

УДК 616-092.4:616.8-003.99  
doi:10.22494/cot.v4i2.60

# Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші



Цупиков О. М.<sup>1,2</sup>, Лушнікова І. В.<sup>1</sup>, Нікандрова Є. О.<sup>1</sup>, Яценко К. В.<sup>1</sup>, Устименко А. М.<sup>2</sup>, Кирик В. М.<sup>2</sup>, Бутенко Г. М.<sup>2</sup>, Скибо Г. Г.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

e-mail: tsupykov@gmail.com

## РЕЗЮМЕ

Створення адекватних *in vitro* та *in vivo* моделей пошкодження нервової тканини є необхідним для оцінки терапевтичного ефекту фармакологічних засобів та регенеративного потенціалу різних типів стовбурових клітин при захворюваннях центральної нервової системи.

**МЕТА РОБОТИ.** Створити моделі ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) – на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Моделювання ПВЛ здійснювали шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД) органотипової культури зрізів головного мозку мишей та додавання ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС) у культуральне середовище. Для аналізу ступеня пошкодження нервової тканини після моделювання ПВЛ використовували спектрофотометричний метод визначення цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі та імуногістохімічний аналіз культивованих зрізів із використанням антитіл до Rip, GFAP та Iba-1, які є маркерами олігодендроцитів, астроглії та мікроглії відповідно.

**РЕЗУЛЬТАТИ.** Було показано, що сумісна дія КГД та ЛПС призводила до значного вивільнення цитозольного ферменту ЛДГ у культуральне середовище, зменшувала Rip-імунореактивність та спричиняла виражений реактивний астро- та мікрогліоз в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

**ВИСНОВКИ.** Дана модель ПВЛ на органотипових зрізах головного мозку мишей є новим і перспективним засобом для дослідження патогенетичних механізмів ураження білої речовини головного мозку, а також шляхів нейропротекції при цій патології, зокрема перспективних фармакологічних засобів та трансплантації стовбурових клітин.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** перивентрикулярна лейкомаляція; ліпополісахариди; киснево-глюкозна депривація; органотипова культура зрізів головного мозку

Однією з найбільш актуальних медико-соціальних проблем сучасної неврології та педіатрії залишаються перинатальні ураження ЦНС, зокрема ураження білої речовини півкуль головного мозку у недоношених новонароджених – перивентрикулярна лейкомаляція (ПВЛ). ПВЛ призводить до різноманітних неврологічних розладів, у тому числі моторних та когнітивних порушень, і майже у 90 % випадків стає причиною розвитку дитячого церебрального паралічу [1]. Для вивчення патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, а також шляхів нейропротекції головного мозку, створені різноманітні *in vivo* та *in vitro* експериментальні моделі [7, 8, 11, 18, 20].

При моделюванні ПВЛ *in vivo* найчастіше використовують гіпоксично-ішемічну модель ураження білої речовини головного мозку новонароджених гризунів [3, 14]. Було показано, що найбільш чутливими клітинами, які пошкоджуються при ПВЛ, є олігодендроцити. Тому в більшості випадків, як *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції, використовується дисоційована культура олігодендроцитів або попередників олігодендроцитів із додаванням ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС) – індуктора нейрозапалення – у культуральне середовище [12, 13, 16].

Для проведення багатьох нейробіологічних досліджень *in vitro* крім культури дисоційованої клітин також використовуються гострі

тканинні зрізи або органотипові культури. Кожна з цих *in vitro* моделей має свої переваги та недоліки. Перші дослідження на гострих зрізах мозку, які інкубували в сольовому розчині, були виконані ще у 1924 році [25]. Було показано, що такі зрізи *in vitro* зберігають свою життєздатність, а їх метаболічні та електрофізіологічні характеристики збігаються з аналогічними характеристиками тканини інтактного мозку [9]. Але треба зауважити, що гострі зрізи швидко втрачають свою життєздатність, тому мають дуже обмежений час для досліджень.

Перевагами дисоційованої культури клітин є можливість виділення «чистої» культури, яка містить певний тип клітин, та спостереження за змінами морфологічних і електрофізіологічних характеристик у окремій клітині. Такі властивості дисоційованої культури особливо цінні для вивчення механізмів певних процесів. Недоліками такої культури є те, що клітини більше не є складовою частиною первинної нейрональної мережі, змінюються їх морфологія, метаболізм та реакції на різноманітні впливи [19].

Найбільш прийнятними для моделювання патологічних процесів *in vitro* та розробки стратегій їх корекції є органотипові культури [5, 26]. Органотипова культура зрізів головного мозку дедалі частіше стає альтернативою експериментам *in vivo*. В органотиповій культурі головного мозку зберігаються цитоархітектоніка, типи клітин та шарів, первинні міжклітинні зв'язки, синаптична організація, розташування рецепторів тощо [15]. До переваг такої культури також належить можливість локальної електричної чи хімічної стимуляції певних частин нейронів (тіла, аксону, дендритів); тонкої хірургічної маніпуляції зі зрізом (ізоляція окремих частин, розсічення аферентних шляхів, відділення відростків від тіл клітин). Крім того, в органотиповій культурі присутній прямиий доступ до позаклітинного простору, що дозволяє, з одного боку, легко контролювати умови життєдіяльності тканини, а з іншого – надає можливість прямого впливу на тканину різноманітними речовинами в необхідній концентрації [10].

Тому такі переваги органотипової культури є привабливими для моделювання різних патологічних станів нервової тканини, зокрема ПVL. Раніше органотипова культура гіпокампа використовувалася для моделювання ПVL *in vitro* [8]. Але відомо, що при перивентрикулярній лейкомаляції найбільше пошкоджуються мієлінізовані нервові волокна мозолистого тіла, яке відсутнє у гіпокампальній органотиповій культурі [6]. Тому ми вирішили для моделювання ПVL *in vitro* використовувати органотипову культуру зрізів головного мозку, в яких зберігається мозолисте тіло.

Останнім часом все більше уваги приділяється дослідженню можливості використання стовбурових клітин у комплексному лікуванні та реабілітації пацієнтів з захворюваннями ЦНС. 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 [2, 4, 21, 23, 24]. Тому органотипові культури зрізів головного мозку можуть бути корисними моделями для дослідження впливу трансплантації стовбурових клітин різного генезу на стан нервової тканини при моделюванні багатьох захворювань ЦНС, зокрема перивентрикулярної лейкомаляції. Така експериментальна система може стати в пригоді під час досліджень контактної і безконтактної (гуморальної) взаємодії трансплантованих стовбурових клітин з тканиною реципієнта.

Отже метою роботи була розробка моделі перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Strasburg, 1986), статті 26 Закону України «Про

захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки. В дослідженні використано мишей лінії FVB «дикого» типу, які утримувались в стандартних умовах на базі експериментальної клініки ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини» з вільним доступом до води та їжі.

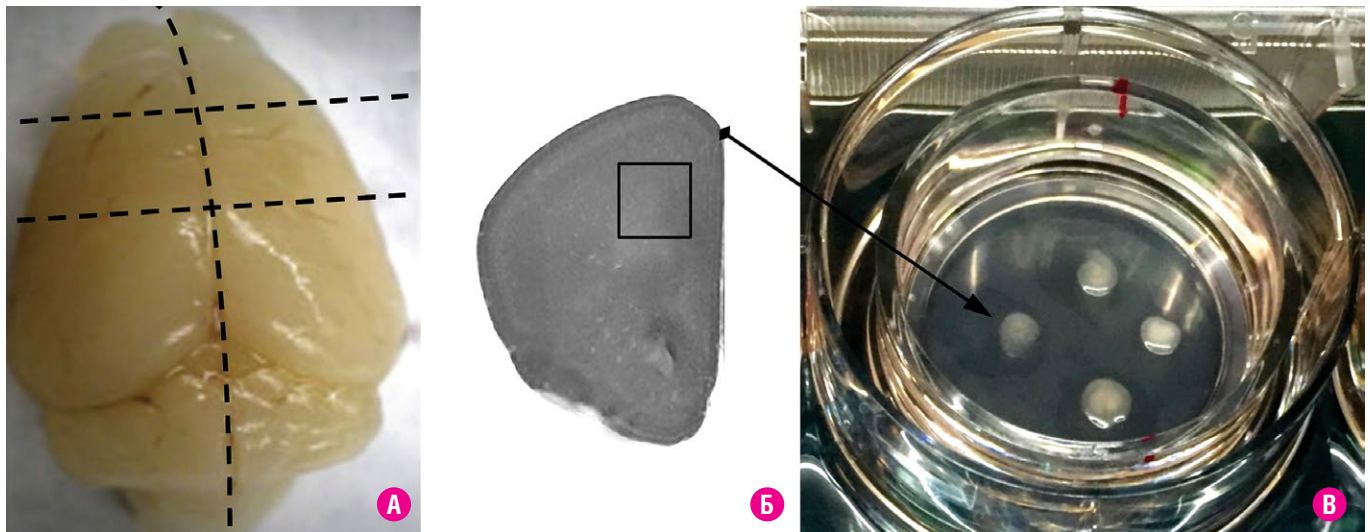
**Органотипова культура зрізів головного мозку новонароджених мишей.** Органотипову культуру зрізів головного мозку отримували з мишей 7-денного віку. Після швидкої декапітації виділяли мозок, розділяли його на дві частини по серединній лінії та за допомогою автоматичного чоппера (*McIlwain*, Великобританія) нарізали зрізи завтовшки 350 мкм. Зрізи культивували у 6-лункових планшетах при температурі +35 °C на пористих напівпроникних нітроцелюлозних мембранах Millicell-CM (*Millipore*, США), розміщених у CO<sub>2</sub>-інкубаторі на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5 % CO<sub>2</sub>) та рідкого середовища, що містило 50 % MEM, 25 % збалансованого сольового розчину Хенкса, 25 % інактивованої кінської сироватки, 10 мМ Трис, 2 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 12,5 мМ HEPES, 15 мМ глюкози, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину (все – *Sigma-Aldrich*, США) з рН 7,2. Середовище культивування змінювали на другий день інкубації та далі двічі на тиждень.

**Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку мишей лінії FVB.** Перивентрикулярну лейкомаляцію моделювали шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД) зрізів головного мозку з подальшим додаванням у культуральне середовище ендотоксину ліпополісахариду для імітації процесу запалення. КГД створювалася у спеціальній камері, де газове середовище містило 95 % азоту і 5 % CO<sub>2</sub>, а рідке середовище – фосфатно-сольовий буфер, 12,5 ммоль HEPES з додаванням 15 ммоль D-сахарози замість глюкози. Тривалість КГД становила 30 хвилин, після чого зрізи двічі відмивали і повертали до нормальних умов культивування (нормокисична реоксигенація протягом 24 та 48 годин). Після КГД у культуральне середовище додавали ЛПС L4130 (*Sigma-Aldrich*, США). Перед додаванням ЛПС досліджували залежність впливу різного вмісту ліпополісахаридів на стан нервової тканини органотипових зрізів мозку. Для цього використовували три різні концентрації ЛПС: 10, 100 та 1000 нг/мл.

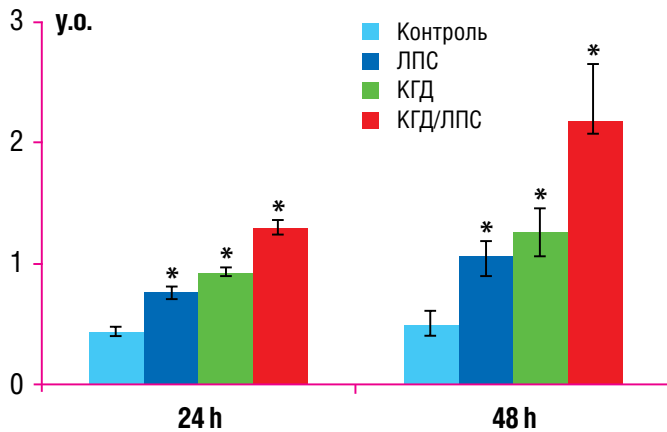
**Кількісна оцінка цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі.** Визначення змін відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі проводилося колориметричним методом за допомогою тест-системи Cytotox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (*Promega*, США). Після проведення експериментів на органотипових зрізах мозку із впливом різних концентрацій ЛПС у комбінації з КГД або без неї відбирали 200 мкл культурального середовища в 24-лунковий планшет. У кожному лунку додавали 200 мкл субстрату для визначення ЛДГ. Проби інкубували при кімнатній температурі в темряві протягом 30 хв. Потім додавали 200 мкл розчину, що зупиняв реакцію.

Оптичну щільність проб вимірювали за допомогою спектрофотометру unISPEC 2 (*LLG*, Німеччина) у мікрокуветах при довжині хвилі 492 нм. Проби відбирали через 24 та 48 годин після експериментальних впливів у дубляж та визначали середнє значення для кожної лунки. Як контроль використовували: 1 – середовище культивування з лунки, де не було органотипової культури (значення оптичної щільності якого віднімалися від показників, отриманих з експериментальних лунк); 2 – середовище культивування з лунки, де знаходилися культури без впливу ЛПС та КГД. Зміни відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі виражали в умовних одиницях, що відповідали одиницям оптичної щільності розчину, нормалізованим до площі тканини у відповідній лунці.

**Імуногістохімічне фарбування органотипової культури зрізів головного мозку.** Оцінку стану різних типів гліальних клітин у культивованих зрізах головного мозку за умов моделювання ПVL було



**Рис. 1.** Отримання органотипової культури зрізів головного мозку мишей. А – фото головного мозку миші. Переривчастою лінією показано ділянки, з яких виготовляли фронтальні зрізи для органотипової культури головного мозку. Б – фото половини фронтального зрізу. Квадратом позначена зона, яку брали для імуногістохімічного аналізу. В – фото культивованих зрізів головного мозку на напівпроникній мембрані.



**Рис. 2.** Відносна кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі органотипових зрізів через 24 та 48 годин після КГД, додавання ЛПС або сумісної дії КГД і ЛПС.

Примітка: \* – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ).

проведено методом імуногістохімії. Органотипову культуру зрізів головного мозку мишей фіксували 4 % розчином параформальдегіду на 0.1 М фосфатному буфері. Зафіксовані зрізи утримували у блокуючому неспецифічне зв'язування білків розчині, який містив: 0,1 М фосфатного буферу (pH 7,4), 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну та 0,3 % Тритон X-100 (*Sigma-Aldrich*, США). Інкубацію зрізів у розчині первинних антитіл робили протягом 12 годин при +4 °C. Були використані такі первинні антитіла: анти-GFAP (маркер астроцитів), 1:1500 (*Dako Cytomation*, Данія), анти-Iba-1 (маркер мікроглії), 1:1000 (*Wako*, Японія), анти-Rip (маркер олігодендроцитів), 1:200 (*Abcam*, США). Первинні антитіла візуалізували відповідними вторинними антитілами, кон'югованими з флуорохромом AlexaFluor (*Invitrogen*, США). Пофарбовану органотипову культуру зрізів головного мозку покривали середовищем Immu-MOUNT (*Thermo Scientific*, США). Забарвлену культуру досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа FV1000-BX61WI (*Olympus*, Японія).

Кількісний аналіз зображень проводили за допомогою програми ImageJ (*National Institutes of Health*, USA). Вимірювали інтенсивність та площу флуоресценції відповідних маркерів через автоматичний роз-

рахунок середнього значення сірого у межах порога вимірювання. Результати виражали в умовних одиницях як інтегральну щільність флуоресценції, що дорівнює добутку інтенсивності та площі флуоресценції (у тому числі інтегральну щільність фонові флуоресценції).

**Статистичний аналіз.** Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Origin Pro 8.5 (*OriginLab Corp.*, США). Вибірка даних включала результати, отримані з трьох експериментів. Результати наведені у вигляді середнього арифметичного з 4 значень ( $n = 4$ ) у кожній експериментальній групі  $\pm$  стандартна похибка середнього (SEM). Дані характеризувалися нормальним розподілом, статистична вірогідність різниць визначалась парним t-критерієм Стьюдента, відмінності вважалися достовірними при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

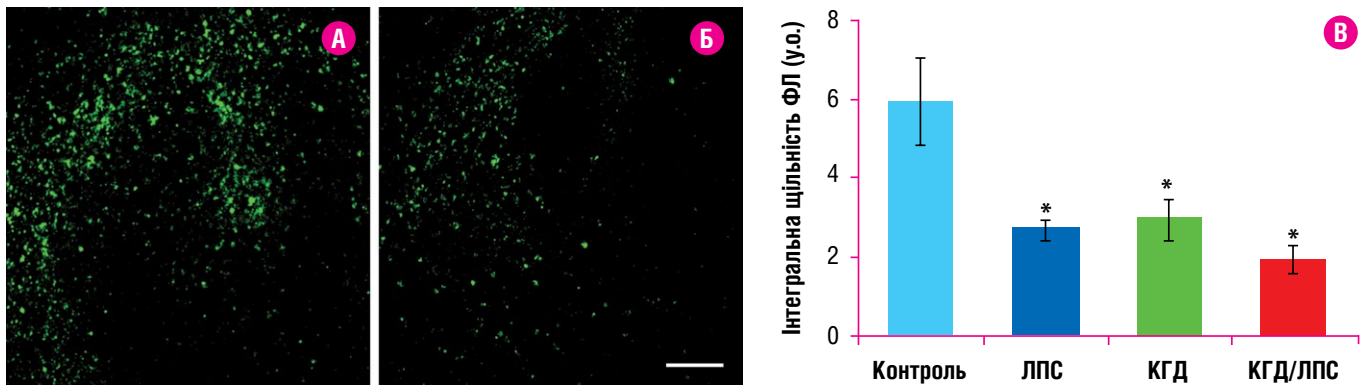
Після виділення у мишей 7-денного віку головного мозку, його розділяли на дві частини по серединній лінії та нарізали фронтальні зрізи (350 мкм) у передньо-задньому (anterior-posterior) напрямі: від брегма 1.10 до брегма -0.10 (**рис. 1-А**).

Зрізи, отримані з відповідної зони кожної півкулі мозку (**рис. 1-Б**), переносили для культивування на пористі напівпроникні мембрани (**рис. 1-В**). Враховуючи, що при ПВЛ найбільше пошкоджуються мієлінізовані нервові волокна мозолистого тіла [6], ми аналізували імуногістохімічне забарвлення саме у зоні бокових шлуночків із мозолистим тілом (**рис. 1-Б**, позначено квадратом).

### ОЦІНКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЗРІЗІВ ПО ЛДГ

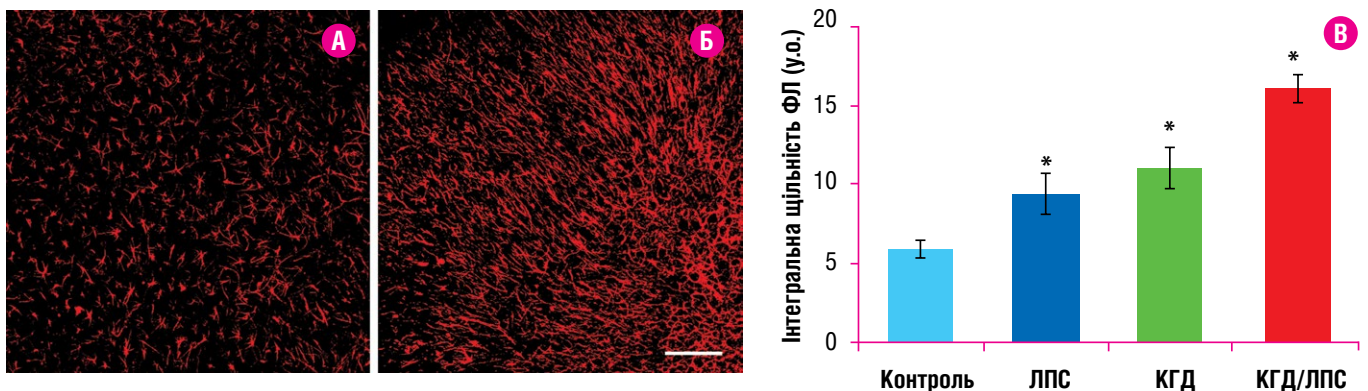
У нашій попередній роботі [22] ми показали, що для моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo* крім гіпоксично-ішемічного ушкодження нервової тканини додатково потрібно моделювання нейрозапалення. Саме тому при моделюванні ПВЛ *in vitro* ми, крім КГД, також додавали ендотоксин ЛПС для створення умов, що імітують нейрозапалення.

Були проведені пілотні дослідження впливу декількох концентрацій ліпополісахариду на органотипову культуру зрізів головного мозку (10, 100, 1000 нг/мл). Доза ЛПС 10 нг/мл мала слабкий вплив на відносну кількість ЛДГ у культуральному середовищі порівняно із контролем, а дози 100 і 1000 нг/мл мали подібний ефект на життєздатність культур (дані не представлено). У подальших дослідженнях ми використовували дозу 100 нг/мл. Таким чином, аналізували такі варіанти впливів



**Рис. 3.** Результати імуногістохімічного аналізу олігодендроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. Конфокальні зображення зрізів у контролі (А) та через 48 год після впливу КГД/ЛПС (Б). Імуногістохімічне фарбування на маркер олігодендроцитів Rip (зелене забарвлення), шкала – 500 мкм. В – гістограма інтегральної щільності флуоресценції.

Примітка: \* – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 4.** Результати імуногістохімічного аналізу астроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. Конфокальні зображення зрізів у контролі (А) та через 48 год після впливу КГД/ЛПС (Б). Імуногістохімічне фарбування на маркер астроцитів GFAP (червоне забарвлення), шкала – 500 мкм. В – гістограма інтегральної щільності флуоресценції.

Примітка: \* – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ).

на органотипову культуру зрізів головного мозку миші: КГД, ЛПС (100 нг/мл) та сумісна дія КГД і ЛПС.

Дослідження змін відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі проводили колориметричним методом через 24 та 48 годин після впливу, коли ефекти на життєздатність клітин у зрізі були достатньо виражені. Цитозольний фермент ЛДГ при пошкодженні клітинної мембрани вивільняється у культуральне середовище та характеризує ступінь ушкодження клітин. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості ферменту ЛДГ у середовищі культивування та обернено пропорційна життєздатності клітин у культурі.

Спектрофотометричний аналіз показав, що через 24 години після додавання ЛПС у культуральне середовище відносна кількість ЛДГ збільшувалася і становила  $0,76 \pm 0,05$  у. о. порівняно із контролем –  $0,430 \pm 0,04$  у. о. (рис. 2, див. с. 184).

КГД спричиняла більш виражений пошкоджуючий ефект на тканину культивованих зрізів і відносна кількість ЛДГ у культуральному середовищі становила  $0,929 \pm 0,03$  у. о. Сумісна дія КГД і ЛПС призводила до ще більшого зростання відносної кількості ЛДГ і через 24 години вона сягала значення  $1,299 \pm 0,07$  у. о.

Через 48 годин показники кількості ферменту ЛДГ значно збільшувалися і становили  $1,050 \pm 0,14$  у. о. після додавання ЛПС,  $1,253 \pm 0,20$  у. о. – після КГД і  $2,164 \pm 0,49$  у. о. – після сумісної дії КГД і ЛПС.

Таким чином, результати спектрофотометричного аналізу продемонстрували, що після сумісної дії КГД та ЛПС пошкоджуючий вплив на органотипові зрізи суттєво більший, ніж при їх окремому використанні. Ефекти були виражені через 24 години і посилювалися через 48 годин.

#### ОЦІНКА ЕКСПРЕСІЇ RIP

Основною ознакою перивентрикулярної лейкомаляції є ураження білої речовини головного мозку біля бокових шлуночків. Тому наступним етапом нашого дослідження був імуногістохімічний аналіз олігодендроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку.

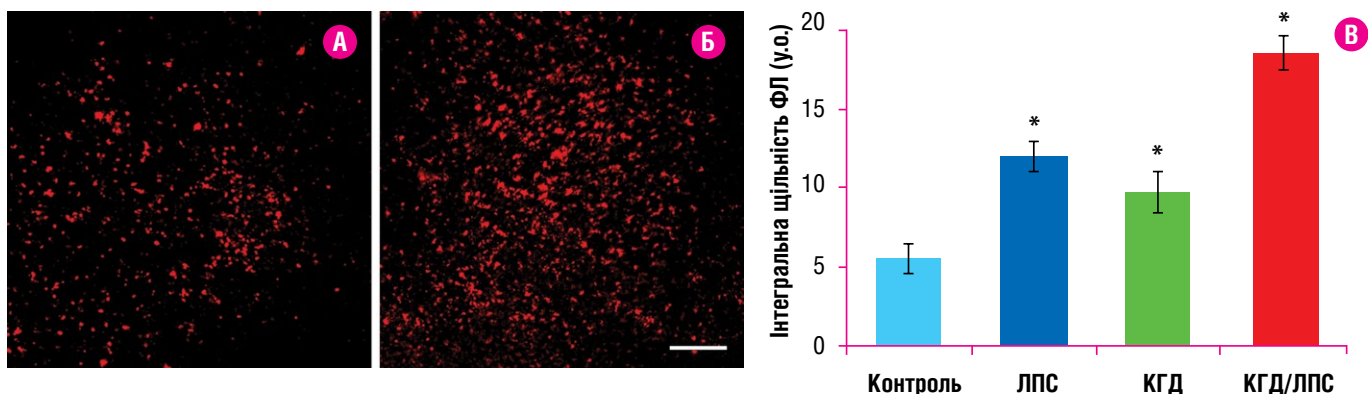
Імуногістохімічний аналіз проводили через 48 годин після впливу, коли ефекти на життєздатність (за результатами визначення ЛДГ) були найбільш вираженими. Виявлено, що додавання ендотоксину ЛПС у культуральне середовище зменшувало Rip-імунореактивність зрізів мозку порівняно із контролем ( $5,92 \pm 1,05$  у. о.) до  $2,67 \pm 0,28$  у. о. (рис. 3).

Дія КГД також мала негативний вплив на стан нервової тканини, інтегральна щільність флуоресценції за маркером Rip дорівнювала  $2,93 \pm 0,53$  у. о.

Rip-імунореактивність зрізів мозку була найнижчою в умовах сумісної дії КГД/ЛПС та становила  $1,90 \pm 0,35$  у. о., що відповідає суттєвому пошкодженню білої речовини головного мозку при моделюванні перивентрикулярної лейкомаляції.

#### ОЦІНКА РЕАКТИВНОГО ГЛІОЗУ В ОРГАНОТИПОВІЙ КУЛЬТУРІ ЗРІЗІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ МИШІ

Реактивний гліоз – це неспецифічні реактивні зміни гліальних клітин (астроцитів і мікроглії) у відповідь на пошкодження нервової тканини, які зазвичай характеризуються проліферацією і/або гіпертрофією гліальних клітин [17]. На моделі *in vivo* нами було показано, що ПВЛ супроводжується вираженим реактивним гліозом [22]. Тому для оцінки реактивного гліозу на моделі ПВЛ *in vitro* ми провели



**Рис. 5.** Результати імуногістохімічного аналізу мікрогліальних клітин в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. Конфокальні зображення зрізів у контролі (А) та через 48 год після впливу КГД/ЛПС (Б). Імуногістохімічне фарбування на маркер мікроглії Iba-1 (червоне забарвлення), шкала – 500 мкм. В – Гістограма інтегральної щільності флуоресценції.

Примітка: \* – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ).

імуногістохімічне дослідження зрізів мозку з використанням маркерів астроцитів (GFAP) та мікрогліальних клітин (Iba-1).

Імуногістохімічне дослідження органотипової культури зрізів мозку показало, що після додавання ЛПС або дії КГД відбувалося збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних астроцитів у порівнянні із контрольною групою ( $5,82 \pm 0,65$  у. о.) і інтегральна щільність флуоресценції становила  $9,33 \pm 1,25$  та  $10,86 \pm 1,20$  у. о. відповідно (рис. 4, див. с. 185).

Сумісна дія КГД та ЛПС призводила до ще більшого реактивного астрогліозу і інтегральна щільність флуоресценції становила  $15,81 \pm 0,74$  у. о. (рис. 4, див. с. 185). Збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних астроцитів у порівнянні із контрольною

групою, ймовірно, було пов'язане з гіпертрофією соми астроцитів та їх відростків, а також за рахунок проліферації астроцитів.

Імуногістохімічний аналіз зрізів мозку на наявність маркера мікроглії Iba-1, показав, що після додавання ЛПС або дії КГД відбувалося збільшення інтенсивності забарвлення Iba-1-позитивних мікро-гліальних клітин. Інтегральна щільність флуоресценції становила  $11,93 \pm 0,91$  та  $9,74 \pm 1,28$  у. о. відповідно (рис. 5) у порівнянні із контрольною групою ( $5,53 \pm 0,93$  у. о.).

Сумісна дія КГД та ендотоксину ЛПС збільшувала реактивний мікрогліоз, при цьому інтегральна щільність флуоресценції становила  $18,59 \pm 1,07$  у. о. (рис. 5).

## ВИСНОВКИ

**Було розроблено модель перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. Показано, що сумісна дія КГД та ЛПС мала найбільш пошкоджуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників окремо. Сумісна дія КГД та ЛПС призводила до значного вивільнення цитозольного ферменту ЛДГ у культуральне середовище, зменшувала Rip-імунореактивність, що свідчить про пошкодження білої речовини головного мозку, та спричиняла виражений реактивний гліоз в органотиповій культурі зрізів головного мозку.**

**Створену in vitro модель ПВЛ можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, а також шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології, зокрема за допомогою перспективних фармакологічних агентів та трансплантації стовбурових клітин.**

## СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Blumenthal I. Periventricular leucomalacia: a review [Text] / I. Blumenthal // Eur J Pediatr. – 2004. – Vol. 163, № 8. – P. 435-42.
2. Human iPSC for Therapeutic Approaches to the Nervous System: Present and Future Applications [Text] / Cefalo M. G., Carai A., Miele E., et al. // Stem Cells Int. – 2016. – Vol. 2016. – P. 4869071.
3. Cheng T. Effect of OLIG1 on the development of oligodendrocytes and myelination in a neonatal rat PVL model induced by hypoxia-ischemia [Text] / T. Cheng, X. Xue, J. Fu // Mol Med Rep. – 2015. – Vol. 11, № 4. – P. 2379-86.
4. Chohan M. O. Interneuron Progenitor Transplantation to treat CNS dysfunction [Text] / M. O. Chohan, H. Moore // Front Neural Circuits. – 2016. – Vol. 10. – P. 64.
5. Modeling nigrostriatal degeneration in organotypic cultures, a new ex vivo model of parkinson's disease [Text] / N. Daviaud, E. Garbayo, N. Lautram, et al. // Neuroscience. – 2014. – Vol. 256. – P. 10–22.
6. Deng W. Progress in periventricular leukomalacia [Text] / W. Deng, J. Pleasure, D. Pleasure // Arch Neurol. – 2008. – Vol. 65, №10. – P. 1291-5.
7. Diazoxide promotes oligodendrocyte precursor cell proliferation and myelination [Text] / B Fogal, C McClaskey, S Yan, et al. // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, № 5. – P. e10906.
8. Central administration of lipopolysaccharide induces depressive-like behavior in vivo and activates brain indoleamine 2,3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice cultures [Text] / X. Fu, S. M. Zunich, J. C. O'Connor, et al. // J Neuroinflammation. – 2010. – Vol. 7. – P. 43.
9. Hertz L. Metabolic studies in brain slices - past, present, and future [Text] / L. Hertz // Front Pharmacol. – 2012. – Vol. 3. – P. 26.

10. *Humpel C.* Organotypic brain slice cultures: a review [Text] / *C. Humpel* // *Neuroscience*. – 2015. – **Vol. 305**. – P. 86-98.
11. Intranasal surfactant protein D as neuroprotective rescue in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia [Text] / *A. Kumral, B. Iscan, D. Engur, et al.* // *J Matern Fetal Neonatal Med*. – 2016. – **Vol. 16**. – P. 1-6. [Epub ahead of print].
12. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS [Text] / *S. Lehnardt, C. Lachance, S. Patrizi, et al.* // *J Neurosci*. – 2002. – **Vol. 22, № 7**. – P. 2478-86.
13. Tumor necrosis factor alpha mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present [Text] / *J. Li, E. R. Ramenaden, J. Peng, et al.* // *J Neurosci*. – 2008. – **Vol. 28, № 20**. – P. 5321-30.
14. The vulnerability of thalamocortical circuitry to hypoxic-ischemic injury in a mouse model of periventricular leukomalacia [Text] / *X. B. Liu, Y. Shen, D. E. Pleasure, et al.* // *BMC Neurosci*. – 2016. – **Vol. 17**. – P. 2.
15. Morin-Brureau M. M. Organotypic brain slices: a model to study the neurovascular unit micro-environment in epilepsies . [Text] / *M. M. Morin-Brureau, F. De Bock, M. Lerner-Natoli* // *Fluids Barriers CNS*. – 2013. – **Vol. 10**. – P. 11.
16. *Pang Y.* Effects of lipopolysaccharide on oligodendrocyte progenitor cells are mediated by astrocytes and microglia [Text] / *Y Pang, Z Cai, PG Rhodes* // *J Neurosci Res*. – 2000. – **Vol. 62, № 4**. – P. 510-20.
17. Structural modifications of astrocytes in the hippocampus after experimental cerebral ischemia in gerbils [Text] / *T. A. Pivneva, O. M. Tsupykov, M. N. Pilipenko* // *Neirofiziologiya*. – 2005. – **Vol. 37, № 5/6**. – P. 410-415.
18. Rodent Hypoxia-Ischemia Models for Cerebral Palsy Research: A Systematic Review [Text] / *P. Rumajogee, T. Bregman, S. P. Miller, et al.* // *Front Neurol*. – 2016. – **Vol. 7**. – P. 57.
19. *Seibenhener M. L.* Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice [Text] / *M. L. Seibenhener, M. W. Wooten* // *J Vis Exp*. – 2012. – **Vol. 65**. – P.3634
20. Retinal vessel pathologies in a rat model of periventricular leukomalacia: a new model for retinopathy of prematurity? [Text] / *J. Steck, C. Bluemel, S. Kampmann, et al.* // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2015. – **Vol. 56, № 3**. – P. 1830-41.
21. *Syed F. I.* Central Nervous System Complications of Hematopoietic Stem Cell Transplant [Text] / *F. I. Syed, D. R. Couriel, D. Frame, et al.* // *Hematol Oncol Clin North Am*. – 2016. – **Vol. 30, № 4**. – P. 887-98.
22. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia [Text] / *O. M. Tsupykov, V. M. Kyryk, A. M. Ustylenko, et al.* // *Cell and organ transplantology*. – 2015. – **Vol. 3, № 1**. – P. 68-73.
23. Transplantation of neural progenitor cells stimulates endogenous neurogenesis in mice after ischemic stroke [Text] / *O. M. Tsupykov, V. M. Kyryk, A. A. Mamchur, et al.* // *Cell and organ transplantology*. – 2014. – **Vol. 2, № 1**. – P. 85-89.
24. Indications and prospects of neural transplantation for chronic neurological diseases [Text] / *M. Vadori, L. Denaro, D. D'Avella, et al.* // *Curr Opin Organ Transplant*. – 2016. – **Vol. 21, № 5**. – P. 490-6.
25. *Warburg O.* Ueber den Stoffwechsel der tumoren [Text] / *O. Warburg, K. Posener, E. Negelein* // *Biochem Z*. – 1924. – **Vol. 152**. – P. 319-344.
26. Organotypic brain slice cultures from adult rats: approaches for a prolonged culture time [Text] / *E. Wilhelmi, U. H. Schöder, A. Benabdallah, et al.* // *Altern Lab Anim*. – 2002. – **Vol. 30, № 3**. – P. 275-83.



СТАТТЯ НА САЙТІ  
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 03.10.2016 р.

Прийнята до друку 10.11.2016 р.