

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

*Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису*

**Ганжа Віта Вікторівна**

УДК 57.085.23

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**Вплив нейропротекторних та ушкоджуючих  
факторів на культивовані нейрони гіпокампу щурів  
при дії бета-аміоїду**

03.00.13 – Фізіологія людини та тварин

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ В.В. Ганжа

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

**Київ- 2021 р.**

## АНОТАЦІЯ

**Ганжа В. В. Вплив нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на культивовані 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- $\beta$  ( $A\beta$ ) 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 агента 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 загиблих 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.

**Ключові слова:** хвороба Альцгеймера, культура нейронів гіпокампу, кальцій, бета-амілоїд ( $A\beta$ ), токсичність, некроз, апоптоз.

## SUMMARY

**Ganzha V.V. Influence of neuroprotective and damaging factors on cultured neurons of the hippocampus of rats 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  $\beta$ -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.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Наукові праці, в яких опубліковані 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. *(Особистий внесок здобувача полягає у аналізі наукової літератури та формулюванні висновків щодо сучасного стану проблеми).*
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>. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, і підготовці матеріалів статті до публікації).*
3. **V.V. Ganzha**, E.A. Lukyanetz. Role of mitochondrial disfunction 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>. *(Особистий внесок здобувача полягає у аналізі наукової літератури та формулюванні висновків щодо сучасного стану проблеми).*
4. Rozumna N.M., Shkryl V.M., **Ganzha V.V.** et al. Effects of Modeling of Hypercalcemia and  $\beta$ -Amyloid on Cultured Hippocampal Neurons of Rats. Neurophysiology 52, 348–357 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11062->

021-09891-8 (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, і підготовці матеріалів статті до публікації).

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> (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, і підготовці матеріалів статті до публікації).

### Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Чоповська В. В.**, Кравенська Є. В., Яворська О. М., Лук'янець О. О. Вплив  $A\beta_{1-42}$ -амілоїду на кальцієву сигналізацію нейронів культури гіпокампа щурів // Тези II наукової конференції молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму», Фізіол. Журнал, №6, том 58, 2012 р. с 126. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
2. Kravenska E.V., **Chopovska V.V.**, Yavorskaya E.N., Lukyanetz E.A. Influence of  $\beta$ -amyloid on calcium signalling of hippocampal neurons. // II Міжнародний симпозіум "Молекулярні механізми регулювання синаптичної передачі", Київ, 2012 р. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
3. **Чоповська В. В.**, Кравенська Є. В., Яворська О. М., Лук'янець О. О. Вплив  $\beta_{1-42}$ -амілоїда на життєздатність нейронів культури гіпокампа щурів // Тези III наукової конференції молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму», Київ, 2013. С 28. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
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. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

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. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

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. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

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

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 . *Публікація тез, участь у постерній сесії*

9. Lukyanetz E.A., **Chopovska V.V.**, Kravenska E.V, Yavorskaya E.N., Shkryl V.M. Effect of  $\beta$ -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. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

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 гіпокампа при моделюванні хвороби Альцгеймера // Мат. докл. VIII з'їзду УБФТ. – Київ, 2019. – С. 13. *Публікація тез.*

11. **Ганжа В.В.**, Лук'янець О.О. Загальні методи культивування нервових клітин гіпокампа // 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). *Публікація тез, усна доповідь.*

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. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

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



## ЗМІСТ

<b>АНОТАЦІЯ</b>	<b>2</b>
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>	<b>12</b>
<b>ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ</b>	<b>13</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	<b>21</b>
1.1 Історія відкриття амілоїдних білків.	<b>21</b>
1.2 Будова і властивості бета-амілоїдних пептидів	<b>23</b>
1.2.1 А $\beta$ мономери.	<b>24</b>
1.2.2 А $\beta$ фібрили.	<b>25</b>
1.2.3 А $\beta$ олігомери	<b>29</b>
1.3 Утворення і роль APP в організмі.	<b>32</b>
1.4 Роль секретаз в утворенні бета-амілоїду.	<b>36</b>
1.4.1 $\alpha$ -секретаза.	<b>36</b>
1.4.2 $\beta$ -секретаза.	<b>37</b>
1.4.3 $\gamma$ -секретаза.	<b>38</b>
1.5 Фізіологічна роль бета-амілоїду.	<b>40</b>
1.6. Механізми токсичної дії бета -амілоїдних пептидів.	<b>42</b>
1.7 Мітохондрії в патогенезі хвороби Альцгеймера.	<b>45</b>
1.8 Дисфункція мітохондрій і бета-амілоїд.	<b>46</b>
1.9 Мітохондрії та внутрішньоклітинний дисбаланс кальцію	<b>47</b>
1.10 Будова та властивості нанокристалічного діоксиду церію.	<b>48</b>
<b>РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>53</b>
2.1. Приготування первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампа.	<b>53</b>
2.2. Покриття покривних скелець полілізином та ламініном.	<b>54</b>
2.3. Обробка клітин культури гіпокампу реагентами.	<b>54</b>
2.4. Забарвлювання нейронів гіпокампу.	<b>56</b>
2.5. Встановлення стану клітин.	<b>56</b>

2.6. Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія.	<b>57</b>
2.7. Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію.	<b>58</b>
2.8. Розчини та реактиви.	<b>59</b>
2.9. Статистичний аналіз.	<b>61</b>
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>62</b>
3.1 Дослідження впливу $A\beta_{1-42}$ -амілоїду на зміну внутрішньоклітинну концентрацію кальцію та його вміст в ендоплазматичному ретикулумі культивованих нейронів гіпокампу.	<b>62</b>
3.2 Впливи білка $A\beta$ -амілоїду та гіперкалієвого середовища (моделювання гіперкальціємії <i>in vitro</i> ) на нейрони культури гіпокампу щурів.	<b>65</b>
3.3 Вплив моделювання гіперкальціємії на рівень внутрішньоклітинного кальцію в культурі нейронів гіпокампу.	<b>69</b>
3.4 Вплив блокатора відкриття мітохондріальної пори циклоспорину А на загибель культури нейронів гіпокампу при дії бета-амілоїду.	<b>73</b>
3.5 Вплив мемантину на життєздатність нейронів гіпокампу при активації глутаматних НМДА- рецепторів.	<b>75</b>
3.6 Вплив мемантину на життєздатність нейронів гіпокампу при дії $A\beta_{1-42}$ .	<b>80</b>
3.7 Вплив мемантину на сигналізацію кальцію у нейронах гіпокампу щурів, культивованих з $A\beta$ -амілоїдом.	<b>85</b>
3.8 Нейропротекторний вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) щодо життєздатності нейронів культури гіпокампу.	<b>89</b>
<b>РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.</b>	<b>95</b>
4.1 Вплив білка $A\beta$ -амілоїду та участі кальцію в умовах гіперкальціємії на нейрони культури гіпокампу	<b>95</b>

4.2 Дослідження впливу $A\beta_{1-42}$ -амілоїду на зміну внутрішньоклітинного кальцію та його вмісту в ендоплазматичному ретикулуму культивованих нейронах гіпокампу.	<b>99</b>
4.3 Роль відкривання мітохондріальної пори у загибелі нейронів гіпокампу під час дії $A\beta_{1-42}$ -амілоїду.	<b>101</b>
4.4 Захисні властивості антагоністу НМДА – рецепторів мемантину на життєздатність нейронів культури гіпокампу щурів при моделюванні ексайтотоксичності та при дії $A\beta$ -амілоїду.	<b>103</b>
4.5 Вплив мемантину на сигналізацію кальцію у нейронах гіпокампу щурів, культивованих з $A\beta$ -амілоїдом.	<b>108</b>
4.6 Вплив нанокристалічного діоксиду церію на життєздатність нейронів культури гіпокампа при токсичній дії бета-амілоїду.	<b>111</b>
<b>ВИСНОВКИ.</b>	<b>114</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.</b>	<b>116</b>
<b>ДОДАТОК 1</b>	<b>143</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

A $\beta$  – бета-амилоїд

APP – amyloid precursor protein

ХА – хвороба Альцгеймера

мтДНК – мітохондріальна ДНК

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕТЛ – електронтранспортний ланцюг

МППП – мітохондріальна пора перехідної проникності

РФК – реактивні форми кисню

ЦНС – центральна нервова система

АМРА – аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксалопропіонова кислота

APP – білок-попередник амілоїду (amyloid precursor protein)

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

LTP – довготривала потенціація

RyR – ріанодинові рецептори

ЕР– ендоплазматичний ретикулум

НДЦ – нанокристалічні матеріали на основі діоксиду церію

# ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

## Вступ

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 [1]. 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 [2]. 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 [3].

Характерними ознаками ХА є наявність у структурах мозку сенільних бляшок, які являють собою міжклітинні агрегати білка А $\beta$ -амілоїду (А $\beta$ ), 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 [4]. 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 [5,6].

За останні 25 років було проведено багато досліджень і отримано велику кількість даних стосовно фізико-хімічної та біологічної активності пептиду А $\beta$ , що є головним компонентом А $\beta$ -амілоїдних відкладень у мозку хворих на ХА [7]. 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 [8]. Формується А $\beta$ -амілоїд при укороченні первинного ланцюга APP спеціальними ферментами мембрани  $\beta$ -секретазами. Спочатку формується фрагмент C99, який далі укорочується з утворенням А $\beta$ -амілоїду. Мутаційні зміни APP та субодиниць  $\gamma$ -секретазного комплексу є найбільш поширеною причиною розвитку спадкової ХА [9].

А $\beta$  складається з 39–42 амінокислотних залишків. Дві основні його форми, А $\beta$ -40 та А $\beta$ -42, розрізняються лише двома залишками, але демонструють відмінні біофізичні, біологічні та клінічні властивості. А $\beta_{1-42}$  є більш нейротоксичним; він інтенсивно накопичується у вигляді вищезгаданих бляшок у гіпокампі та судинах головного мозку, що і призводить до ініціації ХА [10].

Було виявлено, що А $\beta$ -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 [1]. Експериментальними дослідженнями було встановлено, що А $\beta$ -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 [11].

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 $\beta$ -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 $\beta$  та ряду нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на життєздатність нейронів гіпокампу для визначення можливого механізму ушкоджуючої дії А $\beta$ .

### **Мета дослідження**

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

### **Завдання дослідження**

1. Відтворити токсичну дію А $\beta_{1-42}$  амілоїду на нейронах культури гіпокампу.
2. Визначити вплив А $\beta_{1-42}$ -амілоїду на внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в нейронах культури гіпокампу.
3. Визначити впливи А $\beta_{1-42}$ -амілоїду на життєздатність нейронів культури гіпокампу та рівень внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  в умовах моделювання гіперкальціємії.
4. Охарактеризувати вплив блокатору мітохондріальної пори циклосприну А на життєздатність нейронів гіпокампу при дії А $\beta_{1-42}$ -амілоїду.
5. Визначити вплив агоністу НМДА-рецепторів на життєздатність нейронів культури при дії бета-амілоїду.
6. Визначити вплив блокатору НМДА-рецепторів мемантину на внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  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 дослідження**

Приготування та підтримання первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампу щурів, подвійне забарвлювання 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 протягом 24 годин, 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, 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 виявляє 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 загиблих 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.

### **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 0116U004470 та 0120U001281).

## **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 А $\beta$ -амілоїдом, а також з низкою нейропротекторних та ушкоджуючих сполук, може значно розширити розуміння механізмів впливу А $\beta$ -амілоїду та причин, які призводять виникнення хвороби Альцгеймера. Отримані в роботі 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.Альперну: «Актуальні питання патологічної фізіології». – Харків, 26 березня, 2021; 5th HBP Student Conference on Interdisciplinary Brain Research, 1-4 February,

2021; XX-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; Матеріали XIX-го з'їзду 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 **140** с. Дисертаційна робота ілюстрована **25** рисунками. Список використаної літератури налічує **216** джерел.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Історія відкриття амілоїдних білків.

Вперше амілоїдні відкладення були визначені більше 150 років тому. У 1854 році Рудольф Вірхов ввів і популяризував термін амілоїд, щоб позначити макроскопічну аномалію тканини, яка виявила позитивну реакцію забарвлення йодом. Відкладення забарвлювалися в синій колір подібно крохмальним зернам у рослин. Незважаючи на те, що результати привели до неправильного висновку, про існування у людини крохмальних зерен подібно рослинам, звідси і пішла назва «амілоїд». Ця назва була спочатку введена Маттіасом Шлейденом в 1838 році для позначення конгломератів крохмалю в рослинних клітинах і була похідним від латинського *amylum* і грецького *amylon* [12,13].

У 20-х роках XX століття Беннхольд за допомогою барвника Конго червоного виявив характерне червоне забарвлення амілоїду при нормальному освітленні і подвійне заломлення променів зеленого кольору при поляризаційній мікроскопії. Даний метод залишається "золотим стандартом" для діагностики амілоїду. За допомогою електронної мікроскопії було встановлено, що амілоїд складається з фібрилярного білка з характерною унікальною перехресною  $\beta$ -складчастою конфігурацією поліпептидних ланцюгів.[2]

Іншою важливою групою специфічних барвників є флуоресцентні тіофлавін-Т і -S. При зв'язуванні тіофлавіну-S з амілоїдом відбувається посилення флуоресценції. Однак, цей барвник має досить високий рівень фонові флуоресценції і застосовується тільки в гістологічних дослідженнях. У тіофлавіну-Т при зв'язуванні з амілоїдом відбувається зсув

спектра флуоресценції в червону область. Саме тіофлавін-Т, разом з Конго червоним, використовуються в наш час для оцінки динаміки утворення амілоїдних фібрил *in vitro* [14].

Факт зв'язування різних амілоїдів одними і тими ж барвниками говорить про наявність у них схожої структури. Завдяки відкриттю подвійного променезаломлення при зв'язуванні амілоїдів з Конго червоним [15], стало зрозуміло, що амілоїди мають впорядковану ультраструктуру. Проте, тільки з появою електронної мікроскопії стало можливим вивчати тонку структуру амілоїдів.

Перші роботи по структурі амілоїдів із застосуванням електронної мікроскопії з'явилися в 1959 році. На основі вивчення гістологічних препаратів різних тканин, Коен і Калкінс показали, що всі амілоїдні включення мають фібрилярну структуру [15].

Після виділення з тканин і очищення амілоїди її зберігають свою фібрилярну структуру. Пізніше методом дифракції рентгенівських променів було показано наявність крос-бета структури у всіх відомих амілоїдів. [16].

У 1984 році Джордж Гленнер та Кеййн Вонг, вперше виділили попередньо не описаний білок, який утворює амілоїдні фібрили при хворобі Альцгеймера (ХА), розширивши цим інтерес до амілоїду, пов'язуючи його з одним із найважливіших захворювань людини.

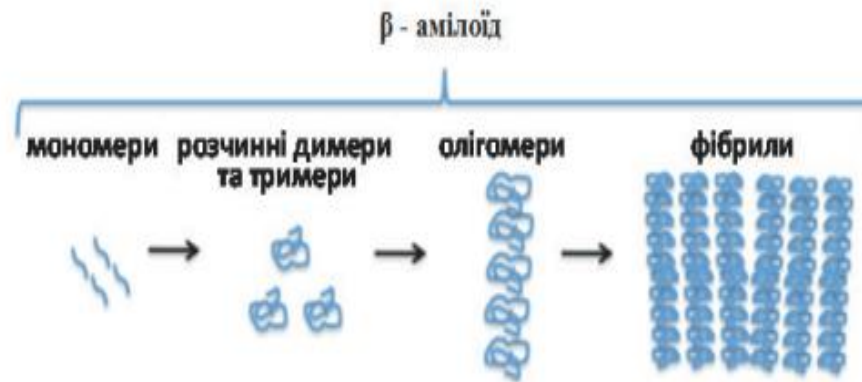
Дослідники, успішно виділили та секвенували перші 24 амінокислоти "цереброваскулярного амілоїдного білка фібрили  $\beta$ " і назвали цей білок  $\beta$ -білком. Утворення у мозку, при хворобі Альцгеймера, незабаром стали називати  $\beta$ -амілоїдом, сам білок - амілоїдом- $\beta$ , а його попередник - білком-попередником амілоїду, як ніби це єдиний тип амілоїду. Цей важливий документ заклав основу для проведення широких досліджень у наступні десятиліття, які в кінцевому підсумку встановили роль  $\beta$ -амілоїдозу як гравця в патогенезі ХА. Однак у роботах з хворобою Альцгеймера термін

амілоїд вживається без розбору для  $\beta$ -білка незалежно від того, чи він є розчинним, агрегованим, або у формі амілоїдної фібрили.[17]

Таким чином, вивчення структури амілоїдів пройшло довгий шлях від припущень про наявність впорядкованої структури, до детальних моделей організації амілоїдних фібрил. Разом з тим, залишається невирішеним цілий ряд проблем. Зокрема, до цих пір не існує методики розшифровки амілоїдної структури, сформованої великими білками, а не короткими пептидами. На даний час залишається незрозумілим, наскільки точно отримані *in vitro* моделі відповідають структурам, які формуються в живих організмах.

## **1.2. Будова і властивості амілоїдних пептидів.**

A $\beta$ -амілоїд являє собою частину більш довгої молекули білка-попередника A $\beta$ -амілоїду і складається з 695 амінокислот. Цей білок представляє собою інтегральний мембранний глікопротеїн, що зустрічається в різних тканинах організму і значно сконцентрований у синапсах нейронів [18]. Пептид A $\beta$  має здатність до автоматичної агрегації, тому може існувати у вигляді мономерів, які прогресивно агрегуються в димери, олігомери, останні, в свою чергу, можуть генерувати у фібрили **(Рис. 1.1.)** Фібрилярні утворення мають  $\beta$ -лишкову структуру, можуть осідати утворюючи позаклітинні амілоїдні бляшки. Амілоїд A $\beta$ <sub>1-42</sub> більш схильний до агрегації та фібрилізації, будучи найбільш нейротоксичним пептидом A $\beta$ , тому відіграє важливу роль у патогенезі ХА [19].



**Рис.1.1.** Схематичне представлення різних форм Аβ-амілоїду: мономер, розчинні димери та тримери, олігомери та фібрили [20].

### 1.2.1. Аβ Мономери

Аβ утворюється під час синаптичних процесів при відносно високих швидкостях виробництва . Він вивільняється як мономер Аβ активованими нейронами [21] і як було показано, модулює синаптичну активність в залежності від часу та концентрації [22].

З фізико-хімічної точки зору, мономер Аβ відноситься до класу внутрішньо неупорядкованих білків , які не мають фіксованої тривимірної структури . Тому багато досліджень зосереджуються на оптимізацію умов, здатних стабілізувати пептиди Аβ. Тривимірну структуру розчину різних фрагментів пептиду Аβ визначали за допомогою спектроскопії ядерно-магнітного резонансу (ЯМР), методів молекулярної динаміки (МД) та рентгенівської кристалографії [10].

Аβ метастабілізується у водних розчинах і набуває стабільності, утворюючи вторинну структуру в мембраноподібному середовищі [21]. Перші моделі пептиду Аβ (1-28), отримані за допомогою ЯМР, показали, що він згортається переважно в α-спіральну структуру з перетворенням у β-листи, що також може відбуватися на ранніх стадіях утворення амiлоїдів при Х А [23].

Також за допомогою ЯМР-спектроскопії дослідили структури розчину пептиду А $\beta$  (10-35). У воді цей білок руйнується на компактний ряд петель, (ниток) і втрачає бета-лишкову структуру. Приблизно 25% поверхні є гідрофобною, а компактна структура котушки є метастабільною, що може призвести до глобальної конформаційної перебудови та утворення міжмолекулярної бета-лишкової вторинної структури, спричиненої фібрилізацією. Трьохвимірні-ЯМР-структури пептиду А $\beta$  (8-25) та пептиду А $\beta$  (28-38) демонструють дві спіральні області, з'єднані  $\beta$ -оборотом типу I. Пептид А $\beta$  (25-35) - високотоксичний синтетичний, похідний пептидів А $\beta$ . Для перевірки конформаційних властивостей дослідники використовували ЯМР та CD дослідження пептиду А $\beta$  (25-35) та фтор-спиртів. Пептид поводить як типова трансмембранна спіраль у ліпідному середовищі, утворюючи фібрилярні агрегати, що говорить про прямий механізм нейротоксичності [24].

За допомогою ЯМР-моделювання пептидів А $\beta$  1-40 (А $\beta$ -40) та 1-42 (А $\beta$ -42) дослідили, що вони також мають дуже різні конформаційні стани, причому кінець С пептиду А $\beta$ -42 є більш структурованим, а залишки 31-34 та 38-41 утворюють  $\beta$ -шпиль, який знижує гнучкість С-кінця, що може бути причиною більшої схильності А $\beta$ -42 до утворення амілоїдів, ніж А $\beta$ -40. Дослідження молекулярної динаміки дають можливість припустити, що А $\beta$ -40 та А $\beta$ -42 дійсно можуть заповнювати численні дискретні конформації, що включають  $\alpha$ -спіральні або  $\beta$ -лишкові конформери, і такі структурні стани можуть швидко змінюватися. Гідрофобний С-кінець А $\beta$  має вирішальне значення для запуску трансформації з  $\alpha$ -спіральної в  $\beta$ -лишкову структуру і відіграє ключову роль у визначенні стану агрегації білка при ХА [25].

Мономери А $\beta$  агрегують в різні типи складок, включаючи олігомери, протофібрили та амілоїдні фібрили. Амілоїдні фібрили більші і нерозчинні, і вони можуть далі збиратися в амілоїдні бляшки, тоді як амілоїдні олігомери є розчинними і можуть поширюватися по всьому мозку.



### 1.2.2 A $\beta$ фібрили

Із 1960-х років з підтримкою електронних мікроскопів почались інтенсивні дослідження амілоїдів, локалізованих у різних органах (печінці, серці та мозку). Поступово разом з даними електронномікроскопічного та рентгеноструктурного аналізів склалося уявлення про структурну організацію амілоїдних фібрил. Згідно з даними Кіті і Добсона, амілоїдні фібрили мають середній діаметр близько 10 нм, а їх довжина може доходити до 15 мкм. Фібрила може складатися з 2-6 філаментів і мати різну морфологію. Фібрили можуть асоціювати латерально в стрічки, пучки, перекручуватися з різним періодом. Амілоїдні структури при рентгеноструктурному аналізі показують наявність  $\beta$ -крос структури, для якої характерна будова фібрил[26].

Перші дослідження амілоїдних фібрил, підтримували так звану «гіпотезу амілоїдного каскаду», яка передбачає, що агрегація A $\beta$  в бляшки призводить до нейротоксичності і деменції, що сприяють патогенезу хвороби Альцгеймера та інших амілоїдозів. Хоча пептид A $\beta$  може швидко агрегуватися, утворюючи фібрили, які відкладаються в амілоїдні бляшки, що пов'язані з ХА, подальші дослідження показали, що немає прямої кореляції між амілоїдними бляшками та втратою синапсів та нейронів у мозку з даною хворобою [27].

Багато шляхів можуть призвести до неконтрольованого формування фібрил. Однією з найбільш загальних причин неправильного згортання (місфолдингу) білкових молекул *in vivo* (або денатурації *in vitro*), є дестабілізація структури поліпептидного ланцюга, що в подальшому приводить до агрегації. *In vivo* вона може бути викликана різними мутаціями, помилки транскрипції та трансляції, помилки у процесі згортання, зміни внутрішньоклітинного середовища, оксидативним стресом, хімічними модифікаціями. *In vitro* до порушення структури білка

призводять фактори зовнішнього середовища, що викликають пошкодження гідрофобних областей білка, посилення гідратації руйнування внутрішньомолекулярних водневих зв'язків. До числа таких факторів відносяться значення рН, наявність солей, що екранують заряд білка, висока температура та інші чинники. Утворення фібрил також відбувається завдяки гідрофобним та електростатичним взаємодіям де преважають, міжмолекулярні, зв'язки [9]

Відомо, що амілоїдогенні пептиди та білки відрізняються за амінокислотою послідовністю та структурою. Амілоїдогенні білки мають різні характеристики четвертинної структури: можуть бути багаті на  $\beta$ -складки (листи),  $\alpha$ -спіралі або містити як  $\alpha$ -спіралі, так і  $\beta$ -складки; мати глобулярну жорстку структуру. Різні за структурою білки ( $\alpha$ - 30 спіральні,  $\beta$ -структурні, нативно розгорнуті,  $\alpha+\beta$ ,  $\alpha/\beta$ , одно- або мультидоменні) схильні до агрегації і здатні утворювати нерозчинні, насичені  $\beta$ -ланцюгами фібрилярні агрегати [26].

Попередні дослідження показали, що поліпептид амілоїду організований в характерну « $\beta$ -крос» структуру, у якій центральні протофіламенти перпендикулярні до осі фібрили, а певні фрагменти поліпептидних ланцюгів мономерів утворюють  $\beta$ -листи або ядро фібрили. Кожен протофіламент утворюється декількома  $\beta$ -листами мономерів,  $\beta$ -ланцюги яких паралельні один до одного. Фібрили, що складаються з декількох  $\beta$ -листів, в основному, мають протофіламенти, закручені ліворуч, причому ступінь закручення залежить від іонної сили [28]. Далі агрегація протофіламентів відбувається за допомогою гідрофобних сил та за відсутності екранування електростатичного відштовхування. Агреговані протофіламенти закручуються один відносно одного, формуючи фібрилу типу «закручена стрічка»[29]. Молекули амілоїдогенного білка здатні до формування  $\beta$ -ядра. Ядро фібрили, як правило, формується структурованим фрагментом амінокислової послідовності частково денатурованого білка.[30]. Радикали амінокислот у складі фібрил утворюють так звані

«канали зв'язування», що розташовуються вздовж довгої осі фібрили. Ширина цього каналу визначається відстанню між кожним другим радикалом амінокислоти та становить близько  $\sim 6,5$  Å. За допомогою методу дифракції рентгенівських променів було встановлено, що відстань між сусідніми молекулами білка в складі фібрили  $\sim 4,7$  Å [31]. При нормальному скручуванні,  $\beta$ -ядра розташовуються по колу навколо спільної осі, із періодом повторення  $115,5$  Å. Загальні структурні елементи амілоїдних фібрил з'єднуються  $\beta$ -ядрами з тісними інтерфейсами, позбавленим води, ця структура носить назву «стерична блискавка». Стабільність структури амілоїдних фібрил забезпечується саме «стеричними блискавками» за допомогою водневих зв'язків між ядрами  $\beta$ -листів [30].

Для формування та утворення фібрилярних структур потрібна часткова денатурація конкретного білка (специфічного для кожного захворювання), в результаті чого білок набуває здатності до полімеризації з утворенням білкових філаментів – амілоїдних фібрил. Окремі білки в процесі формування амілоїдних фібрил взаємодіють певними ділянками своєї будови, що називають амілоїдогенними послідовностями. Виділяють 2 класи амілоїдогенних послідовностей: послідовності з гідрофобними сегментами та послідовності, збагачені на глутамін та аспарагін [32]. Гідрофобні, ароматичні амінокислотні залишки сприяють агрегації, бо гідрофобні взаємодії є ключовим її фактором, як показано, зокрема, методами молекулярного моделювання.

Як високомолекулярні полімери амілоїдні фібрили мають такі загальні риси - це фібрилярна морфологія та  $\beta$ -складчастість просторової структури [26]. Також фібрили мають характерні тинкторіальні (барвникзв'язувальні) властивості, що призводить до специфічної спектральної відповіді флуоресцентного зонду. Як правило, амілоїдні фібрили визначають за допомогою флуоресцентних барвників — Тіофлавіну Т чи Конго Ред. Ці сполуки специфічно підвищують інтенсивність флуоресценції і змінюють

положення максимумів збудження та емісії у присутності фібрилярних протеїнів [33].

Завдяки електронній мікроскопії і рентгеноструктурному аналізу з'явилося більш точний опис амілоїдних фібрил. Амілоїдні фібрили можуть бути прямими або перекрученими, можуть містити багато протофіламентів, які розташовуються паралельно осі фібрили або закручуватися відносно один одного. Можна уявити, що амілоїдні фібрили представляють собою закручені в спіраль антипаралельні  $\beta$ -листи, всередині спіралі утворюється порожнина, подібно циліндру. [34]. За допомогою ЯМР вимірювання показали, що структури « $\beta$ -крос» амілоїдних фібрил можуть бути утворені паралельними ( $\alpha$ -синуклеїн,  $\beta$ -амілоїд тощо) або антипаралельними  $\beta$ -складками (амілін, гантінгтін тощо). [35].

На даний час незрозуміло, чи є невеликі відмінності у структурі та будові фібрил патологічно значущими, однак відомо, що незначна різниця у двох залишках А $\beta$ -40 та А $\beta$ -42 призводить до великих відмінностей у їх біофізичній, біологічній та клінічній поведінці. Трьохвимірна структура залишків 15-42 амілоїду А $\beta$ -42 приймає подвійну підковоподібну сукупність з максимально похованими гідрофобними бічними ланцюгами, в яких залишки 1-14 частково впорядковані у  $\beta$ -ланцюговій конформації, яка є у більш нейротоксичних видів, агрегується набагато швидше і домінує в сенільних бляшках у хворих на ХА. Подальші дослідження повідомляють, що когнітивні порушення виникали до відкладення бляшок або виявлення нерозчинних амілоїдних фібрил [36]. На противагу цьому, кількість А $\beta$  олігомерів збільшується на зрізах головного мозку з хворобою Альцгеймера, що є основою гіпотези А $\beta$ -олігомеру, яка стверджує, що саме розчинні олігомери А $\beta$ , а не нерозчинні фібрили або бляшки викликають збій в роботі синапсів та погіршення пам'яті і призводить до порушення функцій мозку на останніх стадіях захворювання [37].

### 1.2.3. Аβ олігомери

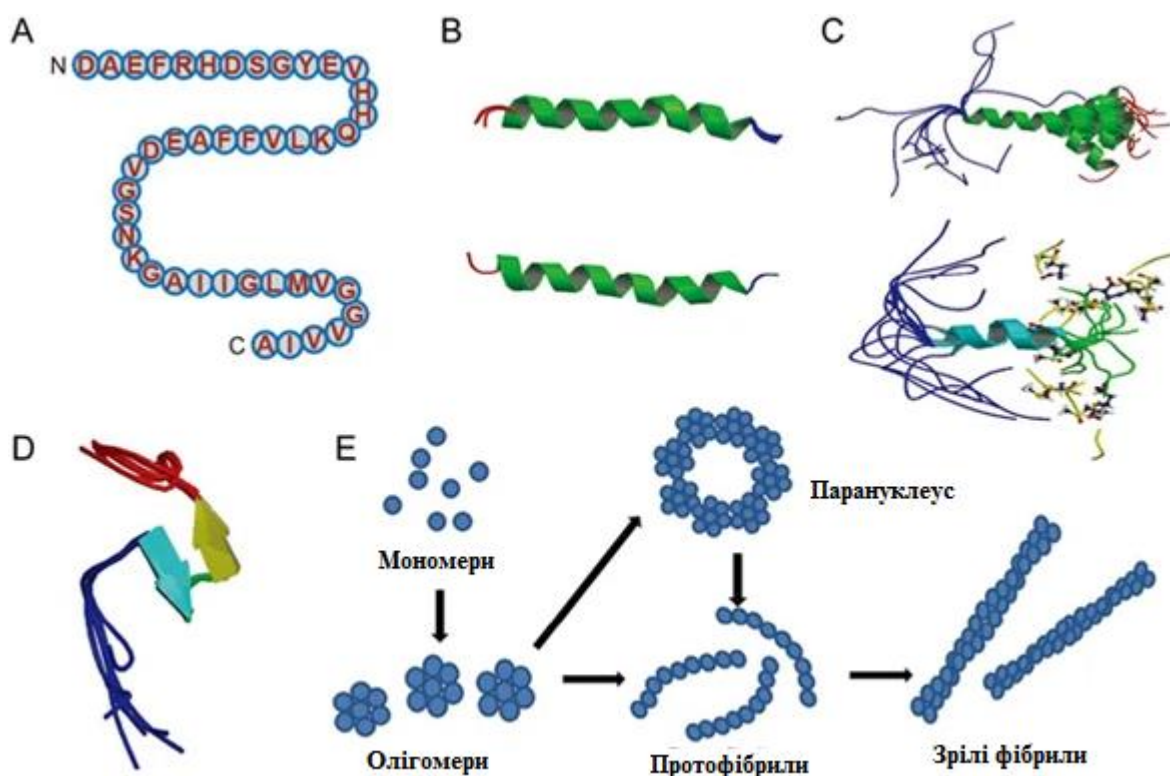
Гіпотеза про Аβ- амілоїд- олігомер (АβО) була введена в 1998 році. В ній було запропоновано, що пошкодження мозку, які призводили до хвороби Альцгеймера, виклика розчинні лігандоподібні АβО. Ця гіпотеза ґрунтувалася на відкритті, що синтетичні препарати АβО, що не містять фібрил, були потужними нейротоксинами ЦНС, які з часом спричиняли селективну загибель нервових клітин. Механізм був пов'язаний з порушеною сигналізацією за участю тирозин-протеїнкінази . З тих пір опубліковано понад 4000 статей, що стосуються АβО, включаючи понад 400 оглядів. Показано, що АβО накопичуються залежно від ХА у тканинах мозку людини та тварин та погіршують навчання і пам'ять, провокують основні аспекти нейропатології ХА, включаючи патологію тау, погіршення та втрату синапсів, запалення та окисдатовний стрес [38] .

Про виявлення амілоїд-β-олігомерів (АβО) у паренхімі та судинній оболонці мозку людини було вперше повідомлено під час впровадження та розробки оригінальної гіпотези про амілоїдний каскад. У той час АβО розглядалися як проміжні речовини на шляху до утворення амілоїдних бляшок, які, як вважали, є патологічною формою Аβ [39].

Сьогодні АβО широко вважається найбільш токсичною та патологічною формою Аβ, їх утворення відбувається рано, до появи бляшок, про що свідчать імунохімія та імуногістохімія.

Відомо, що амілоїдні фібрили більші, нерозчинні і збираються в амілоїдні бляшки, утворюючи гістологічні ураження, характерні для хвороби Альцгеймера, олігомери Аβ є розчинними і можуть поширюватися по всьому мозку. Розподіл розмірів β-олігомерів неоднорідне. Існує широкий консенсус щодо переважного накопичення розчинних високомолекулярних видів приблизно 100–200 кДа при відносно фізіологічних умовах *in vitro* [40]. Мономери β можуть утворювати скупчення вищого порядку, починаючи від олігомерів низької молекулярної

ваги, включаючи димери, тримери, тетрамери та пентамери, до олігомерів середньої діапазону молекулярної маси, включаючи гексамери, нонамери та додекамери, до протофібрил та фібрил (**Рис 1.2**). На відміну від фібрильної структури, щодо структури амілоїдних олігомерів відомо мало. Розчинні олігомери мають значний вміст бета-листів із змішаним паралельним та антипаралельним характером [41]. Структурна характеристика олігомерів є складною, оскільки їхні олігомерні стани є більш перехідними, ніж фібрили, і отримати гомогенні популяції олігомерів важко.



**Рис. 1.2** Структури Aβ – амілоїду мономерів, фібрил та олігомерів. (А) Первинна амінокислотна послідовність 42-амінокислот Aβ ізоформи Aβ-42. Aβ охоплює групу пептидів розміром від 37 до 49 залишків. (Б) Структура амілоїдного бета-пептиду (1–28), який утворює переважно альфа-спіральну структуру. (С) Структура амілоїдного бета-пептиду 1–40, у якому С-кінцеві дві третини пептиду утворюють альфа-спіральну конформацію. (D) Aβ-амілоїд 10–35, який утворює зруйновану структуру катушки. (Е) Перетворення бета - амілоїдних мономерів у олігомери, протофібрили та фібрили. Мономери Aβ можуть утворювати вузли

*вищого порядку, починаючи від низькомолекулярних олігомерів, включаючи димери, тримери, тетрамери та пентамери до олігомерів з молекулярною масою середнього діапазону[42].*

Різні типи розчинних амілоїдних олігомерів мають спільну структуру і мають спільний механізм токсичності [43]. Спочатку вони з'являються у вигляді сферичних агрегатів, а потім подовжуються шляхом злиття сферичних субодиниць із виглядом «бісеру», утворюючи попередник протофібрил на шляху до зрілих волокон. [44] .

Структура агрегатних форм  $A\beta$  і шляхи агрегації залишаються проблемами досліджень, хоча останнім часом було досягнуто значного прогресу у їх вивченні. Взаємодія  $A\beta$  з перехідними металами виявила потенційні патологічні взаємодії та структурні наслідки. Олігомери, які зазвичай можуть бути вбудовані в мембрану, зв'язуються з перехідними металами, такими як Cu, Zn та Fe [45]. Структурно зв'язані з металом сенільні бляшки відіграють певну роль у прискоренні агрегації амілоїдного бета-пептиду, а експресія олігомерів  $A\beta$ , у свою чергу, може регулювати гомеостаз металу [46].

Існує безліч доказів того, що підвищені рівні  $A\beta$  олігомерів в мозку мають патологічні наслідки, було виявлено, що  $A\beta$  олігомери викликають патологію тау, порушення аксонального транспорту, погіршення в роботі синапсів, окислювальний стрес, селективну загибель нервових клітин та ін. [38].

### **1.3. Утворення і роль APP в організмі**

Основною складовою амілоїдних бляшок, що виявляються при ХА є попередник  $A\beta$  пептиду, трансмембранний білок APP (Amyloid precursor protein) який являє собою один з найпоширеніших білків центральної нервової системи. Він повсюдно експресується в тканинах людини і

знаходиться в плазматичній мембрані, а також у декількох органелах, таких як ендоплазматичний ретикулум (ЕР), апарат Гольджі та мітохондрії [47]. APP є інтегральним мембранним глікопротеїном, у послідовності якого було ідентифіковано певні структурні домени. Зовнішньоклітинна ділянка набагато більша за внутрішньоклітинну та поділена на домени перший E1, який містить субдомени такі як металозв'язувальна петля, домен-інгібітор серинової протеази, і другий E2, який може зв'язувати протеоглікани в зовнішньоклітинному матриксі. Ген APP локалізований в 21 хромосомі і містить не менше 19 екзонів, що може призводити до появи ізоформ APP. Вони виникають в результаті альтернативного сплайсингу, мають різну довжину з молекулярною масою від 100 до 140 кДа. Це APP695, APP751 та APP770 (містять 695, 751 та 770 амінокислот відповідно).

Білки сімейства APP (695-770 а.з.) складаються з гідрофільного N кінцевого позаклітинного домену, гідрофобного трансмембранного домену та C кінцевого цитоплазматичного домену [22]. Порівняння ДНК людини та інших ссавців показує високу ступінь консервативності гена APP: встановлена 100% ідентичність APP695 з мозку людини і мавп. В нейронах центральної нервової системи домінує ізоформа APP695 [48]. APP синтезується і гліколізується в ендоплазматичному ретикулумі, потім переноситься в комплекс Гольджі для дозрівання перед транспортом до клітинної поверхні [22].

APP бере участь в адгезії, міграції, проліферації клітин, забезпечує гомеостаз холестерину і міді. У головному мозку APP бере участь у розвитку нейронів, утворенні і відновленні синапсів, забезпеченні синаптичної пластичності. Однак детальні механізми цих ефектів до кінця не вивчені [48].

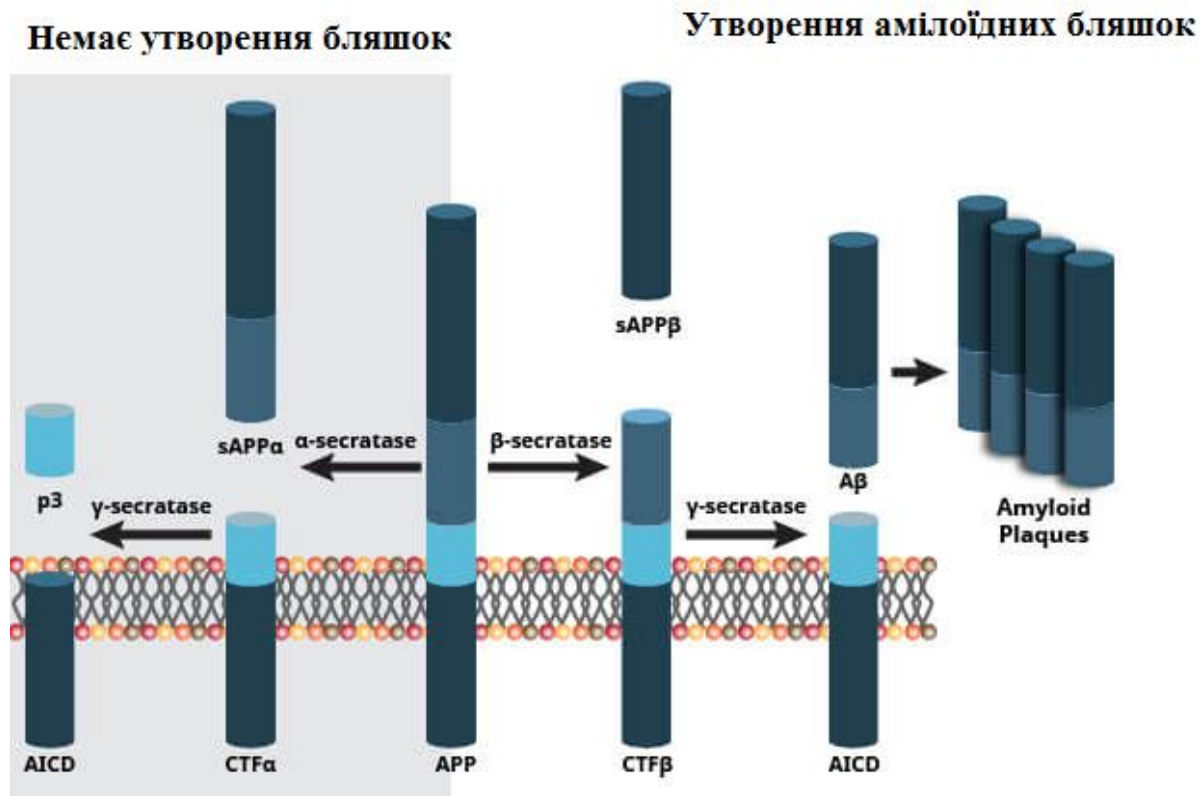
Все більше даних вказують на нейропротекторну роль цього мембранного білка в ситуаціях метаболічного стресу. APP сам по собі або його розчинні позаклітинні фрагменти (APPs $\alpha$ ) можуть сприяти виживанню нейронів. Дійсно, різні моделі гострої гіпоксії, ішемії тварин,



черепномозкової травми демонструють захисні ефекти APP або APPs $\alpha$ . Основні механізми включають APP опосередовану регуляцію гомеостазу кальцію через NMDA - рецептори, кальцієві потенціалкеруючі канали або внутрішнє депо кальцію. Крім того, APP впливає на експресію генів, пов'язаних з виживанням або апоптозом [49].

APP метаболізується двома різними та взаємовиключними шляхами: секреторним (або неамілоїдогенним) та амілоїдогенним. При неамілоїдогенному шляху білок APP спочатку розщеплюється  $\alpha$ -секретазою, вивільняючи розчинний N-кінцевий фрагмент (sAPP $\alpha$ ) та C-кінцевий фрагмент (C83), який далі розщеплюється  $\gamma$ -секретазою, щоб вивільнити менший C-кінцевий фрагмент 3 кДа (C3), це може бути пов'язано з апоптозом. Секреторне розщеплення APP опосередковується групою мембранно зв'язаних протеаз, які є членами сімейства ADAM (дезінтегрін та металопротеаза), а активність  $\alpha$ -секретази віднесена до ADAM-10 та ADAM-17 [50].

У амілоїдогенному шляху, утворення A $\beta$ -амілоїду, APP альтернативно розщеплюється  $\beta$ -секретазою, вивільняючи менший N-кінцевий фрагмент (sAPP $\beta$ ) та довший кінцевий фрагмент C (C99), який містить повну амілоїдогенну послідовність амінокислот. Подальше розщеплення APP  $\gamma$ -секретазою в районі мембранозв'язуючого домену призводить до появи пептидних фрагментів A $\beta$  пептиду різної довжини (39-43 амінокислотних залишків), причому, дві основні форми пептидів представляють собою варіанти A $\beta$  (1-40) і A $\beta$  (1-42) (з 40 і 42 залишків амінокислот, відповідно). Хоча варіант пептиду A $\beta$  (1-42) становить лише 10% від загальної кількості A $\beta$  пептиду, що секретується з клітин, він є основним білковим компонентом амілоїдних бляшок у гіпокампі та судинах головного мозку, є токсичним для клітин і призводить до ініціації ХА. При цьому дана форма A $\beta$  пептиду утворює агрегати *in vitro* набагато швидше, ніж пептид A $\beta$  (1-40) [51] (**Рис. 1.3.**).



**Рис. 1.3.** Утворення  $\beta$ -амілоїду. По центру показано мембрану клітини, яку пронизує білок-попередник амілоїду (APP); зліва від нього — нормальний перебіг, при якому бляшки не утворюються; справа — процеси, що призводять до формування амілоїдних бляшок. Позначення:  $A\beta$  —  $\beta$ -амілоїд; AICD — внутрішньоклітинний домен APP;  $CTF\alpha$  —  $\alpha$ -карбоксилтермінальний фрагмент;  $CTF\beta$  —  $\beta$ -карбоксилтермінальний фрагмент; p3 — p3-фрагмент;  $sAPP\beta$  —  $APP\beta$ , що секритується[52].

У фізіологічних умовах APP переважно метаболізується секреторним шляхом і існує рівновага між виробленням  $A\beta$  пептиду та кліренсом [48]. В даний час два білки вважаються тісно залученими до утворення пептидів  $A\beta$  у мозку: аполіпропротеїн Е (апоЕ) та фермент, що руйнує інсулін (ІДЕ). Точний механізм, за допомогою яких пептиди  $A\beta$  утворюються у мозку, не з'ясовано повністю, але домінуючою гіпотезою є те, що ці білки зв'язуються з пептидом  $A\beta$  і разом з ним утворюють сенільні бляшки. [19]. Неприятливі генетичні поліморфізми (такі як алель  $\epsilon 4$  апоЕ) та патологічні стани, пов'язані з аномальним гомеостазом ІДЕ (наприклад, цукровий діабет),

можуть сприяти амілоїдогенному розщепленню APP в мозку. Цей процес призводить до накопичення A $\beta$  в нервових тканинах, утворюючи амілоїдний каскад патологічних процесів, що викликає до розвитку нейрофібрилярних клубків і прогресування ХА. [49].

#### **1.4. Роль секретаз в утворенні бета-амілоїдів**

Як уже зазначалося, A $\beta$  є продуктом фрагментації білка попередника (APP) - трансмембранного білка I типу, позаклітинний N-кінцевий домен якого (sAPP) може бути відділений в ході двох незалежних шляхів протеолізу. Ферменти, задіяні в процесі відщеплення A $\beta$ , називаються секретазы [48].

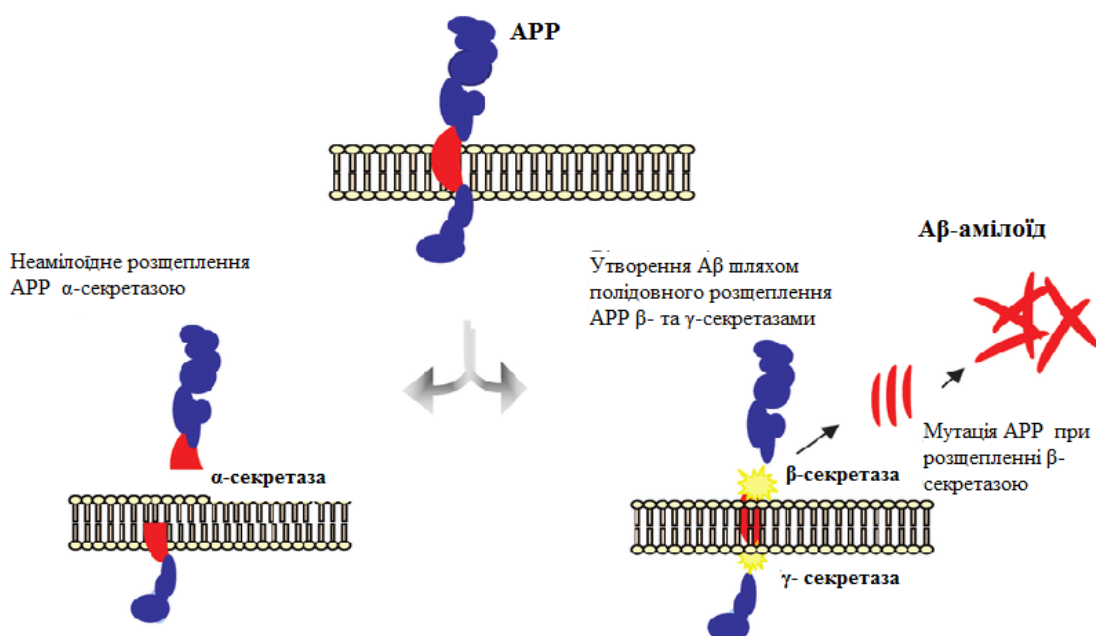
##### ***1.4.1 $\alpha$ -секретаза***

Основний шлях обробки APP - через шлях  $\alpha$ -секретази, при якому відбувається розщеплення на C-кінцевій стороні залишку 16 послідовності A $\beta$  і вивільняється розчинний N-кінцевий фрагмент (sAPP $\alpha$ ) та 83-залишковий C-кінцевий фрагмент (C83) (**Рис 1.4**). Конститутивна активність ще не визначена, але індукована  $\alpha$ -секретазна активність, знаходиться під контролем протеїнкінази C. Багато досліджень показали, що  $\alpha$ -секретаза - це мембранозмінна ендопроптаза, яка розщеплює APP насамперед на плазматичній мембрані. За допомогою профілювання інгібітора протеїнази було встановлено, що  $\alpha$ -секретаза є металопротеїназою цинку. Підтипи сімейства ADAM (дезінтегрін та металопротеїназа) мають активність, подібну до секретазы, і троє з них були запропоновані як  $\alpha$ -секретаза: ADAM9, ADAM10 та ADAM17. Як і APP, вони також є трансмембранними білками типу I [53].

ADAM10 є переважаючою формою  $\alpha$ -секретази в мозку, причому недавно дві рідкісні мутації ADAM10 були ідентифіковані як фактор, що призводять до ранньої форми ХА [54]. Однак це відкриття ще потребує

підтвердження. Даний шлях протеолізу, в якому задіяна  $\alpha$ -секретаза, називають неамілоїдогенним, оскільки відбувається фрагментація молекули APP поблизу зовнішньої поверхні мембрани між амінокислотними залишками всередині послідовності A $\beta$ , що запобігає подальше утворення молекули амілоїдного пептиду [54].

На відміну від A $\beta$ , sAPP $\alpha$  відіграє важливу роль у пластичності та виживанні нейронів і є захисним від ексайтотоксичності. sAPP $\alpha$  також регулює проліферацію стовбурових клітин нейронів і важливий для раннього розвитку ЦНС, більшість фізіологічних функцій APP опосередковується sAPP $\alpha$  [48].



**Рис. 1.4.** Схематичне зображення розщеплення білка-попередника амілоїду (APP) ферментами секретаз. В неамілоїдогенному шляху APP переважно розщеплюється  $\alpha$ -секретазою. У амілоїдогенному шляху нейротоксичні A $\beta$ -пептиди виділяються після послідовного розщеплення APP  $\beta$ - та  $\gamma$ -секретазами і надалі накопичуються в олігомерних агрегатах [55].

### *1.4.2. $\beta$ -секретаза*

Альтернативна більш рідкісна реакція розщеплення каталізується  $\beta$ -секретазою (BACE), яка здійснює розрив APP поблизу N-кінця відповідного A $\beta$  домену, розташованого поруч із зовнішньою стороною мембрани на відстані 16 амінокислотних залишків від місця розщеплення  $\alpha$ -секретазою (Рис. 1.4) [56] .

Активність  $\beta$ -секретази присутня у більшості клітин і тканин організму, але максимальна активність проявляється в нейронах . Між іншим, астроцити виявляють меншу активність  $\beta$ -секретази, ніж нейрони [57]. Активність  $\beta$ -секретази в клітинах ефективно розщеплює мембранозв'язані субстрати APP: APP конструкції, де бракує трансмембранного домену, не розщеплюються при трансфекції в клітини. Це означає, що  $\beta$ -секретаза, ймовірно, є мембранно пов'язаною протеазою або, альтернативно, тісно пов'язана з мембранним білком.  $\beta$ -секретаза має максимальну активність при кислотному рН, оскільки агенти, які порушують внутрішньоклітинний рН, також інгібують активність  $\beta$ -секретази.

Протягом 1999–2000 років п'ять команд дослідників дійшли висновку, що нова трансмембранна аспарагічна протеаза BACE1 (також названа мемапсином та Asp2) є  $\beta$ -секретазою. Дійсно, BACE1 виявляв усі відомі характеристики  $\beta$ -секретази. Послідовність 501 амінокислот BACE1 має риси еукаріотичних аспарагінових протеаз сімейства пепсинів.

Рівень експресії BACE1 значною мірою відповідає характеристикам активності  $\beta$ -секретази в клітинах та тканинах. Рівень мРНК BACE1 найвищий у мозку та підшлунковій залозі і значно нижчий у більшості інших тканин. Більше того, мРНК BACE1 багато експресується в нейронах, але мало міститься в гліальних клітинах мозку, що знаходяться в стані спокою [58].

Після  $\beta$  -розщеплення ектодомен APP також вивільняється як розчинний APPb (sAPPb). Хоча sAPPb відрізняється від sAPPa лише тим, що не має ділянки A $\beta$  1-16 на його карбоксильному кінці, повідомлялося, що sAPP $\beta$  опосередковує загибель клітин нейронів.

### ***1.4.3. $\gamma$ -секретаза.***

APP, що виник в результаті дії  $\alpha$ -секретази, або  $\beta$  секретаз, в подальшому піддається вторинному внутрішньомембранному ендопроотеолізу  $\gamma$ -секретазою, для генерації p83 та Ab відповідно, яка здійснюється пов'язаним з мембраною мультимерним білковим комплексом, що носить назву пресенілінового або  $\gamma$ -секретазного (**Рис. 1.4**). [48]

Фрагмент p83 швидко руйнується і вважається, що він не має жодної важливої функції.  $\gamma$ -секретазно-опосередковане розщеплення є унікальним в тому, що розщеплення відбувається в межах трансмембранного домену, хоча точне місце може варіюватися.  $\gamma$ -розщеплення може давати як A $\beta$ -40, більшість видів, так і A $\beta$ -42, а також вивільняти внутрішньоклітинний домен APP (AICD) [51].

Декілька біохімічних даних показали активність  $\gamma$ -секретази у високомолекулярному комплексі, що складається щонайменше з чотирьох компонентів: пресеніліну (PS, PS1 або PS2), нікастрину, APH-1 і APH-2, і посилювачі пресеніліну -2 (PEN-2). У ссавців є два пресенілінових гомологи, PS1 та PS2. Мутації в цих двох генах, зокрема PS1, є причиною у більшості випадків сімейної ХА.

Крім чотирьох головних компонентів є додатковий компонент  $\gamma$  -секретази це CD147 є трансмембранним глікопротеїном і взаємодіє з усіма чотирма основними компонентами  $\gamma$ -секретази. Зниження рівня CD147 збільшує вироблення A $\beta$ . TMP21 / p23 зв'язується з комплексом  $\gamma$  -секретази і регулює розщеплення  $\gamma$ , але не  $\beta$  розщеплення, через його

трансмембранний домен. Нещодавно був ідентифікований новий протеїн, що активує  $\gamma$ -секретазу (GSAP), і виявлено, що GSAP вибірково збільшує продукцію  $A\beta$  завдяки взаємодії як із  $\gamma$ -секретазою, так і з субстратом APP-CTF [44].

Наведені вагомі дані свідчать про те, що комплекс  $\gamma$ -секретази знаходиться насамперед у ендоплазматичному ретикулумі, апарату Гольджі (Golgi / TGN), ендоцитарному та проміжному відділах, більшість з яких (крім TGN) не є основними субклітинними локалізаціями для APP. Крім розщеплення APP-CTF,  $\gamma$ -секретаза розщеплює низку функціонально важливих трансмембранних білків, включаючи Notch, кадгерин, тирозиназу, ErbB4, CD44 тощо [59].

### **1.5. Фізіологічна роль бета амілоїду**

Хоча пептиди  $A\beta$  виробляються у великих кількостях при патологічних станах, вони також присутні у низькому рівні в мозку при нормальному стані, особливо під час синаптичної активності. Протягом багатьох років не було зрозуміло роль APP та  $A\beta$  в непатологічних станах, і вважалося, що  $A\beta$  є випадковим продуктом катаболізму APP і не має ніякої фізіологічної ролі. APP - це інтегральний білок мембрани, що має високу спорідненість до міді, всюди експресується. Цей білок необхідний для росту нейронів бере участь у нейророзвитку, синаптогенезі та клітинній адгезії [60].

У високих концентраціях (від наномолярних до мікромольних)  $A\beta$  викликає нейротоксичність та загибель клітин [61]. Також  $A\beta$ -амілоїд здатний індукувати апоптоз і некроз, причому розвиток будь-якого з цих процесів залежить від концентрації  $A\beta$ -амілоїду і типу клітин. Однак було досліджено, що низькі (пікомолярні) концентрації  $A\beta$  можуть діяти як трофічний сигнал і як модулятор синаптичної активності, що має наслідки для пам'яті та навчання. Крім того, мікродіаліз визначав пікомолярні рівні  $A\beta$  в інтерстиціальній рідині нормального, здорового мозку. [62] За

словами Cirrito та його колег, рівень пептидів Аβ в мозку динамічно та безпосередньо впливає на синаптичну активність. Крім того, мала кількість Аβ могла б діяти як антиоксидант, завдяки його здатності фіксувати окислювально-відновлювальні метали, такі як Cu, Fe та Zn, і, таким чином, перешкоджати їх участі у окислювально-відновлювальному циклі з іншими лігандами [21]; отже, Аβ має здатність функціонувати як хелатор і молекула антиоксидантів.

Аβ був широко вивчений завдяки його зв'язку з невритними бляшками в мозку людей хворих на ХА . Однак у непатологічних умовах також повідомлялося про існування Аβ. Враховуючи це, було зроблено багато спроб знайти фізіологічну функцію Аβ в мозку, зокрема його роль у синаптичній пластичності та виживанні нейронів. Фізіологічні рівні Аβ є важливими для синаптичної пластичності у здорових людей [63]. Враховуючи позитивні та негативні ефекти Аβ, висловлюється думка, що пептид виявляє подвійну дію: нейротрофну або нейротоксичну. Ці ефекти можуть бути пов'язані з різними аспектами, такими як його відносна концентрація, клітинне середовище, а також вік людей.

Низькі фізіологічні концентрації Аβ можуть відігравати ключову роль для регуляції синаптичної пластичності та поліпшення когнітивних функцій, тоді як накопичення високих концентрацій Аβ у поєднанні з віковими ефектами спричиняє порушення регуляції та втрату синаптичної функції, як показано при ХА [63].

Функціональні властивості Аβ не були повністю з'ясовані, проте численні дослідження свідчать про те, що пептид має нейротрофні властивості. Нещодавно було висловлено припущення, що розчинний Аβ відіграє важливу роль у сприянні росту нейронів, виживаності клітин, у модуляції синаптичної функції та захисті від окисного стресу.[22] Також фізіологічні концентрації Аβ сприяють процесам навчання та пам'яті. Крім того, було висловлено припущення, що мономери Аβ-40, що є найпоширенішим видом, що зустрічається в мозку, можуть функціонувати



як природні молекули антиоксидантів, запобігаючи загибелі нейронів, спричиненій окислювальним пошкодженням, спричиненим металами.[64]

Також відомо, що низькі пікомолярні концентрації препарату, що містить одночасно мономери та олігомери  $A\beta$ -42, викликають помітне збільшення довготривалої потенціації гіпокампа (LTP), тоді як високі наномолярні концентрації цього білка, призводять її зниження. Пікомолярні рівні  $A\beta$ -42 також спричиняють виражене підвищення як опорної, так і контекстної пам'яті страху. Таким чином, описані тут результати дослідження підтверджують подвійність ефектів  $A\beta$ , при якому низькі концентрації відіграють позитивну роль на нейротрансмісію та пам'ять, тоді як високі концентрації викликають добре відомий патологічний ефект, що проявляється в деменції [65].

### **1.6. Механізми токсичної дії бета-амілоїдних пептидів**

Пептид бета амілоїду ( $A\beta$ ) спочатку був ідентифікований та біохімічно охарактеризований у 1984 році як пептид, який агрегується та відкладається за межами нейронів у тканини мозку пацієнтів з хворобою Альцгеймера [4]. Цей процес призводить до утворення невритних бляшок (також званих сенільними або амілоїдними бляшками ) в мозку людей хворих на ХА. Вважається, що пептид  $A\beta$ , головний компонент цих бляшок і відіграє центральну роль при ХА. Ця гіпотеза виникла з того факту, що майже всі люди із синдромом Дауна (DS) або трисомією 21 хромосоми мають додаткову копію гена-попередника амілоїду на 21 хромосомі. Отже, вони мають високий рівень  $A\beta$ , а пацієнти з DS виявляють клінічні симптоми ХА до віку 40 років [2].  $A\beta$  представляє собою короткий пептид масою 4,2 кДа з 40-42 амінокислот, що утворюється при внутрішньоклітинному розщепленні білка попередника амілоїду (APP). [49].

У міру накопичення  $A\beta$  наші органи контролюють рівень амілоїдів за допомогою різних механізмів. У здоровому мозку концентрація пептиду  $A\beta$

регулюється його виробленням з APP та надходженням в мозок через гематоенцефалічний бар'єр, головним чином, через рецептор кінцевих продуктів вдосконаленої глікації (RAGE), а також за допомогою кліренсу з мозку через білок-1, пов'язаний з рецептором ліпопротеїдів низької щільності, та ферментативну деградацію в мозку. Таким чином, порушення цих регуляторних механізмів може призвести до накопичення та відкладення надмірної кількості пептиду A $\beta$  в мозку людини з ХА [66].

Полімерні форми A $\beta$  викликають зміни біохімічних молекул та функцій у клітинах мозку, внаслідок чого виникають кілька невропатологічних відхилень, пов'язаних із симптомами ХА. Початкові повідомлення в 1994 р. показали, що підвищений окислювальний стрес, одна з ранніх патологічних подій у ХА, опосередковувався перекисом водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), що утворюється в результаті відновлення іонів металів пептидами A $\beta$  [2]. Цей висновок узгоджується зі здатністю A $\beta$  захоплювати іони перехідних металів Cu, Fe та Zn, які є потужними каталізаторами окислення, тим самим заважаючи їм брати участь у окислювально-відновлювальному циклі з іншими лігандами. Ці елементи, зокрема Zn, також були залучені до сприяння олігомеризації пептидів A $\beta$ . Крім того, позаклітинне та внутрішньоклітинне скупчення іонів металів виявляється в мозку людей хворих на ХА з високою концентрацією A $\beta$  бляшок [67].

Внаслідок виробництва вільних радикалів, індукованого A $\beta$ , деякі біомолекули в мозку ХА зазнають конформаційні та структурні зміни внаслідок перекисного окислення ліпідів та окислювальної модифікації білків, що призводить до дисфункції цих молекул і тим самим впливає на функції клітин. [2]. Наприклад, окислена убиквітин карбокси-кінцева гідролаза L-1 (UCH L-1) призводить до протеасомальної дисфункції і, як наслідок, відбувається накопичення пошкоджених, неправильно складених та агрегованих білків. Окислювально модифікована креатинкіназа BB (CK) та глутаміносинтетаза (GS) сильно впливають на вироблення АТФ та приплив іонів кальцію в нейрони, що призводить до втрати функції іонних

насосів, порушення регуляції внутрішньоклітинного гомеостазу кальцію, зміни в LTP та мітохондріальної дисфункції з виділенням проапоптотичних факторів. Усі ці зміни можуть врешті-решт призвести до смерті нейрона.[68]. Підвищений окислювальний стрес, у свою чергу, також сприяє переробці APP за рахунок регуляції експресії гена BACE1, що призводить до збільшення генерації A $\beta$  [56].

Хоча пептид A $\beta$  відіграє найважливішу роль у синапсі, агрегат-опосередкована токсичність погіршує синаптичну функцію, що призводить до прогресуючої втрати пам'яті та когнітивної недостатності, пов'язаної з ХА. Синаптичну дисфункцію викликають зміни синаптичних структур та нейрохімічних речовин, викликані олігомеризованими A $\beta$ , а не амілоїдними бляшками. [22]. Дослідження нормального гіпокампу гризунів також показали, що розчинні A $\beta$ -олігомери, виділені з кори головного мозку пацієнтів з ХА або з культури тканин, знижують дендритну щільність і помітно гальмують LTP, що призводить до порушення синаптичної пластичності та пам'яті. Однак LTP не було порушено після лікування, що дозволяє припустити, що олігомерна форма, є синаптотоксичною. Було виявлено, що синаптична дисфункція, викликана олігомерами, пов'язана зі зменшенням поверхневої експресії як глутаматних рецепторів типу NMDA, так і AMPA [67], а також рівня білка постсинаптичної щільності-95 (PSD-95) в коркових нейронах. Всі три рецептори є ключовими білками постсинаптичної щільності (PSD), що беруть участь у регуляції синаптичної функції. Як рецептори глутамату, так і нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChRs) значно знижуються в мозку при ХА, можливо, завдяки інтерналізації рецепторів A $\beta$ . Зв'язування екзогенних A $\beta$  з nAChRs полегшує інтерналізацію та внутрішньонейронне накопичення цих токсичних пептидів, які можуть впливати на клітини нейронів. Крім того, недавнє дослідження запропонувало, що активація казеїнкінази II (CKII) A $\beta$  може стати основою для порушення синаптичної передачі [69].

Окрім прямого токсичного впливу, який чинить А $\beta$ , він продемонстрував активізацію декількох сигнальних шляхів всередині клітини через зв'язування з багатьма рецепторами клітини (інсулін, RAGE, NMDA, нікотинний тощо). Ці сигнальні шляхи можуть, зокрема, брати участь у нейронних пошкодженнях, що спостерігаються при ХА. Аналогічно, ці шляхи є перспективними молекулярними терапевтичними мішенями, що мають високий потенціал управління ХА [67].

Флуоресцентні дослідження ї показали, що А $\beta$  швидко зв'язується з усіма клітинними мембранами. Крім того, встановлено, що клітинний вплив А $\beta$  викликає збільшення внутрішньоклітинного кальцію, що тісно пов'язане з процесами пошкодження та загибелі клітин. Однак механізм, за допомогою якого виникає цей внутрішньоклітинний приріст кальцію, недостатньо вивчений [70].

Як високотоксичний пептид, А $\beta$  олігомер, безпосередньо стимулює апоптоз нейронів шляхом взаємодії з рецепторами клітинної поверхні. Більш того, довгострокове накопичення токсичних видів А $\beta$  -пептиду в паренхімі також призводить до окислювального пошкодження ДНК і білків, до фізичного пошкодження клітинних органел і порушення рівня внутрішньоклітинного кальцію. Кожен з цих чинників може спровокувати загибель клітин. Недостатність аутофагії і інших шляхів контролю якості білків сприяє дисфункції нейронів і клітин глії. Активація і проліферація гліальних клітин сприяють запаленню. Кілька процесів можуть впливати на ГАМК ергічні сигналізацію і сприяти втраті гальмівного тону [71].

## **1.7 Мітохондрії в патогенезі хвороби Альцгеймера**

Нейрони мають високі та постійні потреби в енергії для підтримки належної функції, тому їх цитоплазма містить велику кількість мітохондрій, які часто мають витягнуту або розгалужену форму. Мітохондрії є основними виробниками клітинної енергії, і мають суттєве

значення для виживання нейронів та їх функціонування. Вони являють собою клітинні органели, які виконують важливі функції: постачання клітини енергією у формі АТФ, генерація і регулювання концентрації реактивних форм кисню (ROS) та іонів кальцію в цитоплазмі, ініціація апоптозу [72]. Порушення функції цих органел відіграє провідну роль у походженні і клінічних проявах мітохондріальних захворювань, зумовлених мутаціями генів мітохондріальної або ядерної ДНК, що кодують учасників енергетичного метаболізму. Водночас встановлено, що дисфункція мітохондрій робить істотний внесок у процеси старіння, а також у патогенез низки захворювань, що характеризуються нейродегенерацією, зокрема, ХА [73,74]. Мутації в мітохондріальних ДНК призводять до посиленої генерації вільних радикалів, зниження вмісту АТФ і, відповідно, до втрати енергетичної потужності клітин. Тому порушення мітохондріальної функції може слугувати біомаркером розвитку ХА і мішенню для використання терапевтичних впливів [75,76]. Експериментальні моделі ХА *in vitro* та *in vivo* показали погіршення мітохондріальної функції, а саме зниження мітохондріального дихання і активності метаболічних ферментів, посилення окисного стресу і збільшення експресії  $\beta$ -амілоїду [73,74,77]. Мітохондріальна дисфункція включає в себе зміни активності ферментів мітохондріального дихального ланцюга з утворенням ROS, структурних аномалій мітохондрій, розвитком окисного стресу і подальшого апоптозу [74]. Ці мітохондріальні порушення проявляються ще до процесів відкладення  $\beta$ -амілоїду і тісно пов'язані з розвитком  $\beta$ -амілоїду- і  $\tau$ -патології при ХА [73].

## **1.8 Дисфункція мітохондрій і А $\beta$**

Групою вчених була висунута гіпотеза мітохондріального каскаду, що зв'язує накопичення бета-амілоїду, гіперфосфоріляцію тау-протеїну, клінічні прояви ХА, з дисфункцією мітохондрій. Відомо, що бета-амілоїд

може накопичуватися в ЕПР, мітохондріях, ендосомах, апараті Гольджі і ядрі. Як уже згадувалося, показано, що бета-амілоїд здатний порушувати роботу мітохондрій, проникаючи в їх матрикс. Таким чином, патологічний накопичення внутрішньоклітинного бета-амілоїду і його олігомерів може призводити до ще більшого порушення функції мітохондрій [78,79].

Відкладення А $\beta$ -амілоїду призводить до більшого пошкодження мітохондрій, взаємодіючи з А $\beta$ -амілоїд-зв'язаною алкогольдегідрогеназою мітохондріального білка (нейронний мітохондріальний фермент, підсилює А $\beta$ -амілоїд опосередковану мітохондріальну і нейронну дисфункцію). Утворений комплекс запобігає зміні проникності мітохондріальної мембрани і зниження активності дихальних ферментів. Крім того, при ХА також відзначалася зміна мітохондріальної рухливості, викликаючи мітохондріальне скорочення в нейритах [80]. Крім того, А $\beta$ -амілоїд порушує поділ і злиття мітохондрій, змінюючи експресію білків, які регулюють цей процес. Зниження потенціалу мітохондріальної мембрани викликає зміну мітохондріальної проникності, що є раннім фактором апоптозу. Вивільнення мітохондріального цитохрому С з міжмембранного простору мітохондрій в цитоплазму також є ключовою подією в активації каскаду реакцій, які призводять до загибелі клітин. Такі зміни в структурі мітохондрій були відзначені в патогенезі ХА [81]. Повідомлялося, що пептиди А $\beta$ -амілоїду присутні не тільки в нервових клітинах, а й в мітохондріях. При накопиченні А $\beta$ -амілоїду в мітохондріях розвивається інгібування мітохондріального респіраторного ферментного комплексу II і IV, що викликає зниження продукування аденозинтрифосфату (АТФ) і збільшення вироблення факторів окисного стресу при ХА [82]. Було виявлено, що накопичення А $\beta$ -амілоїду знижує активність ферменту циклу трикарбонових кислот. В ізольованих мітохондріях щурів А $\beta$  знижує частоту дихання, пригнічує активність комплексу IV транспортного ланцюга та знижує активність мітохондріальних ферментів  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази, цитохром оксидази та піруватдегідрогенази [77].

Синаптичні мітохондрії можуть бути особливо схильні до пошкодження шляхом агрегування А $\beta$  через високу потребу в енергії та потужний приплив  $\text{Ca}^{2+}$ , що виникає під час синаптичної активації, особливо при глутаматергічних синапсах [83]. Накопичення А $\beta$ -амілоїду призводить до порушення функціонування мітохондріальних кальцієвих каналів і посилення вивільнення цитохрому С, що викликає зміни  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостазу, що призводять до апоптозу [84].

### **1.9 Мітохондрії та внутрішньоклітинний дисбаланс кальцію**

Мітохондрії також відіграють важливу роль в підтримці гомеостазу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в нейронах. Мітохондріальні шляхи транспорту кальцію, як і загальнонейронні, регулюють такі важливі функції нервових клітин, як вивільнення нейротрансмітерів в синаптичний простір і дихання мітохондрій за рахунок дії на  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні дегідрогенази (підтримання біоенергетичного метаболізму). Порушення гомеостазу кальцію збільшує сприйнятливність нейронів до різних стрес-факторів. Надмірне накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях призводить до підвищення проникності внутрішньої мембрани мітохондрій, а також може викликати пошкодження зовнішньої мембрани, що веде до загибелі нейронів внаслідок некрозу або апоптозу . Порушення передачі кальцієвих сигналів відбувається і при інших патологіях мозку, наприклад ішемії/гіпоксії [83]. У випадку ХА такі порушення спостерігаються ще на ранніх стадіях захворювання. На підтримку останнього свідчать певні зміни у процесах регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ , підвищення синтезу токсичних форм А $\beta$ , а також мутації їх білка-попередника А $\beta$ PP та пресеніліну-1. Підвищене накопичення цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  викликає накопичення А $\beta$  та гіперфосфорилування тау-білка, що спричиняє загибель нейронів [74].

До патогенезу ХА також залучена активація пори неспецифічної проникності (ПНП) мітохондрій, яка спричиняє і передуює загибелі нейронів.

ПНП представляє собою мультипротеїновий комплекс в мембрані мітохондрій, який відповідає за регуляцію транспорту іонів та білків, також причетний до підтримання внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостазу. Так було продемонстровано, що блокатор мітохондріальної пори може суттєво зменшувати загибель нейронів гіпокампу викликану  $\text{A}\beta$  при моделюванні ХА [85].

Відомо, що на ранніх стадіях розвитку ХА серед патологічних процесів спостерігаються і порушення окиснення біомолекул (ліпідів, білків та нуклеїнових кислот) та інших біохімічних процесів. Ці процеси можуть призвести до незворотного відкривання ПНП, що може індукувати апоптоз. Існують літературні дані, згідно яких  $\text{A}\beta$  також здатний безпосередньо впливати на проникність ПНП. [85,86]

### **1.10. Будова та властивості нанокристалічного діоксиду церію.**

На початку ХХІ століття усе більшу увагу вчених привертають розробки, пов'язані з виробництвом матеріалів, отриманих за допомогою нанотехнологій. Нанотехнології - один з найперспективніших напрямків в сучасній науці і техніці. наномедицина має на увазі застосування технологічних можливостей і об'єктів нанотехнології з метою діагностики та лікування захворювань або поліпшення біологічних функцій організму. Причиною бурхливого розвитку нанотехнологій є наявність у наночасток властивостей, які обумовлюють їх ефективне використання не лише в промисловості, але й в медицині [87].

Церій (Ce) – рідкоземельний елемент (порядковий номер 58), який належить до лантаноїдів. Унікальність церію обумовлена тим, що він може існувати у різних станах окиснення ( $\text{Ce}^{3+}$  та  $\text{Ce}^{4+}$ ), на відміну від більшості інших рідкоземельних металів, які переважно існують у тривалентному стані [88]. Сам церій не має біологічного значення в фізіології ссавців, але розчинні солі  $\text{Ce}^{3+}$  використовуються в



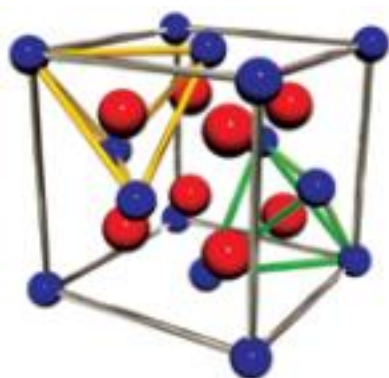
біомедичних цілях через їхню бактерицидну, бактеріостатичну, імуномодулюючу та протипухлинну активність [89,90].

Останнім часом спостерігається вибух фундаментального та практичного інтересу до розробки та застосування наночастинок як потенційних каталітичних антиоксидантів у біології та медицині [91]. Біологічна активність наночастинок діоксиду церію (НДЦ) визначається його кисневою нестехіометрією, яка залежить від розміру наночастинок і поверхневого ліганду [92]. Високий ступінь біосумісності, низька токсичність і каталітична активність НДЦ дозволяє розглядати його як перспективний наноматеріал для біомедичного застосування [88]. Проте нині всі можливі механізми його біологічної активності є маловивченими.

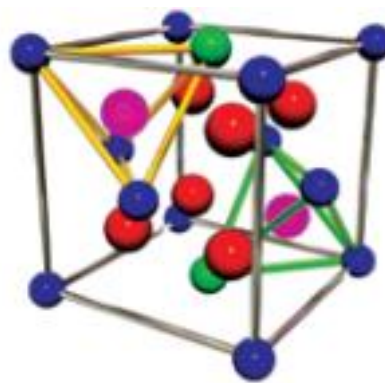
Доведено, що нанокристалічний діоксид церію може виступати в якості оксидоредуктаз – ензимів, що регулюють окисно-відновні процеси в біологічних системах [93,94]. За даними досліджень, припускають, що НДЦ повинен захищати клітини від руйнування за впливу несприятливих факторів, що викликають оксидативний стрес. Киснева нестехіометрія і пов'язана з нею можливість участі НДЦ в окисно - відновних процесах у живих клітинах, а також здатність до ауторегенерації забезпечує високу ефективність його застосування [94,95].

Нанокристалічний діоксид церію, входить до складу каталізаторів селективного окислення і дегідрогенізації. При переході в нанокристалічний стан, діоксид церію значно змінює свої фізико-хімічні властивості, причому характер цих змін досить незвичайний [93]. Зокрема, на відміну від цілого ряду речовин, зі зменшенням розмірів частинок параметр елементарної комірки  $\text{CeO}_2$  збільшується. Одночасно з цим змінюється киснева нестехіометрія внаслідок збільшення частки атомів, що знаходяться на поверхні наночастинок іонів  $\text{Ce}^{3+}$ . Низька енергія утворення кисневих дефектів у кристалічній решітці оксиду церію зумовлює можливість легко вступати в окисно-відновні реакції та інактивувати активні форми

окисгену та нітрогену [88,91]. Згідно з квантово-механічними розрахунками, енергія утворення кисневих дефектів у кристалічній решітці НДЦ знижується за зменшення розмірів частинок [17]. Зміну каталітичної активності наночастинок діоксиду церію можна досягти шляхом варіювання їх розмірів, дисперсності та лігандної оболонки [17, 36]. Це пов'язано з тим, що наночастинки, на відміну від частинок великого розміру, мають значно більшу кількість поверхневих дефектів, які переважно є поверхневими кисневими вакансіями, що спричиняють зміну у локальному електронному та валентному оточенні та стабілізують ступінь окиснення  $\text{Ce}^{3+}$ . Ця властивість надає діоксиду церію здатність накопичувати та вивільняти кисень зі своєї кристалічної решітки залежно від умов оточення. У нанорозмірного діоксиду церію внаслідок збільшення площі поверхні і, відповідно, кількості дефектів у ній зростає інтенсивність  $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$  окиснювально-відновного циклу та обмін кисню. Визначено критичний розмір НДЦ (в межах 1,1-1,3 нм), при якому всі іони церію в кристалічній решітці знаходяться в стані  $\text{Ce}(\text{III})$  [93]. Значна киснева нестехіометрія спостерігається для частинок  $\text{CeO}_2$  розміром менше 5 нм, і саме такі частинки проявляють максимальну активність в окисно-відновних процесах. На **Рис.1.5** представлені моделі кристалічної решітки макрокристалічного (1) і нанорозмірного (2)  $\text{CeO}_2$ , де показано, яким чином утворення кисневих вакансій призводить до збільшення кисневої нестехіометрії і підвищення частки атомів церію, що знаходяться в ступені окислення (III).



1.



2.

**Рис.1.5** Кристалічна структура стехіометричного макрокристалічного (1) і нестехіометричного (2) нанокристалічного діоксиду церію. ● -  $\text{Ce}^{3+}$ ; ● -  $\text{Ce}^{4+}$ ; ● -  $\text{O}^{2-}$ ; ● киснева вакансія.

Дослідження НДЦ з пероксидом водню методами рентгенівської фотоелектронної спектроскопії і УФ-спектроскопії показали, що збільшення співвідношення  $\text{Ce}^{3+}:\text{Ce}^{4+}$  в наночастинках безпосередньо корелює з підвищенням їх здатності виконувати функції супероксиддисмутази та каталази і діє як міметик. Ці результати переконливо підтверджують, що найбільш значущим фактором є саме присутність  $\text{Ce}^{3+}$  в поверхневому шарі.

Змінюючи стехіометрію нанодисперсного діоксиду церію можна регулювати його антиоксидантні й прооксидантні властивості та ензимоподібну активність. Існує необхідність подальшого дослідження функцій, властивостей та ролі НДЦ з метою поліпшення інтеграції біоміметичних наноматеріалів в організм людини та тварин, що є підставою для нових наукових розробок у галузі біології та медицини для профілактики, діагностики і лікування різних захворювань. Нині існуючі методи лікування хвороби Альцгеймера лише полегшують симптоми, але не перешкоджають прогресуванню захворювання. Крім того, в даний час лікування ХА обмежене через не тільки відносну неефективність терапевтичних засобів, а й через наявність гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), який обмежує проходження екзогенних речовин до мозку. У зв'язку з цим нанотехнологія являє собою інноваційний та перспективний підхід

завдяки властивостям наночастинок, що дозволяють їм безперешкодно перетинати ГЕБ. НДЦ є одним з таких кандидатів на біомедичне застосування. Унікальні редокс-властивості, низька токсичність і висока ступінь біосумісності дозволяють розглядати даний матеріал як найбільш перспективний наноматеріал антиоксидантного механізму дії.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### **2.1. Приготування первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампу.**

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.

Для одержання клітин для культивування новонароджених щурів 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 °C) 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 см<sup>2</sup> ) 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 CO<sub>2</sub> до 5 %, в кожену чашку Петрі додавали по 2 мл поживного середовища. Нейрони культивували в інкубаторі два тижні при 36 °С в атмосфері, збагаченій CO<sub>2</sub> 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.

## 2.2. Покриття скельця полілізином та ламініном

Покривні скельця (Fisherfinest, USA) обробляли розчином спирту (96 %) протягом 24 годин, потім промивали дистильованою водою та стерилізували в жарочній шафі при 180 °С протягом 2 годин. Скельця розміщували в стерильні чашки Петрі і на кожне скельце наносили 60 мкл суміш полілізину (0,05 мг/мл) та ламініну (0,005 мг/мл). Покриті скельця, витримувались протягом 24 год при 36 °С в атмосфері, збагаченій 5 % CO<sub>2</sub>, після цього промивались тричі розчином для виділення гіпокампу **Таб. 2.3.**

## 2.3. Обробка клітин гіпокампу реагентами

### *Обробка клітин культури гіпокампу Aβ-амілоїдом*

У наших експериментах клітинну *in vitro* модель ХА одержували внаслідок 24-годинної інкубації нейронів культури гіпокампу з Aβ<sub>1-42</sub>-амілоїдом (Sigma-Aldrich, США) у кінцевій концентрації 2 мкМ. Для отримання концентрованого розчину Aβ<sub>1-42</sub>-амілоїду (“Sigma”, США) розчиняли в DMSO і зберігали при температурі –20 °С. Кінцева концентрація DMSO не перевищувала 0.5 %.

### *Обробка клітин культури гіпокампу нанокристалічним діоксидом церію (НДЦ)*

З метою дослідження впливу НДЦ на життєздатність нейронів при дії бета-амілоїду, окрему групу культури клітин спільно інкубували з  $A\beta_{1-42}$  (2 мкМ, 24 год.) та НДЦ (1:100, 24 год., Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ, Україна) у різних конфігураціях введення діючих речовин. Концентрований розчин НДЦ готували на диметилсульфоксиді та зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Кінцева концентрація диметилсульфоксиду не перевищувала 0,5 %.

### *Обробка нейронів циклоспорином А.*

З метою заблокувати відкриття мітохондріальної пори, нейрони попередньо інкубували з циклоспорином А, (Sigma-Aldrich, США) (1,25 мкМ/л, 30 хв). Концентрований розчин циклоспорино А готували на диметилсульфоксиді та зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Кінцева концентрація диметилсульфоксиду не перевищувала 0,5 %.

### *Обробка нейронів мемантином та НМДА.*

З метою дослідження впливу неконкурентного низькоафінного антагоністу НМДА – рецепторів мемантину (Sigma-Aldrich, США) (50 мкМ, 24 год.) та власно агоністу НМДА (Sigma-Aldrich, США) (10 мкМ, 24 год.) на життєздатність нейронів при дії бета –амілоїду культури клітин гіпокампу інкубували окремо та спільно з  $A\beta_{1-42}$  та зазначеними реагентами.

### *Моделювання гіперкальціємії на нейронах гіпокампу.*

З метою дослідження впливу зміни концентрації кальцію за умов моделювання гіперкальціємії, як прикладу порушення кальцієвого гомеостазу, на життєздатність клітин культури гіпокампа при одночасній дії амілоїда клітини інкубували окремо з  $\text{CaCl}_2$  (3 мкМ, 24 год.; моделювання

гіперкальціємії) (Sigma-Aldrich, США) та спільно з  $\text{A}\beta_{1-42}$  та зазначеним реагентом.

## **2.4. Забарвлювання нейронів гіпокампу**

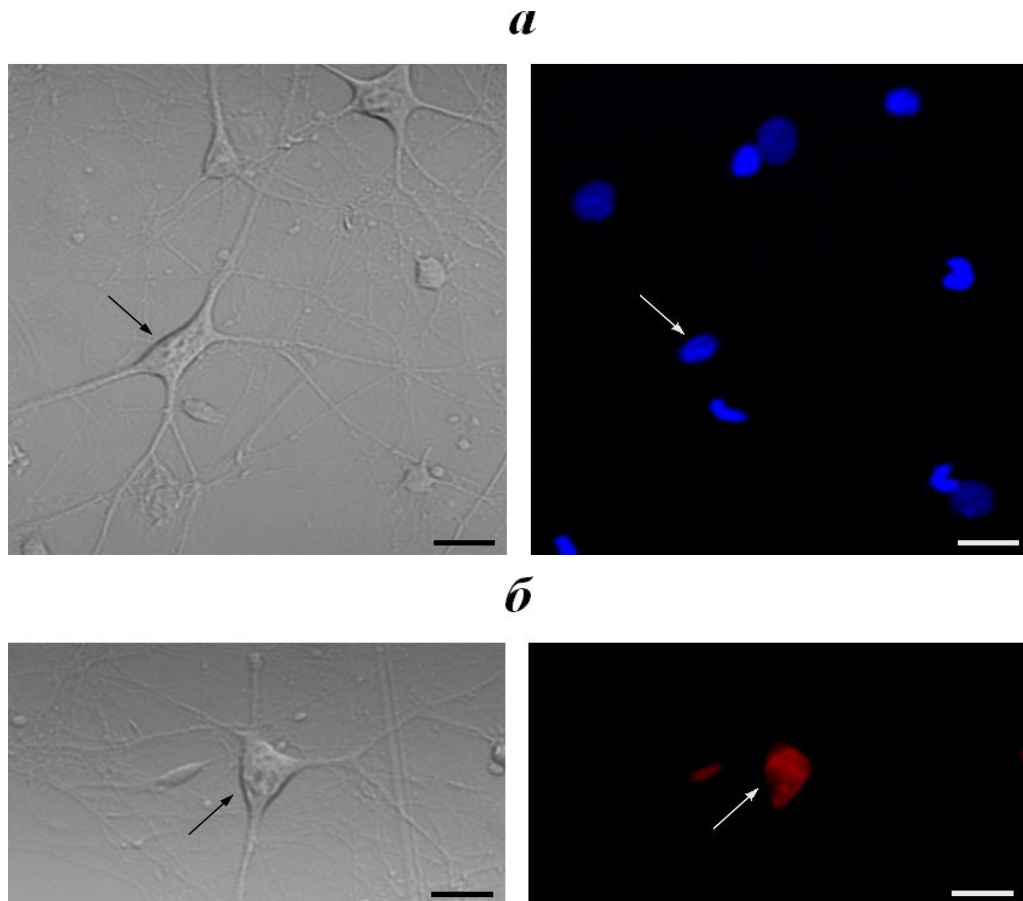
В експериментах використовували метод подвійного забарвлювання нейронів культури гіпокампу за допомогою барвників Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США, індикатор ДНК, що знаходиться в ядрах клітин), та пропідіуму йодиду (ПЙ, Sigma-Aldrich, США, індикатор некротичних клітин). Контрольні, а також оброблені 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.

## **2.5. 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 рівномірніше по всьому об'єму ядра, і Hoechst 33258 в них слабо флуоресціює синьо-блакитним світлом (**Рис.2.1, а**). 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) (Рис. 2. 1, б).



**Рис.2.1.** Мікрофотографії пірамідальних нейронів культури гіпокампу (типові зображення). а – фазовий контраст (зліва) та флуоресценція Hoechst 33258 (справа; синій колір) у живому нейроні (вказано стрілкою); б – фазовий контраст (зліва) та флуоресценція пропідію йодиду (справа; червоний колір) у некротичному нейроні (вказано стрілкою); масштаб 50 мкм

## **2.6. Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія.**

Для отримання флуоресцентних зображень та підрахунку нейронів у експериментах використовували конфокальний лазерний скануючий мікроскоп FV1000-BX61WI та програмне забезпечення FluoView «Olympus» (Японія) або Image J (National Institutes of Health, США). Довжина хвиль збуджуючого лазерного випромінення становила 352/405 нм при використанні Hoeschst 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.

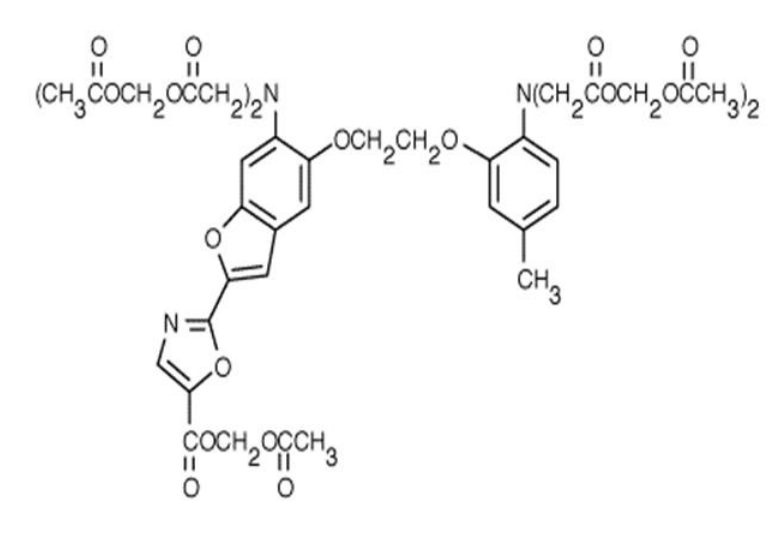
## **2.7. Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію.**

Для визначення концентрації кальцію в нейронах культури гіпокампа використовували мембранопроникну форму барвника Fura-2/AM (**Рис 2.2**).

Культуру нейронів перед експериментом забарвлювали в розчині барвника Fura-2/AM (5мкМ) протягом 30 хв. Потім скельця з нейронами відмивали від барвника та переносили 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 [96] 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) протягом 5 с. Після відновлення рівня кальцію до базового рівня проводили аплікацію кофеїну (10 мМ; 5 с.) для виявлення вмісту кальцію в ендоплазматичному

Стимуляція клітин електричним полем [97] 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.



**Рис. 2.2.** Хімічна формула молекули *fura-2/AM*.

## 2.8. Розчини та реактиви

**Флуоресцентна кальційметрія.** Базовий розчин, який використовувався під час усіх експериментальних процедур, представлено в табл. 2.1.

NaCl	140
KCl	2
MgCl <sub>2</sub>	2
CaCl <sub>2</sub>	2
HEPES	10
глюкоза	10
pH	7.35

*Таблиця 2.1. Базовий розчин для двохвильового вимірювання внутрішньо-клітинної концентрації кальцію (мМ).*

Даний розчин використовувався в якості перфузуючого розчину в експериментальній камері.

Для індукування кальцієвих транзйєнтів використовували гіперкалієвий розчин (табл. 2.2).

NaCl	82
KCl	50
MgCl <sub>2</sub>	2
CaCl <sub>2</sub>	2
HEPES	10

глюкоза	10
pH	7.35

*Таблиця 2.2. Гіперкалієвий розчин (мМ).*

Всі розчини аплікували до клітин культури гіпокампа шляхом повної заміни розчину в експериментальній камері.

**Культура клітин.** До складу розчину для виділення гіпокампа входили основні компоненти, відображені в **табл. 2.3**.

NaCl	140
KCl	5
CaCl <sub>2</sub>	0.2
HEPES	10
глюкоза	10
pH	7.35

*Таблиця 2.3. Розчин для виділення гіпокампа (мМ).*

У даний розчин також обов'язково додавали антибіотики: натрієву сіль бензилпеніциліну 50 од/мл та стрептоміцину сульфат 50 мкг/мл.

Поживне середовище для культивування нейронів гіпокампа містило наступні компоненти: 90% мінімального середовища Ігла ( MEM, “SIGMA”, США), бікарбонатний буфер (2.2 г/л NaHCO<sub>3</sub>), 10% кінської сироватки (“GIBCO”, США), 10 мкг/мл інсуліну та антибіотики: натрієву сіль бензилпеніциліну – 50 од/мл та стрептоміцину сульфат 50 мкг/мл.

## **2.9. 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  $P < 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

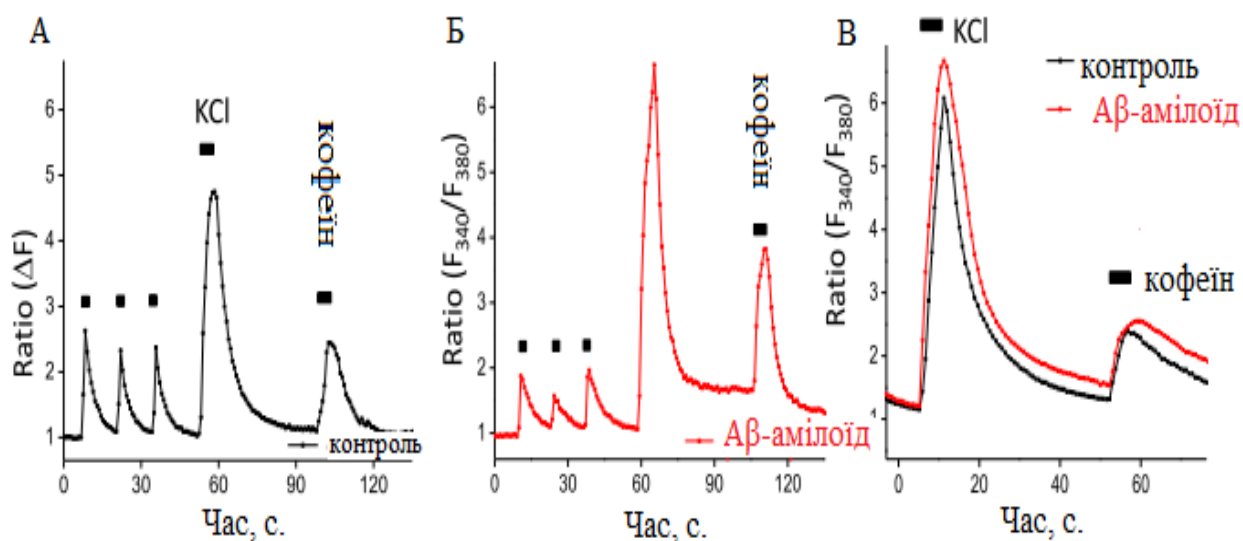
### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### **3.1 Вплив $A\beta_{1-42}$ -амілоїду на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію та його вміст в ендоплазматичному ретикулумі культивованих нейронах гіпокампу.**

У всіх нейронах здійснювали вимірювання рівня вільного кальцію в нормальних умовах під час стимуляції клітин різними чинниками: 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; 5 с) для виявлення вмісту кальцію в ендоплазматичному ретикулумі.

Введення гіперкалієвого розчину призводить до деполяризації нейронів, що призводило до надходження кальцію через потенціалчутливі кальцієві канали. Стимуляція полем та гіперкалієвим розчином перед введенням кофеїну сприяли наповненню внутрішньоклітинних кальцієвих депо, а також викликала деполяризацію клітини і входження кальцію в клітину через потенціал чутливі кальцієві канали. Кофеїн являється агоністом ріанодинових кальцієвих рецепторів, і тому його застосування викликає вивільнення кальцію з ендоплазматичного ретикулуму.

Зміни внутрішньоклітинного рівня кальцію, що відбувались внаслідок цих процедур, показано на **Рис. 3.1.1** в контролі (частина **А**) та в нейронах культури гіпокампу інкубованих 24 год з додаванням 2 мкМ  $A\beta_{1-42}$  – амілоїду в культивоване середовище (частина **Б**).



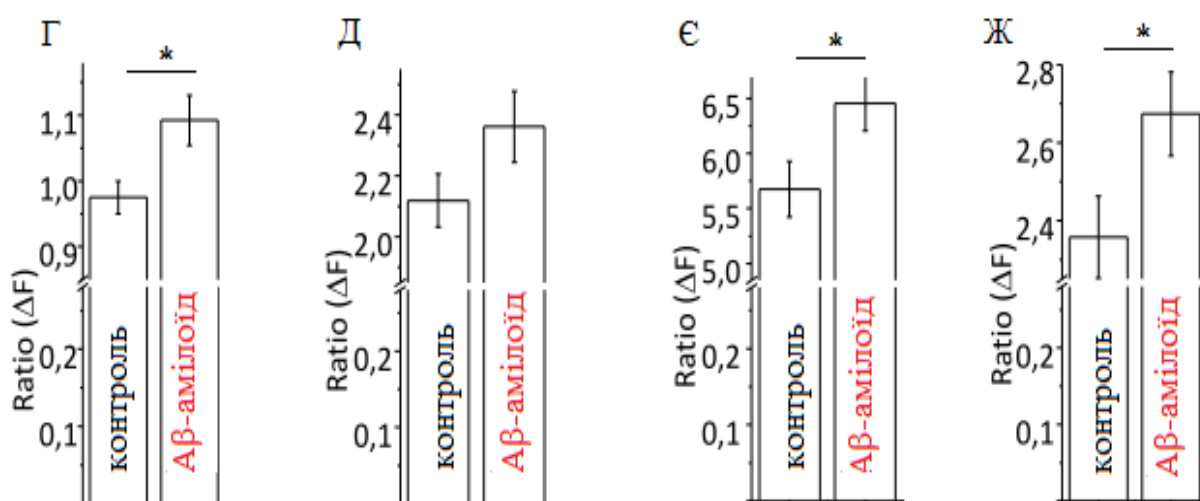
**Рис. 3.1.1** Кальцієві транзйєнти в культивованих клітинах гіпокампу, викликані деполяризацією плазматичної мембрани за допомогою аплікації гіперкалієвого розчину в контролі та при дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$  ( $\beta$ -амілоїд). Дані флуоресцентної мікроскопії з використанням Fura-2/AM представлені 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.3.1.1**, 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 транзйєнту, 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 транз'єнтів, 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.



**Рис. 3.1.2** Усереднені значення кальцієвих транз'єнтів, викликаних деполяризацією плазматичної мембрани за допомогою аплікації гіперкалієвого розчину в контролі та при дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$  ( $\beta$ -амілоїд) в культивованих клітинах гіпокампу (Рис 3.1.1).

Частина Г є базальний рівень сигналу до появи  $Ca^{2+}$  транз'єнту; амплітуда  $Ca^{2+}$  транз'єнту (частина Д; стимуляція нейронів електричним полем); амплітуда  $Ca^{2+}$  транз'єнту під час аплікації деполяризуючого розчину (частина Є; 50 мМ KCl; 5 с); пікове значення обумовленого аплікацією розчину з 10 мМ кофеїну (частина Ж).

У наших експериментах дані могли відрізнятися в кожній групі за кожен день. Тому, щоб зменшити похибку вимірювань, спочатку обчислювалось значення відповідного параметру для кожного дня запису, а отримане середнє значення порівнювалось з таким в контролі та при дії  $A\beta_{1-42}$  для кожного дня експерименту **Рис.3.1.2.** 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 транз'єнту 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.

Наші експерименти показали, що у культивованих з  $A\beta_{1-42}$  амілоїдом нейронах гіпокампу у порівнянні із контролем відбувалось збільшення як базального рівня вільного кальцію на 12% ( $p < 0.05$ ), збільшувалась амплітуда кальцієвих відповідей на аплікацію 50мМ розчину KCl на 14% ( $p < 0.05$ )) та введення кофеїну на 13% ( $p < 0.05$ )), що свідчить про збільшення вмісту  $Ca^{2+}$  в ендоплазматичному ретикулумі.

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.

### **3.2 Вплив $A\beta$ -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

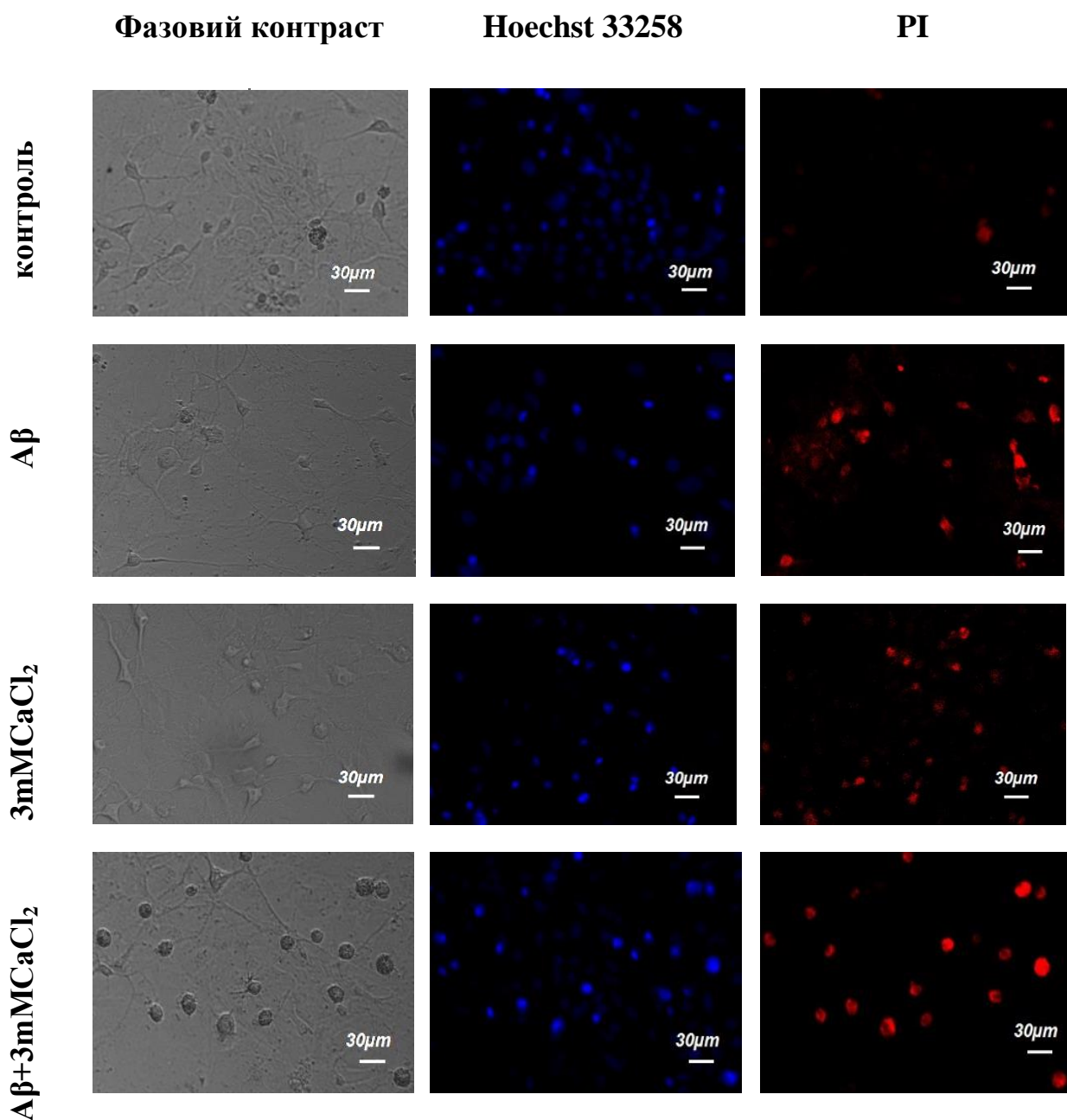
одночасній дії бета-амілоїду. Накопичення останнього є основою гіпотези «амілоїдного каскаду» щодо патогенезу ХА. Отримані результати мають відображати значення змін клітинної сигналізації кальцію як однієї з причин нейродегенерації у рамках перевірки кальцієвої гіпотези зазначеної патології [98]. З даною метою, було проведено чотири серій експериментів:

1. Контрольна.
2. Введення 3мМ  $\text{CaCl}_2$ , моделювання гіперкальціємії.
3. Введення амілоїда  $\text{A}\beta_{1-42}$ .
4. Одночасне введення 3мМ  $\text{CaCl}_2$  та  $\text{A}\beta_{1-42}$ .

У контрольних зразках культури клітин гіпокампа щурів ( $n= 962$ ) переважна більшість клітин в середньому ( $82,4 \pm 2,39 \%$ ) не проявляли будь-яких ознак патологічних змін оцінювалась, як живі. Ядра таких клітин рівномірно накопичували нуклеофор Ноеchst 33258 і характеризувалися слабо синьою флуоресценцією, мали чіткі контури та інтактну ядерну архітектуру. Ядра відносно невеликої частини нейронів в контрольних зразках ( $10,7 \pm 1,66 \%$ ) із яскраво синьою флуоресценцією демонстрували фізіологічні зміни в ядерному хроматині, такі як його конденсація та фрагментація, що є всіма ознаками апоптозу. Ті нейрони, ядра яких в контрольних умовах забарвлювались ПЙ і давали червону флуоресценцію (що свідчило про їх некротичне переродження), склали  $6,9 \pm 1,76 \%$  в середньому по групі (**Рис.3.2.1**).

Після інкубації зразків культури клітин гіпокампу в середовищі з підвищеним вмістом  $\text{CaCl}_2$  (3 мМ, 24 год.; моделювання гіперкальціємії,  $n=2108$ ) кількість живих клітин становила лише приблизно половину дослідженої групи (в середньому  $53,5 \pm 4,05\%$ ). Нейрони з апоптотичними змінами в даних умовах складали  $26,2 \pm 4,2 \%$ . Група клітин з ознаками некрозу була численнішою, ніж в контрольних зразках, приблизно на 15 % ( $P < 0.001$ ), у середньому їх кількість становила  $20,3 \pm 2,79 \%$  (**Рис.3.2.1, Рис.3.2.2**). Таким чином, введення  $\text{CaCl}_2$  в середовище культивування

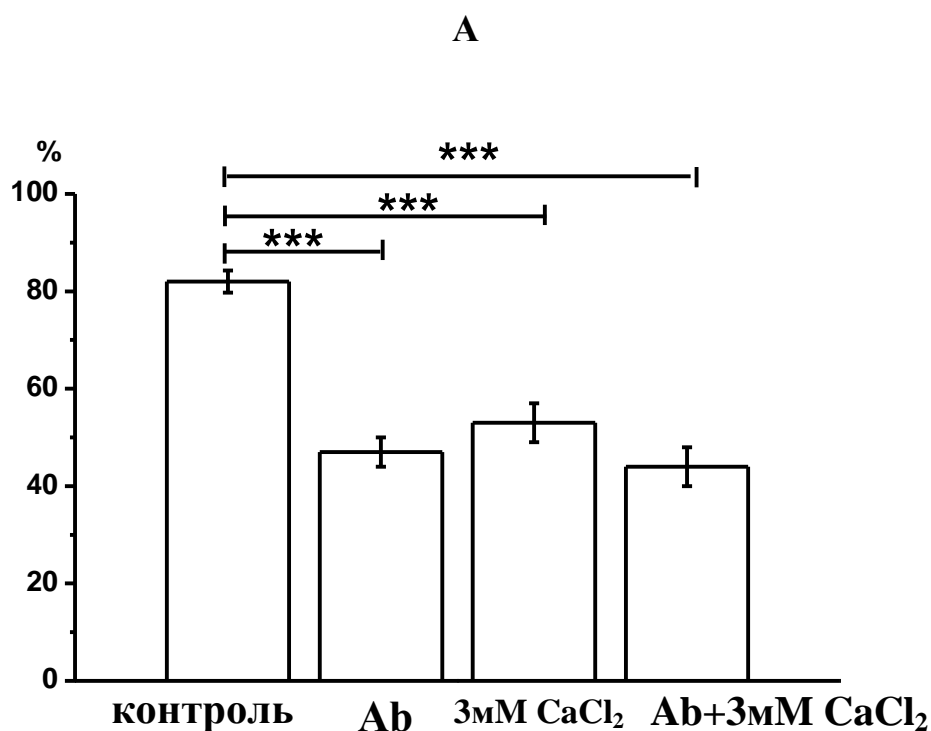
індукувало загибель нейронів гіпокампу, у половині клітин дослідженої вибірки відзначалися виражені патологічні зміни.



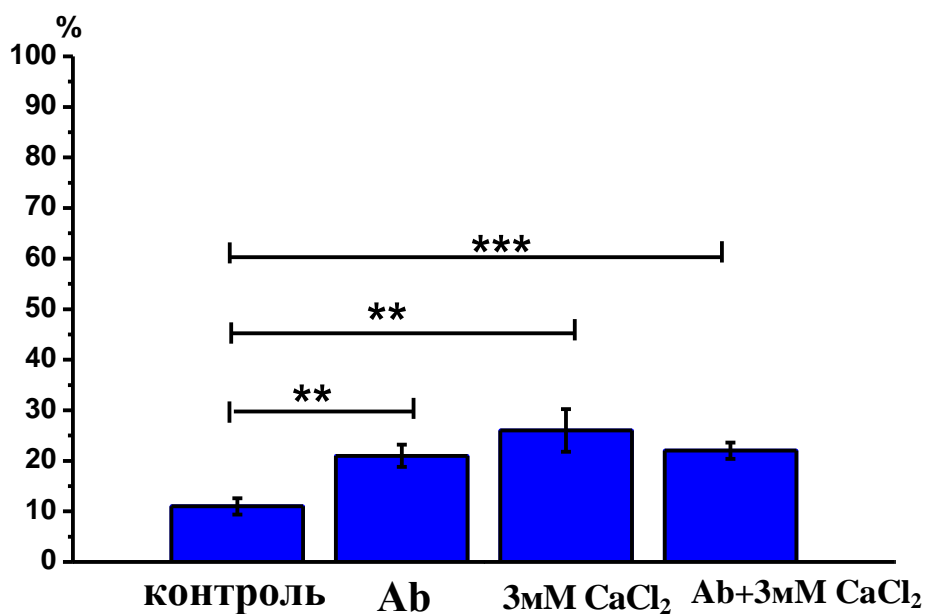
**Рис.3.3.1.** Вплив середовища з високим вмістом кальцію та Aβ<sub>1-42</sub> на життєздатність нейронів гіпокампу в культурі клітин. Зображення культивовані нейрони гіпокампу: А) інкубуються в контролі, середовище (2,0 мМ Ca<sup>2+</sup>), Б) після інкубації в присутності високого позаклітинного кальцію (3,0 мМ), В) у присутності Aβ<sub>1-42</sub> (2,0 мкМ) та Г) у поєднанні з високим вмістом кальцію та Aβ<sub>1-42</sub> (3,0 мМ Ca<sup>2+</sup> + 2,0 мкМ Aβ<sub>1-42</sub>).

Зображення отримували у фазово-контрастному режимі (Ph-C), використовуючи Hoechst 33258 для диференціації живих та апоптотичних клітин (Hoechst), та пронідій йодид (PI) для виявлення некротичних клітин.

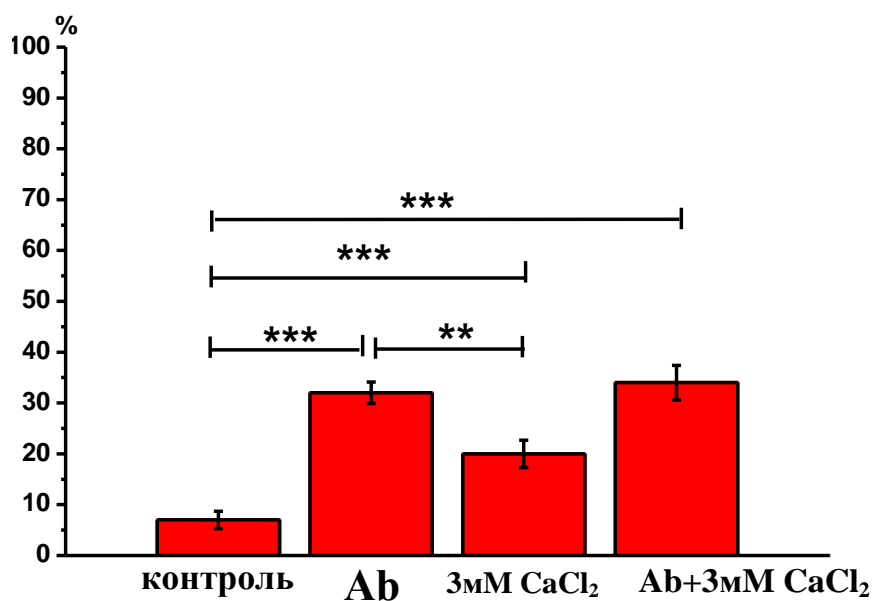
Введення в середовище інкубації амілоїду  $A\beta_{1-42}$  (2 мкМ, 24 год., n=1130) призводило до зменшення цитологічно нормальних клітин (в середньому  $47,3 \pm 3,02$  %), збільшення у порівнянні з контролем клітин з ознаками апоптозу (в середньому  $21,2 \pm 2,22$  %) та некрозу (в середньому  $31,6 \pm 2,19$  %). Таким чином, додавання амілоїду  $A\beta_{1-42}$  в середовище культивування спричинювало нейротоксичний ефект та індукувало загибель нейронів гіпокампу (**Рис.3.2.1, Рис.3.2.2**).



Б



В



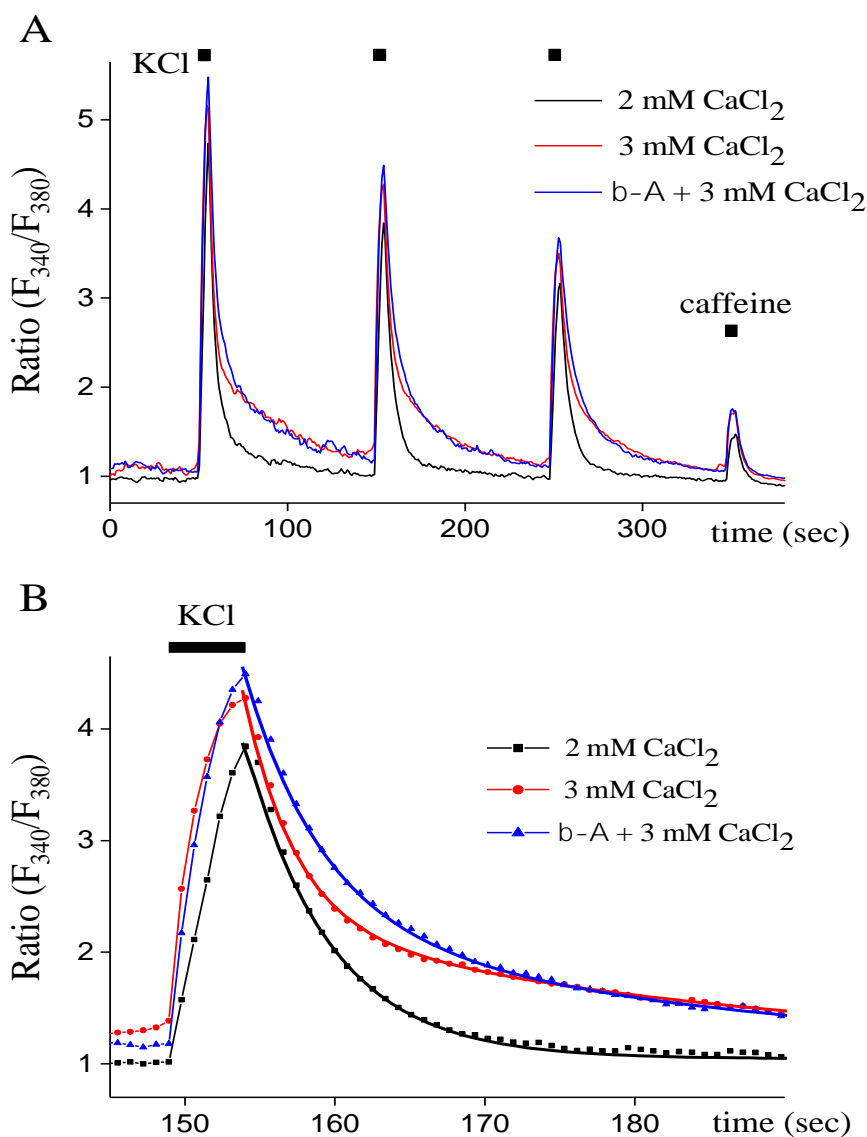
*Рис. 3.2.2. Середні значення нормованих кількостей цитологічно інтактних клітин (А), клітин з ознаками апоптозу (Б) і некрозу (В) у культурі нейронів гіпокампа: \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , при вказаних міжгрупових порівняннях*

При одночасному введенні амілоїду  $A\beta_{1-42}$  та  $CaCl_2$  ( $n=1397$ ) відбувалось помітне зменшення кількості живих клітин, порівняно з умовами ізолюваної 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.3.2.1, Рис 3.2.2**).. 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 ізолюваній 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 цілком обгрунтованою.

### **3.3 Вплив умов моделювання гіперкальціємії на рівень внутрішньоклітинного кальцію в культурі нейронів гіпокампу.**

Наступні експерименти полягали в дослідженні умов моделювання гіперкальціємії на клітини, що інкубувалися з  $A\beta_{1-42}$  –амілоїдом, за допомогою флуорисцентної кальційметрії. Збільшення зовнішньоклітинного кальцію та різні патологічні стани, включаючи ХА, призводять до погіршення функціонування нейронів. Тому ми в своїй роботі провели дослідження участі кальцію в умовах гіперкальціємії, що є моделлю порушення кальцієвого гомеостазу, на життєздатність клітин культури гіпокампа при дії  $A\beta_{1-42}$  –амілоїда та гіперкальціємії.

З даною метою, було проведено три серій експериментів: контрольна при 2 мМ  $CaCl_2$ ; інкубації зразків культури клітин гіпокампу в середовищі з додаванням 3 мМ  $CaCl_2$ , (24 год.; моделювання гіперкальціємії); одночасне введення 3 мМ  $CaCl_2$  та  $A\beta_{1-42}$  –амілоїда протягом 24 год.



**Рис 3.3.1.** Кальцієві транзйєнти, викликані деполяризацією плазматичної мембрани аплікацією гіперкалієвого розчину в контролі (2 мМ  $\text{CaCl}_2$ ), при умовах моделювання гіперкальціємії (3 мМ  $\text{CaCl}_2$ ) та при дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$  ( $\beta$ -амілоїд). Дані представлені як співвідношення інтенсивностей флуоресценції при довжині хвиль 340 і 380 нм.

*A* – усереднені дані реєстрацій змін вільного кальцію внаслідок трьох разової аплікації 50 мМ  $\text{KCl}$  (по 5 сек.) та аплікації розчину з 10 мМ кофеїну (5 сек); *B* – розгорнутий в часі другий кальцієвий транзйєнт з фрагменту *A*.

На **Рис 3.3.1** показано зміни кальцієвого сигналу у клітин, як відношення  $F_{340} / F_{380}$ , що інкубувалися в контрольних умовах (2 мМ  $\text{CaCl}_2$ ;



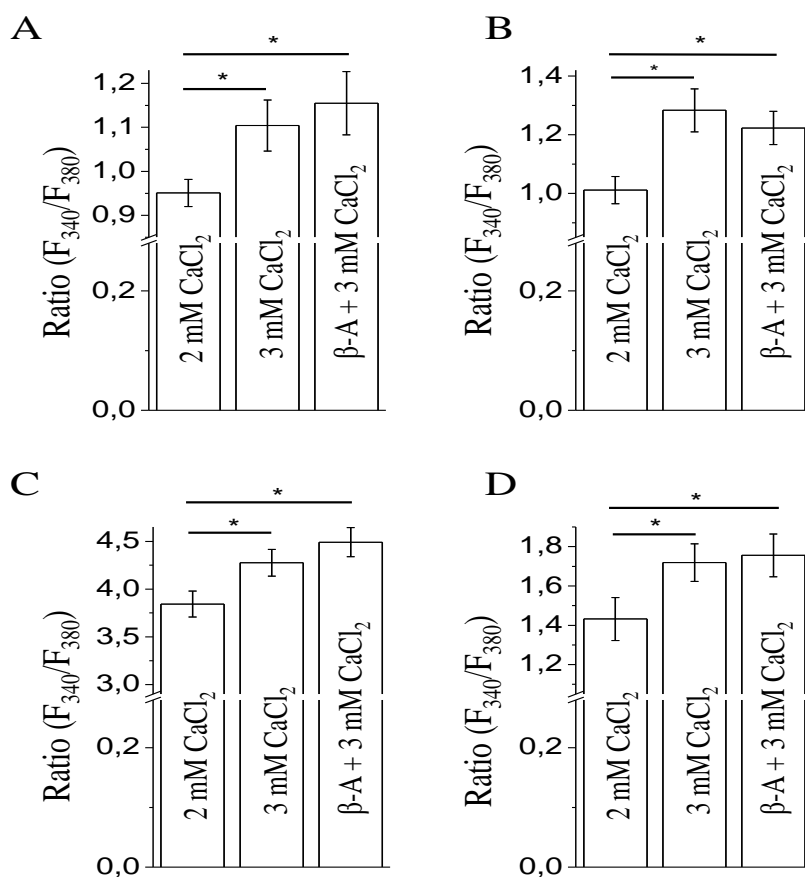
усереднені дані по 43 реєстрацій); при 3 мМ зовнішньоклітинного кальцію (середнє значення від 65 реєстрацій) та 3 мМ  $\text{CaCl}_2$  та за умов дії  $\text{A}\beta_{1-42}$ -амілоїду (середні дані по 51 реєстрацій). Як видно з представлених даних при наявності в середовищі 3 мМ  $\text{CaCl}_2$  та 3 мМ  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{CaCl}_2$ ) та  $1,10 \pm 0,06$  (n=65) за умов 3 мМ  $\text{CaCl}_2$ . При інкубуванні нейронів гіпокампу в культивативному середовищі з 2 мкМ амілоїду  $\text{A}\beta_{1-42}$  та 3 мМ  $\text{CaCl}_2$  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 **Рис 3.3.2А**.

В контрольних умовах з періодичністю в 100 секунд транзйентних змін рівень вільного  $\text{Ca}^{2+}$  повертався до початкового рівня. За однакових умов стимуляцій, при гіперкальціємії спостерігалось уповільнення відновлення рівня вільного кальцію, та період в 100 с не вистачило для відновлення цього рівню. Спад  $\text{Ca}^{2+}$  транзйєнта від піку до рівню в спокої був апроксимований експоненціальною функцією спаду вигляду:  $y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{x}{t_2}}$ . Як видно з **Рис. 3.3.1В** в контролі при 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  спад транзйєнта гарно апроксимувався за умов  $t_1 = 5,61 \pm 0,01$  с та  $t_2 = 0,21 \pm 0,05$  с. За умов умовах гіперкальціємії при 3 мМ  $\text{CaCl}_2$  зовнішньоклітинного кальцію  $t_1 = 3,33 \pm 0,07$  с та  $t_2 = 33,37 \pm 1,34$  с; та  $\text{A}\beta$ -амілоїда+3мМ  $\text{CaCl}_2$   $t_1 = 5,20 \pm 0,16$  с та  $t_2 = 31,09 \pm 2,03$  с. Збільшення часу  $t_2$  відповідає уповільненню відновленню рівня вільного кальцію.

Рівень вільного кальцію до появи другого  $\text{Ca}^{2+}$  транзйєнта в контрольних умовах (2 мМ  $\text{CaCl}_2$ ) складав  $1,011 \pm 0,046$  в.од (n=43) та  $1,283 \pm 0,073$  в.од (n=65) за умов 3 мМ  $\text{CaCl}_2$ . За умов  $\text{A}\beta$ -амілоїду та 3 мМ  $\text{CaCl}_2$  цей параметр складав  $1,223 \pm 0,057$  в.од (n=51). В обох випадках даний

рівень кальцію був достовірно збільшений ( $P<0.05$ ). Статистичні данні представлені на **Рис 3.3. 2В**.



**Рис 3.3.2.** Зміни рівня внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Частина А є базальний рівень сигналу до появи  $\text{Ca}^{2+}$  транзйєнту; частина В є рівень сигналу до появи другого  $\text{Ca}^{2+}$  транзйєнту; частина С є амплітуда другого  $\text{Ca}^{2+}$  транзйєнту під час аплікації деполяризуючого розчину (50 мМ  $\text{KCl}$ ; 5 с); частина D є пікове значення обумовленого 5 с аплікацією розчину з 10 мМ кофеїну.

Амплітуда другого  $\text{Ca}^{2+}$  транзйєнту викликаного протягом 5 секунд деполяризуючим розчином була достовірно збільшена з  $3,843 \pm 0,139$  в.од ( $n=43$ ) до  $4,276 \pm 0,140$  в.од ( $n=68$ ) в умовах з 3 мМ  $\text{CaCl}_2$  відповідно до контролю ( $P<0.05$ ). За умов  $\text{A}\beta$ -амілоїда+3мМ  $\text{CaCl}_2$  цей параметр також достовірно був збільшений до  $4,491 \pm 0,152$  в.од ( $n=43$ , рис 2С;  $P<0.05$ ).

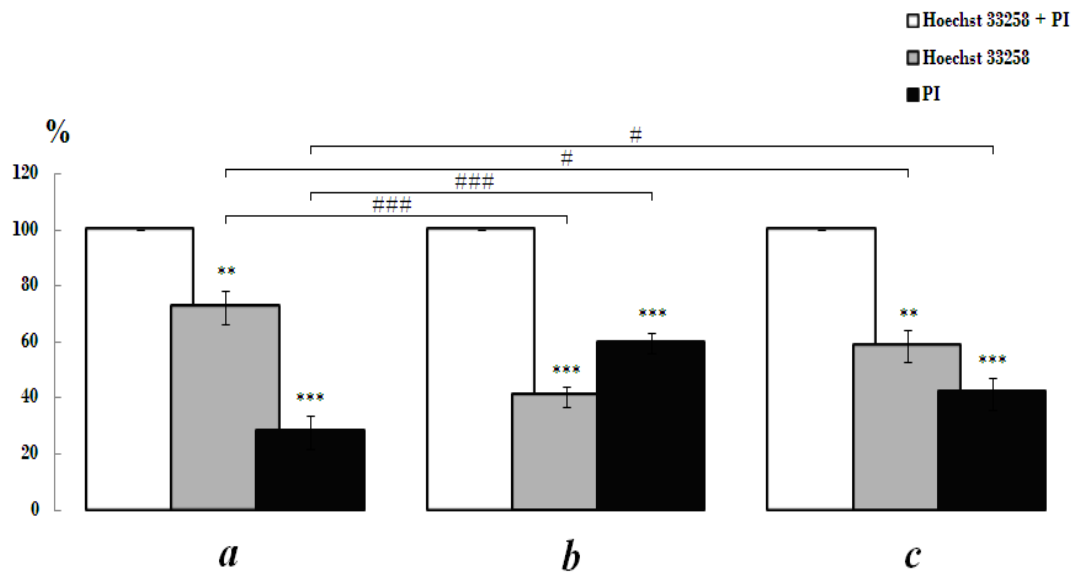
Також сигнал на 10 мМ аплікацію кофеїну достовірно збільшувався в присутності підвищеного зовнішньоклітинного кальцію з контрольних значень в  $1,432 \pm 0,109$  в.од ( $n=43$ ;  $P<0.05$ ) до  $1,719 \pm 0,095$  в.од (3мМ  $\text{CaCl}_2$ ;  $n=65$ ,  $P<0.05$ ). За умов  $\text{A}\beta$ -амілоїда +3мМ  $\text{CaCl}_2$  склав  $1,756 \pm 0,109$  ( $n=51$  в.од;  $P<0.05$ ).

Таким чином в умовах моделювання гіперкальціємії (при 3 мМ  $\text{CaCl}_2$  зовнішньоклітинного кальцію) у порівнянні з контролем (2 мМ  $\text{CaCl}_2$ ), відбувалось збільшення базального рівня  $\text{Ca}^{2+}$  (на 16%) також збільшувалась амплітуда кальцієвих відповідей на аплікацію 50 мМ розчину KCl (на 11%) і вміст  $\text{Ca}^{2+}$  в ендоплазматичному ретикулумі (на 20%). Також спостерігалось уповільнення відновлення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (фаза спаду). При культивуванні нейронів гіпокампу з одночасною присутністю  $\text{A}\beta_{1-42}$ -амілоїду та 3 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 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.

### **3.4 Вплив блокатора відкривання мітохондріальної пори циклоспорину А на виживання нейронів культури гіпокампу при дії . $\text{A}\beta_{1-42}$ -амілоїду.**

Ми намагалися встановити роль відкривання мітохондріальних пор у загибелі нейронів культури гіпокампу при дії  $\text{A}\beta$ -амілоїду. Для цього використовували подвійне забарвлення клітин двома барвниками, що зв'язуються з ДНК – Hoechst 33258 та ПЙ.

Аналіз експериментальних даних дозволив, виявити, що у контрольних умовах частка живих нейронів в середньому становила  $72 \pm 6 \%$  ( $p \leq 0,01$ ), а некротизованих –  $28 \pm 6 \%$ , відносно загальної кількості клітин ( $n = 3211$ ), **(Рис. 3.4.1, а)**. При наявності в середовищі  $A\beta_{1-42}$ -амілоїду становила живих клітин  $41 \pm 4 \%$  ( $p \leq 0,001$ ), у той час як відсоток некротизованих нейронів зросла до  $59 \pm 4 \%$  ( $p \leq 0,001$ ) відносно загальної кількості клітин ( $n = 2815$ ); отже, останнє значення було на 31 % більшим, ніж у контролі ( $p \leq 0,001$ ) **(Рис.3.4.1, б)**. Після інкубації з циклоспорином А частка живих нейронів складала  $58 \pm 6 \%$  ( $p \leq 0,01$ ), у той час як некротичних –  $42 \pm 6 \%$  ( $p \leq 0,001$ ) відносно загальної кількості клітин ( $n = 2974$ ). Іншими словами останнє значення було на 17 % меншим порівняно з відповідним значенням приінкубації лише з  $A\beta_{1-42}$ -амілоїдом ( $p \leq 0,05$ ) **(Рис.3.4.1, с)**.



**Рис. 3.4.1.** Співвідношення кількостей живих та некротизованих нейронів культури гіпокампу в контрольних умовах (а), після інкубації з  $A\beta_{1-42}$ -амілоїдом (б) та після послідовної інкубації з циклоспорином А та  $A\beta_{1-42}$ -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.

### **3.5 Вплив мемантину на життєздатність нейронів гіпокампу при активації глутаматних НМДА рецепторів**

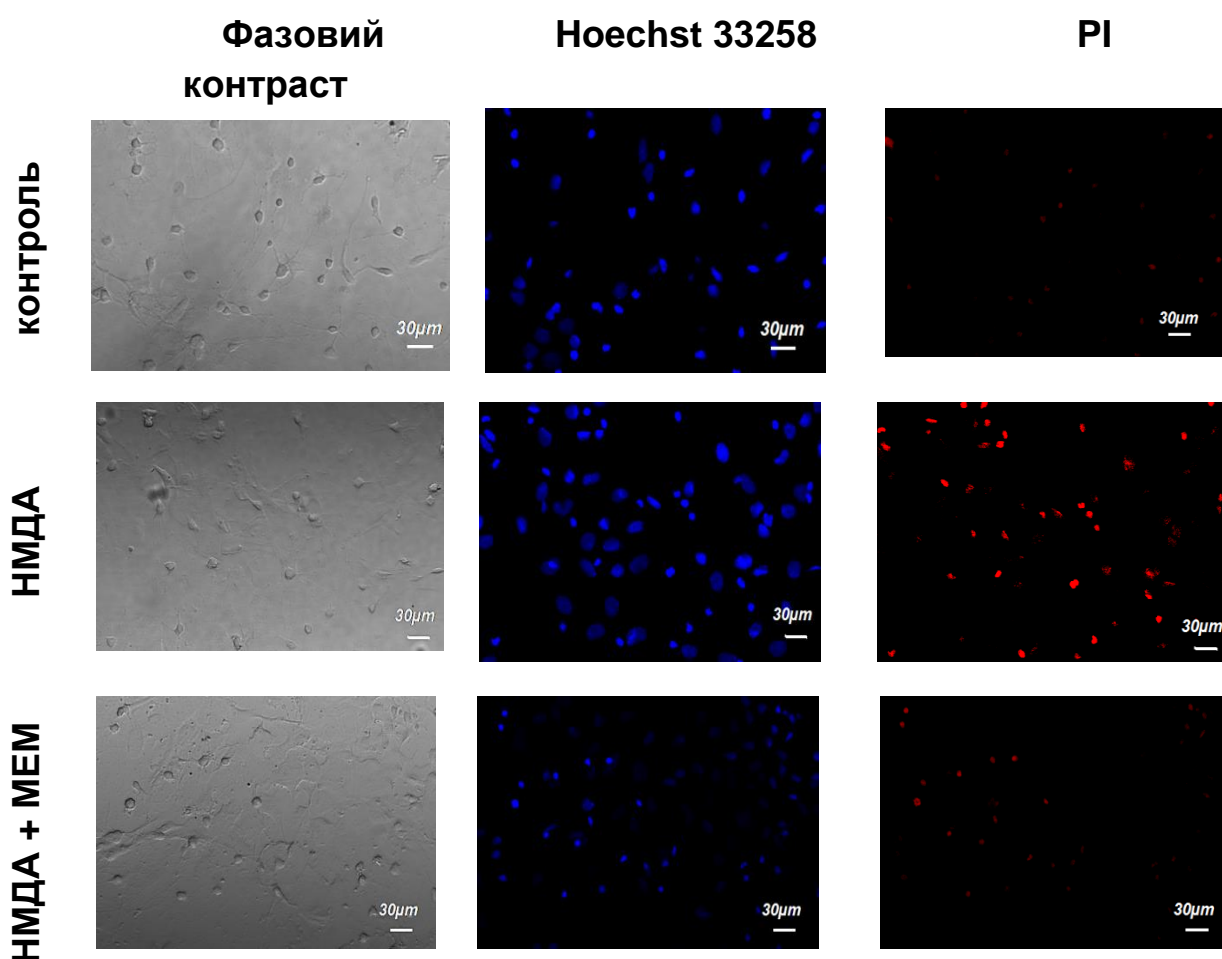
У дослідях *in vitro* на нейронах культури гіпокампу ми намагалися оцінити нейропротекторну роль неконкурентного низькоафінного антагоністу НМДА – рецепторів мемантину на життєздатність цих клітин при моделюванні ексайтотоксичності. З даною метою, було проведено три серії експериментів:

1. Контрольна.
2. Введення НМДА.
3. Одночасне введення НМДА та мемантину.

Після цього використовували подвійне забарвлювання клітин двома барвниками, що зв'язуються з ДНК (Hoechst та ПЙ), і проводилось оцінювання життєздатності нейронів шляхом їх підрахунку за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії, порівнюючи флуоресценцію клітин за контрольних умов та після 24-год інкубації з вище зазначеними реагентами (**Рис 3.5.1**).

У наших дослідженнях було встановлено, що у контрольних зразках культури клітин гіпокампу щурів ( $n = 1318$ ) переважна більшість клітин (в середньому  $75,1 \pm 1,72 \%$ ), які не проявляли будь-яких ознак патологічних змін та оцінювалась, як живі. Ядра таких клітин рівномірно накопичували нуклеофор Hoechst 33258 і характеризувалися слабо синьою флуоресценцією, мали чіткі контури та інтактну ядерну архітектуру. Ядра відносно невеликої частини нейронів в контрольних зразках ( $10,7 \pm 1,34 \%$ ) із яскраво синьою флуоресценцією демонстрували фізіологічні зміни в

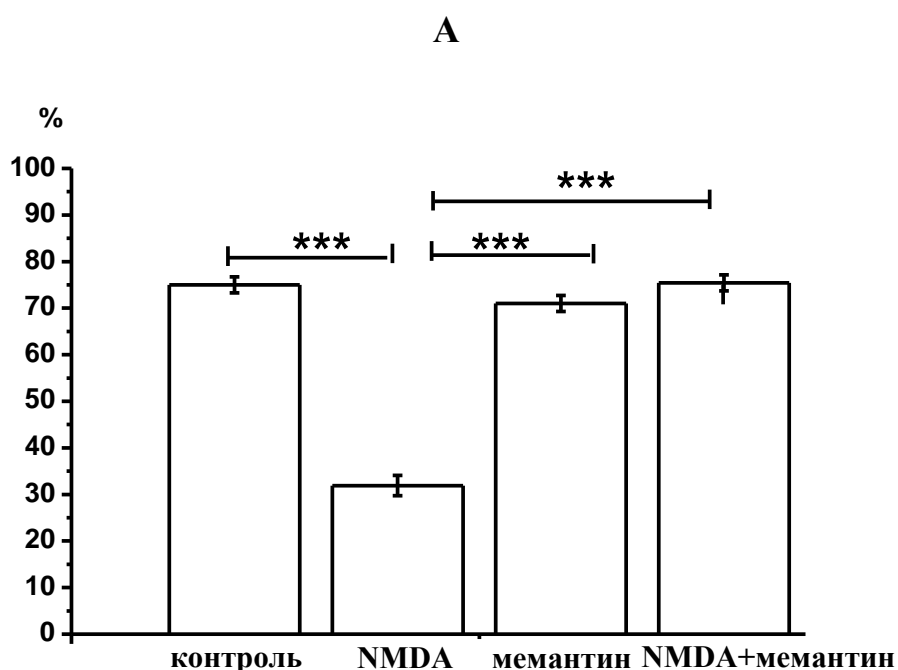
ядерному хроматині, такі як його конденсація та фрагментація, що є всіма ознаками апоптозу. Ті нейрони, ядра яких в контрольних умовах забарвлювались ПЙ і давали червону флуоресценцію (що свідчило про їх некротичне переродження) склали  $14,1 \pm 0,98 \%$  в середньому по групі (Рис. 3.5. 1, 2).

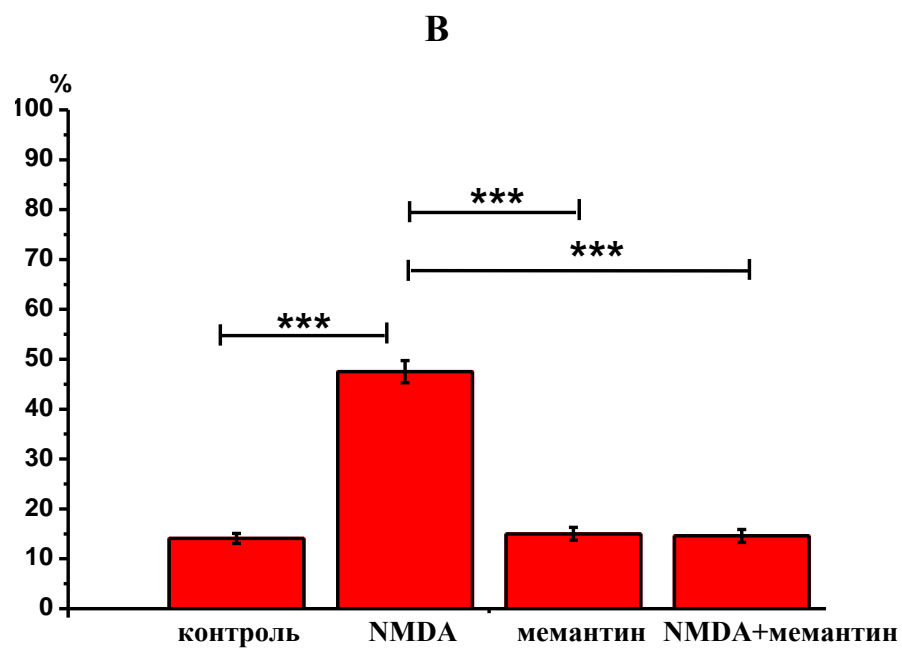
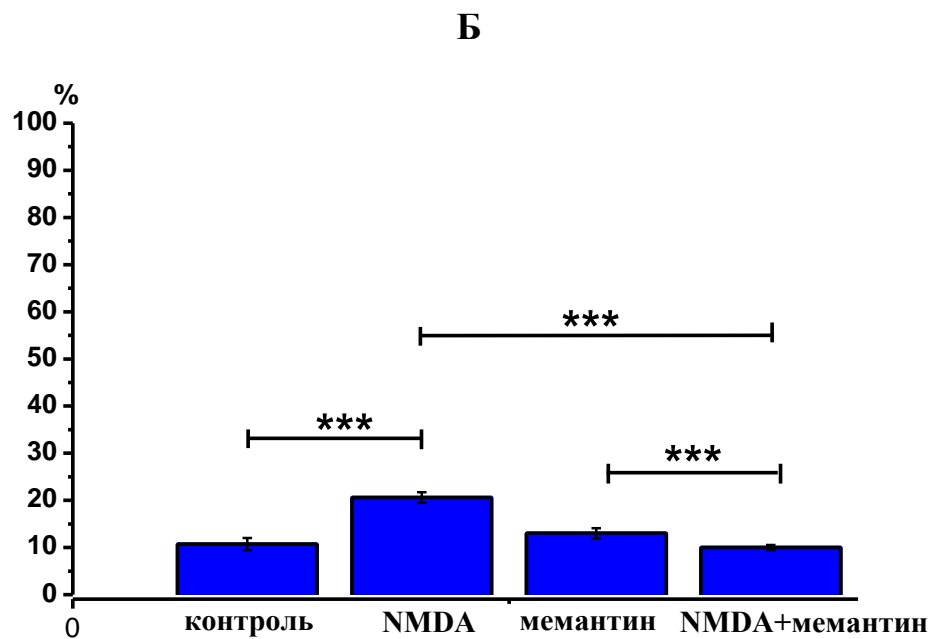


**Рис.3.5.1** Вплив мемантину на життєздатність нейронів гіпокампу при активації глутаматних НМДА рецепторів. А) інкубуються в контролі; Б) після інкубації в присутності НМДА (10 мкМ, 24 год.) , В) у поєднанні з НМДА (10 мкМ, 24 год.) та Мемантину (50 мкМ, 24 год.) . Зображення отримували у фазово-контрастному режимі (Ph-C), використовуючи Hoechst 33258 для диференціації живих та апоптотичних клітин (Hoechst), та використовуючи йодид пропідію (PI) для виявлення некротичних клітин.

Після інкубації з антагоністом НМДА – рецепторів мемантином (50 мкМ, 24 год., n=1671 ) в другій серії експериментів отримали, що частка живих нейронів становила в середньому  $71,1 \pm 1,70$  %, апоптотичних –  $13,0 \pm 1,10$  %, некротизованих –  $15,0 \pm 1,30$  % щодо загальної кількості досліджених клітин. Вірогідних змін в групі клітин в порівнянні з контролем не виявилось, отже мемантин як такий не мав істотної пошкоджуючої дії на клітини культури гіпокампу (**Рис.3.5. 2**).

Після інкубації зразків культури клітин гіпокампу в середовищі з додаванням НМДА (10  $\mu$ М, 24 год., n=1330) кількість живих клітин становила приблизно третину дослідженої групи (в середньому  $31,9 \pm 2,18$  %). Нейрони з апоптотичними змінами в даних умовах спостерігалися у  $20,6 \pm 1,11$  % випадках. Група клітин з ознаками некрозу була більш численною, ніж в контрольних зразках приблизно на 33 % ( $P < 0.001$ ), в середньому їх кількість становила  $47,5 \pm 2,21$  % (**Рис. 3.5.2** ). Таким чином, введення НМДА в середовище культивування індукувало інтенсивну загибель нейронів гіпокампу, у половині клітин дослідженої вибірки відзначалися виражені патологічні зміни.





**Рис. 3.5.2.** Середні значення нормованих кількостей цитологічно інтактних клітин (А) та клітин з ознаками апоптозу (Б) і некрозу (В) у культурі нейронів гіпокампу щурів при додавання НМДА та мемантину в середовище.

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



Після спільної інкубації клітин культури гіпокамп з НМДА 10 мкМ, 24 год. та мемантином 50 мкМ, 24 год. (n= 2108) частка живих нейронів щодо загальної кількості клітин складала  $75,4 \pm 1,72$  %, апоптотичних –  $10 \pm 0,54$  %, некротичних –  $14,6 \pm 1,31$  % (**Рис.3.5.1**). 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.

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

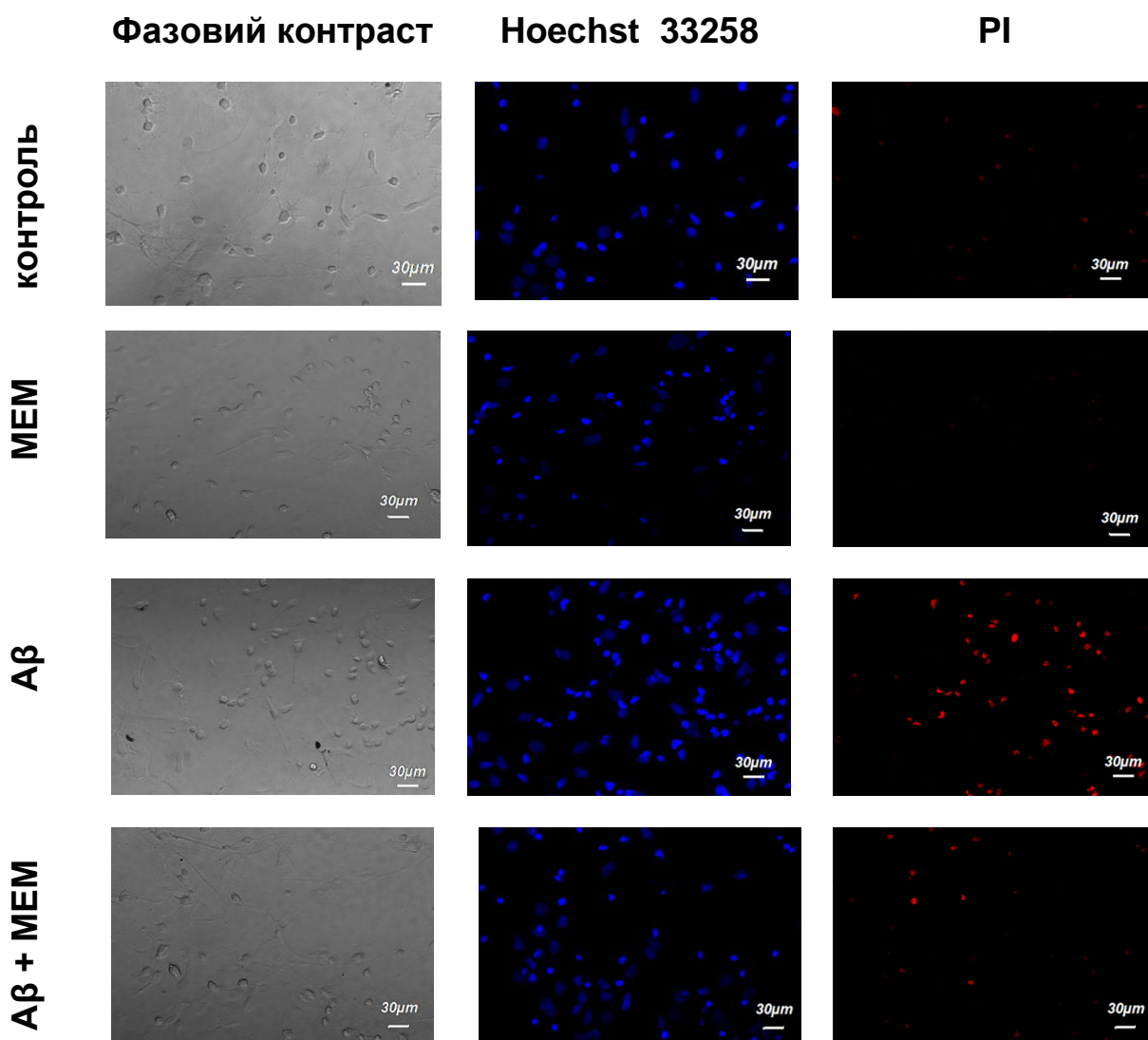
Виходячи з того, що за даними літератури нейротоксичність  $A\beta_{1-42}$  опосередковується ексайтотоксичністю глутамату, а мемантин, як неконкурентний низькоафінний антагоніст глутаматних НМДА- рецепторів, блокуючи їх, запобігає загибелі нейронів, спричиненої цією ексайтотоксичністю, можна припустити, що останній може мати нейропротекторний ефект проти нейротоксичності  $A\beta_{1-42}$ . Тому в слідуючих серіях експериментів ми досліджували нейропротекторну здатність мемантину щодо нейротоксичної дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$ . Для цього ми проводили обробку культур амілоїдом  $A\beta_{1-42}$  та одночасно зазначеним антагоністом і амілоїдом  $A\beta_{1-42}$  протягом 24 годин. З даною метою, було проведено чотири серії експериментів:

1. Контроль
2. Введення мемантину(50 мкМ).
3. Введення амілоїда  $A\beta_{1-42}$ (2 мкМ).
4. Одночасне введення мемантину та  $A\beta_{1-42}$ .

У контрольних зразках ( $n = 1318$ ) 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. Ядра таких клітин рівномірно накопичували нуклеофор Hoechst 33258 і характеризувалися слабо синьою флуоресценцією, мали чіткі контури та інтактну ядерну архітектуру. Ядра відносно невеликої частини нейронів в контрольних зразках ( $10,7 \pm 1,34 \%$ ) із яскраво-синьою флуоресценцією демонстрували фізіологічні зміни в ядерному хроматині, такі як його конденсація та фрагментація, що є всіма ознаками апоптозу. Нейрони, ядра яких в контрольних умовах забарвлювались ПЙ і давали червону флуоресценцію, (що свідчило про їх некротичне переродження) склали  $14,1 \pm 0,98 \%$  в середньому по групі (**Рис. 3.6. 1, 2**)

Після інкубації з антагоністом НМДА – рецепторів мемантином (50 мкМ, 24 год.,  $n = 1171$ ) в другій серії експериментів отримали, що частка живих нейронів становила в середньому  $71,1 \pm 1,70 \%$ , апоптотичних –  $13,0 \pm 1,10 \%$ , некротизованих –  $15,0 \pm 1,30 \%$  щодо загальної кількості досліджених клітин. Вірогідних змін в групах клітин в порівнянні з контролем не виявлено, отже сам мемантин не мав побічної дії на клітини культури гіпокампу (**Рис.3.6. 2**).

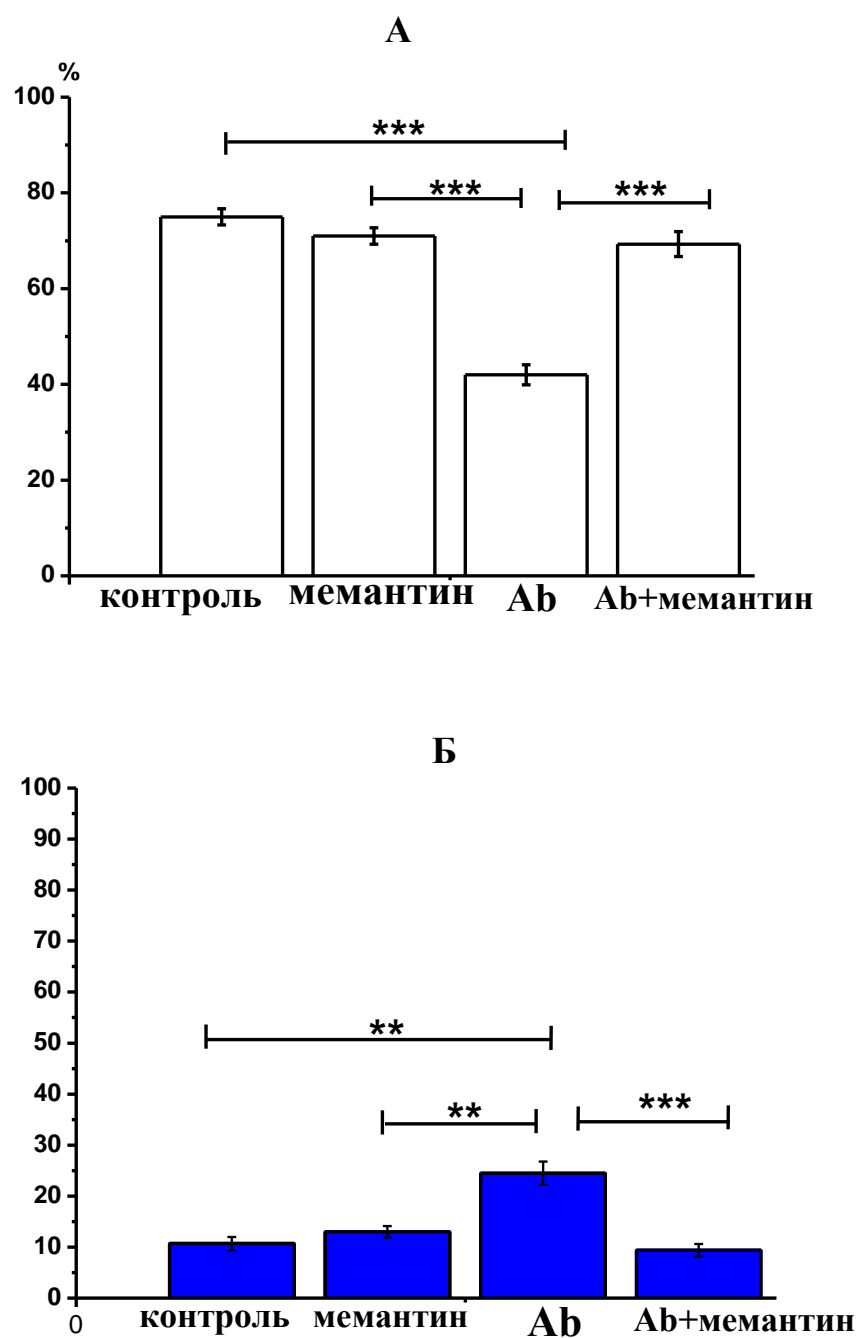
Введення в середовище інкубації амілоїду  $A\beta_{1-42}$  (2 мкМ, 24 год.,  $n = 1473$ ) призводило до зменшення цитологічно нормальних клітини (в середньому  $42,0 \pm 2,08 \%$ ). Нейрони ж з ознаками апоптозу в даних умовах спостерігалися приблизно в  $24,5 \pm 2,29 \%$ . Група клітин з некротичними змінами була також більш численною, ніж в контрольних зразках (в середньому їх кількість становила  $33,5 \pm 2,45 \%$ ) (**Рис. 3.6. 1, Рис. 3.6. 2**).

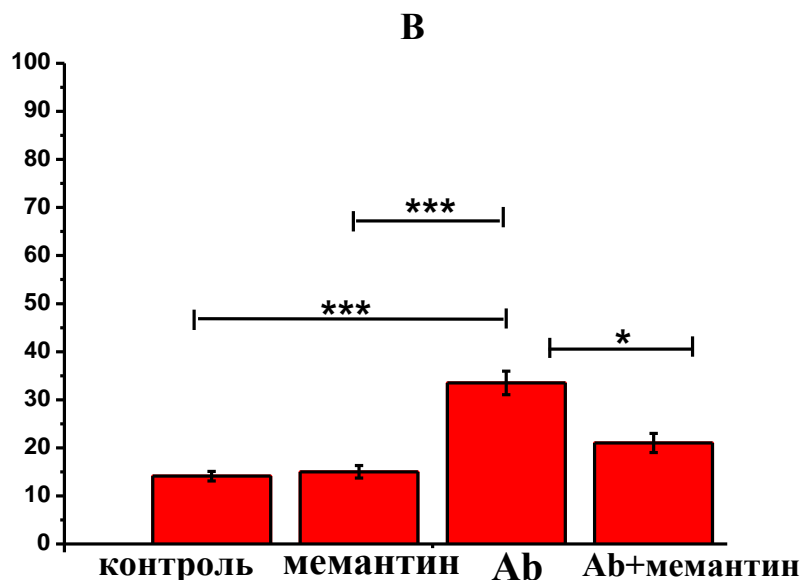


**Рис.3.6.1** Вплив мемантину на життєздатність нейронів гіпокампу при дії  $A\beta_{1-42}$ . А) інкубуються в контролі; Б) після інкубації в присутності Мемантину ( $50 \mu\text{M}$ , 24 год.), В) у присутності  $A\beta_{1-42}$  ( $2,0 \mu\text{M}$  24 год.); Г) у поєднанні Мемантину ( $50 \mu\text{M}$ , 24 год.) та  $A\beta_{1-42}$  ( $2,0 \mu\text{M}$  24 год.). Зображення отримували у фазово-контрастному режимі (Ph-C), використовуючи Hoechst 33258 для диференціації живих та апоптотичних клітин (Hoechst), та використовуючи йодид пропідію (PI) для виявлення некротичних клітин.

Таким чином, додавання амілоїду  $A\beta_{1-42}$  в середовище культивування спричинювало нейротоксичний ефект та індукувало загибель нейронів гіпокампу.

При одночасному введенні амілоїду  $A\beta_{1-42}$  та мемантину в середовище культивування ( $n=1316$ ), відмічалось збереження більшої кількості цитологічно інтактних клітин, ніж в умовах ізольованої дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$ . Відносна кількість клітин без ознак апоптозу чи некрозу в даному випадку становила більше половини проаналізованої вибірки (в середньому  $69,3 \pm 2,60\%$ ) і вірогідно відрізнялась від відповідної при ізольованій дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$  (Рис.3.5. 2).





**Рис. 3.6.2.** Середнє значення нормованих кількостей цитологічно інтактних клітин (А), клітин з ознаками апоптозу (Б) і некрозу (В) у культурі нейронів гіпокампу щурів при додавання амілоїду Aβ<sub>1-42</sub> та мемантину.

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

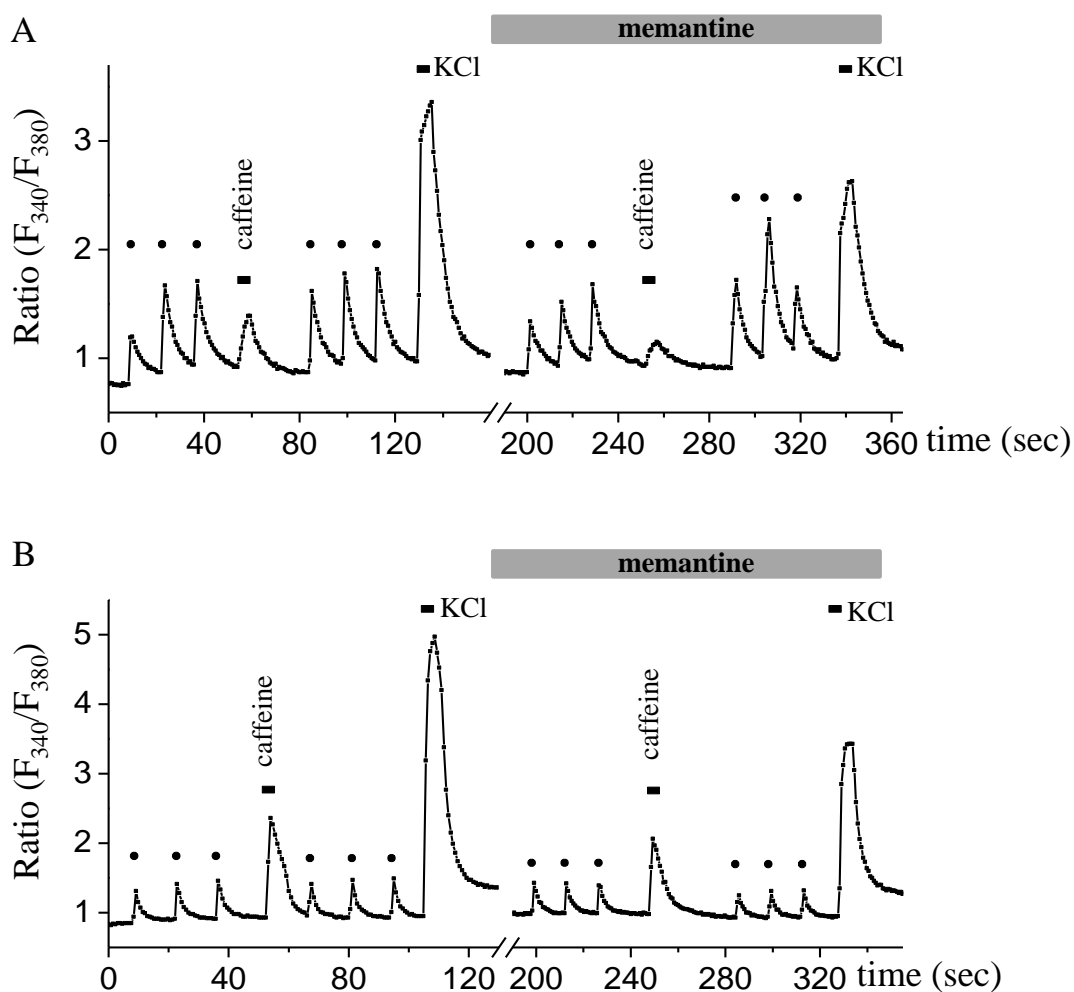
Кількість клітин з апоптотичними змінами в описуваній групі складала приблизно стільки ж, як в умовах контролю ( $9,4 \pm 1,20$  % від загального числа), і цей показник виявився приблизно вдвічі меншим аналогічного значення в описаній вище групі клітин при ізольованій дії амілоїду Aβ<sub>1-42</sub>. Тобто, додавання мемантину забезпечувало зниження кількості апоптотичних одиниць ( $P < 0.001$ ). 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 Aβ<sub>1-42</sub> даний показник в середньому становив  $21,0 \pm 2,00$  %,  $P < 0.01$ . Отже, додавання мемантину помітно обмежувало патологічний вплив амілоїду Aβ<sub>1-42</sub> на нейрони культури гіпокампу.

### 3.7. Вплив мемантину на сигналізацію кальцію у нейронах гіпокампу щурів, культивованих з A $\beta$ -амілоїдом

Наступні експерименти полягали в дослідженні дії мемантину (20 мкМ) на кальцієвий гомеостаз нейронів у контролі та при культивуванні з A $\beta$ <sub>1-42</sub> (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<sup>2+</sup> в цитоплазмі. Також було досліджено транз'єнтні зміни завдяки 5 сек аплікації розчину з 50 мМ KCl та вивільнення Ca<sup>2+</sup> з ендоплазматичного ретикулуму (10 мМ кофеїну, 5 сек).

У першій серії експериментів ми використовували нейрони гіпокампу, які культивували в умовах контролю. Спочатку здійснювали трьохразову стимуляцію електричним полем (тривалість 1 с. кожної) з інтервалами між ними 3 сек, (**Рис. 3.7.1А.**), це було необхідно для заповнення внутрішньоклітинних кальцієвих депо. Після цього ми застосували кофеїн (10 мМ), який є агоністом ріанодинових кальцієвих рецепторів, тривалістю 5 сек, для виявлення вмісту кальцію в ендоплазматичному ретикулумі. Після відновлення рівня кальцію до базового рівня повторювали стимуляцію електричним струмом, потім стимуляцію гіперкалієвим розчином (5 с; 50 мМ) (**Рис.3.7. 1А.**).

Далі ми провели ті ж самі вимірювання що й у контролі, але у присутності 20 мкМ мемантину, щоб перевірити його вплив на участь у кальцієвій сигналізації в культивованих нейронах гіпокампу. Як видно, застосування мемантину у позаклітинному розчині призвело до зменшення завантаження кальцію RyR в ендоплазматичному депо і зменшилась амплітуда кальцію під час деполяризації мембрани за KCl, але незначно впливав на вільний кальцій та базальний рівень.



**Рис 3.7.1.** Зміни внутрішньоклітинного рівня кальцію у контрольних умовах та присутності мемантину з амілоїдом  $A\beta_{1-42}$ .

*A* – вибіркова реєстрація змін внутрішньоклітинної концентрації вільного кальцію в культивованому нейроні гіпокампу в контролі та присутності 20  $\mu$ M мемантину внаслідок трьох разової стимуляції електричним полем (чорні кола) аплікації розчину з 10 mM кофеїну (5 с) та 5 секундної деполяризації розчином з 50 mM KCl; *B* – за умов інкубування клітин з 2  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$ -амілоїдом, 24 год.

У наступній серії експериментів ми використовували той самий протокол, але тестували нейрони, які інкубували за 24 год до експериментів з 2  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$ . Приклад таких реєстрацій представлений на **Рис.3.7 1B**. Вимірювання змін кальцієвого сигналу спочатку відбувалась до давання в

зовнішній розчин 20 мкМ мемантину, потім робили подальші вимірювання від тієї ж клітини в присутності цього реагенту. Така форма експерименту зменшує відмінності між реєстраціями і дозволяє переконливо досліджувати дію мемантину. Як видно з представлених реєстрацій зміни кальцієвого сигналу відбувалось значне зменшення  $\text{Ca}^{2+}$  транз'єнтів впродовж 5 с аплікацією деполяризованого розчину (50 мМ KCl) та застосування кофеїну 10 мМ 5 с в присутності 20 мкМ мемантину порівнюючи з контролем.

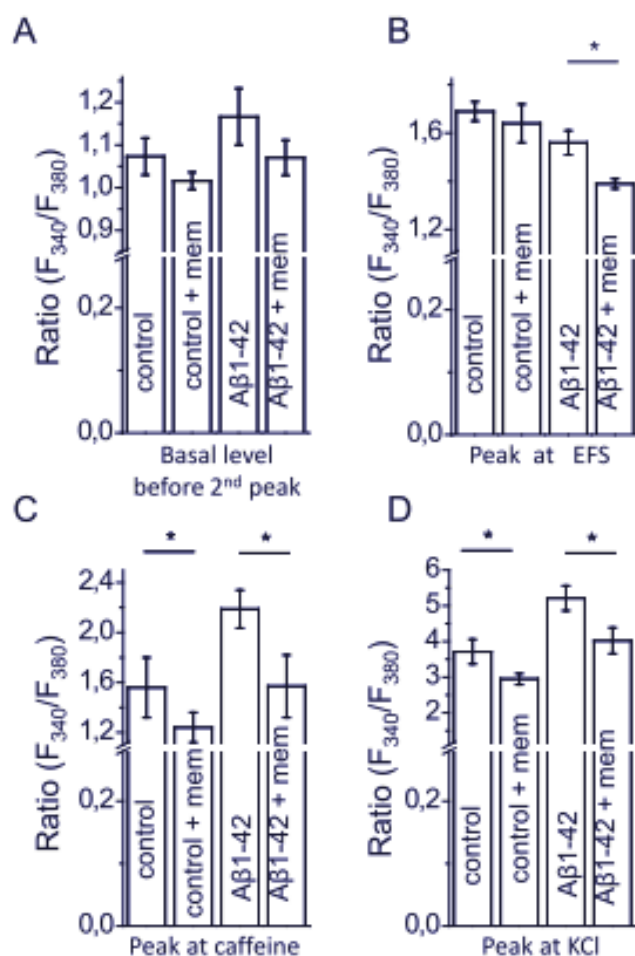
Статистичні дані одержаних результатів представлені на **Рис.3.7.2.** Таким чином, базальний рівень вільного кальцію в контрольних умовах складав  $1,05 \pm 0,07$  в.од. (відносних одиниць) ( $n=15$ ) та  $0,95 \pm 0,02$  в.од ( $n=14$ ) в присутності 20 мкМ мемантину. При культивуванні нейронів 24 год з 2 мкМ  $\text{A}\beta_{1-42}$ -амілоїдом цей параметр складав  $0,97 \pm 0,04$  в.од ( $n=20$ ) та  $1,01 \pm 0,03$  в.од ( $n=16$ ) в присутності 20 мкМ мемантину. Рівень сигналу до появи другого  $\text{Ca}^{2+}$  транз'єнту, викликаного стимуляцією електричним полем (СЕП), в контрольних умовах склав  $1,07 \pm 0,04$  в.од ( $n=15$ ) та  $1,016 \pm 0,020$  в.од ( $n=14$ ) в присутності 20 мкМ мемантину. За умов інкубації нейронів 24 год в культивованому середовищі з 2 мкМ амілоїдом  $\text{A}\beta_{1-42}$  цей параметр складав  $1,17 \pm 0,07$  ( $n=20$ ) та  $1,070 \pm 0,041$  ( $n=16$ ) в присутності 20 мкМ мемантину, що представлено на **Рис. 3.7. 2А.**

Мемантин майже не змінив пікових значень  $\text{Ca}^{2+}$  транз'єнтів, спричинених стимуляцією нейронів електричним полем. Таким чином, амплітуда другого  $\text{Ca}^{2+}$  транз'єнту викликаного стимуляцією нейронів електричним полем була зменшена з  $1,69 \pm 0,04$  ( $n = 15$ ) у контролі, а після застосування мемантину  $1,64 \pm 0,08$  ( $n = 14$ ). Під час інкубації нейронів 24 год з  $\text{A}\beta$ -амілоїдом цей параметр суттєво знизився з  $1,56 \pm 0,05$  ( $n = 19$ ) до  $1,39 \pm 0,02$  при аплікації мемантину ( $n = 16$ ,  $P < 0,05$ ). Дані представлені на **Рис.3.7. 2. В.**

Участь RyR ендоплазматичного депо у кальцієвій сигналізації представлені на **Рис.3.7.2.С.** Пікові значення кальцієвих сигналів,



викликаних аплікацією 10 мМ кофеїну, значно зменшувались у присутності 20 мкМ мемантину порівняно з контрольними значеннями з  $1,56 \pm 0,24$  ( $n = 14$ ) в контролі до  $1,24 \pm 0,12$  ( $n = 12$ ,  $P < 0,05$ ) після дії мемантину. У нейронах, які раніше обробляли А $\beta$ -амілоїдом, це значення було зменшено з  $2,16 \pm 0,36$  ( $n = 17$ ) до  $1,57 \pm 0,25$  ( $n = 16$ ,  $P < 0,01$ ) після застосування мемантину і А $\beta$ -амілоїду.



**Рис 3.7.2.** Зміни рівня внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Частина А рівень сигналу до появи другого  $Ca^{2+}$  транзйенту викликаного стимуляцією електричним полем (СЕП); частина В є амплітуда другого  $Ca^{2+}$  транзйенту викликаного СЕП; частина С є пікове значення обумовленого 5 с аплікацією розчину с 10 мМ кофеїну; частина D є амплітуда  $Ca^{2+}$  транзйенту під час аплікації деполяризуючого розчину (50 мМ KCl; 5 с ) в контрольних умовах (control), в присутності 20 мкМ

мемантину (тет.) та в культивованому середовищі з 2 мкМ амілоїдом  $A\beta_{1-42}$  ( $A\beta$ -A). \* - відповідає статистичній достовірності  $P < 0.05$ .

Ми також розраховали статистичні дані щодо амплітуди  $Ca^{2+}$  транз'єнту викликаного 5-секундною деполяризацією KCl (50 мМ). Вони також були достовірно зменшені з  $3,71 \pm 0,34$  ( $n = 15$ ) у контролі до  $2,95 \pm 0,16$  ( $n = 14$ ,  $P < 0,05$ ) після 20 мкМ додавання мемантину. У попередньо інкубованих нейронах 24 год з  $A\beta_{1-42}$  цей параметр також достовірно був зменшений в присутності мемантину, **Рис. 3.7.2D**. Ці значення були зменшені з  $5,21 \pm 0,35$  ( $n = 19$ ) до  $4,02 \pm 0,36$  ( $n = 16$ ,  $P < 0,05$ ) після застосування мемантину і  $A\beta$ -амілоїду.

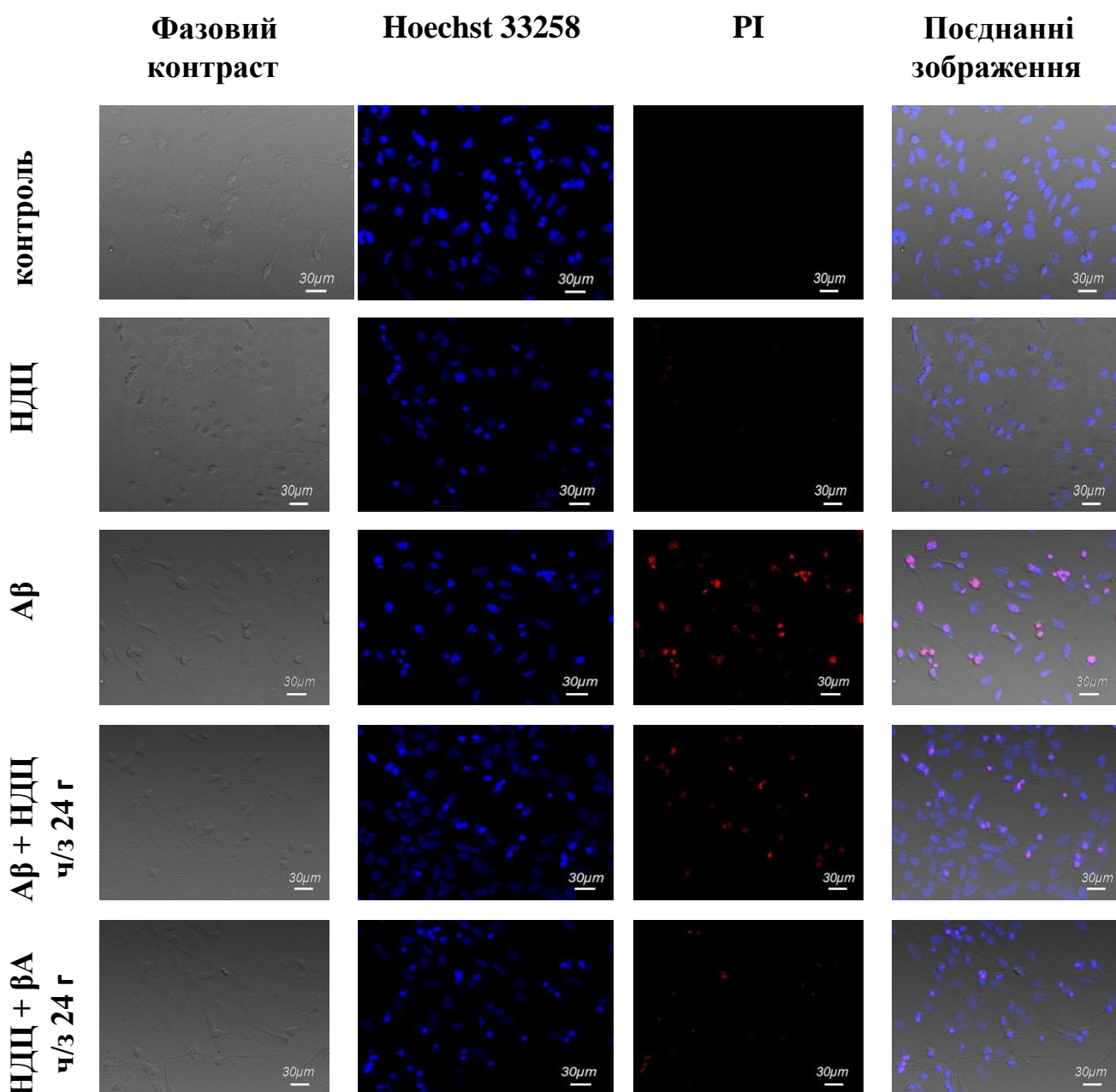
Наші експерименти показали, що мемантин зменшує кальцієвий сигнал як в умовах контролю так і у нейронах, культивованих з  $A\beta_{1-42}$ , але з різним ступенем. Дія мемантину мала тенденцію до зменшення базального рівня кальцію, це значення знаходилось в діапазоні, що не перевищувало 8%. Також даний,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

Отримані результати на нейронах гіпокампу щурів, 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.

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

З даною метою, було проведено п'ять серій експериментів: перша – контрольна; друга - введення НДЦ за 24 години до проведення вимірювання; третя - введення амілоїду  $A\beta_{1-42}$  за 24 години до проведення вимірювання; четверта - введення амілоїда  $A\beta_{1-42}$  на 24 години, і подальше введення НДЦ за 24 години до проведення вимірювання; п'ята - профілактичне введення НДЦ за 24 години до введення амілоїду  $A\beta_{1-42}$ . Після цього використовували подвійне забарвлення клітин двома барвниками, що зв'язуються з ДНК (Hoechst та ПЙ), і проводився підрахунок клітин за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії.

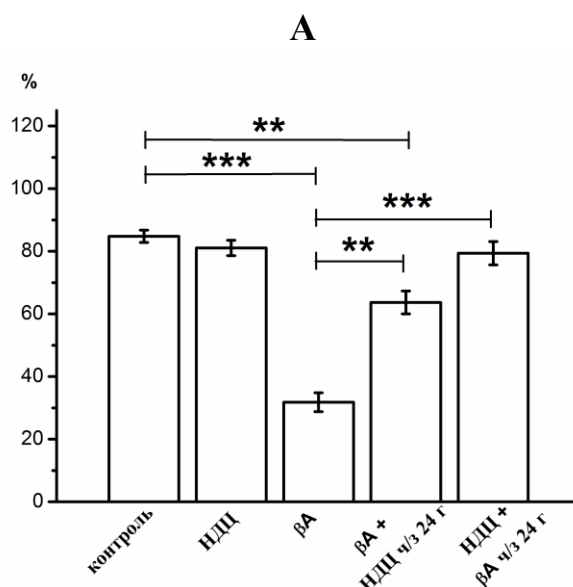
У контрольних зразках ( $n = 1629$ ) культури клітин гіпокампу щурів переважна більшість клітин (в середньому  $84,7 \pm 2,1 \%$ , ) не проявляли будь-яких ознак патологічних змін. Ядра таких клітин, які акумулювали нуклеофор Hoechst 33258, характеризувалися слабо синьою флуоресценцією і мали чіткі контури, ядерний хроматин забарвлювався відносно рівномірно (**Рис.3.7.1**). Ядра відносно невеликої частини нейронів в контрольних зразках ( $5,9 \pm 1,31 \%$ ) давали яскраво синю флуоресценцію і в них була чітко виражена фрагментація хроматину, що було ознакою апоптотичної трансформації. Відмічалась також частка нейронів в зразках, культивованих в контрольних умовах ( $9,4 \pm 1,57 \%$ , в середньому по групі), що забарвлювалась ПЙ і характеризувалась червоною флуоресценцією (що свідчило про некротичне переродження) даної частини проаналізованих нейронних популяцій (**Рис.3.7. 1**).

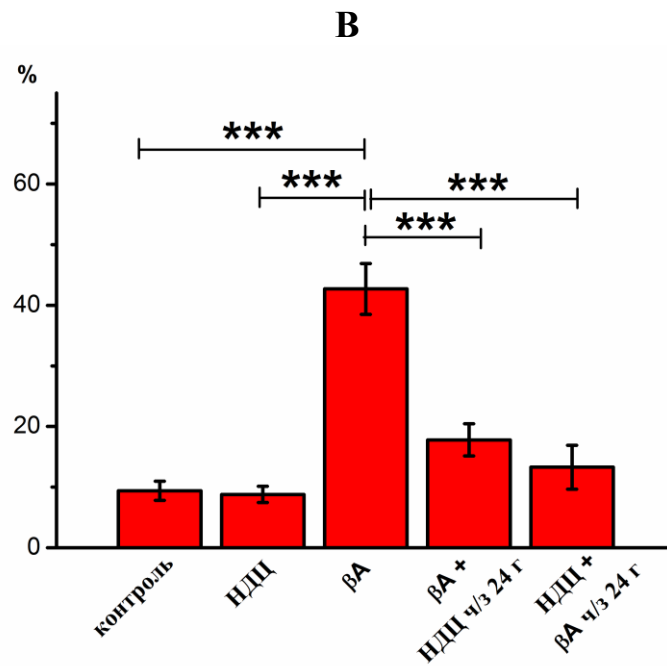
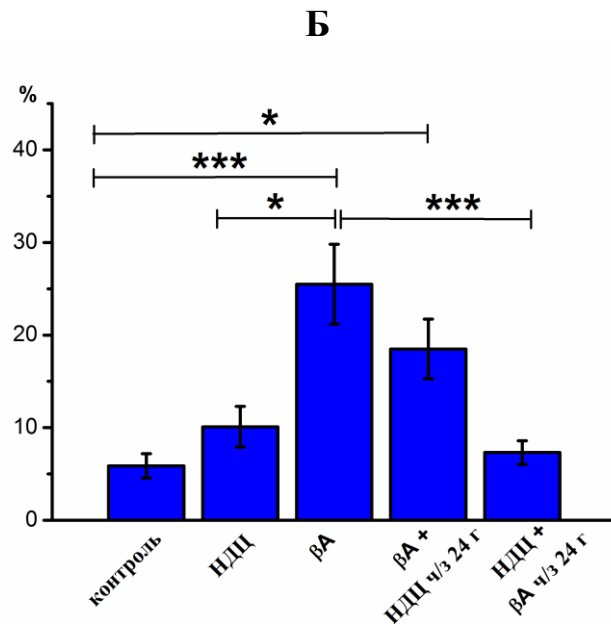


**Рис. 3.8.1** Встановлення можливої нейропротекторної ролі нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на життєздатність нейронів культури гіпокампу під час впливу A $\beta$ <sub>1-42</sub>-амілоїду. А) інкубуються в контролі; Б) у присутності A $\beta$ <sub>1-42</sub> (2 мкМ); В) після інкубації в присутності НДЦ; Г) введення амілоїду A $\beta$ <sub>1-42</sub> потім НДЦ ч/з 24; Д) введення НДЦ за 24 год. до додавання A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Зображення отримували у фазово-контрастному режимі (Ph-C), використовуючи Hoechst 33258 для диференціації живих та апоптотичних клітин (Hoechst), та прониїд йодид (PI) для виявлення некротичних клітин.

Введення НДЦ в другій серії експериментів (n=1139) показало, що частка живих нейронів становила в середньому  $81,1 \pm 2,35$  %, апоптотичних –  $10,1 \pm 2,2$  %, некротизованих –  $8,8 \pm 1,34$  % щодо загальної кількості обстежених клітин. Вірогідних змін в групах клітин в порівнянні з контролем не виявлено, отже сам НДЦ не впливав негативно на клітини культури гіпокампу (**Рис. 3.7.2**).

Після інкубації зразків культури клітин гіпокампу в середовищі з додаванням амілоїду  $A\beta_{1-42}$  (n= 540) кількість живих клітин становили приблизно третину дослідженої популяції (в середньому  $31,8 \pm 3,02$  %). Нейрони ж з апоптотичними змінами в даних умовах спостерігалися приблизно в 5 разів частіше, ніж в контролі ( $25,5 \pm 4,32$  %). Група клітин з ознаками некрозу була також більш численною, ніж в контрольних зразках (в середньому їх кількість становила  $42,7 \pm 4,17$  %) (**Рис. 3.7.2**). Таким чином, наявність амілоїду  $A\beta_{1-42}$  в середовищі культивування індукувало інтенсивну загибель нейронів гіпокампу: більш ніж в половині клітин дослідженої вибірки відзначалися виражені патологічні зміни.





**Рис. 3.8.2.** . Середні значення нормованих кількостей живих нейронів (А), нейонів з ознаками апоптозу (Б) і некрозу (В) у культурі нейронів гіпокампу при додаванні до середовища  $A\beta_{1-42}$  та наночастинок діоксиду церію (НДЦ)

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

Введення НДЦ через 24 години інкубації з амілоїдом  $A\beta_{1-42}$  ( $n = 786$ ), забезпечувало збереження більшої кількості живих клітин, ніж в умовах ізольованої дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$ . Відносна кількість клітин без ознак пошкодження в даному випадку становила більше половини проаналізованої вибірки (в середньому  $63,7 \pm 3,64 \%$ ) і вірогідно відрізнялась як від контрольної, так і при ізольованій дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$  (Рис.3.7. 2). Кількість клітин з апоптотичними змінами в зазначеній групі складала приблизно в тричі більше ніж умовах контролю, але цей показник виявився меншим аналогічного значення в описаній вище групі зразків при ізольованій дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$ . В середньому по групі відносна кількість клітин з ознаками апоптозу становила  $18,5 \pm 3,23 \%$  від загального числа. Іншими словами, додавання НДЦ забезпечувало зниження кількості апоптотичних одиниць 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 відрізнялися приблизно в 2,5 рази (при введенні НДЦ через 24 години інкубації з амілоїдом  $A\beta_{1-42}$  в середовище даний показник в середньому становив  $17,8 \pm 2,65 \%$ ). Тобто, введення НДЦ після дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$  призупиняло його патологічний вплив на нейрони культури гіпокампу.

Після профілактичної інкубації клітин гіпокампу із НДЦ за 24 години до введення амілоїду ( $n = 527$ ) частка живих нейронів щодо загальної кількості клітин складала  $79,4 \pm 3,71 \%$  (приблизно в 2,5 рази більше ніж при ізольованій дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$ ), апоптотичних -  $7,3 \pm 1,28 \%$ , некротизованих -  $13,3 \pm 3,61 \%$  (приблизно в 3 рази менше ніж при ізольованій дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$ ). Іншими словами, попередня обробка культур клітин гіпокампу НДЦ різко зменшувала інтенсивність загибелі вказаних клітин в результаті дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$  як по апоптотичному, так і по некротичному шляхах (Рис. 3.7.2).

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 [99], які можуть утворюватися під впливом А $\beta$  і вести до апоптозу чи некрозу клітин. Крім того, через нетривалий проміжок часу наночастинки регенерують і знову здатні виконувати функцію антиоксиданту.



## РОЗДІЛ 4

### ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

#### **4.1 Вплив білка A $\beta$ -амілоїду та участі кальцію, в умовах моделювання гіперкальціємії, на нейрони культури гіпокампу**

Відомо що кальцій має істотне значення для функціонування клітини взагалі і нейронів зокрема. Іони кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) грають важливу роль у багатьох аспектах нейрональної фізіології, включаючи ріст і диференціацію, властивості потенціалу дії, синаптичну пластичність, навчання та пам'ять.

$\text{Ca}^{2+}$  відіграє особливо важливу роль у клітинах нейронів, де він опосередковує численні життєво важливі фізіологічні процеси та відіграє центральну роль у контролі синаптичної пластичності [100]. Нейрони вимагають надзвичайно точного контролю концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  для нормального функціонування. У нейронну  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізацію залучається велика кількість  $\text{Ca}^{2+}$  каналів: потенціал-залежні  $\text{Ca}^{2+}$  канали плазматичної мембрани, НМДА рецептори, AMPA рецептори, TRP канали та депо-керовані канали. Вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо ендоплазматичного ретикулу (ER) здійснюється інозітол-1,4,5-трісфосфатними ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) и ріанодиновими рецепторами ( $\text{RyR}$ ). Помпа SERCA в ER,  $\text{Ca}^{2+}$  помпа плазматичної мембрани і  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  обмінники, плазматичної мембрани контролюють концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі у вузькому діапазоні значень. У формуванні цитозольних  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів важливу роль відіграють мітохондрії [101]. Нейрони надзвичайно чутливі до рівня концентрації кальцію, і навіть незначні дефекти гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  можуть призвести до руйнівних наслідків та зміни нормальної діяльності.

Порушення  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостазу кальцію сприяє утворенню різних патофізіологічних станів, таких як некроз, апоптоз, дефіцит аутофагії та дегенерація [102]. Гіпотеза про те, що порушення регуляції  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до нейродегенерації, була вперше запропонована доктором Хачатуряном у середині 80-х років. Він припускав, що стійкий дисбаланс клітинного  $\text{Ca}^{2+}$  може порушити нормальні функції нейронів і в кінцевому підсумку призвести до нейродегенеративних захворювань, включаючи ХА [103].

Можливий зв'язок між “амілоїдним каскадом” та “ $\text{Ca}^{2+}$  гіпотезою” в патогенезі ХА виявився в результаті досліджень, які показують, що, по-перше, порушення регуляції  $\text{Ca}^{2+}$  модулює утворення амілоїдних бляшок, по-друге, амілоїдні бляшки та розчинні агрегати А $\beta$  збільшують рівень цитозольного  $[\text{Ca}^{2+}]$  різними механізмами [104].

Позаклітинний кальцій відіграє ключову роль у регуляції широкого спектру фізіологічних функцій. Кальцій бере участь у згортанні крові, скороченні м'язів та кальцифікації кісток [105]. Гомеостаз кальцію жорстко регулюється, але може бути зруйнований безліччю доброякісних або злоякісних процесів. Виявлення цих станів варіюються від безсимптомного захворювання, випадково виявленого під час скринінгових лабораторних досліджень, до важких метаболічних порушень. Багато органів беруть участь у регуляції кальцію. Головними серед них є паращитовидні залози, коли рівень кальцію падає, паращитовидні залози збільшують секрецію паратиреоїдного гормону (ПТГ) [106].

Гіперкальціємія має багато клінічних проявів, які вражають нервово-м'язову, шлунково-кишкову, ниркову, скелетну та серцево-судинну системи. Найпоширенішими причинами гіперкальціємії є первинний гіперпаратиреоз та злоякісні новоутворення [105]. Також є дослідження впливу гіперкальціємії на центральну нервову систему що включають тривогу, депресію та когнітивну дисфункцію, а у пацієнтів, у яких помітно підвищений рівень кальцію в сироватці крові, може спостерігатися млявість,

сплутаність свідомості, ступор. Виникнення цих патологічних процесів може бути спричиненим безпосереднім впливом ПТГ на мозок [107].

Було встановлено, що А $\beta$ -амілоїд, присутній у надлишкових кількостях, може призводити до порушення кальцієвого гомеостазу та проявляти в мозку нейротоксичні властивості через збільшення. Відомо, що збільшення концентрації кальцію в зовнішньоклітинному середовищі сприяє пошкодженню нейронів завдяки накопиченню його в клітинах та клітинних структурах. Збільшення зовнішньоклітинного кальцію та різні патологічні стани, включаючи ХА, призведуть до погіршення функціонування нейронів. Тому мета нашої роботи полягала у визначенні впливу А $\beta$ -амілоїду на кальцієвий гомеостаз, в умовах гіперкальціємії, у клітинах культури гіпокампу.

У наших результатах ми виявили, що введення в середовище культивування CaCl<sub>2</sub> в концентрації більше ніж за фізіологічних умов (понад 10<sup>-4</sup>-10<sup>-3</sup>М) індукувало загибель нейронів гіпокампу, у половині клітин дослідженої вибірки відзначалися виражені патологічні зміни. Механізм цих подій за даними літератури пояснюється сідаючим. Цитоплазматичний кальцій активує кальпаїни – кальцій-залежні цистеїнові протеази, що сприяють руйнуванню лізосомальних мембран і мобілізації лізосомальних ферментів, зокрема, неспецифічних, так званих кілерних або виконавчих протеаз - катепсинів. Катепсини можуть активувати проапоптозний білок Bid і каспазу 3 і сприяти запуску апоптозу [108], але вони ж руйнують білки цитоскелету і клітинних мембран, і тим самим порушують їх цілісність, що приводить до некрозу[102,109,110]

Додавання амілоїду А $\beta$ <sub>1-42</sub> в середовище культивування спричинювало нейротоксичний ефект та індукувало загибель нейронів гіпокампу. Такі ж дані про токсичний вплив і зниження життєздатності клітин під дією амілоїду А $\beta$ <sub>1-42</sub> отримано і іншими дослідниками, наприклад, в органотиповій культурі гіпокампу [111], в первинній культурі гіпокампу [112–114]В цих роботах після інкубації зазначених клітин з амілоїдом

спостерігали  $A\beta_{1-42}$  - індуковані морфологічні зміни, такі як усадка тіл нейронів, збільшення кількості мертвих клітин та клітинних уламків. Механізми загибелі клітин під дією амілоїду продовжують вивчатися. На даний час існують такі теорії. Аномальна глутаматергічна активність, асоційована з постсинаптичними рецепторами і порушенням процесів активації НМДА-рецепторів під дією накопичуваного амілоїду, призводить до глутамат-викликаної ексайтотоксичності - каскаду дегенеративних реакцій у нейронах, а саме метаболічної дезінтеграції, оксидативному стресу і як наслідок апоптозу та некрозу [115,116]. В той же час через надмірну активацію НМДА-рецепторів, у свою чергу, відбувається послідовний вхід  $Ca^{2+}$  в клітини [117] і в результаті загибель нейронів шляхами, описаними вище. Також було встановлено, що амілоїд  $A\beta_{1-42}$  може порушувати кальцієвий гомеостаз через збільшення вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо ендоплазматичного ретикулума [116,118], або через канали, сформовані самим  $A\beta$ -амілоїдом [119,120] та, відповідно, призводити до порушення функціонування ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій, розвитку апоптозу та вільнорадикального окислення в нейронних мембранах [121]. У попередніх експериментах нашого відділу було встановлено, що після преінкубації з  $A\beta$ -амілоїдом дійсно відбувалось підвищення рівня внутрішньоклітинної концентрації кальцію [122], ушкоджувалась кальційзахоплююча функція мітохондрій нейронів культури гіпокампа щурів та змінювалась активність потенціалкерованих кальцієвих каналів плазматичної мембрани культивованих нейронів гіпокампу, так, вірогідно і, процесів, котрі забезпечують виведення кальцію з клітини [121]. Подібне підвищення базового рівня кальцію було показане на культурі кортикальних нейронів та нейронів культури гіпокампа [123], де 48-годинна інкубація з  $A\beta_{1-40}$ -амілоїдом та  $A\beta_{25-35}$ -амілоїдом призводила до підвищення базового рівня кальцію, причому в гіпокампальних нейронах порівняно з кортикальними рівень кальцію був вищим. Також експериментальні дані декількох дослідницьких груп за допомогою методу

фіксації потенціалу продемонстрували здатність амілоїду збільшувати кальцієвий струм в центральних нейронах [124,125], а також на клітинній лінії N1E, 24-годинна інкубація якої з  $A\beta_{1-42}$ -амілоїдом призвела до збільшення активності кальцієвих каналів [126]. Подібне збільшення струму спостерігалось і в експериментах на центральних гранулярних та кортикальних нейронах, де їх попередньо інкубували з  $A\beta_{25-35}$ -амілоїдом [127].

Таким чином, на підставі отриманих результатів ми припускаємо участь кальцієвого механізму розвитку апоптозу та некрозу в нашій культурі при дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$ . Слід зазначити, що досліджень, подібних нашим за умов гіперкальціємії на культурах клітин на даний час не має. Отже, необхідні додаткові зусилля з метою з'ясування ролі внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  в патогенезі ХА. У міру того, як стане зрозумілим наше уявлення про механізми, що пов'язують розлади гомеостазу  $Ca^{2+}$  з патологією ХА, будуть розроблені більш специфічні терапевтичні засоби, спрямовані на канали на мембранах внутрішньоклітинних органел, такі як ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії та лізосоми, що забезпечить нові можливості для профілактики та лікування ХА.

#### **4.2 Вплив $A\beta_{1-42}$ -амілоїду на зміну внутрішньоклітинного кальцію та його вмісту в ендоплазматичному ретикулуму**

Багато механізмів та внутрішньоклітинних кальційрегулюючих структур можуть бути залучені в ХА, включаючи мітохондрії [18,84,128], ендоплазматичний ретикулум [129], PS (пресеніліни) [130], потенціалкеровані кальцієві канали [131], калієві канали [132], ацетилхолінові рецептори [133], рецептори глутамату [134] та інші процеси. У наших дослідженнях ми торкаємось лише одного аспекту, що

стосується цієї хвороби, це роль ріанодинових рцепторів (RyR) у розвитку ХА.

Наші експерименти показали, що у культивованих з  $A\beta_{1-42}$ амілоїдом нейронах гіпокампу у порівнянні із контролем відбувалось збільшення як базального рівня вільного кальцію на 12% , збільшувалась амплітуда кальцієвих відповідей на аплікацію 50мМ розчину KCl на 14% та введення кофеїну на 13%, що свідчить про збільшення вмісту  $Ca^{2+}$  в ендоплазматичному ретикулумі. Отже,  $A\beta_{1-42}$ -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. Останнє може означати, що  $A\beta$  може мати декілька цілей своєї дії, включаючи зміни функції RyR.

Щодо відомих механізмів дії амілоїду  $A\beta_{1-42}$ , було запропоновано кілька гіпотез. Серед них - «амілоїдна гіпотеза». Згідно з якою також є кілька припущень:  $A\beta$  індукує збільшення кальцієвих сигналів за рахунок утворення піріонів  $A\beta$  в клітинній мембрані;  $A\beta$  олігомери інтенсивно викликають сигнали  $Ca^{2+}$  завдяки їх вивільненню з ендоплазматичного ретикулуму; накопичення  $A\beta$  олігомерів в синапсах пошкоджує рецептори глутамату, підвищуючи, таким чином, внутрішньоклітинний  $Ca^{2+}$ . Також було запропоновано багато інших процесів, пов'язаних з різними мутаціями пресенілінів (ПС) або посиленням метаболізму білка-попередника амілоїду (APP), див. огляд[135]. Серед всіх інших гіпотез також було запропоновано таку як "пресенілінова ". Пресеніліни є каталітичним компонентом комплексу  $\gamma$ -секретази, відіграючи роль у генерації  $A\beta$ . Найпоширенішими мутаціями ПС були зв'язані з клітинним стресом ендоплазматичного ретикулума [136], оксидативним стресом [137], аутофагія и апоптоз[138], також однією з них є зміна експресії ріанодинових рцепторів у мозку, ураженому на ХА. Точні молекулярні механізми, які могли б лежати в основі регуляції експресії RyR при ХА, досі невідомі. Однак було запропоновано таку гіпотезу, що збільшення експресії RyR може бути

компенсуючим механізмом, пов'язаним із втратою функції витоку пресенілінів ПС [139]. Було показано, що різні моделі дослідження ХА пов'язані з Аβ та надмірною експресією мутацій ПС. В одних із таких досліджень показано, що пресеніліни можуть відігравати важливу роль у активності каналу RyR безпосередньо через взаємодію пресенілінів з рiадиновими рецепторами і опосередковано через взаємодію ПС з модуляторами RyR. Пресеніліни виконують роль пасивних каналів витоку кальцію з ЕР, а деякі мутації порушують цю функцію пресенілін, викликаючи тим самим перепоповнення ЕР  $\text{Ca}^{2+}$  [139]. Таким чином, посилене опосередковане вивільнення рiанодиноними рецепторами  $\text{Ca}^{2+}$  може опосередковано брати участь у загибелі нейронів через перевантаження цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Збереження внутрішньоклітинного гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  має важливе значення для функції нейронів, їх виживання і є основним компонентом синаптичної передачі. “Гіпотеза кальцієвого гомеостазу ХА”, вказує на порушену кальцієву сигналізацію в ендоплазматичному ретикулумі, особливо коли в цей процес залучені мутації білків пресенілінів.

#### **4.3 Роль відкривання мітохондріальної пори у загибелі нейронів гіпокампу при впливі Аβ<sub>1-42</sub> амілоїду**

Хвороба Альцгеймера (ХА) є однією з найпоширеніших патологій, яка зачіпає значний відсоток населення планети, але, на жаль, не піддається ефективному лікуванню. Є дані, що патогенез хронічних нейродегенеративних захворювань (у т.ч., ХА) включає в себе відкривання пори неспецифічної проникності мітохондрій, що, як правило, передусь апоптичній загибелі клітин [140,141] Активація цього мультипротеїнового комплексу, побудованого з компонентів обох мембран мітохондрій, супроводжується розвитком неспецифічної проникності цих органел, різким зменшенням їх мембранного потенціалу та полегшеним транспортуванням

речовин масою до 1500 Да, що, у свою чергу, призводить до швидкого виходу  $\text{Ca}^{2+}$  із матриксу у позамітохондріальний простір за його концентраційним градієнтом [142,143]. Існують дані, що формування мітохондріальної пори також є характерною рисою ряду патологічних станів клітин печінки, м'язів, серцево-судинної системи, інфекційних захворювань, раку, гострих та хронічних інтоксикацій, у тому числі, викликаних солями металів [84,140,142,144,145]. Припускається і фізіологічна роль цієї системи, що полягає у швидкому виході надлишку акумульованого мітохондріями  $\text{Ca}^{2+}$ , регулюванні об'єму, рН та окисно-відновної рівноваги органел, імпорті білків, звільненні матриксу від пошкоджених та зайвих молекул, позбавленні клітини від самих зруйнованих мітохондрій тощо [146–149]. Втім, незважаючи на очевидний зв'язок молекулярних ефектів, що супроводжують ХА та розвиток неспецифічної проникності мітохондрій у нейронах, механізми, що лежать в основі цього процесу, і досі залишаються маловивченими.

Потрібно підкреслити, що на сьогоднішній день літературні дані щодо подібних досліджень є надзвичайно обмеженими [140]. Загалом відомо, що на ранній стадії розвитку патологічних явищ, що супроводжують ХА, порушення процесів окиснення та інші нейротоксичні чинники можуть призвести до незворотного відкривання мітохондріальної пори, що, у свою чергу, викликає істотний клітинний стрес [141,150]. Зокрема, генерація активних форм кисню під впливом А $\beta$ -амілоїду призводить до активації перекисного окислення ліпідів та утворення альдегід-4-гідроксинеоненалу, який є потужним активатором апоптозу та мітохондріальної пори завдяки прямій взаємодії з її структурним компонентом – адедніннуклеотидтранслоказою [151,152]. За деякими даними, А $\beta$ -амілоїд також здатний безпосередньо впливати на проникність мітохондрій [84,153]. Цікаво, що експерименти, проведені на астроцитарно-нейрональній культурі, показали, що А $\beta$ -амілоїд діє переважно саме на астроцити, внаслідок чого генеруються активні форми кисню та



відбувається деполяризація мітохондрій. А послідоюча загибель нейронів є лише непрямим наслідком цих процесів [154]. Крім того, порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляції та відповідь ендоплазматичного ретикулуму на стрес, що активує мітохондріальні ферменти і сенсibiliзує мітохондріальні мембрани для неспецифічної проникності [155], були виявлені при дослідженні культур клітин і трансгенних мишей *in vivo*, які експресують мутантні форми пресеніліну-1 [156]. Схожі до наших, досліджень були проведені групою вчених на фібробластах людей хворих на ХА. Вони виявили, що у порівнянні із звичайними фібробластами, фібробласти з ХА мали порушення регуляції кальцію в мітохондріях. Крім того, фібробласти з ХА показали стійку активацію неспецифічного мітохондріального кальцієвого каналу, перехідної пори мітохондріальної проникності. Більше того, фармакологічна блокада ППМП циклоспорином А запобігла підвищенню рівня супероксиду мітохондрій та значно покращила порушення регуляції мітохондрій та цитозольних кальцій у фібробластах ХА [157].

Результати однієї з наукових груп вказують на значний розвиток некрозу у клітинах культури гіпокампа щурів під впливом  $\text{A}\beta_{25-35}$ -амілоїда порівняно з контрольними. Вчені пояснили одержаний ефект деполяризацією мітохондріальної мембрани та безпосередньо пов'язаним із цим пошкодженням ферменту полі(АДФ-рибозо)-полімерази, здатної за нормальних умов відновлювати молекулу ДНК, а отже, запобігати загибелі клітини. Втім, суттєві методичні відмінності даної роботи (зокрема, інша довжина молекули  $\text{A}\beta$ -амілоїда) роблять неможливим повноцінне порівняння отриманих результатів з нашими..

#### **4.4 Дослідження захисних властивостей антагоністу НМДА – рецепторів мемантину на життєздатність нейронів культури гіпокампу щурів при моделюванні ексайтотоксичності та при дії А $\beta$ -амілоїду**

Однією з найважливіших структур, пов'язаних з патологією ХА, є гіпокамп. Зокрема, особливості цієї хвороби, включаючи позаклітинні відкладення А $\beta$ , нейрофібрилярні клубки та втрата нейронів, спостерігаються у гіпокампі [5,6], в ході розвитку ХА до 80% нейронів в гіпокампі гине [158]. В нашій лабораторії клітинна модель ХА створюється на культурі нейронів саме гіпокампа [159,160]. Тому метою цього дослідження було виявити захисні ефекти антагоністу НМДА-рецепторів мемантину на нашій моделі ХА у рамках гіпотези, що лікування мемантином може зменшити ексайтотоксичність, індуковану А $\beta$ .

Глутамат - основний збудливий нейромедіатор в головному мозку, широко представлений в неокортексі та гіпокампі. У нормі при активації пресинаптичного нейрона глутамат вивільнюється в синаптичну щілину, зв'язується з НМДА-рецептором, що відкриває катіонний канал, який в спокої закритий іоном магнію. Відкриття каналу призводить до входження іонів кальцію, який регулює життєдіяльність нейронів. Рецептори НМДА-типу характеризуються високим ступенем пластичності як щодо експресуємої на мембранах їх кількості, так і активності. У нормі вони активуються лише при певних фізіологічних процесах, наприклад, при індукції синаптичної пластичності, і здатні до тривалої тонічної активності (довготривалої потенціації синаптичної передачі), що вважається одним з ключових механізмів забезпечення таких вищих функцій, як навчання, пам'ять, поведінкові та інші реакції [161,162].

Накопичення глутамату в синапсах внаслідок порушення зворотного захоплення пресинаптичними нейронами або порушення його захоплення

гліальними клітинами призводить до постійної фонові активації нейронів. Тривала деполяризація мембрани, викликана аномальним накопиченням глутамату в синапсі, усуває магній з іонного каналу, відкриваючи шлях для масивного входження всередину нейронів іонів кальцію, що зумовлює  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковану ексайтотоксичність. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  призводять до активації протеаз, фосфоліпази A2, дія яких направлена на порушення окислювального фосфорилування, мітохондріальної дисфункції, вивільнення арахідонової кислоти, що лежить в основі пошкодження і смерті нейронів шляхом апоптозу або некрозу. При наявності надмірної кількості глутамату, протеїнкіназа CaMK-II гіперактивується і починає неспецифічне фосфорилування нейрональних білків, порушуючи тим самим регуляцію всіх клітинних мембран з наступною зміною довготривалої потенціалізації на тривалу депресію, що призводить до погіршення пам'яті [163]. Про участь подібного роду механізмів в патогенезі ХА свідчить, наприклад, виявлення низького рівня зворотного захоплення глутамату в лобовій і скроневій корі, зниження рівня синаптофізіна (глікопротеїну мембрани синаптичних пухирців) і VGluT1 (білка синаптичних пухирців) [164–166]. Відносний надлишок глутамату може бути пов'язаний і з інтерналізацією (ендоцитозом) НМДА-рецепторів, яка стимулюється A $\beta$  [167]. Можливий і інший механізм патологічного впливу A $\beta$  на НМДА-рецептори - через хронічну запальну відповідь, ініційовану в мікроглії. Процеси, що лежать в основі початку запалення, призводять до каскаду ланцюгових клітинних подій, включаючи блокування поглинання глутамату глією та посилене його вивільнення в синаптичну щілину. Запалення може також звільняти потенціал-залежні НМДА-канали від блокування іонами магнію, що призводить до збільшення потоку іонів кальцію через них, порушення мітохондріального дихання, запуску окисного стресу і в решті решт апоптозу, як вже було зазначено вище [168].

Описані результати експериментальних досліджень доводять, що інгібування НМДА-рецепторів - перспективна терапевтична стратегія при

ХА. Зниження активності рецепторів, які запускають каскад апоптозу, ймовірно може зменшити як швидкість розвитку нейродегенерації, так і симптоми хвороби внаслідок підвищення життєздатності тих чи інших популяцій нейронів.

До препаратів, що діють на глутаматергічну систему, відноситься антагоніст НМДА-рецепторів мемантин. Препарат швидко і зворотно зв'язується з НМДА-рецепторами, що вигідно відрізняє його від інших антагоністів НМДА-рецепторів і лежить в основі його ефективності. Мемантин, будучи неконкурентним низькоафінним потенціал-залежним антагоністом НМДА-рецепторів, блокує катіонний канал в стані спокою, і за рахунок цього переривається каскад нейродегенерації, викликаній входом кальцію і окислювальним стресом постсинаптичних нейронів. При повній деполяризації мембрани мемантин видаляється з каналу, що забезпечує нормальну синаптичну передачу [169].

В експериментах показано, що при застосуванні мемантину зменшуються обсяг і ступінь нейронального ушкодження, що в свою чергу дало підставу для опису його можливих нейропротекторних властивостей. Дію препарату продемонстровано на багатьох експериментальних моделях: при церебральному інфаркті [170], крововиливі [171], хронічній ішемії [172], травматичному пошкодженні [173,174] та інших станах [162].

Що стосується ХА, то низка робіт присвячена дослідженню захисних властивостей мемантину на моделі продромальної стадії хвороби - трансгенних мишах. Наприклад, показано, що лікування мемантином тварин лінії APP23, у яких вже в 6 місячному віці накопичуються амілоїдні бляшки, що супроводжується астрогліозом і мікрогліозом, достовірно покращувало процеси навчання і пам'яті [175]. Тривале лікування мемантином трансгенних мишей Tg2576 було пов'язано з достовірним зменшенням відкладання амілоїдних бляшок, кількості дегенеруючих аксонів і збільшенням щільності синапсів [176].

Також показаний прокогнітивний ефект мемантину в доклінічних моделях ХА. В експериментах на щурах мемантин запобігав розвитку дефіциту короточасної пам'яті, пов'язаного з введенням  $A\beta_{1-40}$  [177], пошкодженню консолідації довготривалої пам'яті, спричиненому розчинним бета-амілоїдом [178], покращував просторову пам'ять тварин, яким вводили олігомери  $A\beta_{1-42}$  [179] та інші. Зростаюча кількість даних свідчить про те, що частина клітинної дегенерації, спричиненої амілоїдом, пов'язана з надмірною активацією НМДА-рецепторів [180–183]. Ця активація може статися після зайвого накопичення позаклітинного глутамату і, як наслідок, розвивається глутамат-викликана ексайтотоксичність - каскад дегенеративних реакцій у нейронах, а саме метаболічна дезінтеграція, оксидативний стрес та апоптоз, що призводять в результаті до загибелі клітин [180,184]. З даних літератури відомо [185–187], що мемантин забезпечує блокаду іонного каналу НМДА-рецепторів в умовах розвитку ексайтотоксичності, тобто при патологічному збудженні НМДА-рецепторів при надмірній концентрації глутамату в синаптичній щілині. Цей механізм сприяє припиненню надмірної активності цього типу рецепторів, зберігаючи можливість проведення через них фізіологічних глутаматергічних рецептор-ефекторних реакцій [180,188]. В результаті описаного механізму мемантин проявляв нейропротекторні властивості, захищаючи від токсичності, спричиненої НМДА, нейрони культури кори [189,190] і гіпокампу щурів [191], органотипових гіпокампульних зрізів і гранулярних клітин мозочка [188], гангліозних клітин сітківки [192]. Тому у наших експериментах ми вирішили перевірити чи буде мемантин запобігати апоптозу та некрозу клітин, викликаних надмірною активацією НМДА-рецепторів, в наших експериментальних умовах. Для цього ми провели серії експериментів із додаванням в середовище інкубації власно агоністу цих рецепторів НМДА та одночасне введення НМДА та мемантину на 24 години. Введення НМДА в середовище культивування індукувало інтенсивну загибель нейронів гіпокампу, у половині клітин дослідженої

вибірки відзначалися виражені патологічні зміни. Порівнюючи результати з отриманими при інкубації з додаванням одного НМДА та після спільної інкубації клітин культури гіпокамп з та мемантином кількість живих клітин збільшилася на 43,5 %, кількість апоптотичних і некротичних знизилась відповідно на 10 % і 32 % . Це свідчить про те що мемантин в наших експериментальних умовах здійснював захисний ефект проти ексайтотоксичності, викликаній додаванням НМДА в середовище культивування. Отже, потенціал мемантина як нейропротекторного агента проти загибелі клітин, опосередкованої НМДА-рецепторами, в доклінічних моделях підтверджується і нашими результатами.

Введення в середовище інкубації амілоїду  $A\beta_{1-42}$  спричинювало нейротоксичний ефект та індукувало загибель нейронів гіпокампу. Такі ж дані про токсичний вплив і зниження життєздатності клітин під дією амілоїду  $A\beta_{1-42}$  отримано і іншими дослідниками, наприклад, в органотиповій культурі гіпокампу [111], в первинній культурі гіпокампу [113,160,193,194]. В цих роботах після інкубації зазначених клітин з амілоїдом спостерігали  $A\beta_{1-42}$  - індуковані морфологічні зміни, такі як усадка тіл нейронів, збільшення кількості мертвих клітин та клітинних уламків.

При одночасному введенні амілоїду  $A\beta_{1-42}$  та мемантину, додавання мемантину призупиняло патологічний вплив амілоїду  $A\beta_{1-42}$  на нейрони культури гіпокампа. Досліджень, подібних нашим на культурах клітин на даний час не багато, проте вони в певній мірі узгоджуються з нашими результатами. Так, в експериментах *in vitro* мемантин продемонстрував здатність нівелювати ефекти бета-амілоїду, в тому числі його розчинних олігомерів, в культурах кортикальних і гіпокампальних нейронів [190,195]. Також було встановлено, що мемантин запобігає патологічному апоптозу і нейрональним втратам в гіпокампі при одночасних введеннях з  $A\beta_{1-40}$  [196], тобто володіє нейропротекторним ефектом.

Підводячи підсумок, ми продемонстрували, що блокування НМДА-рецепторів в культурі нейронів гіпокампа при дії А $\beta$ -амілоїду призводить до регуляції потужного та тривалого шляху/шляхів їх виживання внаслідок зупинки або блокування механізмів смерті шляхом апоптозу і некрозу. Так як, мемантин запобігав нейротоксичності, опосередкованій НМДА-рецепторами в нашій моделі ХА і є також ефективним на інших тваринних моделях патологій, ми вважаємо, що ця сполука заслуговує на подальше тестування при різних клінічних неврологічних синдромах, що виникають внаслідок надмірної стимуляції зазначених рецепторів. Оскільки препарати класу аміноадамонтанів вже застосовуються клінічно, таке тестування та застосування до кількох неврологічних порушень людини може бути пришвидшене.

#### **4.5 Вплив мемантину на сигналізацію кальцію у нейронах гіпокампу щурів, культивованих з А $\beta$ -амілоїдом**

Глутамат є основним швидким збудливим нейромедіатором і бере участь у майже всіх функціях ЦНС, особливо в зонах кори та гіпокампа - 70% усіх збудливих синапсів у ЦНС використовують глутамат як нейромедіатор [197]. Іонотропні рецептори глутамату (iGluRs), відповідальні за швидкий нейронний зв'язок при збуджуючих синапсах, містять три підродини:  $\alpha$ -аміно 3-гідрокси 5 -метил 4-ізоксазол-пропіонова кислота (AMPA), рецептори кайнату та НМДА-рецептори [198]. Серед них іонні канали, поєднані з НМДА-рецепторами, як правило, найбільш проникні для  $\text{Ca}^{2+}$ , що може, в свою чергу, функціонувати як другий месенджер у різних сигнальних шляхах [199].

Гіпокамп має високу щільність рецепторів глутамату, зокрема, рецепторів НМДА, є надзвичайно важливим для деяких форм навчання та пам'яті. У нормі вони активуються лише при певних фізіологічних процесах, наприклад, при індукції синаптичної пластичності, і здатні до

тривалої тонічної активності (довготривалої потенціації синаптичної передачі), що вважається одним з ключових механізмів забезпечення таких вищих функцій, як навчання, пам'ять, поведінкові та інші реакції [200].

НМДА-рецептори були задіяні як медіатор пошкодження нейронів, пов'язаних з багатьма неврологічними розладами, включаючи ішемію, епілепсію, травми головного мозку, деменцію та нейродегенеративні розлади, такі як ХА [201]. Патологічні підвищення рівня глутамату а також інші порушення, які змінюють потенціал мембрани спокою (наприклад, порушення метаболізму), можуть спричинити надмірне стимулювання НМДА-рецепторів, що викликає екситотоксичність та сприяє загибелі клітин, цей процес лежить в основі потенційного механізму нейродегенерації, що виникає при ХА [202]. Мемантин, неконкурентний антагоніст НМДА-рецептора, блокує іонні канали НМДА з швидкою кінетикою. При повній деполяризації мембрани мемантин видаляється з каналу, що забезпечує нормальну синаптичну передачу. Вважається, що ці властивості лежать в основі очевидної здатності мемантину забезпечувати нормальну фізіологічну функцію рецептора, одночасно порушуючи патологічну активацію. Також досліджено, що блокування НМДА-рецепторів пом'якшує спричинену А $\beta$  дегенерацію у нейронах гіпокампа щурів [199]. Доклінічні дані говорять про те, що опосередкована НМДА-рецепторна екситотоксичність може бути пов'язана з наслідками аномального відкладення А $\beta$  при ХА.

У наших експериментах ми перевірили вплив мемантину на компоненти внутрішньоклітинної сигналізації кальцію, такі як базальний рівень Са<sup>2+</sup> у цитоплазмі, зміни перехідних процесів Са<sup>2+</sup>, викликані деполяризацією мембрани з стимуляцією клітин електричним полем, активацією потенціалчутливих каналів Са<sup>2+</sup> аплікацією деполяризуючим розчином (КСІ 50 мМ тривалістю 5секунд) і вивільнення Са<sup>2+</sup> за допомогою RyR рецепторів, з ендоплазматичного ретикулума. Крім того, ми оцінили ці параметри в нейронах, які були оброблені А $\beta$ <sub>1-42</sub> (клітинна модель



ХА)[203].

Наші результати показали, що  $A\beta_{1-42}$  збільшив усі досліджувані параметри в наших експериментах. Таким чином, співвідношення ( $F_{340}/F_{380}$ ) показників базального рівня  $Ca^{2+}$  збільшились на 8,67%, пік транзйєнтів амплікацією деполяризуючим розчином (50мМ КСІ протягом 5сек.) - 40,32%, пік кофеїну - 40,19%, тоді як пік стимуляції клітин електричним полем трохи зменшився на 7, 69%. Ці дані показують, що  $A\beta_{1-42}$  суттєво впливає на потенціалзалежні канали, збільшуючи надходження кальцію в клітину і відбувається більше заповнення депо ендоплазматичного ретикулуму та вивільнення з нього кальцію в цитоплазму під час дії агоніста RyR [203].

Наші експерименти продемонстрували, що мемантин зменшував всі тестовані показники в умовах контролю та нейрони, культивовані з  $A\beta_{1-42}$  (модель ХА), але з різним ступенем. Дія мемантину мала тенденцію до зменшення базального рівня кальція, це значення знаходилось в діапазоні, що не перевищувало 8%. Також даний, ефект був менш виражений для кальцієвих транзйєнтів при стимуляції електричним полем, значення не перевищували 3% у контролі та 11% у клітинах приінкубованих з  $A\beta_{1-42}$ . Найбільш виражений ефект мемантину був виявлений у випадку застосування кофеїну та КСІ [203].

Раніше було показано, що стимуляція клітин електричним полем може впливати на кальцієві канали,  $Ca^{2+}$  запаси,  $Na^{+}$  канали [204]. Також було відомо, що стимуляцію електричним полем, краще використовувати переважно для модуляції електросекреторного зчеплення на нервових закінченнях, де це можна краще дослідити, викликаючи синаптичне вивільнення за допомогою електричних імпульсів. Ми припускаємо, що викликані стимуляцією електричним полем електричні імпульси, забезпечують значну деполяризацію мембрани. Наші експерименти показують, що стимуляція клітин електричним полем не надто підходить для вивчення ефектів хімічних сполук, але його можна успішно

використовувати, головним чином, для заповнення депо ендоплазматичного ретикулуму  $\text{Ca}^{2+}$ . Хоча відомо, що мемантин є антагоністом рецепторів НМДА, наші дослідження показали, що він може частково блокувати кальцієві канали L-типу нейронів гіпокампа в концентрації 20 мкМ. Це спостереження узгоджується з даними, отриманими на дослідженнях гангліозної клітини сітківки дорослих жаб *Ranatemporaria* [205]. У цих експериментах автори показали, що мемантин (30 ÷ 45 мкМ) значною мірою інгібує  $\text{Ca}^{2+}$  канали L2 типу. Їх результати свідчать про те, що нейропротекторний ефект мемантину може бути забезпечений не тільки за рахунок інгібування потоків рецепторів НМДА, але і за рахунок пригнічення L.- типу каналів. Наші результати, отримані на нейронах гіпокампа щурів, повністю підтверджують вищезазначений висновок, що мемантин також пригнічує потенціалзалежні кальцієві канали, які ймовірно за все, є L-типом [203].

#### **4.6 Вплив нанокристалічного діоксиду церію на життєздатність нейронів культури гіпокампа при токсичній дії бета-амілоїду**

В останні роки активно вивчаються нові можливості застосування в медицині нанобіоматеріалів, що володіють рядом унікальних властивостей, з метою діагностики та лікування захворювань або поліпшення біологічних функцій організму. Особливо широко досліджуються можливості використання нанокристалічних матеріалів на основі діоксиду церію (НДЦ). Такі їх характеристики, як низька токсичність поряд зі специфічними окислювально-відновними і протирадикальними властивостями, здатність до регенерації дозволяють розглядати наночастинки церію як перспективний об'єкт для біомедичних застосувань [206]. Наприклад, показано, що НДЦ зменшує дегенерацію сітківки ока [207], захищає тканини мозку [208],

фібробласти шкіри людини [209], клітини ендотелію [210] та серця [211] від оксидативного стресу.

Актуальним є біомедичне застосування НДЦ і при нейродегенеративних захворюваннях, особливо хворобі Альцгеймера (ХА). Як відомо, ХА є однією з патологій, що призводить до прогресуючої деменції у літніх людей. Першою областю мозку, якій завдаються збитки, є гіпокамп. Проблеми з пам'яттю, мовою і дезорієнтація з'являються серед основних нейроповедінкових симптомів [212].

Для зниження рівня та впливу А $\beta$  ведеться пошук препаратів, які перешкоджають його утворенню в мозку або видаляють бляшки, які вже утворилися в тканинах, або запобігають процесам, які запускаються при агрегації А $\beta$ . Нині існуючі методи лікування хвороби Альцгеймера лише полегшують симптоми, але не перешкоджають прогресуванню захворювання. Крім того, в даний час лікування ХА обмежене через не тільки відносну неефективність терапевтичних засобів, а й через наявність гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), який обмежує проходження екзогенних речовин до мозку. У зв'язку з цим нанотехнологія являє собою інноваційний та перспективний підхід завдяки властивостям наночастинок, що дозволяють їм безперешкодно перетинати ГЕБ. НДЦ є одним з таких кандидатів на біомедичне застосування. Унікальні редокс-властивості, низька токсичність і висока ступінь біосумісності дозволяють розглядати даний матеріал як найбільш перспективний наноматеріал антиоксидантного механізму дії. Даних щодо його антиоксидантних властивостей при ХА дуже мало [213–215]

Біологічну активність НДЦ пов'язують з кисневою нестехіометрією, тобто з існуванням на поверхні наночастинок іонів  $\text{Ce}^{3+}$ . Завдяки низькому значенню окислювально-відновного потенціалу пари  $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ , приповерхневі іони церію легко взаємодіють з киснем, змінюють свою валентність на  $4^{+}$ , а потім відновлюються назад до  $3^{+}$  [159,216]. Дана властивість і визначає головну цінність нанокристалів  $\text{CeO}_2$  для

біомедицини - здатність брати участь в окислювально-відновлювальних процесах, що проходять в організмі [217].

В проведених дослідженнях встановлено, що механізм інактивації вільних радикалів наночастинками діоксиду церію аналогічний дії супероксиддисмутази [218]. Дослідження НДЦ з пероксидом водню методами рентгенівської фотоелектронної спектроскопії і УФ-спектроскопії показали, що збільшення співвідношення  $\text{Ce}^{3+}:\text{Ce}^{4+}$  в наночастинках безпосередньо корелює з підвищенням їх здатності виконувати функції супероксиддисмутази. Ці результати переконливо підтверджують, що найбільш значущим фактором є саме присутність  $\text{Ce}^{3+}$  в поверхневому шарі.

Потрібно підкреслити, що на сьогодні кількість досліджень, подібних нашому, є досить обмеженою [213–215]. Загалом відомо, що на ранній стадії розвитку патологічних феноменів, супроводжуваних ХА, порушуються процеси окиснення. Надмірна генерація активних форм кисню під впливом Аβ-амілоїду призводить до посилення перекисного окиснення ліпідів. Результатом є інтенсифікація апоптозу та некротичної загибелі клітин. За даними Sing та ін. [213] НДЦ виявляє потужну антиоксидантну активність, яка залежить від розміру, складу та площі поверхні частинок, а також захищає нейрони культури мозку від пошкодження вільними радикалами та токсичності Аβ-<sub>1-42</sub> амілоїду. Нещодавно Kwon та ін. [214] висвітлили терапевтичну кандидатуру НДЦ для зменшення окисного стресу при ХА. У своєму дослідженні вони показали, що кон'югований НДЦ був локалізований переважно в мітохондріях, зменшував реактивний гліоз та пошкодження мітохондрій у моделі ХА. Наведені результати певною мірою узгоджуються з нашими спостереженнями.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до мети і поставлених завдань було досліджено вплив нейропротективних та ушкоджуючих факторів на нейрони культури гіпокампу при дії  $A\beta_{1-42}$ -амілоїду (моделювання *in vitro* хвороби Альцгеймера).

1. Відтворено токсичну дію бета-амілоїду на нейрони культури гіпокампу. Встановлено, що  $A\beta$ -амілоїд спричиняє інтенсивну загибель нейронів у культурі в порівнянні з такою в контролі.

2. Наявність  $A\beta_{1-42}$ -амілоїду в середовищі культивування викликає істотне підвищення концентрації внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  в нейронах гіпокампу. Збільшується як вхід  $Ca^{2+}$  та його перерозподіл, так і вміст  $Ca^{2+}$  у ендоплазматичному ретикулуму. В результаті, підвищується базальний рівень  $Ca^{2+}$ , що негативно впливає на життєздатність нейронів.

3. Моделювання умов гіперкальціємії зумовлює зниження життєздатності нейронів гіпокампу і підвищує рівень внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$ , що призводить до збільшення кількості некротизованих нейронів. Отже, вірогідною є участь кальцієвого механізму в розвитку апоптозу та некрозу нейронів гіпокампу при дії  $A\beta_{1-42}$ .

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

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

6. Мемантин зменшував кальцієвий сигнал як в умовах контролю так і у нейронах культивованих з  $A\beta_{1-42}$ -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  $A\beta_{1-42}$ -амілоїду, значно зменшуючи кількість апоптотичних та некротичних нейронів. Особливо ефективним було завчасне додавання НДЦ перед введенням  $A\beta_{1-42}$ -амілоїду в середовище культивування.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.

1. Marchesi VT. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. *FASEB J.* 2011 Jan;25(1):5–13.
2. Prasansuklab A, Tewin T. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: The Toxicity of Amyloid Beta. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2013;2013:10 pages.
3. Drachman DA. Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease. Vol. 67, *Neurology.* 2006. p. 1340–52.
4. Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. Vol. 2, *Acta Neuropathologica Communications.* BioMed Central Ltd.; 2014. p. 135.
5. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 2010 Jan;77(1):32–42.
6. Deture MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019 Aug;14(1):1–18.
7. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, et al. The Alzheimer's disease-associated amyloid  $\beta$ -protein is an antimicrobial peptide. 2010 Mar 3;5(3):e9505.
8. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 1987;325(6106):733–6.
9. Bhadbhade A, Cheng DW. Amyloid Precursor Protein Processing in Alzheimer's Disease. Vol. 6, *Iranian Journal of Child Neurology.* 2012. p. 1–4.
10. Hillen H. The Beta Amyloid Dysfunction (BAD) Hypothesis for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2019;13(November):1–10.
11. Korol' TY, Korol' S V., Kostyuk EP, Kostyuk PG. Disruption of calcium

- homeostasis in Alzheimer's disease. Vol. 40, *Neurophysiology*. Springer; 2008. p. 385–92.
12. Aterman K. A historical note on the iodine-sulphuric acid reaction of amyloid. *Histochemistry*. 1976;49(2):131–43.
  13. Nizhnikov AA, Antonets KS, Inge-Vechtomov SG. Amyloids: From pathogenesis to function. Vol. 80, *Biochemistry (Moscow)*. Maik Nauka Publishing / Springer SBM; 2015. p. 1127–44.
  14. LeVine H. Quantification of  $\beta$ -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol*. 1999;309:274–84.
  15. Sipe JD, Cohen AS. Review: History of the amyloid fibril. Vol. 130, *Journal of Structural Biology*. Academic Press Inc.; 2000. p. 88–98.
  16. Pepys MB. Amyloidosis. *Annu Rev Med*. 2006 Feb 12; 57(1):223–41.
  17. Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, Chan H, Perry G, Smith MA, et al. Amyloid- $\beta$ : A chameleon walking in two worlds: A review of the trophic and toxic properties of amyloid- $\beta$ . *Brain Res Rev*. 2003;43(1):1–16.
  18. Kravenska E V., Ganzha V V., Yavorskaya EN, Lukyanetz EA. Effect of Cyclosporin A on the Viability of Hippocampal Cells Cultured under Conditions of Modeling of Alzheimer's Disease. *Neurophysiology*. 2016 Aug 1;48(4):246–51.
  19. Recuero M, Serrano E, Bullido MJ, Valdivieso F. A $\beta$  production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *FEBS Lett*. 2004 Jul 16;570(1–3):114–8.
  20. C. Crdenas-Aguayo M del, C. Silva-Lucero M del, Cortes-Ortiz M, Jimnez-Ramos B, Gmez-Virgilio L, Ramrez-Rodrguez G, et al. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. In: *Neurochemistry [Internet]*. InTech; 2014 [cited 2021 Jun 24].
  21. Cirrito JR, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Parsadanian M, Cramer JW, et al. In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid- $\beta$  metabolism and half-life. *J Neurosci*. 2003 Oct 1;23(26):8844–53.



22. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, et al. APP Processing and Synaptic Function. *Neuron*. 2003 Mar 27;37(6):925–37.
23. Talafous J, Marcinowski KJ, Klopman G, Zagorski MG. Solution Structure of Residues 1–28 of the Amyloid  $\beta$ -Peptide. *Biochemistry*. 1994 Jun 1;33(25):7788–96.
24. Yang M, Teplow DB. Amyloid  $\beta$ -Protein Monomer Folding: Free-Energy Surfaces Reveal Alloform-Specific Differences. *J Mol Biol*. 2008 Dec;384(2):450–64.
25. Sgourakis NG, Yan Y, McCallum SA, Wang C, Garcia AE. The Alzheimer's Peptides A $\beta$ 40 and 42 Adopt Distinct Conformations in Water: A Combined MD / NMR Study. *J Mol Biol*. 2007 May 18;368(5):1448–57.
26. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu Rev Biochem*. 2006 Jun;75(1):333–66.
27. Stakos DA, Stamatelopoulos K, Bampatsias D, Sachse M, Zormpas E, Vlachogiannis NI, et al. The Alzheimer's Disease Amyloid-Beta Hypothesis in Cardiovascular Aging and Disease: JACC Focus Seminar [Internet]. Vol. 75, *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA; 2020 [cited 2020 Apr 1]. p. 952–67.
28. Serpell LC. Alzheimer's amyloid fibrils: Structure and assembly. Vol. 1502, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier; 2000. p. 16–30.
29. Makin OS, Serpell LC. Structures for amyloid fibrils. Vol. 272, *FEBS Journal*. 2005. p. 5950–61.
30. Eisenberg DS, Sawaya MR. Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86(1):69–95.
31. Sunde M, Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and x-ray diffraction. Vol. 50, *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press; 1997. p. 123–59.
32. Tycko R. Molecular structure of amyloid fibrils: Insights from solid-state

- NMR. Vol. 39, Quarterly Reviews of Biophysics. 2006. p. 1–55.
33. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*. 2018 Oct 2; 25(4):215–9.
  34. Perutz MF, Finch JT, Berriman J, Lesk A. Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16;99(8):5591–5.
  35. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(9):1205–35.
  36. Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, et al. High-level neuronal expression of A $\beta$ (1-42) in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: Synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*. 2000 Jun 1;20(11):4050–8.
  37. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva J V., Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):535–9.
  38. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL. The Amyloid- $\beta$  Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimer's Dis*. 2018;64(s1):S567–610.
  39. Hayden EY, Teplow DB. Amyloid  $\beta$ -protein oligomers and Alzheimer's disease. Vol. 5, *Alzheimer's Research and Therapy*. 2013.
  40. Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, Teplow DB. Amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem*. 1997 Aug 29;272(35):22364–72.
  41. Yu L, Edalji R, Harlan JE, Holzman TF, Lopez AP, Labkovsky B, et al. Structural characterization of a soluble amyloid  $\beta$ -peptide oligomer. *Biochemistry*. 2009 Mar 10;48(9):1870–7.
  42. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid

- beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. Vol. 38, *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group; 2017. p. 25–35.
43. Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* (80- ). 2003 Apr 18;300(5618):486–9.
  44. Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and  $\alpha$ -synuclein: Molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev*. 2002;54(3):469–525.
  45. Curtain CC, Ali F, Volitakis I, Cherny RA, Norton RS, Beyreuther K, et al. Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Binds Copper and Zinc to Generate an Allosterically Ordered Membrane-penetrating Structure Containing Superoxide Dismutase-like Subunits. *J Biol Chem*. 2001 Jun 8;276(23):20466–73.
  46. Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, Cherny RA, White AR, Beyreuther K, et al. Overexpression of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):44670–6.
  47. Rhein V, Eckert A. Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function -- role of glucose metabolism and insulin signalling. *Arch Physiol Biochem*. 2007 Jun.113(3):131–41.
  48. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* . 2011;4(1):3.
  49. Hefter D, Draguhn A. APP as a protective factor in acute neuronal insults. Vol. 10, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2017.
  50. Buxbaum JD, Thinakaran G, Koliatsos V, O'Callahan J, Slunt HH, Price DL, et al. Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci* [Internet]. 1998 Dec 1;18(23):9629–37.
  51. Meisl G, Yang X, Hellstrand E, Frohm B, Kirkegaard JB, Cohen SIA, et al. Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation

- kinetics of the A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 1;111(26):9384–9.
52. Zhang C. Natural compounds that modulate BACE1-processing of amyloid-beta precursor protein in Alzheimer's disease. Vol. 14, *Discovery medicine*. Discov Med; 2012. p. 189–97.
  53. Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, et al. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan 31;301(1):231–5.
  54. Suh J, Choi SH, Romano DM, Gannon MA, Lesinski AN, Kim DY, et al. ADAM10 Missense Mutations Potentiate  $\beta$ -Amyloid Accumulation by Impairing Prodomain Chaperone Function. *Neuron*. 2013 Oct 16;80(2):385–401.
  55. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development [Internet]. Vol. 38, *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Jun 23]. p. 125–135.
  56. Vassar R. BACE1: The  $\beta$ -secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 2004;23(1–2):105–13.
  57. Cole SL, Vassar R. The Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener*. 2007 Nov 15;2(1):1–25.
  58. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, et al. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as  $\beta$ -secretase. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 1999 Dec [cited 2020 Apr 12];14(6):419–27.
  59. Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, et al. The role of presenilin cofactors in the  $\gamma$ -secretase complex. *Nature*. 2003 Mar 27;422(6930):438–41.
  60. Luo Y, Sunderland T, Roth GS, Wolozin B. Physiological levels of beta-amyloid peptide promote PC12 cell proliferation. *Neurosci Lett* [Internet]. 1996 Oct 18 [cited 2020 Apr 4];217(2–3):125–8.
  61. Jellinger K. Challenges in Neuronal Apoptosis. *Curr Alzheimer Res*. 2006

Sep 3;3(4):377–91.

62. Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA. The production of amyloid  $\beta$  peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci*. 2003 Jul 1;23(13):5531–5.
63. Pearson HA, Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol [Internet]*. 2006 Aug 15 [cited 2020 Apr 4];575(Pt 1):5–10.
64. Garcia-Osta A, Alberini CM. Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem*. 2009 Apr;16(4):267–72.
65. C. Crdenas-Aguayo M del, C. Silva-Lucero M del, Cortes-Ortiz M, Jimnez-Ramos B, Gmez-Virgilio L, Ramrez-Rodrguez G, et al. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. In: *Neurochemistry*. InTech; 2014.
66. Morris GP, Clark IA, Vissel B. Questions concerning the role of amyloid- $\beta$  in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol [Internet]*. 2018;136(5):663–89.
67. Carrillo-Mora P, Luna R, Colín-Barenque L. Amyloid beta: Multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
68. Abramov AY, Canevari L, Duchen MR.  $\beta$ -Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons through Activation of NADPH Oxidase. *J Neurosci*. 2004;24(2):565–75.
69. Jones R. From amyloid- $\beta$  to receptor endocytosis. Vol. 6, *Nature Reviews Neuroscience*. 2005. p. 669.
70. Arispe N, Diaz JC, Simakova O. A $\beta$  ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with A $\beta$  channel blockers. Vol. 1768, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier; 2007. p. 1952–65.
71. Zhao J, Nussinov R, Ma B. Mechanisms of recognition of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) monomer, oligomer, and fibril by homologous antibodies. *J Biol Chem*. 2017;292(44):18325–43.

72. Hung CHL, Ho YS, Chang RCC. Modulation of mitochondrial calcium as a pharmacological target for Alzheimer's disease. Vol. 9, Ageing Research Reviews. Ageing Res Rev; 2010 [cited 2021 Jun 20]. p. 447–56.
73. Gwon AR, Park JS, Arumugam T V., Kwon YK, Chan SL, Kim SH, et al. Oxidative lipid modification of nicastrin enhances amyloidogenic  $\gamma$ -secretase activity in Alzheimer's disease. Aging Cell. 2012 Aug;11(4):559–68.
74. Hou Y, Ghosh P, Wan R, Ouyang X, Cheng H, Mattson MP, et al. Permeability transition pore-mediated mitochondrial superoxide flashes mediate an early inhibitory effect of amyloid beta1-42 on neural progenitor cell proliferation. Neurobiol Aging. 2014 May [cited 2021 Jun 21];35(5):975–89.
75. Darvesh AS, Carroll RT, Bishayee A, Geldenhuys WJ, Van Der Schyf CJ. Oxidative stress and Alzheimer's disease: Dietary polyphenols as potential therapeutic agents. Vol. 10, Expert Review of Neurotherapeutics. Expert Rev Neurother; 2010. p. 729–45.
76. Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Targeting tau protein in alzheimers disease. Vol. 27, Drugs and Aging. Drugs Aging; 2010. p. 351–65.
77. Leuner K, Müller WE, Reichert AS. From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: Novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease. Mol Neurobiol. 2012 [cited 2021 Jun 21];46(1):186–193.
78. Sisodia SS, Annaert W, Kim SH, De Strooper B. Gamma-secretase: never more enigmatic. Vol. 24, Trends in neurosciences. 2001.
79. Hauptmann S, Scherping I, Dröse S, Brandt U, Schulz KL, Jendrach M, et al. Mitochondrial dysfunction: An early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. Neurobiol Aging. 2009 ;30(10):1574–86.
80. Maruszak A, Zekanowski C. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 2011 Mar

30;35(2):320–30.

81. Ridge PG, Kauwe JSK. Mitochondria and Alzheimer's Disease: the Role of Mitochondrial Genetic Variation. *Curr Genet Med Rep*. 2018 Mar; 6(1):1–10.
82. Reddy PH, Manczak M, Yin X, Grady MC, Mitchell A, Tonk S, et al. Protective effects of Indian spice curcumin against Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. Vol. 61, *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press; 2018. p. 843–66.
83. Ганжа ВВ, Лук ОО. Роль дисфункції мітохондрій у розвитку хвороби Альцгеймера. :57–66.
84. Кравенська ЄВ, Чоповська ВВ, Яворська ОМ, Лук ОО. Роль мітохондрій у розвитку хвороби альцгеймера. *Tavrishesky medical-biological Bull*. 2012;15:147–9.
85. Pérez MJ, Ponce DP, Aranguiz A, Behrens MI, Quintanilla RA. Mitochondrial permeability transition pore contributes to mitochondrial dysfunction in fibroblasts of patients with sporadic Alzheimer's disease. *Redox Biol*. 2018;19(September):290–300.
86. Effect of Cyclosporin A on the Viability of Hippocampal Cells Cultured under Conditions of Modeling of Alzheimer's Disease Elena A Lukyanetz Bogomolets Institute of Physiology NASU. 2019 .
87. Ю. М. Шадур, В. С Бітюцький, М. Я. Співак, О. М. Мельниченко, О. Б. Щербаков. ДОКЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ. *Вісник ЖНАЕУ Ветеринарія*. 2015;т. 1, №2 (:358–63.
88. Ferraro D, Tredici IG, Ghigna P, Castillio-Michel H, Falqui A, Di Benedetto C, et al. Dependence of the Ce(III)/Ce(IV) ratio on intracellular localization in ceria nanoparticles internalized by human cells. *Nanoscale*. 2017 Jan 28;9(4):1527–38.
89. О.С. Цехмістренко, С.І. Цехмістренко, В.С. Бітюцький. БІОМІМЕТИЧНА ТА АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ

НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ. Світ медицини та біології. 2018;1 (63)(3):196–201.

90. Naz S, Beach J, Heckert B, Tummala T, Pashchenko O, Banerjee T, et al. Cerium oxide nanoparticles: A “radical” approach to neurodegenerative disease treatment. Vol. 12, Nanomedicine. Future Medicine Ltd.; 2017. p. 545–53.
91. ЩЕРБАКОВ А. Б. , Н. М. ЖОЛОБАК , В. К. ИВАНОВ , Ю. Д. ТРЕТЬЯКОВ НЯС. Наноматериалы на основе диоксида церия: свойства и перспективы использования в биологии и медицине. Биотехнология. 2011;Т. 4, №1:9–28.
92. Pezzini I, Marino A, Turco S Del, Nesti C, Doccini S, Cappello V, et al. Cerium oxide nanoparticles: The regenerative redox machine in bioenergetic imbalance. Nanomedicine. 2017 Feb 1 [cited 2021 Jun 23];12(4):403–16.
93. Baranchikov AE, Polezhaeva OS, Ivanov VK, Tretyakov YD. Lattice expansion and oxygen non-stoichiometry of nanocrystalline ceria. CrystEngComm. 2010 Nov 19;12(11):3531–3.
94. Lee SS, Song W, Cho M, Puppala HL, Nguyen P, Zhu H, et al. Antioxidant properties of cerium oxide nanocrystals as a function of nanocrystal diameter and surface coating. ACS Nano. 2013 Nov 26 ,7(11):9693–703.
95. Nelson BC, Johnson ME, Walker ML, Riley KR, Sims CM. Antioxidant cerium oxide nanoparticles in biology and medicine. Vol. 5, Antioxidants. MDPI AG; 2016.
96. Shkryl VM. Error correction due to background subtraction in ratiometric calcium measurements with CCD camera. Heliyon. 2020 Jun 1;6(6):e04180.
97. Jacobs JM, Meyer T. Control of action potential-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the soma of hippocampal neurons by  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores. J Neurosci [Internet]. 1997 Jun 1 [cited 2021 Feb 20];17(11):4129–35.
98. Calcium Hypothesis of Alzheimer’s disease and brain aging: A framework



- for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimer's Dement.* 2017 Feb 1, 13(2):178-182.e17.
99. Bailey ZS, Nilson E, Bates JA, Oyalowo A, Hockey KS, Sajja VSSS, et al. Cerium Oxide Nanoparticles Improve Outcome After In Vitro and In Vivo Mild Traumatic Brain Injury . *J Neurotrauma.* 2016 Nov 2;
  100. Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. Vol. 21, *Neuron.* Cell Press; 1998. p. 13–26.
  101. Pchitskaya E, Popugaeva E, Bezprozvanny I. Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. Vol. 70, *Cell Calcium.* Elsevier Ltd; 2018. p. 87–94.
  102. Tong BCK, Wu AJ, Li M, Cheung KH. Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. Vol. 1865, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* Elsevier B.V.; 2018. p. 1745–60.
  103. Khachaturian ZS. Hypothesis on the Regulation of Cytosol Calcium Concentration and the Aging Brain. *Neurobiol Aging.* 1987 Jul 1;8(4):345–6.
  104. Agostini M, Fasolato C. When, where and how? Focus on neuronal calcium dysfunctions in Alzheimer's Disease. Vol. 60, *Cell Calcium.* Churchill Livingstone; 2016. p. 289–98.
  105. Žofková I. Hypercalcemia. Pathophysiological aspects. *Physiol Res.* 2016;65(1):1–10.
  106. Zagzag J, Hu MI, Fisher SB, Perrier ND. Hypercalcemia and cancer: Differential diagnosis and treatment. *CA Cancer J Clin.* 2018 Sep 1;68(5):377–86.
  107. Arispe N, Rojas E, Pollard HB. Alzheimer disease amyloid  $\beta$  protein forms calcium channels in bilayer membranes: Blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(2):567–71.
  108. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. Vol. 258, *Journal of Internal Medicine.* *J Intern Med*; 2005. p. 479–517.

109. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Vol. 32, Trends in Biochemical Sciences. Trends Biochem Sci; 2007. p. 37–43.
110. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. Vol. 1757, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. Biochim Biophys Acta; 2006. p. 1371–87.
111. Arbo BD, Hoppe JB, Rodrigues K, Garcia-Segura LM, Salbego CG, Ribeiro MF. 4'-Chlorodiazepam is neuroprotective against amyloid-beta in organotypic hippocampal cultures. J Steroid Biochem Mol Biol. 2017 Jul 1;171:281–7.
112. Calvo-Rodriguez M, Hernando-Pérez E, López-Vázquez S, Núñez J, Villalobos C, Núñez L. Remodeling of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rat hippocampal neurons aged in vitro. Int J Mol Sci. 2020;21(4):1–12.
113. Hooshmandi E, Ghasemi R, Iloun P, Moosavi M. The neuroprotective effect of agmatine against amyloid  $\beta$ -induced apoptosis in primary cultured hippocampal cells involving ERK, Akt/GSK-3 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ . Mol Biol Rep. 2019 Feb 1; 46(1):489–96.
114. Ji ZH, Zhao H, Liu C, Yu XY. In-vitro neuroprotective effect and mechanism of 2 $\beta$ -hydroxy- $\delta$ -cadinol against amyloid  $\beta$ -induced neuronal apoptosis. Neuroreport. 2020;31(3):245–50.
115. Danysz W, Parsons CG, Möbius H-Jö, Stöffler A, Quack Gü. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for alzheimer's disease — a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. Neurotox Res . 2000 Jun;2(2–3):85–97.
116. Galla L, Redolfi N, Pozzan T, Pizzo P, Greotti E. Intracellular calcium dysregulation by the alzheimer's disease-linked protein presenilin 2. Int J Mol Sci. 2020;21(3).
117. Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. Treatment of Alzheimer's disease: Current status and new perspectives. Vol. 2, Lancet Neurology. Lancet

Publishing Group; 2003. p. 539–47.

118. Cowburn RF, Wiehager B, Sundström E.  $\beta$ -amyloid peptides enhance binding of the calcium mobilising second messengers, inositol(1,4,5)trisphosphate and inositol-(1,3,4,5)tetrakisphosphate to their receptor sites in rat cortical membranes. *Neurosci Lett*. 1995 May 19;191(1–2):31–4.
119. Kawahara M, Kuroda Y. Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's  $\beta$ -amyloid protein: Channel formation and disruption of calcium homeostasis. In: *Brain Research Bulletin*. Brain Res Bull; 2000. p. 389–97.
120. Kourie JJ, Henry CL, Farrelly P. Diversity of amyloid  $\beta$  protein fragment [1-40]-formed channels. *Cell Mol Neurobiol*. 2001; 21(3):255–84.
121. Король Т К. Ушкодження кальційзахоплюючої функції мітохондрій при експериментальній хворобі Альцгеймера. In 2009. p. 0–6.
122. Kostyuk PG, Kostyuk EP, Korol TY. Effect of  $\beta$ -amyloid Peptide on Plasmalemmal Calcium Channels in Cultured Hippocampal Neurons. *Int J Physiol Pathophysiol*. 2010;1(1):1–7.
123. Resende R, Pereira C, Agostinho P, Vieira AP, Malva JO, Oliveira CR. Susceptibility of hippocampal neurons to A $\beta$  peptide toxicity is associated with perturbation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Brain Res* . 2007 Apr 27; 1143(1):11–21.
124. Ramsden M, Henderson Z, Pearson HA. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid  $\beta$  protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res*. 2002 Nov 29; 956(2):254–61.
125. Cook DG, Li X, Cherry SD, Cantrell AR. Presenilin 1 deficiency alters the activity of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in cultured cortical neurons. *J Neurophysiol*. 2005 Dec; 94(6):4421–9.
126. Davidson RM, Shajenko L, Donta TS. Amyloid beta-peptide (A $\beta$ P) potentiates a nimodipine-sensitive L-type barium conductance in N1E-115

- neuroblastoma cells. *Brain Res.* 1994 Apr 18;643(1–2):324–7.
127. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, et al. Suppression of an amyloid  $\beta$ -peptide-mediated calcium channel response by a secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Neuroscience.* 1999 Nov; 95(1):1–4.
  128. Eckert A, Schmitt K, Götz J. Mitochondrial dysfunction - The beginning of the end in Alzheimer's disease? Separate and synergistic modes of tau and amyloid-toxicity. Vol. 3, *Alzheimer's Research and Therapy. Alzheimers Res Ther*; 2011.
  129. Ghribi O. The Role of the Endoplasmic Reticulum in the Accumulation of  $\beta$ -Amyloid Peptide in Alzheimers Disease. *Curr Mol Med.* 2006 Feb 6; 6(1):119–33.
  130. Xia W, Zhang J, Ostaszewski BL, Kimberly WT, Seubert P, Koo EH, et al. Presenilin 1 regulates the processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid  $\beta$ -protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry.* 1998 Nov 24; 37(47):16465–71.
  131. Korol TY, Korol S V, Kostyuk EP, Kostyuk PG.  $\beta$ -Amyloid-Induced Changes in Calcium Homeostasis in Cultured Hippocampal Neurons of the Rat. *Neirofiziologiya/Neurophysiology.* 2008;40(1):9–12.
  132. Kravenska Y, Nieznanska H, Nieznanski K, Lukyanetz E, Szewczyk A, Koprowski P. The monomers, oligomers, and fibrils of amyloid- $\beta$  inhibit the activity of mitoBKCa channels by a membrane-mediated mechanism. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2020 Sep 1;1862(9):183337.
  133. H. Ferreira-Vieira T, M. Guimaraes I, R. Silva F, M. Ribeiro F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.* 2016 Jan 26;14(1):101–15.
  134. Liu J, Chang L, Song Y, Li H, Wu Y. The role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. Vol. 13, *Frontiers in Neuroscience. Frontiers Media S.A.*; 2019 .
  135. Del Prete D, Checler F, Chami M. Ryanodine receptors: Physiological function and deregulation in Alzheimer disease. Vol. 9, *Molecular*

- Neurodegeneration. BioMed Central Ltd.; 2014 . p. 1–15.
136. T K, K I, A H, T Y, T K, M T, et al. Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *J Biol Chem*. 2001 Nov 16 ; 276(46):43446–54.
  137. Mohammad Abdul H, Sultana R, Keller JN, St. Clair DK, Markesbery WR, Butterfield DA. Mutations in amyloid precursor protein and presenilin-1 genes increase the basal oxidative stress in murine neuronal cells and lead to increased sensitivity to oxidative stress mediated by amyloid  $\beta$ -peptide (1-42), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and kainic acid: Implications for A. *J Neurochem*. 2006 Mar;96(5):1322–35.
  138. Zeng L, Hu C, Zhang F, Xu DC, Cui M-Z, Xu X. Cellular FLICE-like Inhibitory Protein (c-FLIP) and PS1-associated Protein (PSAP) Mediate Presenilin 1-induced  $\gamma$ -Secretase-dependent and -independent Apoptosis, Respectively. *J Biol Chem*. 2015 Jul 24; 290(30):18269.
  139. Terro F, Czech C, Esclaire F, Elyaman W, Yardin C, Baclet MC, et al. Neurons overexpressing mutant presenilin-1 are more sensitive to apoptosis induced by endoplasmic reticulum-golgi stress. *J Neurosci Res*. 2002 Aug 15;69(4):530–9.
  140. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Vol. 87, *Physiological Reviews*. *Physiol Rev*; 2007. p. 99–163.
  141. Ганжа ВВ, Лук'янець ОО. Роль дисфункції мітохондрій у розвитку хвороби Альцгеймера. :57–66.
  142. Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. Vol. 12, *Apoptosis*. *Apoptosis*; 2007. p. 815–33.
  143. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. Vol. 79, *Physiological Reviews*. American Physiological Society; 1999. p. 1127–55.
  144. Duchen MR. Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new

- mitochondrial biology. Vol. 25, Molecular Aspects of Medicine. Mol Aspects Med; 2004. p. 365–451.
145. Kravenskaya Y V., Fedirko N V. Mechanisms underlying interaction of zinc, lead, and cobalt with nonspecific permeability pores in the mitochondrial membranes. *Neurophysiology*. 2011 Nov 5;43(3):163–72.
  146. Belzacq AS, Vieira HLA, Kroemer G, Brenner C. The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie*. 2002;84(2–3):167–76.
  147. Bernardi P, Petronilli V. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: A critical appraisal. Vol. 28, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. J Bioenerg Biomembr; 1996. p. 131–8.
  148. Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. Vol. 258, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. Am J Physiol; 1990.
  149. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. Calcium and mitochondria. In: *FEBS Letters*. FEBS Lett; 2004. p. 96–102.
  150. Parks JK, Smith TS, Trimmer PA, Bennett JP, Davis Parker WJ. Neurotoxic A $\beta$  peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro. *J Neurochem*. 2001;76(4):1050–6.
  151. Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 1997;17(13):5089–100.
  152. Vieira HLA, Belzacq AS, Haouzi D, Bernassola F, Cohen I, Jacotot E, et al. The adenine nucleotide translocator: A target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal. *Oncogene*. 2001 Jul 19;20(32):4305–16.
  153. Oakes S, Lin S, Bassik M. The Control of Endoplasmic Reticulum-Initiated Apoptosis by the BCL-2 Family of Proteins. *Curr Mol Med*. 2006 Feb 6;6(1):99–109.
  154. Abramov AY, Duchen MR. The role of an astrocytic NADPH oxidase in

- the neurotoxicity of amyloid beta peptides. In: Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. Royal Society; 2005. p. 2309–14.
155. Rizzuto R, Duchen MR, Pozzan T. Flirting in little space: the ER/mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  liaison. Vol. 2004, Science's STKE : signal transduction knowledge environment. Sci STKE; 2004.
  156. Mattson MP, Chan SL, Camandola S. Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune systems. Vol. 23, BioEssays. Bioessays; 2001. p. 733–44.
  157. Pérez MJ, Ponce DP, Aranguiz A, Behrens MI, Quintanilla RA. Mitochondrial permeability transition pore contributes to mitochondrial dysfunction in fibroblasts of patients with sporadic Alzheimer's disease. Redox Biol. 2018 Oct 1;19:290.
  158. Morris RG, Kopelman MD. The Memory Deficits in Alzheimer-type Dementia: A Review. Q J Exp Psychol Sect A. 1986 Nov;38(4):575–602.
  159. Coelho BP, Gaelzer MM, dos Santos Petry F, Hoppe JB, Trindade VMT, Salbego CG, et al. Dual Effect of Doxazosin: Anticancer Activity on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells and Neuroprotection on an In Vitro Model of Alzheimer's Disease. Neuroscience. 2019 Apr 15;404:314–25.
  160. Calvo-Rodriguez M, Hernando-Perez E, Nuñez L, Villalobos C. Amyloid  $\beta$  oligomers increase ER-mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  cross talk in young hippocampal neurons and exacerbate aging-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  remodeling. Front Cell Neurosci. 2019 Jan 29;13.
  161. Carvajal FJ, Mattison HA, Cerpa W. Role of NMDA Receptor-Mediated Glutamatergic Signaling in Chronic and Acute Neuropathologies. Vol. 2016, Neural Plasticity. 2016.
  162. Gonzalez J, Jurado-Coronel JC, Ávila MF, Sabogal A, Capani F, Barreto GE. NMDARs in neurological diseases: A potential therapeutic target. Int J Neurosci. 2015 May;125(5):315–27.
  163. Glaser T, Arnaud Sampaio VF, Lameu C, Ulrich H. Calcium signalling: A

- common target in neurological disorders and neurogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2019 Nov;95:25–33.
164. Scott HA, Gebhardt FM, Mitrovic AD, Vandenberg RJ, Dodd PR. Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2011;32(3):553.e1-553.e11.
  165. Takahashi K, Foster JB, Lin CLG. Glutamate transporter EAAT2: Regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Sep;72(18):3489–506.
  166. O'donovan SM, Sullivan CR, Mccullumsmith RE. The role of glutamate transporters in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. 2017;3:32.
  167. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . *Nat Neurosci.* 2005 Aug;8(8):1051–8.
  168. Wenk GL, Parsons CG, Danysz W. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: Focus on memantine. *Behav Pharmacol.* 2006 Sep;17(5–6):411–24.
  169. Folch J, Busquets O, Ettcheto M, Sánchez-López E, Castro-Torres RD, Verdaguer E, et al. Memantine for the treatment of dementia: A review on its current and future applications. *J Alzheimer's Dis.* 2018 Jan;62(3):1223–40.
  170. Görgülü A, KInş T, Çobanoğlu S, Ünal F, I zgi N, Yanik B, et al. Reduction of edema and infarction by Memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat. *Acta Neurochir (Wien).* 2000;142(11):1287–92.
  171. Huang CY, Wang LC, Wang HK, Pan CH, Cheng YY, Shan YS, et al. Memantine Alleviates Brain Injury and Neurobehavioral Deficits after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Mol Neurobiol.* 2015 Jun;51(3):1038–52.
  172. Seyedsaadat SM, Kallmes DF. Memantine for the treatment of ischemic



- stroke: Experimental benefits and clinical lack of studies. *Rev Neurosci*. 2018;30(2).
173. Wang CC, Wee HY, Hu CY, Chio CC, Kuo JR. The Effects of Memantine on Glutamic Receptor–Associated Nitrosative Stress in a Traumatic Brain Injury Rat Model. *World Neurosurg*. 2018 Apr;112:e719–31.
  174. Effgen GB, Morrison B. Memantine Reduced Cell Death, Astrogliosis, and Functional Deficits in an in vitro Model of Repetitive Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2017 Feb;34(4):934–42.
  175. Van Dam D, De Deyn PP. Cognitive evaluation of disease-modifying efficacy of Galantamine and Memantine in the APP23 model. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006 Jan;16(1):59–69.
  176. Dong H, Yuede CM, Coughlan C, Lewis B, Csernansky JG. Effects of memantine on neuronal structure and conditioned fear in the Tg2576 mouse model of Alzheimer’s disease. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Dec;33(13):3226–36.
  177. Yamada K, Takayanagi M, Kamei H, Nagai T, Dohniwa M, Kobayashi K, et al. Effects of memantine and donepezil on amyloid  $\beta$ -induced memory impairment in a delayed-matching to position task in rats. *Behav Brain Res*. 2005 Jul;162(2):191–9.
  178. Tucci P, Mhillaj E, Morgese MG, Colaianna M, Zotti M, Schiavone S, et al. Memantine prevents memory consolidation failure induced by soluble beta amyloid in rats. *Front Behav Neurosci*. 2014 Sep;8.
  179. Budni J, Feijó DP, Batista-Silva H, Garcez ML, Mina F, Belletini-Santos T, et al. Lithium and memantine improve spatial memory impairment and neuroinflammation induced by  $\beta$ -amyloid 1-42 oligomers in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2017 May;141:84–92.
  180. Danysz W, Parsons CG, Möbius H-Jö, Stöffler A, Quack Gü. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for alzheimer’s disease — a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res*. 2000;2(2–3):85–97.

181. Butterfield DA, Pocernich CB. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: Therapeutic implications. Vol. 17, CNS Drugs. 2003. p. 641–52.
182. Parameshwaran K, Dhanasekaran M, Suppiramaniam V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. Exp Neurol. 2008 Mar;210(1):7–13.
183. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. Vol. 57, Journal of Alzheimer's Disease. IOS Press; 2017. p. 1041–8.
184. Chen HSV, Lipton SA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. J Neurochem. 2006 Jun;97(6):1611–26.
185. Rogawski MA, Wenk GL. The Neuropharmacological Basis for the Use of Memantine in the Treatment of Alzheimer's Disease. CNS Drug Rev. 2003;9(3):275–308.
186. Lipton SA. Pathologically-Activated Therapeutics for Neuroprotection: Mechanism of NMDA Receptor Block by Memantine and S-Nitrosylation. Curr Drug Targets. 2007;8:621–32.
187. Majláth Z, Török N, Toldi J, Vécsei L. Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.ae](mailto:reprints@benthamscience.ae) Memantine and Kynurenic Acid: Current Neuropharmacological Aspects. Curr Neuropharmacol. 2016;14:200–9.
188. Volbracht C, Van Beek J, Zhu C, Blomgren K, Leist M. Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity. Eur J Neurosci. 2006 May;23(10):2611–22.
189. Lopes JP, Tarozzo G, Reggiani A, Piomelli D, Cavalli A. Galantamine potentiates the neuroprotective effect of memantine against NMDA-induced excitotoxicity. Brain Behav. 2013;3(2):67–74.
190. Tremblay R, Chakravarthy B, Hewitt K, Tauskela J, Morley P, Atkinson T, et al. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection cultured cortical neurons from a variety of death signals. J Neurosci. 2000;20(19):7183–92.
191. Kriegelstein J, Lippert K, Pösch G. Apparent independent action of

- nimodipine and glutamate antagonists to protect cultured neurons against glutamate-induced damage. *Neuropharmacology*. 1996;35(12):1737–42.
192. Vincent Chen H-S, Pellegrini JW, Aggatwal SK, Warach S, Jensen FE, Lipton SA. Open-Channel Block of /V-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Responses by Memantine: Therapeutic Advantage against NMDA Receptor-mediated Neurotoxicity. *J Neurosci*. 1992;72(11):4427–36.
  193. Hooshmandi E, Moosavi M, Katinger H, Sardab S, Ghasemi R, Maghsoudi N. CEPO (carbamylated erythropoietin)-Fc protects hippocampal cells in culture against beta amyloid-induced apoptosis: considering Akt/GSK-3 $\beta$  and ERK signaling pathways. *Mol Biol Rep*. 2020 Mar;47(3):2097–108.
  194. Ji ZH, Zhao H, Liu C, Yu XY. In-vitro neuroprotective effect and mechanism of 2 $\beta$ -hydroxy- $\delta$ -cadinol against amyloid  $\beta$ -induced neuronal apoptosis. *Neuroreport*. 2020;245–50.
  195. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, et al. A $\beta$  oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2007 Jan;27(4):796–807.
  196. Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by b-amyloid(1-40). *Brain Res*. 2002;958:210–21.
  197. Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino acid transmitters. Vol. 21, Annual review of pharmacology and toxicology. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1981. p. 165–204.
  198. Parsons CG, Stöffler A, Danysz W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. Vol. 53, *Neuropharmacology*. Pergamon; 2007. p. 699–723.
  199. Olivares D, K. Deshpande V, Shi Y, K. Lahiri D, H. Greig N, T. Rogers J, et al. N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and

- Parkinson's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2013 Jul 25;9(6):746–58.
200. Lynch MA. LTP and memory. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2003;358(April):87–136.
  201. Kemp JA, McKernan RM. NMDA receptor pathways as drug targets. Vol. 5, *Nature Neuroscience. Nat Neurosci*; 2002. p. 1039–42.
  202. Greene JG, Greenamyre JT. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. Vol. 48, *Progress in Neurobiology.* Elsevier Ltd; 1996. p. 613–34.
  203. Shkryl VM, Ganzha V V, Lukyanetz EA. Effect of memantin on calcium signaling in hippocampal neurons cultured with  $\beta$ -amyloid. :3–10.
  204. Mycielska ME, Djamgoz MBA. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: Galvanotaxis and metastatic disease. Vol. 117, *Journal of Cell Science. J Cell Sci*; 2004. p. 1631–9.
  205. Baginskas A, Kuras A, Grigaliunas A. Inhibition of dendritic L-type calcium current by memantine in frog tectum. *Med.* 2013;49(9):409–14.
  206. Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale.* 2011 Apr;3(4):1411–20.
  207. Wong LL, McGinnis JF. Nanocerium as bona fide catalytic antioxidants in medicine: What we know and what we want to know.... *Adv Exp Med Biol.* 2014;801:821–8.
  208. Heckman KL, Decoteau W, Estevez A, Reed KJ, Costanzo W, Sanford D, et al. Custom cerium oxide nanoparticles protect against a free radical mediated autoimmune degenerative disease in the brain. *ACS Nano.* 2013 Dec 23;7(12):10582–96.
  209. Lee SS, Song W, Cho M, Puppala HL, Nguyen P, Zhu H, et al. Antioxidant properties of cerium oxide nanocrystals as a function of nanocrystal diameter and surface coating. *ACS Nano.* 2013 Nov 26;7(11):9693–703.
  210. Chen S, Hou Y, Cheng G, Zhang C, Wang S, Zhang J. Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* 2013 Jul;154(1):156–66.
  211. Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE. Cardioprotective

- effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2007 Feb 1;73(3):549–59.
212. International D. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia; World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia.
  213. Singh N, Amateis E, Mahaney JE, Meehan K RB. The Antioxidant Activity of Cerium Oxide Nanoparticles is Size Dependant and Blocks A $\beta$ 1-42-Induced Free Radical Production and Neurotoxicity | The FASEB Journal. *FEBS J*. 2008.
  214. Rzigalinski BA, Carfagna CS, Ehrich M. Cerium oxide nanoparticles in neuroprotection and considerations for efficacy and safety. Vol. 9, Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. Wiley-Blackwell; 2017.
  215. Kwon HJ, Cha MY, Kim D, Kim DK, Soh M, Shin K, et al. Mitochondria-Targeting Ceria Nanoparticles as Antioxidants for Alzheimer's Disease. *ACS Nano*. 2016 Feb 23;10(2):2860–70.
  216. Viagin OG, Masalov AA. Влияние кислородной нестехиометрии на формирование люминесцентных центров в нанокристаллах диоксида церия. *Біофіз вісн*. 2012;28(1):68–74.
  217. Tarnuzzer RW, Colon J, Patil S, Seal S. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett*. 2005 Dec;5(12):2573–7.
  218. Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials*. 2008 Jun;29(18):2705–9.

## ДОДАТОК 1

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