

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

Ганжа Віта Вікторівна

УДК 57.085.23

**ВПЛИВ НЕЙРОПРОТЕКТОРНИХ ТА УШКОДЖУЮЧИХ
ФАКТОРІВ НА КУЛЬТИВОВАНІ НЕЙРОНИ ГІПОКАМПУ
ЩУРІВ ПРИ ДІЇ БЕТА-АМІЛОЇДУ**

03.00.13 – Фізіологія людини та тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біофізики іонних каналів Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Лук'янець Олена Олександрівна
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу біофізики іонних каналів

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Макарчук Микола Юхимович
ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ ім. Тараса
Шевченка, завідувач кафедри фізіології та анатомії.

доктор біологічних наук , професор
Берченко Ольга Григорівна,
«Інститут неврології, психіатрії та наркології Національної
академії медичних наук України», завідувач лабораторії
нейрофізіології, імунології та біохімії.

Захист відбудеться __«14» вересня__2021 року о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:
http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий «10» серпня 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Хвороба Альцгеймера (ХА) є однією з найпоширеніших нейродегенеративних патологій, яка виникає у значній частці населення Землі і при цьому на жаль, не піддається ефективному лікуванню (Marchesi, 2011). В даний час на ХА страждає понад 26,6 мільйонів людей у всьому світі, і це число істотно зростає щороку. За прогнозами фахівців, очікується, що до 2050 р. кількість хворих на ХА зросте вчетверо і становитиме приблизно 106 мільйонів, тобто одна з 85 осіб у світі буде жити з цією хворобою. (Prasansuklab & Tewin, 2013). Зі збільшенням тривалості життя в теперішній час частота захворювань на ХА стає вищою. З цієї причини як фундаментальні, так і клінічні дослідження, що охоплюють усі аспекти, пов'язані з цією хворобою, є надзвичайно актуальними, і такі роботи в останні десятиліття стали значно інтенсивнішими. (Drachman, 2006).

Характерними ознаками ХА є наявність у структурах мозку сенильних бляшок, які являють собою міжклітинні агрегати білка А β -амілоїду (А β), а також внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків, що утворюються з гіперфосфорильованого тау-білка, пов'язаного з мікротрубочками. Розвиток цих структур зумовлює значну втрату нейронів у структурах головного мозку, особливо в області гіпокампу (Morris et al., 2014). Відомо, що гіпокамп відповідає за здатність до навчання, формування короткотривалої пам'яті та низку інших процесів. В ході розвитку ХА до 80% нейронів в гіпокампі гине і людині стає все складніше засвоювати нову інформацію та запам'ятовувати події (Deture & Dickson, 2019; Perl, 2010).

За останні 25 років було проведено багато досліджень і отримано велику кількість даних стосовно фізико-хімічної та біологічної активності пептиду А β , що є головним компонентом А β -амілоїдних відкладень у мозку хворих на ХА (Soscia et al., 2010). Бета-амілоїд утворюється з більш довгої молекули білка-попередника амілоїду (amyloid precursor protein – APP), який складається з 695 амінокислотних залишків. APP представляє собою інтегральний мембранний глікопротеїн, що зустрічається в різних тканинах організму, він істотно сконцентрований у синапсах нейронів (Kang et al., 1987). Формується А β -амілоїд при укороченні первинного ланцюга APP спеціальними ферментами мембрани β -секретазами. Спочатку формується фрагмент С99, який далі укорочується з утворенням А β -амілоїду. Мутаційні зміни APP та субодиниць γ -секретазного комплексу є найбільш поширеною причиною розвитку спадкової ХА (Bhadbhade & Cheng, 2012).

А β складається з 39–42 амінокислотних залишків. Дві основні його форми, А β -40 та А β -42, розрізняються лише двома залишками, але демонструють відмінні біофізичні, біологічні та клінічні властивості. А β ₁₋₄₂ є більш нейротоксичним; він інтенсивно накопичується у вигляді вищезгаданих бляшок у гіпокампі та судинах головного мозку, що і призводить до ініціації ХА (Hillen, 2019).

Було виявлено, що А β -амілоїд, присутній у надлишкових кількостях, може проявляти в мозку нейротоксичні властивості та призводити до ряду порушень: продукування великої кількості вільних радикалів, збільшення кількості активних форм кисню, призводити до пошкодження дендритів нервових клітин, індукувати апоптоз та некроз нейронів (Marchesi, 2011). Експериментальними дослідженнями було встановлено, що А β -амілоїд може порушувати кальцієвий гомеостаз нейронів через аномальну активацію кальцієвих каналів плазматичної мембрани. Це у свою чергу призводить до пошкодження мітохондрій, ендоплазматичного ретикулуму, розвитку вільнорадикального окислення нейронних мембран (Korol' et al., 2008).

Отже, докладніші дослідження зміни життєздатності нервових клітин, кальцієвого гомеостазу та функціонування внутрішньоклітинних кальційрегулюючих структур нейронів ЦНС при впливі амілоїду являють безсумнівний науковий інтерес та можуть розширити розуміння молекулярних механізмів виникнення та розвитку ХА, а також допомогти успішному пошуку фармакологічних засобів для лікування та можливого запобігання цієї патології. Для зниження рівня та впливу А β -амілоїду ведеться пошук препаратів, які перешкоджають його утворенню в мозку або запобігають процесам, які запускаються при агрегації цього білка. Нині існуючі методи лікування ХА лише полегшують її симптоми, але не перешкоджають прогресуванню захворювання. Тому дослідження в цій області є дуже актуальними. В нашій роботі ми вивчали вплив А β та ряду нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на життєздатність нейронів гіпокампу для визначення можливого механізму ушкоджуючої дії А β .

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана згідно плану науково-дослідної тематики відділу біофізики іонних каналів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (номер державної реєстрації 0118U007344) та інших програм, що виконуються відділом (номер державної реєстрації 0116U004470 та 0120U001281).

Мета дослідження полягала у з'ясуванні впливів деяких нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на нейрони гіпокампу щурів при впливі А β_{1-42} для визначення можливого механізму дії цього агенту.

Завдання дослідження

1. Відтворити токсичну дію А β_{1-42} амілоїду на нейронах культури гіпокампу.
2. Визначити вплив А β_{1-42} -амілоїду на внутрішньоклітинну концентрацію Ca²⁺ в нейронах культури гіпокампу.
3. Визначити впливи А β_{1-42} -амілоїду на життєздатність нейронів культури гіпокампу та рівень внутрішньоклітинного Ca²⁺ в умовах моделювання гіперкальціємії.

4. Охарактеризувати вплив блокатору мітохондріальної пори циклосприну А на життєздатність нейронів гіпокампу при дії $A\beta_{1-42}$ -амілоїду.
5. Визначити вплив агоністу НМДА-рецепторів на життєздатність нейронів культури при дії бета-амілоїду. $A\beta_{1-42}$
6. Визначити вплив блокатору НМДА-рецепторів мемантину на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} в згаданих нейронах.
7. З'ясувати характеристики впливу наночасток оксиду церію на життєздатність нейронів культури гіпокампу щурів в умовах дії бета-амілоїду $A\beta_{1-42}$.

Об'єкт дослідження – внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію в нейронах культури гіпокампу щурів в умовах їх культивування з бета амілоїдом ($A\beta_{1-42}$).

Предмет дослідження – зміни життєздатності та внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в нейронах культури гіпокампу щурів під впливом бета-амілоїду $A\beta_{1-42}$ і деяких нейропротекторних та ушкоджуючих факторів.

Методи досліджень. Приготування та підтримання первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампу щурів, подвійне забарвлення нейронів, конфокальна мікроскопія з отриманням флуоресцентних зображень, вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію за допомогою флуоресцентної мікроскопії та з використанням мембранопроникної форми флуоресцентного барвника Fura-2/AM, статистична обробка числових результатів досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів

У роботі вперше порівняно впливи деяких нейропротекторних та ушкоджуючих факторів з різними механізмами дії на життєздатність нейронів гіпокампу. Показано негативний вплив наявності в середовищі білка $A\beta_{1-42}$ -амілоїду, при культивуванні нейронів тривалістю 24 години, на життєздатність нейронів культури гіпокампу. За допомогою флуоресцентної мікроскопії встановлено, що $A\beta_{1-42}$ -амілоїд викликає підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} в нейронах культури. Збільшується як вхід Ca^{2+} так і його перерозподіл, при збільшенні вмісту Ca^{2+} у ендоплазматичному ретикулумі. В результаті, підвищується базальний рівень Ca^{2+} , що негативно впливає на життєздатність нейронів. За допомогою конфокальної мікроскопії було вперше досліджено вплив мемантину, циклосприну А, а також наночастинок діоксиду церію на життєздатність нейронів культури гіпокампу, що культивувалися з $A\beta_{1-42}$ -амілоїдом, з можливістю встановлення їх нейропротекторних властивостей. Досліджено захисні властивості неконкурентного низькоафінного антагоністу НМДА – рецепторів мемантину на життєздатність нейронів культури гіпокампу щурів

при впливі $A\beta_{1-42}$ -амілоїду. Мемантин виявляв захисний ефект при експериментальних умовах ексайтотоксичності, викликаній додаванням НМДА в середовище культивування. Блокування відкриття мітохондріальної пори неспецифічної проникності циклоспорином А, сприяло зменшенню кількості некротичних нейронів гіпокампу при токсичній дії $A\beta_{1-42}$ -амілоїду. У ході аналізу даних було вперше встановлено, що введення наночастинок діоксиду церію (НДЦ) значно знижує кількість загинувших нейронів при дії $A\beta_{1-42}$ -амілоїду, тому використання НДЦ для біомедичних застосувань є дуже перспективним. Отримані дані можуть бути основою для розробки нових ефективних фармакологічних підходів для зниження рівня та впливу $A\beta$ -амілоїду при хворобі Альцгеймера.

Теоретичне та практичне значення роботи

Результати, одержані в нашій роботі на нейронах культури гіпокампу щурів, мають як теоретичне, так і практичне значення. Детальне дослідження механізмів, які лежать в основі порушень при інкубації нейронів з білком $A\beta$ -амілоїдом, а також з низкою нейропротекторних та ушкоджуючих сполук, може значно розширити розуміння механізмів впливу $A\beta$ -амілоїду та причин, які призводять виникнення хвороби Альцгеймера. Отримані в роботі експериментальні дані можуть бути основою для розробки нових ефективних фармакологічних підходів для корекції та лікування даної патології.

Особистий внесок здобувача

Здобувач особисто виконала пошук інформації та аналіз наукової літератури за темою дослідження, освоїла приготування первинної культури дисоційованих клітин гіпокампу, виконала експериментальні дослідження, обробку та теоретичне обґрунтування результатів, підготувала матеріали до публікації. Частина експериментальних досліджень була проведена спільно зі співробітниками відділу біофізики іонних каналів Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, які є співавторами опублікованих робіт. Формування мети дослідження, планування робіт, обговорення результатів експериментів та формулювання висновків досліджень проводилося за участі наукового керівника д.б.н., проф., Лук'янець О.О. Здобувачем було здійснено написання всіх розділів дисертації та підготовка тексту до друку.

Апробація результатів дисертації

Дисертаційну роботу апробовано на таких конференціях: всеукраїнська науково-практична конференція, перші читання присвячені Д.О.Альперіну: «Актуальні питання патологічної фізіології». – Харків, 26 березня, 2021; 5th НВР Student Conference on Interdisciplinary Brain Research, 1-4 February, 2021; ХХ-му з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю, 27–30 трав. 2019, Київ, Україна; VIII з'їзді Українського біофізичного товариства, 2019, Київ, Україна; Міжн. наук. форум Neuroscience, липень 5-9, 2014, Мілан, Італія; VI Конгресі Українського товариства нейронаук, Київ, 4-8 червня, 2014, Київ, Україна; The Queen

Elizabeth II Conference Centre, Broad Sanctuary, London SW1P 3EE, UK, 30 June - 2 July 2014; XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка, 2014; XI Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» 6–8 квіт. 2013, Київ, Україна; Тези III наукової конференції молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму», 2013, Київ, Україна; IV наукової конференції: «Біологічно активні речовини та матеріали: фундаментальні та прикладні питання отримання та застосування», 2013, Новий Світ, Україна; II Наукової конференції молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму», 2012, Київ, Україна; II International Symposium “Molecular Mechanisms of Synaptic transmission regulation” in memory of Prof. Vladimir Skok (6-9 October 2012 p., Kyiv, Ukraine).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць, з них 5 статей у наукових фахових виданнях України, 13 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається із вступу, чотирьох розділів, висновків, переліку використаної літератури та списку опублікованих за темою дисертації праць. Обсяг дисертації становить **143** с. Дисертаційна робота ілюстрована **25** рисунками. Список використаної літератури налічує **220** джерел.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1 “Огляд літератури” присвячений висвітленню відомих аспектів патогенезу хвороби Альцгеймера. Особливу увагу сфокусовано на клітинних змінах при даній хворобі, зокрема на утворенні білка А β -амілоїду і його токсичних властивостях. Розглянуто особливості функціонування кальцій регулюючих структур, зокрема мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму.

У розділі «Матеріали та методи дослідження» описані методичні підходи, що застосовувалися при виконанні роботи. В експериментах використовували щурів лінії Вістар, яких утримували в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Всі експериментальні процедури було виконано згідно з міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин: Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV. Проведення всіх експериментальних досліджень було узгоджено з Комітетом з біоетики інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, протокол № 1/14 від 06.02.2014 р.

Приготування первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампу шурів. Щоб одержати клітини для культивування, з дотриманням вимог біоетики, новонароджених шурів декапітували. Потім головний мозок вміщували в середовище Ігла (“Sigma”, США) з додаванням 20 мМ HEPES, 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну та 25 мкг/мл стрептоміцину сульфату. За допомогою скальпелю виділяли гіпокамп і нарізали його на частки 1-2 мм завтовшки та на 20 хв переносили у теплий (36 °С) ферментативний розчин, який містив 0.05 % пронази Е (“Serva”, США). Далі шматочки гіпокампу промивали декілька разів холодним поживним середовищем до складу якого входили: мінімальне середовище Ігла, кінська сироватка (10%), інсулін (10 мкг/мл), бікарбонатний буфер (2,3 мг/мл), натрієва сіль бензилпеніциліну (50 од/мл) і сульфат стрептоміцину (50 мкг/мл). У камері Горяєва підраховували кількість клітин на одиницю об’єму в первинній суспензії. Для отримання необхідної кількості клітин у суспензії (густина клітин при посадці 30 тис. на 1 см²) додавали культуральне середовище. Потім 200 мкл суспензії клітин наносили на покривні скельця розміром 12x12 мм, що були попередньо оброблені сумішшю полілізину (0,05 мг/мл) та ламініну (0,005 мг/мл). Після 2 год інкубації при 36 °С в атмосфері, збагаченій CO₂ до 5 %, в кожену чашку Петрі додавали по 2 мл поживного середовища. Нейрони культивували в інкубаторі два тижні при 36 °С в атмосфері, збагаченій CO₂ до 5 %. З метою пригнічення проліферації гліальних клітин через 3 доби *in vitro* культуру обробляли фторурацилом (1 мкМ/л), (Sigma-Aldrich, США) протягом 24 год.; після цього проводили повну заміну поживного середовища. Нейрони брали до експерименту на 12–13 день культивування.

Обробка клітин культури гіпокампу Аβ-амілоїдом. У наших експериментах клітинну *in vitro* модель ХА одержували внаслідок 24-годинної інкубації нейронів культури гіпокампу з Аβ₁₋₄₂-амілоїдом (Sigma-Aldrich, США) у кінцевій концентрації 2 мкМ. Для отримання концентрованого розчину Аβ₁₋₄₂-амілоїду (“Sigma”, США) розчиняли в DMSO і зберігали при температурі –20 °С. Кінцева концентрація DMSO не перевищувала 0.5 %.

Забарвлювання нейронів гіпокампу. В експериментах використовували метод подвійного забарвлювання нейронів культури гіпокампу за допомогою барвників Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США, індикатор ДНК, що знаходиться в ядрах клітин), та пропідіуму йодиду (ПЙ, Sigma-Aldrich, США, індикатор некротичних клітин). Контрольні, а також оброблені реагентами нейрони переносили на 10 хв у розчин ПЙ з кінцевою концентрацією 2 мкг/мл. Потім клітини фіксували, помістивши на 20 хв у 4 % розчин параформальдегіду. Згодом нейрони поміщали на 20 хв у розчин Hoechst 33258 (кінцева концентрація 1 мкг/мл). Після кожного етапу клітини двічі промивали у 2 мл фосфатного буферу. Усі маніпуляції здійснювали при кімнатній температурі. Після забарвлювання покривні скельця з клітинами

фіксували на предметному склі з використанням розчину Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc., США). Зафіксовані препарати аналізували, використовуючи, конфокальний мікроскоп.

Встановлення стану клітин. Кількість живих клітин і клітин з проявами апоптозу або некрозу оцінювали за допомогою подвійного забарвлювання Hoechst 33258 і ПЙ. Перший із зазначених барвників проникає через неушкоджені мембрани клітин і забарвлює ядерний хроматин, забезпечуючи таким чином можливість виявлення апоптотично змінених клітин, хроматин яких конденсується. В живих клітинах хроматин розподілений більш рівномірно по всьому об'єму ядра, і Hoechst 33258 в них слабо флуоресцює синьо-блакитним світлом. В апоптотично змінених клітинах інтенсивність флуоресценції Hoechst 33342 в 3–4 рази вище, ніж в нормальних клітинах (яскраве блакитне світіння, що свідчить про конденсацію хроматину та фрагментацію ядер; це відбувається при індукції апоптозу). ПЙ не здатний проникати через інтактну плазматичну мембрану і забарвлює тільки ядра клітин з істотно пошкодженою плазматичною мембраною, тобто клітини, в яких відбулась некротична трансформація (червона флуоресценція).

Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія. Для отримання флуоресцентних зображень та підрахунку нейронів у експериментах використовували конфокальний лазерний скануючий мікроскоп FV1000-VX61WI та програмне забезпечення FluoView «Olympus» (Японія) або Image J (National Institutes of Health, США). Довжина хвиль збуджуючого лазерного випромінювання становила 352/405 нм при використанні Hoechst 33258 та 543 нм при використанні ПЙ відповідно.

Підрахунок нейронів проводили в п'яти просторово віддалених ділянках кожного препарату. Нейрони відрізняли від гліальних клітин за допомогою фазового контрасту. Обсяг вибірок становив від 100 до 300 клітин; в цих межах підраховували кількості живих, апоптотичних і некротизованих одиниць та розраховували нормовані значення відповідних показників.

Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Для визначення концентрації кальцію в нейронах культури гіпокампу використовували мембранопроникну форму барвника Fura-2/AM.

Культуру нейронів перед експериментом забарвлювали в розчині барвника Fura-2/AM (5мкМ) протягом 30 хв. Потім скельця з нейронами відмивали та поміщали в експериментальну камеру. В цю камеру встановлювали платинові електроди, для здійснення стимуляції нейронів електричним полем; вона мала систему протоку розчинів. З використанням цифрової відеокамери реєстрували зміни рівня інтенсивності флуоресценції барвника Fura-2/AM в сомі нейронів при збудженні світлом з довжиною хвилі 340 нм та 380 нм. За допомогою комп'ютерних програм XCELL (Olympus Software, Японія) та IDL (Exelis, США) проводили подальший аналіз даних та

обраховували співвідношення інтенсивності флуоресценції вказаних довжинах хвиль ($R = F_{340}/F_{380}$) за протоколом Shkryl, 2020 при відніманні фонового рівня розрахованого зовні клітини. Динамічні зміни цього показника дозволяють оцінити зміни рівня вільного кальцію в цитозолі нейронів. У всіх нейронах культури гіпокаму вимірювали рівень вільного кальцію в нормальних умовах, а також під час стимуляції клітин різними чинниками. Спочатку здійснювали трьохразову стимуляцію електричним полем та аплікацію гіперкалієвого розчину (50 мМ) тривалістю 5 с. Після відновлення рівня кальцію до базового рівня проводили аплікацію кофеїну (10 мМ; 5 с.) для виявлення вмісту кальцію в ендоплазматичному ретикуліуму.

Стимуляція клітин електричним полем (Jacobs & Meyer, 1997) здійснювалася за допомогою двох електродів що були встановлені на відстані 12 мм один від одного; подавали пачки струмів тривалістю 1 с. (15 поштовхів струму тривалістю в 1 мс та напругою 30 В і частотою 15 Гц), що контролювалося за допомогою комп'ютера.

Склад розчинів. Для кальційметрії використовували наступні розчини. Базовий розчин, який використовували під час усіх експериментальних процедур, містив (мМ): NaCl – 140, KCl – 2, MgCl₂ – 2, CaCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкозу – 10; рН доводили до значення 7.35 за допомогою NaOH. Даний розчин використовували в якості перфузійного розчину в експериментальній камері, а також для прикладання досліджуваних речовин.

Гіперкалієвий розчин містив, (мМ): NaCl – 82, KCl – 50, MgCl₂ – 2, CaCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкозу – 10; рН доводили до значення 7.35 за допомогою NaOH.

Поживне середовище для культивування нейронів гіпокампі містило наступні компоненти: 90% мінімального середовища Ігла (MEM, “SIGMA”, США), бікарбонатний буфер (2.2 г/л NaHCO₃), 10% кінської сироватки (“GIBCO”, США), 10 мкг/мл інсуліну та антибіотики: натрієва сіль бензилпеніциліну-50 од/мл, та стрептоміцину сульфат (50 мкг/мл).

Статистичний аналіз. Отримані числові результати обробляли методами варіаційної статистики за допомогою програми Origin 7.0 («Microcall Inc.», США). Числові дані наведені нижче у вигляді середніх \pm похибка середнього. Результати характеризувалися нормальним розподілом, міжгрупове порівняння даних виконували з використанням дисперсійного аналізу ANOVA. Якщо міжгрупові відмінності були знайдені, застосовували критерій Tukey та t-тест Стьюдента. Міжгрупові відмінності вважали статистично значимими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження впливу $A\beta_{1-42}$ -амілоїду на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію та його вміст в ендоплазматичному ретикулумі культивованих нейронів гіпокампу.

Метою даних експериментів було вивчення механізмів функціонування кальційрегулюючих структур, зокрема ендоплазматичного ретикулуму, після інкубації клітин культури гіпокампу з $A\beta_{1-42}$ -амілоїдом. У нейронах здійснювали вимірювання рівня вільного кальцію, як значення співвідношень довжини хвиль F_{340} / F_{380} в нормальних умовах: спочатку здійснювали трьохразову стимуляцію електричним полем та аплікацію гіперкалієвого розчину (50 мМ) протягом 5 секунд. Після відновлення рівня кальцію до базового рівня використовували кофеїн (10 мМ; 5с.), для виявлення вмісту кальцію в ендоплазматичному ретикулумі.

Зміни внутрішньоклітинного рівня кальцію, що відбувались внаслідок цих процедур, показано на **Рис. 1** в контролі (частина **А**) та в культивованих клітинах гіпокампу інкубованих 24 год в культуральному середовищі з 2 мкМ амілоїду $A\beta_{1-42}$ (частина **Б**).

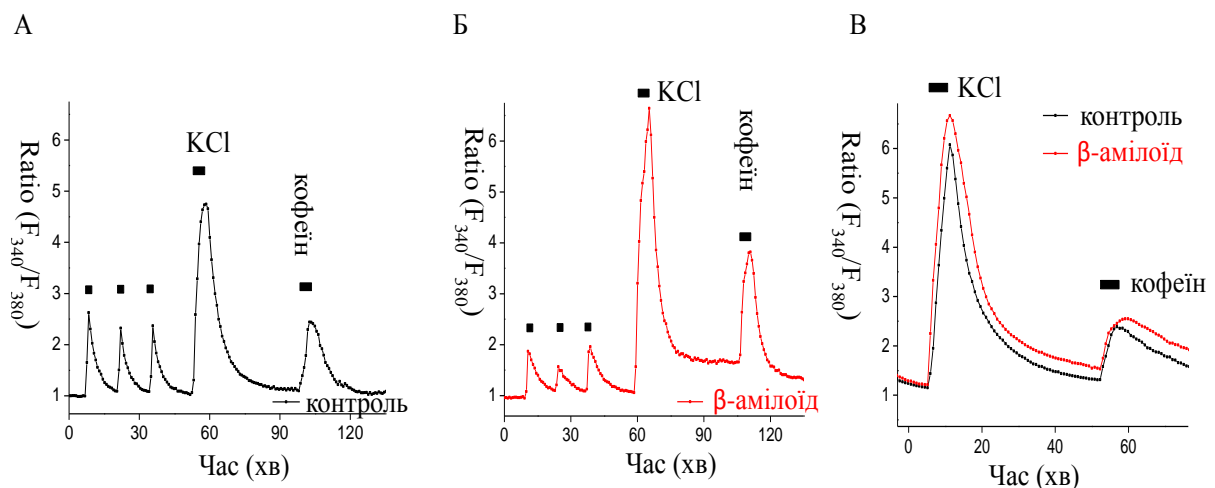


Рис.1. Кальцієві транзйенти в культивованих клітинах гіпокампу, викликані деполяризацією плазматичної мембрани за допомогою аплікації гіперкалієвого розчину в контролі та при дії амілоїду $A\beta_{1-42}$ (β -амілоїд). Дані флуоресцентної мікроскопії з використанням Fura-2/AM представлені як співвідношення інтенсивностей флуоресценції при довжині хвиль 340 і 380 нм

А та Б - вибіркові реєстрації змін рівня співвідношення F_{340} / F_{380} внаслідок трьохразової стимуляції електричним полем (чорні квадрати), аплікації розчину з 50 мМ KCl 5 сек.(KCl) та аплікації розчину з 10 мМ протягом 5 с кофеїну (кофеїн). Частина В - середнє значення для клітин у відповідних умовах.

Згідно з **Рис.1**, рівень вільного кальцію при співвідношенні довжини хвиль F_{340} / F_{380} в контрольних умовах складав $0,98 \pm 0,03$ в.од. (відносних одиниць) ($n=45$), був збільшений на 12% у клітинах інкубованих з $A\beta_{1-42}$ ($1,09 \pm 0,03$; $n=38$). Амплітуда другого кальцієвого транзйенту, викликаного стимуляцією електричним полем, складала $2,12 \pm 0,09$ – ($n=46$) та $2,36 \pm 0,12$ в.од. ($n=38$; збільшення на 11%) що до контролю та при інкубації з $A\beta_{1-42}$, відповідно. Амплітуда транзйентів, викликаних аплікацією деполяризуючого розчину, тривалістю 5 с, була збільшена на 14%, з $5,68 \pm 0,25$ ($n=46$) до $6,46 \pm 0,25$ ($n=38$) в умовах культивування з $A\beta$ -амілоїдом. Також пік калієвого сигналу на аплікацію 10 мМ кофеїну збільшувався на 13% в нейронах культивованих з $A\beta$ -амілоїдом з $2,36 \pm 0,11$ ($n=39$) до $2,67 \pm 0,11$ ($n=28$), порівняно з контролем, це свідчить про збільшення вмісту Ca^{2+} в ендоплазматичному ретикулумі в умовах впливу $A\beta$ -амілоїду.

Для зменшення похибки вимірювань, спочатку обчислювалось значення відповідного параметру для кожного дня запису, а отримане середнє значення порівнювалось з таким у контролі та при дії $A\beta$ -амілоїду для кожного дня експерименту. Середнє значення базального рівня дорівнювало $1,01 \pm 0,03$ та $1,08 \pm 0,04$ ($N=10$, $P<0.05$) в контролі та при інкубації з $A\beta$ -амілоїдом відповідно. Амплітуда кальцієвого транзйенту при аплікації деполяризуючого калієвого розчину складала $4,16 \pm 0,29$ в контролі та $4,720 \pm 0,322$ у клітин, що інкубувались з $A\beta$ -амілоїдом ($N=10$, $P<0.05$). Пікове значення Ca^{2+} сигналу на 5 сек. аплікацію кофеїну дорівнювало $1,84 \pm 0,21$ та $1,99 \pm 0,22$ ($N=7$, $P<0.05$) в контролі та при впливі $A\beta$ -амілоїду відповідно.

Ці дані показують, що $A\beta_{1-42}$ суттєво може впливати на мембранно-залежні канали, збільшуючи надходження кальцію в клітину і, отже, відбувається більше заповнення депо ендоплазматичного ретикулуму та вивільнення з нього кальцію в цитоплазму під час дії агоніста RyR .

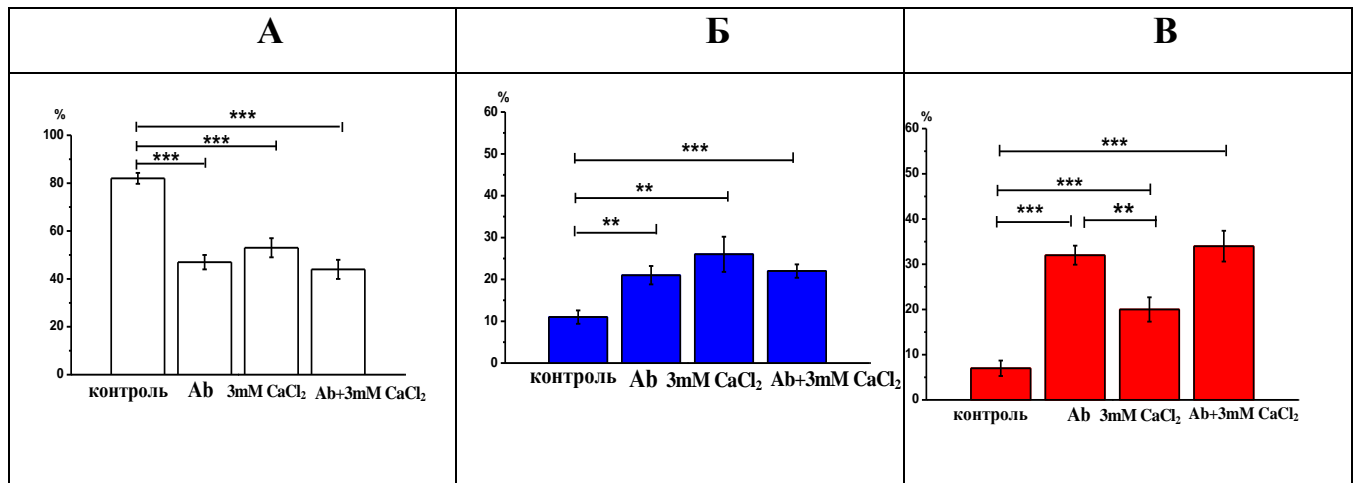
Впливи $A\beta$ -амілоїду та гіперкальцієвого середовища (моделювання гіперкальціємії *in vitro*) на нейрони культури гіпокампу щурів

В нашій роботі ми провели дослідження впливу зміни концентрації кальцію в умовах моделювання гіперкальціємії, як прикладу порушення кальцієвого гомеостазу, на життєздатність клітин культури гіпокампу при одночасній дії бета-амілоїду. Накопичення останнього є основою гіпотези «амілоїдного каскаду» щодо патогенезу ХА.

У контрольних зразках культури клітин гіпокампу щурів переважна більшість клітин (в середньому $82,4 \pm 2,39$ %), не проявляли будь-яких ознак патологічних змін та оцінювалась, як живі. Група клітин з ознаками апоптозу складала $10,7 \pm 1,66$ %. Нейрони, ядра яких в контрольних умовах забарвлювались ПЙ (свідчення їх некротичного переродження), склали $6,9 \pm 1,76$ % в середньому по групі (**Рис.2**).

Після інкубації нейронів культури гіпокампу в середовищі з підвищеним вмістом $CaCl_2$ (3 мМ, 24 год.; моделювання гіперкальціємії) кількість живих клітин становила лише приблизно половину дослідженої групи. Нейрони з апоптотичними змінами в даних умовах спостерігалися у

$26,2 \pm 4,2 \%$. Група клітин з ознаками некрозу була більш численнішою, ніж в контрольних зразках (**Рис. 2**), приблизно на 15 % ($P < 0.001$), у середньому їх кількість становила $20,3 \pm 2,79 \%$



*Рис. 2. Середні значення нормованих кількостей живих клітин (А), клітин з ознаками апоптозу (Б) і некрозу (В) у культурі нейронів гіпокампу: ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, при вказаних міжгрупових порівняннях.*

Отже, додавання амілоїду $A\beta_{1-42}$ в середовище культивування спричиняло інтенсивнішу загибель нейронів гіпокампу. При одночасному введенні амілоїду $A\beta_{1-42}$ та $CaCl_2$ відбувалось помітне зменшення кількості живих клітин, порівняно з умовами ізольованої дії як амілоїду $A\beta_{1-42}$, так і $CaCl_2$. Відносна кількість клітин без ознак апоптозу чи некрозу в даному випадку становила в середньому $44,30 \pm 3,60 \%$ (**Рис. 2**). Це значення не відповідало сумі ефектів $A\beta_{1-42}$ і $CaCl_2$, проте було більшим ніж в умовах окремої дії кожного реагенту. Кількість клітин з апоптотичними або некротичними змінами в описуваній групі була приблизно такою, як при ізольованій дії як амілоїду $A\beta_{1-42}$, так і $CaCl_2$ (в середньому $21,48 \pm 1,58 \%$ від загального числа для перших та $34,2 \pm 3,58 \%$ для других). Таким чином, на підставі отриманих результатів участь кальцієвого механізму розвитку апоптозу та некрозу в нашій культурі при дії амілоїду $A\beta_{1-42}$, є цідком обґрунтованою.

Вплив моделювання гіперкальціємії на рівень внутрішньоклітинного кальцію в культурі нейронів гіпокампу.

Наступні експерименти полягали в дослідженні впливу моделювання гіперкальціємії на клітини, що інкубувалися з $A\beta_{1-42}$ –амілоїдом, за допомогою флуорисцентної кальційметрії. Збільшення зовнішньоклітинного кальцію може призводити до патологічного стану, схожого з дією $A\beta$ при ХА.

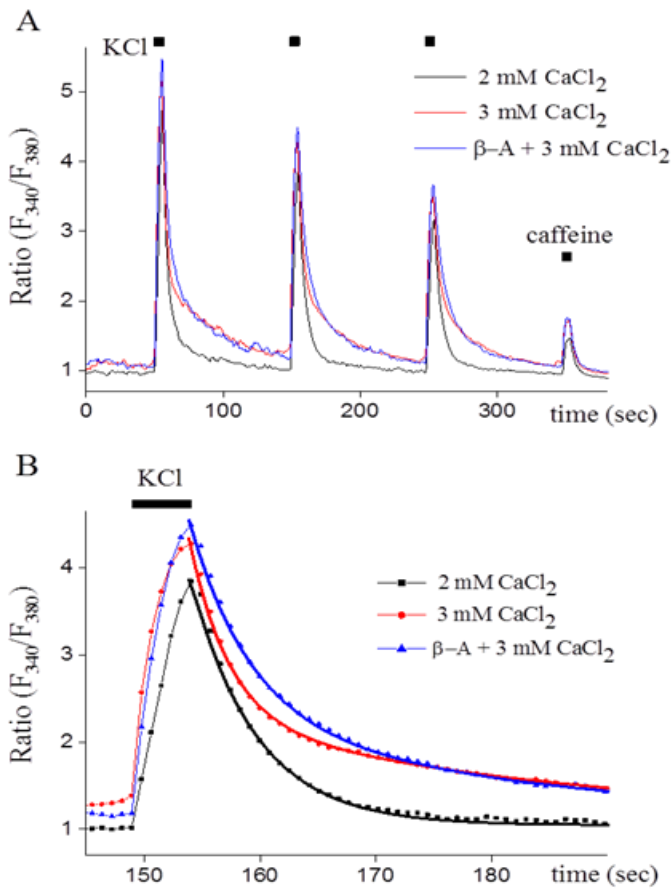


Рис. 3. Кальцієві транзйєнти, викликані депольаризацією плазматичної мембрани аплікацією гіперкальцієвого розчину в контролі (2 мМ CaCl₂), в умовах моделювання гіперкальціємії (3 мМ CaCl₂) та при дії амілоїду Aβ₁₋₄₂ (β-амілоїд). Дані представлені як співвідношення інтенсивностей флуоресценції при довжині хвиль 340 і 380 нм. А – усереднені дані реєстрацій змін вільного кальцію внаслідок трьохразової аплікації 50 мМ KCl (по 5 сек.) та аплікації розчину з 10 мМ кофеїну (5 сек); В – розгорнутий в часі другий кальцієвий транзйєнт з фрагменту А.

На **Рис.3** показано зміни кальцієвого сигналу у клітин, як відношення F_{340}/F_{380} , що інкубувалися в контрольних умовах (2 мМ CaCl₂; усереднені дані по 43 реєстрацій); при 3 мМ зовнішньоклітинного кальцію (середнє значення від 65 реєстрацій) та 3 мМ CaCl₂ та за умов дії Aβ₁₋₄₂-амілоїду (середні дані по 51 реєстрацій). Як видно з представлених даних при наявності в середовищі 3 мМ CaCl₂ та 3 мМ CaCl₂ разом з бета-амілоїдом кальцієві сигнали та їх спад до базального рівня, значно збільшувалися.

Базальний рівень вільного кальцію складав $0,95 \pm 0,03$ (n=43) в контрольних умовах (2 мМ CaCl₂) та $1,10 \pm 0,06$ (n=65) за умов 3 мМ CaCl₂. При інкубуванні нейронів гіпокампу в культивацийному середовищі з 2 мкМ амілоїду Aβ₁₋₄₂ та 3 мМ CaCl₂ цей параметр складав $1,16 \pm 0,07$ (n=51). В обох випадках даний рівень кальцію був достовірно збільшеним (P<0.05), у порівнянні з контрольними значеннями.

Таким чином в умовах моделювання гіперкальціємії (при 3 мМ CaCl₂ зовнішньоклітинного кальцію) у порівнянні з контролем (2 мМ CaCl₂), відбувалось збільшення базального рівня Ca²⁺ (на 16%) також збільшувалась амплітуда кальцієвих відповідей на аплікацію 50 мМ розчину KCl (на 11%) і вміст Ca²⁺ в ендоплазматичному ретикуліумі (на 20%). Також спостерігалось уповільнення відновлення концентрації Ca²⁺ (фаза спаду). При культивуванні нейронів гіпокампу з одночасною присутністю Aβ₁₋₄₂-амілоїду та 3 мМ CaCl₂, у порівнянні з контрольною групою клітин відбувались також збільшення цих параметрів; і вони були більш вираженими. При аплікації 50 мМ KCl спостерігалось збільшення на 17%, а при аплікації розчину з 10 мМ кофеїну –

на 22%. Таким чином, в умовах підвищення зовнішньоклітинної концентрації кальцію відбувається збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію та сповільнення його виведення або перерозподіл у нейронах.

Вплив блокатора відкривання мітохондріальної пори циклоспорину А на виживання нейронів культури гіпокампу при дії бета-амілоїду.

Ми намагалися встановити роль відкривання мітохондріальних пор у загибелі нейронів культури гіпокампу при дії А β -амілоїду. Для цього використовували подвійне забарвлення клітин двома барвниками, що зв'язуються з ДНК – Hoechst 33258 та ПІ.

Аналіз експериментальних даних дозволив, виявити, що у контрольних умовах частка живих нейронів в середньому становила 72 ± 6 % ($p \leq 0,01$), а некротизованих – 28 ± 6 %, відносно загальної кількості клітин ($n = 3211$), (Рис.4, а). При наявності в середовищі А β_{1-42} -амілоїду кількість живих клітин становила 41 ± 4 % ($p \leq 0,001$), у той час як відсоток некротизованих нейронів зросла до 59 ± 4 % ($p \leq 0,001$) відносно загальної кількості клітин ($n = 2815$); отже, останнє значення було на 31 % більшим, ніж у контролі ($p \leq 0,001$) (Рис. 4, б). Після інкубації з циклоспорином А частка живих нейронів складала 58 ± 6 % ($p \leq 0,01$), у той час як некротичних – 42 ± 6 % ($p \leq 0,001$) відносно загальної кількості клітин ($n = 2974$). Іншими словами останнє значення було на 17 % меншим порівняно з відповідним значенням при інкубації лише з А β_{1-42} -амілоїдом ($p \leq 0,05$) (Рис. 4, с).

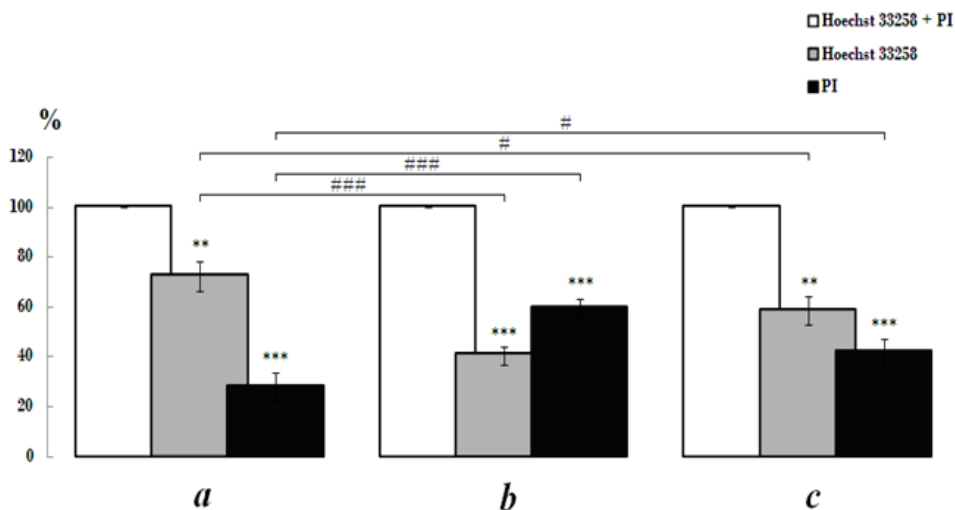


Рис. 4. Співвідношення кількостей живих та некротизованих нейронів культури гіпокампу в контрольних умовах (а), після інкубації з А β_{1-42} -амілоїдом (б) та після послідовної інкубації з циклоспорином А та А β_{1-42} -амілоїдом (с). Вертикальна вісь - нормована кількість клітин, %; # – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, ***, ### – $p \leq 0,001$

На основі результатів проведених дослідів ми зробили висновок, що блокування відкривання мітохондріальної пори (каналів неспецифічної

проникності) циклоспорином А сприяло істотному зменшенню кількості некротизованих нейронів гіпокампу.

Вплив мемантину на життєздатність нейронів гіпокампу при активації глутаматних НМДА рецепторів

У досліджах *in vitro* на нейронах культури гіпокампу ми намагались оцінити нейропротекторну роль антагоністу НМДА-рецепторів мемантину на життєздатність цих клітин при моделюванні ексайтотоксичності. Ми використовували подвійне забарвлення клітин двома барвниками, що зв'язуються з ДНК (Hoechst та ПЙ), і оцінювали життєздатність нейронів шляхом їх підрахунку за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії.

У наших дослідженнях було встановлено, що у контрольних зразках культури клітин гіпокампу щурів переважна більшість клітин (в середньому $75,1 \pm 1,72$ %), не проявляли будь-яких ознак патологічних змін та оцінювалась, як живі. Відносно невелика частина нейронів в контрольних зразках ($10,7 \pm 1,34$ %) демонстрували ознаки апоптозу. Ті нейрони, ядра яких в контрольних умовах забарвлювались ПЙ і давали червону флуоресценцію (що свідчило про некротичні зміни) в середньому склали $14,1 \pm 0,98$ % (Рис. 5).

Після інкубації з антагоністом НМДА-рецепторів мемантином (50 мкМ, 24 год.) вірогідних змін в групі клітин в порівнянні з контролем не виявилось, отже, мемантин не мав як такої пошкоджуючої дії на клітини культури гіпокампу (Рис. 5).

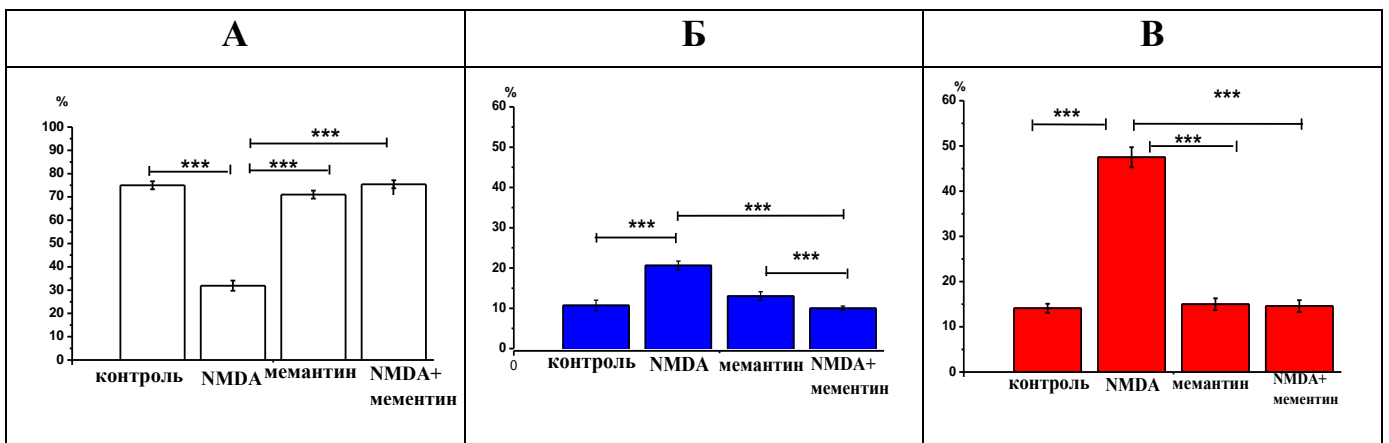


Рис.5. Середні значення нормованих кількостей цитологічно інтактних клітин (А) та клітин з ознаками апоптозу (Б) і некрозу (В) у культурі нейронів гіпокампу щурів при додаванні НМДА та мемантину в середовище.

*** $P < 0,001$.

З даних літератури (Lipton, 2007; Majláth et al., 2016; Rogawski & Wenk, 2003), відомо, що мемантин забезпечує блокування іонних каналів НМДА-рецепторів в умовах розвитку ексайтотоксичності, тобто при патологічному

збудженні НМДА-рецепторів наприклад при надмірній концентрації глутамату. Цей механізм сприяє припиненню надмірної активності даного типу рецепторів, зберігаючи можливість проведення через них фізіологічних глутаматергічних рецептор-ефекторних реакцій (Danysz et al., 2000; Volbracht et al., 2006). Мемантин проявляв нейропротекторні властивості, захищаючи від загибелі, спричиненої глутаматом, нейрони культури кори (Lopes et al., 2013; Tremblay et al., 2000) і гіпокампу щурів (Krieglstein et al., 1996).

Після інкубації культури клітин гіпокампу в середовищі з додаванням НМДА (10 мкМ, 24 год), спостерігалась інтенсивна загибель нейронів гіпокампу, у половині клітин дослідженої вибірки визначалися виражені патологічні зміни. Після спільної інкубації клітин культури гіпокампу з НМДА (10 мкМ, 24 год) та мемантином (50 мкМ, 24 год) частка живих нейронів щодо загальної кількості клітин збільшувалась і складала в середньому $75,4 \pm 1,72$ %, тоді як частка апоптотичних клітин була $10 \pm 0,54$ %, а некротичних – $14,6 \pm 1,31$ % (Рис. 5). Порівнюючи ці результати з отриманими при інкубації з додаванням одного НМДА, кількість живих клітин ставала більшою на 43,5 % ($P < 0.001$), а кількість апоптотичних і некротичних одиниць – меншою відповідно на 10 % ($P < 0.001$) і 32 % ($P < 0.001$). Це свідчить про те що мемантин в наших експериментальних умовах здійснював захисний вплив при дії НМДА на глутаматні рецептори нейронів.

Вплив мемантину на життєздатність нейронів гіпокампу при дії $A\beta_{1-42}$

Виходячи з того, що за даними літератури нейротоксичність $A\beta_{1-42}$ може опосередковуватися ексайтотоксичністю глутамату, а мемантин, як неконкурентний низькоафінний антагоніст глутаматних НМДА-рецепторів, блокуючи їх дію, запобігає загибелі нейронів, спричиненої цією ексайтотоксичністю, можна думати, що мемантин може мати нейропротекторний ефект проти нейротоксичності $A\beta_{1-42}$. Тому в наступних серіях експериментів ми досліджували нейропротекторну здатність мемантину проти нейротоксичної дії амілоїду $A\beta_{1-42}$.

У контрольних зразках нейронів культури гіпокампу щурів більшість клітин (в середньому $76,1 \pm 1,72$ %), були живі. Ядра відносно невеликої частини нейронів (в середньому $9,7 \pm 1,34$ %) були з ознаками апоптозу. Ті нейрони, ядра яких в контрольних умовах забарвлювались ПЙ і давали червону флуоресценцію, (що свідчило про некроз), в середньому по групі склали $14,1 \pm 0,98$ % (Рис. 6).

Введення в інкубаційне середовище амілоїду $A\beta_{1-42}$ (2 мкМ, 24 год.) спричиняло нейротоксичний ефект та індукувало посилену загибель нейронів гіпокампу. Такі ж дані про токсичний вплив і зниження життєздатності клітин під дією амілоїду $A\beta_{1-42}$ отримано і іншими дослідниками, зокрема, в органотиповій культурі гіпокампу (Arbo et al., 2017) та первинній культурі гіпокампу (Calvo-Rodriguez et al., 2019; Hooshmandi et al., 2019, 2020; Ji et al., 2020). В цих роботах після інкубації зазначених клітин

з амілоїдом також спостерігали $A\beta_{1-42}$ – індуковані негативні морфологічні зміни.

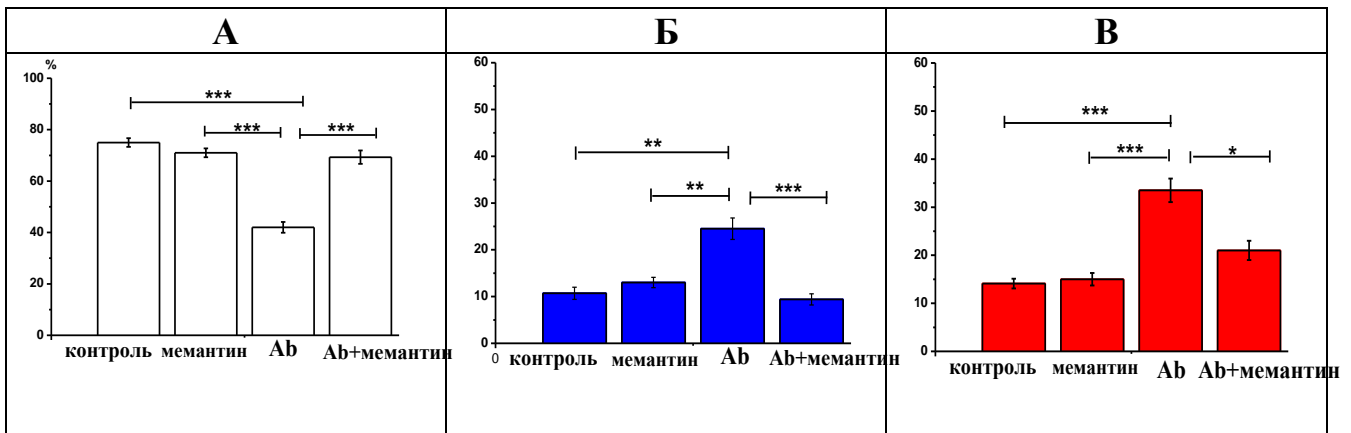


Рис. 6. Середні значення нормованих кількостей цитологічно інтактних клітин (А), клітин з ознаками апоптозу (Б) і некрозу (В) у культурі нейронів гіпокампу щурів при додаванні амілоїду $A\beta_{1-42}$ та мемантину до середовища культивування.

** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

При одночасному введенні амілоїду $A\beta_{1-42}$ та мемантину в середовище відмічалось збереження більшої кількості цитологічно інтактних клітин, ніж в умовах ізольованої дії амілоїду $A\beta_{1-42}$. Додавання мемантину також забезпечувало зниження кількості апоптотичних клітин ($P < 0.001$). Відносна кількість клітин з виразними ознаками некрозу в двох зазначених групах також розрізнялася приблизно в 1,5 рази: при наявності в середовищі мемантину одночасно з амілоїдом $A\beta_{1-42}$ даний показник в середньому становив $21,0 \pm 2,00$ %, $P < 0.01$). Отже, додавання мемантину помітно обмежувало патологічний вплив амілоїду $A\beta_{1-42}$ на нейрони культури гіпокампу. Інші автори також повідомляли, що в експериментах *in vitro* мемантин продемонстрував здатність нівелювати ефекти бета-амілоїду, в тому числі його розчинних олігомерів, в культурах кортикальних і гіпокампальних нейронів (Lacor et al., 2007; Tremblay et al., 2000). Було також встановлено, що мемантин запобігає патологічному апоптозу і нейрональним втратам в гіпокампі при одночасних введенні з $A\beta_{1-40}$ (Miguel-Hidalgo et al., 2002), тобто мемантин проявляє очевидний нейропротекторний ефект.

Наступні експерименти полягали в дослідженні дії мемантину (20 мкМ) на кальцієвий гомеостаз нейронів у контролі та при культивуванні з $A\beta_{1-42}$ (24 години). В цих експериментах було досліджено: зміну амплітуди кальцієвих транз'єнтів при деполяризації мембрани стимуляцією нейронів електричним полем (забезпечує вхід кальцію через короткочасову активацію потенціал-залежних каналів); зміну базального рівня Ca^{2+} в цитоплазмі. Також було досліджено транз'єнтні зміни завдяки 5 сек аплікації розчину з 50 мМ КСІ та вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму (10 мМ кофеїну, 5 сек).

Дані дослідження проводили як у контролі так і при культивуванні нейронах з $A\beta_{1-42}$ –амілоїдом (24 години).

Наші експерименти показали, що мемантин зменшує кальцієвий сигнал як в умовах контролю так і у нейронах, культивованих з $A\beta_{1-42}$, але з різним ступенем. Дія мемантину мала тенденцію до зменшення базального рівня кальцію, це значення знаходилось в діапазоні, яке не перевищувало 8%. Також даний, ефект був менш виражений для піку кальцієвих транзйєнтів при стимуляції нейронів електричним полем, значення яких не перевищувало 3% у контролі та 11% у клітинах з додаванням $A\beta_{1-42}$. Більш виражений ефект мемантину нами був виявлений при дії кофеїну та деполяризуючого розчину з 50 мМ KCl. Так пік Ca^{2+} сигналу спричинений вивільненням з ендоплазматичного ретикулуму зменшився на 20,5%, а амплітуда кальцієвого транзйєнту на аплікацію деполяризуючого розчину зменшилась на 20,7%. У клітинах, при культивуванні з $A\beta_{1-42}$, дані параметри були дещо більшими і становили: 28,2 та 22,8% відповідно.

Отримані результати показують, що нейропротекторний ефект мемантину може бути забезпечений не тільки внаслідок інгібування НМДА-рецепторів, але також за допомогою послаблення навантаження нейронів завдяки зменшенню та перерозподілу внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , що забезпечує захист нейронів від перевантаження Ca^{2+} за умов дії $A\beta_{1-42}$ на культуру нейронів гіпокампу.

Нейропротекторний вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) щодо життєздатності нейронів культури гіпокампу.

В останні роки активно вивчаються можливості застосування в медицині нанобіоматеріалів, що демонструють низку унікальних властивостей. Особливу цікавість в цьому аспекті викликають нанокристалічні матеріали на основі діоксиду церію (НДЦ). Такі їх характеристики, як низька токсичність поряд зі специфічними окислювально-відновними і протирадикальними властивостями, дозволяють розглядати наночастинки церію як перспективний об'єкт для біомедичних застосувань (Celardo et al., 2011). Наприклад, показано, що під впливом НДЦ зменшується дегенерація сітківки ока (Wong & McGinnis, 2014), захищаються від оксидативного стресу тканини мозку (Neckman et al., 2013), фібробласти шкіри людини (Lee et al., 2013), клітини ендотелію (Chen et al., 2013) та серця (Niu et al., 2007). Потребують вивчення впливи НДЦ при нейродегенеративних захворюваннях, зокрема ХА.

Ми виявили, що при ізольованому введенні НДЦ в культивоване середовище нейронів гіпокампу, частка живих клітин становила в середньому $81,1 \pm 2,35$ %, апоптотичних – $10,1 \pm 2,2$ %, некротизованих – $8,8 \pm 1,34$ % щодо загальної кількості клітин. Ці значення вірогідно не відрізнялися від аналогічних величин в контролі; отже сам НДЦ не впливав негативно на клітини культури гіпокампу. Після інкубації нейронів культури гіпокампу в середовищі з ізольованим додаванням амілоїду $A\beta_{1-42}$ кількість живих клітин

була в 2,5 рази меншою чим у згаданій вище групі (в середньому $31,8 \pm 3,02\%$). Нейрони ж з апоптотичними змінами в даних умовах спостерігалися значно частіше, ніж в контролі ($25,5 \pm 4,32\%$). Група клітин з ознаками некрозу була майже в 5 разів більш численнішою, ніж в контрольних зразках (в середньому їх кількість становила $42,7 \pm 4,17\%$) (Рис. 7).

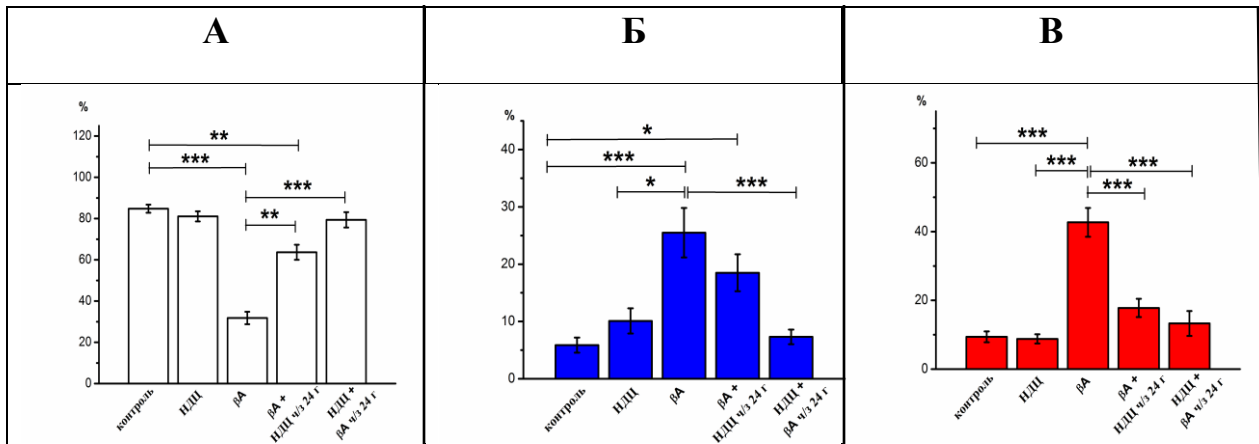


Рис. 7. Середні значення нормованих кількостей живих нейронів (А), нейронів з ознаками апоптозу (Б) і некрозу (В) у культурі нейронів гіпокампу при додаванні до середовища Аβ₁₋₄₂ та наночастинок діоксиду церію (НДЦ)

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Введення НДЦ під час інкубації з амілоїдом Аβ₁₋₄₂ забезпечувало збереження дещо більшої кількості цитологічно інтактних клітин, ніж в умовах ізольованої дії амілоїду Аβ₁₋₄₂. Відносна кількість таких клітин без ознак пошкодження в даному випадку становила більше половини проаналізованої вибірки (в середньому $63,7 \pm 3,64\%$) і вірогідно відрізнялась як від контрольного значення, так і від такого при ізольованій дії амілоїду Аβ₁₋₄₂ (Рис. 7). Додавання НДЦ забезпечувало меншу кількість апоптотичних нейронів (в середньому на 7 %) у порівнянні з тим, що спостерігалось в попередній групі ($P < 0.001$). Відносні кількості клітин з виразними некротичними змінами в двох зазначених групах також розрізнялися приблизно в 2,5 рази: при інкубації НДЦ з амілоїдом Аβ₁₋₄₂ в середовище даний показник в середньому становив $17,8 \pm 2,65\%$. Отже, введення НДЦ після дії амілоїду Аβ₁₋₄₂ повною мірою обмежувало його негативний вплив на нейрони культури гіпокампу.

Після профілактичної інкубації нейронів гіпокампу із НДЦ, доданого за 24 год до введення амілоїду, частка живих нейронів щодо загальної кількості клітин складала в середньому $79,4 \pm 3,71\%$ (тобто була в 2,5 рази більшою, ніж при ізольованій дії амілоїду Аβ₁₋₄₂), а частка апоптотичних ($7,3 \pm 1,28\%$), та некротичних ($13,3 \pm 3,61\%$) одиниць були приблизно в 3 рази менше ніж при ізольованій дії амілоїду Аβ₁₋₄₂. Таким чином, попередня обробка культур клітин гіпокампу НДЦ зумовлювала значне зменшення інтенсивності загибелі вказаних клітин в результаті дії амілоїду. Можна припустити, що такий ефект досліджуваних наночастинок обумовлюється

здатністю НДЦ впливати на окислювально-відновлювальні процеси, що проходять в організмі, істотно зменшуючи продукцію активних форм кисню, в тому числі вільних радикалів (Bailey et al., 2016), які можуть утворюватися під впливом А β і вести до апоптозу чи некрозу клітин.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до мети і поставлених завдань було досліджено вплив нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на нейрони культури гіпокампу при дії А β ₁₋₄₂-амілоїду (моделювання *in vitro* хвороби Альцгеймера).

1. Відтворено токсичну дію бета-амілоїду на нейрони культури гіпокампу. Встановлено, що А β -амілоїд спричиняє інтенсивну загибель нейронів у культурі в порівнянні з такими в контролі.

2. Наявність А β ₁₋₄₂-амілоїду в середовищі культивування викликає істотне підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca²⁺ в нейронах гіпокампу. Збільшується як вхід Ca²⁺ та його перерозподіл, так і вміст Ca²⁺ у ендоплазматичному ретикулуму. В результаті, підвищується базальний рівень Ca²⁺, що негативно впливає на життєздатність нейронів.

3. Моделювання умов гіперкальціємії зумовлює зниження життєздатності нейронів гіпокампу і підвищує рівень внутрішньоклітинного Ca²⁺, що призводить до збільшення кількості некротизованих нейронів. Отже, вірогідною є участь кальцієвого механізму в розвитку апоптозу та некрозу нейронів гіпокампу при дії А β ₁₋₄₂.

4. Циклоспорин, будучи блокатором відкривання мітохондріальної пори, помітно зменшує негативний вплив А β -амілоїду на життєздатність нейронів. Останнє свідчить про залучення змін у мітохондріях в розвиток цитотоксичної дії А β -амілоїду на досліджені нейрони.

5. Агоніст глутаматних рецепторів НМДА сприяє збільшенню кількості некротизованих клітин, що відповідає посиленню ушкодження нейронів культури гіпокампу внаслідок ексайтотоксичності. Блокатор НМДА-рецепторів мемантин, значно зменшує кількість клітин з ознаками некрозу при дії НМДА.

6. Мемантин зменшує кальцієвий сигнал як в умовах контролю так і у нейронах культивованих з А β ₁₋₄₂-амілоїдом, але з більш вираженим ступенем, також позитивно впливав на життєздатність нейронів. Кількість некротичних та апоптотичних клітин при цьому була меншою, ніж за відсутності даного блокатора.

7. Вперше виявлено, що наночастинки діоксиду церію (НДЦ) сприятливо впливають на життєздатність нейронів гіпокампу в умовах негативної дії А β ₁₋₄₂-амілоїду, значно зменшуючи кількість апоптотичних та некротичних нейронів. Особливо ефективним було завчасне додавання НДЦ перед введенням А β ₁₋₄₂-амілоїду в середовище культивування.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові публікації, в яких висвітлені основні наукові результати дисертації:

1. Є.В. Кравенська, **В.В. Чоповська**, О.М. Яворська, О.О. Лук'янець Роль мітохондрій у розвитку хвороби Альцгеймера // Таврійський медико-біологічний вісник том 15, № 3, ч. 2 (59), 2012., с. 147-149.
2. Kravenska, E.V., **Ganzha V.V.**, Yavorskaya, E.N. et al. Effect of Cyclosporin A on the Viability of Hippocampal Cells Cultured under Conditions of Modeling of Alzheimer's Disease. *Neurophysiology* 48, 246–251 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11062-016-9595-5>.
3. **V.V. Ganzha**, E.A. Lukyanetz. Role of mitochondrial dysfunction in the development of Alzheimer's Disease // *Fiziol. Zh.*, Vol. 67(1), 2021, p.57-66. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz67.01.057>.
4. Rozumna, N.M., Shkryl, V.M., **Ganzha V.V.** et al. Effects of Modeling of Hypercalcemia and β -Amyloid on Cultured Hippocampal Neurons of Rats. *Neurophysiology* 52, 348–357 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11062-021-09891-8>
5. V.M. Shkryl, **V.V. Ganzha**, E.A. Lukyanetz. Effect of memantin on calcium signaling in hippocampal neurons cultured with beta-amyloid // *Fiziol. Zh.*, Vol. 67(2), 2021, p.3-10. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz67.02.003>

Наукові публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Чоповська В. В.**, Кравенська Є. В., Яворська О. М., Лук'янець О. О. Вплив β_{1-42} -амілоїда на кальцієву сигналізацію нейронів культури гіпокампу щурів // Тези II наукової конференції молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму», Фізіол. Журнал, №6, том 58, 2012 р. с 126.
2. Kravenska E.V., **Chopovska V.V.** Yavorskaya E.N., Lukyanetz E.A. Influence of β -amyloid on calcium signalling of hippocampal neurons. // II Міжнародний симпозіум "Молекулярні механізми регулювання синаптичної передачі", Київ, 2012 р.
3. **Чоповська В. В.**, Кравенська Є. В., Яворська О. М., Лук'янець О. О. Вплив β_{1-42} -амілоїда на життєздатність нейронів культури гіпокампу щурів // Тези III наукової конференції молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму», Київ, 2013. С 28.
4. **Чоповська В. В.**, Кравенська Є. В., Гуржій К. В., Лук'янець О. О. Дослідження участі мітохондріальної пори неспецифічної проникності у розвитку хвороби Альцгеймера, // тези IV наукової конференції: «Біологічно активні речовини та матеріали: фундаментальні та прикладні питання отримання та застосування», Новий Світ, 2013. С. 98.
5. **Чоповська В. В.**, Кравенська Є. В., Лук'янець О. О. Дослідження участі мітохондріальної пори неспецифічної проникності у розвитку хвороби

Альцгеймера, // тези XI Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна, 2013: Біологічні науки» Київ, С. 99.

6. **Чоповська В. В.**, Кравенська Є. В., Гуржій К. В., Лук'янець О. О. Вплив циклоспорину на кальцієву сигналізацію нейронів культури гіпокампу при моделюванні хвороби Альцгеймера, // Фізіологічний журнал, т. 60, №3, (додаток), Київ, 2014. - С. 24.

7. **Чоповська В. В.**, Кравенська Є. В., Яворська О. М., Лук'янець О. О. Роль мітохондріальної пори у загибелі нейронів культури гіпокампу при моделюванні хвороби Альцгеймера, // Матеріали VI Конгресу Українського товариства нейронаук, Київ, 4-8 червня, 2014. – С. 117-118

8. Kravenska E.V, **Chopovska V.V.**, Lukyanetz E.A. The role of mitochondrial permeability transition pore in the development of Alzheimer's disease, // Physiology 2014 – The Queen Elizabeth II Conference Centre, Broad Sanctuary, London SW1P 3EE, UK, 30 June - 2 July 2014. – P. 139 .

9. Lukyanetz E.A., **Chopovska V.V.**, Kravenska E.V, Yavorskaya E.N., Shkryl V.M. Effect of β -amyloid on calcium signalling in rat hippocampal neurons, // Programme book of 9 th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9 2014, Abstract Number: FENS-2031.– P. 320.

10. Розумна Н.М., Кравенська Є.В., **Ганжа В.В.**, Співак М.Я., Лук'янець О.О. Дослідження впливу нанокристалічного діоксиду церію на життєздатність нейронів культури гіпокампу при моделюванні хвороби Альцгеймера // Мат. докл. VIII з'їзду УБФТ. – Київ, 2019. – С. 13.

11. **Ганжа В.В.**, Лук'янець О.О. Загальні методи культивування нервових клітин гіпокампу // Фізіологічн. журн. (Матеріали XX з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, Київ, 27-30 травня 2019 року) – 2019. – Т.65(3s) , № 3. – С. 40-41. – (додаток). - (Proceedings of the XX Congress of Ukrainian Physiological Society, Kyiv, May 27-30, 2019).

12. **Vita Ganzha**, Nataliia Rozumna, Elena Lukyanetz Studies of the protective properties of the NMDA - receptor antagonist memantine on the viability of neurons in rat hippocampal culture when modeling excitotoxicity and Alzheimer's Disease // abstract book of 5 th HBP Student Conference on Interdisciplinary Brain Research, 2021. – P. 32-34.

13. **Ганжа В.В.**, Шкріль В.М. , Розумна Н.М., Лук'янець О.О. Вплив мемантину на нейрони гіпокампу щурів при їх культивуванні з амілоїдом $A\beta_{1-42}$. // Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції перші читання присвячені Д.О.Альперну: «Актуальні питання патологічної фізіології». – Харків, 26 березня, 2021. – С. 41-42.

АНОТАЦІЯ

Ганжа В. В. Вплив нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на нейрони гіпокампу щурів при дії бета-амілоїду. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин». – Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2021.

Хвороба Альцгеймера (ХА) є нейродегенеративним захворюванням, яке характеризується прогресуючими когнітивними порушеннями і втратою пам'яті. Патогенез ХА складний, залежить від багатьох факторів і досі не до кінця вивчений. Позаклітинні відкладення пептиду амілоїду- β ($A\beta$) у вигляді сенільних бляшок, утворення внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків та масивна нейронна втрата, особливо в області гіпокампу, розглядаються як основні патологічні ознаки ХА. Відомо, що гіпокамп відповідає за здатність до навчання, формування короткотривалої пам'яті та низку інших процесів. В ході розвитку ХА до 80% нейронів в гіпокампі гине і людині стає все складніше засвоювати нову інформацію та запам'ятовувати події. Мета даної роботи полягала у з'ясуванні впливів деяких нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на нейрони гіпокампу щурів при впливі $A\beta_{1-42}$ для визначення можливого механізму дії цього агенту при моделюванні хвороби Альцгеймера. За допомогою флуоресцентної мікроскопії встановлено, що $A\beta_{1-42}$ -амілоїд викликає підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} в нейронах культури. Збільшується як вхід Ca^{2+} так і його перерозподіл, при збільшенні вмісту Ca^{2+} ендоплазматичному ретикулумі. В результаті, підвищується базальний рівень Ca^{2+} , що негативно впливає на життєздатність нейронів. За допомогою конфокальної мікроскопії було вперше досліджено вплив мемантину, циклоспорину А, а також наночастинок діоксиду церію на життєздатність нейронів культури гіпокампу, що культивувалися з $A\beta_{1-42}$ -амілоїдом, з можливістю встановлення їх нейропротекторних властивостей. Досліджено захисні властивості неконкурентного низькоафінного антагоністу НМДА – рецепторів мемантину на життєздатність нейронів культури гіпокампу щурів при впливі $A\beta_{1-42}$ -амілоїду. Мемантин виявляв захисний ефект при експериментальних умовах ексайтотоксичності, викликаній додаванням НМДА в середовище культивування. Блокування відкривання мітохондріальної пори неспецифічної проникності циклоспорином А, сприяло зменшенню кількості некротичних нейронів гіпокампу при токсичній дії $A\beta_{1-42}$ -амілоїду. У ході аналізу даних було вперше встановлено, що введення наночастинок діоксиду церію (НДЦ) значно знижує кількість загиблених нейронів при дії $A\beta_{1-42}$ -амілоїду, тому використання НДЦ для біомедичних застосувань є дуже перспективним. Отримані дані можуть бути

основою для розробки нових ефективних фармакологічних підходів для зниження рівня та впливу А β -амілоїду при хворобі Альцгеймера.

Ключові слова: хвороба Альцгеймера, культура нейронів гіпокампу, кальцій, бета-амілоїд (А β), токсичність, некроз, апоптоз.

АННОТАЦІЯ

Ганжа В. В. Влияние нейропротекторных и повреждающих факторов на нейроны гиппокампа крыс при действии бета-амилоида. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 «Физиология человека и животных». - Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2021.

Болезнь Альцгеймера (БА) является нейродегенеративным заболеванием, которое характеризуется прогрессирующими когнитивными нарушениями и потерей памяти. Патогенез БА сложный, зависит от многих факторов до сих пор не до конца изучен. Внеклеточные отложения пептида β - амилоида (А β) в виде сенильных бляшек, образование внутриклеточных нейрофибрилярных клубков и массивная нейронная потеря, особенно в области гиппокампа, рассматриваются как основные патологические признаки БА. Известно, что гиппокамп отвечает за способность к обучению, формирование кратковременной памяти и ряд других процессов. В ходе развития БА до 80% нейронов в гиппокампе погибает и человеку становится все сложнее усваивать новую информацию и запоминать события. Цель данной работы заключалась в выяснении влияния некоторых нейропротекторных и повреждающих факторов на нейроны гиппокампа крыс при воздействии А β_{1-42} для определения возможного механизма действия этого агента при моделировании болезни Альцгеймера. С помощью флуоресцентной микроскопии установлено, что А β_{1-42} -амилоид вызывает повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в нейронах культуры. Увеличивается как вход Ca^{2+} так и его перераспределение, при увеличении содержания Ca^{2+} эндоплазматическом ретикулуме. В результате, повышается базальный уровень Ca^{2+} , что негативно влияет на жизнеспособность нейронов. С помощью конфокальной микроскопии впервые исследовано влияние мемантина, циклоспорина А, а также наночастиц диоксида церия на жизнеспособность нейронов культуры гиппокампа, что культивировались с А β_{1-42} -амилоида, с возможностью установки их нейропротекторных свойств. Исследованы защитные свойства неконкурентного антагониста НМДА - рецепторов мемантина на жизнеспособность нейронов культуры гиппокампа крыс при воздействии А β_{1-42} -амилоида. Мемантин проявлял защитный эффект при экспериментальных условиях эксайтотоксичности, вызванной

добавлением НМДА в среду культивирования. Блокировка открывания митохондриальной поры неспецифической проницаемости циклоспорином А, способствовало уменьшению количества некротических нейронов гиппокампа при токсическом действии $A\beta_{1-42}$ -амилоида. В ходе анализа данных было впервые установлено, что введение наночастиц диоксида церия (НДЦ) значительно снижает количество погибших нейронов при действии $A\beta_{1-42}$ -амилоида, поэтому использование НДЦ для биомедицинских применений является очень перспективным. Полученные данные могут служить основой для разработки новых эффективных фармакологических подходов для снижения уровня и влияния $A\beta$ -амилоида при болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, культура нейронов гиппокампа, кальций, бета-амилоид ($A\beta$), токсичность, некроз, апоптоз.

SUMMARY

Ganzha V.V. The effect of neuroprotective and damaging factors on the neurons of the rat hippocampus under the action of beta-amyloid. - Manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of biological sciences on a specialty 03.00.13 – "Physiology of human and animals". – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive cognitive impairment and memory loss. The pathogenesis of AD is complex, depends on many factors and is still not fully understood. Extracellular deposits of β -amyloid ($A\beta$) peptide in the form of senile plaques, the formation of intracellular neurofibrillary tangles and massive neuronal loss, especially in the hippocampus, are considered the main pathological signs of AD. The hippocampus is known to be responsible for learning, short-term memory, and a number of other processes. During the development of HA, up to 80% of the neurons in the hippocampus die and it becomes increasingly difficult for a person to absorb new information and remember events. The aim of this study was to elucidate the effects of some neuroprotective and damaging factors on rat hippocampal neurons when exposed to $A\beta_{1-42}$ to determine the possible mechanism of action of this agent in modeling Alzheimer's disease. Using fluorescence microscopy, it was found that $A\beta_{1-42}$ -amyloid causes an increase in the concentration of intracellular Ca^{2+} in the neurons of the culture. Both Ca^{2+} input and its redistribution increase with increasing Ca^{2+} content in the endoplasmic reticulum. As a result, the basal level of Ca^{2+} increases, which negatively affects the viability of neurons. Confocal microscopy was the first to study the effect of memantine, cyclosporine A, and cerium dioxide nanoparticles on the viability of hippocampal culture neurons

cultured with $A\beta_{1-42}$ -amyloid, with the possibility of establishing their neuroprotective properties. The protective properties of the non-competitive low-affinity antagonist NMDA - memantine receptors on the viability of neurons in the hippocampus of rats under the influence of $A\beta_{1-42}$ -amyloid were studied. Memantine showed a protective effect under experimental conditions of excitotoxicity caused by the addition of NMDA to the culture medium. Blocking the opening of mitochondrial pores of nonspecific permeability with cyclosporine A, helped to reduce the number of necrotic neurons in the hippocampus with the toxic action of $A\beta_{1-42}$ -amyloid. During the analysis of the data, it was found for the first time that the introduction of cerium dioxide nanoparticles (NDC) significantly reduces the number of neurons killed by $A\beta_{1-42}$ -amyloid, so the use of NDC for biomedical applications is very promising. The data obtained can be the basis for the development of new effective pharmacological approaches to reduce the level and effects of $A\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's disease, hippocampal neuron culture, calcium, beta-amyloid ($A\beta$), toxicity, necrosis, apoptosis.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

$A\beta$ – бета-амілоїд

APP – amyloid precursor protein

ХА – хвороба Альцгеймера

МППП – мітохондріальна пора перехідної проникності

APP – білок-попередник амілоїду (amyloid precursor protein)

NEPES – N-2-гідроксиетилпіперазин-N-2-етансульфонова кислота

RyR- ріанодинові рецептори

ER-ендоплазматичний ретикулум

НДЦ – нанокристалічні матеріали на основі діоксиду церію