

# Рання нейропротекція – ефекти впливу на експресію білків p53 та анексину A5 в базальному магноцелюлярному ядрі мозку щурів із колхіцин-індукованим ураженням

М. В. Данукало 

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

## Ключові слова:

нейропротекція, нейродегенерація, апоптоз, p53, анексин A5, головний мозок, нейрони, цитиколін, тіоцетам, HSF-1.

Запорізький медичний журнал. 2026. Т. 28, № 3(156). С. 236-244

**Мета роботи** – встановити характер експресії p53 та анексину A5 у клітинах базального магноцелюлярного ядра головного мозку щурів на фоні ранньої корекції цитиколіном, тіоцетамом і HSF-1 колхіцин-індукованої нейродеструкції.

**Матеріали і методи.** Дослідження здійснили на 50 щурах-самцях лінії Wistar. Експериментальних тварин поділили на 5 груп (по 10 у кожній). Група 1 – контрольні щури, яким внутрішньшлуночково в головний мозок вводили 0,9 % розчин NaCl. До груп 2–5 включено тварин, яким цим самим шляхом вводили розчин колхіцину. Після цього група 2 – позитивний контроль, а тварини з груп 3–5 на наступний день після оперативного втручання отримували цитиколін, тіоцетам і HSF відповідно протягом 14 днів. Усіх піддослідних щурів евтаназували під знеболюванням тіопенталом, головний мозок вилучали для гістохімічних та імунофлуоресцентних досліджень.

**Результати.** Внутрішньшлуночкове введення колхіцину асоційоване із втратою нейронального компонента та збільшенням кількості гліальних клітин у структурі мозку, яку дослідили. Встановлено, що двотижнева корекція нейропротекторами запобігає цьому ефекту. Колхіцин-індукована нейродегенерація супроводжується збільшенням кількості p53<sup>+</sup> та анексин A5<sup>+</sup> клітин у базальному магноцелюлярному ядрі. Застосування цитиколіну та HSF-1 сприяє найбільш вираженому збільшенню кількості p53-позитивних нейронів (на 60–70 % щодо патології), а тіоцетаму – імунопозитивних до анексину A5-клітин. Усі види застосованої патогенетичної корекції сприяли нормалізації показника інтенсивності флуоресценції (CTCF) анексин A5<sup>+</sup>-клітин до контрольних значень.

**Висновки.** У базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних тварин на 14 добу після інтрацеребровентрикулярної ін'єкції колхіцину порівняно з хібнооперованими тваринами зафіксовано зниження щільності нейронів і збільшення щільності гліальних клітин. Водночас у цій структурі мозку щурів із груп раннього застосування цитиколіну, тіоцетаму та рекомбінантного HSF-1 для корекції дії нейротоксину показники щільності нейронів та глії відповідали рівню контрольних тварин. Найбільший показник CTCF анексин A5-позитивних клітин встановлено у базальному магноцелюлярному ядрі щурів з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину порівняно з хібнооперованими та тваринами з груп корекції (де не виявлено статистично вірогідних відмінностей показника). Показник CTCF p53-позитивних клітин базального магноцелюлярного ядра в усіх експериментальних групах щурів не мав статистично значущих відмінностей порівняно з контрольною групою та між групами. Кількість p53- та анексин A5-позитивних клітин у базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних тварин з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину вірогідно перевищує показник хібнооперованих тварин. У щурів із груп корекції цей показник залежав від препарату, який вводили.

## Keywords:

neuroprotection, neurodegeneration, apoptosis, p53, Annexin A5, brain, neurons, citicoline, thiocetam, HSF-1.

Zaporozhye Medical Journal. 2026;28(3):236-244

## Early neuroprotection: effects on p53 and annexin A5 protein expression in the basal magnocellular nucleus of rats with colchicine-induced injury

M. V. Danukalo

**Aim.** To determine the expression patterns of p53 and annexin A5 in the cells of the basal magnocellular nucleus (BMN) of the rat brain following early neuroprotective intervention with citicoline, thiocetam, and recombinant HSF-1 in a rat model of colchicine-induced neurodegeneration.

**Materials and methods.** The study involved 50 male Wistar rats divided into five groups (n = 10 each). Group 1 (control) received an intracerebroventricular (ICV) injection of 0.9 % NaCl solution. Animals in groups 2–5 received ICV colchicine. Group 2 served as the positive control (untreated pathology model). Groups 3–5 received citicoline, thiocetam, and HSF-1, respectively, for 14 consecutive days beginning the day after surgery. Subsequently, all rats were euthanized under thiopental sodium anesthesia, and the brains were harvested for histochemical and immunofluorescent analyses.

**Results.** ICV colchicine caused loss of the neuronal component and an increase in glial cell number in the BMN. A two-week course of neuroprotective correction prevented these changes. Colchicine-induced neurodegeneration was also associated with an elevated number of p53- and Annexin A5-immunopositive cells in the BMN. Notably, administration of citicoline and HSF-1 resulted in a further pronounced increase in p53-positive neurons (by 60–70 % relative to the pathology group), whereas thiocetam caused a significantly increased number of annexin A5-immunopositive cells. Concurrently, all types of pathogenetic correction normalized the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) of annexin A5+ cells to control levels.

**Conclusions.** In the BMN of experimental animals on day 14 post-ICV colchicine injection, a decrease in neuronal density and an increase in glial density were observed compared to sham-operated rats. In contrast, in the groups receiving early administration of citicoline, thiocetam, or recombinant HSF-1, neuronal and glial density parameters remained at levels comparable to control animals. The highest CTCF values for annexin A5-positive cells were recorded in the colchicine group compared to both sham-operated and correction groups, with no statistically significant differences among the latter. At the same time, p53 CTCF values

in the BMN across all experimental groups showed no statistically significant differences compared to the control or each other. While the total counts of p53- and annexin A5-positive cells in the colchicine group significantly exceeded those in sham-operated animals, this parameter in the correction groups varied according to the specific pharmacological agent used.

Базальне магноцелюлярне ядро (БМЯ) у вентромедіальному палідумі головного мозку є ключовим джерелом ацетилхоліну в неокортексі та відіграє важливу роль у підтримці нормального когнітивного статусу [1]. Встановлено, що в БМЯ значну акумуляцію тау-протеїну (компонента нейрофібрилярних клубочків, накопичення якого в нейронах призводить до їх загибелі) виявляють уже на самому початку хвороби Альцгеймера, навіть коли деменції немає [2]. Крім того, за результатами електрофізіологічних і візуалізаційних досліджень, стимуляція БМЯ сприяє збільшенню вмісту ацетилхоліну в неокортексі, посилює кровообіг у корі та підкіркових структурах, призводить до модуляції нейропластичності та синаптичної передачі в кіркових нейронах [3]. Отже, БМЯ головного мозку є потенційною мішенню для фармакологічного та електричного (методом глибокої стимуляції мозку) втручання для гальмування розвитку деменції та покращення якості життя хворих.

Разом із тим, фармакологічні агенти характеризуються незначною ефективністю в компенсації когнітивного дефіциту у пацієнтів із різними нейродегенеративними хворобами, а глибоку стимуляцію мозку (deep brain stimulation, DBS) в ділянці БМЯ визначено як перспективний підхід. Зауважимо, що дослідники виявили значно кращий ефект від процедури глибокої стимуляції мозку на фоні кращої збереженості структури БМЯ, вищих вихідних когнітивних властивостей та віку. Отже, дійшли висновку, що відповідь на холінергічне лікування (фармакологічне або електричне) може прогнозуватися ступенем функціональної холінергічної цілісності головного мозку [3]. Тому набуває актуальності питання щодо оцінювання можливостей раннього патогенетично обґрунтованого нейропротекторного впливу на нейрони БМЯ шляхом вивчення механізмів і шляхів їх загибелі.

Для досліджень у цій галузі оптимальною щодо часового (є можливість оцінити початок впливу токсичного агента) й патогенетичного аспектів є колхіцин-індукована (шляхом інтрацеребровентрикулярного (ІЦВ) введення) нейродегенерація. Цю модель вчені назвали моделлю деменції альцгеймерівського типу, оскільки колхіцин спричиняє руйнування цитоскелета нейронів та ініціює головні патологічні процеси, що відбуваються і при вік-асоційованих нейродегенеративних хворобах, зокрема оксидативний стрес, порушення протеостазу та синаптогенезу [4,5]. Проте шляхи розвитку клітинної загибелі, що виникають при цьому, лишаються предметом сучасних досліджень, оскільки їх розуміння дасть підстави визначити ключові мішені впливу для підвищення резистентності нейронів при пошкодженні цитоскелета.

Підтверджено здатність колхіцину до активації процесу апоптозу в нейронах різних відділів головного мозку за участі білків, що відповідають за його ефекторну фазу (каспаза 3), яка є невідворотною [6]. Водночас експресію протеїнів, що регулюють більш ранні етапи клітинної відповіді на дію пошкоджувального фактора сублетальної сили (p53 та анексин А5), вивчено недостатньо, хоча

сама їхня біологічна активність визначатиме подальші зміни в ураженій клітині (вона або ввійде в програму альтруїстичної загибелі, або збереже життєдіяльність, або загине шляхом некрозу із наступним нейрозапаленням та розширенням зони пошкодження).

Отже, оцінювання ступеня експресії таких білків, як p53 та анексин А5 у БМЯ тварин з ІЦВ введенням колхіцину на фоні патогенетично обґрунтованої корекції дасть змогу не тільки оцінити її протекторний потенціал, але й розширити уявлення про ранні молекулярні механізми детермінування долі нейронів за умов колхіцин-індукованого пошкодження. Це має важливе значення для пошуку нових терапевтичних підходів до запобігання нейродегенерації та прогресування патологічного процесу.

## Мета роботи

Встановити характер експресії p53 та анексину А5 у клітинах базального магноцелюлярного ядра головного мозку щурів на фоні ранньої корекції цитиколіном, тіоцетамом та HSF-1 колхіцин-індукованої нейродеструкції.

## Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 50 самцях щурів породи Wistar віком 10–11 місяців, з масою тіла 180–200 г. Усі тварини отримані із ПП «Біомодельсервіс», м. Київ. Перед початком дослідження тварини перебували на акліматизації та карантині протягом 14 днів, під час якого спостерігали за їхньою поведінкою та загальним станом. Клітки тварин розміщували в окремих приміщеннях. Світловий режим: 12 годин – світло, 12 годин – темрява. Температура повітря – 19–25 °С, відносна вологість – 50–70 %. Усі ці параметри реєстрували щоденно. Умови годування: добова норма – 30 г/тварину. Щури отримували стандартний комбікорм («Vita», Україна) для лабораторних гризунів, що містить рослинні компоненти, 4 % жирів, сухе молоко.

Дослідження схвалене Комісією з питань біоетики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (протокол від 06.02.2026 року № 2) та здійснене відповідно до національних «Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001) та міжнародних правил поводження з лабораторними тваринами, затверджених Директивою 2010/63/ЄС Європейського парламенту і Ради ЄС від 22 вересня 2010 року «Про захист прав тварин, що використовуються в наукових цілях».

Групи піддослідних щурів структуровано в *таблиці 1*.

Обґрунтування вибору використаних засобів для корекції надано в попередній роботі і полягає у впливі цих речовин на різні ланки патогенезу нейродеструкції, що спричинена колхіцином. Особливо важливими в цьому контексті є такі ефекти цитиколіну, як мітопротекторна та донатора холіну для синтезу медіатора; тіоцетаму – антиоксидантна дія, нормалізація енергетичного

Таблиця 1. Експериментальні групи тварин (n = 10), що залучені до дослідження

№ групи	Маніпуляція	Фармакологічний агент	Шлях введення	Дозування
1 група	ІЦВ введення 0,9 % NaCl (37 °С)	—	—	—
2 група	ІЦВ введення колхіцину – 15 мкг/3 мкл у 0,9 % NaCl (37 °С)	—	—	—
3 група	ІЦВ введення колхіцину – 15 мкг/3 мкл у 0,9 % NaCl (37 °С)	Цитиколін (Ferrer Internacional, SA, Spain)	Інтраперитонеально	500 мг/кг
4 група	ІЦВ введення колхіцину – 15 мкг/3 мкл у 0,9 % NaCl (37 °С)	Тіоцетам (комбінація пірацетаму та тіотріазоліну 1:4), Корпорація «Артеріум», Україна	Інтраперитонеально	250 мг/кг
5 група	ІЦВ введення колхіцину – 15 мкг/3 мкл у 0,9 % NaCl (37 °С)	Фактор теплового шоку-1 (HSF-1) (recombinant), «Sigma Aldrich», США	Інтраперитонеально	200 мкл/кг

метаболізму, підвищення експресії холінорецепторів; HSF-1 – активація HSP-70 / GSH-залежних механізмів ендогенної неропротекції [7,8,9,10,11].

Внутрішньошлуночково колхіцин вводили під загальною анестезією, яка індукована за допомогою препарату «Телазол» (склад: тіолетамін гідрохлорид і золазепам гідрохлорид по 250 мг у флаконі) у дозі 0,1 мл на 100 г маси тіла, внутрішньоочеревинно. Ін'єкції 3 мкл 0,9 % розчину NaCl (37 °С) або 15 мкг колхіцину, розчиненого в 3 мкл 0,9 % NaCl (37 °С), здійснювали у латеральні шлуночки головного мозку щурів із використанням цифрової стереотаксичної системи World Precision Instruments (США).

До фармакокорекції добирали тварин, у котрих зафіксовано достовірне зниження показників просторової пам'яті та локомоторної активності у тесті восьмиканального лабіринту [12].

Корекційний вплив препаратів починався на наступну добу після внутрішньошлуночкового введення колхіцину. Протягом наступних 14 днів тваринам щоденно одноразово внутрішньоочеревинно вводили відповідний фармакологічний агент. На п'ятнадцяту добу експерименту щурів виводили з дослідження шляхом одночасної декапітації під загальним знеболюванням, якого досягали введенням тіопенталу натрію в дозі 120 мг/кг внутрішньоочеревинно.

Одразу після евтаназії вилучали головний мозок, здійснювали стандартну гістологічну обробку. Фіксацію проводили у розчині Буена, після цього тканини дегідратували шляхом послідовного перенесення через серії етанолу у концентраціях, що збільшувалися (від 50 % до 100 %). Надалі зразки обробляли сумішами 100 % етанолу та хлороформу у співвідношеннях 2:1, 1:1, 1:2, після чого орган переносили у чистий хлороформ і в суміш хлороформу з парапластом. Завершальний етап – інфільтрація та заливка тканин у чистий парапласт (McCormick, США).

Парапластові блоки використано для виготовлення серійних гістологічних зрізів завтовшки 5 мкм за допомогою мікротома Microm-325 (Microm Corp., Німеччина). Топографічне визначення ділянки мозку, що відповідала базальному магнотелюлярному ядру, здійснили за координатами, що наведені у стереотаксичному атласі мозку щура [13].

Для об'єктивного оцінювання нейродеструктивного впливу колхіцину серійні зрізи головного мозку експериментальних тварин забарвлювали за Нісслем, аналізували, використовуючи програму цифрового аналізу зображень ImageJ, за допомогою інструменту «Analyse particles», який обраховував кількість забарвлених елементів та їхню площу в кадрі. Дані використовували для обчислення щільності нейронів

та глії в експериментальних групах. Для класифікації клітин на нейрональні та гліальні популяції застосовували метод кластеризації K-Means із двома центрами кластерів (K = 2) з математичних бібліотек Python. Перед кластеризацією усі значення площ клітин стандартизовано (z-масштабовано) щодо контрольної групи шляхом обчислення z-значень:  $z = (x - \mu) / \sigma$ , де x – площа окремої клітини,  $\mu$  – середнє значення площ клітин контрольної групи,  $\sigma$  – стандартне відхилення показника площ клітин контрольної групи.

Алгоритм кластеризації застосовували до кожного дослідження окремо, з використанням масштабованих значень. Після кластеризації кожному кластеру присвоєно біологічну інтерпретацію відповідно до середнього значення площі в його межах: кластер із вищим середнім значенням z-значень визначали як популяцію нейронів, а кластер із меншим – як популяцію глії.

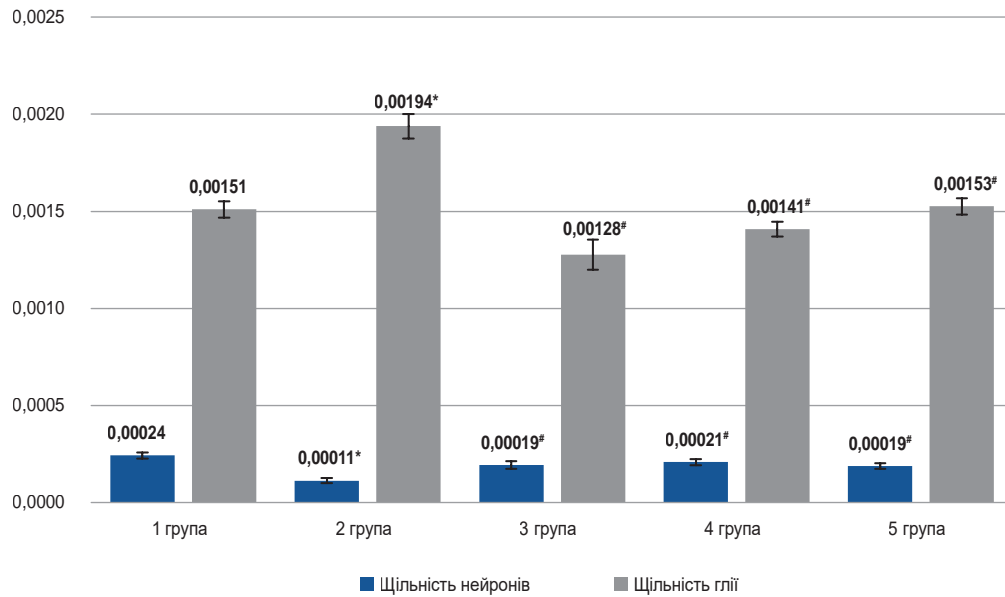
Для забезпечення відтворюваності кластеризації фіксували параметр random\_state = 0. Результати кластеризації включали обчислення кількості клітин кожного типу та щільності (кількість клітин на одиницю площі кадру,  $\mu\text{m}^2$ ).

Експресію білків p53 та анексину А5 (annA5) у нейронах БМЯ досліджували за допомогою імунофлуоресцентного аналізу. Гістологічні зрізи перед проведенням реакції піддавали депарафінуванню, регідратації та процедурі демаскування антигенів у цитратному буфері (рН 6,0) з використанням РТ-модуля (ThermoScientific, США). Далі зрізи інкубували в блокувальному буферному розчині (SantaCruz Biotechnology, США), після чого наносили специфічні моноклональні антитіла мишачого походження, кон'юговані з флуоресцеїн-ізотіоціанатом (FITC; SantaCruz Biotechnology, США), відповідно до протоколу виробника [14]. Для флуоресцентної ідентифікації ядер клітин у досліджуваній ділянці використано барвник DAPI (SantaCruz Biotechnology, США).

Флуоресцентну мікроскопію здійснили в ультрафіолетовому діапазоні з використанням світлофільтра 38HE (high-emission) на мікроскопі AxioImager-M2 (Carl Zeiss, Німеччина), що обладнаний цифровою камерою AxioCam-ERc 5s (Carl Zeiss, Німеччина). Отримані мікрофотографії аналізували, застосовуючи програмне забезпечення ImageJ, за допомогою якого кількісно оцінили такі параметри:

– скоригована загальна клітинна флуоресценція (Corrected Total Cell Fluorescence, CTCF), що визначала рівень накопичення імунореактивного матеріалу в клітині. Показник наведено в умовних одиницях імунофлуоресценції (Одіф) та обчислено за формулою:  $CTCF = ID_1 - (S \times ID_0)$ , де  $ID_1$  – інтегрована оптична щільність імунопозитивної клітини (визначена автоматично в ImageJ); S – площа клітини з позитивною флуоресцен-

1



**Рис. 1.** Показники щільності нейронів та глії у тварин з експериментальних груп (клітин/μм²). \*: вірогідна різниця показників ( $p_{st} < 0,05$ ) щодо групи 1 (хибнооперованих тварин); #: вірогідна різниця показників ( $p_{st} < 0,05$ ) щодо групи 2 (тварин з ІЦВ введенням колхіцину).

цією;  $ID_0$  – інтегрована щільність фону (з клітин, що не мали флуоресцентного сигналу). CTCF використано як напівкількісну характеристику для оцінювання вмісту міченого білка в окремих нейронах;

– кількість імунопозитивних клітин в аналізованій зоні зрізу мозку (ділянка базального магноцелюлярного ядра) обраховували вручну у межах одного поля зору.

Опрацювання експериментальних даних здійснили з застосуванням програмного забезпечення Statistica (ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J) та Microsoft Excel 7.0 (Microsoft Corp., США). Для оцінювання характеру розподілу показників у вибірках використано критерій Шапіро–Вілкі. Перевірку статистичної значущості відмінностей груп дослідження виконано залежно від характеру розподілу даних: у разі нормального розподілу застосовували t-критерій Стюдента з поправкою Бонфероні; коли дані не відповідали нормальному розподілу, використовували непараметричний критерій Манна–Вітні (U-критерій).

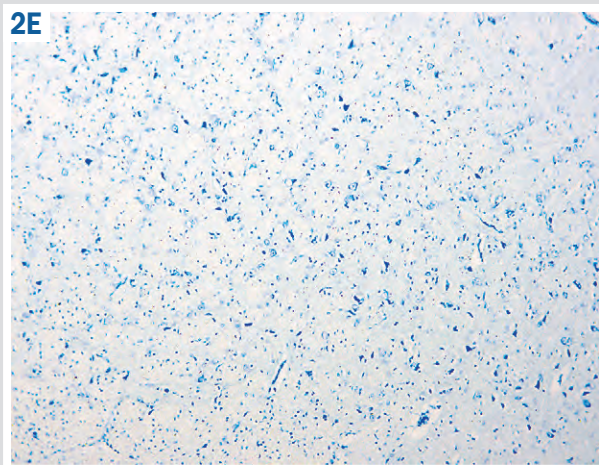
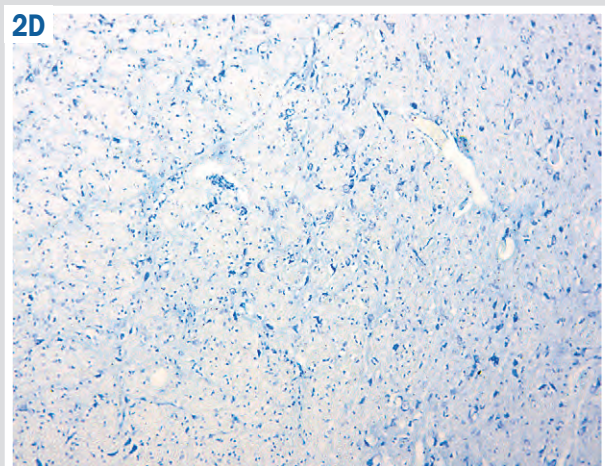
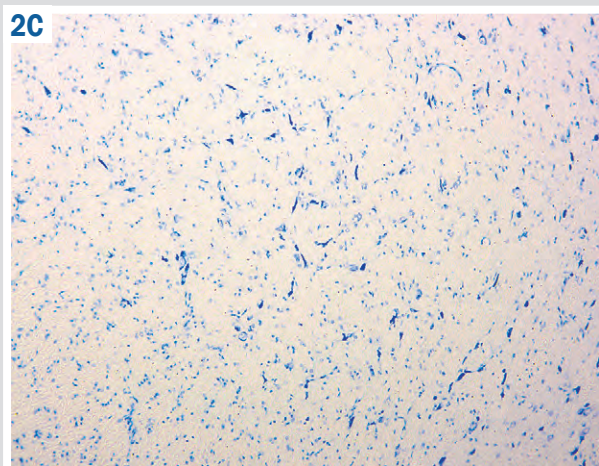
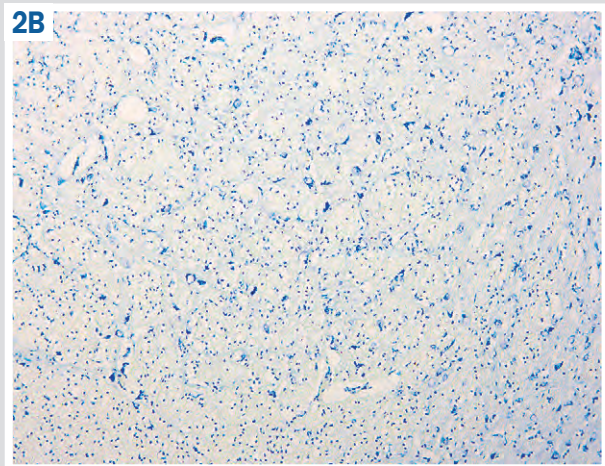
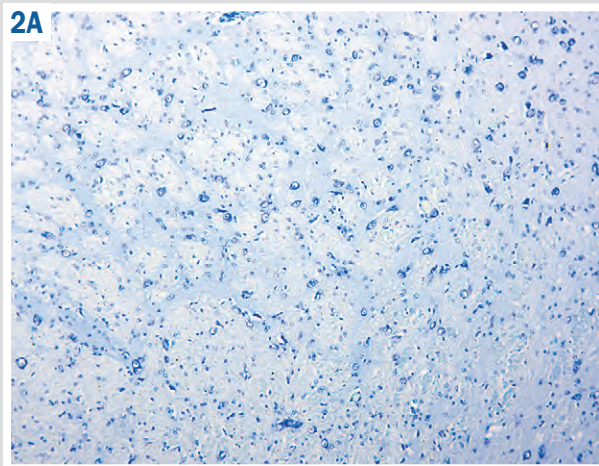
## Результати

Порівняння показника щільності нейронів та глії в структурі БМЯ у тварин з експериментальних груп із контрольними показало, що ІЦВ введення колхіцину (група 2) призвело до статистично значущої втрати нейронів на 53,6 % та збільшення кількості гліальних клітин на 28,4 %. У БМЯ тварин із груп ранньої корекції (3–5 групи) порівняно з контролем (група 1) статистично значущу різницю ні за показником щільності нейронів, ані щільності глії не зафіксовано. Водночас у тварин із груп 3–5 відносно щурів групи 2 щільність нейронів у БМЯ більша на 41,5 %, 46,0 % та 40,0 % відповідно на фоні вірогідно меншого показника щільності глії на 34,2 %, 27,4 % та 21,3 % відповідно (рис. 1, 2).

Імунофлуоресцентне дослідження білків p53 та appA5 у структурі БМЯ експериментальних щурів дало змогу виявити певні особливості їхньої експресії на фоні колхіцин-індукованої дегенерації, і при ранній корекції токсичного uszkodження нейронів.

Так, у структурі БМЯ експериментальних тварин під час аналізу показника CTCF p53<sup>+</sup>-клітин не зафіксовано вірогідних відмінностей груп. Разом із тим, показник appA5<sup>+</sup>-клітин найвищий у тварин групи 2 (з ІЦВ введенням колхіцину) та вірогідно перевищував відповідні параметри щурів групи 1 (хибнооперованих) – на 46,9 %; групи 3 (корекція цитиколіном) – на 45,4 %; груп 4 (корекція тіоцетамом) і 5 (корекція фактором теплового шоку-1, HSF-1) – на 12,1 %. Відповідно, між хибнооперованими тваринами та щурами з корекцією статистичної різниці за досліджуваним критерієм нейронів БМЯ не було, як і між групами щурів із різними патогенетичними підходами до корекції колхіцин-індукованої нейродегенерації (табл. 2).

У результаті оцінювання кількості імунопозитивних до p53 клітин у структурі БМЯ експериментальних тварин (групи 2–5) щодо хибнооперованих щурів (група 1) встановлено достовірно більшу їх кількість у групі 2 – в 2,5 раза, групі 3 – в 3,6 раза, групі 4 – в 2,4 раза, групі 5 – вчетверо. Разом із тим, показник кількості p53<sup>+</sup>-клітин у БМЯ щурів груп із корекцією цитиколіном (група 3) і рекомбінантним HSF-1 (група 5) вірогідно перевищував відповідний параметр тварин групи 2 (ІЦВ колхіцину без корекції) на 70 % і 60 % відповідно. У результаті порівняльного аналізу груп тварин із ранньою патогенетично обґрунтованою корекцією за досліджуваною характеристикою структури БМЯ встановлено: кількість p53<sup>+</sup>-клітин у групах 3 і 5 вірогідно перевищує таку групи 4 (корекція тіоцетамом) на 44 % та 40 % відповідно (табл. 3).



**Рис. 2.** Нейрони базального ганглія у щурів експериментальних груп (забарвлення на речовину Ніссля).

**A:** у щурів групи 1; **B:** у щурів групи 2; **C:** у щурів групи 3; **D:** у щурів групи 4; **E:** у щурів групи 5; scale bar 100  $\mu$ m.

**Таблиця 2.** Показники скоригованої загальної клітинної флуоресценції (СТCF) клітин, імунопозитивних до p53 та annA5, у БМЯ головного мозку щурів з експериментальних груп, Me [Q1; Q4]

Експериментальна група	p53* клітини, Од <sub>ф</sub>	annA5* клітини, Од <sub>ф</sub>
Група 1 (хибнооперовані тварини, n = 10)	4860,98 [3065,88; 7309,35]	2739,18 [1956,03; 3902,76]
Група 2 (тварини з ІЦВ колхідину, n = 10)	5212,23 [3134,24; 7777,14]	4024,89 [2694,63; 6374,05] <sup>1</sup>
Група 3 (тварини з ІЦВ колхідину + цитиколін, n = 10), 500 мг/кг	4582,47 [2793,97; 6247,30]	2768,34 [1852,42; 4411,24] <sup>2</sup>
Група 4 (тварини з ІЦВ колхідину + тіоцетам, n = 10), 250 мг/кг	4298,77 [2790,43; 6210,25]	3591,79 [1943,96; 4776,96] <sup>2</sup>
Група 5 (тварини з ІЦВ колхідину + HSF-1, n = 10), 200 мкл/кг	4147,42 [2985,06; 6146,23]	3589,46 [2276,44; 5034,63] <sup>2</sup>

1: вірогідні відмінності показників ( $p_u < 0,05$ ) щодо групи 1; 2: вірогідні відмінності показників ( $p_u < 0,05$ ) щодо групи 2.

Таблиця 3. Кількість клітин, імунопозитивних до p53 та appA5, у зрізі БМЯ головного мозку щурів з експериментальних груп, Ме [Q1; Q4]

Експериментальна група	p53 <sup>+</sup> клітини	appA5 <sup>+</sup> клітини
Група 1 (хибнооперовані тварини, n = 10)	4 [2; 5]	3,0 [2,5; 4,5]
Група 2 (тварини з ІЦВ колхіцину, n = 10)	10 [8; 14] <sup>1</sup>	6 [4; 13] <sup>1</sup>
Група 3 (тварини з ІЦВ колхіцину + цитиколін, n = 10), 500 мг/кг	17 [13; 22] <sup>1,2</sup>	13 [11; 19] <sup>1</sup>
Група 4 (тварини з ІЦВ колхіцину + тіоцетам, n = 10), 250 мг/кг	9,5 [8; 14] <sup>1,3</sup>	17,5 [11; 20] <sup>1,2</sup>
Група 5 (тварини з ІЦВ колхіцину + HSF-1, n = 10), 200 мкл/кг	16 [14; 19] <sup>1,2,4</sup>	13 [12; 14] <sup>1</sup>

1: вірогідні відмінності показників ( $p_U < 0,05$ ) щодо групи 1; 2: вірогідні відмінності показників ( $p_U < 0,05$ ) щодо групи 2; 3: вірогідні відмінності показників ( $p_U < 0,05$ ) щодо групи 3; 4: вірогідні відмінності показників ( $p_U < 0,05$ ) щодо групи 4.

Кількість імунопозитивних до appA5 клітин у структурі БМЯ щурів групи 1 вірогідно менша за таку у щурів групи 2 – вдвічі, груп 3 і 5 – в 4,3 раза, групи 4 – в 5,8 раза. Зазначимо, що серед груп із корекцією щодо групи 2 (ІЦВ колхіцину без корекції) достовірно відрізнялася за кількістю імунопозитивних клітин до appA5 у БМЯ тільки група 4 (перевищення показника майже втричі), де щури отримували корекцію тіоцетамом. Між експериментальними групами з корекцією за цим показником структури БМЯ статистично вірогідних відмінностей не було (табл. 3).

## Обговорення

У цьому дослідженні на основі показників світлової мікроскопії препаратів головного мозку, забарвлених за Нісслем, в експериментальних тварин встановлено позитивний вплив ранньої нейропротекції цитиколіном, тіоцетамом і HSF-1 на кількість нейронів БМЯ при інтрацеребровентрикулярному введенні колхіцину. У цьому контексті варто зауважити, що під впливом нейропротекторних препаратів, на відміну від групи 2, де ці засоби не застосовували, не зафіксовано зменшення кількості імунопозитивних до білків p53 та appA5 клітин БМЯ. Проте слід враховувати дві важливі властивості колхіцину як токсичного агента, зокрема дозозалежність і часовий характер дії. Цей аспект вивчали Y. Liang et al., які показали, що загибель нейронів стріатума у піддослідних мишей виявляли на третій день після ін'єкції колхіцину, і тривала вона протягом наступного тижня. На підставі отриманих даних дослідники припустили, що введення сублетальних доз колхіцину протягом перших днів призводить до клітинної смерті шляхом некрозу, а наступна дегенерація структури пов'язана з розвитком апоптозу, зумовленого вторинним пошкодженням на фоні нейрозапалення [15].

Отже, враховуючи наведені дані щодо вірогідно більшої кількості клітин БМЯ, імунопозитивних до білків p53 та appA5 у групах із корекцією порівняно з групою, тварини якої отримували лише ІЦВ колхіцину, на фоні достовірно більшої щільності нейронів у перших, слід інтерпретувати як свідчення того, що рання нейропротекція застосованими фармакологічними агентами запобігає масивній некротичній загибелі нейронів. При цьому зауважимо, що оскільки клітинна загибель шляхом апоптозу не супроводжується активацією запального процесу, пошкодження цілісності сусідніх нейронів, ексайтотоксичністю, то в такому контексті переспрямування пошкодженої клітини на апоптотичний, а не некротичний шлях загибелі є доволі перспективним планом нейропротекції [16].

Встановлено, що p53 та appA5 мають також цитопротекторну направленість дії. Так, p53 регулює експресію низки генів, активація яких призводить до репарації ДНК [17], а для appA5 встановлено здатність зменшувати поляризацію прозапальних мікрогліальних M1 клітин і можливість мобілізувати антиоксидантні системи нейронів (шлях Nrf2/НО-1) [18]. Тому, імовірно, рання нейропротекція може стимулювати і захисні ефекти білків, які дослідили, сприяючи в такий спосіб виживанню нейронів БМЯ в експерименті.

Окремо наголосимо, що не виявлено впливу колхіцину та нейропротекторних засобів на вміст p53 у кожній окремо взятій імунопозитивній клітині БМЯ експериментальних тварин. Водночас у групах 3–5 патерни кількості p53<sup>+</sup>-клітин у БМЯ відрізняються залежно від нейропротектора, який застосували. Так, порівняно з групою 2 кількість p53<sup>+</sup>-клітин у БМЯ вірогідно змінили лише цитиколін і HSF-1. Тобто, найімовірніше, у цих групах зафіксовано стандартний вплив p53-залежних механізмів регуляції клітинних процесів у великій кількості нейронів, що можливо лише за наявності достатньої кількості енергетичних ресурсів і нормалізації роботи мітохондрій, а також стабілізації p53, що має здатність до швидкої протеасомної деградації.

Усі названі ефекти описано для цитиколіну та HSF-1. Так, цитиколін сприяє покращенню роботи мітохондрій, запобігаючи втраті кардіоліпіну з їхньої внутрішньої мембрани, що підтримує в них нормальний транспорт електронів [19]. Крім того, важливими факторами виживання нейронів, що індукуються цитиколіном, є зменшення активності каспаз [20], стимуляція ангиогенезу [20], збільшення експресії нейротрофічного фактора мозку (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) [21]. Для HSF-1 визначено аналогічні ефекти, але виникають вони за іншими механізмами. Так, цей білок може спричинити зменшення енергодефіциту шляхом підвищення експресії лактатдегідрогенази та кінази піруватдегідрогенази, що сприяє збільшенню ефективності гліколізу [22,23]. HSF-1 стимулює ангиогенез завдяки тому, що збільшує експресію фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1), який є транскрипційним фактором для судинно-ендотеліального фактора росту (VEGF) [24,25]. Підтверджено здатність цього фактора інгібувати апоптоз через залежну від білків теплового шоку HSP70/HSP90 експресію про- та антиапоптотичних білків на користь останніх [11,25].

У БМЯ тварин із корекцією порівняно з групою з ІЦВ введенням колхіцину без корекції appA5<sup>+</sup>-клітини характеризувались вірогідно меншим показником інтенсивності флуоресценції (СТCF). За даними фахової літератури щодо ефектів застосованих препаратів, можна припустити певні механізми, що пояснювали би

3

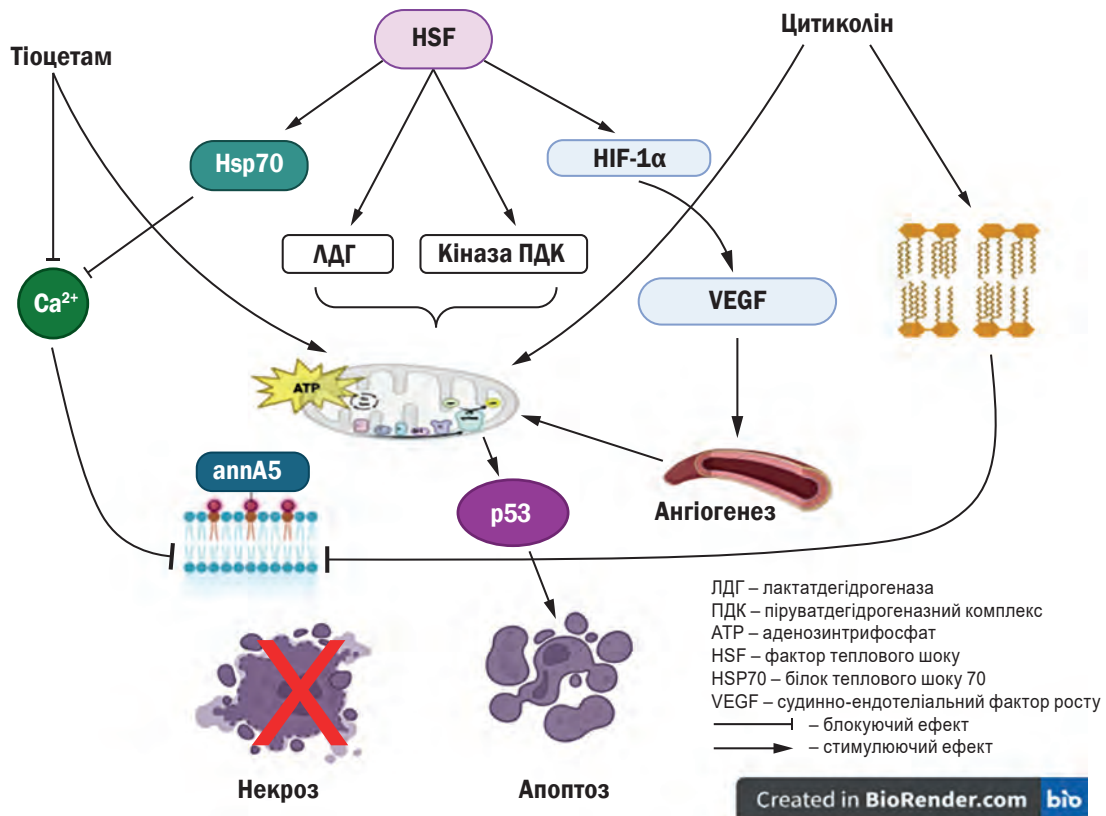


Рис. 3. Гіпотетичний механізм впливу застосованих нейропротективних засобів на експресію p53 та annA5 у клітинах БМЯ експериментальних щурів на фоні ІЦВ введення колхіцину.

встановлений факт. Так, відомо, що annA5 є  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальним білком, який приєднується до екстерналізованого фосфатидилсерину на мембрані клітини, що перебуває на ранній фазі апоптозу [26]. Тому важливими факторами для його експресії є стабільність клітинної мембрани та регуляція внутрішньоклітинного кальцію [27]. Так, показано, що цитиколін стабілізує клітинну мембрану, оскільки стимулює біосинтез фосфоліпідів і їх попередників, як-от фосфатидилхоліну, що є критичними для підтримки нормальної архітектури клітинної мембрани [28].

Тіоцетам, зокрема один із його активних компонентів пірацетам, може блокувати кальцієві канали N-типу [29]. Щодо HSF-1, то, можливо, його дія також пов'язана з внутрішньоклітинним кальцієм та реалізується через АТФ-залежні  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальні домени HSP70, або через встановлену можливість HSP70 впливати на активність потенціал-залежних  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Проте в цьому контексті ще бракує фундаментальних даних [30].

Відкритим залишається питання щодо достовірно більшої кількості annA5<sup>+</sup>-клітин у БМЯ тварин із групи корекції тіоцетамом щодо щурів з ІЦВ введенням колхіцину без корекції. На підставі результатів цього дослідження припускаємо, що раннє застосування цього нейропротектора при ІЦВ введенні колхіцину запобігає некротичній загибелі клітин БМЯ, «перемикаючи» її на апоптотичну (рис. 3).

Отже, на підставі даних, що отримали під час експериментального дослідження, та відомостей фахової літератури можна зробити кілька припущень, перевірка яких потребуватиме подальших досліджень:

- ІЦВ введення 15 мкг колхіцину супроводжується і некротичною, і апоптотичною загибеллю нейронів БМЯ із переважанням некрозу;

- рання корекція цитиколіном і фактором теплового шоку-1 (HSF-1) у клітинах БМЯ, можливо, супроводжується апоптозом, що активований переважно через внутрішній шлях (оскільки він більш залежний від p53), і p53-залежними механізмами клітинної репарації;

- рання корекція тіоцетамом у клітинах БМЯ, імовірно, супроводжується апоптозом, що активований здебільшого через зовнішній шлях, проте не виключено, що в окремих p53-позитивних клітинах відбуваються і репаративні процеси та внутрішній шлях апоптозу;

- важливим фактором є зменшення експресії annA5 в імунопозитивних клітинах БМЯ тварин, що отримували патогенетично обґрунтовану корекцію, щодо групи щурів без корекції.

## Висновки

1. У базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних тварин на 14 добу після інтраце-

ребровентрикулярної ін'єкції колхіцину порівняно з хібнооперованими тваринами встановлено зменшення щільності нейронів і збільшення щільності гліальних клітин. Водночас у досліджуваній структурі мозку щурів із груп раннього застосування цитиколіну, тіоцетама та рекомбінантного HSF-1 для корекції дії нейротоксину показники щільності нейронів та глії зафіксовано на рівні контрольних тварин.

2. Найбільший показник СТСФ анексин А5-позитивних клітин встановлено в базальному магноцелюлярному ядрі щурів з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину порівняно з хібнооперованими та тваринами із груп корекції (де не зафіксовано статистично вірогідних відмінностей за цим показником). СТСФ р53-позитивних клітин базального магноцелюлярного ядра в усіх експериментальних групах щурів не мав статистично значущих змін порівняно з контрольною групою та при порівнянні груп між собою.

3. Кількість р53- та анексин А5-позитивних клітин у базальному магноцелюлярному ядрі експериментальних тварин з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину вірогідно перевищує таку у хібнооперованих тварин. У щурів із груп корекції цей показник залежав від препарату, який вводили.

#### Фінансування

Дослідження фінансоване Національним фондом досліджень України в рамках «Конкурсу на одержання грантів Президента України для підтримки наукових досліджень і розробок молодих вчених-докторів філософії / кандидатів наук (до 35 років включно)», реєстраційний номер 2025.05/0007, тема: «Оптимізація підходів до патогенетичної корекції порушень аксонального транспорту при експериментальній нейроотравмі», № договору: 267.05/0007.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 02.03.2026

Після доопрацювання / Revised: 27.04.2026

Схвалено до друку / Accepted: 05.05.2026

#### Відомості про автора:

Данукало М. В., PhD, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.  
ORCID ID: 0000-0003-3413-945X

#### Information about the author:

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.



Максим Данукало (Maksym Danukalo)  
danukalo.m.v@zsmu.edu.ua

#### References

- Chen YS, Shu K, Kang HC. Deep brain stimulation in Alzheimer's disease: Targeting the nucleus basalis of Meynert. *J Alzheimers Dis*. 2021;80(1):53-70. doi: [10.3233/JAD-201141](https://doi.org/10.3233/JAD-201141)
- Tieman CT, Mufson EJ, Kanaan NM, Counts SE. Tau oligomer pathology in nucleus basalis neurons during the progression of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018;77(3):246-59. doi: [10.1093/jnen/nlx120](https://doi.org/10.1093/jnen/nlx120)
- Nazmuddin M, Philippens IH, van Laar T. Electrical stimulation of the nucleus basalis of Meynert: a systematic review of preclinical and clinical data. *Sci Rep*. 2021;11(1):11751. doi: [10.1038/s41598-021-91391-0](https://doi.org/10.1038/s41598-021-91391-0)
- 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](https://doi.org/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.
- Kaji AA, Torii M, Ishii S. Caspase-3 inhibition toward perinatal protection of the developing brain from environmental stress. *Dev Neurosci*. 2023;45(2):66-75. doi: [10.1159/000529125](https://doi.org/10.1159/000529125)
- Danukalo MV, Kolesnyk YM. The specificity of iNOS expression indicators in the basal magnocellular nucleus of rats under early pathogenetic correction in experimental neurodestruction. *Zaporozhye Medical Journal*. 2024;26(5):379-86. doi: [10.14739/2310-1210.2024.5.309732](https://doi.org/10.14739/2310-1210.2024.5.309732)
- Belenichev IF, Aliyeva OG, Kamyshnyi AM. Long-term results of pharmacological correction of iNOS, eNOS, nNOS mRNA expression disorders in rat hippocampus after chronic prenatal hypoxia. *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine*. 2019;3(2):6-15. doi: [10.29256/v.03.02.2019.escbm01-06](https://doi.org/10.29256/v.03.02.2019.escbm01-06)
- Demchenko AV, Belenichev IF. [Estimation of thioacetamide influence on glutathione link of thiol disulfide cerebral system in conditions of experimental chronic ischemia]. *Pathologia*. 2015;(2):101-5. Ukrainian. doi: [10.14739/2310-1237.2015.2.51154](https://doi.org/10.14739/2310-1237.2015.2.51154)
- Burlaka BS, Belenichev IF, Ryzhenko OI, Ryzhenko VP, Aliyeva OG, Makyeyeva LV, et al. The effect of intranasal administration of an IL-1b antagonist (RAIL) on the state of the nitroxydergent system of the brain during modeling of acute cerebrovascular accident. *Pharmacia*. 2021;68(3):665-70. doi: [10.3897/pharmacia.68.e71243](https://doi.org/10.3897/pharmacia.68.e71243)
- Belenichev IF, Aliyeva OG, Gunina LM, Bukhtiyarova NV. [Evaluation of the efficiency of the neuroprotective drugs after prenatal hypoxia]. *Fiziolohichniy zhurnal*. 2023;69(1):43-53. Ukrainian. doi: [10.15407/fz69.01.043](https://doi.org/10.15407/fz69.01.043)
- Danukalo MV, Kolesnyk YM, Hancheva OV. Contemporary comprehensive approaches to assessing the effectiveness of experimental model of neurodegenerative disorders with cognitive status changes. *Mod Med Technol*. 2023;(4):51-8. doi: [10.34287/MMT.4\(59\).2023.7](https://doi.org/10.34287/MMT.4(59).2023.7)
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th ed. London: Elsevier Academic Press; 2018.
- SCBT. Santa Cruz biotechnology [Internet]. SCBT. [cited 2026 Mar 14]. Available from: <https://www.scbt.com/resources/protocols/immunofluorescence-cell-staining>
- Liang Y, Li S, Wen C, Zhang Y, Guo Q, Wang H, et al. Intrastratial injection of colchicine induces striatonigral degeneration in mice. *J Neurochem*. 2008;106(4):1815-27. doi: [10.1111/j.1471-4159.2008.05526.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05526.x)
- Belenichev IF, Cherniy V, Nahorna E, Pavlov S, Cherniy T, Bukhtiyarova N, et al. [Neuroprotection and neuroplasticity]. Kyiv: Logos; 2015. Ukrainian.
- Almeida A, Sánchez-Morán I, Rodríguez C. Mitochondrial-nuclear p53 trafficking controls neuronal susceptibility in stroke. *IUBMB Life*. 2021;73(3):582-91. doi: [10.1002/iub.2453](https://doi.org/10.1002/iub.2453)
- Gao Y, Zhang H, Wang J, Li F, Li X, Li T, et al. Annexin A5 ameliorates traumatic brain injury-induced neuroinflammation and neuronal ferroptosis by modulating the NF-κB/HMGB1 and Nrf2/HO-1 pathways. *Int Immunopharmacol*. 2023;114:109619. doi: [10.1016/j.intimp.2022.109619](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109619)
- Gareri P, Castagna A, Cotroneo AM, Putignano S, De Sarro G, Bruni AC. The role of citicoline in cognitive impairment: pharmacological characteristics, possible advantages, and doubts for an old drug with new perspectives. *Clin Interv Aging*. 2015;10:1421-9. doi: [10.2147/CLIA.S87886](https://doi.org/10.2147/CLIA.S87886)
- Cavalu S, Saber S, Ramadan A, Elmorsy EA, Hamad RS, Abdel-Reheim MA, et al. Unveiling citicoline's mechanisms and clinical relevance in the treatment of neuroinflammatory disorders. *FASEB J*. 2024;38(17):e70030. doi: [10.1096/fj.202400823R](https://doi.org/10.1096/fj.202400823R)
- Anandan P, Rengarajan S, Venkatachalam S, Pattabi S, Jones S, Prabhuk K, et al. Neuroprotection by cerebrolysin and citicoline through the upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) expression in the affected neural cells: A preliminary clue obtained through an in vitro study. *Cureus*. 2024;16(2):e54665. doi: [10.7759/cureus.54665](https://doi.org/10.7759/cureus.54665)
- Xu J, Shi Q, Xu W, Zhou Q, Shi R, Ma Y, et al. Metabolic enzyme PDK3 forms a positive feedback loop with transcription factor HSF1 to drive chemoresistance. *Theranostics*. 2019;9(10):2999-3013. doi: [10.7150/thno.31301](https://doi.org/10.7150/thno.31301)
- He L, Lv S, Ma X, Jiang S, Zhou F, Zhang Y, et al. ErbB2 promotes breast cancer metastatic potential via HSF1/LDHA axis-mediated glycolysis. *Med Oncol*. 2022;39(4):45. doi: [10.1007/s12032-021-01641-4](https://doi.org/10.1007/s12032-021-01641-4)
- Du P, Xu L, Wang Y, Jiao T, Cheng J, Zhang C, et al. Astragaloside IV ameliorates pressure overload-induced heart failure by enhancing angiogenesis through HSF1/VEGF pathway. *Heliyon*. 2024;10(17):e36687. doi: [10.1016/j.heliyon.2024.e37019](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37019)

25. Fiser O, Muller P. Role of HSF1 in cell division, tumorigenesis and therapy: a literature review. *Cell Div.* 2025;20(1):1-15. doi: [10.1186/s13008-025-00153-1](https://doi.org/10.1186/s13008-025-00153-1)
26. Gerke V, Gavins FNE, Geisow M, Grewal T, Jaiswal JK, Nylandsted J, Rescher U. Annexins-a family of proteins with distinctive tastes for cell signaling and membrane dynamics. *Nat Commun.* 2024;15(1):1574. doi: [10.1038/s41467-024-45954-0](https://doi.org/10.1038/s41467-024-45954-0)
27. Su G, Zhang D, Li T, Pei T, Yang J, Tu S, et al. Annexin A5 derived from matrix vesicles protects against osteoporotic bone loss via mineralization. *Bone Res.* 2023;11(1):60. doi: [10.1038/s41413-023-00290-9](https://doi.org/10.1038/s41413-023-00290-9)
28. Mastropasqua L, Agnifili L, Ferrante C, Sacchi M, Figus M, Rossi G, et al. Citicoline/coenzyme Q10/vitamin B3 fixed combination exerts synergistic protective effects on neuronal cells exposed to oxidative stress. *Nutrients.* 2022;14(14):2963. doi: [10.3390/nu14142963](https://doi.org/10.3390/nu14142963)
29. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Eliwa D, Alexiou A, Papadakis M, Alruwaili M, et al. The mechanistic role of piracetam in the management of vascular dementia. *Behav Brain Res.* 2025;2025:115551. doi: [10.1016/j.bbr.2025.115551](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2025.115551)
30. de Oliveira AA, Priviero F, Tostes RC, Webb RC, Nunes KP. Dissecting the interaction between HSP70 and vascular contraction: role of Ca<sup>2+</sup> handling mechanisms. *Sci Rep.* 2021;11(1):1420. doi: [10.1038/s41598-021-80966-6](https://doi.org/10.1038/s41598-021-80966-6)