

# КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

“Журнал НАМН України”, 2013, т. 19, № 3. — С. 365-370.

УДК 616.831/.832-089:611.018.82.018.013:616-089.811

ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

**О. А. Рибачук<sup>1,2,3</sup>, В. М. Кирик<sup>3</sup>, О. М. Цупиков<sup>1,2,3</sup>, Г. М. Бутенко<sup>3</sup>,  
Г. Г. Скибо<sup>1,2,3</sup>, Т. А. Півнева<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, 01024 Київ

<sup>2</sup>Науково-навчальний центр “Державна ключова лабораторія молекулярної і клітинної біології”  
НАН України, 01024 Київ

<sup>3</sup>Державна установа “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”,  
04114 Київ

## ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ НЕЙРОНАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН, ТРАНСПЛАНТОВАНИХ НА ОРГАНОТИПОВУ КУЛЬТУРУ ГІПОКАМПА ПІСЛЯ КИСНЕВО-ГЛЮКОЗНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ *IN VITRO*

Після експериментальної киснево-глюкозної депривації органотипової культури гіпокампа мишей лінії FVB відзначено пошкодження пірамідних нейронів зони CA1 гіпокампа та активація гліальних клітин. Показано, що трансплантовані на органотипову культуру гіпокампа після її киснево-глюкозної депривації трансгенні за геном зеленого флуоресцентного білка ембріональні нервові стовбурові клітини зберігають свою життєздатність на 7 та 14 добу після трансплантації та експресують маркер нейронів (*NeuN*), що свідчить про їх диференціацію у зрілі нейрони.

**Ключові слова:** нейральні стовбурові клітини, органотипова культура гіпокампа, киснево-глюкозна депривація, трансплантація клітин.

В останні роки завдяки сучасним концепціям критичного рівня кровотоку та ішемічної “напівтіні” (*penumbra*) вивчення патофізіології ішемічного інсульту мозку змістилося від циркуляторних і метаболічних механізмів у напрямок поглибленого дослідження ролі клітинних та молекулярних механізмів пошкодження [1, 4]. Існує багато методів лікування інсульту, але вони не є досконалими. На сьогодні велику увагу приділяють клітинній терапії. Зокрема, з кінця 80-х років минулого століття реалізується

міжнародна програма з вивчення потенціалу стовбурових клітин (у тому числі і нейрогенних), що може сприяти значного прогресу у лікуванні нейродегенеративних захворювань [7, 14, 15].

Одним із прогресивних методів дослідження, які застосовуються в галузі біохімії, клітинній та молекулярній біології є культивування клітин і тканин. Системи *in vitro* є зручним експериментальним інструментом для точного контролю, тонких маніпуляцій і тривалого моніторингу нормаль-

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України  
Відділ цитології

Г. Г. Скибо — зав. відділом, д.м.н., професор

Т. А. Півнева — провідн.н.с., д.б.н.

О. М. Цупиков — с.н.с., к.м.н.

О. А. Рибачук — м.н.с., аспірант (oks-ribachuk@yandex.ru)

Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України

Г. М. Бутенко — директор, акад. НАМН України

В. М. Кирик — зав. лабораторією клітинних та тканинних культур, к.м.н.

© О. А. Рибачук, В. М. Кирик, О. М. Цупиков, Г. М. Бутенко, Г. Г. Скибо, Т. А. Півнева, 2013.

них і патологічних процесів, що мають місце у різних тканинах і, зокрема, в нервовій тканині. Серед систем *in vitro* особливе місце займають органотипові культури нервової тканини, які протягом періоду культивування тривалий час зберігають цитоархітекtonіку, типоспецифічність клітин, міжклітинні зв'язки та інші особливості, характерні для живої тканини, і в той же час є набагато зручнішими для експериментальних маніпуляцій, ніж моделі *in vivo*.

Для моделювання ішемічного пошкодження мозку та вивчення впливу трансплантованих нервових стовбурових клітин (НСК) на стан нервової тканини може бути використана органотипова культура гіпокампа. З літературних джерел відомо, що після ішемії (модель чотирьохсудинної оклюзії у щурів) у зоні CA1 гіпокампа спостерігається втрата 90-95 % пірамідних нейронів. При трансплантації НСК в зону гіпокампа щура було показано, що 1-3 % цих клітин виживали, при цьому 3-9 % з них експресували нейрональний маркер *NeuN* [19, 28]. Дослідники вказують, що *NeuN*-позитивні нащадки трансплантованих НСК відповідають за покращення просторової орієнтації тварин.

Вчені наводять дані використання трансплантації НСК людини тваринам на моделі унілатеральної ішемії головного мозку шляхом оклюзії сонної артерії. Трансплантація НСК знижувала об'єм зони інфаркта та істотно покращувала моторну, чутливу та когнітивну функції експериментальних тварин. За допомогою імуно-електронної мікроскопії вдалося встановити, що молоді нейрони — нащадки трансплантованих клітин — встановлювали синаптичні контакти з нейроцитами реципієнтної тканини [12, 15].

Для доставки стовбурових клітин у ділянку ішемічного ушкодження головного мозку можна також використовувати судинне русло. Наприклад, внутрішньовенно вводили суспензію НСК людини щурам на моделі транзиторної ішемії головного мозку [15]. Трансплантовані таким чином НСК ідентифікували в тканині гіпокампа, де вони проліферували та диференціювалися в зрілі астроцити і нейрони.

Інші вчені моделювали ішемію моторної зони кори великого мозку щура шляхом оклюзії середньої мозкової артерії. Мічені НСК людини вводили у хвостову вену. Подальші дослідження моторної сфери тварин показали, що трансплантація НСК позитивно впливає на функціональне відновлення та сприяє зменшенню моторного та когнітивного дефіциту. Істотну різницю в неврологічному статусі тварин автори спостерігали вже на другому тижні після моделювання інсульту [5]. За допомогою імуногістохімічного фарбування встановили, що трансплантовані клітини мігрували та

інтегрувалися у тканину мозку на стороні пошкодження, а також експресували маркери нейронального та астроцитарного типу. Мічені клітини були виявлені в тканині мозку навіть через 540 діб після трансплантації.

Таким чином, трансплантацію нейральных клітин при ішемічному пошкодженні головного мозку можна розглядати як один із найбільш дієвих методів відновлення втрачених функцій та усунення когнітивного дефіциту.

Для імуногістохімічних досліджень ми обрали гіпокамп — це структура головного мозку, відповідальна за навчання, пам'ять та просторову орієнтацію, і поряд з корою головного мозку та стріатумом є надзвичайно чутливою до пошкоджуючих впливів, зокрема до нестачі кисню та глюкози [2, 3, 18]. Відомо, що гіпокамп є однією з найчутливіших частин головного мозку під час ішемічного пошкодження з вибірковою ушкодженням пірамідних нейронів в *str. pyramidale* зони CA1 [10, 25]. Також показано, що глія бере активну участь у контролі нейронної активності та синаптичної передачі в нормі та при різних патологічних станах [17]. Мікроскопічний аналіз органотипової культури гіпокампа показав, що вона зберігає типову топографію клітинних шарів і зон, які характерні для гіпокампа у природних умовах, а нейрони зони CA1 мають традиційну пірамідну форму [4, 13]. При перпендикулярному розрізі органотипової культури гіпокампа можна побачити, що нейрони розташовуються у середині зрізу (4-8 шарів пірамідних клітин), з усіх сторін їх оточують клітини глії. До напівпроникної мембрани прилягає шар гліальних клітин з тонкими відростками, які виконують трофічну та захисну функції, а у даному випадку забезпечують фіксацію культивованих зрізів на мембрані.

Метою даної роботи було визначити рівень пошкодження нейронів та гліальних клітин зони CA1 гіпокампа при короткотривалій киснево-глюкозній депривації, а також дослідити вплив трансплантації НСК на стан нервової тканини після ішемічного пошкодження.

#### Матеріал та методи

**Отримання життєздатних зрізів гіпокампа.** Усі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження", "Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою", а також принципів біоетики та норм біологічної безпеки [8].

Для отримання зрізів гіпокампа використовували мишей лінії FVB 8-9-добового віку. Тварин декапітували та виділяли мозок з черепної коробки.

Виділення та культивування зрізів гіпокампа проводили за методом L. Stoppini [23]. А саме, гіпокампи виділяли з мозку в охолоджену середовищі (50 % MEM, 5 mM Tris, 12.5 mM Hepes, 25 % 10-кратного сольового розчину HBSS, pH 7,3). Потім за допомогою автоматичного чоппера (McIlwain, Великобританія) робили зрізи перпендикулярно до довгої осі гіпокампа товщиною 350-375 мкм, які культивували 5-7 діб. Культивування зрізів проводили на напівпроникних мембранах, розміщених на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5 % CO<sub>2</sub>) та рідкого середовища (50 % MEM, 25 % збалансованого сольового розчину Хенкса, 15 mM D-глюкози, 25 % інактивованої кінської сироватки, pH 7,2) при 37 °C. Середовище культивування змінювали на другий день інкубації, а далі двічі або тричі на тиждень. Протягом 5-7 діб культивування зрізи гіпокампа повністю очищувалися від клітин, пошкоджених під час виділення, та досягали стабільного стану. Протягом цього часу зрізи розпластувалися, їх товщина зменшувалася до 200-250 мкм.

**Ішемічне пошкодження органотипової культури гіпокампа викликали шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД)**, яку створювали шляхом утримання зрізів у спеціальній камері (35 °C) де кисень повітря був замінений на азот, а у середовищі культивування глюкоза була замінена на сахарозу. Тривалість КГД становила 10 хв. Надалі зрізи повертали до нормальних умов культивування на 2 год (нормоксична реоксигенація).

**Отримання та трансплантація нейральних прогеніторів на органотипову культуру гіпокампа.** Гіпокампи виділяли у стерильних умовах з мозку 16-добових плодів мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном зеленого флуоресцентного білка (GFP). За допомогою пастерівських піпеток різного діаметру механічно дисоціювали тканину гіпокампу у середовищі Neurobasal (Gibco Invitrogen, США). Після дисоціації суспензію клітин пропускати через нейлонові клітинні фільтри (Falcon, США) з діаметром пор 40 мкм. Очищену фракцію НСК отримували центрифугуванням суспензії клітин у градієнті густини (22 % розчин Percoll). Відсоток життєздатних клітин у суспензії визначали методом проточної цитометрії за допомогою лазерного цитофлюориметра-сортера FACSAria (Becton Dickinson, США) після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином (7-AAD). НСК трансплантували на органотипову культуру гіпокампа в кількості 1·10<sup>5</sup> клітин через 2 год після КГД/реоксигенації.

**Оцінка культивованих зрізів за методом забарвлення клітин пропідіум йодидом (PI).** Для виявлення пошкоджених клітин використовували забарвлення культивованих зрізів стійким флуо-

ресцентним барвником PI, який проникає в клітини з пошкодженою мембраною. При проникненні в клітину барвник зв'язується з молекулою ДНК, яка набуває червоної флуоресценції. PI додавали в середовище культивування до проведення киснево-глюкозної депривації. Для виконання експерименту відібрали зрізи, які не були забарвлені PI. Культури аналізували за допомогою флуоресцентного мікроскопу XSP-139A-TP.

**Імуногістохімічне фарбування культивованих зрізів гіпокампа.** Для ідентифікації нейронів та клітин глії використовували подвійне імуногістохімічне забарвлення антитілами до GFAP (кролячі поліклональні, 1:1500, маркер астроцитів, DAKO, Данія); NeuN (мишачі моноклональні, 1:1000, маркер нейронів, Chemicon, Великобританія); GFP (козячі поліклональні, 1:1000, маркер трансплантованих стовбурових клітин, Molecular Probes Inc., США). Органотипові культури гіпокампа фіксували 4 % розчином формальдегіду, відмивали фосфатним буфером, та для кращого проникнення антитіл та запобігання зайвого неспецифічного зв'язування обробляли розчином: 0,3 % TritonX-100, 0,5 % BSA. Протягом 24 год культури гіпокампа інкубували у суміші первинних антитіл. Після відмивання у фосфатному буфері зрізи обробляли 1 год сумішшю вторинних антимішачих Alexa Fluor-555-кон'югованих (1:1000, Invitrogen, США), антикозячих Alexa Fluor-488-кон'югованих та антикролячих Alexa Fluor-647-кон'югованих антитіл (1:1000, Invitrogen, США).

Після відмивання РВ, культури фіксували покривним склом у спеціальному середовищі для флуоресцентних препаратів (Dako, Данія). Зрізи гіпокампа вивчали за допомогою конфокального мікроскопа FluoView™ FV1000 (Olympus Inc., США) з цифровою фотокамерою, поєднаною з комп'ютером.

**Результати та їх обговорення.** Після експериментальної киснево-глюкозної депривації в органотиповій культурі гіпокампа мишей лінії FVB спостерігалось ушкодження пірамідних нейронів зони CA1 гіпокампа разом з активацією гліальних клітин. Ступінь імунореактивності нейронів і астроцитів та їх локалізація у зоні CA1 гіпокампа істотно залежала від терміну постішемічного періоду.

На 3, 7 та 14 добу після КГД усі структури нейропіля зони CA1 гіпокампа були зміненими. На 14 добу культивування після ішемічного пошкодження кількість пірамідних нейронів у str. pyramidalе візуально зменшилась удвічі. На зрізах органотипової культури гіпокампа можна побачити, що непошкоджені нейрони, які вижили, розташовуються нерівномірно та втрачають компактність їх розташування. Між нейронами спостерігалось поява пустот та збільшення міжклітинного

простору (рис. 1). Поява численних пустот у *str. pyramidale* та реструктуризація компактного розташування пірамідних нейронів безпосередньо пов'язані із загибеллю вищевказаних нейронів. Відомо, що механізм загибелі пірамідних нейронів зони CA1 при ішемії відбувається як за некро-тичним, так і за апоптотичним фенотипом [26, 27]. Реактивний астрогліоз спостерігався вже на 3 добу після КГД. Усі структури нейропіля зони CA1 гіпокампа були сильно вакуолізовані, переважно через наявність великої кількості набряклих відростків астрочитів (див. рис. 1). Гіпертрофовані сомита астрочитів, які є показником піку реактивного астрогліозу [6, 23], були чітко помітні на 7 добу культивування та розташовувалися в основному в *str. pyramidale* CA1-зони гіпокампа (див. рис. 1). Гіпертрофувана структура астрочитів проявлялася не лише збільшенням площі сомита клітин, але і потовщенням та зменшенням довжини численних коротких відростків. На 14 добу рівень активації астрочитів був таким самим, як і на 3 добу культивування зрізів гіпокампа після КГД.

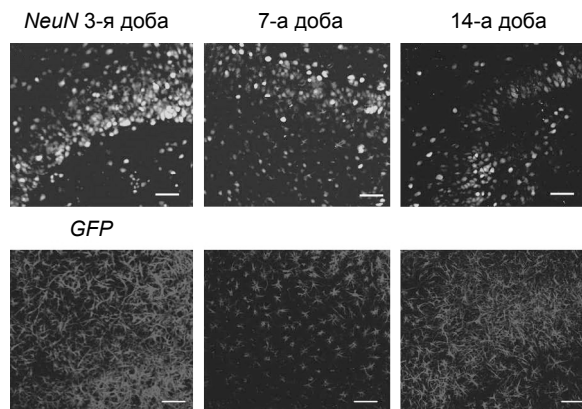


Рис. 1. CA1-зона гіпокампа на 3-ю, 7-у та 14-у доби після КГД. Імуногістохімічне фарбування на NeuN та GFP. Масштабна лінійка — 50 мкм.

Через 2 год реоксигенації після КГД свіжовиділені GFP-позитивні НСК трансплантували на культивовані органотипові зрізи гіпокампа. Кількість життєздатних клітин після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином (7-AAD) становила 89,8-93,5 %, а вміст GFP-позитивних клітин серед життєздатних у даній фракції — 97,5-99,6 %.

На 3 добу після трансплантації GFP-позитивні НСК вбудовувалися у нейропіл гіпокампа та змінювали свою морфологію. Спостерігалась поява радіальних відростків, які відходили від сомита клітини, що вказувало на їх диференціацію (рис. 2). У деяких клітин відзначався ріст коротких чисельних відростків. Візуально кількість нейронів у *str. pyramidale* зони CA1 гіпокампа була такою ж як і

після КГД, але без трансплантації (див. рис. 2). Подвійне імуногістохімічне фарбування на GFP (маркер трансплантованих стовбурових клітин) та на NeuN (нейрони) на 3 добу після трансплантації не виявило кольорової колокалізації (кольори на мікрофотографії конвертовані у чорно-білі), це вказує на те, що трансплантовані клітини ще не диференціювалися у нейрони (див. рис. 2).

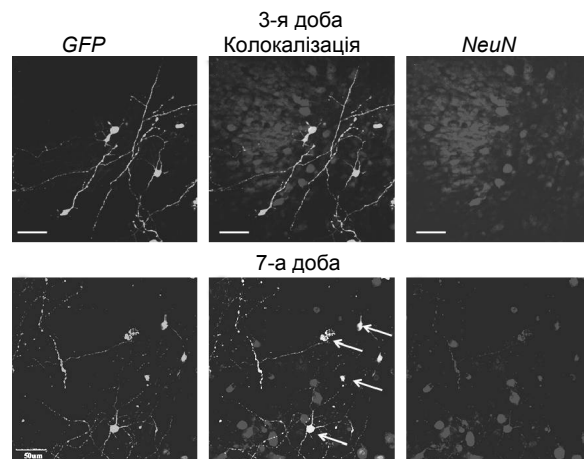


Рис. 2. GFP- та NeuN-позитивні клітини CA1-зони гіпокампа на 3-ю та 7-у доби після КГД і трансплантації НСК. Колокалізація на GFP та NeuN показує, що GFP-позитивні клітини експресують NeuN (вказано стрілками). Масштабна лінійка — 50 мкм.

На 7 добу після трансплантації GFP-позитивні НСК продовжували змінювати свою морфологію. Було відзначено появу більшої кількості клітин з численними відростками, що відходили від сомита клітини (див. рис. 2). При подвійному імуногістохімічному фарбуванні маркерами нейронів та GFP-позитивних клітин в CA1 зоні гіпокампа відзначали колокалізацію кольорових маркерів (див. рис. 2). Це свідчить про те, що GFP-позитивні НСК не лише інтегрувалися у тканину реципієнта, мігрували в місця пошкодження, але і диференціювалися у зрілі нейрони.

На 14 добу після трансплантації НСК кількість диференційованих у нейрони GFP-позитивних клітин збільшувалася (рис. 3) при цьому GFP-позитивні клітини набували фенотип зрілих нейронів. Зокрема, ці клітини характеризувалися розвинутою сомою та розгалуженими дедритами.

Таким чином, показано, що GFP-позитивні НСК, трансплантовані в органотипову культуру гіпокампа після КГД, диференціювалися у нейрони, але не у клітини астроглії. Це свідчить про те, що трансплантовані клітини можуть реагувати на сигнали мікрооточення тканини реципієнта, які регулюють клітинну диференціацію та визначають напрямок міграції [9, 20].

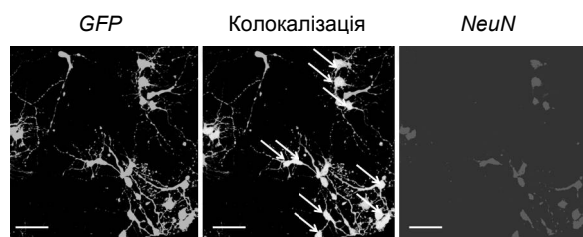


Рис. 3. *GFP*- та *NeuN*-позитивні клітини CA1-зони гіпокампа на 14-у добу після КГД і трансплантації НСК. Колокалізація демонструє, що *GFP*-позитивні клітини експресують *NeuN* (вказано стрілками). Масштабна лінійка — 50 мкм.

Механізм дії трансплантованих клітин на ішемізований мозок невідомий. Припускають, що таке покращення морфо-функціонального стану ішемі-

зованої тканини при трансплантації МСК відбувається саме завдяки активації синаптогенезу, нейрогенезу або нейропротекції за рахунок ростових факторів, про що зазначають ряд авторів [11, 16, 21, 24].

Отже, виходячи з даних літератури та отриманих результатів, трансплантація нейральних стовбурових клітин може зайняти одну з провідних позицій у лікуванні наслідків ішемічного пошкодження головного мозку. На даний час цей напрям клітинної трансплантології знаходиться на етапі різнобічного експериментального вивчення. Можливо, що у майбутньому отримані позитивні результати будуть підтверджені і клінічними дослідженнями ефективності цього методу лікування наслідків ішемічного пошкодження головного мозку.

### Список використаної літератури

1. Винничук С. М., Черенько Т. М. Ишемический инсульт: эволюция взглядов на стратегию лечения. — Киев: ООО "Комполис", 2003. — 120 с.
2. Виноградова О. С. Гиппокамп и память. — М.: Наука, 1975. — 267 с.
3. Гамбарян Л. С., Коваль И. Н. Гиппокамп. Физиология и морфология. — Ереван: АН Армянской ССР, 1973. — 104 с.
4. Asiedu-Gyekye I. J., Vaktorovich A. The "no-reflow" phenomenon in cerebral circulation // *Med. Sci. Monit.* — 2007. — **9**, № 11. — P. 394-397.
5. Bahr B. A. Long-term hippocampal slices: a model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes // *J. Neurosci. Res.* — 1995. — **42**, № 3. — P. 294-305.
6. Chu K., Kim M., Park K., Jeong S. Human neural stem cells improve sensory-motor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia // *Brain Res.* — 2004. — **1016**, № 2. — P. 145-153.
7. Daniel-Christoph W., Scheibe J., Glocke I. et al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. — 2013. — **73**, № 1. — P. 79-87.
8. Dunnett S. B., Rosser A. E. Clinical translation of cell transplantation in the brain // *Curr. Opin. Organ Transplant.* — 2011. — **16**, № 6. — P. 632-639.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. — Strasbourg, 18.03.1986. — 48 p.
10. Gu H., Yu S. P., Gutekunst C. A. et al. Inhibition of the Rho signaling pathway improves neurite outgrowth and neuronal differentiation of mouse neural stem cells // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* — 2013. — **5**, № 1. — P. 11-20.
11. Kirino T., Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia // *Acta Neuropathol.* — 1984. — **62**. — P. 201-208.
12. Kokaia Z., Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults // *Curr. Opin. Neurobiol.* — 2003. — **13**, № 1. — P. 127-132.
13. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke // *Neurology.* — 2000. — **55**, № 4. — P. 565-569.
14. Laake J., Haug F. M., Wieloch T., Ottersen O. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence // *Brain Res. Protocols.* — 1999. — **4**. — P. 173-184.
15. Miller R. H., Bai L. Translating stem cell therapies to the clinic // *Neurosci. Lett.* — 2012. — **519**. — № 2. — P. 87-92.
16. Mizusawa H. Brain ischemia — regenerative therapy using human neural stem cells // *Rinsho Shinkeigaku.* — 2003. — **43**, № 11. — P. 832-833.
17. Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S. et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors // *Cell.* — 2002. — **110**, № 4. — P. 429-441.
18. *Neuroglia 2<sup>nd</sup> ed.* / Eds: H. Kettenmann, B. R. Ransom. — Oxford: University Press, 2005. — 601 p.
19. Peeters C., Hoelen D., Groenendaal F. et al. Deferoxamine, allopurinol and oxypurinol are not neuroprotective after oxygen/glucose deprivation in an organotypic hippocampal model, lacking functional endothelial cells // *Brain Res.* — 2003. — **963**, № 1-2. — P. 72-80.
20. Roitberg B. Transplantation for stroke // *Neurol. Res.* — 2004. — **26**, № 3. — P. 256-264.
21. Rosenblum S., Wang N., Smith T. N. et al. Timing of intra-arterial neural stem cell transplantation after hypoxia-ischemia influences cell engraftment, survival, and differentiation // *Stroke.* — 2012. — **43**, № 6. — P. 1624-1631.
22. Savitz S. I., Rosenbaum D. M., Dinsmore J. H. et al. Cell transplantation for stroke // *Ann. Neurol.* — 2002. — **52**, № 3. — P. 266-275.
23. Stoppini L., Buchs P. A., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue // *J. Neurosci. Meth.* — 1991. — **37**, № 2. — P. 173-182.
24. Sukumari-Ramesh S., Alleyne C. H., Jr, Dhandapani K. M. Astrocyte-specific expression of survivin after intracerebral hemorrhage in mice: a possible role in reactive gliosis? // *J. Neurotrauma.* — 2012. — **19**, № 18. — P. 2798-804.

25. *Tsupykov O. M., Pivneva T. A., Poddubna A. O. et al.* Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals. // *Internat. J. Physiol. Pathophysiol.* — 2010. — 1, № 1. — P. 25-34.
26. *Winkelman E. R., Charcansky A., Faccioni-Heuser M. C.* An ultrastructural analysis of cellular death in the CA1 field in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia followed by 2, 4 and 10 days of reperfusion // *Anat. Embryol. (Berl).* — 2006. — 211, № 5. — P. 423-434.
27. *Yuan J., Yankner B.Y.* Apoptosis in the nervous system // *Nature.* — 2000. — 407. — P. 802-809.
28. *Zeng Y. S., Xu Z. C.* Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia // *Neurosci Res.* — 2000. — 37. — P. 113-125.

Одержано 1.03.2013

## ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК, ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ НА ОРГАНОТИПОВУЮ КУЛЬТУРУ ГИППОКАМПА ПОСЛЕ КИСЛОТНО-ГЛЮКОЗНОЙ ДЕПРИВАЦИИ *IN VITRO*

О. А. Рыбачук<sup>1,2,3</sup>, В. М. Кирик<sup>3</sup>, О. М. Цупиков<sup>1,2,3</sup>, Г. М. Бутенко<sup>3</sup>, Г. Г. Скибо<sup>1,2,3</sup>,  
Т. А. Пивнева<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, 01024 Киев

<sup>2</sup>Научно-учебный центр "Государственная ключевая лаборатория молекулярной и клеточной биологии" НАН Украины, 01024 Киев

<sup>3</sup>Государственное учреждение "Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины", 04114 Киев

После экспериментальной кислородно-глюкозной депривации органотиповой культуры гиппокампа мышей линии *FVB* отмечены повреждения пирамидных нейронов зоны CA1 гиппокампа и активация глиальных клеток. Показано, что трансплантированные на органотиповую культуру гиппокампа после ее кислородно-глюкозной депривации трансгенные по гену зеленого флуоресцентного белка эмбриональные нервные стволовые клетки сохраняют свою жизнеспособность на 7 и 14 сут после трансплантации и экспрессируют маркер нейронов (*NeuN*), что свидетельствует об их дифференциации в зрелые нейроны.

## DIFFERENTIATION OF NEURONAL STEM CELLS TRANSPLANTED ON ORGANO-TYPICAL CULTURE OF HIPPOCAMPUS FOLLOWING ACID-GLUCOSE DEPRIVATION *IN VITRO*

O. A. Rybachuk<sup>1,2,3</sup>, V. M. Kyryk<sup>3</sup>, O. M. Tsupykov<sup>1,2,3</sup>, G. M. Butenko<sup>3</sup>,  
G. G. Skibo<sup>1,2,3</sup>, T. A. Pivneva<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>A. A. Bogomoletz Institute of Physiology NAS Ukraine, 01024 Kyiv

<sup>2</sup>Scientific-Training Center "State Key Laboratory of Molecular and Cell Biology" NAS Ukraine,  
01024 Kyiv

<sup>3</sup>State Institution "Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS Ukraine", 04114 Kyiv

The damage of pyramidal neurons of hippocampal CA1 zone and activation of glial cells was noted following experimental oxygen-glucose deprivation of *FVB* mice. Transgenic by gene of green fluorescent protein embryonal nerve stem cells transplanted on organ-typical culture of the hippocampus after its oxygen-glucose deprivation were found to retain their viability on days 7 and 14 after transplantation and to express neuronal marker (*NeuN*), which testifies their differentiation to mature neurons.