

DOI 10.31718/2077-1096.26.2.131

УДК: 616-018.83:616.831-091.8-092]-085.214.2-092.4

Данукало М.В.

РОЛЬ 24-ГОДИННОГО ПРЕКОНДИЦІЮВАННЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРАМИ У ВИЖИВАНІСТІ НЕЙРОНІВ ПРИ КОЛХІЦИН-ІНДУКОВАНІЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦІЇ IN VITRO

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Запоріжжя, Україна.

Колхіцин-індукована нейротоксичність є цінним експериментальним інструментом для моделювання порушень аксонального транспорту – патологічного процесу, асоційованого з розвитком і прогресуванням нейродегенерації при хворобі Альцгеймера, хворобі Паркінсона та травматичних ураженнях головного мозку. Водночас механізми нейрональної загибелі та стійкості до дії цього нейротоксину залишаються предметом активних досліджень. Метою представленого дослідження було оцінити вплив 24-годинного прекодиціювання цитіколіном і тіоцетамом на виживаність клітин первинної культури ембріональної нервової тканини за умов дії колхіцину. Дослідження проводили на первинній культурі нейронів, яку розподілили на інтактну групу, групу з 24-годинною експозицією колхіцину в концентрації 1 мкМ та групи з попередньою нейропротекторною корекцією. Фармакологічне прекодиціювання здійснювали шляхом добової інкубації клітин у середовищі, що містило цитіколін (100 мкМ) або тіоцетам (1 мМ), із подальшим додаванням токсиканту. Надалі клітини фіксували та піддавали цитохімічному забарвленню на субстанцію Ніссля для світлової мікроскопії, а також імунофлуоресцентному дослідженню експресії каспази-3 (casp3) і циклооксигенази-2 (cox2). Встановлено, що експозиція колхіцину спричиняє дезорганізацію субстанції Ніссля, підвищення експресії casp3 та виражену прозапальну відповідь за маркером cox2. Попереднє застосування цитіколіну та тіоцетаму дозволило достовірно знизити частку апоптотичних клітин на 60,8% і 42,9% відповідно, хоча повного відновлення показників до рівня інтактного контролю досягнуто не було. Досліджувані нейропротектори продемонстрували виражені антиапоптотичні властивості, однак виявилися менш ефективними щодо корекції морфологічних ознак хроматолізу та інтенсивності експресії cox2. Висновки: 1. 24-годинна експозиція колхіцину в первинній культурі нейронів характеризується глибокою дезорганізацією тигроїду (двократне зростання гетерогенності забарвлення), активацією каспаза-залежного апоптозу (20-кратне підвищення інтенсивності експресії каспази-3 із залученням 87,5% клітин) та стимуляцією запальної відповіді (5,8-кратне зростання інтенсивності експресії циклооксигенази-2). 2. Фармакологічне прекодиціювання цитіколіном і тіоцетамом асоціюється зі зниженням кількості casp3+ клітин на 60,8% і 42,9% відповідно, однак не супроводжується достовірним зменшенням інтенсивності флуоресценції порівняно з групою колхіцинової токсичності. Обидва препарати при 24-годинній преінкубації виявилися недостатньо ефективними для повного відновлення структури тигроїду та нормалізації експресії циклооксигенази-2, демонструючи лише тенденцію до корекції зазначених показників.

Ключові слова: колхіцин, нейропротекція, цитіколін, тіоцетам, нейроапоптоз, нейрозапалення

Зв'язок із науковими темами: Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи Запорізького державного медико-фармацевтичного університету: «Дисфункція нейро-гуморальної регуляції в патогенезі метаболічних розладів та когнітивних порушень при експериментальній патології». Державний реєстраційний номер N 0123U103051 (2023-2028).

Всі матеріали поширюються на умовах ліцензії Creative Commons Attribution License International CC-BY, яка дозволяє іншим розповсюджувати роботу з визнанням авторства цієї роботи і першої публікації в цьому журналі © Всі автори, 2025

Надійшла/Received: 31.03.2026. Прийнята/Accepted: 22.04.2026. Опублікована/Published: 29.05.26.

ISSN 2077-1096 (print), ISSN 2077-1126 (online)

Вступ

Сучасний погляд на патогенез низки нейродегенеративних станів, таких як хвороби Альцгеймера, Паркінсона, хронічне травматичне ураження мозку, полягає в тому, що руйнування цитоскелету нейронів є ключовим процесом, котрий спричиняє ініціацію та прогресування їхньої загибелі [1, 2]. Зокрема, деструкція мікротрубочок із наступним колапсом аксонального транспорту призводить до переривання ретроградного надходження трофічних факторів до клітини, дезорганізації внутрішньоклітинного метаболізму (порушення мітоптозу та протеостазу) та спричиняє порушення синаптогенезу та нейропластичності [3]. У зв'язку із цим колхіцин, як ві-

домий токсин, що руйнує компоненти цитоскелету клітини, є цінним інструментом для моделювання нейродегенерації, що пов'язана із блокуванням складання мікротрубочок. Наприклад, на тваринних моделях з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину було продемонстровано розвиток низки патофізіологічних реакцій, зокрема накопичення органел у перикаріоні, мітохондріальної дисфункції та активації стресу ендоплазматичного ретикулума. Кінцевим етапом цієї дезорганізації є запуск процесів апоптозу та нейрозапалення [3, 4]. Натомість, важливо підкреслити, що вплив на ендогенні захисні механізми цитопротекції, в тому числі і стимуляція стійкості нейронів до розпаду мікротрубочкового апарату, є запорукою збереження популяції клі-

тин та підтримки їх функціонування при цьому. Тому сьогодні ці механізми є предметом активного вивчення, оскільки це відкриває шлях до створення таргетної нейропротекції при низькій нейродегенеративних станів.

Нині відомі сполуки із доведеною здатністю модулювати різні ендogenous механізми нейропротекції та які широко використовуються у практичній медицині, такі як цитіколін та тіоцетам (комбінація пірацетаму та тіотриазоліну 1:4). Продемонстровано, що цитіколін має мітопротекторну та мембранопротекторну дію та виступає в ролі донатора холіну для синтезу медіаторів, тоді як тіоцетам має виражений антиоксидантний ефект та нормалізує енергетичний метаболізм. Проте аналіз їх ефектів проводився в умовах вже наявного пошкодження на моделях *in vivo* [5, 6]. У той же час ефект прекодиціювання цими препаратами, що дозволяє вивчити ефекти модифікації метаболічного фенотипу клітини для підвищення її толерантності до майбутньої агресії недостатньо описаний. Окремі дослідження демонструють ефекти преінкубації культур нейронів та нейрональних клітин сітківки із цитіколіном або пірацетамом в умовах змодельованого ішемічного пошкодження (OGD, Oxygen-Glucose Deprivation), моделі гіпоксії-реоксигенації [7], дії токсичних речовин (свинець, бета-амілоїд, ставроспорин [8-10]), глутамат-індукованої ексайтотоксичності [11]. Однак, даних стосовно ефекту фармакологічного прекодиціювання цими препаратами та метаболічних змін клітин при цьому на тлі колхіцину-індукованої нейродеструкції обмаль.

Мета дослідження

Описати вплив 24-годинного прекодиціювання цитіколіном та тіоцетамом на виживаність клітин в первинній культурі ембріональної нервової тканини на тлі дії колхіцину.

Матеріали та методи дослідження

Виділення первинної культури нейронів проходило за детально описаною методикою M. L. Seibenhener et al. [12] в лабораторії клітинних культур та біоінженірингу Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. В наведеному дослідженні зазначимо лише основні його етапи. Дослідження проводилось із дотриманням національних «Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001) та міжнародних правил поведінки із лабораторними тваринами, затверджених Директивою 2010/63/ЄС Європейського парламенту і Ради ЄС від 22 вересня 2010 року «Про захист прав тварин, що використовуються в наукових цілях». Проведення дослідження було схвалене Комісією з питань біоетики ЗДМФУ (протокол №2 від 06.02.2026).

Забір тканини головного мозку новонародже-

них щурів.

Біля полум'я спиртівки ембріони щурів лінії Вістар ($n = 5$) обезголовлювали, елімінували головний мозок без оболонок і промивали в теплом (37°C) фосфатно-сольовому буфері, модифікованому Дульбеко без кальцію (DPBS, Sigma-Aldrich, USA). Всі інші процедури проводили в стерильних умовах ламінарного боксу.

Ферментна дисоціація тканини.

В чашці Петрі тканину подрібнювали скальпелем у 3 мл розчину DPBS, потім додавали ще 1,5 мл буферу та 0,5 мл 0,25% розчину трипсину (Sigma-Aldrich, USA). Далі тканину інкубували у водяній бані при 37°C протягом 15 хвилин, постійно перевертаючи пробірку через кожні 5 хв. Після чого тричі промивали осад 5 мл DPBS протягом 5 хв. Останній розчин замінювали на 2 мл буферу.

Механічна дисоціація тканини.

Обережно аспіруючи шприцем через стерильну голку діаметром 22G, подрібнювали тканину, чекали осадження великих часточок на дно пробірки з наступним перенесенням супернатанту в окрему стерильну пробілку. Решту тканин повторно дисоціювали в 2 мл буфера, чекали осадження, супернатант відбирали і додавали до попереднього. Як наслідок отримували 4 мл дисоційованих клітин. Для забезпечення більшої чистоти культури від детриту та зруйнованої тканини додатково застосовували сітчасті стерильні клітинні фільтри з діаметром пори 70 мкм (Biofill, China).

Посів клітин.

Кількість дисоційованих життєздатних клітин рахували в гемоцитометрі з підфарбовуванням трипановим синім (Sigma-Aldrich, USA). Клітини висівали на 8-лункові адгезивні предметні скельця Millicell EZ Slide 8 Well-glass (Sigma Aldrich, USA) із розрахунку 20000 клітин на 1 лунку та культуральні флакони (25 см²) із розрахунку 5x10⁶ клітин/флакон. Таким чином, відповідна кількість клітин змішувалась зі стандартним поживним середовищем, модифікованим за Дульбеко (DMEM, Sigma-Aldrich, USA) із додаванням 1% розчину антибіотику/антимікотику, що містить 10000 ОД пеніциліну, 10 мг стрептоміцину, 25 мкг амфотеріцину Б у 1 мл (Sigma Aldrich, USA) та 10% інактивованої теплою фетальною бичачою сироватки (Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma-Aldrich, USA) із подальшим розміщенням флаконів та скелець на ніч в CO₂-інкубаторі при температурі 37°C та 5% CO₂.

На наступний день проводили заміну поживного середовища, і повторювали процедуру кожні 3 дні. На 10-й день росту наявні флакони розділяли на 4 групи:

Інтактні клітини – росли в звичайних умовах;

Колхіцин-оброблені клітини – зазнавали 24-годинної експозиції в середовищі, що містило 1 мкМ колхіцину (Sigma-Aldrich, USA) [13];

Колхіцин-оброблені клітини + цитіоклін – в поживне середовище додавали 100 мкМ цитіокліну (Ferrer Internacional, SA, Spain) на 24 години [11], з 25-ї по 8 годин інкубували з 1 мкМ колхіцину;

Колхіцин-оброблені клітини + тіоцетам – клітини добу інкубували в середовищі з 1мМ тіоцетаму («Артеріум», Україна) в розрахунку на пірацетам [7], після чого додавали 1 мкМ колхіцину на 24 години;

Після завершення експерименту клітини фіксували в метанолі та піддавали цитохімічному забарвленню на субстанцію Ніссля для світлової мікроскопії та імунофлюоресцентного дослідження експресії каспази 3 (casp3) та циклооксигенази 2 (cox2).

Цитохімічне забарвлення клітин за Нісслем.

1% розчин толуїдинового синього додавали до фіксованих та промитих в фосфатно-сольовому буфері (PBS) клітин та інкубували при 37°C в термостаті 24 години з наступним промиванням дистильованою водою. Після поміщали в покривне середовище і проводили мікроскопію із збереженням фотографій для подальшої обробки. Оцінювалось не менше 10 полей зору з кожної експериментальної групи клітин з 2 окремих флаконів.

Імунофлюоресцентне дослідження експресії casp3 та cox2.

Для вивчення особливостей експресії casp3 та cox2 фіксовані клітини інкубували із первинними антитілами до відповідних маркерів в блокуючому буфері (SantaCruz Biotechnology, USA) протягом 12 годин при +4 °C. Після чого ретельно відмивали в PBS та наносили вторинні протимишачі антитіла, що кон'юговані з FITC (SantaCruz Biotechnology, USA) та проводили повторну інкубацію в темній камері при температурі 37°C протягом 1 години. Далі знову промивали в PBS та наносили покривне середовище що містить DAPI (SantaCruz Biotechnology, USA) для візуалізації ядра. Підготовлені зразки аналізували на мікроскопі Axiolmager-M2 («Carl Zeiss», Germany) із використанням світлофільтра 38HE. Мікрофотографії клітин зберігали для подальшої обробки в програмі цифрового аналізу зображень. Оцінювалось не менше 10 полей зору з кожної експериментальної групи клітин з 2 окремих скелець.

Аналіз отриманих мікрофотографій.

Отримані мікрофотографії аналізувалися за допомогою інструментів програми ImageJ в напівавтоматичному режимі.

Зокрема, для оцінки гомогенності розподілу субстанції Ніссля, як показнику здорової клітини, на 8-бітних зображеннях забарвлених клітин розраховували середнє значення сірого (Mean) та його стандартне відхилення (StD). Після чого

обчислювали коефіцієнт варіації (CV):

$$CV = StD / Mean \quad (1)$$

Отриманий показник дозволяє математично оцінити ступінь нерівномірності забарвлення та вакуолізації цитоплазми.

Для оцінки флюоресцентних зображень застосовували відсотковий вміст імунопозитивних клітин до загальної кількості клітин та скориговану загальну клітинну флуоресценцію (Corrected Total Cell Fluorescence, CTCF). Останній параметр виражався в умовних одиницях імунофлюоресценції (Од_{іф}) та обчислювався за формулою:

$$CTCF = ID_1 - (S \times ID_0) \quad (2),$$

де: ID₁ – інтегрована оптична щільність імунопозитивної клітини (визначалась автоматично в ImageJ); S – площа клітини з позитивною флуоресценцією; ID₀ – інтегрована щільність фону (з клітин, що не демонстрували флуоресцентного сигналу). CTCF використовували як напівкількісну характеристику для оцінки вмісту міченого білка в окремих клітинах.

Статистичні методи обробки включали оцінку нормальності розподілу вибірки за допомогою критерія Шапіро-Уїлка. Після чого для даних із нормальним розподілом застосовувався однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA із розрахунком post-hoc критерію Тьюкі, а для даних, розподіл яких відрізнявся від нормального застосовували критерій Краскела-Волліса із апостеріорними порівняннями. Достовірними відмінності вважалися при $p < 0,05$. Всі розрахунки проводили на ліцензійному програмному забезпеченні (STATISTICA ліцензія №JPZ804I382130ARCN10-J

Результати дослідження

Аналіз варіабельності інтенсивності забарвлення субстанції Ніссля в досліджуваних клітинах продемонстрував, що 24-годинна експозиція колхіцину в первинній культурі нейронів новонароджених щурів спричиняє значну дезорганізацію тигроїду та вакуолізацію цитоплазми. Морфологічно це виражалось у дворазовому зростанні гетерогенності цитоплазматчного забарвлення. Слід зазначити, що попередня преінкубація як з цитіокліном так і тіоцетамом не забезпечувала відновлення цього показника до рівня контрольних значень (рис. 1).

Аналіз показників експресії casp3 в експериментальних культурах нервової тканини продемонстрував різку активізацію апоптозу. Так, CTCF (інтегрована інтенсивність флюоресценції) у групі клітин з колхіцином зріс більш ніж у 20 разів порівняно з інтактними клітинами, а частка casp3⁺-клітин перевищила негативний контроль в 6 разів.

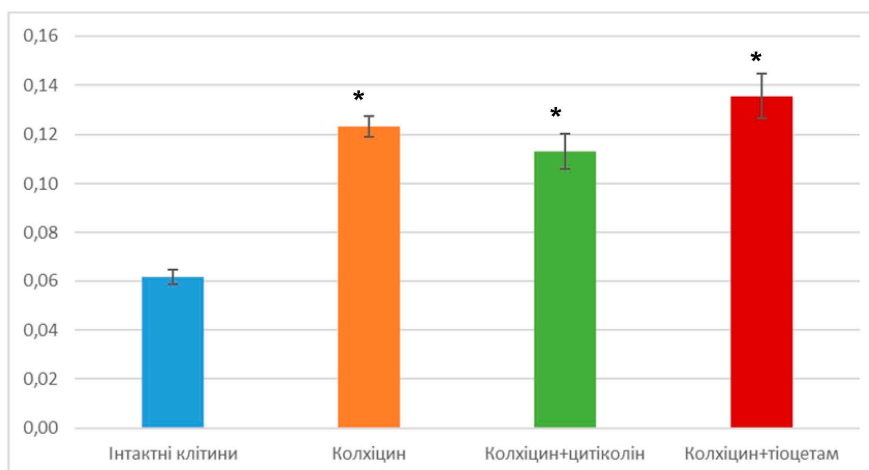


Рис. 1. Коефіцієнт варіації інтенсивності забарвлення субстанції Ніссля в клітинах експериментальних груп, $M \pm m$. Примітка. * – вірогідна відмінність від показнику інтактних клітин.

При аналізі впливу нейропротекторів було встановлено, що, хоча в показнику СТСФ статистичної різниці між групою клітин з колхіцином та групами з преінкубацією не виявлено (наявна лише відмінність від інтактного контролю), все ж спостерігається тенденція до зниження цього параметру від впливу нейропротекторів. Разом з тим, частка апоптотичних клітин у групах з фармакологічним прекондиціонуванням дозволила вірогідно знизити кількість casp3⁺-клітин на 60,8 % (цитіколін) та 42,9 % (тіоцетам) відносно групи з колхіцином, але при цьому не повертаючи до рівня інтактних клітин. При порівнянні ефективності нейропротекторів між собою в досліджуваному показниках статистичної різниці не виявлено (табл. 1).

Дослідження експресії сох2 у експеримента-

льних культурах клітин підтвердило прозапальний ефект колхіцину, що проявлялося у зростанні показника СТСФ сох2⁺-клітин у 5,8 разів відносно інтактних клітин. При цьому частка імунопозитивних клітин статистично значущо не змінилася, хоча спостерігалася тенденція до зростання цього показника під дією токсину. Встановлено, що попереднє застосування досліджуваних нейропротекторів не забезпечило зниження інтенсивності флюоресценції (СТСФ) до рівня контролю, показники в групах із фармакологічним прекондиціонуванням статистично перевищували значення інтактних клітин. Також препарати достовірно не вплинули на відсоток імунопозитивних до сох2 клітин (табл. 2).

Таблиця 1
Показники експресії каспази 3 в клітинах експериментальних груп (Me[Q1;Q3])

Група	СТСФ casp3 ⁺ -клітин (Од. _ф)	% casp3 ⁺ -клітин в полі зору
Інтактні клітини	3028,8[1335,8;6834,6]	14,3[7,4;20,0]
Клітини з колхіцином	62631,8[43184,05;78051,1] ¹	87,5[51,7;100] ^{1,3,4}
Колхіцин+цитіколін	17631,73[12601,5;74673,25] ¹	34,3[18,8;56,8] ¹
Колхіцин+тіоцетам	14323,84 [11138,1;46501,5] ¹	50,0[37,5;60,0] ¹

Примітки до таблиці 1. 1 – вірогідна відмінність від показнику інтактних клітин ($p < 0,05$); 3 – вірогідна відмінність від показнику групи колхіцин+цитіколін ($p < 0,05$); 4 – вірогідна відмінність від показнику колхіцин+тіоцетам ($p < 0,05$).

Таблиця 2
Показники експресії циклооксигенази 2 в клітинах експериментальних груп (Me[Q1;Q3])

Група	СТСФ сох2 ⁺ -клітин (Од. _ф)	% сох2 ⁺ -клітин в полі зору
Інтактні клітини	1586,9 [994, 9; 2504,53]	42,2[35,3;71,4]
Клітини з колхіцином	9322,5 [3345,7;14819,1] ¹	70,0[57,1;80,0]
Колхіцин+цитіколін	8355,3 [5072,2;34928,5] ¹	69,2[40,0;81,2]
Колхіцин+тіоцетам	9420,7 [2500,2;14959,3] ¹	40,0[33,3;60,0]

Примітки до таблиці 2. 1 – вірогідна відмінність від показнику інтактних клітин ($p < 0,05$);

Обговорення результатів

Отримані результати свідчать про те, що індукована колхіцином нейротоксичність має мультифакторіальний характер і реалізується через поєднання цитоскелетної деструкції, активації апоптотичних каскадів та стійкої прозапальної відповіді, що не раз зазначалось іншими авто-

рами [14]. Морфометричний аналіз субстанції Ніссля виявив значну дезорганізацію тигроїду. Це можна пояснити тим, що деполімеризація мікротрубочок із порушенням цитоскелету неминуче дезорганізує шорстку ендоплазматичну сітку, що ми спостерігали у вигляді вогнищового хроматолізу. Можна припустити, що, оскільки

нейропротектори не забезпечили повноцінного відновлення цього показника, то пряма хімічна дія колхіцину на тубулін є первинною та домінуючою, тому метаболічні нейропротектори не здатні прямо стабілізувати мікротрубочки в цій моделі. В наших попередніх роботах, досліджуючи вплив колхіцину на загибель нейронів структур головного мозку *in vivo*, відмічалось зменшення площі субстанції Ніссля під впливом колхіцину у порівнянні з контролем, що свідчить про специфічний вплив цього токсину на внутрішньоклітинну організацію органел [15].

Збільшення експресії каспази 3 під дією колхіцину нині є добре встановленим фактом [14]. Застосування цитіколіну в нашому експерименті асоціювалось зі зменшенням кількості casp3⁺-клітин відносно клітин оброблених колхіцином, що пояснюється тим, що цитіколін є донатором холіну, стимулює синтез фосфатидилхоліну мембран та запобігає накопиченню вільних жирних кислот. Це, в свою чергу, сприяє стабілізації мітохондріальної мембрани та обмежує вихід проапоптотичних факторів [16, 17]. Ефективність тіоцетаму в тому числі може бути пов'язана зі здатністю одного із його компонентів, пірацетаму, аттенувати транслокацію мітохондріальних білків (AIF, ендонуклеаза), що може забезпечити захист нейронів навіть у випадках ініційованого оксидативного стресу [18].

Асоціація колхіцин-індукованого запалення саме із сох-2 також встановлена Sil та Ghosh. Автори довели, що колхіцин індукує нейрозапалення саме через активацію цього ферменту, що веде до накопичення простагландину E2 із розвитком подальшої нейродеструкції [19]. При цьому зауважимо, що попередня 24-годинна експозиція із нейропротекторами в нашому дослідженні не змогла знизити інтенсивність експресії до рівня контролю. При цьому, на моделях *in vivo* дослідники відмічали зниження рівня сох-2 при на тлі впливу цитіколіну та пірацетаму [20, 21]. Це можна пояснити тим, що запалення як комплексний тканинний процес, який виникає у відповідь на пошкодження, повною мірою не можливо відтворити на культурі клітин.

Висновки

1) 24-годинна експозиція колхіцину в первинній культурі нейронів характеризується глибокою дезорганізацією тигроїду (двократне зростання гетерогенності забарвлення), активацією каспаза-залежного апоптозу (збільшення інтенсивності експресії каспази-3 у 20 разів та залучення 87,5% клітин) і стимуляцією запалення (зростання інтенсивності експресії циклооксигенази-2 у 5,8 рази).

2) Фармакологічне прекодиціювання цитіколіном та тіоцетамом асоціюється із зниженням кількості casp3⁺-клітин на 60,8% (цитіколін) та 42,9% (тіоцетам), але не інтенсивності флуоресценції порівняно до групи клітин із колхіцином. Обидва препарати при 24-х годинній преінкуба-

ції недостатньо ефективними щодо повного відновлення структури тигроїду та нівелювання інтенсивності експресії циклооксигенази-2, демонструючи лише тенденцію до нормалізації цих параметрів.

ORCID автора

Данукало М.В. – [0000-0003-3413-945X](https://orcid.org/0000-0003-3413-945X)

Конфлікт інтересів

Відсутній.

Фінансування

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

References

1. Wurz AI, Schulz AM, O'Bryant CT, Sharp JF, Hughes RM. Cytoskeletal dysregulation and neurodegenerative disease: Formation, monitoring, and inhibition of cofilin-actin rods. *Front Cell Neurosci.* 2022 doi: 10.3389/fncel.2022.982074
2. Pozo Devoto VM, Lacovich V, Feole M, Bhat P, Chovan J, Čarna M, et al. Unraveling axonal mechanisms of traumatic brain injury. *Acta Neuropathol Commun.* 2022;10(1):140. doi: 10.1186/s40478-022-01414-8
3. Guo W, Stoklund Dittlau K, Van Den Bosch L. Axonal transport defects and neurodegeneration: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;99:133-50. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.07.010
4. Rapaka D, Adiukwu PC, Bitra VR. Experimentally induced animal models for cognitive dysfunction and Alzheimer's disease. *MethodsX.* 2022;9:101933. doi: 10.1016/j.mex.2022.101933
5. Jasielski P, Piędel F, Piwek M, Rocka A, Petit V, Rejda K. Application of Citicoline in Neurological Disorders: A Systematic Review. *Nutrients.* 2020;12(10):3113. doi: 10.3390/nu12103113
6. Belenichev IF, Sokolik EP, Bukhtiarova NV, Levich SV. Pharmacological modulation of heat shock protein 70 (HSP70)—dependent mechanisms of endogenous neuroprotection in conditions of prenatal chronic alcoholism by cerebrocurin and tiocetam. *Klin Psikofarmakol Bul.* 2016;26(2):103-108. doi: 10.5455/bcp.20151003061901
7. Solanki P, Prasad D, Muthuraju S, Sharma AK, Singh SB, Ilavzhagan G. Preventive effect of piracetam and vinpocetine on hypoxia-reoxygenation induced injury in primary hippocampal culture. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(4):917-922. doi: 10.1016/j.fct.2010.12.015
8. Aminzadeh A, Salarinejad A. Citicoline protects against lead-induced oxidative injury in neuronal PC12 cells. *Biochem Cell Biol.* 2019;97(6):715-721. doi: 10.1139/bcb-2018-0218
9. Kurz C, Ungerer I, Lipka U, Kirr S, Schütt T, Eckert A, et al. The metabolic enhancer piracetam ameliorates the impairment of mitochondrial function and neurite outgrowth induced by β -amyloid peptide. *Br J Pharmacol.* 2010;160(2):246-257. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00656.x
10. Barrachina M, Secades J, Lozano R, Gómez-Santos C, Ambrosio S, Ferrer I. Citicoline increases glutathione redox ratio and reduces caspase-3 activation and cell death in staurosporine-treated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 2002;957(1):84-90. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03605-3
11. Matteucci A, Varano M, Gaddini L, Mallozzi C, Villa M, Pricci F, et al. Neuroprotective effects of citicoline in *in vitro* models of retinal neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6286-6297. doi: 10.3390/ijms15046286
12. Seibenhener ML, Wooten MW. Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice. *J Vis Exp.* 2012;(65):3634. doi: 10.3791/3634
13. Kristensen BW, Noer H, Gramsbergen JB, Zimmer J, Norberg J. Colchicine induces apoptosis in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 2003;964(2):264-278. doi: 10.1016/S0006-8993(02)04080-5

14. Kristensen BW, Noer H, Gramsbergen JB, Zimmer J, Norberg J. Colchicine induces apoptosis in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 2003;964(2):264-278. doi: 10.1016/S0006-8993(02)04080-5
15. Danukalo MV, Kolesnyk YM. Specificity of iNOS expression indicators in the basal magnocellular nucleus of rats against the background of early pathogenetic correction in experimental neurodestruction. *Zaporozhye Med J.* 2024;26(5):379-386. doi: 10.14739/2310-1210.2024.5.309732
16. Gareri P, Castagna A, Cotroneo AM, Putignano S, De Sarro G, Bruni AC. The role of citicoline in cognitive impairment: pharmacological characteristics, possible advantages, and doubts for an old drug with new perspectives. *Clin Interv Aging.* 2015;10:1421-9. doi: 10.2147/CIA.S87886
17. Mastropasqua L, Agnifili L, Ferrante C, Sacchi M, Figus M, Rossi GC, et al. Citicoline/coenzyme Q10/vitamin B3 fixed combination exerts synergistic protective effects on neuronal cells exposed to oxidative stress. *Nutrients.* 2022;14(14):2963. doi: 10.3390/nu14142963
18. Verma DK, Gupta S, Biswas J, Joshi N, Singh A, Chaturvedi RK, et al. Metabolic enhancer piracetam attenuates the translocation of mitochondrion-specific proteins of caspase-independent pathway, poly [ADP-ribose] polymerase 1 up-regulation and oxidative DNA fragmentation. *Neurotox Res.* 2018;34(2):198-219. doi: 10.1007/s12640-018-9878-2
19. Sil S, Ghosh T. Role of cox-2 mediated neuroinflammation on the neurodegeneration and cognitive impairments in colchicine induced rat model of Alzheimer's Disease. *J Neuroimmunol.* 2016;291:115-124. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.12.003
20. Cavalu S, Saber S, Ramadan A, Elmorsy EA, Hamad RS, Abdel-Reheim MA, et al. Unveiling citicoline's mechanisms and clinical relevance in the treatment of neuroinflammatory disorders. *FASEB J.* 2024;38(17):e70030. doi: 10.1096/fj.202400823R
21. Mani V, Rabbani SI, Shariq A, Amirthalingam P, Arfeen M. Piracetam as a therapeutic agent for doxorubicin-induced cognitive deficits by enhancing cholinergic functions and reducing neuronal inflammation, apoptosis, and oxidative stress in rats. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(12):1563. doi: 10.3390/ph15121563

Summary

THE ROLE OF 24-HOUR NEUROPROTECTIVE PRECONDITIONING IN NEURONAL SURVIVAL DURING COLCHICINE-INDUCED NEURODEGENERATION IN VITRO

Danukalo M. V.

Keywords: colchicine, neuroprotection, citicoline, thiocetam, neuroapoptosis, neuroinflammation.

Colchicine-induced neurotoxicity is a valuable tool for replicating axonal transport disruption in both in vivo and in vitro experiments – a pathological process associated with the development and progression of neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases, as well as traumatic brain injuries. However, the mechanisms of neuronal death and resistance to this neurotoxin remain subjects of active research.

Objective. The purpose of this study was to describe the effect of 24-hour preconditioning with citicoline and thiocetam on cell survival in a primary culture of embryonic nervous tissue under the influence of colchicine.

Materials and methods. The study was conducted on a primary neuronal culture divided into an intact group, a group with 24-hour exposure to 1 μ M colchicine, and groups with prior neuroprotective correction. Pharmacological preconditioning was performed by incubating cells for 24 hours in a medium containing either citicoline (100 μ M) or thiocetam (1 mM) before the subsequent addition of the toxicant. Subsequently, the cells were fixed and subjected to cytochemical Nissl staining and immunofluorescent analysis of caspase-3 (casp3) and cyclooxygenase-2 (cox2) expression.

Results. The analysis demonstrates that colchicine exposure causes disorganization of the Nissl substance, increased casp3 expression, and a pronounced pro-inflammatory response according to the cox2 marker. Prior application of citicoline and thiocetam significantly reduced the proportion of apoptotic cells by 60.8% and 42.9%, respectively, although it did not provide full restoration of the parameters to the level of the intact control. The investigated neuroprotectors demonstrated significant anti-apoptotic properties but were less effective in correcting the morphological signs of chromatolysis and the intensity of cox2 expression. **Conclusions.** 1. 24-hour exposure to colchicine in primary neuronal culture is characterized by profound tigroid disorganization (a twofold increase in staining heterogeneity), activation of caspase-dependent apoptosis (a 20-fold increase in caspase-3 expression intensity with the involvement of 87.5% of cells), and stimulation of inflammation (a 5.8-fold increase in cyclooxygenase-2 expression intensity). 2. Pharmacological preconditioning with the studied drugs is associated with a decrease in the number of casp3⁺-cells by 60.8% (citicoline) and 42.9% (thiocetam), but does not affect the fluorescence intensity compared to the colchicine group. At the same time, 24-hour pre-incubation with both drugs proved insufficient for the full restoration of the tigroid structure or the complete neutralization of cyclooxygenase-2 expression intensity, demonstrating only a trend towards the normalization of these parameters.