

Метод конфокальної мікроскопії та його застосування для оцінки життєздатності нейронів

Н.М. Розумна, В.В. Ганжа, О.О. Лук'янець

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: nata_nr@biph.kiev.ua

У сучасному ритмі розвитку медико-біологічних досліджень успішне вирішення поставленого завдання вимагає від кваліфікованого фахівця глибоких знань про сучасні методичні прийоми. Вони дозволяють досліднику використовувати їх для розробки та реалізації методології власних експериментів, успішної публікації, написання звітів і документації для подачі на грантові програми. Одними з таких методологій є візуалізація своїх даних за допомогою лазерної скануючої конфокальної мікроскопії. Зображення, отримані з її допомогою, надалі використовуються для подальших кількісних розрахунків. Метою нашої роботи було розглянути основні принципи конфокальної мікроскопії, показати можливості використання її потенціалу для біологічних та біомедичних досліджень на сьогоднішній день. В роботі наведено приклад використання можливостей конфокального мікроскопа FV1000-BX61WI (Olympus, Японія) у Центрі колективного користування при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України для оцінки життєздатності клітин. Цей метод є корисним у дослідженнях нейропротекторних ефектів та токсичності потенційних фармакологічних агентів.

Ключові слова: лазерна скануюча конфокальна мікроскопія, культура клітин гіпокампа, Hoechst 33258, пропідіум йодид, життєздатність клітин, апоптоз, некроз.

ВСТУП

Лазерна скануюча конфокальна мікроскопія (ЛСКМ) – це сучасний і незамінний метод візуалізації, який дозволяє отримувати високоякісні оптичні зрізи препаратів клітин і тканин із високою роздільною здатністю (завтовшки до 100 мкм з інтервалом 0,3-0,5 мкм) та глибинною селективністю. Ключовою особливістю ЛСКМ є її здатність отримувати зображення у фокусі з обраних глибин, процес, відомий як оптичне секціонування. Завдяки оптичному секціонуванню цей метод дає змогу формувати тривимірні зображення клітинних структур без необхідності механічного зрізання зразка [1, 2].

Основна концепція конфокальної мікроскопії була спочатку розроблена Марвіном Мінскі в середині 1950-х років (запатентована в 1961 році), коли він був аспірантом Гарвардського університету. Мінскі хотів зобразити нейронні мережі в нефарбованих

препаратах мозкової тканини. Винахід Мінскі залишався значною мірою непоміченим, швидше за все, через відсутність інтенсивних джерел світла, необхідних для візуалізації, і комп'ютерної потужності, необхідної для обробки великих обсягів даних. Слідуючи творчості Мінського, М. Девід Еггер і Мохмір Петран в кінці 1960-х років вперше створили багатопроточний конфокальний мікроскоп, який використовував обертовий диск Ніпкова для дослідження незабарвлених ділянок мозку і гангліозних клітин [3, 4]. У 1979 р. датський фізик Ф. Бракендорф розробив Перший ЛСКМ, а у 1985 р. Т. Вільсон, Б. Амос і Д. Уайт продемонстрували можливість використання конфокальної мікроскопії для дослідження флуоресцентних препаратів [5]. Перші комерційні моделі були представлені у 1987 році. Упродовж 1990-х років спостерігався інтенсивний розвиток волоконно-оптичних технологій, поява нових фізичних і хімічних підходів до просвітлення лінз,

створення тонких діелектричних покриттів та детекторів із мінімальним рівнем шуму [1,4]. Крім того, паралельний прогрес у сфері конфокальних мікроскопів і флуоресцентних барвників сприяв широкому впровадженню ЛСКМ у практику досліджень [6].

Принцип роботи ЛСКМ. Основою конфокальної мікроскопії є узгодження фокальних площин у мікроскопі. Оптичний об'єктив має дві площини: фокальну, де розташований зразок, та конфокальну, на яку проектується зображення. Саме проєкцію в конфокальну площину спостерігач бачить через окуляр. У цій площині встановлена точкова конфокальна діафрагма (пінхол), яка у своїй проєкції точно відповідає фокусній точці джерела монохроматичного освітлення (рис. 1, А) [7].

Принцип функціонування сучасного ЛКСМ можна описати так: когерентне лазерне випромінювання проходить через два пінколи – перед джерелом світла та перед детектором (фотопомножувачем). Дихроїчне дзеркало відбиває лазерний промінь, який сканує зразок у певній фокальній площині. У відповідь виникає вторинна флуоресценція, що повертається тією ж оптичною траєкторією й фокусується у вигляді конфокальної точки на детекторі.

Діаметр пінхолу визначає товщину отриманого оптичного зрізу – він блокує флуоресцентне світло, що виникає поза фокусом. Таким чином, створюється «просторовий фільтр», завдяки якому реєструються дані лише з тонкої, чітко визначеної площини зразка. На відміну від традиційної люмінесцентної мікроскопії, де формується зображення з усієї товщі препарату (включно зі світлом із позафокусних ділянок), конфокальна система забезпечує більш високу контрастність і роздільну здатність. Світло, що походить із ділянок над або під фокальною площиною, не є конфокальним відносно пінхолу, утворює розмиті диски Ейрі та в більшості випадків відсікається діафрагмою, не досягаючи фотодетектора. Тому воно практично не впливає на формування кінцевого зображення.

Схематично процес отримання зображення в ЛСКМ виглядає так: лазер сканує флуоресцентний зразок, пінхол відсікає сигнал, який несе оптичний шум, і до детектора потрапляє лише флуоресценція з фокусної площини. Подальше зображення формується під час цифрової обробки зареєстрованих сигналів. Результатом є висококонтрастний тонкий оптичний зріз у площині ХУ з достатньою інформаційною деталізацією. Зміщення фокальної площини вздовж осі Z дає змогу отримати послідовні оптичні зрізи, а спеціальні сканувальні дзеркала забезпечують рух лазерного променя в площині ХУ всередині зразка (Рис. 1, Б). Отримані пиксельно-структуровані дані дозволяють побудувати серію ХУ-зрізів, а поступове переміщення зразка по осі Z – провести пошарове секціонування. Завдяки комп'ютерній реконструкції «оптичних зрізів» у тривимірний масив формується повноцінне 3D-флуоресцентне зображення об'єкта з можливістю відтворення зрізів у будь-якій площині, включаючи ХZ та YZ. Це дає суттєві переваги над звичайною світловою мікроскопією, де така візуалізація є недоступною [2, 7-9].

Переваги ЛСКМ. Сучасна ЛСКМ в наш час отримала активне впровадження в різних сферах. У порівнянні з звичайною світловою мікроскопією конфокальна мікроскопія має наступні переваги [2, 4, 10]:

Глибина проникнення: ЛСКМ дозволяє отримувати зображення глибше, ніж традиційні оптичні мікроскопи, зокрема завдяки можливості сканування різних площин зразка.

Висока роздільна здатність: завдяки точному контролю фокусу ЛСКМ дозволяє отримувати зображення з високою просторовою роздільною здатністю.

Мінімізація шуму: виключення позафокусного світла дозволяє значно знизити шум в зображеннях і покращити контраст.

3D-візуалізація: ЛСКМ дозволяє створювати тривимірні реконструкції зразків, що важливо для дослідження складних структур,

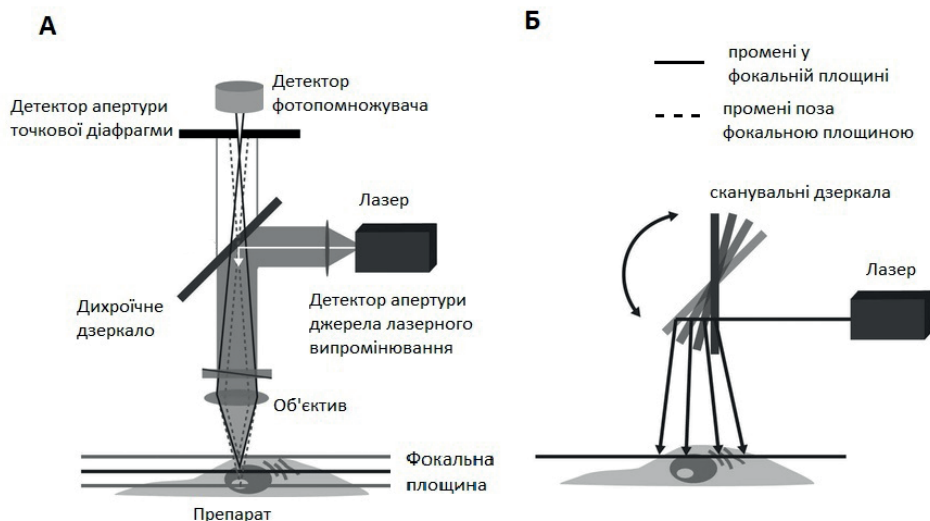


Рис.1. Спрощена схема принципу роботи ЛСКМ (з модифікацією [7]).

А – схематична діаграма основних компонентів та оптичного шляху ЛСКМ.

Б – схема сканувальних дзеркал, за допомогою яких здійснюється переміщення збуджуючого променя по зразку в ЛСКМ.

наприклад, клітин або тканин.

Дослідження живих клітин у реальному часі.

Мінімальне пошкодження зразка

Обмеження та виклики ЛСКМ. Як будь-який метод, ЛСКМ має свої обмеження. По перше, це проблеми з глибиною зображення. Для зразків великих розмірів або високих товщин може бути важко отримати чітке зображення на великих глибинах. По друге, це повільне сканування при великих об'ємах даних. По третє, при тривалому освітленні препарату виникають фототоксичність і фотознебарвлення. Врешті решт, ЛСКМ є дорогим обладнанням, що може бути недоступним для багатьох лабораторій. До того ж, для роботи на ЛСКМ потрібні спеціалізовані навички, вміння правильно налаштувати і обслуговувати мікроскоп вимагає специфічних технічних знань [1, 2, 10].

Області застосування ЛСКМ. ЛСКМ використовується в широкому спектрі галузей, включаючи клітинну біологію, генетику, мікробіологію, біологію розвитку, біомедицину, спектроскопію, нанонауку (нановізуалізацію) та квантову оптику тощо [9-11]. Типові задачі методу в молекулярній

біології – дослідження органел, цитоскелету, внутрішньоклітинного транспорту, ядра, хромосом і навіть локалізації в них генів [12]. В нейробіології за допомогою ЛСКМ проводять візуалізацію морфології нейронів, дендритів, синаптичних контактів. Метод дозволяє проводити дослідження динамічних процесів в живих клітинах, наприклад, роботи іонних каналів, змін концентрації вільного кальцію усередині клітини і навіть малої її частини з використанням флуоресцентного барвника [13]. Прикладом використання методу у біомедицині є аналіз інфекцій рогівки ока шляхом кількісної та якісної оцінки ендотеліальних клітин рогівки [14], аналіз клітинних змін при пухлинному рості [15], вивчення ангиогенезу [16]. В медичній діагностиці ЛСКМ використовують для аналізу біопатів, тканин і субклітинних структур [17, 18].

Оцінка життєздатності клітин за допомогою ЛСКМ. Цей метод є корисним у дослідженнях нейропротекторних ефектів та токсичності потенційних фармакологічних агентів. Він ґрунтується на одночасному застосуванні двох барвників – Hoechst 33258 (бісбензimid) і пропідіум йодид [19-21].

Hoechst 33258 – флуоресцентний барв-

ник, що специфічно зв'язується з ДНК і збуджується ультрафіолетом. Максимум поглинання бісбензіміда – 361 нм, максимум випромінювання флуоресценції знаходиться в синій області від 460 до 490 нм (шах 486 нм). Даний барвник здатний проникати крізь плазматичну мембрану і забарвлювати ДНК, що міститься як в живих, так і в загинувших клітинах. Бісбензімід зв'язується переважно з ділянками ДНК, що містять значну кількість пар аденін-тимін основ. Флуоресценція бісбензіміда може ефективно збуджуватися УФ спектральними лініями аргонних лазерів, ксенонових або ртутних ламп і виявлятися за допомогою фільтрів для DAPI або синіх GFP фільтрів (фільтри пропускання синього світла). Hoechst 33258 має відносно великий зсув Стокса (різниця довжин хвиль максимумів спектрів поглинання і випромінювання флуоресценції), що робить його придатним для багатоклітинного фарбування препаратів у комбінації з зеленими, жовтими і червоними флуорофорами. Він може бути доданий безпосередньо в культуру клітин після розведення його до робочої концентрації в культуральному середовищі або збалансованих сольових розчинах. Оптимальна концентрація бісбензіміда для фарбування ДНК змінюється для різних типів клітин і повинна бути підібрана для кожного конкретного експерименту. Час інкубації з барвником залежить від типу клітин і, як правило, знаходиться в межах від 5 до 30 хвилин при кімнатній температурі або при 37°. Ядра забарвлюються в синій колір і можуть бути чітко візуалізовані як з подальшим промиванням культури від барвника, так і без нього. Hoechst 33258 дає змогу ідентифікувати нормальні та апоптотично змінені клітини. В живих клітинах хроматин розподілений більш рівномірно по всьому об'єму ядра і Hoechst 33258 у них флуоресціює слабо блакитним світлом. В апоптотично змінених одиницях відбувається конденсація хроматину та фрагментація ядер, у зв'язку з цим інтенсивність флуоресценції Hoechst

33258 в 3-4 рази вища, ніж у нормальних клітинах (яскраво блакитне світіння) [22].

Пропідіум йодид – барвник, що забарвлює ДНК тільки мертвих клітин, оскільки не здатний проникати через неушкоджену цитоплазматичну мембрану. Після того, як він зв'язується з нуклеїновою кислотою, інтенсивність його флуоресценції посилюється в 20-30 разів, максимум збудження – 535 нм і максимум випромінювання реєструється при 617 нм. Пропідіум йодид забарвлює ядра клітин, в яких відбулась некротична трансформація (флуоресціює червоним світлом). Цей барвник широко використовується у флуоресцентній мікроскопії [23, 24], ЛСКФ [25], проточній цитометрії [26].

МЕТОДИКА

Усі експериментальні процедури проводили відповідно до Директиви Європейської комісії (86/609/EEC) та етичних рекомендацій Міжнародної асоціації з вивчення болю, а також були схвалені Локальним комітетом з етики тварин Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця (протокол №1/25 від 08.01.2025). Усі зусилля спрямовувалися на мінімізацію кількості використаних тварин і їхніх страждань.

Дослідження здійснювали на культурах нейронів гіпокампа щурів, які отримували за стандартною методикою [27-30] та обробляли 0,1%-м розчином сапоніну («Sigma Aldrich», США) для індукції апоптозу і некрозу. Типи клітинної загибелі оцінювали методом подвійного фарбування Hoechst 33258 («Sigma Aldrich», США) та пропідіум йодидом («Sigma Aldrich», США). Для цього в культуральне середовище додавали Hoechst 33258 (кінцева концентрація 1,0 мкг/мл) та пропідіум йодид (кінцева концентрація 5,0 мкг/мл). Час експозиції з барвниками складав 10 хвилин при 37°C і 5% CO₂. Потім культури промивали в 2,0 мл фосфатно-сольового буфера і фіксували протягом 20 хвилин у 4% розчині параформальдегіду

при кімнатній температурі. Після фіксації культури знов промивали, один раз в 2,0 мл фосфатно-сольового буфера та один раз в 2,0 мл бідистильованої води. Після фарбування покривні скельця з клітинами монтували на слайди за допомогою розчину Fluoroshield («Sigma Aldrich», США). Слайди досліджували за допомогою ЛСКМ FV1000-BX61WI з використанням програмного забезпечення FluoView («Olympus», Японія). Довжини хвиль збуджувального лазерного випромінювання становили 351/405 нм (при використанні Hoechst 33258) та 543 нм (при використанні пропідіум йодиду) відповідно.

На підставі кольору флуоресценції барвників та ступеня інтенсивності Hoechst 33258, підраховували кількості живих, апоптотичних і некротичних одиниць, використовуючи програмне забезпечення Image J («Wayne Rasband (NIH)», США) [31]. Нейрони диференціювались від гліальних клітин за допомогою фазового контрасту.

РЕЗУЛЬТАТИ

Типові зображення культур клітин гіпокампу щурів, отримані на ЛСКМ, наведено на Рис. 2. Ядра живих клітин характеризувалися слабо блакитною флуоресценцією, мали чіткі контури, ядерний хроматин забарвлювався Hoechst 33258 відносно рівномірно (Рис. 2, Б).

Ядра апоптотичних нейронів мали яскраво блакитну флуоресценцію, або в них була

чітко виражена фрагментація і конденсація хроматину, що було ознакою апоптотичної трансформації (Рис. 2, Б). Ядра некротичних клітин забарвлювались не лише Hoechst 33258, а й пропідіумом йодидом, і мали червону флуоресценцію (Рис. 2, В).

Репрезентативні результати візуалізації на ЛСКМ клітин культури гіпокампу щурів в контролі та після попередньої обробки 0,1%-м розчином сапоніну, в межах одного поля зору, показані на Рис. 3.

На основі підрахунків в програмі Image J популяцію клітин культури гіпокампу щурів розділили на три групи: 1) живі клітини, їх ядра виявляли лише низький рівень блакитної флуоресценції; 2) апоптотичні, ядра яких виявляли яскраво блакитний рівень флуоресценції або спостерігались ознаки фрагментації, конденсації ядра; 3) некротичні клітини, їх ядра виявляли, як блакитну, так і червону флуоресценцію. Загальна кількість клітин в контролі становила 74 клітини, з них живих клітин – 67, апоптотичних – 7, некротичних – 0. Це означає, що відсоток мертвих клітин становить $((7+0)/74) \times 100\% \approx 9\%$, або, навпаки, життєздатність становить 91%. При дії сапоніну загальна кількість клітин становила 70, з них живих клітин – 21, апоптотичних – 24, некротичних – 25. Це означає, що відсоток мертвих клітин становить $((24+25)/70) \times 100\% \approx 70\%$, або, навпаки, життєздатність становить 30%.

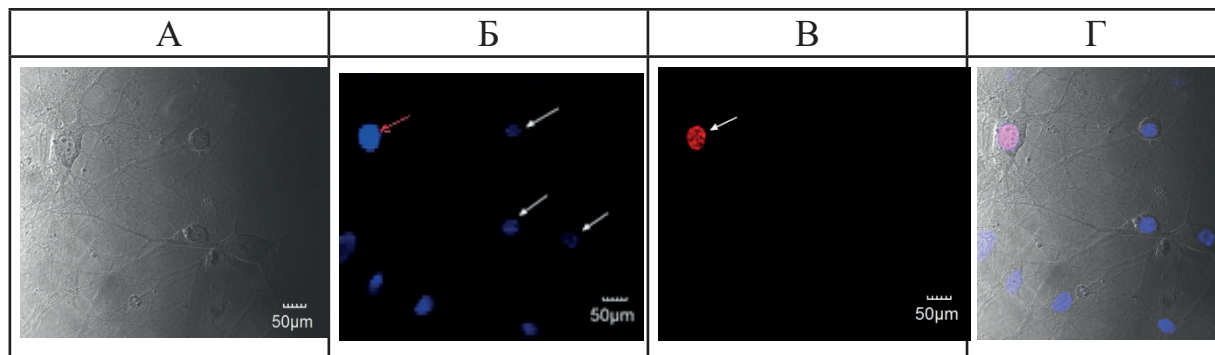


Рис. 2. Мікрофотографії культивованих пірамідних нейронів гіпокампа .

А – фазовий контраст, Б – флуоресценція Hoechst 33258 у живих (білі стрілочки) та апоптотичних (червона стрілочка) нейронах, В – флуоресценція пропідіуму йодиду в некротизованому нейроні, Г – поєднанні зображення

Такий високий рівень смертності клітин обумовлюється дією 0,1%-го розчину сапоніну, який, як відомо, робить клітинну мембрану проникною. Ця властивість сапоніну застосовується в біологічних дослідженнях для пермеабілізації клітинних мембран. Таким чином, наше дослідження, проведене з використанням двох барвників – Hoechst 33258 та пропідіум йодиду – у поєднанні з ЛСКМ, є адекватним підходом для оцінки життєздатності клітин.

ВИСНОВКИ

ЛСКМ є одним із найефективніших методів сучасної біомедичної візуалізації. Завдяки високій просторовій роздільній здатності, можливості оптичного зрізання і тривимірної реконструкції цей метод відіграє ключову роль у клітинній біології, нейронауках, онкології та матеріалознавстві. Незважаючи на її вартість і технічні вимоги, її застосування приносить великі результати в багатьох напрямках. Дана технологія є незамінною у біологічних дослідженнях, зокрема для візуалізації клітин, тканин,

потовщених зразків, коли важливо отримати чіткі оптичні розрізи і тривимірні дані без фізичного розрізання зразка. Подальший розвиток технологій (мультифотонні та суперрезольвуючі системи) робить конфокальну мікроскопію основою для нових напрямів наномедицини та біотехнологій.

Метод оцінки життєздатності клітин, як приклад використання можливостей конфокального мікроскопа у поєднанні з флуоресцентними барвниками, є корисним у дослідженнях нейропротекторних ефектів та токсичності потенційних фармакологічних агентів.

Робота була підтримана грантом Національного фонду досліджень України № 2023.05/0023, проєкт «Біомедичний центр інноваційних досліджень у галузі нейронаук».

N.M. Rozumna, V.V. Hanzha, O.O. Lukyanets

CONFOCAL MICROSCOPY: METHODOLOGY AND ITS USE IN ASSESSING NEURONS VIABILITY

*Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: nata_nr@biph.kiev.ua*

In the current landscape of medical and biological research, successfully addressing a given task requires specialists

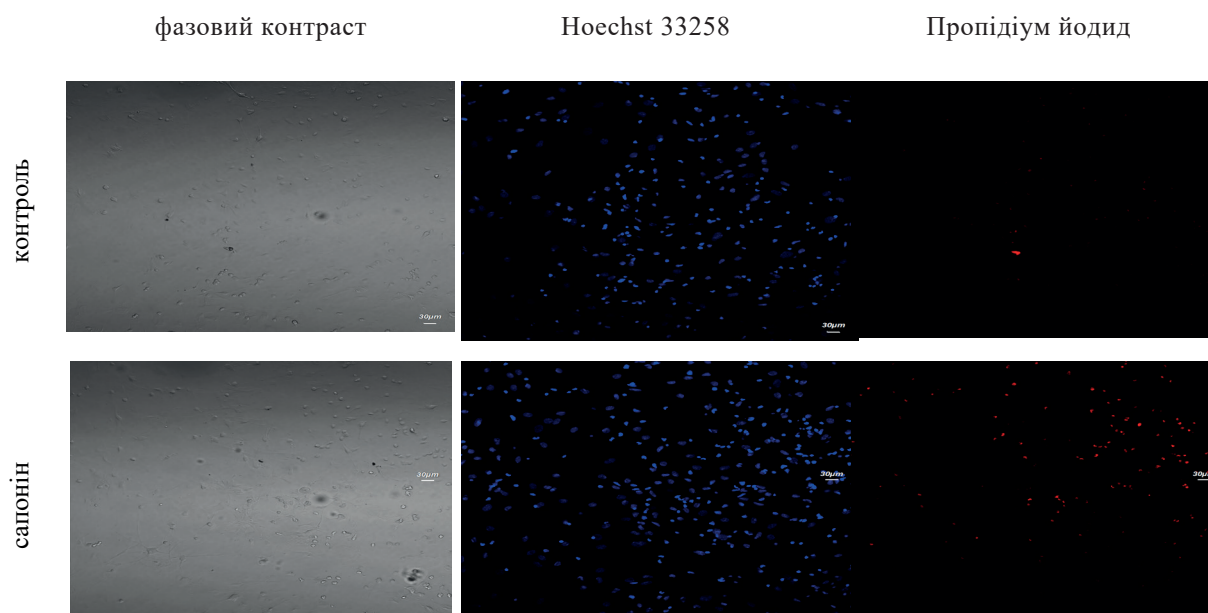


Рис. 3. Вплив 0,1%-го розчину сапоніну на життєздатність нейронів гіпокампу щурів.

to possess in-depth knowledge of modern methodological approaches. Such expertise enables researchers to develop and implement their own experimental protocols, publish their findings, and prepare reports and documentation for grant applications. One valuable methodology is the visualization of data using laser scanning confocal microscopy. Images obtained with this technique can then be used for quantitative analyses. The aim of this study was to examine the fundamental principles of confocal microscopy and to demonstrate its potential applications in contemporary biological and biomedical research. This paper presents an example of using the FV1000-BX61WI confocal microscope (Olympus, Japan) at the Shared Use Centre of the Bogomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine to assess cell viability. This approach is particularly useful for investigating the neuroprotective effects and toxicity of potential pharmacological agents.

Keywords: laser scanning confocal microscopy, hippocampal cell culture, Hoechst 33258, propidium iodide, cell viability, apoptosis, necrosis.

REFERENCES

- Smith CL. Basic Confocal Microscopy. *Current Protocols in Neuroscience*. 2011;56(1):2.1-2.18. doi: <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0202s56>.
- Bayguinov PO, Oakley DM, Shih CC, Geanon DJ, Joens MS, Fitzpatrick JAJ. Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Current protocols in cytometry*. 2018;85(1):e39. Epub 2018/06/22. doi: 10.1002/cpcy.39.
- Paddock SW, Eliceiri KW. Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2014;1075:9-47. Epub 2013/09/21. doi: 10.1007/978-1-60761-847-8_2.
- Claxton NS, Fellers TJ, Davidson MW. Microscopy, Confocal. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. 2006.
- Amos WB, White JG. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biology of the cell*. 2003;95(6):335-42. Epub 2003/10/02. doi: 10.1016/s0248-4900(03)00078-9.
- Reigoto AM, Andrade SA, Seixas M, Costa ML, Mermelstein C. A comparative study on the use of microscopy in pharmacology and cell biology research. *PLoS One*. 2021;16(1):e0245795. Epub 2021/01/23. doi: 10.1371/journal.pone.0245795.
- Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current protocols in cytometry*. 2020;92(1):e68. Epub 2019/12/27. doi: 10.1002/cpcy.68.
- Claxton N, Fellers T, Davidson M. LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPY. *Olympus Fluoview Resource Center National High Magnetic Field Laboratory*. 2005.
- Lavrentovich OD. Confocal Fluorescence Microscopy. *Characterization of Materials*. 2012. p. 1-15.
- Takbhat B. A Narrative Review on Confocal Laser Scanning Microscopy: Principle, Applications, Advancements and Challenges. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 2024. doi: 10.7860/JCDR/2024/73869.20245.
- Tovey S, Brighton P, Bampton E, Huang Y, Willars G. Confocal microscopy: Theory and applications for cellular signaling. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2012;937:51-93. doi: 10.1007/978-1-62703-086-1_3.
- Stockert JC, Blázquez-Castro A. *Fluorescence Microscopy in Life Sciences*: Bentham Science Publishers; 2017.
- Shkryl VM. Basic principles of confocal microscopy of calcium signals. *Biophysical Bulletin*. 2017;2(38):20-34. doi: 10.26565/2075-3810-2017-38-03.
- Patel DV, McGhee CN. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2007;35(1):71-88. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2007.01423.x>.
- Rey-Barroso L, Peña-Gutiérrez S, Yáñez C, Burgos-Fernández FJ, Vilaseca M, Royo S. Optical Technologies for the Improvement of Skin Cancer Diagnosis: A Review. *Sensors*. 2021;21(1):252.
- Cannizzaro R, Mongiat M, Canzonieri V, Fornasari M, Maiero S, De Re V, Todaro F, De Paoli P, Spessotto P. Endomicroscopy and Cancer: A New Approach to the Visualization of Neoangiogenesis. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012;2012(1):537170. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/537170>.
- Ragazzi M, Piana S, Longo C, Castagnetti F, Foroni M, Ferrari G, Gardini G, Pellacani G. Fluorescence confocal microscopy for pathologists. *Modern Pathology*. 2014;27(3):460-71. doi: 10.1038/modpathol.2013.158.
- Ilie MA, Caruntu C, Lupu M, Lixandru D, Tampa M, Georgescu SR, Bastian A, Constantin C, Neagu M, Zurac SA, Boda D. Current and future applications of confocal laser scanning microscopy imaging in skin oncology. *Oncology letters*. 2019;17(5):4102-11. Epub 2019/04/05. doi: 10.3892/ol.2019.10066.
- Malagelada C, Xifró X, Badiola N, Sabrià J, Rodríguez-Alvarez J. Histamine H2-receptor antagonist ranitidine protects against neural death induced by oxygen-glucose deprivation. *Stroke*. 2004;35(10):2396-401. Epub 2004/08/24. doi: 10.1161/01.str.0000141160.66818.24.
- Lee YJ, Shacter E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(28):19792-8. Epub 1999/07/03. doi: 10.1074/jbc.274.28.19792.
- Miura M, Yuan J. Transient transfection assay of cell death genes. *Methods in enzymology*. 2000;322:480-92. Epub 2000/07/29. doi: 10.1016/s0076-6879(00)22044-2.
- Sun J, Feng Y, Wang Y, Ji Q, Cai G, Shi L, Wang Y, Huang Y, Zhang J, Li Q. α -hederin induces autophagic cell death in colorectal cancer cells through reactive oxygen species dependent AMPK/mTOR signaling pathway activation. *International journal of oncology*. 2019;54(5):1601-12. Epub 2019/03/22. doi: 10.3892/ijo.2019.4757.
- Bonde C, Norberg J, Zimmer J. Nuclear shrinkage and other markers of neuronal cell death after oxygen-glucose

- deprivation in rat hippocampal slice cultures. *Neuroscience letters*. 2002;327(1):49-52. Epub 2002/07/06. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00382-8.
24. Spahr-Schopfer I, Vutskits L, Toni N, Buchs PA, Parisi L, Muller D. Differential neurotoxic effects of propofol on dissociated cortical cells and organotypic hippocampal cultures. *Anesthesiology*. 2000;92(5):1408-17. Epub 2000/04/26. doi: 10.1097/00000542-200005000-00032.
25. Gard DL. Chapter 10 - Confocal Fluorescence Microscopy of the Cytoskeleton of Amphibian Oocytes and Embryos. In: Matsumoto B, editor. *Methods in Cell Biology*: Academic Press; 2002. p. 379-416.
26. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(50). Epub 2011/05/05. doi: 10.3791/2597.
27. Hanzha VV, Rozumna NM, Kravenska YV, Spivak MY, Lukyanetz EA. The effect of cerium dioxide nanoparticles on the viability of hippocampal neurons in Alzheimer's disease modeling. *Front Cell Neurosci*. 2023;17:1131168. Epub 2023/04/04. doi: 10.3389/fncel.2023.1131168.
28. Rozumna NM, Hanzha VV, Lukyanetz EA. Memantine protects the cultured rat hippocampal neurons treated by NMDA and amyloid β 1-42. *Frontiers in neuroscience*. 2023;17:1269664. Epub 2023/12/25. doi: 10.3389/fnins.2023.1269664.
29. Rozumna NM, Hanzha VV, Lukyanets OO. The Effect of the CDK5 Inhibitor Roscovitine on the Viability of Rat Hippocampal Neurons in Culture In Vitro. *Fiziologichnyi Zhurnal*. 2025;71(2):18-24. doi: 10.15407/fz71.02.018.
30. Kravenska EV, Ganzha VV, Yavorskaya EN, Lukyanetz EA. Effect of Cyclosporin A on the Viability of Hippocampal Cells Cultured under Conditions of Modeling of Alzheimer's Disease. *Neurophysiology*. 2016;48(4):246-51. doi: 10.1007/s11062-016-9595-5.
31. Bankhead P. Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ. 2014.