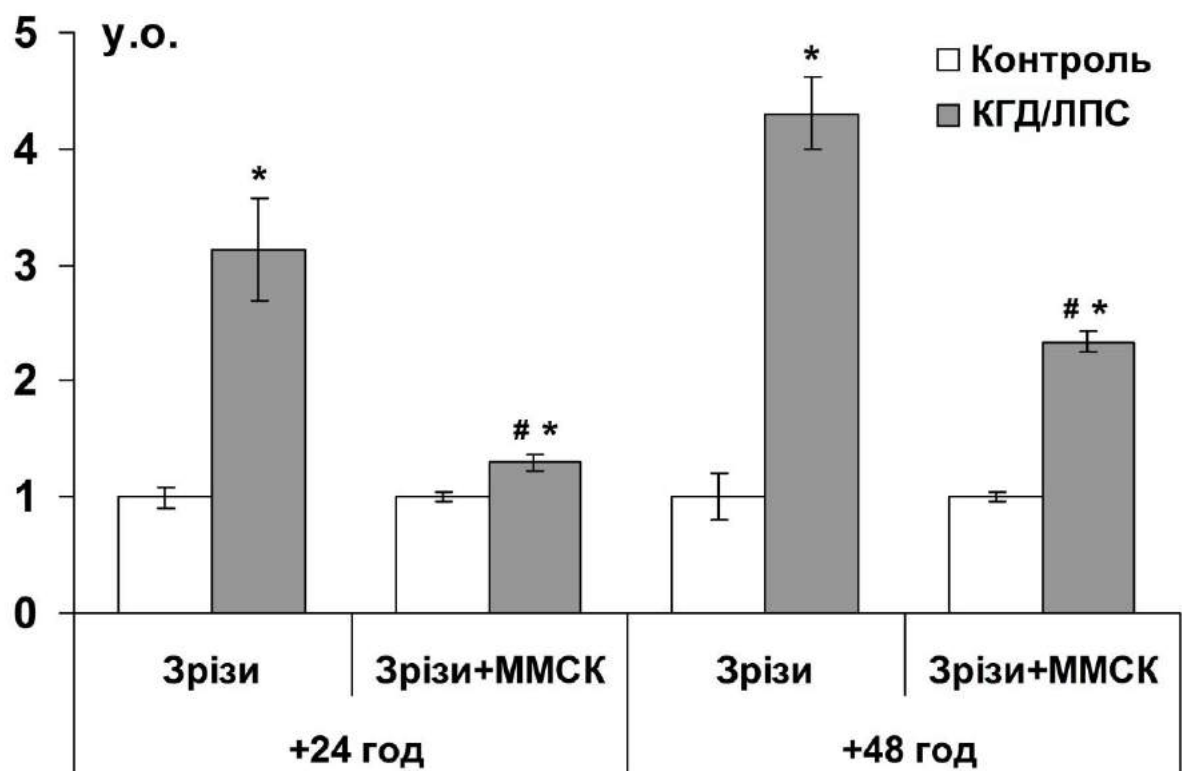


Рис. 3.82. Відносна кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі органотипових зрізів мозку через 24 та 48 год після 30-хв КГД та додавання ЛПС (100 нг/мл) в умовах контактного співкультивування з ММСК. $n=4$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД/ЛПС.

Оцінювали також вплив КГД/ЛПС на життєздатність ММСК у культурі. Показано, що через 24 та 48 год після КГД/ЛПС відносна кількість ЛДГ у культуральному середовищі ММСК достовірно не змінювалася порівняно із контрольними значеннями (Рис. 3.83). Тобто, КГД/ЛПС істотно не впливало на життєздатність ММСК у культурі, що свідчить про високу стійкість ММСК до ушкоджуючих чинників, використаних у даній експериментальній схемі.

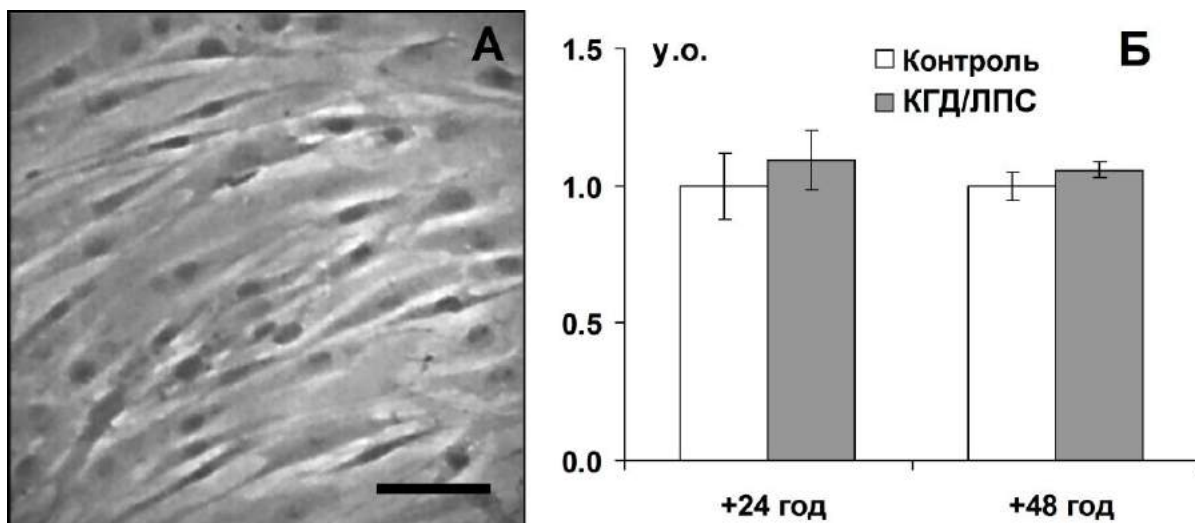


Рис. 3.83. Вплив КГД/ЛПС на життєздатність ММСК. А – мікрофотографія культури ММСК. Б – гістограма, що демонструє відносну кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі ММСК через 24 та 48 год після КГД/ЛПС; $n=4$. Масштабна лінія – 300 мкм.

Таким чином, результати продемонстрували, що контактне співкультивування зрізів головного мозку з ММСК мало нейропротекторний характер, суттєво зменшуючи пошкоджуючий вплив КГД/ЛПС.

Використовуючи ІМГХ, було проведено ідентифікацію трансплантованих клітин та оцінку їх можливої диференціації на 14 добу після нанесення ММСК на поверхню органотипової культури.

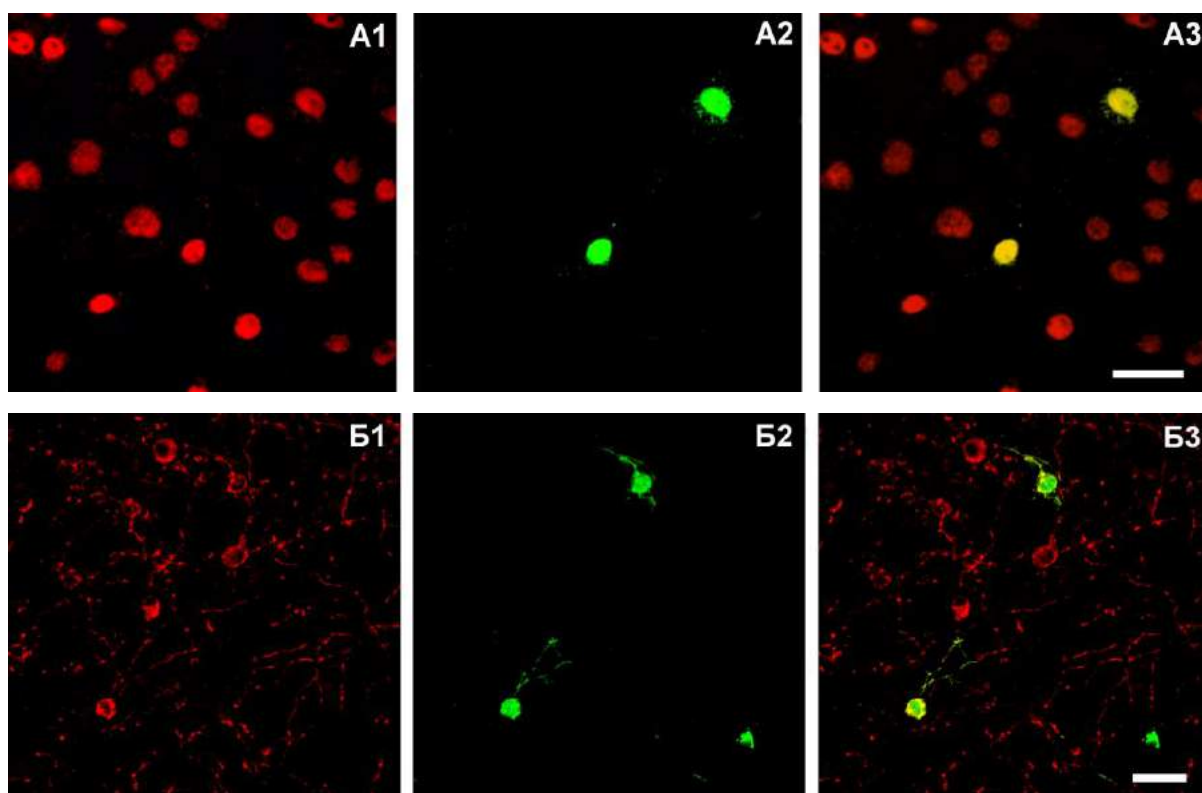


Рис. 3.84. Імуногістохімічний аналіз сумісної контактної культури GFP-позитивних ММСК та зрізів головного мозку миші на 14-у добу співкультивування. А1 – конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер нейронів (NeuN), А2, – GFP-позитивні ММСК, А3 – накладення зображень А1 і А2; В1 – конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер олігодендроцитів (oligodendrocytes), В2 – GFP-позитивні ММСК, В3 – накладення зображень В1 і В2. Масштабна лінія – 100 мкм.

ІМГХ аналіз показав, що на 14-у добу контактного співкультивування GFP-позитивних ММСК із органотиповими зрізами головного мозку ММСК виживали, зберігали фенотипічні ознаки. Більшість ММСК залишалися у недиференційованому стані, але приблизно 5 % GFP-позитивних ММСК, що прикріпилися до культивованого зрізу, диференціювалися у NeuN-позитивні зрілі

нейрони (Рис. 3.84, А1-А3) або Рір-позитивні олігодендроцити (Рис. 3.84, Б1-Б3).

Результати нашого дослідження свідчать про те, що ММСК здатні диференціюватися у клітини нервової тканини у модельних експериментах *in vitro* і мають протекторний вплив на культивовані зрізи головного мозку.

Можливі механізми нейропротекторної дії ММСК можуть бути пов'язані як зі заміною ушкоджених клітин шляхом диференціації та інтеграції трансплантованих клітин у зони пошкодження, так і з біоактивними чинниками, здатними модулювати розвиток ушкодження нервових клітин [128]. Здебільшого вважають, що нейропротекторні властивості трансплантованих ММСК реалізуються не прямо через диференціацію, а паракринно завдяки продукції численних факторів, які індукують міграцію ендогенних прогеніторів нейронів у зону пошкодження, стимулюють рост дендритів і аксонів та зменшують постішемичне запалення [166, 310]. Було показано, що кондиційне середовище з ММСК захищало культуру нейронів від індукованого апоптозу [326]. ММСК модулюють численні сигнальні каскади під час нейрогенезу, ангиогенезу, синаптогенезу та апоптозу за допомогою секреції трансмітерів (фактора росту фібробластів (FGF-2), епідермального фактора росту (EGF), нейротрофічного фактора гліальних клітин (GDNF) та ін. ММСК також продукують високий рівень цитокінів, які залучені в процеси проліферації клітин та регенерації тканин, таких як IGF-1 (insulin-like growth factor-1), VEGF-a (vascular endothelial growth factor-a), SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) та еритропоетин [247].

Відомо про вплив трансплантованих ММСК на тканини реципієнта шляхом диференціації у клітини, специфічні для місця трансплантації. Є дані, які підтверджують, що ММСК із жирової

клітковини сприяли морфологічному і функціональному відновленню пошкоджень спинного мозку. Вони експресували гліальні маркери GFAP, β -тубулін-3 і нейрофіламенти NF160 [257].

Наші результати у цій серії експериментів продемонстрували, що при контактному співкультивуванні ММСК підвищують життєздатність зрізів головного мозку при КГД/ЛПС за рахунок клітинних молекулярних механізмів, а певна кількість трансплантованих ММСК диференціювалися у нейрони та олігодендроцити, оскільки експресували маркери зрілих нейронів та олігодендроцитів.

Для перевірки гіпотези, що нейропротекторні властивості ММСК реалізуються також завдяки гуморальним факторам, які вони секретують, у наступній серії експериментів ми аналізували вплив ММСК на культивовані зрізи головного мозку після КГД/ЛПС в умовах безконтактного співкультивування (Рис. 3.80, 1). З цією метою ММСК 2-го пасажу переносили в 6-лункові культуральні планшети, де вони прикріплялися і розпластувалися. Надалі вкладиші з попередньо культивованими на поверхні напівпрониклої мембрани і стабілізованими зрізами переносили у планшети зі ММСК для подальшого безконтактного співкультивування.

Виявлено, що через 24 год після КГД/ЛПС відносна кількість ЛДГ суттєво збільшувалася (Рис. 3.85). Безконтактне співкультивування з ММСК достовірно зменшувало кількість ЛДГ порівняно із КГД/ЛПС.

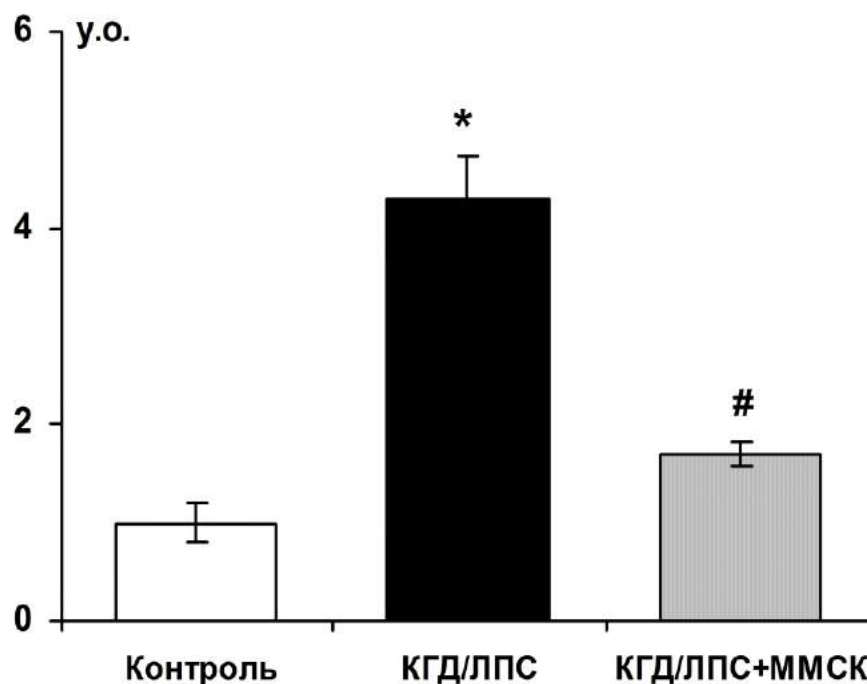


Рис. 3.85. Відносна кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі органотипових зрізів мозку через 24 год після 30-хв КГД та додавання ЛПС (100 нг/мл) в умовах безконтактного спілкування з ММСК; $n=8$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД/ЛПС.

Імуногістохімічний аналіз культивованих зрізів головного мозку на наявність маркеру олігодендроцитів Рір, показав, що через 24 год після КГД/ЛПС інтенсивність забарвлення Рір-позитивних олігодендроцитів зменшувалася, а при КГД/ЛПС в умовах безконтактного спілкування з ММСК відбувалося збільшення інтенсивності забарвлення Рір-позитивних олігодендроцитів ($4,0 \pm 1,1$ у.о.) у порівнянні з групою КГД/ЛПС ($1,9 \pm 0,4$ у.о.), але не досягало контрольного рівня ($5,9 \pm 1,1$ у.о.) (Рис. 3.86 А-Г).

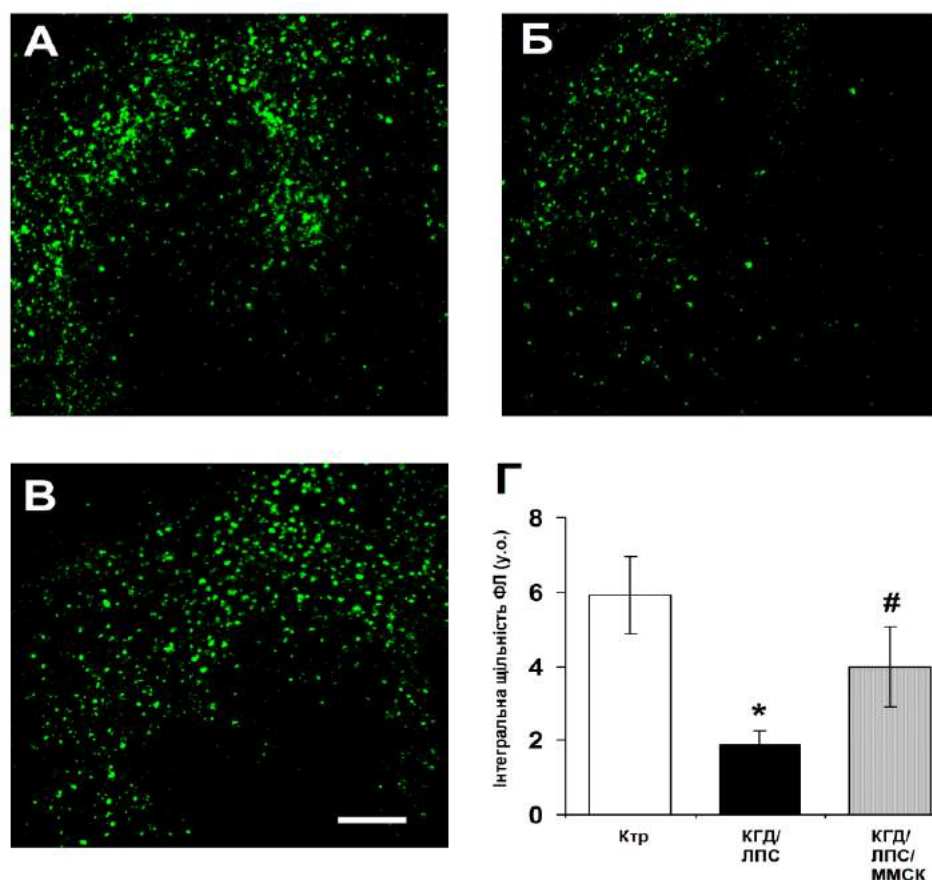


Рис. 3.86. Імуногістохімічний аналіз олігодендроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші за контрольних умов (А), через 24 год після КГД/ЛПС (Б) та після КГД/ЛПС за умов безконтактного спілкування з ММСК (В) – олігодендроцити марковані Рір антителами; Г – гістограма інтегральної щільності флюоресценції (у.о.) імунопозитивних олігодендроцитів; $n=8$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД/ЛПС. Масштабна лінія – 500 мкм.

Оцінка інтегральної щільності флюоресценції GFAP- та Iba-1-позитивного сигналу показала, що КГД/ЛПС призводила до збільшення відповідного сигналу (GFAP+, Iba-1+) у порівнянні з контрольною групою (Рис. 3.61. 3.62). У випадку астроцитів інтегральна щільність флюоресценції GFAP-позитивного сигналу через 24 год після КГД/ЛПС збільшилася до $15,8 \pm 0,7$ у.о. порівняно із контрольною групою ($5,8 \pm 0,7$ у.о.) (Рис. 3.87).

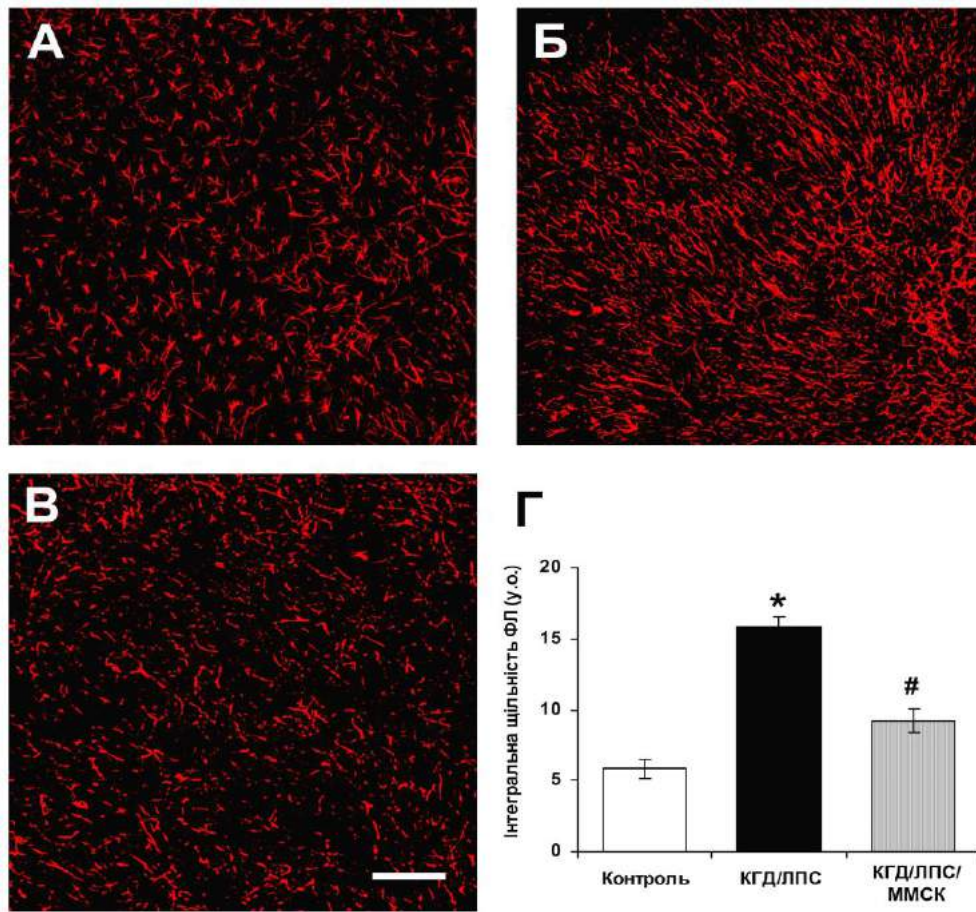


Рис. 3.87. Імуногістохімічний аналіз астрогліальних клітин в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші за контрольних умов (А), через 24 год після КГД/ЛПС (Б) та після КГД/ЛПС за умов безконтактного співкультивування з ММСК (В) – астроцити марковані GFAP антителами; Г – гістограма інтегральної щільності флюоресценції (у.о.) імунопозитивних астроцитів; $n=8$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД/ЛПС. Масштабна лінія – 500 мкм.

При КГД/ЛПС також збільшилася інтегральна щільність флюоресценції Іба-1-позитивних мікрогліальних клітин до $18,6 \pm 0,7$ у.о. порівняно із контролем – $5,5 \pm 0,9$ у.о. (Рис. 3.88).

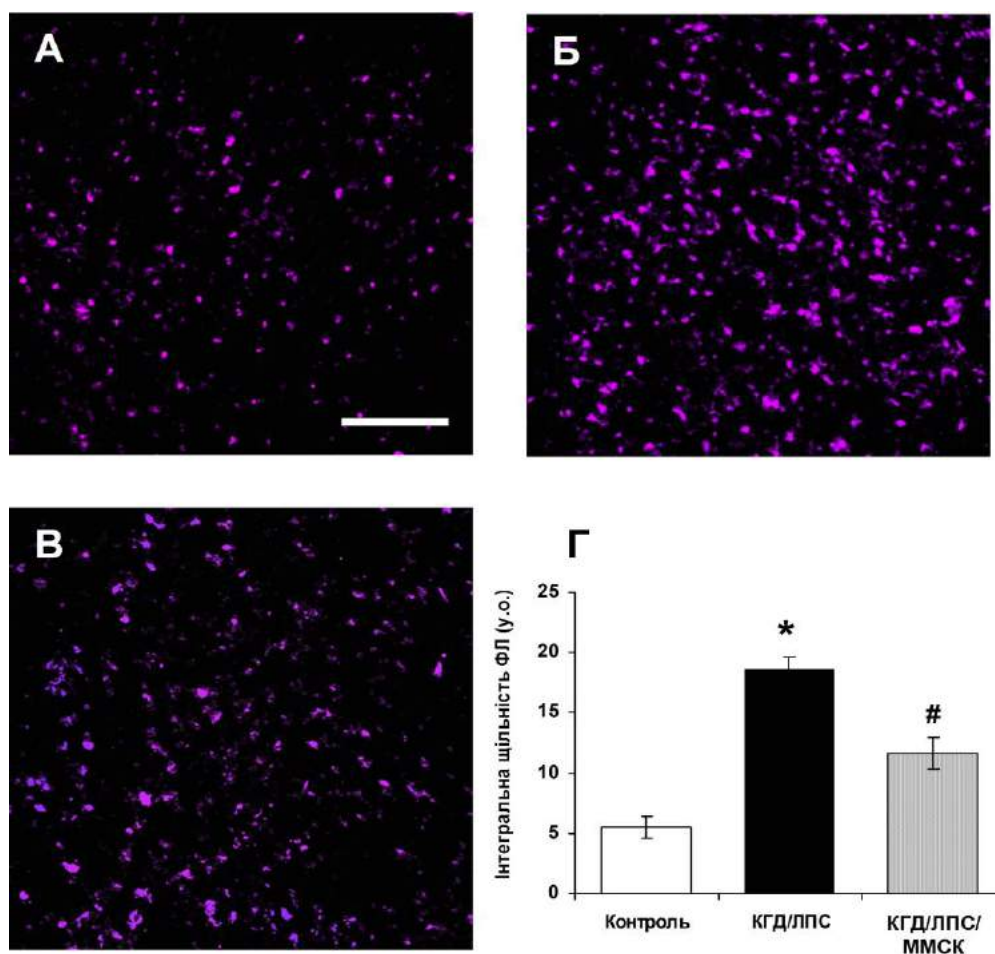


Рис. 3.88. Імуногістохімічний аналіз мікрогліальних клітин в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші за контрольних умов (А), через 24 год після КГД/ЛПС (Б) та після КГД/ЛПС за умов безконтактного співкультивування з ММСК (В) – марковані Iba-1 антителами. Псевдоколір. Г – гістограма інтегральної щільності флюоресценції (у.о.) імунопозитивної мікроглії; $n=8$, * – $p < 0.05$ до контролю, # – $p < 0.05$ до КГД/ЛПС. Масштабна лінія – 500 мкм.

У випадку співкультивування присутність ММСК певною мірою запобігала підвищенню GFAP- та Iba-1-імунопозитивних сигналів порівняно з групою КГД/ЛПС. Інтегральна щільність флюоресценції GFAP- та Iba-1-позитивних сигналів становила $9,2 \pm 0,8$ у.о. і $11,6 \pm 1,3$ у.о., відповідно.

Таким чином, на моделі *in vitro* ми показали, що ММСК в умовах як контактного, так і безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку мають нейропротекторний вплив при КГД/ЛПС суттєво зменшуючи ушкодження клітин. Спостерігалось також зменшення активного астро- та мікрогліозу. Крім того, показано принципову можливість для ММСК диференціюватися у нейрони і гліальні клітини за наших експериментальних умов. Це може свідчити про те, що ММСК реалізують свої нейропротекторні властивості за рахунок як клітинних, так гумогальних механізмів.

Основні результати **розділу 3.3** опубліковані у таких статтях: [299, 300, 301].

3.10. Узагальнення отриманих результатів

В основі функціонування нервової тканини при киснево-глюкозному дефіциті знаходяться численні клітинні і молекулярні механізми, які у певних межах сприяють процесам адаптації, але при досягненні порогу резистентності викликають пошкодження клітин. Вивчення та розуміння механізмів ішемічного ушкодження нервових клітин та пошук засобів нейропротекції не втрачає актуальності. Відомо, що гіпокамп є одним з найбільш чутливих до нестачі кисню та глюкози структур мозку, саме тому клітини гіпокампа стали об'єктом нашого дослідження.

Для вивчення особливостей міжклітинних взаємодій у гіпокампі та участі цих взаємодій у розвитку ішемічного ушкодження була застосована модель *in vitro* з використанням довгострокових гіпокампальних культур (органотипової чи дисоційованої) та киснево-глюкозної депривації (КГД) з наступною нормоксичною

реоксигенацією. Модель було розроблено таким чином, щоб імітувати відомий феномен відстроченого характеру загибелі нервових клітин, з метою виявлення тих початкових клітинних та молекулярних механізмів, які можуть розглядатися як додаткові мішені для терапевтичної корекції розвитку ішемічного пошкодження. Після нормалізації стану культур протягом 12-14 діб, їх піддавали 10-, 20- чи 30-хвилинній КГД з наступною нормоксичною реоксигенацією 1, 4 чи 24 год у залежності від завдання конкретного експерименту.

Розроблені критерії оцінки органотипових культур гіпокампа за умов КГД та простежена певна динаміка виникнення деструктивних змін. У наших експериментальних умовах суттєві ознаки ушкодження клітин культивованих зрізів гіпокампа спостерігаються у 4-годинний термін нормоксичної реоксигенації після КГД (10, 20, 30 хв) і насамперед у найбільш чутливій до нестачі кисню та глюкози СА1 зоні, де розташувалася тіла пірамідних нейронів. Надалі (у 24 годинний термін) зміни стають ще більш вираженими. Це співвідноситься з ефектом відстроченої загибелі СА1 нейронів при ішемії та відповідає цілям дослідження. Розроблені також критерії оцінки культур дисоційованих гіпокампальних клітин за умов КГД. Така модель використовувалася у разі необхідності, оскільки вона має певні переваги для деяких проведення досліджень на клітинному рівні.

Результати оцінки життєздатності культур продемонстрували пряму залежність ступеня ушкодження гіпокампальних нейронів в умовах культивування від тривалості періоду КГД та часу подальшої нормоксичної реоксигенації. Показано, що досить тривалий час (1-годинний термін) за нашої експериментальної схеми КГД не є критичною для виживання клітин, що дозволяє детально аналізувати особливості та механізми, які задіяні у процесах розвитку пошкодження культур гіпокампа при дефіциті кисню і глюкози та

передбачає можливість виявлення ендогенних механізмів нейропротекції, які маю потенціал для запобігання відстроченої загибелі нервових клітин.

Морфологічні деструктивні зміни, що спостерігалися у віддалені терміни вказують на переважання апоптотичного типу загибелі клітин та поступовий розвиток ефектів КГД. Крім того, виявлено, що за ідентичних умов впливу КГД інтернейрони, астрогліальні та мікрогліальні клітини відносно резистентні до КГД у порівнянні з пірамідними нейронами.

Виживання чи загибель клітин гіпокампа значною мірою обумовлено станом мітохондрій. Нами показано, що зміни мітохондріальної активності, корелюють з змінами життєздатності та морфології нервових клітин у СА1 зоні культивованих зрізів гіпокампа при КГД. Результати вказують на певну активацію мітохондрій всіх типів клітин у початковий період (до 1 год) після тимчасової КГД. Пірамідні нейрони проявляють ознаки пошкодження раніше (у 4-годинний термін), інтернейрони більш стійкі у відношенні КГД. Показано, що коли енергетичні резерви пірамідних нейронів вичерпуються, вони гинуть (переважно шляхом апоптозу) у той же час інтернейрони виживають. Крім того, спостерігається поступова активація астрогліальних і мікрогліальних клітин протягом всього періоду дослідження.

Показано, що в умовах нашої експериментальної моделі у розвитку ішемічного ушкодження клітин культивованих зрізів гіпокампа задіяні механізми пов'язані з глутаматною ексайтотоксичністю та активацією перекисного окислення ліпідів, оскільки блокада цих сигнальних шляхів поліпшує стан культур. Розвиток ушкодження клітин у віддалені терміни після КГД супроводжується суттєвими деструктивними змінами у СА1 зоні

гіпокампа. Виявлені якісні та кількісні відхилення у структурі нейронів та синапсів по відношенню до контролю.

Аналіз ультраструктурних змін протягом першої години після КГД, коли руйнівні ефекти на нервові клітини ще не мають значних проявів, відбуваються суттєві зміни структури пре- і постсинаптичних частин збудливих синапсів зони CA1 *stratum radiatum*, які особливо виражені у складних синапсах. Крім того, КГД призводив до зменшення загальної кількості синаптичних везикул у пресинаптичних терміналях, зниження їх щільності, а також виснаження пулу везикул готових до вивільнення. Зміни мають односпрямований характер як для простих, так і для складних синапсів. Всі ці події мають суттєвий вплив на синаптичну активність і свідчать про певну ступінь виснаження збудливих синапсів, що може бути причиною подальшого розвитку функціональних порушень у CA1 нейронах після КГД. Отримані результати розширюють уявлення про ультраструктурні зміни в умовах гіперактивації збудливих синапсів при КГД.

Показано, що протягом першої години після КГД відбувається активація ГАМК-ергічних гальмівних синапсів. Це супроводжується збільшенням площі контактування інтернейронів з сомою CA1 пірамідних нейронів та виникненням перфорованих/сегментованих форм постсинаптичної щільності, що може свідчити про трансформацію простих синапсів у складні, згідно нашої класифікації.

Можна припускати, що згаданий механізм формування активної зони, а саме утворення складної форми ПСЩ, відбувається аналогічно і у випадку збудливих синапсів та є ознакою підвищення синаптичної активності. Ультраструктурні зміни гальмівних синапсів були більш стримані, відносно збудливих. Особливе розташування гальмівних синапсів інтернейронів на сомі пірамідних нейронів та їх активація після КГД свідчить про суттєвий вклад інтернейронів у модуляцію

функціонування та життєздатності пірамідних нейронів при їх гіперактивації в умовах КГД.

Інтернейрони були більш резистентними у порівнянні з CA1 пірамідними нейронами у віддалені терміни після КГД. Показано, що вони коекспресують білки GAD67, $\alpha 7$ -nAChRs і Cx36. Показано, що через ГАМК-Р, $\alpha 7$ -nAChRs та Cx36-канали інтернейрони мають здатність певною мірою впливати на виживання CA1 нейронів після КГД. Підвищена життєздатність інтернейронів та нормалізація в них синтезу/метаболізму ГАМК передбачає певну координовану кооперацію згаданих механізмів.

Виявлене у наших експериментах збільшення об'єму глії навколо збудливих синапсів свідчить про здатність цих клітин до модуляції синаптичної пластичності та життєздатності нейронів в умовах нестачі кисню та глюкози.

Отже, інтернейрони та гліальні клітини значною мірою можуть опосередковувати відстрочений характер ушкодження пірамідних нейронів.

Показано, що одним з важливих факторів, які визначають життєздатність CA1 пірамідальних нейронів гіпокампа при КГД є гліцинові рецептори, розташовані переважно на сомі нейронів. Це має певний потенціал для розробки нових терапевтичних стратегій захисту нейронів при ішемії шляхом фармакологічної модуляції сигнальних шляхів, опосередкованих GlyRs.

Отримані нами дані свідчать, що важливу роль у забезпеченні життєздатності нервових клітин та їх синаптичної активності в умовах КГД відіграють нейронні молекули клітинної адгезії. NCAM сприяють міжклітинним взаємодіям та стійкості нейронів до патологічних впливів. Пептид FGL, міметик гетерофільного зв'язування NCAM, запобігав дестабілізації синаптичних контактів і деструкції нейронів,

що свідчить про суттєвий вклад NCAM у підтримку клітинного гомеостазу при ішемічному ушкодженні. Наші експериментальні моделі дозволили виявити певні початкові ознаки ушкодження нейронів. Показано, що протягом першої години після КГД відбувалося зменшення швидкості екзоцитозу нейромедіатора у зонах синаптичних контактів, що супроводжувалося зниженням загальної активності клітинного метаболізму. Вказані ендogenous механізми значною мірою опосередковані NCAM, вони можуть бути відповідальними за порушення передачі сигналів між нейронами і розвиток їх пошкодження опосередковане дисфункцією NCAM. Відновлення функціональної активності нейронів у присутності синтетичного пептиду FGL свідчить про важливу роль NCAM у механізмах, які певною мірою здатні протистояти розвитку ішемічного ушкодження.

Крім того, показано, що ефективність синаптичної передачі значною мірою координують трансмембранні білки пресеніліну (PS1) і синаптотагміну (Syt1), взаємодія яких опосередковує вивільнення нейромедіатору з синаптичних везикул, а модуляція цих ендogenous механізмів є важливим елементом для нейропротекції в умовах мозкових патологій.

За наших експериментальних умов було виявлено, що у проміжний період (4-годинний термін) після КГД у CA1 пірамідних нейронах спостерігається зниження рівня експресії HIF та Ca^{2+} -АТФази (PMCA), яке співвідноситься з недостатньою утилізацією у цих клітинах внутріклітинного кальцію і з подальшим їх пошкодженням. Нейропротекторний вплив аноксичного прекодиціювання (АПК) в умовах наступної КГД асоціюється з підвищеним рівнем експресії в них HIF та стабілізацією роботи Ca^{2+} -АТФаз (PMCA і SERCA). Простежується взаємозв'язок HIF-опосередкованого підвищення життєздатності CA1 нейронів при КГД з експресією PMCA, оскільки у

присутності блокатора HIF проліл-гідроксилази (ДПД) після КГД виявлено суттєве підвищення рівня експресії PMCA1, PMCA2, що передбачає посилення вивільнення Ca^{2+} з клітин і зменшення пошкодження нейронів. Крім того, протекторні ефекти АПК можуть бути обумовлені підвищенням рівня експресії SERCA та активацією процесу акумуляції надлишку Ca^{2+} у депо саркоплазматичного ретикулуму. Виявлено взаємозв'язок Ca^{2+} гомеостазу з HIF-опосередкованими сигнальними шляхами у процесі забезпечення життєздатності CA1 нейронів при КГД.

У роботі також було виявлено тісний функціональний взаємозв'язок NCAM-, FGFR- та HIF-опосередкованих механізмів, які здатні у певних межах протидіяти розвитку пошкодження нейронів внаслідок нестачі кисню та глюкози. Присутність NCAM-міметика у культуральному середовищі при КГД запобігала зниженню рівня HIF і стабілізувала показники життєздатності і метаболічної активності у культурах гіпокампа. FGFR є важливим зв'язуючим елементом NCAM-опосередкованих сигнальних шляхів. Згадані механізми приймають безпосередню участь у забезпеченні життєздатності нервових клітин і можуть розглядатися як фактори ендогенної нейропротекції.

Ендогенні механізми нейропротекції обумовлюють як резистентність клітин до патологічних умов, так і можливість процесів відновлення у нервовій тканині, зокрема за рахунок стовбурових клітин. Нами показано, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) мають нейропротекторні властивості в умовах їх контактного і безконтактного співкультивування з культивованими зрізами. Присутність ММСК у культурі запобігала ушкодженню нервових клітин за патологічних умов. Крім того, показано, що ММСК при контактному культивуванні здатні диференціюватися у нейрони і гліальні клітини за наших експериментальних умов. Це свідчить, що

ММСК можуть реалізовувати протекторну дію за рахунок як клітинних, так гумогальних механізмів.

Одже, представлені у цій роботі результати поглиблюють уявлення про молекулярні механізми, задіяні у розвиток пошкодження нервових клітин внаслідок дефіциту кисню і глюкози та вказують на існування певної кооперації внутрішньо- і міжклітинних механізмів, що має широкі перспективи у напрямку розробки нових стратегій комплексної модуляції функціонування і життєздатності нейронів при ішемічному пошкодженні. Представлені модельні системи можуть бути використані для тестування нейропротекторних засобів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені результати комплексного дослідження різних типів гіпокампальних клітин, виявлені особливості міжклітинних взаємодій та висвітлені певні ендогенні 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 CA1 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 прекодиціювання 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 нами 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 можливість комплексного підходу у напрямку розробки засобів нейропротекції мозкових порушень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Божкова В.П., Брежестовский П.Д., Буравлев В.П. и др. (1988). Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. *Москва: Наука*, 318 с.
2. Винничук С.М., & Черенько Т.М. (2003). Ишемический инсульт: эволюция взглядов на стратегию лечения. *Київ: ООО Комполис*, 120 с.
3. Гиріна О., & Глущенко А. (2003). Перебіг вільнорадикальних процесів і підбір антиоксидантної терапії при ішемічній хворобі серця. *Ліки України*, 4, 13-19.
4. Гусев Е.И., & Скворцова В.И. (2001). Ишемия головного мозга: Монография. *Москва: Медицина*, 328 с.
5. Зайцев В.Г., & Закревский В.И. (1998). Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. *Вестник Волгоградской медицинской академии*, 4, 49 – 53.
6. Иванов К.П., Кисляков Ю.Я. (1979). Энергетические потребности и кислородное обеспечение головного мозга. *Ленинград: Наука*, 216 с.
7. 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.
8. Лушнікова І.В., Ніконенко І.Р., Ніконенко А.Г., & Скібо Г.Г. (2008). Просторовий розподіл везикул у синапсах СА1 зони гіпокампа при дії короткотривалої аноксії/гіпоглікемії та довготривалої потенціації. *Фізіологічний журнал*, 54(1), 35-44.

9. Лушнікова І.В. (2008). Функціональна активність нейронів гіпокампа в умовах короткотривалої киснево-глюкозної деривації *in vitro*. *Фізіологічний журнал*, 54(6), 58-65.
10. Лушнікова І.В. (2009). Морфологічна пластичність клітин зони СА1 гіпокампа *in vitro* в умовах короткотривалої аноксії-гіпоглікемії та подальшої реоксигенації. *Фізіологічний журнал*, 55(3), 109-117.
11. Никоненко О.Г., & Скибо Г.Г. (2007). Роль молекул клітинної адгезії у модуляції синаптичної активності. *Фізіологічний журнал*, 53(2), 69–76.
12. Пивнева Т.А., Цупиков О.М., Пилипенко М.Н., Василенко Д.А., & Скибо Г.Г. (2005). Структурные изменения астроцитов в гиппокапе песчанки после экспериментальной ишемии мозга. *Нейрофизиология*, 37(5/6), 410-415.
13. Скибо Г.Г., Коваленко Т.М., Осадченко І.О., Цупиков О.М., & Пивнева Т.А. (2006). Структурні зміни в гіпокампі при експериментальній ішемії мозку. *Український неврологічний журнал*, 1(1), 86–92.
14. Abraham H., Losonczy A., Czeh G., & Lasar G. (2001). Rapid activation of microglial cells by hypoxia, kainic acid, and potassium ions in slice preparations of the rat hippocampus. *Brain Research*, 906, 115-126.
15. Aggarwal B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 3, 745-756.
16. Ahn S.Y., Chang Y.S., & Park W.S. (2014). Mesenchymal stem cells transplantation for neuroprotection in preterm infants with severe intraventricular hemorrhage. *Korean Journal of Pediatrics*, 57(6), 251–256.

17. Aiba I., & Shuttleworth C.W. (2012). Sustained NMDA receptor activation by spreading depolarizations can initiate excitotoxic injury in metabolically compromised neurons. *Journal of Physiology*, 590(22), 5877-5893. doi:10.1113/jphysiol.2012.234476.
18. Aiba I., Carlson A.P., Sheline C.T., & Shuttleworth C.W. (2012). Synaptic release and extracellular actions of Zn²⁺ limit propagation of spreading depression and related events in vitro and in vivo. *Journal of Neurophysiology*, 107(3), 1032-1041. doi:10.1152/jn.00453.2011.
19. Alabi A.A., & Tsien R.W. (2012). Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(8), 013680.
20. Albuquerque S., Pereira E., Alkondon E., Rogers M. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function, *Physiological Reviews*, 89(1), 73–120.
21. Alkondon M., & Albuquerque X. (2001). Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 86, 3043-3055.
22. Alldredge B. (2008). Clinical connexions. *Journal of Clinical Pathology*, 61, 885-890.
23. Allen N., Rossi D., & Attwell D. (2004). Sequential release of GABA by exocytosis and reversed uptake leads to neuronal swelling in simulated ischemia of hippocampal slice. *Journal of Neuroscience*, 24, 3837-3849.
24. Allen K., Fuchs E.C., Jaschonek H., Bannerman D.M., & Monyer H. (2011). Gap junctions between interneurons are required for normal spatial coding in the hippocampus and short spatial memory. *Journal of Neuroscience*, 31, 6542-6552.

25. Almeida A., Delgado-Esteban M., Bolanos J.P., & Medina J.M. (2002). Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *Journal of Neurochemistry*, 81, 207-217.
26. Aminova L.R., Chavez J.C., Lee J., Kung A., Lamanna J.C., & Ratan R.R. (2005). Prosurvival and prodeath effects of hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in a murine hippocampal cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 5, 3996–4003.
27. Applegate M.D., Kerr D.S., & Landfield P.W. (1987). Redistribution of synaptic vesicles during long term potentiation in the hippocampus. *Brain Research*, 401(2), 401-406.
28. Aroeira R.I., Ribeiro J.A., Sebastião A.M., & Valente C.A. (2011). Age-related changes of glycine receptor at the rat hippocampus: from the embryo to the adult. *Journal of Neurochemistry*, 118, 339-353.
29. Arundine M., & Tymianski M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34, 325-337.
30. Avignone E., Frenguelli B.G., & Irving A.J. (2005). Differential responses to NMDA receptor activation in rat hippocampal interneurons and pyramidal cells may underlie enhanced pyramidal cell vulnerability. *European Journal of Neuroscience*, 22, 3077-3090.
31. Baer K., Waldvogel H.J., Faull R.L., & Rees M.I. (2009). Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: an immunohistochemical review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2(25), 1-11. doi:10.3389/neuro.02.025.2009.
32. Bano D., & Ankarcrona M. (2018). Beyond the critical point: An overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream

- consequences. *Neuroscience Letters*, 663, 79-85.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.048>.
33. Behr D.C., Elle J., Underwood J. B., Davis R., Ward E., Karran C.L., Masters K., Beyreuther, & Multhaup G. (1999). Proteolytic fragments of Alzheimer's disease-associated presenilin 1 are present in synaptic organelles and growth cone membranes of rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1564-1573.
 34. Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., & Diemer N.M. (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 43, 369-1374.
 35. Berezin V. (2010). Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM. *Springer-Verlag New York*, 434 p.
 36. Bernardinelli Y., Nikonenko I., & Muller D. (2014). Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 123 doi: 10.3389/fnana.2014.00123.
 37. Blick C., Ramachandran A., Wigfield S., McCormick R., Jubb A., Buffa F.M., Turley H., Knowles M.A., Cranston D., Catto J., & Harris A.L. (2013). Hypoxia regulates FGFR3 expression via HIF-1 α and miR-100 and contributes to cell survival in non-muscle invasive bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 109(1), 50-59.
 38. Blumenthal I. (2004) Periventricular leucomalacia: a review. *Eur J Pediatr*, 163(8), 435-42.
 39. Bocchio M., Nabavi S., & Capogna M. (2017). Synaptic plasticity, engrams, and network oscillations in amygdala circuits for storage and retrieval of emotional memories. *Neuron*, 94(4), 731-743. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.022.

40. Bode A., & Lynch J.W. (2014). The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Molecular Brain*, 7(1), 1-12. <https://doi:10.1186/1756-6606-7-2>.
41. Bolay H., Gursoy-Ozdemir Y., Sara Y., Onur R., Can A., & Dalkara T. (2002) Persistent defect in transmitter release and synapsin phosphorylation in cerebral cortex after transient moderate ischemic injury. *Stroke*, 33(5), 1369-1375.
42. Bonanni L., Chachar M., Jover-Mengual T., Li H., Jones A., Yokota H., Ofengeim D., Flannery R.J., Miyawaki T., Cho C.H., Polster B.M., Pypaert M., Hardwick J.M., Sensi S.L., Zukin R.S., & Jonas E.A. (2006). Zinc-dependent multi-conductance channel activity in mitochondria isolated from ischemic brain. *Journal of Neuroscience*, 26, 6851-6862.
43. Bonde C., Noraberg J., & Zimmer J. (2002). Nuclear shrinkage and other markers of neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures. *Neuroscience Letters*, 327(1), 49-52.
44. Bourne J., Harris K.M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17, 381-386.
45. Brackmann M., Zhao C., Schmieden V., & Braunewell K.H. (2004). Cellular and subcellular localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(3), 1137-1142. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.172
46. Brencher L., Verhaegh R., & Kirsch M. (2017). Attenuation of intestinal ischemia-reperfusion-injury by β -alanine: a potentially glycine-receptor mediated effect. *Journal of Surgical Research*, 211, 233-241. doi:10.1016/j.jss.2016.12.023.

47. Brini M., Calì T., Ottolini D., & Carafoli E. (2013). The plasma membrane calcium pump in health and disease. *FEBS Journal*, 280(21), 5385-5397. doi: 10.1111/febs.12193.
48. Brosnan J.T., & Brosnan M.E. (2013). Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*, 45(3), 413-418. doi: 10.1007/s00726-012-1280-4.
49. Buckman J.F., Hernández H., Kress G.J., Votyakova T.V., Pal S., & Reynolds I.J. (2001). MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *Journal of Neuroscience Methods*, 104(2), 165-176.
50. Buckmaster P., Yamawaki R., & Zhang G. (2002). Axon arbors and synaptic connections of a vulnerable population of interneurons in the dentate gyrus in vivo. *Journal of Comparative Neurology*, 445, 360-373.
51. Buddle M., Eberhardt E., Ciminello L., Levin T., Wing R., DiPasquale K., & Raley-Susman K. (2003). Microtubule-associated protein 2 (MAP2) associates with the NMDA receptor and is spatially redistributed within rat hippocampal neurons after oxygen-glucose deprivation. *Brain Research*, 978, 38-50.
52. Budman E., Deeb W., Martinez-Ramirez D., Pilitsis J.G., Peng-Chen Z., Okun M.S., & Ramirez-Zamora A. (2018). Potential indications for deep brain stimulation in neurological disorders: an evolving field. *European Journal of Neurology*, 25(3), 434-e30. doi: 10.1111/ene.13548.
53. Cassavaugh J., & Lounsbury K.M. (2011). Hypoxia-mediated biological control. *Journal of Cell Biochemistry*, 112, 735-744.
54. Castillo P.E., Schoch S., Schmitz F., Sudhof T.C., & Malenka R.C. (2002). RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature*, 415, 327-330.

55. Cavallaro U., & Dejana E. (2011). Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(3), 189-197.
56. Chamberland S., & Topolnik L. (2012). Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Frontiers in Neurosciences*, 6, 165.
57. Chan P.H. (2004). Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochemical Research*, 29(11), 1943-1949.
58. Chang A.Y., Chan J.Y., Cheng H.L., Tsai C.Y., & Chan S.H. (2009) Hypoxia-inducible factor 1/heme oxygenase 1 cascade as upstream signals in the prolife role of heat shock protein 70 at rostral ventrolateral medulla during experimental brain stem death. *Shock*, 32, 651-658.
59. Chapman E.R. (2008). How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annual Review of Biochemistry*, 77, 615-641.
60. Chen W., Ostrowski R.P., Obenaus A., & Zhang J.H. (2009). Prodeath or prosurvival: two facets of hypoxia inducible factor-1 in perinatal brain injury. *Experimental Neurology*, 216(1), 7-15.
61. Chen H., Yoshioka H., Kim G.S., Jung J.E., Okami N., Sakata H., Maier C.M., Narasimhan P., Goeders C.E., & Chan P.H. (2011). Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14, 1505-1517.
62. Cheng T., Xue X., & Fu J. (2015). Effect of OLIG1 on the development of oligodendrocytes and myelination in a neonatal rat PVL model induced by hypoxia-ischemia. *Molecular Medicine Reports*, 11(4), 2379-86.

63. Chernykh E.R., Kafanova M.Y., Shevela E.Y., Sirota S.I., Adonina E.I., Sakhno L.V., Ostanin A.A., & Kozlov V.V. (2014). Clinical experience with autologous M2 macrophages in children with severe cerebral palsy. *Cell Transplantation*, 23(1), S97–104.
64. Chohan M. O. & Moore H. (2016). Interneuron Progenitor Transplantation to treat CNS dysfunction. *Front Neural Circuits*, 10, 64.
65. Choi D.W. (1987). Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. *Journal of Neurosciencia*, 7, 369-379.
66. Costa J.T., Mele M., Baptista M.S., Gomes J.R., Ruscher K., Nobre R.J., & Duarte C.B. (2016). Gephyrin Cleavage in In Vitro Brain Ischemia Decreases GABAA. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 3513-3527. <https://doi:10.1007/s12035-015-9283-2>.
67. Crosby M.E., Devlin C.M., Glazer P.M., Calin G.A., & Ivan M. (2009) Emerging roles of microRNAs in the molecular responses to hypoxia. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 3861-3866.
68. Crossin K.L. (2012). Oxygen levels and the regulation of cell adhesion in the nervous system: a control point for morphogenesis in development, disease and evolution? *Cell Adhesion and Migration*, 6(1), 49-58.
69. Cruikshank S.J., Hopperstad M., Younger M., Connors B.W., Spray D.C., & Srinivas M. (2004). Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101, 12364–12369.
70. Daviaud N., Garbayo E., Lautram N., Franconi F., Lemaire L., Perez-Pinzon M., & Montero-Menei C.N. (2014). Modeling nigrostriatal degeneration in organotypic cultures, a new ex vivo model of parkinson's disease. *Neuroscience*, 256, 10–22.

71. De Pina-Benabou H., Szostak V., Kyrozis A., Rempe D., Uziel D., Urban-Maldonado M., Benabou S., Spray D.C., Federoff H.J., Stanton P.K., & Rozental R. (2005). Blockade of gap junctions in vivo provides neuroprotection after perinatal global ischemia. *Stroke*, 36, 2232-2237.
72. Deans M.R., Gibson J.R., Sellitto C., Connor B.W., & Paul D.L. (2001). Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron*, 31, 477-485.
73. Decker T., & Lohmann-Matthes M.L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1), 61-69.
74. Deleuze C., Alonso G., Lefevre I.A., Duvoid-Guillou A., & Hussy N. (2005). Extrasynaptic localization of glycine receptors in the rat supraoptic nucleus: further evidence for their involvement in glia-to-neuron communication. *Neuroscience*, 133(1), 175-183. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.01.060
75. Dirnagl U., Becker K., & Meisel A. (2009). Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *The Lancet Neurology*, 8, 398-412.
76. Dityatev A., Dityateva G., Sytnyk V., Delling M., Toni N., Nikonenko I., Muller D., & Schachner M. (2004). Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9372-9382.
77. Downer E.J., Cowley T.R., Lyons A., Mills K.H., Berezin V., Bock E., & Lynch M.A. (2010). A novel anti-inflammatory role of NCAM-derived mimetic peptide, FGL. *Neurobiology of Aging*, 31(1), 118-128.

78. Durmaz R., Deliorman S., & Isiksoy S. (1999). Antiproliferative properties of the lazardoids U-83836E and U-74389G on glioma cells in vitro. *Pathology and Oncology Research*, 5(3), 223-228.
79. Edinger A.L., & Thompson C.B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 663-669.
80. Eichler S.A., Förster B., Smolinsky B., Jüttner R., Lehmann T.N., Fähring M., & Meier J.C. (2009). Splice-specific roles of glycine receptor $\alpha 3$ in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 30(6), 1077-1091. <https://doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06903.x>.
81. Elkashef S.M., Allison S.J., Sadiq M., Basheer H.A., Ribeiro Morais G., Loadman P.M., Pors K., & Falconer R.A. (2016). Polysialic acid sustains cancer cell survival and migratory capacity in a hypoxic environment. *Scientific Reports*, 33026, 1-11.
82. Faber D.S., & Pereda A.E. (2018). Two Forms of Electrical Transmission Between Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11.427, 1-11. doi: 10.3389/fnmol.2018.00427.
83. Fabian-Fine R., Skehel P., Errington M., Davies H.A., Sher E., Stewart M.G., & Fine A. (2001). Ultrastructural distribution of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 21, 7993–8003.
84. Fan X., Heijnen C.J., van der Kooij M.A., Groenendaal F., & van Bel F. (2009). The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Research Reviews*, 62(1), 99-108.
85. Farooq M.U., Goshgarian C., Min J., & Gorelick P.B. (2016). Pathophysiology and management of reperfusion injury and hyperperfusion syndrome after carotid endarterectomy and carotid

- artery stenting. *Experimental and Translational Stroke Medicine*, 8(1), 7. doi: 10.1186/s13231-016-0021-2.
86. Fedoroff S., & Richardson A. (2001). Protocols for neural cell culture. *Totowa, New Jersey: Humana Press*, 13-27.
 87. Ferchmin P.A., Perez D., Eterovic V.A., & de Vellis J. (2003). Nicotinic receptors differentially regulate N-methyl-D-aspartate damage in acute hippocampal slices. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305, 1071-1078.
 88. Flores C.E., & Méndez P. (2014). Shaping inhibition: activity dependent structural plasticity of GABAergic synapses. *Frontiers in Cell Neuroscience*, 8, 327. doi:10.3389/fncel.2014.00327.
 89. Flores C.E., Nikonenko I., Mendez P., Fritschy J.M., Tyagarajan S.K., & Muller D. (2015). Activity-dependent inhibitory synapse remodeling through gephyrin phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 112(1), E65-72. doi:10.1073/pnas.1411170112.
 90. Fontes J.D., Ramsey J., Polk J.M., Koop A., Denisova J.V., & Belousov A.B. (2015). Death of Neurons following Injury Requires Conductive Neuronal Gap Junction Channels but Not a Specific Connexin. *PLoS One*, 10(5), e0125395. doi: 10.1371/journal.pone.0125395.
 91. Francavilla C., Loeffler S., Piccini D., Kren A., Christofori G., & Cavallaro U. (2007). Neural cell adhesion molecule regulates the cellular response to fibroblast growth factor. *Journal of Cell Science*, 120(24), 4388-4394.
 92. Frantseva M.V., Kokarovtseva L., & Perez Velazquez J.L. (2002). Ischemia-induced brain damage depends on specific gap-junctional coupling. *Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism*, 22, 453-462.

93. Fu X.S., Zunich M., O'Connor J.C., Kavelaars A., Dantzer R., & Kelley K.W. (2010). Central administration of lipopolysaccharide induces depressive-like behavior in vivo and activates brain indoleamine 2, 3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 43.
94. Ganeshina O., Berry R.W., Petralia R.S., Nicholson D.A., & Geinisman Y. (2004). Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *Journal of Comparative Neurology*, 468(1), 86–95.
95. Ganeshina O., Berry R.W., Petralia R.S., Nicholson D.A., & Geinisman Y. (2004). Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous junctions. *Neuroscience*, 125(3), 615–623.
96. Genoud S., Pralong W., Riederer B.M., Eder L., Catsicas S., & Muller D. (1999). Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures. *Journal of Neurochemistry*, 72, 1699-1706.
97. Glushakov A.V., Voytenko L.P., Skok M.V., & Skok V.I. (2004). Distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing different alpha-subunits in the submucosal plexus of the guinea-pig. *Autonomic Neuroscience*, 110, 19–26.
98. Gouazé-Andersson V., Delmas C., Taurand M., Martinez-Gala J., Evrard S., Mazoyer S., Toulas C., & Cohen-Jonathan-Moyal E. (2016). FGFR1 induces glioblastoma radioresistance through the PLC γ /HIF1 α pathway. *Cancer Research*, 76(10), 3036-3044.
99. Grimm C., Hermann D.M., & Bogdanova A. (2005). Neuroprotection by hypoxic preconditioning: HIF-1 and erythropoietin protect from

- retinal degeneration. *Seminar in Cell and Developmental Biology*, 16, 531-538.
100. Gwag B.J., Canzoniero L.M., Sensi S.L., Demaro J.A., Koh J.Y., Goldberg M.P., Jacquin M., & Choi D.W. (1999). Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience*, 90, 1339-1348.
 101. Haber M., Zhou L., & Murai K.K. (2006). Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *Journal of Neuroscience*, 26, 8881-8891.
 102. Hada B., Karmacharya M.B., Park S.R., & Choi B.H. (2018). Low-intensity ultrasound decreases ischemia-induced edema by inhibiting N-methyl-d-aspartic acid receptors. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 45(6), 675-681. doi: 10.1017/cjn.2018.331.
 103. Hayakawa K., Esposito E., Wang X., Terasaki Y., Liu Y., Xing C., Ji X., & Lo E.H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, 535(7613), 551-555. doi: 10.1038/nature18928.
 104. Hammond C., Crepel V., Gozlan H., & Ben-Ari Y. (1994). Anoxic LTP sheds light on the multiple facets of NMDA receptors. *Trends in Neuroscience*, 17(11), 497-503.
 105. Hara S., Hamada J., Kobayashi C, Kondo Y., & Imura N. (2001). Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4, 808–813.
 106. Harata N., Ryan T., Smith S., Buchanan J., & Tsien R. (2001). Visualizing recycling synaptic vesicles in hippocampal neurons by FM 1-43 photoconversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98(22), 12748-12753.

107. Harris K.M., Fiala J.C., & Ostroff L. (2003). Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 358(1432), 745-748.
108. Harry GJ., & Lefebvre d'Hellencourt C. (2003). Dentate gyrus: alterations that occur with hippocampal injury. *Neurotoxicology*, 24, 343-356.
109. Harukuni I., & Bhardwaj A., (2006). Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurologic Clinics*, 24, 1–21.
110. Harvey R. J., Depner U. B., Wässle H., Ahmadi S., Heindl C., Reinold H., & Müller U. (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*, 304, 884-887. doi:10.1126/science.1094925.
111. Hassel B., & Brathe A. (2000). Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate *Journal of Neuroscience*, 20, 1342–1347.
112. Hernandez M.S., & Troncone L.R. (2009). Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *Journal of Neural Transmission*, 116, 1551-1560. doi:10.1007/s00702-009-0326-6.
113. Hertz L., & Zielke HR. (2004). Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends in Neuroscience*, 27, 735–743.
114. Hillis A.E. Johnson R.T., Griffin J., McArthur J. (2005). Acute ischemic stroke. *Current Therapy in Neurologic Disease*, St. Louis, MO: Mosby, 213-217.
115. Hirayama Y., & Koizumi S. (2018). Astrocytes and ischemic tolerance. *Neuroscience Research*, 126, 53-59. doi: 10.1016/j.neures.2017.11.013.
116. Hormuzdi S.G., Pais I., LeBeau F.E.N., Towers S.K., Rozov A., Buhl E.H., Whittington M.A., & Monyer H. (2001). Impaired electrical

- signalling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron*, 31, 487-495.
117. Hou Q., Gao X., Zhang X., Kong L., Wang X., Bian W., Tu Y., Jin M., Zhao G., Li B., Jing N., & Yu L. (2004). SNAP-25 in hippocampal CA1 region is involved in memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, 20(6), 1593-1603.
 118. Hu H. J., & Song M. (2017). Disrupted Ionic Homeostasis in Ischemic Stroke and New Therapeutic Targets. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 26, 2706-2719. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.011.
 119. Huang L., Li Q., Wen R., Yu Z., Li N., Ma L., & Feng W. (2017). Rho-kinase inhibitor prevents acute injury against transient focal cerebral ischemia by enhancing the expression and function of GABA receptors in rats. *European Journal of Pharmacology*, 797, 134-142. doi:10.1016/j.ejphar.2017.01.021.
 120. Ishimaru H., Casamenti F., Uéda K., Maruyama Y., & Pepeu G. (2001). Changes in presynaptic proteins, SNAP-25 and synaptophysin, in the hippocampal CA1 area in ischemic gerbils. *Brain Research*, 903, 94-101.
 121. Isik S., Zaim M., Yildiz M.T., Negis Y., Kunduraci T., Karakas N., Arikan G., & Cetin G. (2015). DNA topoisomerase II β as a molecular switch in neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Annals of Hematology*, 94(2), 7–18.
 122. Ivannikov M.V., Sugimori M., & Llinás R.R. (2013). Synaptic vesicle exocytosis in hippocampal synaptosomes correlate directly with total mitochondrial volume. *Journal of Molecular Neuroscience*, 49, 223-230.
 123. Ivanovic Z. (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *Journal of Cellular Physiology*, 219, 271-275.

124. Jander S., Schroeter M., & Saleh A. (2007). Imaging Inflammation in Acute Brain Ischemia. *Stroke*, 38, 642-645.
125. Jiang B.H., Semenza G.L., Bauer C., & Marti H.H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *American Journal of Physiology*, 271, C1172-1180.
126. Jin H., Wu H., Osterhaus G., Wei J., Davis K., Sha D., Floor E., Hsu C.C., Kopke R.D., & Wu J.Y. (2003). Demonstration of functional coupling between γ -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the US A*, 100, 4293-4298.
127. Jin R., Liu L., Zhang S., Nanda A., & Li G. (2013). Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 6(5), 834-851.
128. Jahn H.M., & Bergami M. (2018). Critical periods regulating the circuit integration of adult-born hippocampal neurons. *Cell and Tissue Research*, 371(1), 23-32. doi:10.1007/s00441-017-2677-x.
129. Janda E, Boi L, & Carta AR. (2018). Microglial Phagocytosis and Its Regulation: A Therapeutic Target in Parkinson's Disease? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 144. doi: 10.3389/fnmol.2018.00144.
130. Johansen FF. (1993). Interneurons in rat hippocampus after cerebral ischemia. Morphometric, functional, and therapeutic investigations. *Acta Neurologica Scandinavica*, 150, 1-32.
131. Johnson J.W., & Ascher P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325(6104), 529-531.
132. Jonas P., & Lisman J. (2014). Structure, function, and plasticity of hippocampal dentate gyrus microcircuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 107. doi:10.3389/fncir.2014.00107.

133. Jourdain P., Nikonenko I., Alberi S., & Muller D. (2002). Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *Journal of Neuroscience*, 22(8), 3108-3116.
134. Jung Y.J., Park S.J., Park J.S., & Lee K.E. (2004). Glucose/oxygen deprivation induces the alteration of synapsin I and phosphosynapsin. *Brain Research*, 996(1), 47-54.
135. Kalappa B.I., Gusev A.G., & Uteshev V.V. (2010). Activation of functional $\alpha 7$ -containing nAChRs in hippocampal CA1 pyramidal neurons by physiological levels of choline in the presence of PNU-120596. *PLoS One*, 5, e13964.
136. Kato H., Takahashi A., & Itoyama Y. (2003). Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Research Bulletin*, 60, 215-221.
137. Kavanagh R.J., & Kam P.C. (2001). Lazaroids: efficacy and mechanism of action of the 21-aminosteroids in neuroprotection. *British Journal of Anaesthesia*, 86(1), 110-119.
138. Kawai H., Zago W., & Berg D. (2002). Nicotinic $\alpha 7$ receptor clusters on hippocampal GABAergic neurons: regulation by synaptic activity and neurotrophins. *Journal of Neuroscience*, 22, 7903-7912.
139. Kayali F., Montie H.L., Rafols J.A., & DeGracia D.J. (2005). Prolonged translation arrest in reperfused hippocampal cornu Ammonis 1 is mediated by stress granules. *Neuroscience*, 134, 1223-1245.
140. Keener J., & Sneyd J. (2009) Cellular homeostasis in mathematical physiology interdisciplinary applied mathematics, *Springer, New York, NY*. 8/1.
141. Khoshnam S.E., Winlow W., Farzaneh M., Farbood Y., & Moghaddam H. F. (2017). Pathogenic mechanisms following

- ischemic stroke. *Neurological Sciences*, 38, 1167-1186. doi:10.1007/s10072-017-2938-1.
142. Kim J.M., Lee S.T., Chu K., Jung K.H., Song E.C., Kim S.J., Sinn D.I., Kim J.H., Park D.K., Kang K.M., Hyung Hong N., Park H.K., Won C.H., Kim K.H., Kim M., Kun Lee S., & Roh J.K. (2007). Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Research*, 1183, 43–45.
 143. Kirschen G.W., Kéry R., & Ge S. (2018). The hippocampal neuro-glio-vascular network: metabolic vulnerability and potential neurogenic regeneration in disease. *Brain Plasticity*, 3(2), 129-144. doi: 10.3233/BPL-170055.
 144. Kiryushko D., Kofoed T., Skladchikova G., Holm A., Berezin V., & Bock E. (2003). A synthetic peptide ligand of NCAM, C3d, promotes neuritogenesis and synaptogenesis and modulates presynaptic functions in primary cultures of rat hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12325-12334.
 145. Kiselyov V.V., Skladchikova G., Hinsby A.M., Jensen P.H., Kulahin N., Soroka V., Pedersen N., Tsetlin V., Poulsen F.M., Berezin V., & Bock E. (2003). Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure*, 11(6), 691-701.
 146. Klemann C.J., & Roubos E.W. (2011). The gray area between synapse structure and function-Gray's synapse types I and II revisited. *Synapse*, 65, 1222-1230.
 147. Kofuji P., & Newman E.A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4), 1045–1056.
 148. 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 Ca^{2+} store dysfunction in CA1 and CA3 hippocampal neurons. *Cell Calcium*, 59(5), 251-261.
149. Kovalenko T., Osadchenko I., Nikonenko A., Lushnikova I., Voronin K., Nikonenko G., Muller D., & Skibo G. (2006). Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus*, 16(10), 814-825.
 150. Kreisman N.R., Soliman S., & Gozal D. (2000). Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 83(2), 1031-1038.
 151. Kuenzel K., Mofrad S.A., & Gilbert D.F. (2017). Phenotyping cellular viability by functional analysis of ion channels: GlyR-targeted screening in NT2-N cells. *Methods in Molecular Biology*, 1601, 205-214. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_16.
 152. Kumral A.A., Iscan B., Engur D., Tuzun F., Ozbil S., Ergur B.U., Kaynak Turkmen M., Duman N., & Ozkan H. (2016). Intranasal surfactant protein D as neuroprotective rescue in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia. *Journal of Maternal-Fetal Neonatal Medicine*, 16, 1-6.
 153. Laake J.H., Haug F.M., Wieloch T., & Ottersen O.P. (1999). A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Research Protocols*, 4(2), 173-184.
 154. Larsson E., Lindvall O., & Kokaia Z. (2001). Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 913, 117-132.
 155. Launay E., Gras-Le Guen C., Martinot A., Assathiany R., Martin E., Blanchais T., Deneux-Tharaux C., Rozé J.C., & Chalumeau M.

- (2014). Why children with severe bacterial infection die: a population-based study of determinants and consequences of suboptimal care with a special emphasis on methodological issues. *PLoS One*, 9(9), e107286, 320.
156. Lee J.M., Zipfel G.J., & Choi D.W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, 399, 7-14.
 157. Lehnardt S.S., Lachance C., Patrizi S., Lefebvre S., Follett P.L., Jensen F.E., Rosenberg P.A., Volpe J.J., & Vartanian T. (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *Journal of Neuroscience*, 22(7), 2478-2486.
 158. Lehotsky J. (1999). Distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump (PMCA) isoforms in the gerbil brain: effect of ischemia-reperfusion injury. *Neurochemistry International*, 3, 221–227.
 159. Lendahl U., Lee K.L., Yang H., & Poellinger L. (2009). Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nature Reviews Genetics*, 10, 821-832.
 160. Lévi S., Schweizer C., Bannai H., Pascua I.O., Charrier C., & Triller A. (2008). Homeostatic regulation of synaptic GlyR numbers driven by lateral diffusion. *Neuron*, 59, 261-273. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.030.
 161. Li J.J., Ramenaden E.R., Peng J., Koito H., Volpe J.J., & Rosenberg P.A. (2008). Tumor necrosis factor alpha mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present. *Journal of Neuroscience*, 28(20), 5321-5330.
 162. Li L., Qu Y., Li J., Xiong Y., Mao M., & Mu D. (2007). Relationship between HIF-1alpha expression and neuronal apoptosis in neonatal

- rats with hypoxia-ischemia brain injury. *Brain Research*, 1180, 133-139.
163. Li Y., Blanco G.D., Lei Z., & Xu Z.C. (2010). Increased GAD expression in the striatum after transient cerebral ischemia. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 45, 370-377.
 164. Lin B., Levy S., Raval A.P., Perez-Pinzon M.A., & DeFazio R.A. (2010). Forebrain ischemia triggers GABAergic system degeneration in substantia nigra at chronic stages in rats. *Cardiovasc. Psychiatry Neurology*, 2010, 506952.
 165. Lindvall O., & Kokaia Z. (2010). Stem cells in human neurodegenerative disorders— time for clinical translation? *Journal of Clinical Investigation*, 120(1), 29–40.
 166. Linero I., & Chaparro O. (2014). Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One*, 9(9), e107001.
 167. Lippman J., & Dunaevsky A. (2005). Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *Journal of Neurobiology*, 64, 47-57.
 168. Lipton P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, 79(4), 431-568.
 169. Lisman J., & Raghavachari S. (2006). A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. *Science's STKE*, 356, re11.
 170. Liu X.B., Shen Y., Pleasure D.E., & Deng W. (2016). The vulnerability of thalamocortical circuitry to hypoxic-ischemic injury in a mouse model of periventricular leukomalacia. *BMC Neuroscience*, 17, 2.
 171. Lleo A., Berezovska O., Herl L., Raju S., Deng A., Bacskai B. J., Frosch M. P., Irizarry M. & Hyman B.T. (2004). Nonsteroidal anti-

- inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation. *Nature Medicine*, 10(10), 1065-1066.
172. Lo EH. (2008). A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nature Medicine*, 14, 497-500.
 173. Lu Y., Zhang J., Ma B., Li K., Li X., Bai H., & Chen Q. (2012). Glycine attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis in mice. *Neurochemistry International*, 61, 649-658. <https://doi:10.1016/j.neuint.2012.07.005>
 174. Lukyanetz E.A., Shkryl V.M., Kravchuk O.V., & Kostyuk P.G. (2003). Effect of hypoxia on calcium channels depends on extracellular calcium in CA1 hippocampal neurons. *Brain Research*, 980(1), 128-134.
 175. Lundgren J. L., Ahmed S., Schedin-Weiss S., Gouras G. K., Winblad B., Tjernberg L.O., & Frykman S. (2015). ADAM10 and BACE1 are localized to synaptic vesicles. *Journal of Neurochemistry*, 135(3), 606-615.
 176. 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.
 177. 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.
 178. 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.
 179. Lushnikova I., Skibo G., Muller D., & Nikonenko I. (2011). Excitatory synaptic activity is associated with a rapid structural

- plasticity of inhibitory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuropharmacology*, 60(5), 757-764.
180. 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.
 181. 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.
 182. Lynch J.W., Zhang Y., Talwar S., & Estrada-Mondragon A. (2017). Chapter Eight-Glycine Receptor Drug Discovery. *Advances in Pharmacology*, 79, 225-253.
 183. Maar T., Rønn L., Bock E., Berezin V., Moran J., Pasantes-Morales H., & Schousboe A. (1997). Characterization of microwell cultures of dissociated brain tissue for studies of cell-cell interaction. *Journal of Neuroscience Research*, 47(2), 163-172.
 184. Madhok D.Y., Vitt J.R., & Nguyen A.T. (2018). Overview of neurovascular physiology. *Current Neurology Neuroscience Report*, 18(12), 99. doi: 10.1007/s11910-018-0905-8.
 185. Madl J.E., & Royer S.M. (2000). Glutamate dependence of GABA levels in neurons of hypoxic and hypoglycaemic rat hippocampal slices. *Neuroscience*, 96, 657-664.
 186. Majmundar A.J., Wong W.J., & Simon M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*, 40, 294-309.
 187. Mainberger F., Langer S., Mall V., & Jung N.H. (2016). Impaired synaptic plasticity in RASopathies: a mini-review. *Journal of Neural Transmission*, 123(10), 1133-1138. doi: 10.1007/s00702-016-1609-3.

188. 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.
189. Mark L.P., Prost R.W., Ulmer J.L., Smith M.M., Daniels D.L., Strottmann J.M., Brown W.D., & Hachein-Bey L. (2001). Pictorial review of glutamate excitotoxicity fundamental concepts for neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology*, 22, 1813–1824.
190. Marks J.D. (2009). Regulation of vulnerability to NMDA excitotoxicity during postnatal maturation. Brain hypoxia and ischemia with special emphasis on development. *Humana Press, New York*, 3-24.
191. Martire A., Lambertucci C., Pepponi R., Ferrante A., Benati N., Buccioni M., Dal Ben D., Marucci G., Klotz K.N., Volpini R., & Popoli P. (2019). Neuroprotective potential of adenosine A(1) receptor partial agonists in experimental models of cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1111/jnc.14660.
192. Martone, M.E., Jones, Y.Z., Young, S.J., Ellisman M.N., Zivin J.A., & Hu B.R. (1999). Modification of postsynaptic densities after transient cerebral ischemia: a quantitative and three-dimensional ultrastructural study. *Journal of Neuroscience*, 19, 1988-1997.
193. Mason G.F., Martin D.L., Martin S.B., Manor D., Sibson N.R., Patel A., Rothman D.L., & Behar K.L. (2001). Decrease in GABA synthesis rate in rat cortex following GABA-transaminase inhibition correlates with the decrease in GAD(67) protein. *Brain Research*, 914, 81-91.
194. Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies G.C., & Kasai H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429, 761-766.

195. Mattson M.P. (2003). Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Medicine*, 3(2), 65-94.
196. Matyash V., & Kettenmann H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63, 2-10.
197. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., & Ratcliffe P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399, 271-275.
198. Mazumdar J., Dondeti V., & Simon M.C. (2009). Hypoxia-inducible factors in stem cells and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13, 4319-28.
199. McGehee D.S. (2002). Nicotinic receptors and hippocampal synaptic plasticity ... it's all in the timing. *Trends in Neuroscience*, 25, 171-172.
200. Medvedeva Y.V., Ji S.G., Yin H.Z., & Weiss J.H. (2017). Differential vulnerability of CA1 versus CA3 pyramidal neurons after ischemia: possible relationship to sources of Zn²⁺ accumulation and its entry into and prolonged effects on mitochondria. *Journal of Neuroscience*, 37(3), 726-737. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3270-16.2016.
201. Mei Y.Y., Wu D.C., & Zhou N. (2018). Astrocytic regulation of glutamate transmission in schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 544, 1-10.
202. Mele M., Ribeiro L., Inácio A.R., Wieloch T., & Duarte C.B. (2014). GABA A receptor dephosphorylation followed by internalization is coupled to neuronal death in in vitro ischemia. *Neurobiology disease*, 65, 220-232. [https://doi: 10.1016/j.nbd.2014.01.019](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.01.019).

203. Meshul C.K., & Hopkins W.F. (1990). Presynaptic ultrastructural correlates of long-term potentiation in the CA1 subfield of the hippocampus. *Brain Research*, 514(2), 310-319.
204. Miller A.C., & Pereda A.E. (2017). The electrical synapse: Molecular complexities at the gap and beyond. *Developmental Neurobiology*, 77(5), 562-574. doi: 10.1002/dneu.22484.
205. Mironov S.L. (1995). Plasmalemmal and intracellular Ca²⁺ pumps as main determinants of slow Ca²⁺ buffering in rat hippocampal neurones. *Neuropharmacology*, 9, 1123–1132.
206. Morais T., Coelho D., Sandra H., Vaz S., Ana M., Sebastião A., & Valente C. (2017). Glycine receptor activation impairs ATP-induced calcium transients in cultured cortical astrocytes. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 444. [https://doi: 10.3389/fnmol.2017.00444](https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00444).
207. Muller D., Wang C., Skibo G., Toni N., Cremer H., Calaora V., Rougon G., & Kiss. J. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*, 17(3), 413-422.
208. Nair S., Sobotka K.S., Joshi P., Gressens P., Fleiss B., Thornton C., Mallard C., & Hagberg H. (2019). Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia*. doi: 10.1002/glia.23587.
209. Nakamura S., Takahashi T., Yamashita H., & Kawakami H. (2001). Nicotinic acetylcholine receptors and neurodegenerative disease. *Alcohol*, 24(2), 79–81.
210. Navis A., Garcia-Santibanez R., & Skliut M. (2019). Epidemiology and outcomes of ischemic stroke and transient ischemic attack in the adult and geriatric population. *Journal of Stroke and Cerebrovascular*

- Diseases*, 28(1), 84-89. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.09.013.
211. Nedergaard M. & Dirnagl U. (2005). Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*, 50, 281-286.
 212. Nedergaard M., & Verkhratsky A. (2012). Artifact versus reality – how astrocytes contribute to synaptic events. *Glia*, 60, 1013–1023.
 213. Nicholson D.A, Trana R., Katz Y., Kath W.L., Spruston N., & Geinisman Y. (2006). Distance-dependent differences in synapse number and AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, 50(3), 431-442.
 214. Niizuma K., Yoshioka H., Chen H., Kim G.S., Jung J.E., Katsu M., Okami N., & Chan P.H. (2010). Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(1), 92-99.
 215. Nikonenko A.G., & Skibo G.G. (2004). Technique to quantify local clustering of synaptic vesicles using single section data. *Microscopy Research and Technique*, 65(6), 287-291.
 216. Nikonenko I., Jourdain P., & Muller D. (2003). Presynaptic remodeling contributes to activity-dependent synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 23(24), 8498-8505.
 217. Nikonenko I., Bancila M., Bloc A., Muller D., & Bijlenga P. (2005). Inhibition of T-type calcium channels protects neurons from delayed ischemia-induced damage. *Molecular Pharmacology*, 68, 84-89.
 218. Nishimura H., Matsuyama T., Obata K., Nakajima Y., Kitano H., Sugita M., & Okamoto M.. (2000). Changes in mint1, a novel synaptic protein, after transient global ischemia in mouse hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(10), 1437-1445.

219. Noraberg J., Poulsen F.R., Blaabjerg M., Kristensen B.W., Bonde C., Montero M., Meyer M., Gramsbergen J.B., & Zimmer J. (2005). Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders.*, 4(4), 435-452.
220. Oguro K., Jover T., Tanaka H., Lin Y., Kojima, T., Oguro N., Grooms S.Y., Bennett M.V.L., & Zukin R.S. (2001). Global ischemia-induced increases in gap junctional proteins connexin32 (Cx32) and Cx36 in hippocampus and enhanced vulnerability of Cx32 knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 21, 7534–7542.
221. Ohsawa K., & Kohsaka S. (2011). Dynamic motility of microglia: purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. *Glia*, 59(12), 1793-1799. doi: 10.1002/glia.21238.
222. Olney JW. (1994). New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *Journal of Neural Transmission. Supplementa*, 43, 47-51.
223. Ou Y., & Weber S.G. (2018). Higher Aminopeptidase activity determined by electroosmotic push-pull perfusion contributes to selective vulnerability of the hippocampal CA1 region to oxygen glucose deprivation. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(3), 535-544. doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00326.
224. Ouyang Y.B., Ning S., Adler J.R., Maciver B., Knox S.J., & Giffard R. (2017). Alteration of interneuron immunoreactivity and autophagic activity in rat hippocampus after single high-dose whole-brain irradiation. *Cureus*, 9(6), e1414. doi: 10.7759/cureus.1414.
225. Panchision D.M. (2009). The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 220, 562-568.

226. Pang Y., Cai Z., & Rhodes P.G. (2000). Effects of lipopolysaccharide on oligodendrocyte progenitor cells are mediated by astrocytes and microglia. *Journa of Neuroscience Reseach*, 62(4), 510-520.
227. Papandreou I., Cairns R.A., Fontana L., Lim A.L., & Denko N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, 3, 187-197.
228. Papouin T., Dunphy J.M., Tolman M., Dineley K.T., & Haydon P.G. (2017). Septal cholinergic neuromodulation tunes the astrocyte-dependent gating of hippocampal NMDA receptors to wakefulness. *Neuron*, 94(4), 840-854.
229. Park W.M., Wang Y., Park S., Denisova J.V., Fontes J. D., & Belousov A.B. (2011). Interplay of chemical neurotransmitters regulates developmental increase in electrical synapses. *Journal of Neuroscience*, 31, 5909-5920.
230. Pellegrini-Giampietro D.E., Zukin R.S., Bennett M.V., Cho S., & Pulsinelli W.A. (1992). Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proceedings of National Acadamy of Science of the USA*, 89(21), 10499-10503.
231. Pereda AE. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), 250-263. doi: 10.1038/nrn3708.
232. Pignataro G., Scorziello A., Di Renzo G., & Annunziato L. (2009). Post-ischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. *FEBS Journal*, 276, 46-57.
233. Pilorge M., Fassier C., Le Corrond H., Potey A., Bai J., De Gois S., & Betancur C. (2016). Genetic and functional analyses demonstrate a

- role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Molecular Psychiatry*, 21, 936-945. doi: 10.1038/mp.2015.139.
234. Pluta R., Bogucka-Kocka A., Ułamek-Kozioł M., Bogucki J., Januszewski S., Kocki J., & Czuczwar S.J. (2018). Ischemic tau protein gene induction as an additional key factor driving development of Alzheimer's phenotype changes in CA1 area of hippocampus in an ischemic model of Alzheimer's disease. *Pharmacological Reports*, 70(5), 881-884. doi: 10.1016/j.pharep.2018.03.004.
 235. Pluta R., Ułamek-Kozioł M., Januszewski S., & Czuczwar S.J. (2018). Tau protein dysfunction after brain ischemia. *Journal of Alzheimer's Disease*, 66(2), 429-437. doi:10.3233/JAD-180772.
 236. Pocock R. (2011). Invited review: decoding the microRNA response to hypoxia. *Pflugers Archiv*, 461, 307-15.
 237. Poglia L., Muller D., & Nikonenko I. (2011). Ultrastructural modifications of spine and synapse morphology by SAP97. *Hippocampus*, 21(9), 990-998. doi:10.1002/hipo.20811.
 238. Popov V.I., Davies H.A., Rogachevsky V.V., Patrushev I.V., Errington M.L., Gabbott P.L., Bliss T.V., & Stewart M.G. (2004). Remodelling of synaptic morphology but unchanged synaptic density during late phase long-term potentiation (LTP): a serial section electron micrograph study in the dentate gyrus in the anaesthetised rat. *Neuroscience*, 128(2), 251-262.
 239. Popov V.I., Medvedev N.I., Kraev I.V., Gabbott P.L., Davies H.A., Lynch M., Cowley T.R., Berezin V., Bock E., & Stewart M.G. (2008). A cell adhesion molecule mimetic, FGL peptide, induces alterations in synapse and dendritic spine structure in the dentate gyrus of aged rats: a three-dimensional ultrastructural study. *European Journal of Neuroscience*, 27(2), 301-314.

240. Pozzo-Miller L.D., Gottschalk W., Zhang L., McDermott K., Du J., Gopalakrishnan R., Oho C., Sheng Z/H/, & Lu B. (1999). Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *Journal of Neuroscience*, 19(12), 4972-4983.
241. Priller C., Bauer T., Mitteregger G., Krebs B., Kretzschmar H., & Herms J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *Journal of Neuroscience*, 26(27), 7212-7221.
242. Puig B., Brenna S., & Magnus T. (2018). Molecular communication of a dying neuron in stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), pii: E2834. doi: 10.3390/ijms19092834.
243. Raghunath M., Sy Wong Y., Farooq M., & Ge R. (2009). Pharmacologically induced angiogenesis in transgenic zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378, 766-771.
244. Rami A. (2003). Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiology Disease*, 13, 75-88.
245. Rami, A., & Kögel, D. (2008). Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin? *Autophagy*, 4, 422-426.
246. Rash J.E., Staines W.A., Yasumura T., Patel D., Furman C.S., Stelmack G.L., & Nagy J.I. (2000). Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 7573-7578.
247. Rasmussen J.G., Frøbert O., Pilgaard L., Kastrup J., Simonsen U., Zachar V., & Fink T. (2011). Prolonged hypoxic culture and

- trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*, 13(3), 318-328.
248. Rizzoli S.O., & Betz W.J. (2004). The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science*, 303(5666), 2037-2039.
 249. Robertson JM. (2018). The Gliocentric Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). pii: E3033. doi: 10.3390/ijms19103033.
 250. Roden W.H., Papke J.B., Moore J.M., Cahill A.L., Macarthur H. & Harkins A.B. (2007). Stable RNA interference of synaptotagmin I in PC12 cells results in differential regulation of transmitter release. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 293(6), C1742-1752.
 251. Romjin H.J., Jansen A.W., & van Marle J. (1994). Quantitative immunofluorescence data suggest a permanently enhanced GAD67/GAD65 ratio in nerve endings in rat cerebral cortex damaged by early postnatal hypoxia-ischemia: a comparison between two computer-assisted procedures for quantification of confocal laser scanning microscopic immunofluorescence images. *Brain Research*, 657, 245-257.
 252. Ronzano R. (2017). Astrocytes and microglia: active players in synaptic plasticity. *Medical Sciences*, 33(12), 1071-1078. doi: 10.1051/medsci/20173312014
 253. Rossi, D.J., Brady, J.D., Mohr, C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nature Neuroscience*, 10, 1377-1386.
 254. Rumajogee P.P., Bregman T., Miller S.P. et al. (2016). Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: a systematic review. *Frontiers in Neurology*, 7, 57.

255. Russo E., Nguyen H., Lippert T., Tuazon J., Borlongan C.V., & Napoli E. (2018). Mitochondrial targeting as a novel therapy for stroke. *Brain Circulation*, 4(3), 84-94. doi: 10.4103/bc.bc_14_18.
256. Ryan T.A., Ziv N.E., & Smith S.J. (1996). Potentiation of evoked vesicle turnover at individually resolved synaptic boutons. *Neuron*, 17(1), 125-134.
257. Ryu H.H., Lim J.H., Byeon Y.E., Park J.R., Seo M.S., Lee Y.W., Kim W.H., Kang K.S., & Kweon O.K. (2009). Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *Journal of Veterinary Science*, 10(4), 273-84.
258. Sadan O., Melamed E., & Offen D. (2009). Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(12), 1487–1497.
259. Sarkar S., Chakraborty D., Bhowmik A., & Ghosh M.K. (2019). Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 24, 435-450. PMID: 30468665.
260. Sarnowska A. (2002). Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. *Folia Neuropathologica*, 40(2), 101-106.
261. Schikorski T., & Stevens C.F. (1997). Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *Journal of Neuroscience*, 17(15), 5858-5867.
262. Schild L., Huppelsberg J., Kahlert S., Keilhoff G., & Reiser G. (2003). Brain mitochondria are primed by moderate Ca²⁺ rise upon hypoxia/reoxygenation for functional breakdown and morphological disintegration. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 25454-25460.

263. Schmidt-Kastner R. (2015). Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia. *Neuroscience*, 309, 259-79. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.034.
264. Schwartz-Bloom R.D., & Sah R. (2001). gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, 77, 353-371.
265. Semenza G.L. (2012). Hypoxia inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148, 399-408.
266. Shi Y.H., Wang Y.X., Bingle L., Gong L.H., Heng W.J., Li Y., & Fang W.G. (2005). In vitro study of HIF-1 activation and VEGF release by bFGF in the T47D breast cancer cell line under normoxic conditions: involment of PI-3K/Akt and MEK1/ERK pathways. *Journal of Pathology*, 205(4), 530-536.
267. Shichi K., Fujita-Hamabe W., Harada S., Mizoguchi H., Yamada K., Nabeshima T., & Tokuyama S. (2011). Involvement of matrix metalloproteinase-mediated proteolysis of neural cell adhesion molecule in the development of cerebral ischemic neuronal damage. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(2), 701-710.
268. Siddiq A., Aminova L.R., Troy C.M., Suh K., Messer Z., Semenza G.L., & Ratan R.R., (2009). Selective inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl-hydroxylase 1 mediates neuroprotection against normoxic oxidative death via HIF- and CREB-independent pathways. *Journal of Neuroscience*, 29, 8828-8838.
269. Sims N.R., & Anderson M.F. (2002). Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochemistry International*, 40(6), 511-526. PMID: 11850108.

270. Simon M.C., & Keith B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 285-96.
271. Singh N., Sharma G., Mishra V., & Raghubir R. (2012). Hypoxia Inducible Factor-1: Its potential role in cerebral ischemia. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32, 491-507.
272. 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.
273. 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.
274. Skibo G., Lushnikova I., & Nikonenko I. (2011). Structural plasticity of synapses in hippocampal slices after oxygen-glucose deprivation. *Neurophysiology*, 43(3), 223-226.
275. Skok M., & Lykhmus O. (2016). The role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and $\alpha 7$ -specific antibodies in neuroinflammation related to alzheimer disease. *Current Pharmaceutical Design*, 22(14), 2035-2049.
276. Slezak M., Pfriederger F.W., & Soltys Z. (2006). Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis. *J Physiol Paris*, 99, 84-91.
277. Smit A. B., Syed N.I., Schaap D., van Minnen J., Klumperman J., Kits K.S., Lodder H., van der Schors R.C., van Elk R., Sorgedragger B., Brejc K., Sixma T.K., & Geraerts W.P. (2001). A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission, *Nature*, 411, 261–268.

278. Sofroniew MV. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638–647.
279. Solenski NJ, diPierro CG, Trimmer PA et al. (2002). Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke*, 33, 816-824.
280. Son J.H., & Winzer-Serhan U.H. (2008). Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs in rat hippocampal GABAergic interneurons. *Journal of Comparative Neurology*, 511, 286-299.
281. Song W., Chattipakorn S.C., & McMahon L.L. (2006). Glycine-gated chloride channels depress synaptic transmission in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 95, 2366-2379. doi: 10.1152/jn.00386.2005.
282. Sorond F.A., Shaffer M.L., Kung A.L., & Lipsitz L.A. (2009). Desferroxamine infusion increases cerebral blood flow: a potential association with hypoxia-inducible factor-1. *Clinical Science*, 116, 771-779.
283. Sorra K.E., & Harris K.M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10, 501-511.
284. Spalding K.L., Bergmann O., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Huttner H.B., Boström E., Westerlund I., Vial C., Buchholz B.A., Possnert G., Mash D.C., Druid H., & Frisén J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), 1219-1227. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.002.
285. Stewart M.G., Medvedev N.I., Popov V.I., Schoepfer R., Davies H.A., Murphy K., Dallérac G.M., Kraev I.V., & Rodriguez J.J. (2005). Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter

- dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices. *European Journal of Neuroscience*, 21, 3368–3378.
286. Stoppini L., Buchs P.A., & Muller D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173-182.
 287. Studer L., Csete M., Lee S.H., Kabbani N., Walikonis J., Wold B., & McKay R. (2000). Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *Journal of Neuroscience*, 20, 7377-7383.
 288. Sudhof T.C. (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron*, 28, 17-320.
 289. Sudweeks S.N., & Yakel J.L. (2000). Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *Journal of Physiology*, 527, 515–528.
 290. Sugawara T., Fujimura M., Noshita N., Kim G.W., Saito A., Hayashi T., Narasimhan P., Maier C.M., & Chan P.H. (2004). Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*, 1(1), 17-25.
 291. Syed F.I., Couriel D.R., Frame D., & Srinivasan A. (2016). Central nervous system complications of hematopoietic stem cell transplant. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 30(4), 887-98.
 292. Tallent MK. (2007). Somatostatin in the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163, 265-284.
 293. Takeda T., Okuyama H., Nishizawa Y., Tomita S., & Inoue M. (2012). Hypoxia inducible factor-1 α is necessary for invasive phenotype in Vegf-deleted islet cell tumors. *Scientific Report*, 494, 1-7.
 294. Tanabe M., Nitta A., & Ono H. (2010). Neuroprotection via strychnine-sensitive glycine receptors during post-ischemic recovery

- of excitatory synaptic transmission in the hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences*, 113, 378-386.
295. Theodosis D.T., Poulain D.A., & Oliek S.H. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological Reviews*, 88, 938-1008.
 296. Thompson R.J., Zhou N., & MacVicar B.A. (2006). Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*, 312, 924-927.
 297. Trendelenburg G., & Dirnagl U. (2005). Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia*, 50(4), 307-320.
 298. Tsai H.L., Deng W.P., Lai W.F., Chiu W.T., Yang C.B., Tsai Y.H., Hwang S.M., & Renshaw P.F. (2014). Wnts enhance neurotrophin-induced neuronal differentiation in adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells via canonical and noncanonical signaling pathways. *PLoS One*, 9(8), e104937.
 299. Tsupyskov O.M., Kyryk V.M., Mamchur A.A., Butenko G., & Skibo G.G. (2014). Transplantation of neural progenitor cells stimulates endogenous neurogenesis in mice after ischemic stroke. *Cell and organ transplantology*, 2(1), 85-89.
 300. Tsupyskov O., Lushnikova I., Nikandrova Y., Yatsenko K., Ustyomenko A., Kyryk V., Butenko G., & Skibo G. (2016). A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. *Cell and Organ Transplantology*, 4(2), 188-193.
 301. Tsupyskov O.M., Lushnikova I., Nikandrova Y., Yatsenko K., Ustyomenko A., Kyryk V., Butenko G., & Skibo G. (2017). Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model *in vitro*. *Cell and Organ Transplantology*, 5(1), 28-32.

302. Tsupikov O., Lushnikova I., Nikandrova Y., Yatsenko K., Ustymenko A., Kyryk V., Butenko G., & Skibo 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.
303. Uemura K., Lill C.M., Li X., Peters J.A., Ivanov A., Fan Z., DeStrooper B., Bacskai B.J., Hyman B.T. & Berezovska O. (2009). Allosteric modulation of PS1/gamma-secretase conformation correlates with amyloid beta(42/40) ratio. *PLoS One*, 4(11), e7893.
304. Ueno S., Bracamontes J., Zorumski C., Weiss D.S., & Steinbach J.H. (1997). Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABAA receptor. *Journal of Neuroscience*, 17, 625–634.
305. Uteshev V.V. (2012). $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors as a ligand-gated source of Ca^{2+} ions: the search for a Ca^{2+} optimum. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 603–638.
306. Vadori M.M., Denaro L., D'Avella D. et al. (2016). Indications and prospects of neural transplantation for chronic neurological diseases. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 21(5), 490-6.
307. Vakifahmetoglu-Norberg H., Ouchida A.T., & Norberg E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 82(3), 426-431. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.088.
308. Van den Eynden J., Ali S., Horwood N., Carmans S., Brône B., Hellings N., Rigo J.M., Steels P., & Harvey R.J. (2009). Glycine and glycine receptor signalling in non-neuronal cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2(9), 1-12. doi:10.3389/neuro.02.009.2009.

309. Vasile F., Dossi E., & Rouach N. (2017) Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function*, 222(5), 2017-2029. doi:10.1007/s00429-017-1383-5.
310. Velthoven C.T.J., Kavelaars A., & Heijnen C. J. (2012). Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatric Research*, 71(4), 474 – 481.
311. Venance L., Rozov A., Blatow M., Burnashev N., Feldmeyer, D., & Monyer H. (2000). Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 10260-10265.
312. Verkhratsky A., & Nedergaard M. (2014). Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philosophical Transactions of the Royal Society Lond B: Biological Science*, 369(1654), 20130595. doi: 10.1098/rstb.2013.0595.
313. Villa R.F., Gorini A., & Hoyer S. (2002). ATPases of synaptic plasma membranes from hippocampus after ischemia and recovery during ageing. *Neurochemistry Research*, 27(9), 861-870.
314. Vlkolinsky R., Stolc S., & Ross A. (1999). Effect of stobadine, U-74389G, trolox and melatonin on resistance of rat hippocampal slices to oxidative stress. *Life Science*, 65(18-19), 1969-1971.
315. Volterra A., & Meldolesi J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 626–640.
316. von Bernhardt R, Eugénín-von Bernhardt J, Flores B, Eugénín León J. (2016). Glial cells and integrity of the nervous system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 949, 1-24.
317. von Bernhardt R, Heredia F, Salgado N, Muñoz P. (2016). Microglia function in the normal brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 949, 67-92.

318. 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.
319. 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.
320. Wake H., Moorhouse A.J., Jinno S., Kohsaka S., & Nabekura J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *Journal of Neuroscience*, 29, 3974-3980.
321. Wang G.H., Jiang Z.L., Fan X.J., Zhang L., Li X., & Ke K.F. (2007). Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABA A and glycine receptors. *Neuropharmacology*, 52(5), 1199-1209.
322. Wang Y., Denisova J.V., Kang K.S., Fontes J.D., Zhu B.T., & Belousov A.B. (2010). Neuronal gap junctions are required for NMDA receptor-mediated excitotoxicity: implications in ischemic stroke. *Journal of Neurophysiology*, 104(6), 3551-3556. doi:10.1152/jn.00656.2010.
323. Wang YZ, Xu TL. (2011). Acidosis, acid-sensing ion channels, and neuronal cell death. *Molecular Neurobiology*, 44, 350-358.
324. Wang L.W., Lin Y.C., Wang S.T., Yeh T.F., & Huang C.C. (2014). Hypoxic/ischemic and infectious events have cumulative effects on the risk of cerebral palsy in very-low-birth-weight preterm infants. *Neonatology*, 106(3), 209–215.

325. Wei, L., Ying, D.J., Cui, L., Langsdorf J., & Yu S.P. (2004). Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. *Brain Research*, 1022, 54-61.
326. Wei X., Zhao L., Zhong J., Gu H., Feng D., Johnstone B.H., March K.L., Farlow M.R., & Du Y. (2009). Adipose stromal cells-secreted neuroprotective media against neuronal apoptosis. *Neuroscience Letters*, 462(1), 76-79.
327. Weinberg J.M., Bienholz A., & Venkatachalam M.A. (2016). The role of glycine in regulated cell death. *Cellular and Molecular Life Science*, 73, 2285-2308. doi:10.1007/s00018-016-2201-6
328. Wellershaus K., Degen J., Deuchars J., Theis M., Charollais A., Caille D., Gauthier B., Janssen-Bienhold U., Sonntag S., Herrera P., Meda P., & Willecke K. (2008). A new conditional mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin36 in neurons and pancreatic beta-cells. *Experimental Cell Research*, 314, 997-1012.
329. Wieloch T. (1985). Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. *Progress in Brain Research*, 63, 69–85.
330. Wilhelmi E.E., Schöder U.H., Benabdallah A., Sieg F., Breder J., & Reymann K.G. (2002). Organotypic brain slice cultures from adult rats: approaches for a prolonged culture time. *Alternatives to Laboratory Animals*, 30(3), 275-83.
331. Witcher M.R., Kirov S.A., & Harris K.M. (2007). Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia*, 55(1), 13-23.
332. Wu X.M., Liu Y., Qian Z.M., Luo Q.Q., & Ke Y. (2016). CX3CL1/CX3CR1 Axis Plays a Key Role in Ischemia-Induced Oligodendrocyte Injury via p38MAPK Signaling Pathway. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 4010-4018. doi: 10.1007/s12035-015-9339-3.

333. Xu T.L., & Gong N. (2010). Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: diversity, function and regulation. *Progress in Neurobiology*, 91, 349-361. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.04.008.
334. Yang C., Hawkins K.E., Doré S., & Candelario-Jalil E. (2019). Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 316(2), C135-C153. doi:0.1152/ajpcell.00136.2018.
335. Yao W., Ji F., Chen Z., Zhang N., Ren S.Q., Zhang X.Y., & Lu W. (2012). Glycine exerts dual roles in ischemic injury through distinct mechanisms. *Stroke*, 43, 2212-2220.
336. Yao Y. (2019). Basement membrane and stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(1), 3-19.
337. Yavuz T., Altuntas I., Odabasi D., Delibas N., Ocal A., Ibrisim E., & Kutsal A. (2005). Beneficial effect of the addition of nitroglycerin to the cardioplegic solution on lipid peroxidation during coronary artery bypass surgery. *International Heart Journal*, 46(1), 45-55.
338. Yokota M., Saido T.C., Kamitani H., Tabuchi S., Satokata I., & Watanabe T. (2003). Calpain induces proteolysis of neuronal cytoskeleton in ischemic gerbil forebrain. *Brain Research*, 984, 122-132.
339. Zaman K.K., Ryu H., Hall D., O'Donovan K., Lin K.I., Miller M.P., Marquis J.C., Baraban J.M., Semenza G.L., & Ratan R.R. (1999). Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *The Journal of Neuroscience*, 22, 9821-9830.
340. Zhan R.Z., Nadler J.V., & Schwartz-Bloom R.D. (2006). Depressed responses to applied and synaptically-released GABA in CA1

- pyramidal cells, but not in CA1 interneurons, after transient forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26, 112–124.
341. Zhan R.Z., Nadler J.V., & Schwartz-Bloom R.D. (2007). Impaired firing and sodium channel function in CA1 hippocampal interneurons after transient cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27, 1444–1452.
 342. Zhang L.H., Gong N., Fei D., Xu L., & Xu T.L. (2008). Glycine uptake regulates hippocampal network activity via glycine receptor-mediated tonic inhibition. *Neuropsychopharmacology*, 33(3), 701–711. doi:10.1038/sj.npp.1301449.
 343. Zhang A.J., Dhruv P., Choi P., Bakker C., Koffel J., Anderson D., Kim J., Jagadeesan B., Menon B.K., & Streib C. (2018). A systematic literature review of patients with aortic web and acute ischemic stroke. *Stroke*, 49(12), 2872–2876.
 344. Zhao Y., Rempe DA. (2010). Targeting astrocytes for stroke therapy. *Neurotherapeutics*, 7, 439–451.
 345. Ziello J.E., Jovin I.S., & Huang Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med*, 80(2), 51–60.
 346. 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.
 347. Zorec R., Parpura V., & Verkhratsky A. (2017). Astroglial vesicular trafficking in neurodegenerative diseases. *Neurochemistry Research*, 42(3), 905–917.