

Специфіка показників експресії iNOS у базальному магноцелюлярному ядрі щурів на тлі ранньої патогенетичної корекції при експериментальній нейродеструкції

М. В. Данукало^{ID}*^{A-D}, Ю. М. Колесник^{ID}^{A,E,F}

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Мета роботи – схарактеризувати показники експресії iNOS у базальному магноцелюлярному ядрі щурів при ранній патогенетичній корекції нейродегенерації, що спричинена інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину.

Матеріали і методи. Дослідження здійснили на 50 щурах-самцях лінії Wistar віком 10–11 місяців. Тварин поділили на п'ять експериментальних груп (n = 10). Контрольним тваринам (група 1) інтрацеребровентрикулярно вводили 0,9 % розчин NaCl; щурам інших експериментальних груп (2–5) у той самий спосіб вводили розчин колхіцину. На наступний день тваринам 3–5 груп починали ранню патогенетичну корекцію цитиколіном (група 3), тіоцетамом (група 4) і HSF-1 (група 5), що тривала 14 днів. Надалі всіх експериментальних тварин (групи 1–5) евтаназували тіопенталом натрію і вилучали головний мозок для гістохімічних, імунофлуоресцентних і біохімічних досліджень.

Результати. Встановили, що інтрацеребровентрикулярне введення колхіцину в щурів супроводжувалося морфологічними ознаками нейродегенерації в базальному магноцелюлярному ядрі та характеризувалося на 39 % достовірно меншою площею хромафінної субстанції в нейронах цієї структури порівняно з контрольними тваринами. Заходи з ранньої патогенетичної корекції нейродегенерації, що індукована колхіцином, асоціювалися з достовірно більшими показниками площі субстанції Ніссля в нейронах базального магноцелюлярного ядра порівняно з відповідним показником тварин, що не отримували корекції. Рівень нітритів у гомогенатах головного мозку щурів із введенням колхіцину без корекції (група 2) переважав контрольні показники (група 1) майже всемоє, а параметри експериментальних груп 3, 4 і 5 – в 3,5, 2,9 і 3,8 раза відповідно. Втім, статистично значущої різниці за вмістом нітритів між групою контролю та групами з корекцією не виявлено. Оцінивши показники експресії iNOS (площа імунопозитивних клітин і скоригована загальна клітинна флуоресценція (sorted total cell fluorescence, STCF)) у базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних щурів, встановили: показник площі максимально змінився у тварин 5 групи (корекція HSF-1), перевищивши відповідний параметр контролю на 18,9 %, у групі 3 (корекція цитиколіном) – на 14,7 %, групи 4 (корекція тіоцетамом) – на 17,1 %, статистично не відрізняючись при цьому від параметра групи 2 (введення колхіцину без корекції). Разом із тим, показник STCF iNOS⁺-клітин у базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних тварин найбільший у групі 2, достовірно перевищував відповідний параметр груп контролю та корекції. Порівнявши групи контролю та корекції за цим показником, вірогідних відмінностей не виявили. Зауважимо, що інтрацеребровентрикулярне введення колхіцину щурам асоціювалося з достовірно вдвічі більшою кількістю iNOS⁺ клітин у базальному магноцелюлярному ядрі порівняно з контрольними тваринами. Однак рання патогенетично обґрунтована корекція щурів із груп 3–5 істотно не вплинула на кількість iNOS⁺ клітин у дослідженій структурі, оскільки у цих групах показник статистично не відрізнявся від параметра групи 2, достовірно перевищуючи при цьому контрольні дані (група 1).

Висновки. Рання патогенетично обґрунтована корекція колхіцин-індукованої нейродегенерації в базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних щурів цитиколіном, тіоцетамом і HSF-1 супроводжувалася збільшенням площі хромафінної субстанції порівняно з відповідними показниками тварин з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину без корекції, а також зниженням рівня нітритів у гомогенатах мозку до рівня контролю (псевдооперованих тварин). У базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних щурів під впливом ранньої патогенетично обґрунтованої корекції експериментальної нейродеструкції показники експресії iNOS (площа імунопозитивних клітин і STCF) змінювалися залежно від нейропротектора, який вводили. Кількість iNOS⁺ клітин у зрізі базального магноцелюлярного ядра експериментальних щурів у групах із корекцією не змінилася порівняно з групою з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину без корекції, статистично значущо більша за відповідний показник контрольних щурів.

Ключові слова:

нейропротекція, синтаза оксиду азоту, нітрозативний стрес, нейродегенерація, головний мозок, нейрони, когнітивні функції – порушення.

Запорізький медичний журнал. 2024. Т. 26, № 5(146). С. 379-386

*E-mail: danukalo.m.v@zsmu.edu.ua

The specificity of iNOS expression indicators in the basal magnocellular nucleus of rats under early pathogenetic correction in experimental neurodestruction

M. V. Danukalo, Yu. M. Kolesnyk

Aim. To characterize iNOS expression indicators in the basal magnocellular nucleus of rats during early pathogenetic correction of neurodegeneration induced by intracerebroventricular colchicine administration.

Materials and methods. The study was conducted using 50 male Wistar rats aged 10–11 months, which were divided into 5 experimental groups (n = 10). The control animals (group 1) were administered a 0.9 % NaCl solution intracerebroventricularly, while the other experimental group rats (groups 2–5) received a colchicine solution in the same manner. The following day, the animals from groups 3–5 were initiated early pathogenetic correction with citicoline (group 3), thioacetam (group 4), and HSF-1 (group 5) lasting 14 days. All the experimental animals (groups 1–5) were then euthanized with sodium thiopental, and their brains were extracted for histochemical, immunofluorescent, and biochemical examinations.

Keywords:

neuroprotection, nitric oxide synthase, nitrosative stress, neurodegeneration, brain, neurons, cognitive function disorders.

Zaporozhye Medical Journal. 2024;26(5):379-386

Results. The study has demonstrated that intracerebroventricular administration of colchicine to rats was accompanied by morphological signs of neurodegeneration in the basal magnocellular nucleus and characterized by a significantly smaller area of chromaffin substance in the neurons of this structure by 39 % as compared to the control animals. At the same time, early pathogenetic correction of colchicine-induced neurodegeneration was associated with significantly larger values of Nissl substance area of the basal magnocellular nucleus neurons compared to the corresponding values in animals that did not receive the correction. Additionally, the nitrite level in the brain homogenates of rats administered colchicine without correction (group 2) exceeded the control (group 1) by almost 7 times, while the indicators in experimental groups 3, 4, and 5 exceeded it by 3.5, 2.9, and 3.8 times, respectively. However, no statistical differences were found between the control group and the correction groups in terms of nitrite content. Evaluating the expression of iNOS (the area of immunopositive cells and corrected total cell fluorescence, CTCF) in the basal magnocellular nucleus of the experimental rats it has been shown that the area was most affected in group 5 (HSF-1 correction), exceeding the control parameter by 18.9 %, group 3 (citicoline correction) by 14.7 %, and group 4 (thioctam correction) by 17.1 %, with no statistical differences compared to group 2 (colchicine administration without correction). Meanwhile, the CTCF of iNOS+ cells in the basal magnocellular nucleus of the experimental animals was the highest in group 2 significantly exceeding the corresponding parameters in the control and correction groups. No significant differences were found between the control and correction groups in this parameter. Additionally, it is noteworthy that intracerebroventricular administration of colchicine to rats, compared to control animals, was associated with a significant double the number of iNOS+ cells in the basal magnocellular nucleus. However, early pathogenetic correction in groups 3-5 did not significantly affect the number of iNOS+ cells in the studied structure, as this parameter did not statistically differ from group 2, although significantly exceeding the corresponding parameter in the control group (group 1).

Conclusions. Early pathogenetically substantiated correction with citicoline, thioctam, and HSF-1 in colchicine-induced neurodegeneration in the basal magnocellular nucleus of experimental rats is accompanied by an increase in the area of chromaffin substance compared to rats that received intracerebroventricular colchicine without correction, as well as a reduction in nitrite levels in brain homogenates to the control level (sham-operated animals). In the basal magnocellular nucleus of experimental rats, under the influence of early pathogenetically substantiated correction of experimental neurodegeneration, iNOS expression indicators (area of immunopositive cells and CTCF) vary depending on the neuroprotectant used. The number of iNOS+ cells in the basal magnocellular nucleus of experimental rats in the correction groups does not change compared to the group that received intracerebroventricular colchicine without correction and is statistically higher than the corresponding indicator in the control rats.

Базальне магноцелюлярне ядро (БМЯ) – група нещільно розміщених нейронів вентромедіального палідуму, що є основним джерелом ацетилхоліну в неокортексі [1]. Встановлено, що холінергічна дисфункція в корі головного мозку, яка зумовлена зокрема й загибеллю нейронів БМЯ, є важливою патогенетичною ланкою прогресування когнітивних порушень при таких складних, асоційованих із віком нейродегенеративних розладах, як хвороба Альцгеймера та Паркінсона [2]. Зауважимо, що початок ушкодження структури БМЯ визначають уже на доклінічних стадіях деменції [3].

Тому вкрай актуальним є питання щодо ранніх патохімічних механізмів нейродеструкції в БМЯ, і його вирішення сприятиме виявленню можливих фармакологічних мішеней для нейропротекції. Один із найбільш вдалих модельних підходів для цього – колхіцин-індукована (шляхом інтрацеребровентрикулярного введення, ІЦВ) нейродегенерація. Особливості цієї моделі, як-от чутливість холінергічних нейронів до токсичної дії колхіцину, дозозалежність його ефектів і загибель здебільшого нейронів тих відділів мозку, що відповідальні за когнітивні функції, дають підстави вважати ІЦВ колхіцину одним зі способів моделювання спорадичної деменції Альцгеймерівського типу у тварин [4,5]. Крім того, така фармакологічна модель, на відміну від генетичних, дає змогу відстежити початок нейродегенерації, де «точкою відліку» є час введення нейротоксину. Останній аспект особливо важливий під час вивчення можливостей патогенетичної корекції ще на доклінічних етапах нейродегенерації в БМЯ в експерименті.

Зазначимо, що аксональний транспорт є критично важливим для функціонування БМЯ через анатомічно зумовлену довжину міжструктурних зв'язків із неокортексом. Дослідження на тваринах показали, що ІЦВ колхіцину через незворотне ушкодження цього

механізму призводить до порушення синаптичної передачі, мітохондріальної дисфункції та накопичення в сомі нейрона патологічно змінених білків. Внаслідок цього відбувається загибель нейронів із розвитком нейрозапалення [6,7]. Втім, відомо, що різні субклітинні елементи (синаптичні везикули, мітохондрії, білки) транспортуються по аксону з різною швидкістю [8]. У зв'язку з цим виникають передумови для різної етапності розвитку порушень синаптогенезу, енергетичного обміну та протеостазу як першопричин загибелі нейронів БМЯ. Це зумовлює різну доцільність патогенетично обґрунтованих підходів до ранньої корекції названих патохімічних процесів, а також індукованого ними нейрозапалення та нейродегенерації.

Встановлено, що ключовими вторинними медіаторами, що реалізують процес запалення в структурах головного мозку, є активні форми кисню та азоту. До їх генерації призводить продукція великої кількості (мікромолів) оксиду азоту (NO) із наступним утворенням перксинітриду (ONOO-). Це є можливим через активацію особливого ферменту – індуцибельної ізоформи синтази оксиду азоту (iNOS, або NOS2), що виробляється і в нейронах, і в глії [9]. Отже, хоча iNOS є важливим учасником нейрозапального процесу, проте досі в науковій літературі недостатньо описано особливості експресії цього ферменту в БМЯ при різних патогенетичних підходах до ранньої корекції колхіцин-індукованої нейродегенерації.

Мета роботи

Схарактеризувати показники експресії iNOS у базальному магноцелюлярному ядрі шурів при ранній патогенетичній корекції нейродегенерації, що спричинена інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину.

1



Рис. 1. Експериментальні групи тварин, що залучені до дослідження.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 50 щурах-самцях лінії Wistar віком 10–11 місяців. Тварин утримували у віварії Навчально-наукового медико-лабораторного центру з віварієм Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Щури мали вільний доступ до їжі та води, а також їм забезпечено однакові умови догляду.

Експериментальна частина дослідження схвалена Комісією з питань біоетики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Дослідження здійснили, дотримуючись національних «Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджені з Директивою 2010/63 ЄС Європейського парламенту та Ради від 22 вересня 2010 року «Про захист прав хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей».

Дизайн дослідження наведено на рис. 1.

Засоби для корекції, що використані під час дослідження, обрані з таких міркувань:

1) Цитиколін (цитидин-5-дифосфохолін) реалізує свої нейропротективні властивості, впливаючи на рівень нейромедiatorів у головному мозку. Так, один із метаболітів цитиколіну – холін – є субстратом для синтезу ацетилхоліну [10]. Крім того, показано позитивний ефект препарату на перебіг нейрозапалення [11];

2) Тіоцетам. Його фармакологічна дія пов'язана з конкуренцією за активні форми кисню та пероксинітрид із вразливими ділянками білків внутрішньої мембрани мітохондрій. У такий спосіб сполука забезпечує зниження активності оксидативного та нітрозативного стресів і запобігає розвитку мітохондріальної дисфункції [12];

3) HSF-1 – ключовий фактор транскрипції для білків теплового шоку, що відіграють роль шаперонних білків, які беруть участь у підтримці внутрішньоклітинного протеостазу [13].

Процедуру ІЦВ колхіцину здійснили під наркозом («Телазол», в 1 флаконі – тілетамін гідрохлорид і золазепам гідрохлорид по 250 мг, 0,1 мл/100 г маси тіла тварини внутрішньоочеревинно). У латеральні шлуночки мозку щурам вводили 3 мкл 0,9 % розчину NaCl (37 °C)

та 15 мкг колхіцину в 3 мкл 0,9 % розчину NaCl (37 °C), процедуру здійснили за допомогою стереотаксичного цифрового апарату World Precision Instruments (США).

Корекцію починали на наступний день після ІЦВ колхіцину. Тваринам щоденно 1 раз на добу протягом 14 днів внутрішньоочеревинно вводили відповідний препарат. На 15 день щурів виводили з експерименту шляхом одномоментної декапітації під тіопенталовим наркозом (тіопентал натрію у дозі 120 мг/кг внутрішньоочеревинно). Головний мозок негайно вилучали, здійснювали гістологічну обробку, що передбачала фіксацію органа в розчині Буена, дегідратацію (в етанолі, починаючи з 50 % розчину і закінчуючи 100 %), переміщення в суміш етанолу 100 % з хлороформом у співвідношеннях 2:1, 1:1, 1:2, чистий хлороформ і суміш хлороформу з парапластом. Далі орган заливали в чистий парапласт (McCormick, США). Після цього за допомогою мікротома Microm-325 (MicromCorp., Німеччина) з парапластового блоку робили зрізи мозку завтовшки 7 мкм. Ділянки зрізу, що відповідали БМЯ, топографічно ідентифікували за стереотаксичним атласом мозку щура [14].

Площу хромафінної субстанції в нейронах БМЯ визначали за допомогою гістохімічного забарвлення зрізів мозку на речовину Ніссля [15]. Гістологічні зразки, що одержали, аналізували на світловому мікроскопі PrimoStar (Carl Zeiss, Німеччина) з камерою AxioCam 105color (Carl Zeiss, Німеччина). Надалі зображення опрацювали у програмі ImageJ (National Institutes of Health, США), де в напівавтоматичному режимі у нейронах БМЯ визначали цей параметр.

Експресію iNOS у нейронах БМЯ вивчали імунофлуоресцентним методом. Для цього на гістологічні зрізи, що попередньо інкубовані в цитратному буферному розчині (ThermoScientific, США) в РТ-модулі (ThermoScientific, США), наносили FITC-кон'юговані моноклональні мишачі антитіла до iNOS (SantaCruz Biotechnology, США) за рекомендаціями виробника [16]. Мікроскопію здійснили в ультрафіолетовому спектрі за допомогою світлофільтра 38HE з високою емісією на мікроскопі AxioImager-M2 (Carl Zeiss, Німеччина) з камерою AxioCam-ERC 5s (Carl Zeiss, Німеччина).

Таблиця 1. Показники експресії iNOS у нейронах БМЯ щурів з експериментальних груп, Ме [Q1; Q4]

| Параметр, одиниці вимірювання | Псевдооперовані щури (група 1) | ІЦВ колхіцину (група 2) | ІЦВ колхіцину + цитиколіну (група 3) | ІЦВ колхіцину + тіоцетам (група 4) | ІЦВ колхіцину + HSF-1 (група 5) |
|--|--------------------------------|--|--|--|--|
| Площа імунопозитивних клітин, мкм ² | 105,59 [86,81; 131,16] | 111,3 [84,58; 144,64] | 109,32 [86,76; 138,54] | 107,14 [87,21; 135,77] | 125,42 [98,25; 155,32] ^{1,3,4} |
| CTCF, Од _ф | 4234,14 [3098,01; 6068,97] | 6150,72 [4213,97; 9552,74] ¹ | 4372,81 [3621,37; 6211,69] ² | 4009,49 [3254,88; 5290,27] ^{2,3} | 4161,62 [3361,63; 5192,64] ² |

1: вірогідна різниця показників ($p_u < 0,05$) щодо групи 1; 2: вірогідна різниця показників ($p_u < 0,05$) щодо групи 2; 3: вірогідна різниця показників ($p_u < 0,05$) щодо групи 3; 4: вірогідна різниця показників ($p_u < 0,05$) щодо групи 4.

Мікрофотографії також аналізували в ImageJ, розраховували скориговану загальну клітинну флуоресценцію (corrected total cell fluorescence, CTCF). Показник наведено в умовних одиницях імунофлуоресценції (Од_ф), обраховано за формулою: $CTCF = ID_1 - (S \times ID_0)$, де ID_1 – показник інтегрованої щільності імунопозитивної клітини, що обрахований програмою автоматично; S – площа імунопозитивної клітини; ID_0 – показник інтегрованої щільності фону (клітини, що не мала видимої флуоресценції). CTCF характеризувала вміст імунореактивного матеріалу в клітині. Крім того, оцінювали кількість імунопозитивних клітин у зрізі мозку в ділянці, яку вивчали.

Окремо в гомогенатах головного мозку експериментальних щурів визначали рівень нітритів із реактивом Гріса спектрофотометричним способом на спектрофотометрі Libra S32 (Biochrom Ltd, USA) при 540 нм [17].

Статистично результати опрацювали в програмах Statistica (ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J) і Excel 7.0 (Microsoft Corp., США). Перевірку нормальності розподілу даних у вибірці здійснили за критерієм Шапіро–Вілка. Для оцінювання достовірності відмінностей результатів досліджень між експериментальними групами щурів визначали коефіцієнт Стюдента (t) для вибірки, що відповідала нормальному закону розподілу даних; критерій Манна–Вітні (U) використали, якщо дані у вибірці не відповідали закону нормального розподілу [18].

Результати

У результаті дослідження встановили особливості показників експресії iNOS у нейронах БМЯ щурів із різними патогенетично обґрунтованими підходами до корекції при колхіцин-індукованій нейродегенерації. Зазначимо, що зміни показників площі хромафінної субстанції в нейронах БМЯ і рівня нітритів у гомогенатах мозку експериментальних щурів не залежали від препарату, що застосовували.

Так, у серійних зрізах мозку, що забарвлені на речовину Ніссля, у групі щурів з ІЦВ колхіцину (група 2) виявили ознаки нейродегенерації порівняно з контрольними тваринами (група 1). Зокрема, визначили багато малих щільно забарвлених тілець із порожниною навколо них. У групах із корекцією (групи 3–5) ця ознака також виявлена, але вона менш виражена, ніж у щурів 2 групи, – зафіксовано візуально меншу кількість щільно забарвлених тілець, а отже й менше порожнин навколо них (рис. 2).

Разом із тим площа хромафінної субстанції (як більш об'єктивний показник для оцінювання ступеня

нейродегенерації) у щурів з ІЦВ колхіцину (група 2) найнижча порівняно з показником у всіх експериментальних групах. Здійснили міжгруповий аналіз за показником площі речовини Ніссля; встановили, що у групі 2 він на 35,9 % відрізнявся від відповідного параметра групи 1, на 24,8 % – групи 3, на 24,6 % – групи 4, на 23,6 % – групи 5. Втім, не виявили вірогідної різниці за цим показником контрольних тварин і щурів із груп корекції, хоча в останніх спостерігали тенденцію до зниження. Зазначимо, що статистично достовірною різницею за цим показником не зафіксовано також між групами корекції (рис. 3).

У результаті аналізу вмісту нітритів у гомогенаті головного мозку щурів експериментальних груп встановили: цей показник у тварин групи 2 достовірно перевищував показники контролю (група 1) майже в 7 разів, а показники експериментальних груп 3, 4, 5 – в 3,5, 2,9 та 3,8 раза відповідно. Зауважимо, що, як і під час аналізу попереднього показника, не виявили статистично значущої різниці за вмістом нітритів ані між групою контролю та групами з корекцією, ні всередині груп із корекцією (рис. 4).

Дослідження особливостей експресії iNOS у нейронах БМЯ експериментальних груп дало змогу встановити: порівняно з групою контролю (група 1) та групою з ІЦВ колхіцину (група 2) рання патогенетична корекція призводить до специфічних змін показників площі iNOS⁺ клітин і CTCF відповідно. У результаті міжгрупового порівняння цих показників у тварин із груп 3, 4, 5 виявили відмінності, що залежали від препарату, який застосовували для корекції (табл. 1, рис. 5).

Встановили, що ІЦВ колхіцину піддослідним тваринам (група 2) порівняно з контрольними щурами (група 1) не призвело до достовірних змін показника площі iNOS⁺ клітин у БМЯ. У групах тварин із ранньою патогенетично обґрунтованою корекцією цей параметр найбільший у групі 5 (корекція HSF-1), достовірно перевищував і показник контролю (на 18,9 %), і результати, встановлені у групах 3 (корекція цитиколіном) і 4 (корекція тіоцетамом) – на 14,7 % та 17,1 % відповідно, але статистично не відрізнявся від групи 2 (ІЦВ колхіцину без корекції). Зауважимо, що групи 3 і 4 вірогідно не відрізнялися за площею імунопозитивних до iNOS клітин БМЯ, не зафіксовано статистично значущої різниці і від груп порівняння (групи 1 і 2) (табл. 1).

Показник CTCF iNOS-позитивних клітин БМЯ найбільший у групі тварин із ІЦВ колхіцину без корекції (група 2) та достовірно перевищував відповідний параметр і псевдооперованих щурів (на 45,3 %), і щурів, яким здійснювали ранню корекцію цитиколіном (на 40,7 %), тіоцетамом (на 53,4 %) та HSF-1 (на 47,8 %). Порівнявши цей показник у щурів із груп корекції та контрольних тварин, достовірних відмінностей не виявили. Внутрішньогрупове порівняння CTCF iNOS-позитивних клітин БМЯ

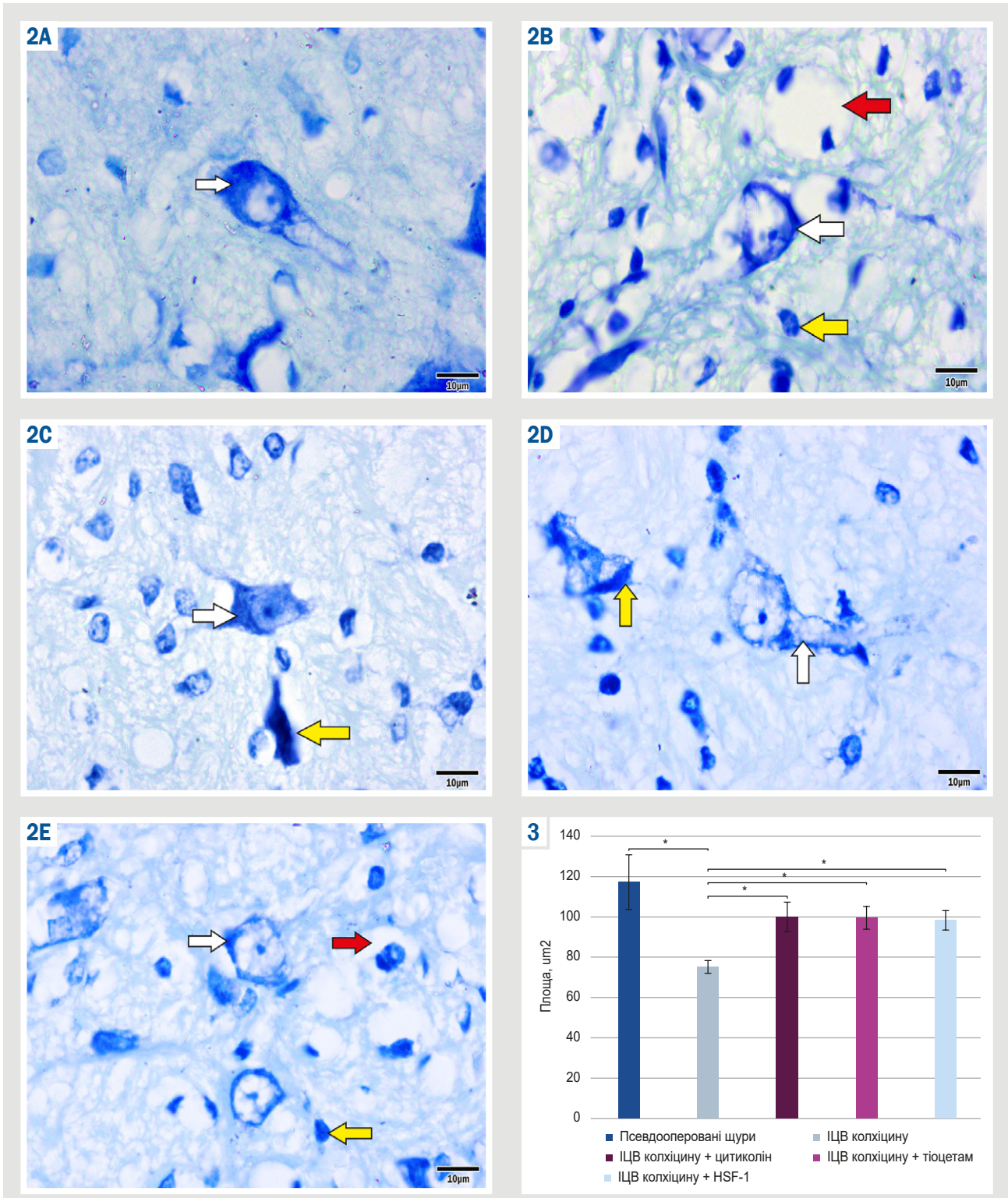


Рис. 2. Нейрони базального магнoцелюлярного ядра у щурів експериментальних груп (забарвлення на речовину Ніссля). **A:** у щурів групи 1; **B:** у тварин групи 2; **C:** у щурів групи 3; **D:** у тварин групи 4; **E:** у щурів групи 5; **біла стрілка:** речовина Ніссля; **жовта стрілка:** щільно забарвлене тілце; **червона стрілка:** порожнина навколо щільно забарвлених тілць.

Рис. 3. Площа речовини Ніссля (µm²) у нейронах БМЯ щурів експериментальних груп. *: достовірні відмінності експериментальних груп за цим показником ($p_{st} < 0,05$).

щурів всередині груп із патогенетично обґрунтованою корекцією показало: цей показник у щурів із групи 4 (корекція тіоцетамом) вірогідно нижчий за відповідний параметр тварин із групи 3 (корекція цитиколіном) – на

8,3 %, статистично не відрізняючись від значень СТСФ тварин із групи 5 (корекція HSF-1). У результаті порівняння за цим показником груп 3 і 5 статистично значуща різниця не встановлена (табл. 1).

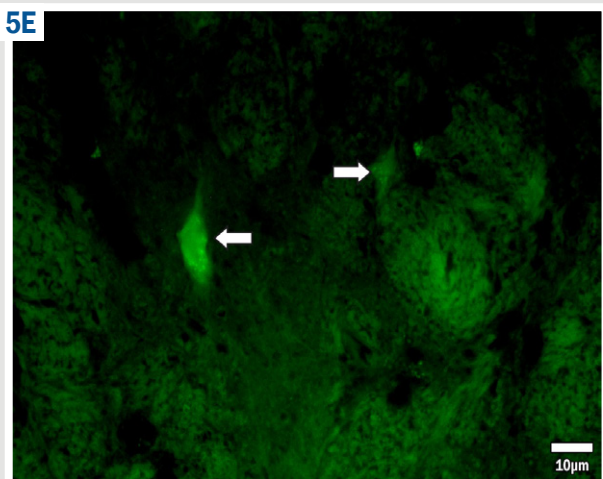
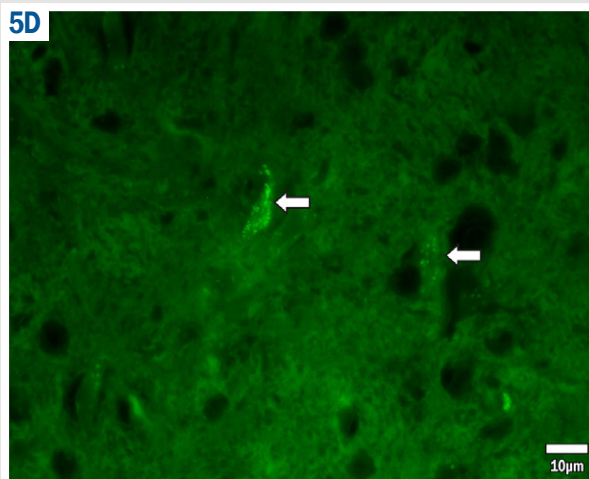
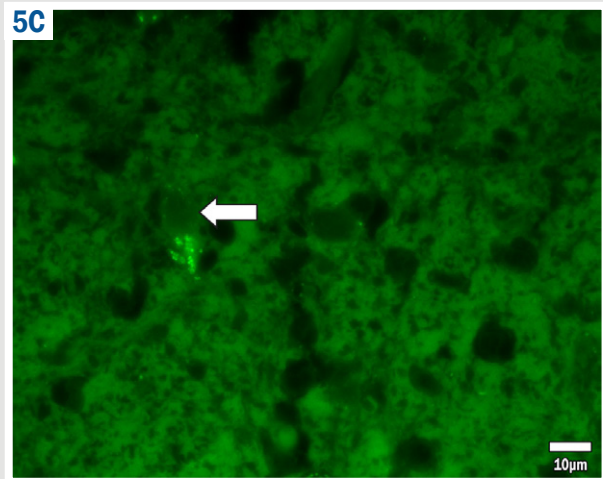
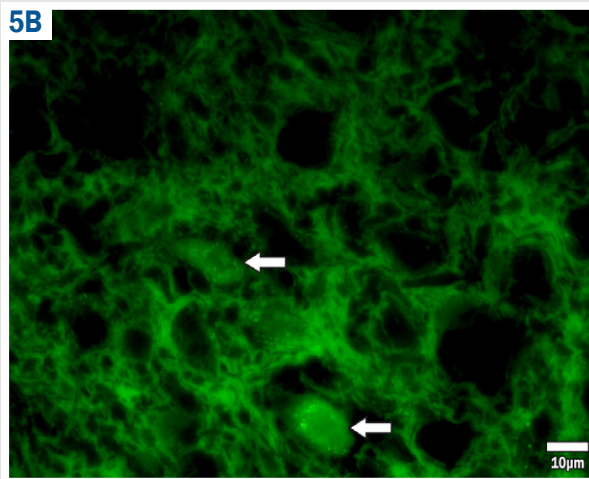
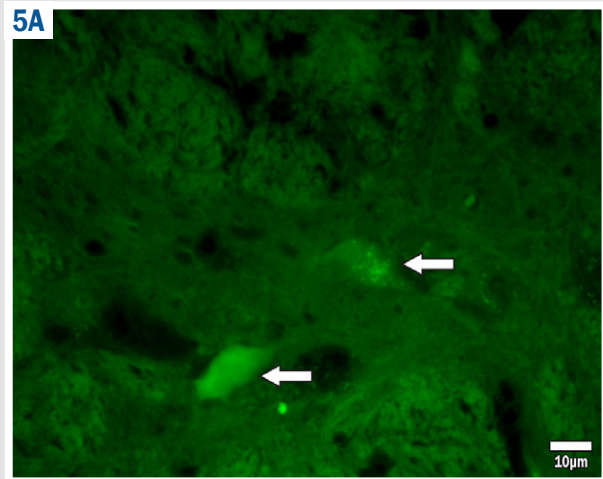
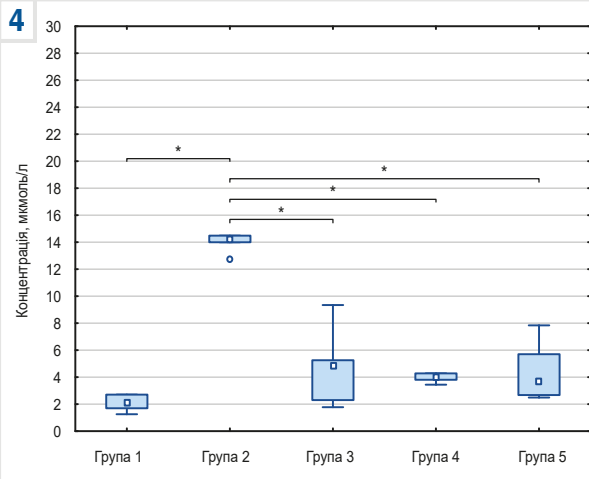


Рис. 4. Вміст нітритів у гомогенатах головного мозку щурів експериментальних груп. *: достовірні відмінності експериментальних груп за цим показником ($p < 0,05$).

Рис. 5. Експресія iNOS у нейронах БМЯ щурів експериментальних груп. **A:** у щурів групи 1; **B:** у тварин групи 2; **C:** у щурів групи 3; **D:** у тварин групи 4; **E:** у щурів групи 5; **стрілка** вказує на імунопозитивну клітину.

Наступна характеристика експресії iNOS, яку оцінювали в БМЯ експериментальних щурів, – кількість імунопозитивних клітин у зрізі на рівні цієї структури мозку. У щурів на тлі ІЦВ колхіцину визначено достовірно

вдвічі більшу кількість iNOS⁺ клітин у БМЯ порівняно з контрольними тваринами. Рання патогенетично обґрунтована корекція у щурів із груп 3–5 істотно не вплинула на кількість iNOS⁺ клітин у БМЯ: цей показник у групах

Таблиця 2. Механізми протизапального і нейропротективного ефектів фармакологічних агентів, які дослідили

| Нейропротектор | Пряма дія | Опосередкована дія |
|----------------|--|--|
| Цитиколін | Його метаболіти – цитидин і холін – є субстратами для синтезу компонентів мембран нейронів [10]. | 1. Активація шляху SIRT-1 [21]; 2. Нормалізація рівня нейромедіаторів (норадреналін, допамін, ацетилхолін) [10,22]; 3. Зниження рівня глутамату та проявів відповідної ексайтотоксичності [23]; 4. Інгібування фосфоліпази A2 [11]. |
| Тіоцетам | Антиоксидантна (вплив на активність відповідних ферментів) [24] та енерготропна дія (вплив на малат-аспартатний човник мітохондрій, окиснення в циклі Кребса, гліколізі) [25]. | 1. Нормалізація нейромедіаторного складу (норадреналін, допамін) [25]. |
| HSF-1 | Нормалізація протеостазу через активацію синтезу шаперонних білків, зокрема HSF-70 [13]. | 1. Зниження окисного стресу через HSP-70/HIF-1-залежні механізми [25]; 2. Активація глутатіонової ланки антиоксидантної системи [26]; 3. Вплив на синтез NF-κB та прозапальних цитокінів [25]. |

3–5 статистично перевищував відповідний параметр контрольних тварин (група 1) та не відрізнявся від такого в щурів з ІЦВ колхіцину без корекції (група 2) (рис. 6).

Обговорення

У результаті дослідження встановили: ІЦВ колхіцину призводить до розвитку нітрозативного стресу і нейродегенерації в БМЯ експериментальних щурів. Це виявили й інші вчені [19,20]. Один із механізмів цього патологічного процесу в БМЯ під впливом нейротоксину, що вивчали, – збільшення кількості iNOS⁺ клітин на тлі високого рівня експресії названої ізоформи синтази оксиду азоту кожним окремим клітинним елементом (і нейронами, і гліальним компонентом). Про це свідчить неоднорідність популяції імунопозитивних нейронів за показником площі в усіх експериментальних групах (табл. 1).

Ранній вплив препаратів із різними патогенетично обґрунтованими нейропротективними ефектами (незалежно від механізмів їхньої дії) в експериментальних щурів характеризувався меншим вмістом нітритів у гомогенатах головного мозку та більшою площею хромафінної субстанції в нейронах БМЯ порівняно зі щурами з ІЦВ колхіцину без корекції. Таку неспецифічність дії препаратів, що дослідили, можна пояснити їхнім мультифакторним ефектом на розвиток нейрозапалення і нейродегенерацію (табл. 2).

Науковий інтерес викликає встановлена під час дослідження певна специфічність впливу нейропротекторних агентів, що вивчали, на показники експресії iNOS. Так, згідно з даними, що наведені в таблиці 1, тільки у групі з корекцією HSF-1 площа iNOS⁺ клітин достовірно більша і щодо псевдооперованих тварин, і щодо щурів, які отримували корекцію цитиколіном та тіоцетамом, не відрізняючись при цьому від показника групи з ІЦВ колхіцину без корекції. Це, а також показники нижнього та верхнього кватилів площі (табл. 1) дає підстави стверджувати, що в цьому випадку до експресії iNOS залучалась переважно нейрональна, а не гліальна популяція клітин БМЯ, оскільки останні мають менший розмір [27,28].

Натомість рівень експресії iNOS, що оцінювали за STCF, у щурів із корекцією достовірно менший у всіх групах порівняно з показником тварин із групи ІЦВ колхіцину без корекції, сягав рівня контрольної групи. Отже, всі нейропротектори, які застосували, впливали на систему монооксиду азоту. Так, відомо, що тіоцетам і цитиколін, активуючи антиоксидантні системи нейрона, зокрема тіол-дисульфідну, збільшують біодоступність NO, а отже обмежують його токсичний ефект [24,26]. У результаті

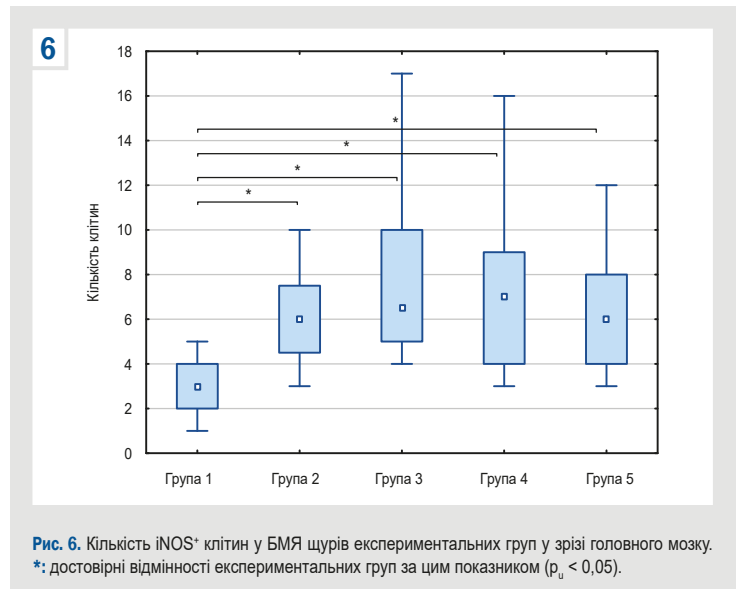


Рис. 6. Кількість iNOS⁺ клітин у БМЯ щурів експериментальних груп у зрізі головного мозку. *: достовірні відмінності експериментальних груп за цим показником ($p_0 < 0,05$).

нашого дослідження встановили, що пряма антиоксидантна дія тіоцетаму ефективніше знижує експресію iNOS порівняно з цитиколіном (табл. 1). Модулятори HSP-70 (HSF-1) в експерименті показали інший механізм впливу на iNOS – знижували експресію основного транскрипційного фактора цього ензиму – NF-κB [25].

Зауважимо, що, згідно з результатами дослідження, рання патогенетична корекція цитиколіном, тіоцетамом та HSF-1 не впливала на кількість iNOS⁺ клітин у зрізі БМЯ головного мозку порівняно з показником щурів з ІЦВ колхіцину без корекції. Це можна пояснити тим, що їх почали застосовувати для корекції уже після дії токсичного фактора, а отже на час пошкодження нейронів у головному мозку експериментальних щурів ще не досягнуто терапевтичної дози препаратів.

Висновки

1. Рання патогенетично обґрунтована корекція колхіцин-індукованої нейродегенерації в базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних щурів цитиколіном, тіоцетамом і HSF-1 супроводжується збільшенням площі хромафінної субстанції порівняно з тваринами з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину без корекції, а також зниженням рівня нітритів у гомогенатах мозку до рівня контролю (псевдооперованих тварин).

2. У базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних щурів під впливом ранньої патогенетичної

нетично обґрунтованої корекції експериментальної нейродеструкції показники експресії iNOS (площа імунопозитивних клітин і СТСФ) змінюються залежно від нейропротектора, який застосовували.

3. Кількість iNOS⁺ клітин у зрізі базального магноцелюлярного ядра експериментальних щурів у групах із корекцією не змінився порівняно з параметром тварин з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину без корекції, залишився статистично більшим за контрольний.

Фінансування

Дослідження виконано в рамках НДР Запорізького державного медико-фармацевтичного університету: «Дисфункція нейрогуморальної регуляції в патогенезі метаболічних розладів та когнітивних порушень при експериментальній патології», державний реєстраційний № 0123U103051 (2023–2028).

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 11.08.2024

Після доопрацювання / Revised: 28.08.2024

Схвалено до друку / Accepted: 02.09.2024

Відомості про авторів:

Данукало М. В., PhD, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-3413-945X

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, ректор Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, заслужений діяч науки і техніки України.

ORCID ID: 0000-0002-1556-5085

Information about the authors:

Danukalo M. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Rector of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Honored Science and Technology Figure of Ukraine.

References

- Oswald MJ, Han Y, Li H, Marashli S, Oglo DN, Ojha B, et al. Cholinergic basal forebrain nucleus of Meynert regulates chronic pain-like behavior via modulation of the prelimbic cortex. *Nature Communications*. 2022;13(1):5014. doi: 10.1038/s41467-022-32558-9
- Tierpoit S, Meyer PM, Patt M, Deuther-Conrad W, Hesse S, Barthel H, et al. PET Imaging of Cholinergic Neurotransmission in Neurodegenerative Disorders. *J Nucl Med*. 2022;63(Suppl 1):33S-44S. doi: 10.2967/jnumed.121.263198
- Aisen PS, Jimenez-Maggiara GA, Rafii MS, Walter S, Raman R. Early-stage Alzheimer disease: getting trial-ready. *Nat Rev Neurol*. 2022;18(7):389-99. doi: 10.1038/s41582-022-00645-6
- Rapaka D, Adiukwu PC, Bitra VR. Experimentally induced animal models for cognitive dysfunction and Alzheimer's disease. *MethodsX*. 2022;9:101933. doi: 10.1016/j.mex.2022.101933
- Kumar A, Seghal N, Naidu PS, Padi SS, Goyal R. Colchicines-induced neurotoxicity as an animal model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Pharmacol Rep*. 2007;59(3):274-83.
- Sleigh JN, Rossor AM, Fellows AD, Tosolini AP, Schiavo G. Axonal transport and neurological disease. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(12):691-703. doi: 10.1038/s41582-019-0257-2
- Guo W, Stoklund Dittlau K, Van Den Bosch L. Axonal transport defects and neurodegeneration: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;99:133-50. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.07.010
- Brown A. Slow axonal transport: stop and go traffic in the axon. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(2):153-6. doi: 10.1038/35040102
- Balez R, Ooi L. Getting to NO Alzheimer's Disease: Neuroprotection versus Neurotoxicity Mediated by Nitric Oxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3806157. doi: 10.1155/2016/3806157
- Jasielski P, Piędel F, Piwek M, Rocka A, Petit V, Rejdak K. Application of Citicoline in Neurological Disorders: A Systematic Review. *Nutrients*. 2020;12(10):3113. doi: 10.3390/nu12103113
- Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2003;73(3):308-15. doi: 10.1002/jnr.10672
- Demchenko AV, Belenichev IF. [Estimation of thiocetam influence on glutathione link of thiol disulfide cerebral system in conditions of experimental chronic ischemia]. *Pathologia*. 2015;(2):101-5. Ukrainian.
- Kim JY, Barua S, Huang MY, Park J, Yenari MA, Lee JE. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy for Neuroprotection after Brain Injury. *Cells*. 2020;9(9):2020. doi: 10.3390/cells9092020
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. London: Elsevier, Academic Press; 2018.
- Zhu Y, Liu F, Zou X, Torbey M. Comparison of unbiased estimation of neuronal number in the rat hippocampus with different staining methods. *J Neurosci Methods*. 2015;254:73-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.07.022
- Santa Cruz Biotechnology. Immunofluorescence Cell Staining [Internet]. www.scbt.com. Available from: <https://www.scbt.com/resources/protocols/immunofluorescence-cell-staining>
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5(1):62-71. doi: 10.1006/niox.2000.0319
- Holovanova IA, Bielkova IV, Liakhova NO. Osnovy medychnoi statystyky [Basics of medical statistics]. Poltava: PDMU; 2017. Ukrainian. Available from: <https://repository.pdmu.edu.ua/handle/123456789/10614>
- Liang Y, Li S, Wen C, Zhang Y, Guo Q, Wang H, et al. Intrastriatal injection of colchicine induces striatonigral degeneration in mice. *J Neurochem*. 2008;106(4):1815-27. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05526.x
- Kumar A, Dogra S. Neuroprotective effect of carvedilol, an adrenergic antagonist against colchicine induced cognitive impairment and oxidative damage in rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 Mar;92(1):25-31. doi: 10.1016/j.pbb.2008.10.005
- Hurtado O, Hernández-Jiménez M, Zarruk JG, Cuartero MI, Ballesteros I, Camarero G, et al. Citicoline (CDP-choline) increases Sirtuin1 expression concomitant to neuroprotection in experimental stroke. *J Neurochem*. 2013;126(6):819-26. doi: 10.1111/jnc.12269
- Synoradzki K, Grieb P. Citicoline: A Superior Form of Choline? *Nutrients*. 2019;11(7):1569. doi: 10.3390/nu11071569
- Hurtado O, Moro MA, Cárdenas A, Sánchez V, Fernández-Tomé P, Leza JC, et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis*. 2005;18(2):336-45. doi: 10.1016/j.nbd.2004.10.006
- Qureshi I, Endres JR. Citicoline: a novel therapeutic agent with neuroprotective, neuromodulatory, and neuroregenerative properties. *Natural Medicine J*. 2010;2(6):11-25.
- Belenichev IF, Cherniy V, Nahorna E, Pavlov S, Cherniy T, Bukhtiyarova N, et al. Nejroprotekcija i nejroplastichnost [Neuroprotection and neuroplasticity]. Kyiv: Logos; 2015. Russian.
- Belenichev IF, Gorbacheva SV, Bukhtiyarova NV, Levich SV. Dynamics of changes in the concentration of heat shock protein (HSP70) in the cerebral cortex and hippocampus in experimental violation of cerebral circulation: the ability to regulate this process through positive modulation of thiol-disulfide system. *Biological Markers and Guided Therapy*. 2016;3(1):107-14. doi: <http://dx.doi.org/10.12988/bmgt.2016.6311>
- Pourbagher-Shahri AM, Farkhondeh T, Talebi M, Kopustinskiene DM, Samarghandian S, Bernatoniene J. An overview of no signaling pathways in aging. *Molecules*. 2021;26(15):4533. doi: 10.3390/molecules26154533
- Doherty GH. Nitric oxide in neurodegeneration: potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories. *Neurosci Bull*. 2011;27(6):366-82. doi: 10.1007/s12264-011-1530-6