

Оцінювання стану системи оксиду азоту в базальному магноцелюлярному ядрі головного мозку щурів на фоні ранньої нейропротекції після інтацеребровентрикулярного введення колхіцину

М. В. Данукало^{id A-D}, Д. Л. Усенко^{id B}, А. Г. Каплаушенко^{id E,F}, Ю. М. Колесник^{id E,F}

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

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

Ключові слова:

система оксиду азоту, iNOS, nNOS, 3-нітротирозин, головний мозок, щури, цитиколін, тіоцетам, HSF-1.

Keywords:

nitric oxide system, iNOS, nNOS, 3-nitrotyrosine, brain, rats, citicoline, thiocetam, HSF-1.

Надійшла до редакції /
Received: 12.05.2026

Після доопрацювання /
Revised: 06.07.2026

Схвалено до друку /
Accepted: 17.07.2026

Конфлікт інтересів:
відсутній.

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

Мета роботи – визначити особливості впливу цитиколіну, тіоцетаму та фактора теплового шоку (HSF-1) на стан системи оксиду азоту (L-аргініну, нітритів, нітротирозину, вмісту iNOS і nNOS) у базальному магноцелюлярному ядрі головного мозку щурів при колхіцин-індукованій нейродеструкції.

Матеріали і методи. Експеримент проведено на 50 самцях щурів лінії Wistar (5 груп), у яких нейродегенерацію моделювали інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину з наступною 14-денною фармакологічною корекцією цитиколіном, тіоцетамом та HSF-1. Стан системи NO оцінювали за рівнем L-аргініну, NOx, нітротирозину та імунофлуоресцентними параметрами (CTCF, щільність) iNOS і nNOS у базальному магноцелюлярному ядрі за допомогою ImageJ. Статистичний аналіз передбачав використання параметричних і непараметричних методів та інтегральне оцінювання даних методом аналізу головних компонент (PCA).

Результати. Введення колхіцину (група 2) призвело до вираженого нітрозативного стресу: зниження рівня L-аргініну на 58,1 % на фоні багатократного підвищення концентрацій NOx, нітротирозину та інтенсивності флуоресценції iNOS. Застосування нейропротекторів (групи 3–5) забезпечило відновлення вмісту L-аргініну (найбільш суттєво – при введенні HSF-1) та зниження маркерів оксидативного ушкодження до значень, наближених до контролю. Імуногістохімічно зафіксовано редукцію експресії iNOS та зростання щільності nNOS-позитивних нейронів у групах корекції, при цьому тіоцетам мав найнижчу ефективність щодо відновлення популяції nNOS⁺-клітин. Інтегральний аналіз PCA підтвердив чітку кластеризацію груп нейропротекції, де відновлення системи оксиду азоту відбувалося переважно внаслідок стабілізації кількості нейронів, а не зміни активності ферментів в окремих клітинах.

Висновки. Встановлено, що колхіцин-індукована нейродегенерація супроводжується значним дефіцитом L-аргініну та активацією нітрозативного стресу, при цьому повної нормалізації рівня субстрату досягнуто лише при застосуванні цитиколіну або HSF-1. Рання 14-денна нейропротекція всіма дослідженими препаратами забезпечує повну стабілізацію вмісту NOx, нітротирозину та запобігає патологічній гіперекспресії iNOS у нейронах базального магноцелюлярного ядра. Показник інтенсивності флуоресценції nNOS залишався стабільно низьким незалежно від терапії, а отже досліджені засоби не моделювали внутрішньоклітинну активність ферменту в окремих нейронах. Визначальним механізмом нейропротекції є збереження популяції nNOS-позитивних клітин, де застосування HSF-1 зумовлює унікальний ефект зростання їхньої щільності навіть понад рівень інтактного контролю.

Сучасні медичні технології. 2026. Т. 18, № 3(70). С. 159-167

Evaluation of the nitric oxide system state in the basal magnocellular nucleus of rat brain following early neuroprotection after intracerebroventricular administration of colchicine

M. V. Danukalo, D. L. Usenko, A. H. Kaplaushenko, Yu. M. Kolesnyk

Aim. To determine the specific effects of citicoline, thiocetam, and heat shock factor-1 (HSF-1) on the nitric oxide system (L-arginine, nitrites, nitrotyrosine, iNOS, and nNOS content) in the basal magnocellular nucleus (BMN) of the rat brain under conditions of colchicine-induced neurodestruction.

Materials and methods. The experiment was conducted on 50 male Wistar rats (5 groups). Neurodegeneration was modeled by intracerebroventricular administration of colchicine, followed by a 14-day pharmacological correction with citicoline, thiocetam, and HSF-1. The state of the NO system was assessed by L-arginine levels, NOx, nitrotyrosine, and immunofluorescence parameters (CTCF, density) of iNOS and nNOS in the BMN using ImageJ software. Statistical analysis included parametric and non-parametric methods, along with an integral data assessment via principal component analysis (PCA).

Results. Colchicine administration (Group 2) led to pronounced nitrosative stress: a 58.1 % decrease in L-arginine levels against a background of a multiple increase in NOx, nitrotyrosine concentrations, and iNOS fluorescence intensity. The use of neuroprotectors (Groups 3–5) ensured the restoration of L-arginine content (most significantly with HSF-1 administration) and a reduction in markers of oxidative damage to values close to control levels. Immunohistochemically, a reduction in iNOS expression and an increase in nNOS-positive neuron density were observed in the treatment groups, with thioctam demonstrating the lowest efficacy in restoring the nNOS+ cell population. PCA confirmed clear clustering of the neuroprotection groups, where restoration of the nitric oxide system occurred primarily through the stabilization of neuron count rather than changes in enzyme activity within individual cells.

Conclusions. It was established that colchicine-induced neurodegeneration is accompanied by profound L-arginine deficiency and nitrosative stress activation, while complete normalization of the substrate level is achieved only with the use of citicoline or HSF-1. Early 14-day neuroprotection with all studied drugs ensures complete stabilization of NOx and nitrotyrosine levels and prevents pathological iNOS overexpression in BMN neurons. The nNOS fluorescence intensity remains consistently low regardless of therapy, indicating that these agents do not affect the intracellular activity of the enzyme in individual neurons. The decisive mechanism of neuroprotection is the preservation of the nNOS-positive cell population density, where the use of HSF-1 results in a unique effect of increasing their density even beyond the intact control level.

Modern medical technology. 2026;18(3):159-167

Оксид азоту (nitric oxide, NO) – унікальна газоподібна молекула-месенджер, що синтезується в результаті ферментативної активності ізоформ синтази оксиду азоту (NOS) і виконує широкий спектр регуляторних функцій у різних органах і тканинах [1]. Протягом тривалого часу NO залишається об'єктом інтенсивних досліджень у галузі нейронаук, оскільки фундаментальні зміни в системі його продукції зафіксовані при низці нейродегенеративних захворювань і корелюють зі ступенем втрати нейронів (зокрема хвороби Альцгеймера та Паркінсона), гострих порушеннях мозкового кровообігу та нейротравмах [2,3,4,5].

У патофізіологічному контексті NO традиційно визначали як деструктивний чинник, що спричиняє нейрональне ушкодження внаслідок розвитку нейрозапалення, нітрозативного стресу та активації каскадів нейроапоптозу. Виходячи за межі контрольованого синтезу, ця сполука може прямо чи опосередковано спричиняти оксидативне пошкодження клітини [2].

Водночас накопичені дані свідчать про нейропротекторну роль модуляторів системи NO [6]. Згідно з результатами численних досліджень, NO – ключовий месенджер на різних етапах функціонування мозку від ембріонального розвитку до процесів навчання, залучений до механізмів синаптичної пластичності та тривалої потенціації (long-term potentiation, LTP). Саме вона є фундаментальним процесом, що забезпечує посилення синаптичних зв'язків і лежить в основі формування довготривалої пам'яті [7].

Отже, сучасна парадигма вказує на подвійний (янусоподібний) характер дії NO: з одного боку, він є медіатором нейротоксичності та дегенерації, що прогресує, а з іншого, – є необхідним фізіологічним агентом для виживання та функціонування нейронів, зокрема і структур головного мозку, що відповідають за когнітивні здібності.

Відповідно, вивчення закономірностей змін у системі NO на фоні ураження нейронів у структурах, пов'язаних із формування пам'яті та когнітивними функціями, є критично важливим для розуміння межі між його фізіологічною (нейропротекторною) та патологічною (нейродегенеративною) діями. Зокрема, значний науковий інтерес викликають хо-

лінергічні центри головного мозку, передусім базальне магноцелюлярне ядро (БМЯ). Оскільки БМЯ є головним джерелом ацетилхоліну для неокортексу, його дегенерацію визначають як фундаментальну ланку розвитку когнітивного дефіциту, що починається ще на доклінічному етапі деменції [8].

Для відтворення таких патологічних станів релевантною є колхіцинова модель нейродеструкції. Інтрацеребровентрикулярне (ІЦВ) введення цього алкалоїду дає змогу відтворити комплекс процесів, характерних для спорадичної деменції альцгеймерівського типу, включаючи порушення аксонального транспорту, оксидативний і нітрозативний стрес, нейрозапалення та масивну загибель нейронів БМЯ [9,10].

Отже, враховуючи мультифакторний механізм загибелі нейронів, а також вторинний характер залученості системи NO при колхіцин-індукованому пошкодженні аксонального транспорту, важливим є комплексне дослідження її компонентів (L-аргініну, нітритів, нітротирозину та експресії таких ізоформ, як iNOS і nNOS) у БМЯ на фоні патогенетично обґрунтованої корекції.

Такий підхід дає можливість оцінити направленість системи NO в бік нейропротективного або нейродеструктивного шляху і при цьому встановити особливості перебудови балансу між складовими, що описуватимуть вектор її дії. Встановлені дані дадуть змогу розширити уявлення про специфіку залученості системи NO на фоні раннього впливу нейропротективними засобами на різні ланки патогенезу розвитку колхіцин-індукованого ураження нейронів БМЯ, зокрема оксидативний стрес, порушення протеостазу та синаптогенезу з супутнім розвитком нейрозапалення та нейроапоптозу.

Мета роботи

Визначити особливості впливу цитиколіну, тіоцетаму та фактора теплового шоку на стан системи оксиду азоту (L-аргініну, нітритів, нітротирозину, вмісту iNOS та nNOS) у базальному магноцелюлярному ядрі головного мозку щурів при колхіцин-індукованій нейродеструкції.

Матеріали і методи дослідження

Експериментальні групи сформовані з 50 статевозрілих самців щурів лінії Wistar віком 10–11 місяців. Тварин утримували у віварії Навчально-наукового медико-лабораторного центру Запорізького державного медико-фармацевтичного університету з вільним доступом до води та корму.

Усі інвазивні та болісні втручання на тваринах проводили із чітким дотриманням принципів біоетики, закріплених у «Загальних етичних принципах проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001), а також Директиві 2010/63/ЄС Європейського парламенту та Ради щодо захисту хребетних тварин, які використовуються у наукових цілях. Комісія з питань біоетики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (протокол від 20.05.2026 року № 8) розглянула матеріали, наведені у статті, та підтвердила відповідність методології експерименту всім чинним вимогам, що задекларовані в міжнародних та національних документах щодо етичного використання тварин у наукових дослідженнях (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, ETS No. 123; Directive 2010/63/EU; Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження»).

До кожної зі сформованих груп входило по 10 тварин:

- група 1 (хибнооперовані, негативний контроль) – щури, яким під загальним знеболюванням виконували всі етапи хірургічного втручання, ідентичні експериментальним групам (фіксація в стереотаксичній системі, трепанація), з подальшим ІЦВ введенням 3 мкл 0,9 % розчину NaCl;

- група 2 (ІЦВ введення колхіцину, позитивний контроль) – тварини, яким виконували ІЦВ введення розчину колхіцину (15 мкг у 3 мкл 0,9 % NaCl) для моделювання нейродегенеративних змін;

- група 3 (ІЦВ введення колхіцину + цитиколін) – щури з ІЦВ введенням колхіцину, яким, починаючи з наступної доби після операції, протягом 14 днів вводили цитиколін у дозі 500 мг/кг внутрішньоочеревинно;

- група 4 (ІЦВ введення колхіцину + тіоцетам) – тварини після ІЦВ введення колхіцину, яким у післяопераційному періоді протягом 14 днів проводили корекцію тіоцетамом у дозі 250 мг/кг внутрішньоочеревинно;

- група 5 (ІЦВ введення колхіцину + фактор теплового шоку (heat shock factor-1, HSF-1)) – щури після ІЦВ введення колхіцину, яким протягом 14 днів вводили рекомбінантний HSF-1 у дозі 200 мкл/кг внутрішньоочеревинно.

ІЦВ введення виконували під загальним знеболюванням препаратом «Телазол» (тіолетамін, золазепам), який вводили внутрішньоочеревинно з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси тіла. У групах моделювання патології вводили розчин колхіцину (15 мкг, розчинений у 3 мкл 0,9 % NaCl, підігрітий до 37 °C). Контрольним тваринам вводили аналогічний об'єм фізіологічного розчину. Координати введення відповідали проєкції латеральних шлуночків мозку, визначені за стереотаксичним атласом мозку щура. Маніпуляції здійснено із застосуванням цифрової стереотаксичної установки World Precision Instruments (США). Придатність застосованої моделі нейродеструкції показана раніше, її оцінювали через 14

днів після оперативного втручання за зниженням показників просторової пам'яті в експериментальних щурів [11].

Відповідно до наведених механізмів колхіцин-індукованої нейрональної загибелі досліджено такі засоби для нейропротекції, як цитиколін, що сприяє синтезу ацетилхоліну та покращує синаптичну трансмісію, тіоцетам – агент, що впливає на оксидативний стрес, та рекомбінантний HSF-1 – стимулятор утворення важливих шаперонів – білків теплового шоку (HSP), тим самим покращуючи протеостаз у пошкоджених нейронах [12,13,14,15].

Починаючи з першої доби після ІЦВ втручання, тваринам груп корекції (3–5) щоденно протягом 14 днів внутрішньоочеревинно вводили препарати з нейропротекторною активністю: цитиколін – 500 мг/кг (Ferrer Internacional, Іспанія); тіоцетам (пірацетам : тіотріазолін = 1:4) – 250 мг/кг («Артеріум», Україна); HSF-1 (recombinant) – 200 мкл/кг (Sigma-Aldrich, США).

На 15 добу після ІЦВ введення фізіологічного розчину або колхіцину (групи 1 та 2) та з корекцією препаратами (з введенням колхіцину – групи 3–5) щурів виводили з експерименту шляхом декапітації під анестезією тіопенталом натрію (120 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Негайно після цього головний мозок вилучали, фіксували у розчині Буена з подальшим зневодненням та заливкою у парапласт. З парапластових блоків виготовляли серійні гістологічні зрізи мозку в проєкції БМЯ завтовшки 5 мкм за допомогою мікротому Microm-325 (Німеччина). Топографічну ідентифікацію досліджуваної структури здійснили відповідно до стереотаксичного атласу мозку щура [16].

Експресію індукцибельної ізоформи NOS в нейронах БМЯ здійснили з використанням методу імунофлуоресцентної мікроскопії. Попередньо виготовлені гістологічні зрізи послідовно піддавали процедурам депарафінізації та регідратації, після чого проводили етап демаскування антигенних детермінант у спеціалізованому модулі нагріву РТ (ThermoScientific, США) з використанням цитратного буфера з рН 6,0 (ThermoScientific, США). Це забезпечувало оптимальні умови для зв'язування антитіл із відповідними епітопами.

Після завершення підготовчих етапів на зрізи наносили специфічні мишачі моноклональні антитіла проти iNOS або nNOS, безпосередньо кон'юговані з флуорофором флуоресцеїн-ізотіоціанатом (FITC). Імунореактиви застосовано у концентраціях та за схемою інкубації, що рекомендовані виробником (Santa Cruz Biotechnology, США) [17].

Візуалізацію імунофлуоресцентного сигналу здійснили в ультрафіолетовому діапазоні з використанням світлофільтра 38HE на дослідному мікроскопі Axiolmager-M2 («Carl Zeiss», Німеччина), додатково обладнаному цифровою камерою AxioCam-ERc 5s («Carl Zeiss», Німеччина). Завдяки цьому отримано високоякісні фотознімки для наступного аналізу.

Одержані цифрові зображення нейронів БМЯ опрацювали кількісно, використавши програмне забезпечення ImageJ. У напівавтоматичному режимі визначали низку параметрів, зокрема:

- скориговану загальну клітинну флуоресценцію (Corrected Total Cell Fluorescence, CTCF), котру застосовували як напівкількісну характеристику вмісту імунореактивного матеріалу в межах окремої клітини. Значення показника наведено в

умовних одиницях імунофлуоресценції (Одіф) та обчислено за формулою: $CTCF = ID_1 - (S \times ID_0)$, де ID_1 – інтегрована щільність флуоресцентного сигналу від імунопозитивної клітини, що визначена автоматично програмними засобами, S – площа клітини, що мала специфічне флуоресцентне світіння, ID_0 – інтегрована щільність флуоресценції фону, визначена за клітинами, що не мали імунореактивності;

– щільність імунопозитивних клітин, котру обчислили як кількість клітин, що мали специфічну флуоресценцію, віднесено до одиниці площі аналізованого поля зору. Отримані результати наведено як клітини на квадратний міліметр (кл/мм²).

Навіску тканини головного мозку 100 мг, що анатомічно відповідала розташуванню БЯМ, попередньо промивали ізотонічним фізіологічним розчином, після чого піддавали механічній гомогенізації у буферному середовищі з рН 7,4 (сахароза : Tris-HCl : етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) у співвідношенні 250:20:1, ммоль/л). Усі маніпуляції виконано за температури +4 °С для збереження біохімічної стабільності досліджених компонентів.

Після завершення процесу гомогенізації для видалення грубих клітинних елементів і неструктурованих тканинних фрагментів здійснили первинне центрифугування в охолодженому (+4 °С) центрифугу Еppendorf 5804 R (Німеччина) протягом 7 хвилин при 1000 × g.

Отриманий після першого етапу центрифугування супернатант обережно відбирали та піддавали повторному центрифугуванню в тому самому температурному режимі. Другий етап проведено на центрифугу Sigma 3-30K (Німеччина) протягом 20 хвилин при 17 000 × g. Після завершення диференційованого центрифугування надосадову фракцію ретельно відокремлювали та зберігали за температури -80 °С до наступного використання у біохімічних дослідженнях.

Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту (NOx) у цитозольній фракції гомогенатів головного мозку визначено методом Гріса. Оптичну густину виміряно на спектрофотометрі Libra S32 (Biochrom Ltd, США) при довжині хвилі 540 нм. Кількісне оцінювання концентрації NOx здійснено на підставі лінійної калібрувальної кривої, побудованої в інтервалі концентрацій нітрату натрію від 0 ммоль/л до 50 ммоль/л. Одержані концентраційні значення для тканинних зразків спочатку наводили у ммоль/л, після цього результати перераховували у нмоль на 1 мг білка.

Для кількісного оцінювання загального вмісту білка в цитоплазматичній фракції гомогенатів головного мозку застосовано біуретову реакцію. Оптичну густину зразків реєстрували при довжині хвилі 546 нм з використанням спектрофотометра Libra S32 (Biochrom Ltd, США).

Концентрацію L-аргініну у цитоплазматичній фракції головного мозку визначали методом високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричною детекцією (ВЕРХ-МС). Аналіз здійснено на хроматографічній системі Agilent 1260, укомплектованій одноквадрупольним мас-спектрометром G6120B Single Quad LCMS («Agilent Technologies», Сінгапур), що обладнаний джерелом іонізації типу електро-спрей (ESI). Хроматографічне розділення аналітів виконано на колонці Zorbax SB-C18 (30 мм × 4,6 мм, розмір часток – 1,8 мкм) в ізократичному режимі за температури термостата

колонки 40 °С. Рухомою фазою складалася з суміші фази А (вода з додаванням 0,1 % трифтороцтової кислоти) та фази Б (ацетонітрил з 0,1 % мурашиної кислоти) у співвідношенні 95:5 (об./об.). Швидкість потоку становила 0,4 мл/хв. Детектування здійснено за допомогою діодно-матричного детектора на довжині хвилі 200 нм. Загальна тривалість одного аналізу становила 5 хвилин, об'єм інжекції – 1 мкл. Перед введенням у хроматографічну систему досліджені зразки піддавали фільтрації крізь нейлонові мембранні фільтри з діаметром пор 0,22 мкм. Кількісний обрахунок концентрації L-аргініну виконано шляхом зіставлення отриманих сигналів з калібрувальним графіком, що побудований за результатами аналізу стандартних зразків в інтактній плазмі щурів.

Рівень нітритрозину в сироватці крові визначено імуноферментним методом з використанням комерційного набору Hycult Biotech (Нідерланди) відповідно до протоколу виробника. Оптичну густину зразків виміряно на спектрофотометрі Sirio S (Seac, Італія). Отримані концентраційні значення наведено у нмоль/мл з наступним перерахунком на 1 мг білка.

Усі експериментальні результати опрацьовано з застосуванням пакета прикладних і статистичних програм Statistica (ліцензія № JPZ8041382130ARCN10-J) та Microsoft Excel 10.0 (Microsoft Corp., США), використано також статистичні та візуалізаційні бібліотеки Python 3.0. Оцінювання відповідності закону нормального розподілу даних у вибірках здійснювали за критерієм Шапіро–Вілکا. Для визначення статистичної значущості відмінностей між експериментальними групами використано t-критерій Стюдента у разі нормального розподілу даних або U-критерій Манна–Вітні, якщо розподіл не відповідав закону нормального розподілу. Для інтегрального оцінювання відмінностей між експериментальними групами та визначення ключових маркерів, що мають найбільший внесок у диференціацію досліджених станів, застосовано аналіз головних компонент (principal component analysis, PCA).

Результати

Результати дослідження дали змогу визначити виражені зміни показників системи NO в БМЯ на фоні ІЦВ введення колхіцину порівняно з групою негативного контролю (група 1). Крім того, встановили особливості впливу ранньої патогенетично обґрунтованої нейропротекції щодо групи позитивного контролю (група 2).

Так, вміст L-аргініну в гомогенатах головного мозку тварин 2 групи із введенням колхіцину без корекції статистично нижчий щодо показників групи 1, зафіксовано його зниження на 58,1 %. Натомість у групах 3–5 рівень амінокислоти перевищував значення позитивного контролю на 98,4 %, 51,2 % та 123,7 % відповідно. 3-поміж досліджених нейропротекторів лише у групі щурів із введенням тіоцетаму (група 4) рівень L-аргініну залишався достовірно нижчим за негативний контроль (група 1) на 36,6 %. Відповідно, вміст дослідженого субстрату у групі 4 на 23,8 % та 48,0 % нижчий порівняно з іншими групами нейропротекції – 3 та 5 відповідно (рис. 1).

У групі 2 (із введенням колхіцину без корекції) на фоні дефіциту L-аргініну встановлено, що маркери нітрозативного стресу (NO_x і нітритрозин) досягали максимальних значень,

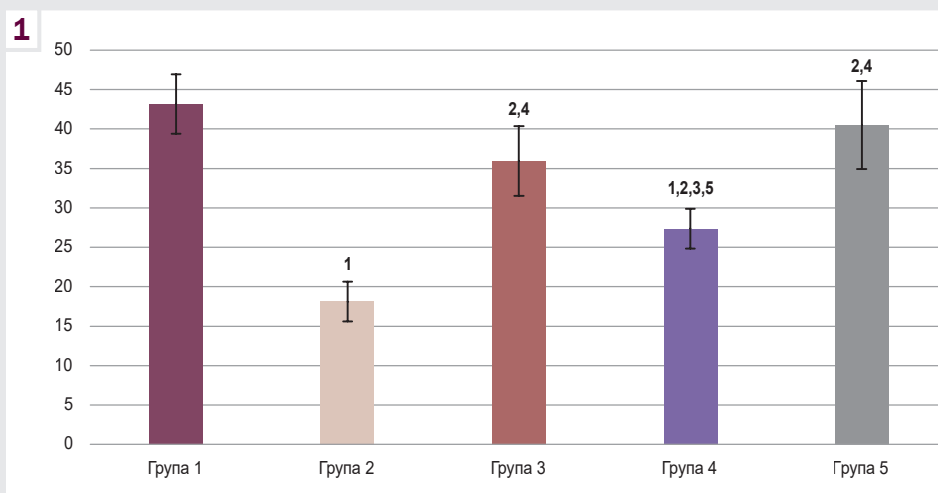


Рис. 1. Вміст L-аргініну в гомогенатах головного мозку щурів експериментальних груп (нмоль/мг білка).

1: вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 1; **2:** вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 2; **3:** вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 3; **4:** вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 4; **5:** вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 5.

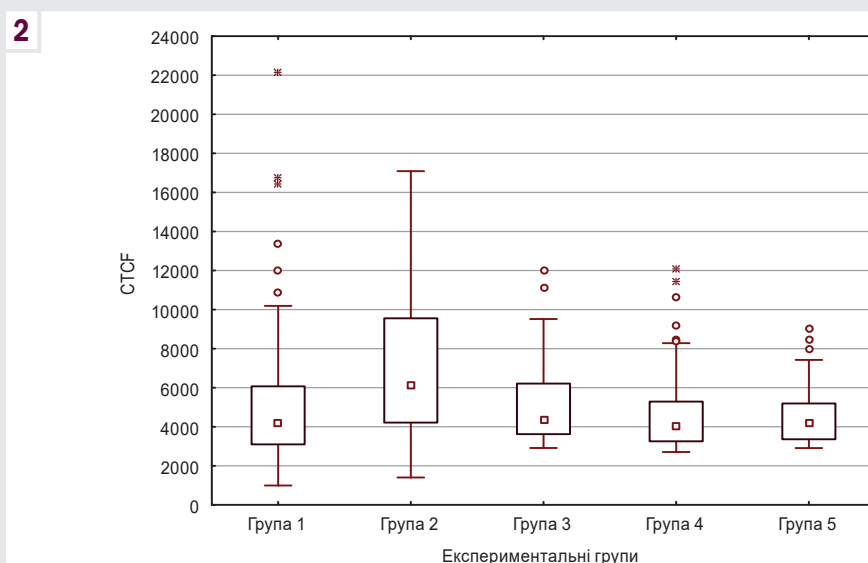


Рис. 2. Скоригована загальна клітинна флуоресценція (CTCF) iNOS⁺-клітин БМЯ у щурів з експериментальних груп.

*: достовірні відмінності між показниками груп порівняння ($p_u < 0,05$).

перевищуючи рівні групи 1 в'ятеро для NO_x та вдвічі для нітритозину. У групах, що отримували ранню нейропротекцію (3–5), виявлено статистично значуще зниження цих параметрів щодо групи 2. Водночас повернення показників до значень негативного контролю (група 1) встановлено лише для нітритозину, а рівні NO_x у групах 3–5 достовірно перевищували відповідні параметри групи 1. Між групами з нейропротекцією (3–5) статистично значущої різниці за вмістом NO_x та 3-нітритозину не виявлено (табл. 1).

Оцінювання інтенсивності флуоресценції (CTCF) iNOS⁺-клітин у БМЯ показало, що рання нейропротекція (групи 3–5) сприяла зниженню експресії ензиму щодо групи позитивного контролю (група 2) на 40,7 %, 53,4 % та 47,8 % відповідно. Показник CTCF iNOS⁺-клітин у тварин 1 групи на

43,5 % нижчий за рівень групи 2 і не мав статистично значущих відмінностей від показників груп 3–5. Міжгрупове порівняння показало, що у щурів групи 4 інтенсивність флуоресценції на 8,3 % нижча, ніж у групі 3, а між групами 3 і 5 достовірних відмінностей не виявлено (рис. 2).

Показник CTCF nNOS⁺-клітин БМЯ характеризувався іншими особливостями: найвищий рівень експресії зафіксовано у групі негативного контролю (група 1), а в інших групах (2–5) цей параметр майже вдвічі менший. Статистично значущих відмінностей між групою позитивного контролю (група 2) та групами із нейропротекцією (3–5), як і між самими групами 3–5, за цим показником не виявлено (рис. 3).

Аналіз щільності імунної позитивності до nNOS⁺ та iNOS⁺ дав змогу встановити виражену перебудову клітинних популя-

Таблиця 1. Показники нітрозативного стресу у гомогенатах головного мозку щурів з експериментальних груп, $M \pm m$

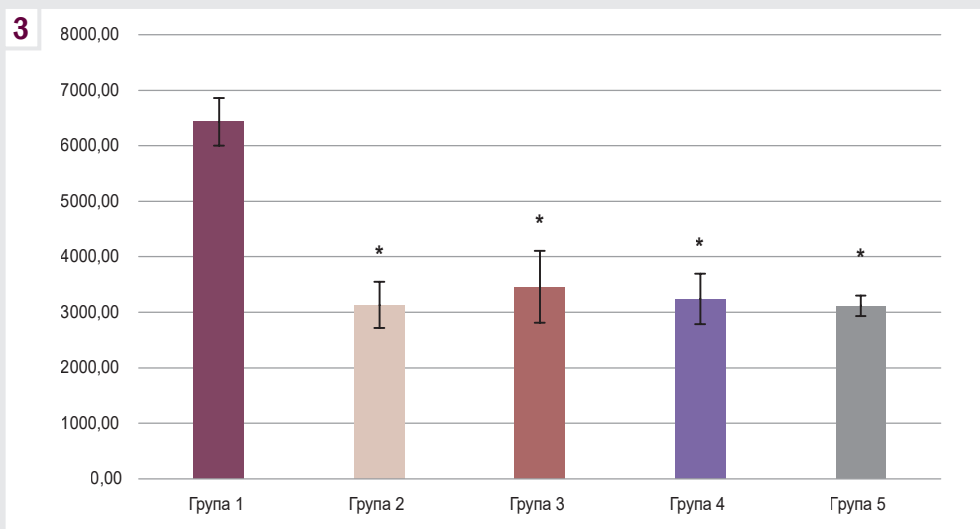
Експериментальна група	NO_x , нмоль/мг білка	3-Нітротирозин, нмоль/мг білка
Група 1 (n = 10)	$0,79 \pm 0,19$	$0,005 \pm 0,001$
Група 2 (n = 10)	$4,77 \pm 0,83^1$	$0,010 \pm 0,001^1$
Група 3 (n = 10)	$1,40 \pm 0,21^{1,2}$	$0,004 \pm 0,001^2$
Група 4 (n = 10)	$1,19 \pm 0,04^{1,2}$	$0,0030 \pm 0,0004^2$
Група 5 (n = 10)	$1,42 \pm 0,27^{1,2}$	$0,003 \pm 0,001^2$

1: вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 1; 2: вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 2.

Таблиця 2. Показники щільності клітин і БМЯ головного мозку щурів з експериментальних груп, Me [Q1; Q3]

Експериментальна група	Щільність iNOS ⁺ -клітин, кл/мм ²	Щільність nNOS ⁺ -клітин, кл/мм ²
Група 1 (n = 10)	84 [40; 92]	159 [133; 186]
Група 2 (n = 10)	165 [138; 191] ¹	94 [66; 122] ¹
Група 3 (n = 10)	185 [145; 224] ¹	209 [170; 249] ²
Група 4 (n = 10)	158 [138; 191] ¹	148 [105; 192] ^{2,3}
Група 5 (n = 10)	171 [158; 224] ¹	343 [292; 396] ^{1,2,3,4}

1: вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 1; 2: вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 2; 3: вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 3; 4: вірогідні відмінності показників ($p_{st} < 0,05$) щодо групи 4.

**Рис. 3.** Скоригована загальна клітинна флуоресценція (CTCF) nNOS⁺-клітин БМЯ у щурів з експериментальних груп.

*: достовірні відмінності щодо групи 1 ($p_{st} < 0,05$).

цій у БМЯ. У тварин групи 2 порівняно з контролем (група 1) визначено збільшення щільності iNOS⁺-клітин (майже вдвічі) на фоні зниження щільності nNOS⁺-клітин на 41 %. У групах із нейропротекцією щільність iNOS⁺-нейронів залишалася високою – вона достовірно перевищувала рівні групи 1 і фактично не відрізнялась від значень позитивного контролю (групи 2). Проте щодо популяції nNOS⁺-клітин встановлено значне зростання їхньої щільності щодо групи 2 в усіх серіях із корекцією. У групі 5 (корекція HSF-1) цей показник навіть перевищив рівень контролю, а в групі 4 (корекція тіоцетамом)

зафіксовано найнижчу щільність nNOS⁺-клітин серед груп із нейропротекцією (табл. 2).

Беручи до уваги багатофакторність досліджених показників, для мінімізації розмірності даних і візуалізації структури вибірки застосовано метод PCA (principal component analysis). Це дало змогу інтегрально оцінити відмінності між групами та визначити ключові маркери, що мають найбільшу вагу в диференціації впливу колхіцину а також ранньої нейропротекції на стан системи NO в БМЯ експериментальних тварин.

4

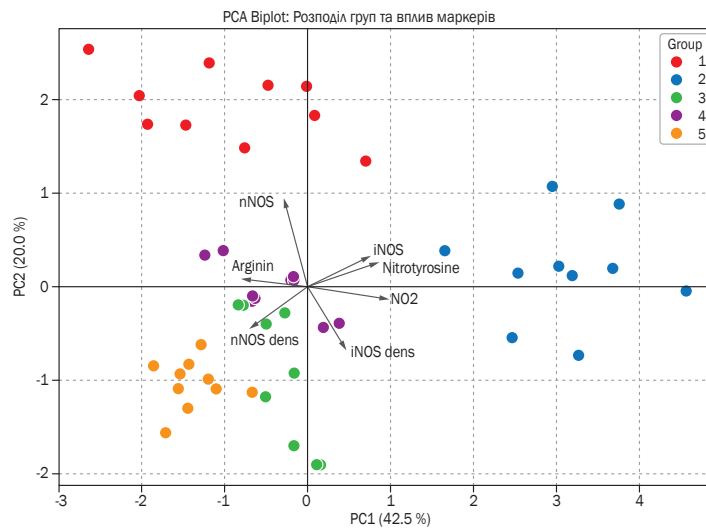


Рис. 4. Графік PCA системи NO в БМЯ експериментальних щурів.

Arginine: L-аргінин; **Nitrotyrosine:** нітротирозин; **nNOS dens:** щільність nNOS⁺-клітин; **iNOS dens:** щільність iNOS⁺-клітин; **nNOS:** клітинна флуоресценція до nNOS; **iNOS:** клітинна флуоресценція до iNOS.

Згідно з результатами аналізу, встановлено чітку класифікацію груп. Так, група негативного контролю характеризувалася низьким рівнем окисдативного стресу та високою експресією (СТСФ) nNOS. Група 2 (ІЦВ введення колхіцину) кардинально відрізнялася від інших високими показниками нітрозативного стресу (NO_x , нітротирозин) та експресії iNOS. Групи з нейропротекцією сформували окремий профіль, що характеризувався зниженням проявів нітрозативного стресу на фоні відновлення кількості (щільності) імунопозитивних до nNOS клітин у БМЯ. Зауважимо, що відновлення відбувалося переважно внаслідок збільшення кількості клітин, а не через зростання експресії ферменту в окремих нейронах (рис. 4).

Обговорення

У результаті дослідження встановлено специфіку та визначено вектор змін показників системи оксиду азоту і при ІЦВ введенні колхіцину, і на фоні ранньої патогенетично обґрунтованої нейропротекції.

Результати дослідження показали, що на 14 добу після ІЦВ введення колхіцин призводить до глибокої дестабілізації нітросидергічної системи в БМЯ. Основним патогенетичним вектором цих змін є різка активація iNOS на фоні пригнічення nNOS. Такий дисбаланс у системі оксиду азоту є універсальною ознакою нейродегенеративного каскаду, що підтверджено висновками дослідження, яке здійснили B. S. Burlaka et al. [18]. Зокрема, автори встановили зростання активності iNOS як ключового чинника вторинної альтерації за умов ішемічного ушкодження мозку. Крім того, у попередніх дослідженнях ми зафіксували неоднорідність розподілу показника площі iNOS⁺-клітин. На підставі цих даних дійшли висновку, що високий рівень експресії ензиму в БМЯ забезпечений залученням і гліального, і нейронального компонентів до його

утворення [19]. Загалом, асоціацію ІЦВ введення колхіцину з розвитком нітрозативного стресу та супутньою нейродеструкцією показано у низці досліджень і нині не викликає сумнівів [20,21].

Аналізуючи ефекти ранньої патогенетичної нейропротекції на систему NO в БМЯ, зазначимо, що застосовані фармакологічні агенти загалом неспецифічно вплинули на зниження вираженості нітрозативного стресу та відновлення клітинної популяції nNOS⁺-клітин. Проте, враховуючи мультифакторний вплив обраних нейропротекторів на розвиток нейрозапалення, вони можуть впливати на різні ланки цього процесу.

Так, виявлені результати дії цитиколіну відповідають даним, що зафіксували С. Mir et al. [22]. Зокрема, автори встановили: попередня інкубація нейронів із цим препаратом знижує їхню загибель від глутаматної ексайтотоксичності, що є критично важливим для збереження пулу L-аргінину. Здатність цитиколіну знижувати рівень нітрозативного стресу підтверджено також у праці S. M. Hamdy et al, які показали зниження вмісту прозапальних маркерів (IL-1 β , NF- κ B) і показників оксидативного стресу (малонового діальдегіду, продукцію NO) на фоні підвищення показників антиоксидантного захисту (відновлений глутатіон) на мишачій моделі хвороби Паркінсона, індукованої ротеноном [23]. Результати дослідження, яке здійснили O. Hurtado et al., пояснюють описані ефекти цього фармакологічного агента через здатність впливати на експресію сиртуїну-1 – білка, що регулює клітинне виживання через деацетилювання низки транскрипційних факторів, зокрема NF- κ B; це, своєю чергою, блокує експресію iNOS [24].

Встановлене у результаті дослідження зниження показників нітрозативного стресу у групі тіоцетаму корелює з даними фундаментальних досліджень (I. F. Belenichev et al.), де тіотріазолін (компонент тіоцетаму) показав виражену

здатність знижувати рівень нітритрози. Автори пов'язують механізм дії цього препарату з його антиоксидантними та антиішемічними властивостями, що дають йому змогу модулювати експресію мРНК ізоформ NOS і більш економно й функціонально використовувати L-аргінін, перешкоджаючи його неконтрольованому залученню в прозапальний синтез NO [25]. При цьому антиоксидантний ефект тіотріазоліну, що реалізується шляхом відновлення тіол-дисульфідної системи, асоціюється зі збільшенням вмісту білків теплового шоку (HSP-70) у тканинах мозку. Останні виконують функцію молекулярних шаперонів, забезпечуючи правильний фолдинг білків, стабілізацію мітохондріальних мембран та пряму взаємодію з системою NO, що сприяє збереженню функціональної активності nNOS [26].

Згідно з результатами нашого дослідження, у групі 5, тварини котрої як нейропротектор отримували HSF-1, визначено найбільшу щільність nNOS⁺-клітин. Це свідчить про те, що пряма дія цього фармакологічного агента, а саме нормалізація протеостазу через активацію синтезу HSF-70, може бути ефективною в захисті білкової структури ензиму та підтримки стабілізації цитоскелету [13]. Разом з тим модуляція синтезу цього протеїну в експериментах показала також вплив на експресію iNOS через пригнічення її основного транскрипційного фактора – NF-κB [15].

Висновки

1. Моделювання нейродегенерації шляхом введення колхіцину супроводжується достовірним дефіцитом L-аргінину в головному мозку експериментальних щурів порівняно з показниками контрольної групи. Відновлення рівня субстрату до значень контролю відбувається за умови корекції цитиколіном або HSF-1, а введення тіоцетаму залишає вміст L-аргінину нижчим за показники хібнооперованих тварин, проте статистично перевищує значення щурів із колхіцин-індукованим ушкодженням без нейропротекції.

2. Інтрацеребровентрикулярне введення колхіцину зумовлює значне зростання вмісту NO_x та 3-нітритрози в гомогенатах головного мозку, а рання патогенетично обґрунтована нейропротекція із застосуванням цитиколіну, тіоцетаму та HSF-1 протягом 14 діб забезпечує їхню повну нормалізацію.

3. Показник скоригованої сумарної клітинної флуоресценції (СТCF) iNOS-позитивних клітин у БМЯ у щурів з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину достовірно перевищує значення хібнооперованих тварин. Рання нейропротекція цитиколіном, тіоцетамом і HSF-1 протягом 14 діб запобігає їх патологічному підвищенню. Показник nNOS-позитивних клітин характеризується однаково низькими значеннями щодо контрольної групи і при модельованій нейродегенерації, і після нейропротекції.

4. Щільність iNOS-позитивних клітин БМЯ у щурів з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину достовірно більша порівняно з контролем. Фармакологічна корекція не вплинула на цей показник у БМЯ. Водночас відповідний параметр nNOS-позитивних клітин мінімальний у тварин із колхіцин-індукованою нейродегенерацією. Нейропротекція цитиколіном і тіоцетамом сприяє збереженню популяції

відповідних нейронів, а застосування HSF-1 зумовлює достовірне зростання їхньої кількості, навіть перевищуючи контроль. Саме розмір популяції nNOS-позитивних клітин, за результатами PCA аналізу, є ключовим у зниженні показників нітрозативного стресу у тварин з експериментальною нейропротекцією.

Декларація щодо використання ШІ

Під час підготовки статті використано такі інструменти штучного інтелекту: Google Gemini 3.5 Flash. Їх застосовано для мовного редагування та перекладу. Усі фрагменти, створені або опрацьовані з використанням ШІ, перевірені та відредаговані авторами, які несуть повну відповідальність за зміст статті.

Фінансування

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

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.

Відомості про авторів:

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

ORCID ID: 0000-0003-3413-945X

Усенко Д. Л., PhD, асистент каф. фізіології та аналітичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-7593-5482

Каплаушенко А. Г., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. фізіології та аналітичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-3704-5539

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

ORCID ID: 0000-0002-1556-5085

Information about the authors:

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

Usenko D. L., PhD, Assistant at the Department of Physical, Colloid and Analytical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Kaplaushenko A. H., PhD, DSc, Head of the Department of Physical, Colloid and Analytical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

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



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

References

- Zhu HY, Hong FF, Yang SL. The roles of nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the pathology of vascular dementia and related therapeutic approaches. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4540. doi: [10.3390/ijms22094540](#)
- Azargoonjahromi A. Dual role of nitric oxide in Alzheimer's disease. *Nitric Oxide*. 2023;134-135:23-37. doi: [10.1016/j.niox.2023.03.003](#)
- O'Connor JL, Fountos DM, Firouzan B, Azizi F, Ghasemi R, Kashfi K. The role of gasotransmitters in Parkinson's disease: Interplay of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide. *Neurotherapeutics*. 2025;22(6):e00710. doi: [10.1016/j.neurot.2025.e00710](#)
- Wang Y, Hong F, Yang S. Roles of nitric oxide in brain ischemia and reperfusion. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8):4243. doi: [10.3390/ijms23084243](#)
- Fesharaki-Zadeh A. Oxidative stress in traumatic brain injury. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13000. doi: [10.3390/ijms232113000](#)
- Jung P, Ha E, Zhang M, Fall C, Hwang M, Taylor E, et al. Neuroprotective role of nitric oxide inhalation and nitrite in a Neonatal Rat Model of Hypoxic-Ischemic Injury. *PLoS One*. 2022;17(5):e0268282. doi: [10.1371/journal.pone.0268282](#)
- Yamamoto K, Chen QY, Zhou Z, Kobayashi M, Zhuo M. Cortical nitric oxide required for presynaptic long-term potentiation in the insular cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2024;379(1906):20230475. doi: [10.1098/rstb.2023.0475](#)
- Soma S, Suematsu N, Sato AY, Tsunoda K, Bramian A, Reddy A, et al. Acetylcholine from the nucleus basalis magnocellularis facilitates the retrieval of well-established memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2021;183:107484. doi: [10.1016/j.nlm.2021.107484](#)
- Doulah A, Mahmoodi G, Pourmahdi Borujeni M. Evaluation of the pre-treatment effect of *Centella asiatica* medicinal plants on long-term potentiation (LTP) in rat model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2020;729:135026. doi: [10.1016/j.neulet.2020.135026](#)
- Danukalo MV, Kolesnyk YM. [Pathogenetic features of iNOS expression in the basal magnocellular nucleus of rats against the background of experimental neurodegeneration]. *Pathologia*. 2024;21(2):93-9. Ukrainian. doi: [10.14739/2310-1237.2024.2.303264](#)
- Danukalo MV, Kolesnyk YM, Hancheva OV. Contemporary comprehensive approaches to assessing the effectiveness of experimental model of neurodegenerative disorders with cognitive status changes. *Modern Medical Technology*. 2023;(4):51-8. doi: [10.34287/MMT.4\(59\).2023.7](#)
- 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](#)
- Kim JY, Barua S, Huang MY, Park J, Yenari MA, Lee JE. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy for Neuroprotection after Brain Injury. *Cells*. 2020;9(9):2020. doi: [10.3390/cells9092020](#)
- Qureshi I, Endres JR. Citicoline: a novel therapeutic agent with neuroprotective, neuromodulatory, and neuroregenerative properties. *Nat Med J*. 2010;2(6):11-25.
- Belenichev IF, Cherniy V, Nahorna E, Pavlov S, Cherniy T, Bukhtiyarova N, et al. *Nejroprotekcija i nejroplastichnost [Neuroprotection and neuroplasticity]*. Kyiv: Logos; 2015. 512 p.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier; 2006.
- Santa Cruz Biotechnology. Immunofluorescence Cell Staining Protocol [Internet]. [cited 2024]. Available from: <https://www.scbt.com/resources/protocols/immunofluorescence-cell-staining>
- Burlaka BS, Belenichev IF, Ryzhenko OI, Ryzhenko VP, Aliyeva OG, Makyeyeva LV, et al. The effect of intranasal administration of an IL-1b antagonist (RAIL) on the state of the nitroxydergic system of the brain during modeling of acute cerebrovascular accident. *Pharmacia*. 2021;68(3):665-70. doi: [10.3897/pharmacia.68.e71243](#)
- Danukalo MV, Kolesnyk YM. [The specificity of iNOS expression indicators in the basal magnocellular nucleus of rats under early pathogenetic correction in experimental neurodestruction]. *Zaporozhye Medical Journal*. 2024;26(5):379-86. Ukrainian. doi: [10.14739/2310-1210.2024.5.309732](#)
- Liang Y, Li S, Wen C, Zhang Y, Guo Q, Wang H, et al. Intrastriatal injection of colchicine induces striatonigral degeneration in mice. *J Neurochem*. 2008;106(4):1815-27. doi: [10.1111/j.1471-4159.2008.05526.x](#)
- Kumar A, Dogra S. Neuroprotective effect of Carvedilol, an adrenergic antagonist against colchicine induced cognitive impairment and oxidative damage in rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;92(1):25-31. doi: [10.1016/j.pbb.2008.10.005](#)
- Mir C, Clotet J, Aledo R, Durany N, Argemí J, Lozano R, et al. CDP-choline prevents glutamate-mediated cell death in cerebellar granule neurons. *J Mol Neurosci*. 2003;20(1):53-9. doi: [10.1385/JMN:20:1:53](#)
- Hamdy SM, Elsayed NA, Youness ER, Elesh H, Abdel-Salam OM. Effect of cytidine-5'-diphosphocholine alone, caffeine or their combination on oxidative stress and inflammatory response in an experimentally-induced Parkinson's disease. *J Complement Integr Med*. 2025;22(3):479-89. doi: [10.1515/jcim-2024-0447](#)
- Hurtado O, Hernández-Jiménez M, Zaruk JG, Cuartero MI, Ballesteros I, Camarero G, et al. Citicoline (CDP-choline) increases Sirtuin1 expression concomitant to neuroprotection in experimental stroke. *J Neurochem*. 2013;126(6):819-26. doi: [10.1111/jnc.12269](#)
- Belenichev IF, Aliyeva OG, Kamyshnyi AM. Long-term results of pharmacological correction of iNOS, eNOS, nNOS mRNA expression disorders in rat hippocampus after chronic prenatal hypoxia. *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine*. 2019;3(2):6-15. doi: [10.29256/v.03.02.2019.escbm02](#)
- Belenichev IF, Gorbacheva SV, Bukhtiyarova NV, Levich SV. Dynamics of changes in the concentration of heat shock protein (HSP70) in the cerebral cortex and hippocampus in experimental violation of cerebral circulation: the ability to regulate this process through positive modulation of thiol-disulfide system. *Biological Markers and Guided Therapy*. 2016;3(1):107-14. doi: [10.12988/bmgt.2016.6311](#)