

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

ЛУК'ЯНОВА ЄВГЕНІЯ МИХАЙЛІВНА

УДК: 616.894-091.8-092.9-08(043.3)

**ДИСЕРТАЦІЯ**

«РОЛЬ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ В МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ  
СКОПОЛАМІН- ТА НІТРИТ-ІНДУКОВАНОЇ ДЕМЕНЦІЇ  
АЛЬЦГЕЙМЕРІВСЬКОГО ТИПУ У ЩУРІВ»

за спеціальністю 222 «Медицина»,  
спеціалізація «Патологічна фізіологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Лук'янова Є.М.

Науковий керівник: Павлова Олена Олексіївна, доктор медичних наук, професор.

Харків – 2022

## АНОТАЦІЯ

*Лук'янова Є.М.* Роль ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку скополамін- та нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу у щурів. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина», спеціалізація «Патологічна фізіологія». – Харківський національний медичний університет, Харків, 2022.

Дисертаційна робота присвячена ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу (хвороби Альцгеймера), викликаної різними експериментальними шляхами у щурів, та можливості внутрішньовенного застосування мезенхімальних стовбурових клітин щодо корекції цього патологічного стану.

За результатами статистики Alzheimer's Disease International у 2019 році у світі налічується близько 50 млн осіб з деменцією, з них – 62% людей із хворобою Альцгеймера (ХА), 17% – з судинною деменцією, 10% – з ХА та судинною деменцією та ін. [1]. Нейродегенеративні захворювання разом із хворобами серцево-судинної системи та онкологічними захворюваннями є лідируючими серед причин інвалідизації та смертності серед людей похилого віку в різних країнах, у тому числі й України. Незважаючи на численні дослідження етіопатогенезу ХА та способів впливу на механізми прогресування хвороби, увага багатьох дослідників зосереджена на вивченні взаємозв'язку між нейропатією та васкулопатією головного мозку (ГМ).

Цереброваскулярна дисфункція, хронічна ішемія та гіпоксія відіграють важливу роль в формуванні амілоїду та розвитку когнітивних порушень [127]. Можливо, нейродегенерація без попереднього порушення функції ендотелія у пацієнтів з ХА не зустрічається [226]. Існуючі в даний час стратегії терапевтичного впливу при прогресуючих нейродегенеративних захворюваннях включають препарати різних фармакологічних груп, які в більшості випадків не спроможні зупинити прогресування процесу ушкодження мозку. Тому пошук нових шляхів

корекції даної патології, спрямованих на відновлення нервових клітин і нейронних зв'язків є актуальним. Враховуючи вищезазначене, визначення ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку ХА та шляхів її корекції за допомогою стовбурових клітин є важливим для запобігання прогресування процесів нейродегенерації головного мозку.

Метою дослідження було вивчення ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку скополамін- та нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу у щурів та визначення доцільності та ефективності застосування мезенхімальних стовбурових клітин щодо її корекції.

Дослідження було проведено за участю 80 статевозрілих щурів-самців популяції WAG масою 180-230 гр. Усі тварини були розміщені в стандартних умовах виварію Харківського національного медичного університету.

Відповідно до поставленої мети було використано дві нетрансгенні моделі деменції альцгеймерівського типу: 14-денна та 28-денна скополамін-індукована (холінодефіцитна) та нітрит-індукована (судинного походження). Тварини були розподілені на 10 груп, де половина з них отримувала мезенхімальні стовбурові клітини:

дві групи контролю (гр. С) отримували внутрішньоочеревинні ін'єкції 0,5мл 0,9% водного розчину натрію хлориду (NaCl) щодня протягом 14 (С=14, n=8) та 28 (С-28, n=8) днів;

чотири групи щурів зі скополамін-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу отримували внутрішньоочеревинні ін'єкції водного розчину скополаміну бутілброміду (Scop) в дозі 1 мг/кг щодня протягом 14 та 28 днів:

- Scop-14 (n=8) та Scop-28 (n=8);
- Scop-14-MSС (n=8) та Scop-28-MSС (n=8) – отримували одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин (MSС) у дозі 500 тис. клітин на одного щура після останнього дня ін'єкцій Scop;

чотири групи щурів з нітрит-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу отримували внутрішньоочеревинні ін'єкції водного розчину нітриту натрію (Nitr) в дозі 50 мг/кг щодня протягом 14 та 28 днів:

- Nitr-14 (n=8) та Nitr-28 (n=8);
- Nitr-14-MSc (n=8) та Nitr-28-MSc (n=8) – отримували одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин (MSc) у дозі 500 тис. клітин на одного щура після останнього дня ін'єкцій Nitr.

Виведення тварин з експерименту відбувалося через 14 днів «періоду регенерації» після останнього дня ін'єкцій Scop/Nitr/NaCl або MSc шляхом миттєвої декапітації, щоб оцінити одночасно ступінь ушкодження і регенераторні можливості судин і нервової тканини ГМ у щурів.

Для досягнення мети за допомогою патофізіологічних, морфологічних, імуногістохімічних, біохімічних, аналітико-статистичних методів оцінювали поведінкові реакції та когнітивні функції щурів в різні фази експерименту, морфофункціональний стан ендотелію судин, нейропіля великих півкуль головного мозку, стан холінергічної та прооксидантно-антиоксидантної системи, енергетичного метаболізму, ступінь гіпоксії та процеси проліферації клітин головного мозку у щурів зі скополамін- та нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу без корекції та на тлі застосування MSc.

Дані дослідження свідчать про те, що тривале введення нітриту натрію та скополаміну бутилброміду веде до розвитку деменції альцгеймерівського типу. При цьому когнітивні та поведінкові зміни у тварин спостерігаються починаючи з 14-денної моделі захворювання та прогресують із двократним збільшенням тривалості ушкоджуючої дії речовин на тканину ГМ. Цікаво, що в обох моделях із різними механізмами розвитку когнітивного дефіциту формується амілоїд як субендотеліально, так і в тканині ГМ. Досліджувана нами роль ендотеліальної дисфункції у механізмах розвитку хвороби Альцгеймера та формуванні амілоїду була розглянута з різних сторін.

Холінодефіцит, викликаний тривалим введенням скополаміну бутилброміду, сприяє активації патологічного розпаду APP-білка, розвитку окислювального



стресу в нейропілі та судинах ГМ, що спричиняє порушення функцій мітохондрій, розвиток гіпоксії та розвиток ендотеліальної дисфункції. Дані патологічні процеси супроводжуються зниженням функції нейропіля, його атрофією, формуванням амілоїдних скупчень у нейропілі та артеріях, збільшенням проникності гематоенцефалічного бар'єра, особливо після 28 днів введення скополаміну бутилброміду. Усе це підтверджувалося розвитком когнітивного дефіциту та порушенням поведінкових реакцій. Цікаво відзначити, що введення скополаміну протягом 14 днів не сприяло розвитку холінодефіциту, проте навіть через 14 днів періоду регенерації спостерігалися початкові ознаки окислювального стресу та ендотеліальної дисфункції, зниження кількості ендотеліоцитів та зміцнення стінок капілярів перицитами, зниження оптичної щільності ендотеліоцитів, підвищення рівня 2,3-дифосфогліцерату в еритроцитах крові, різке зниження рівня кардіоліпіну в гомогенатах головного мозку і, як наслідок, мітохондріальна дисфункція. Це відобразилось на розвитку дисбалансу в прооксидантно-антиоксидантній системі, ушкодженні судин зі збільшенням їх проникності, розвитком і прогресуванням гіпоксії, нейродегенеративних процесів і формуванням амілоїду в тканині ГМ. У той час, як деменція альцгеймерівського типу через 28 днів введення скополаміну бутилброміду починається з вираженого холінодефіциту, який спричиняє утворення множинних скупчень амілоїду в нейропілі та судинах з паралельним розвитком у них вираженого окислювального стресу, гіпоксії, дисфункції ендотелію та атрофії нейропіля. Тому роль ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку скополамін-індукованої деменції альцгеймерівського типу - вторинна, і є наслідком або мітохондріальної дисфункції та окислювального стресу через 14 днів введення скополаміну бутилброміду, або розвивається внаслідок холінодефіциту через 28 днів.

У щурів з нітрит-індукованою деменцією розвиток ендотеліальної дисфункції та ушкодження стінки судин мікроциркуляторного русла зі збільшенням проникності гематоенцефалічного бар'єра у комплексі з метгемоглобінемією ініціювали розвиток гіпоксії та міграцію плазматичних білків, що беруть участь в утворенні амілоїду, в тканину ГМ. Адже на відміну від

скополамінової моделі вже через 14 днів введення нітриту натрію субендотеліально були виявлені яскраві скупчення конгофільних мас. Також візуально при мікроскопії, у порівнянні зі скополаміновою моделлю, у щурів з нітритною моделлю деменції зустрічалися частіше обтуруючі та парієтальні тромби, інфільтрація стінок макрофагами та лімфоцитами, що підтверджувалося більш вищими значеннями фактора фон Віллебранда та ендотеліну-1. До того ж, виражена гіпоксія ГМ негативно позначалася на функції мітохондрій та процесах перекисного окиснення ліпідів, і спричинила розвиток енергодефіциту, мітохондріальної дисфункції та окислювального стресу, що разом вплинули на рівень ацетилхоліну в тканині ГМ, синаптичну пластичність, окислювальну модифікацію білків нейропіля та формування амілоїду в тканині ГМ та гомогенізацію нейропіля з розвитком когнітивного дефіциту.

Незважаючи на роль ушкодженого ендотелію судин в утворенні амілоїду і розвитку деменції альцгеймерівського типу, регенерація судин відбувалася як за рахунок перицитів за типом субституції самостійно, так і за рахунок молодих ендотеліоцитів зі зниженим вмістом ядерної ДНК, за типом реституції після внутрішньовенного введення мезенхімальних стовбурових клітин. При цьому у щурів гр. Scorp-14-MS, Scorp-28-MS та Nitr-14-MS регенерація капілярів відбувалася за рахунок нових ендотеліоцитів, де судинна стінка була ушкоджена, але не настільки, як у щурів після 28 днів введення нітриту натрію. Тому можна припустити, що тут відбувалася «подвійна» регенерація: «внутрішня» за рахунок неушкоджених ендотеліоцитів капілярів і «зовнішня» за рахунок мезенхімальних стовбурових клітин, які диференціювалися в ендотеліоцити. У ситуації, де ушкодження судин було більш сильним, а саме у щурів із 28-денною нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу, введені з зовні стовбурові клітини запустили процеси регенерації судин мікроциркуляторного русла, які не закінчились і після 14 днів періоду «регенерації». Процеси відновлення капілярів супроводжувалися покращенням функції ендотелію шляхом нормалізації балансу між вазоконстрикторами та вазодилататорами, зменшенням запалення у судинах та ризику тромбоутворення, відновленні мітохондріальної функції, що відобразилось

і на виробленні АТФ. Однак ушкоджена внутрішня мембрана мітохондрій, де міститься кардіоліпін, після введення MSC все ж повністю не відновилася у щурів обох моделей, можливо з цим і пов'язано неповне відновлення функції нейронів. Функціональний стан нейропіля був покращений не тільки за рахунок покращення енергетичного метаболізму, поліпшення стану капілярної сітки, але й за рахунок зменшення гіпоксії, окислювального стресу, що відобразилось на збільшенні вмісту ацетилхоліну в гомогенатах ГМ, оптичної щільності нейропіля великих півкуль ГМ та покращенні когнітивних функцій щурів.

Отже, у щурів із обома моделями деменції альцгеймерівського типу розвинувся амілоїдоз тканини головного мозку та порушення когнітивних функцій. Роль ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу у щурів із скополамін-індукованою моделлю - вторинна, не дивлячись на те, що ушкодження судин може виникати ще до розвитку холінодефіциту, а в нітрит-індукованій моделі – первинна. Внутрішньовенне одноразове введення мезенхімальних стовбурових клітин щурам з деменцією альцгеймерівського типу показало доцільність і ефективність їх використання на різних етапах експерименту.

Ключові слова: деменція альцгеймерівського типу, скополамін, нітрит, гіпоксія, ендотелій судин, ендотеліальна дисфункція, головний мозок, мітохондрії, ацетилхолін, окисний (окислювальний) стрес, антиоксидантна система, мезенхімальні стовбурові клітини, щури, поведінкові реакції, когнітивна дисфункція.

## SUMMARY

Lukyanova Y.M. The role of endothelial dysfunction in the mechanisms of development of scopolamine- and nitrite-induced Alzheimer's type dementia in rats. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The thesis on competition of a scientific degree of the doctor of philosophy on a specialty 222 «Medicine», specialization "Pathological physiology". - Kharkiv National Medical University, Kharkiv, 2022.

The thesis is devoted to the role of endothelial dysfunction in the mechanisms of development of Alzheimer's dementia (Alzheimer's disease) caused by various experimental pathways in rats, and the possibility of intravenous mesenchymal stem cells to correct this pathological condition.

According to statistics from Alzheimer's Disease International in 2019, there are about 50 million people with dementia in the world, of which 62% are people with Alzheimer's disease (AD), 17% - with vascular dementia, 10% - with AD and vascular dementia and others [1]. Neurodegenerative diseases, together with cardiovascular diseases and oncological diseases, are the leading causes of disability and mortality among the elderly in various countries, including Ukraine. Despite numerous studies of the etiopathogenesis of AD and ways of influencing the mechanisms of disease progression, the attention of many researchers is focused on the study of the relationship between neuropathy and vasculopathy of the brain.

Thus, many authors believe that a mandatory stage in the accumulation of amyloid and the formation of cognitive impairment is cerebrovascular dysfunction, accompanied by the development of chronic ischemia and hypoxia [127]. It is possible that neurodegeneration without prior endothelial dysfunction in patients with AD does not occur [226]. Existing therapeutic strategies for progressive neurodegenerative diseases include drugs of different pharmacological groups, which in most cases are not able to stop the progression of brain damage. Therefore, the search for new ways to correct this pathology, aimed at restoring nerve cells and neural connections is relevant. Given the above, determining the role of endothelial dysfunction in the mechanisms of AD

development and ways of its correction with the help of stem cells is important to prevent the progression of neurodegeneration of the brain.

The aim of work was to study the role of endothelial dysfunction in the mechanisms of development of scopolamine- and nitrite-induced Alzheimer's dementia in rats and to determine the feasibility and effectiveness of mesenchymal stem cells for its correction.

The study involved 80 mature male WAG rats weighing 180-230 g. All animals were housed in standard vivarium conditions of Kharkiv National Medical University.

According to this goal, two non-transgenic models of Alzheimer's dementia were used: 14- and 28-day scopolamine-induced (cholinodeficiency) and nitrite-induced (vascular), where animals were divided into 10 groups and half of them received mesenchymal stem cells:

two control groups (group C) were received intraperitoneal injections 0.5 ml of 0.9% aqueous sodium chloride solution (NaCl) daily during 14 (C-14, n = 8) and 28 (C-28, n = 8) days;

four groups of rats with scopolamine-induced model of Alzheimer's dementia were received intraperitoneal injections of an aqueous solution of scopolamine butylbromide (Scop) at a dose of 1 mg/kg daily during 14 and 28 days:

- Scop-14 (n = 8) and Scop-28 (n = 8);

- Scop-14-MSc (n = 8) and Scop-28-MSc (n = 8) – were received a single intravenous injection of mesenchymal stem cells (MSc) after the last day of injection of Scop at a dose of 500000 cells per rat;

four groups of rats with a nitrite-induced model of Alzheimer's dementia were received intraperitoneal injections of an aqueous solution of sodium nitrite (Nitr) at a dose of 50 mg/kg daily during 14 and 28 days:

- Nitr-14 (n = 8) and Nitr-28 (n = 8);

- Nitr-14-MSc (n=8) and Nitr-28-MSc (n=8) – were received a single intravenous injection of mesenchymal stem cells (MSc) after the last day of injections of Nitr at a dose of 500000 cells per rat.

Animals were removed from the experiment 14 days after the "regeneration period" after the last day of Scop/Nitr/NaCl or MSc injections by instantaneous decapitation to

assess both the degree of damage and the regenerative capacity of brain vessels and nerve tissue in rats.

To achieve this goal using pathophysiological, morphological, immunohistochemical, biochemical, analytical and statistical methods the behavioral responses and cognitive functions of rats in different periods of the experiment, morphofunctional state of vascular endothelium, cerebral hemisphere neuropile, the state of the cholinergic and prooxidant-antioxidant system, energy metabolism, the level of hypoxia and the proliferation of brain cells without and against the background of MSC administration were evaluated in rats after prolonged exposure to scopolamine butyl bromide and aqueous sodium nitrite solution.

These studies suggest that long-term administration of sodium nitrite and scopolamine butylbromide leads to the development of Alzheimer's dementia. At the same time, cognitive and behavioral changes are already observed in animals with 14-day models of the disease and progress with a twofold increase in the duration of the damaging effect of substances on brain tissue. Interestingly, in both models with different mechanisms of cognitive deficits, amyloid is formed both subendothelially and in brain tissue. The study of the role of vascular damage in the mechanisms of Alzheimer's disease and amyloid formation has been studied from different aspects.

Cholinodeficiency caused by long-term administration of scopolamine butylbromide promotes the activation of pathological degradation of APP protein, the development of oxidative stress in neuropil and GM vessels, causing mitochondrial dysfunction, hypoxia and endothelial dysfunction. These pathological processes are accompanied by a decrease in neuropil function, its atrophy, the formation of amyloid clusters in neuropil and arteries, increased permeability of the blood-brain barrier, especially after 28 days of scopolamine butylbromide. All this was confirmed by the development of cognitive deficits and behavioral disorders. It is interesting to note that 14 days of scopolamine administration did not contribute to the development of cholinodeficiency, but there were already initial signs of oxidative stress and endothelial dysfunction, decreased endothelial cells and capillary wall strengthening with pericytes, decreased endothelial cell density, decreased 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes,

sharp decrease in cardiolipin in brain homogenates and, as a consequence, mitochondrial dysfunction. This was reflected in the development of imbalance in the prooxidant-antioxidant system, damage to blood vessels with increasing their permeability with the subsequent development of hypoxia, neurodegenerative processes and the formation of amyloid in brain tissue. While Alzheimer's dementia after 28 days of scopolamine butylbromide administration begins with severe cholinodeficiency, which causes the formation of multiple accumulations of amyloid in the neuropil and vessels with the parallel development of severe oxidative stress, hypoxia, endothelial dysfunction and neuropil atrophy. Therefore, the role of endothelial dysfunction in the mechanisms of development of scopolamine-induced dementia of Alzheimer's type is secondary, and is a consequence of either mitochondrial dysfunction and oxidative stress after 14 days of scopolamine butylbromide, or develops due to cholinodeficiency after 28 days.

In rats with nitrite-induced dementia, the development of endothelial dysfunction and damage to the vascular wall of the microcirculatory tract with increasing permeability of the blood-brain barrier in combination with methemoglobinemia initiated the development of hypoxia and migration of plasma proteins in the brain tissue. Also visually, under microscopy, compared with scopolamine model, in rats with nitrite model dementia there are more common obturating and parietal blood clots, wall infiltration by macrophages and lymphocytes, as evidenced by higher values of von Willebrand factor and endothelin-1. In addition, severe hypoxia of brain adversely affected mitochondrial function and lipid peroxidation, leading to energy deficiency, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, which together affected the level of acetylcholine in brain tissue, synaptic plasticity, oxidative modification of neuropil proteins, formation of amyloid in brain tissue and homogenization of neuropil with the development of cognitive deficits.

Despite the different roles of damaged vascular endothelium in amyloid formation and the development of Alzheimer's dementia, vascular regeneration occurred both at the expense of pericytes by the type of substitution alone and by young endothelial cells with low nuclear DNA content by the type of restitution after intravenous mesenchymal stem cells injection. Thus at rats gr. Scop-14-MSC, Scop-28-MSC and Nitr-14-MSC capillary regeneration was due to new endothelial cells, where the vascular wall was damaged, but

not as much as in rats after 28 days of sodium nitrite. In this case, we can assume that there was a "double" regeneration: "internal" due to intact capillary endothelial cells and "external" due to mesenchymal stem cells, which differentiated into endotheliocytes. In a situation where vascular damage was more severe, namely in rats with 28-day nitrite-induced Alzheimer's dementia, stem cells started the regeneration of microcirculatory vessels, which did not end after 14 days of the "regeneration" period. All these processes of capillary recovery were accompanied by improved endothelial function by normalizing the balance between vasoconstrictors and vasodilators, reducing vascular inflammation, risk of thrombosis, mitochondrial function, which was reflected in the restoration of ATP production. However, the damaged inner membrane of mitochondria, which contains cardiolipin, after the introduction of MSC still did not fully recover in rats of two models, possibly due to incomplete recovery of neuronal function. Also, the functional state of the neuropil was improved not only by improving energy metabolism, improving the state of the capillary network, but also by reducing hypoxia, oxidative stress, which was reflected in increased acetylcholine in brain homogenates, optical density of large hemispheres and improved cognitive function.

Thus, rats with two models of Alzheimer's dementia developed amyloidosis of brain tissue and cognitive impairment. The role of endothelial dysfunction in the mechanisms of development of Alzheimer's dementia in rats in the scopolamine-induced model is secondary, despite the fact that vascular damage may occur before the development of cholinodeficiency, and in the nitrite-induced model - primary. Intravenous single administration of mesenchymal stem cells to rats with Alzheimer's dementia showed the feasibility and effectiveness of use in different periods of the experiment.

Key words: Alzheimer's type dementia, scopolamine, nitrite, hypoxia, vascular endothelium, endothelial dysfunction, brain, mitochondria, acetylcholine, oxidative stress, antioxidant system, mesenchymal stem cells, rats, behavioral reactions, cognitive dysfunction.



## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Лук'янова ЄМ. Вплив хронічного нітритного навантаження на морфофункціональний стан головного мозку щурів. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019;4(22):52-9. Доступно: <https://jmbs.com.ua/archive/4/6/52> DOI: 10.26693/jmbs04.06.052.

2. Lukyanova Y, Nikolaeva O, Pavlova O, Vasyleva I, Naglov O, Shchegelskaya E, Omelchenko E. Behavioral reactions and cognitive functions in rats with vascular model of Alzheimer's type dementia at different stages of disease before and after stem cell correction. *Inter Collegas*. 2020;7(3):118-124. Available from: <https://inter.knmu.edu.ua/article/view/338> DOI: 10.35339/ic.7.3.118-124.

3. Губіна-Вакулік ГІ, Павлова ОА, Зоренко ЄМ. Гістологічні аспекти при моделюванні деменції альцгеймерівського типу судинного походження та прояви подальшої клітинної регенерації тканини головного мозку у щурів. *Morphologia*. 2020;14(3):29–35. Доступно: <http://morphology.dma.dp.ua/article/view/219460> DOI: 10.26641/1997-9665.2020.3.29-35.

4. Зоренко ЄМ, Павлова ОО, Горбач ТВ, Мартинова СМ. Роль гіпоксії та мітохондріальної дисфункції в механізмах розвитку експериментальної деменції альцгеймерівського типу різного генезу у щурів, оцінка можливості корекції даного стану мезенхімальними стовбуровими клітинами. *Вісник проблем біології і медицини*. 2021;1(159):66-72. Доступно: [https://vpbm.com.ua/ua/vyipusk-1-\(159\),-2021/14506](https://vpbm.com.ua/ua/vyipusk-1-(159),-2021/14506) DOI: 10.29254/2077-4214-2021-1-159-66-72.

5. Губіна-Вакулік ГІ, Зоренко ЄМ. Роль судинного пошкодження в умовах холінодефіциту у щурів при моделюванні скополамін-індукованої деменції альцгеймерівського типу. *Morphologia*. 2021;15(3):66-75. Доступно: <http://morphology.dma.dp.ua/article/view/248548> DOI: 10.26641/1997-9665.2021.3.66-75.

6. Zorenko Y, Gubina-Vakulyck G, Pavlova O, Gorbach T, Shchegelskaya E, Omelchenko E. Dynamics of indicators of the endothelium morphofunctional state of the brain microcirculatory bed vessels in rats with nitrite-induced Alzheimer's type dementia on the background of mesenchymal stem cell administration. Med. čas. 2021;55(1):18-26. Available from: <https://scindeks.ceon.rs/Article.aspx?artid=0350-12212101018Z> DOI: 10.5937/mckg55-31775.

7. Zorenko Y, Pavlova O, Shchegelskaya E, Omelchenko E, Gorbach T, Vasylyeva I. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Scopolamine-Induced Dementia Of Alzheimer's Type. Teikyo Medical Journal. 2021;44 (3):793-805. Available from: <https://www.teikyomedicaljournal.com/article/mesenchymal-stem-cells-ameliorate-scopolamine-induced-dementia-of-alzheimers-type>.

**Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:**

8. Ніколаєва ОВ, Павлова ОО, Лук'янова ЄМ, Губіна-Вакулік ГІ, Горбач ТВ; Харківський національний медичний університет, патентовласник. Спосіб моделювання деменції альцгеймерівського типу судинного походження у щурів. Патент України № 141759. 2020 Квіт 27.

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

9. Лук'янова ЄМ, Павлова ОО. Можливість розвитку енцефалопатії у щурів з гемічною гіпоксією. В: Бойчук ТМ, редактор. Збірник матеріалів Буковинського міжнародного медико-фармацевтичного конгресу студентів і молодих учених, ВІМСО; 2019 Квіт 2-5 квітня; Чернівці. Чернівці: СНТ БДМУ; 2019, с.295.

10. Lukyanova Y, Pavlova O. Nitrite-Induced Changes Of Endothelium Functional State And Cognitive Brain Functions In Rats. In: Marcin Gruchala, editor. Book of abstracts of 25th International Student Scientific Conference; 2019 April 12-13; Gdansk. Medical University of Gdansk; 2019, p.8.

11. Lukyanova Y, Pavlova O. Probability Of Encephalopathy Developing In Rats With Hemic Hypoxia. In: Mateusz Zajac, editor. Abstract Book of 19th International

Congress Of Young Medical Scientists. 2019 May 30th – June 1st; Poznan. Poznan University of Medical Sciences; 2019, p.172.

12. Лук'янова ЄМ, Павлова ОО. Зміни поведінкових реакцій у щурів з експериментальною скополамін-індукованою та судинною нейродегенерацією. В: Гоженко АІ, редактор. Тези доповідей VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю. 2020 Трав 13-15; Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту; 2020, Т.1., с.131-132.

13. Зоренко ЄМ, Павлова ОО. Проліферативні процеси в головного мозку щурів з різними експериментальними моделями деменції. Збірник наукових праць Всеукраїнської науково-практичної конференції (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна). Перші читання, присвячені Д. О. Альперну: «Актуальні питання патологічної фізіології». 2021 Бер 26; Харків. Х: ХНМУ; 2021, с. 46.

14. Зоренко ЄМ, Горбач ТВ. Порівняльний аналіз окремих ланок патогенезу експериментальної деменції альцгеймерівського типу в умовах двох моделей. В: Корда ММ, редактор. Матеріали XXV Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених. 2021 Квіт 12-14; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2021, с.281-282.

15. Зоренко ЕМ, Губина-Вакулик ГИ. Роль микроглии в морфогенезе болезни Альцгеймера. В: Кучин ЮЛ, редактор. Ukrainian scientific medical youth journal. Міжнародна науково-практична онлайн-конференція «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку». 2021 Квіт 22-23; Україна. Київ: Національний медичний університет імені О.О.Богомольця; 2021, 2 (123), с. 19.

16. Lukyanova Y. Functional state of the brain endothelium and energy metabolism in rats with dementia of the Alzheimer's type induced by different ways. In: Zaharinoва Stela, editor. Abstract book of XIX International Congress Of Medical Sciences For Students And Young Doctors. 2021 May 13-16; Sofia. Sofia; 2021, p. 65.

17. Zorenko Y, Gubina-Vakyulyk G. Assessment of the endotheliocytes to pericytes ratio in the brain capillary wall in rats with experimental dementia. In: Johannes

A. Hainfellner, editor. Abstracts of 12th European Congress of Neuropathology. 2021 May 31 – June 3; Copenhagen. *Clinical Neuropathology*. 2021; 40 (4/2021): S19.

18. Зоренко ЄМ, Павлова ОО. Участь мезенхімальних стовбурових клітин в процесах відновлення морфофункціонального стану нейропіля білої речовини великих півкуль головного мозку щурів з деменцією альцгеймерівського типу судинного походження. В: Гоженко АІ, редактор. Тези доповідей VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України. 2021 Жовт 6-8; Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту; 2021, Т.2., с.91-93.

19. Zorenko Y, Singh Rhea. Staining with bromophenol blue as method for studying the neuropil protein of cerebral hemispheres in rats with experimental Alzheimer's type dementia. In: Kapustnyk V.A., editor. Abstract book of International Scientific Interdisciplinary Conference, ISIC. 2021 Oct 20-21; Kharkiv. Kharkiv: KhNMU; 2021, p. 34-35.

20. Зоренко ЄМ, Павлова ОО. Особливості міграції мезенхімальних стовбурових клітин у щурів з експериментальною деменцією альцгеймерівського типу різного походження. В: Котвіцька АА, редактор. Тези доповідей IV Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнародною участю. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція. 2021 Лист 18 ; Харків. Х.: Вид-во НФаУ; 2021, с.116.

21. Лук'янова Є.М. Амілоїдоз головного мозку судинного генезу в експериментальних умовах. В: Капустник ВА, редактор. Збірник тез міжвузівської конференції Фестивалю молодіжної науки "Медицина третього тисячоліття". 2022 Січ 24-26; Харків. Х: ХНМУ; 2022, с. 48-50.

22. Lukyanova Y, Pavlova O, Gubina-Vakulyck G. The morphofunctional state of cerebral hemispheres neuropil in rats with scopolamine-induced dementia of Alzheimer's type after mesenchymal stem cells intravenous injections. *Medicina (Kaunas)* 2022;58(Supplement 1):206.

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА.....	13
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	21
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	
1.1 Сучасні уяви про хворобу Альцгеймера.....	30
1.2 Етіологічні фактори ризику та основні ланки патогенезу хвороби Альцгеймера.....	34
1.2.1 Теорія «амілоїдного каскаду» та «амілоїдної дисфункції».....	36
1.2.2 Гіпотеза таупатії.....	38
1.2.3 Дисфункція нейротрансмісії та холінергічна гіпотеза.....	39
1.2.4 Гіпотеза мітохондріального каскаду та окислювального стресу.....	41
1.2.5 Гіпотеза нейрозапалення та дисфункції мікроглії.....	42
1.2.6 Судинна гіпотеза.....	44
1.3 Основні групи експериментальних моделей деменції альцгеймерівського типу.....	46
1.4 Місце мезенхімальних стовбурових клітин в корекції патологічних процесів при хворобі Альцгеймера та механізми реалізації їх терапевтичних ефектів.....	50
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ</b>	
2.1 Опис моделей деменції альцгеймерівського типу.....	55
2.2 Методи оцінювання поведінкових реакцій та когнітивних функцій у щурів з експериментальною моделлю деменції альцгеймерівського типу.....	59
2.3 Біохімічні методи аналізу крові та гомогенатів головного мозку щурів.....	61
2.4 Гістологічні та імуногістохімічні методи дослідження структури тканини головного мозку.....	64
2.5 Отримання мезенхімальних стовбурових клітин з червоного кісткового мозку та оцінювання їх міграції.....	66
2.6 Статистичний аналіз отриманих результатів.....	68

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. СКОПОЛАМІН-ІНДУКОВАНА МОДЕЛЬ ДЕМЕНЦІЇ АЛЬЦГЕЙМЕРІВСЬКОГО ТИПУ

3.1 Поведінкові реакції та когнітивні функції у щурів групи контролю та зі скополоаміновою моделлю.....70

3.2 Біохімічні параметри функції ендотелію судин, прооксидантно-антиоксидантної системи, енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну в тканині головного мозку у щурів.....74

3.3 Морфофункціональні зміни в тканині головного мозку у щурів.....78

### РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. НІТРИТ-ІНДУКОВАНА МОДЕЛЬ ДЕМЕНЦІЇ АЛЬЦГЕЙМЕРІВСЬКОГО ТИПУ

4.1 Поведінкові реакції та когнітивні функції у щурів.....93

4.2 Біохімічні параметри функції ендотелію судин, прооксидантно-антиоксидантної системи, енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну в тканині головного мозку у щурів.....96

4.3 Морфофункціональні зміни в тканині головного мозку у щурів.....101

### РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

ДОСЛІДЖЕННЯ.....117

ВИСНОВКИ.....160

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....165

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....167

ДОДАТОК А.....203

ДОДАТОК Б.....209

ДОДАТОК В.....218

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- APOE - аполіпопротеїн E  
 APP - білок-попередник амілоїду  
 A $\beta$  – бета-амілоїд  
 BACE-1 – бета-секретаза  
 BAD – бета-амілоїдна дисфункція  
 D – оптична щільність  
 eNOS – ендотеліальна синтаза оксиду азоту  
 GWAS - повногеномний пошук асоціацій  
 Ki-67 – маркер клітинної проліферації  
 MART - тау-білок  
 MCI - легкі когнітивні порушення  
 MSC – мезенхімальні стовбурові клітини  
 NFT - нейрофібрилярні клубки  
 Nitr – нітрит натрію  
 Nitr-14, Nitr-28 – нітрит натрію, введений впродовж 14 днів та 28 днів відповідно  
 Nitr-14-MS, Nitr-28-MS - нітрит натрію, введений впродовж 14 днів та 28 днів відповідно, з подальшим введенням мезенхімальних стовбурових клітин  
 NMDA - N-метил-D-аспартат рецептори глутаматергічної системи  
 NSC - нейральні стовбурові клітини  
 PAI-1 – інгібітор активатора плазміногену-1  
 PART - первинна вікова тауопатія  
 PSEN1, 2 – пресенелін 1, 2  
 R/B – співвідношення середніх значень яскравості кольору в червоній (R) і синій зоні спектра (B)  
 RGB – червона, зелена, синя зони світлового спектра  
 SEM – стандартна похибка середнього  
 Scop – скополамін бутилбромід

Scor-14, Scor-28 - скополамін бутилбромід, введений впродовж 14 днів та 28 днів відповідно

Scor-14-MSС, Scor-28-MSС - скополамін бутилбромід, введений впродовж 14 днів та 28 днів відповідно, з подальшим введенням мезенхімальних стовбурових клітин

VEGF-A, VEGF – фактор росту ендотелію судин

vWF - фактор фон Віллебранда

2,3-ДФГ – 2,3-дифосфогліцерат

АТФ - аденозинтрифосфат

АФК – активні форми кисню

АХ - ацетилхолін

ВП – відкрите поле

ГАМК -  $\gamma$ -аміномасляна кислота

ГЕБ – гемато-енцефалічний бар'єр

ГМ – головний мозок

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота

Е/П – ендотеліоцити/перицити

Е-кадгерин - епітеліальний кадгерин

ЕП – екстраполяційне позбавлення

ЕТ-1 – ендотелін-1

МДА - малоновий діальдегід

МЦР – мікроциркуляторне русло

ЦАА – церебральна амілоїдна ангіопатія

РНК - рибонуклеїнова кислота

СОД - супероксиддисмутаза

ТБК – тіобарбітурова кислота

УРПУ – умовний рефлекс пасивного уникання

ХА – хвороба Альцгеймера

ЦНС – центральна нервова система

ЧМТ – черепно-мозкова травма



## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Щорічне збільшення в світі кількості людей старшого віку призводить до того, що захворювання, пов'язані зі старінням людини, набувають все більшої актуальності. Останнім часом підвищену увагу дослідників привертає важкість когнітивних порушень, що виникають у людей літнього віку, і характеризує розвиток деменції. За результатами статистики Alzheimer's Disease International у 2019 році у світі налічується близько 50 млн осіб з деменцією, з них – 62% людей із хворобою Альцгеймера (ХА), 17% – з судинною деменцією, 10% – з ХА та судинною деменцією та ін. [1]. Хвороба Альцгеймера – багатофакторне прогресуюче нейродегенеративне захворювання, яке характеризується порушенням білкової конформації з подальшою агрегацією білків, що призводить до дисфункції та втрати нейронів головного мозку [2-4]. Існує багато гіпотез розвитку ХА: гіпотеза амілоїдного каскаду та амілоїдної дисфункції, коли надмірне формування амілоїдних бляшок в тканині головного мозку є наслідком неправильного амілоїдогенного розпаду білка-попередника амілоїду (APP), або порушення фізіологічного гомеостазу мономеру A $\beta$ 1-42, A $\beta$  1-40 у циклі синаптичних везикул у пресинаптичних мембранах, або зниження каталітичної здатності  $\gamma$ -секретази та накопичення С-кінцевих нейротоксичних фрагментів APP [5-8]. Інші гіпотези, такі як гіпотеза таупатії, дисфункції нейротрансмісії та холінергічна гіпотеза, гіпотеза мітохондріального каскаду та окислювального стресу, гіпотеза нейрозапалення та дисфункції мікроглії також мають місце при поясненні механізмів розвитку ХА. На нашу думку, особливу увагу привертає інша гіпотеза - судинна, яка має два шляхи розвитку ХА: неамілоїдогенний та амілоїдогенний. Згідно з амілоїд-незалежним шляхом, цереброваскулярне ушкодження супроводжується дисфункцією гематоенцефалічного бар'єра, зниженням мозкового кровообігу, гіперперфузією, гіпоксією, може ініціювати ушкодження нейронів та нейродегенеративні процеси [9]. Згідно з амілоїд-залежним шляхом, при дисфункції судин відбувається порушення кліренсу бета-амілоїду через периваскулярні шляхи та

гематоенцефалічний бар'єр, що призводить до підвищення накопичення бета-амілоїду в тканині головного мозку [10]. Результатом накопичення надлишку амілоїдних бляшок є їх токсичний вплив не тільки на нейрони, але й на судини, що сприяє прогресуванню церебральної ішемії, розвитку ендотеліальної дисфункції, яка посилює надалі когнітивні порушення [11]. Стає очевидним, що судинна дисфункція відіграє одну вирішальну роль в прогресуванні ХА. Про первинну роль ушкодження структури та функції судин у виникненні ХА вчені досі сперечаються, тому що на людину одночасно діє дуже багато серцево-судинних факторів ризику, а також негативних факторів навколишнього середовища. В даному дослідженні перед нами виникло питання, яку ж переважно роль (первинну чи вторинну) відіграє ушкодження судин під впливом різних тригерних факторів та пізніше дисфункція ендотелію в розвитку нейродегенеративних змін тканини головного мозку при ХА.

Відомо, що у людей похилого віку одночасно можуть розвиватися нейродегенеративні та судинні процеси, посилюючи один одного та сприяючи розвитку нейродегенерації комбінованого типу. Оскільки патогенез нейродегенеративних захворювань (хвороби Альцгеймера (з раннім початком) та первинної дегенеративної деменції альцгеймеровського типу (з пізнім початком)) до кінця не ясний, одним з невивчених питань є роль ендотеліальної дисфункції та зв'язок між ендотеліальною дисфункцією та розвитком холінергічного дефіциту, що допоможе з'ясувати механізми розвитку захворювання та розробити методи корекції когнітивних порушень. Для відтворення нейродегенеративних захворювань (хвороби Альцгеймера (первинної дегенеративної деменції альцгеймеровського типу)) у щурів та мишей в експерименті в світі використовують скополамінову (M-холіноблокатор) модель [12-16]. Також для порівняння та розуміння ролі ендотелію судин в розвитку ХА нами була розроблена експериментальна модель нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу судинного походження, де нітритне навантаження на організм щурів сприяло розвитку нейродегенеративних процесів в головному мозку через ушкодження ендотелію судин [17, 18].

Існуючі в даний час стратегії терапевтичного впливу при прогресуючих нейродегенеративних захворюваннях включають препарати різних фармакологічних груп, які в більшості випадків не спроможні зупинити прогресування процесу ушкодження мозку. Тому пошук нових шляхів корекції даної патології, спрямованих на відновлення нервових клітин і нейронних зв'язків є актуальним. Відомо, що для лікування деяких судинних хвороб та нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Паркінсона, розсіяний склероз останнім часом в світі успішно застосовують мезенхімальні стовбурові клітини з червоного кісткового мозку [19-23]. Однак проблема застосування стовбурових клітин для запобігання прогресування та лікування нейродегенеративних захворювань (хвороби Альцгеймера (первинної дегенеративної деменції альцгеймерівського типу)) на теперішній час вивчені недостатньо.

#### **Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.**

Робота виконана у межах наукової теми в рамках плану наукових досліджень Харківського національного медичного університету і є частиною науково-дослідної роботи кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна «Патогенез ушкоджуючої дії на організм екзогенних факторів в сучасних умовах», № держ. реєстрації 0115U000991. Фрагменти цієї роботи присвячені визначенню ролі ендотеліальної дисфункції в патогенезі розвитку деменції альцгеймерівського типу у щурів на фоні довготривалого нітритного навантаження та холінодефіциту, викликаного тривалим введенням скополаміну бутилброміду, та визначенню доцільності та ефективності застосування мезенхімальних стовбурових клітин щодо корекції цього патологічного стану. Дисертантка була виконавцем зазначеної теми. Тема дисертації була затверджена 25.10.2018 р. (протокол №10) та змінена 27.01.2022 р. (протокол №10) на засіданні Вченої Ради ХНМУ.

**Мета дослідження:** вивчення ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку скополамін- та нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу у щурів та визначення доцільності та ефективності застосування мезенхімальних стовбурових клітин щодо її корекції.

У зв'язку з визначеною метою поставлені наступні *завдання дослідження*:

1. З'ясувати особливості морфофункціонального стану ендотелію судин головного мозку у щурів з експериментальною скополамін- та нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу за вмістом ендотеліну-1 (ET-1), ендотеліальної NO-синтази (eNOS), фактора росту ендотелію судин (VEGF-A) у сироватці, фактора фон Віллебранда (vWF) в плазмі краніальної крові, а також за наявністю морфологічних змін судин, співвідношенням ендотеліоцитів до перицитів в стінці капілярів, оптичною щільністю ядер ендотеліоцитів, експресії фактора росту ендотелію судин (VEGF) та клітинної проліферації (Ki-67) ендотеліоцитами та нейронами в тканині головного мозку та маркеру клітинної адгезії E-кадгерину.

2. Дослідити в гомогенатах головного мозку щурів вміст ацетилхоліну для оцінювання ступеня холінергічного дефіциту, стан енергетичного метаболізму, прооксидантно-антиоксидантної системи за рівнем кардіоліпіну, АТФ, ТБК-активних речовин, активністю супероксиддисмутази (СОД), каталази, а також в еритроцитах крові вміст 2,3-дифосфогліцерату (2,3-ДФГ) для оцінювання ступеня гіпоксії головного мозку щурів зі скополамін- та нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу.

3. Визначити морфофункціональний стан нейропіля великих півкуль головного мозку щурів з двома експериментальними деменціями альцгеймерівського типу.

4. Дослідити поведінкові та когнітивні зміни у щурів при скополамін- та нітрит-індукованій деменції альцгеймерівського типу.

5. Встановити характер зв'язку між дисфункцією ендотелію судин, станом енергетичних процесів, холінергічної, прооксидантно-антиоксидантної систем, ступенем гіпоксії в головному мозку щурів, а також морфологічними змінами структур головного мозку та когнітивними функціями.

6. Вивчити особливості морфофункціонального стану ендотелію судин та нейропіля великих півкуль головного мозку, стану холінергічної системи, енергетичного метаболізму, прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, ступеня гіпоксії, зміни поведінкових реакцій та когнітивних функцій у щурів з

експериментальною деменцією альцгеймерівського типу різного походження, які отримували одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин.

**Об'єкт дослідження:** скополамін-індукована та нітрит-індукована деменція альцгеймерівського типу.

**Предмет дослідження:** ендотеліальна дисфункція і її роль в патогенезі розвитку скополамін- та нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу з визначенням особливостей морфофункціонального стану ендотелію судин та нейропіля великих півкуль головного мозку, холінергічної системи, енергетичного метаболізму, прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, ступеня гіпоксії без корекції та на тлі введення мезенхімальних стовбурових клітин.

**Методи дослідження:** патофізіологічні, біохімічні, морфологічні, імуногістохімічні, аналітико-статистичні.

#### **Наукова новизна отриманих результатів.**

Вперше за даними комплексного та порівняльного аналізу на експериментальних моделях деменції, що викликали у щурів різнотривалим введенням скополаміну бутилброміду та нітриту натрію, через 14 діб «періоду регенерації» були виявлені морфофункціональні ознаки ушкодження ендотелію судин (артерій, артеріол, капілярів) більш виражені у щурів з нітритною моделлю (порівняно зі скополаміновою) деменції альцгеймерівського типу у вигляді: зменшення загальної кількості і співвідношення «Ендотеліоцити/періцити» (Е/П) в стінці капілярів за рахунок компенсаторного збільшення періцитів або зменшення кількості ендотеліоцитів і періцитів в залежності від тривалості введення нітриту натрію (за рахунок збільшення періцитів); підвищення кількості мічених Ki-67 ендотеліоцитів, експресії VEGF ендотеліоцитами та нейронами кори; появи в субендотеліальних зонах внутрішньоцеребральних артерій скупчень амілоїду, ознак васкуліту та обтуруючих, парієтальних тромбозів.

За даними зсуву рівнів eNOS, ET-1, VEGF-A в сироватці та vWF в плазмі крові встановили, що від тривалості введення скополаміну бутилброміду та нітриту натрію залежить прогресування ступеня ушкодження ендотелію судин.

Вперше на підставі визначення ступеня гіпоксії (за вмістом 2,3-ДФГ) в еритроцитах крові, холінодефіциту (за вмістом ацетилхоліну), енергодефіциту та мітохондріальної дисфункції (за рівнем АТФ, кардіоліпіну), рівня окислювального стресу (ТБК-активні речовини) та активності ферментів антиоксидантної системи (СОД, каталази) в гомогенатах головного мозку щурів обох моделей простежується схожа закономірність у спрямованості відхилень від контролю (підвищується вміст 2,3-ДФГ, ТБК-активних речовин, знижуються вміст АТФ, кардіоліпіну, ацетилхоліну, активність СОД та каталази). Проте більш виражені відхилення вищезазначених показників спостерігались у тварин з нітрит-індукованою моделлю.

Вперше за результатами вимірювання оптичної щільності цитоплазми нервових відростків був оцінений функціональний стан нейропіля великих півкуль головного мозку щурів і визначено, що введення саме скополаміну бутилброміду (в співставленні зі ступенем змін після введення нітриту натрію), призводить до більш суттєвого зниження його функціональної активності за рахунок зменшення вмісту РНК в цитоплазмі нервових відростків і до накопичення амілоїду в нейропілі поверхневої білої речовини великих півкуль головного мозку, в субкортикальній білій речовині і в білій речовині гіпокампа.

Вперше встановлено, що порушення поведінкових реакцій у щурів всіх груп (тест «Відкрите поле») змінюється пропорційно тривалості введення скополаміну бутилброміду та нітриту натрію і полягає в прогресуванні захисного гальмування, підвищенні емоційної реактивності, зниженні дослідницької активності у щурів. Проте втрата когнітивних функцій була більш вираженою у щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу.

Вперше доведено, що одноразове внутрішньовенне введення мезенхімальних стовбурових клітин (MSC), отриманих з червоного кісткового мозку щурам обох моделей, в порівнянні з тими, що не отримували MSC, супроводжується появою: нових капілярів та ендотеліоцитів, ділянок нейропіля з ймовірною регенерацією відростків нервових клітин, підвищенням рівня ацетилхоліну в гомогенатах головного мозку. Визначено, що під впливом MSC знижується емоційна

реактивність, занепокоєння, тривожність і, підвищуються когнітивні функції і синаптична пластичність, що свідчить про значне покращення, але не повне відновлення дослідницької та когнітивної активності.

Доповнені наукові дані про роль ендотеліальної дисфункції в патогенезі нейродегенеративних процесів в головному мозку, розширені уявлення про регенераторний потенціал клітин головного мозку на тлі введення скополаміну бутилброміду та нітриту натрію та після припинення їх негативного впливу.

### **Практичне значення отриманих результатів.**

Дисертаційна робота є фундаментальним дослідженням у сфері патофізіології нейродегенеративних захворювань. Практична значущість результатів дослідження полягає у поглибленні знань стосовно механізмів виникнення амілоїдозу головного мозку за умов негативного впливу різних екзогенних ушкоджуючих факторів, що відкриває перспективи подальших експериментальних в галузі регенеративної медицини, нейрофізіології і клінічних досліджень щодо розробки нових методів лікування і профілактики прогресування нейродегенеративних процесів при хворобі Альцгеймера.

Запропоновані нові морфометричні та гістохімічні методики оцінювання функціонування нейропіля та ендотелію судин головного мозку, що дають змогу використовувати їх для діагностики нейродегенеративних захворювань в клінічній практиці.

Приймаючи до уваги позитивний регенераторний ефект від однократного внутрішньовенного введення мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих з червоного кісткового мозку, необхідно проведення подальших досліджень, для визначення оптимальної кратності їх введення, побічних і віддалених ефектів впливу на організм для обґрунтування необхідності впровадження в клінічну практику при лікуванні пацієнтів з початковими ознаками та з вираженою клінікою нейродегенерації головного мозку.

### **Впровадження в практику.**

Розроблена нова модель деменції альцгеймерівського типу судинного походження (нітрит-індукована деменція альцгеймерівського типу) шляхом

щоденного внутрішньоочеревинного введення водного розчину нітриту натрію щурам-самцям в дозі 50 мг/кг впродовж 14 днів. Практичне значення результатів даного дослідження підтверджується патентом України на корисну модель (№141759).

Отримані результати впроваджені в навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна, кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету (м. Харків), кафедри патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету (м. Харків), кафедри патологічної фізіології Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава), кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету (м. Одеса).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною науково-дослідною роботою, в якій автором особисто визначено мету та завдання дослідження, проведено патентно-інформаційний пошук за темою та аналіз літературних джерел, результати яких свідчать про відсутність аналогів наукових розробок, вибір обсягів та методів досліджень. Автор самостійно проводив моделювання нітрит- та скополамін-індукованої експериментальної деменції альцгеймерівського типу, введення мезенхімальних стовбурових клітин, оцінювання поведінкових реакцій та когнітивних функцій, морфометричні дослідження, аналіз та узагальнення отриманих результатів, сформулював основні положення та висновки роботи. Автором особисто написані всі розділи дисертації. Запозичення результатів в інших авторів відсутні.

#### **Апробація результатів дисертації.**

Матеріали дисертації були представлені та обговорені на: VI Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих вчених, BIMCO 2019 (2-5 квітня, 2019, м.Чернівці), 25th International Student Scientific Conference (12-13th April 2019, Gdansk, Poland), 19th International Congress Of Young Medical Scientists (May 30th – June 1st 2019, Poznan, Poland), VIII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (13-15 травня, 2020, м.Одеса),



Всеукраїнській науково-практичній конференції (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна) (26 березня, 2021, м.Харків), XXV Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (12-14 квітня 2021, м. Тернопіль), XIX International Congress Of Medical Sciences For Students And Young Doctors (13-16 May, 2021, Sofia, Bulgaria), 12th European Congress of Neuropathology (May 31 – June 3, 2021, Copenhagen, Denmark), International Scientific Interdisciplinary Conference, ISIC – 2021 (October, 20-21, 2021, Kharkiv), IV Науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю “Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція” (18 листопада, 2021, м. Харків), Міжвузівській конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» (26-28 січня, 2022, м.Харків), International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 80th International Scientific Conference of the University of Latvia (25-26 March, 2022, Riga, Latvia).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукові роботи, з яких 5 статей (1 стаття - один автор, 1 стаття - 2 автори, 3 статті - більше, ніж 2 автори) – в наукових фахових виданнях України, рекомендованих МОН України, 2 статей – в зарубіжних виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз Scopus (Сербія, Японія - 4-ий квартиль), 1 патент на корисну модель, 14 тез у збірниках матеріалів міжнародних наукових конференцій, конгресів (Польща, Болгарія, Данія, Україна, Латвія).

**Структура і обсяг роботи.** Дисертаційна робота викладена на 218 сторінках машинописного тексту та складається з анотації, вступу, опису матеріалів і методів дослідження, 2 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, переліку використаних джерел літератури, який містить 287 джерел (з них 44 – кирилицею, 243 – латиницею), що займають 36 сторінок, та додатків (на 16 сторінках). Робота ілюстрована 18 таблицями і 31 рисунками, які займають 45 сторінок.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Сучасні уявлення про хворобу Альцгеймера

За даними Державної служби статистики України населення (станом на 1 червня 2021 року) зменшилося на 10 млн осіб у порівнянні з 1992 роком та становить 41408,2 тис. осіб, при цьому кількість померлих (100 осіб на день) переважає над кількістю новонароджених (37 осіб) [24]. Головну роль у збільшенні смертності серед населення України сьогодні відіграють захворювання серцево-судинної системи та онкологічна патологія. Проте з огляду на погіршення демографічної ситуації в Україні, що характеризується збільшенням кількості людей похилого віку, особливу увагу слід приділяти значущості деяких неврологічних нозологій. Як і в усьому світі, так і в нашій країні, старіння населення супроводжується зростанням нейродегенеративних захворювань [25].

Прогресуюча дегенерація нейронів центральної нервової системи (ЦНС) веде до розвитку деменції, синдрому, що супроводжується деградацією пам'яті, мислення, поведінки та втратою здатності виконувати щоденні рутинні завдання [26]. За результатами статистики Alzheimer's Disease International у 2019 році у світі налічується близько 50 млн осіб з деменцією, з них – 62% людей із хворобою Альцгеймера (ХА), 17% – з судинною деменцією, 10% – з ХА та судинною деменцією та ін. [1]. При цьому кількість пацієнтів, які страждають на деменцію, у країнах Європейського союзу та розширеного Європейського регіону («wider European Region») за прогнозами спільноти Alzheimer Europe зросте з 9 780 678 осіб у 2018 році до 18 846 286 осіб у 2050 році. Важливо відзначити, що жінки страждають на деменцію вдвічі частіше за чоловіків і з віком кількість таких хворих збільшується [27]. Також, спираючись на дані Global Burden of Disease (GBD), в Україні ХА стоїть на п'ятому місці через смертність серед населення після ішемічної хвороби серця, інсультів, цирозу печінки та раку легені [28]. Численні дослідження, проведені вченими з вивчення етіопатогенезу, а також пошуку методів лікування, здатних зупинити прогресування хвороби Альцгеймера з

моменту першого опису симптомів захворювання в 1906 році Алоїсом Альцгеймером, не принесли бажаних результатів у боротьбі з цим захворюванням.

Хвороба Альцгеймера (ХА) – багатофакторне прогресуюче нейродегенеративне захворювання, що характеризується порушенням білкової конформації з подальшою агрегацією білків, що призводить до дисфункції та загибелі нейронів головного мозку (ГМ) [2-4]. Накопичення позаклітинних амілоїдних бляшок, гіперфосфорилування, олігомеризація тау-протеїну під впливом бета-амілоїду та утворення нейрофібрилярних клубків з тау-філаментів усередині нейронів та в їх відростках, і пізніше розвиток дистрофічних нейритів призводить до синаптичної, нейропільної та невральної втрати та атрофії різних відділів головного мозку [29, 30]. При цьому страждає кора головного мозку (спочатку базальні, скроневі, фронтальні частини неокортексу, а потім весь неокортекс), гіпокамп, базальні ганглії, мигдалеподібне тіло та проміжний мозок. Зрештою ушкоджуються середній мозок, кора мозочка та нижній стовбур головного мозку [4]. Слід зазначити, що крім атрофії сірої речовини при ХА, за результатами досліджень іноземних колег, у білій речовині відбувається дегенерація нервових волокон та відкладення патологічних білків до появи симптомів деменції внаслідок амілоїдної патології судин мікроциркуляторного русла [31]. Дані зміни супроводжуються як порушенням пам'яті, концентрації, мови, здатності доглядати за собою, орієнтації, розпізнавання близького оточення, режиму сну-неспанья, так і поведінковими змінами у вигляді апатії, депресії, агресивних реакцій, появою галюцинацій, астеноїєю-кахексією, дисфункцією сечовивідних шляхів та кишечника, порушенням ковтання та відмовою інших життєво важливих центрів кори та стовбура головного мозку, що у результаті закінчується смертю [32].

Відповідно до класифікації МКБ-10 (американської версії) ХА (G30) поділяється на:

G30.0 Хвороба Альцгеймера з раннім початком (один із синонімів – первинна дегенеративна деменція альцгеймерівського типу, пресенільний початок);

G30.1 Хвороба Альцгеймера з пізнім початком (поява симптомів після 60-65 років) (один із синонімів – первинна дегенеративна деменція альцгеймерівського типу, сенільний початок);

G30.8 Інша хвороба Альцгеймера;

G30.9 Хвороба Альцгеймера неуточнена [33].

Остаточню діагноз встановлюють на підставі анамнезу хвороби, об'єктивного статусу, результатів стандартних нейропсихологічних та лабораторних тестів, генетичного скринінгу, а також позитронно-емісійної та магнітно-резонансної томографії, де оцінюють біомаркери присутності бета-амілоїду та тау-протеїну у тканині головного мозку, у спинномозковій рідині, стану кори, гіпокампа та інших відділів мозку [34, 35].

Макроскопічно спостерігається атрофія кори, особливо мультимодальної асоціативної області, задніх відділів кори, звивини лобової та скроневої кори з ураженням білої речовини переважно лобової частки. Одночасно збільшуються скроневі та лобові роги бічних шлуночків, уражаються окремі структури лімбічної системи, у тому числі гіпокамп та мигдалеподібне тіло, стовбур мозку, розвивається пігментація на блакитній плямі. Маса мозку знижується [36].

Мікроскопічно виявляють у тканині головного мозку конгофільні амілоїдні бляшки внаслідок позаклітинного накопичення переважно A $\beta$ 42 пептидів [37]. Поширення амілоїду по головному мозку має фазовий характер: у першій фазі уражається неокортекс, основна частина кори півкуль головного мозку, що складається із шести горизонтальних шарів нейронів і відповідає за вищі нервові функції; у другій фазі уражається аллокортекс, що складається з трьох-чотирьох шарів нейронів і включає гіпокамп, лімбічну систему і нюховий мозок; у третій фазі амілоїдні бляшки поширюються на базальні ганглії, у четвертій – на стовбур мозку, у п'ятій – на мозочок [38].

Також гістологічно, імуногістохімічно визначають у тканині головного мозку численні нейропильні нитки внаслідок дегенерації нейронів та нейрофібрилярні клубки з аномальних тау-протеїнів у нейронах та відростках або вже позаклітинно після загибелі нейронів [39].

Дані морфологічні зміни супроводжуються втратою не тільки нейронів, але й синапсів, що підтверджується за допомогою імуноблотінгу та імуногістохімії зниженням вмісту пре- та постсинаптичних білків та щільності глутамінергічних закінчень у фракціях головного мозку [40].

Крім зміни нейронів, нейропіля, мікроскопічно можна виявити зміни у судинах у хворих на хворобу Альцгеймера. Одне з них – розвиток церебральної амілоїдної ангіопатії (ЦАА) у вигляді накопичення A $\beta$ 40-42 пептидів у стінках дрібних артеріях, артеріолах, капілярах сірої речовини кори головного мозку, лептоменінгеальних судинах [41]. Лептоменінгеальні судини більш чутливі до відкладення амілоїду. Судини тім'яної та потиличної частки ушкоджуються частіше, ніж лобової та скроневої [42].

У пацієнтів з ХА було виявлено ремоделювання судин у вигляді збільшення їх звивистості, місцями витончення, місцями збільшення щільності стінки судини, зменшення довжини капілярів та зниження експресії білків щільних контактів, збільшення жорсткості артерій [43, 44]. При цьому було доведено прямий взаємозв'язок між збільшенням жорсткості артерій, високою швидкістю пульсової хвилі, зниженням церебрального кровотоку та когнітивним дефіцитом [45, 46]. У свою чергу, підвищена швидкість пульсової хвилі в артеріях, гіперінтесивність білої речовини та мікрокрововиливи у тканині головного мозку у осіб з когнітивними порушеннями також пов'язані між собою [47]. Крім того, часто при нейровізуалізації пацієнтів з ХА виявляють кальцифікати навколо внутрішньочерепних судин, хоча їх внесок у патологію ХА ще вивчається [48].

На жаль, дані зміни тканини головного мозку при ХА, використовуючи перераховані вище методи візуалізації, можна зафіксувати тільки при вже явній клінічній картині. У доклінічній стадії ХА ранні ознаки ураження тканини головного мозку важко виявити.

## 1.2 Етіологічні фактори ризику та основні ланки патогенезу хвороби Альцгеймера

Вчені та клініцисти намагаються розробити програми з профілактики розвитку хвороби Альцгеймера, враховуючи як генетичні, так і набуті фактори ризику.

Відомо, що ризик розвитку деменції збільшується з віком, особливо після 65 років. Більш ранній початок проявів ХА в більшості випадків є результатом аутосомно-домінантного або аутосомно-рецесивного успадкування мутації генів, що регулюють функціонування білка-попередника амілоїду (APP-білка), тау-протеїну та інших білків, що беруть участь у метаболізмі та нейропротекції. Однак генетичну схильність виявляють і у людей старшого віку.

В одному з великих рандомізованих контрольованих досліджень у Фінляндії було показано, що у людей зі зниженими когнітивними здібностями на тлі присутності серцево-судинних факторів ризику після дворічної зміни способу життя (правильне харчування, фізична та соціальна активність, когнітивні тренування, управління факторами ризику розвитку серцево-судинних захворювань) покращилися когнітивні функції, а ризик розвитку та прогресування деменції знизився [49]. Дані дослідження дають можливість оцінити роль численних факторів ризику у розвитку ХА і вжити профілактичних заходів.

У прогресуванні ХА важливу роль відіграють цереброваскулярні захворювання (інфаркти головного мозку, ЦАА) та фактори ризику серцево-судинних захворювань (гіпертонія, дисліпідемія, ожиріння, атеросклероз, цукровий діабет, гіподинамія, куріння, вживання алкогольних напоїв), а також захворювання серця, що спричиняють гіпоксію головного мозку (наприклад, фібриляція передсердь, аритмії, зупинка серця) [50]. Так було досліджено, що від 6 до 47% людей з деменцією мають зміни в судинах головного мозку [51]. У свою чергу, дисфункція магістральних судин шийї та головного мозку, у тому числі і гематоенцефалічного бар'єра, тягне за собою як зниження кровопостачання головного мозку з подальшим розвитком ішемії, так і порушення механізмів

кліренсу, дренажу,  $\beta$ -амілоїду через судинну стінку та посилення розпаду білка-попередника амілоїду з подальшим накопиченням амілоїду та ушкодженням нейронів [52].

Не остання роль розвитку деменції і ХА належить черепно-мозковим травмам (ЧМТ). В одному з великих досліджень було показано, що ризик розвитку деменції у людей із ЧМТ на 24% вищий, ніж у людей без ЧМТ [53]. Це пояснюється не лише загибеллю нейронів, зниженням синаптичної пластичності, зниженням об'єму мозку та компенсаторним збільшенням шлуночків, але й накопиченням бета-амілоїду (A $\beta$ 42) у білій речовині головного мозку [54, 55].

Певний внесок у розвиток ХА вносить і хронічний стрес з депресивними розладами. Зниження вмісту дофаміну та серотоніну в головному мозку, а також підвищення вироблення кортикотропіну, кортизолу також стимулюють утворення амілоїдних бляшок та призводить до втрати нейронів [56, 57].

Крім того, порушення режиму сну-неспанья є не тільки, але й раннім симптомом ХА. Так, зменшення вироблення мелатоніну під тривалим впливом світла призводить до збільшення утворення нерозчинного тау-протеїну [58]. Також через нестачу сну не відбувається збільшення інтерстиціального простору в головному мозку, взаємодія між інтерстиціальною та спинномозковою рідиною знижується, порушується гомеостаз у нервовому мікросередовищі. В результаті погіршується кліренс шкідливих метаболітів, таких як бета-амілоїд, по периваскулярних просторах, через клітини епендими, м'які гліальні мембрани поверхні мозку в ліквор, а потім у глибокі шийні лімфатичні вузли [59, 60].

Незважаючи на велику кількість тригерних факторів розвитку ХА, на які можливий зовнішній вплив, внесок генетичних мутацій у формування амілоїдних бляшок у тканині головного мозку та зниження когнітивних здібностей є «першим» серед переліку факторів ризику, що не піддаються геномній «поправці/корекції».

Так, першими були виявлені мутації в гені APP (amyloid  $\beta$  precursor protein, білка-попередника амілоїду) у осіб з раннім початком ХА у віці 30-60 років з аутомно-домінантним типом спадкування. При цих мутаціях знижується активність  $\gamma$ -секретази, що призводить до зниження розщеплення С-кінцевого

фрагмента APP, збільшення співвідношення A $\beta$ 42 до A $\beta$ 40 (за рахунок зниження секреції останнього) з подальшим формуванням амілоїдних бляшок. Мутації в генах мембранних білків PSEN1 та PSEN2, які є частиною  $\gamma$ -секретази, також сприяють порушенню регуляції в розпаді APP та надмірному накопиченню бета-амілоїду у тканині головного мозку у людей з раннім початком ХА [61].

При спорадичному, пізньому початку ХА присутність алелю  $\epsilon$ 4 гена аполіпопротеїну Е (APOE) збільшує ризик розвитку ХА, сприяючи полімеризації фібрил бета-амілоїду. Навпаки, алелі  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 APOE покращують кліренс A $\beta$ , надаючи цим нейропротекторну дію [62]. Крім того, крім APOE згідно з даними повногеномних асоціативних досліджень (GWAS, genome-wide association studies), одонуклеотидні поліморфізми ABCA7, BIN1, CASS4, CD2AP, CD33, CELF1, CLU, CR1, ERHA1, FERMT2, HLA-кла, MS4A6A, NME8, PICALM, PT24KA2, локуси RIN3, SORL1, CELF1, NME8, FERMT2, CASS4, DGS2 та ZCWPW1 також пов'язані з більш високим ризиком пізнього початку ХА [63]. До того ж, зміни рецептора, що експресується на гені мієлоїдних клітин 2 (TREM2), сприяє недостатній функції мікроглії, фагоцитів з подальшим накопиченням «клітинного сміття», у тому числі й амілоїдних бляшок [64, 65].

Складність генофонду ХА потребує подальшого аналізу, т.к. не виключена взаємодія генів між собою та їх асоціацією з амілоїдною, нейрофібрилярною патологією, атрофією, запаленням головного мозку та зниженням когнітивних функцій [66].

З вищезгаданої інформації випливає, що основною ланкою патогенезу ХА є скупчення патологічних білків, нерозчинного бета-амілоїду та тау-протеїну, у гіпокампі, неокортексі та судинах головного мозку.

### **1.2.1 Теорія «амілоїдного каскаду» та «амілоїдної дисфункції»**

Бета-амілоїд (A $\beta$ ) утворюється зі свого білка попередника APP (amyloid  $\beta$  precursor protein). APP – інтегральний мембранний білок, який експресується у багатьох тканинах, зокрема в синапсах нейронів. Він відповідає за синаптичне



утворення та відновлення, антероградний нейрональний транспорт. До структури даного білка входить позаклітинний N-кінець, трансмембранний домен та цитоплазматичний C-кінець. Розщеплення даного білка відбувається двома шляхами: амілоїдогенним та неамілоїдогенним.

$\alpha$ -Секретаза розщеплює APP, вивільняючи sAPP $\alpha$  з поверхні клітини та залишаючи C-кінець APP з 83 амінокислот з подальшим внутрішньомембранним розщепленням  $\gamma$ -секретазою пептиду P3 та A $\beta$ . Дане розщеплення – неамілоїдогенне та відбувається у відповідь на активацію M-холінорецепторів ацетилхоліном [67].

Амілоїдогенний розпад APP запускається  $\beta$ -секретазою з утворенням sAPP $\beta$  і 99-амінокислотного C-кінця, який в подальшому через кілька стадій розщеплюється  $\gamma$ -секретазою до кінцевих форм бета-амілоїду 40-амінокислотного A $\beta$ 40 і 42-амінокислотного A $\beta$ 42 [5]. Переважання гідрофобного A $\beta$ 42 над A $\beta$ 40, а саме за рахунок зниження продукції A $\beta$ 40, індукує утворення амілоїдних фібрил, а потім і бляшок, що тягне за собою активацію утворення нейрофібрилярних клубків та розвиток нейродегенерації [6].

Таким чином, відповідно до теорії «амілоїдного каскаду», розробленої Hardy and Higgins, 1992, продукція A $\beta$ 42 та його подальше накопичення відіграє головну роль у синаптичній дисфункції та загибелі нейронів.

Однак, в одних дослідженнях, де застосовували інгібітори  $\beta$ - та  $\gamma$ -секретаз для зниження продукції бета-амілоїду, у пацієнтів все одно розвивалися когнітивні порушення, що вказує на те, що накопичення бета-амілоїду не відіграє головну роль у втраті синаптичної функції та загибелі нейронів [68-72]. В інших дослідженнях вчені пов'язують розвиток синаптичної дисфункції та загибелі нейронів з накопиченням C-кінцевого фрагмента APP, що володіє нейротоксичними властивостями [69]. Більш того, зниження каталітичної здатності  $\gamma$ -секретази та накопичення C-кінцевих фрагментів APP сприяє розвитку як спорадичної, так і сімейної ХА [8].

Багато дослідників вважають, що неправильне укладання бета-амілоїду, яке передуює когнітивному дефіциту при ХА більш ніж на 10 років, пов'язане з

порушенням фізіологічного гомеостазу мономеру  $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{1-40}$  в циклі синаптичних везикул у пресинаптичних мембранах [7]. З втратою мономерів  $A\beta$  у синапсах знижується синаптична активність нейронів, внаслідок чого активуються  $\beta$ -секретази (BACE-1, beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme) та утворюється багато нейротоксичних олігомерів  $A\beta$  [73]. Тому зниження мономерів  $A\beta$  у спинномозковій рідині та рання активація BACE-1 є першими ознаками патології  $A\beta$  у людей з помірними когнітивними порушеннями (MCI, mild cognitive impairment) [74]. Є докази того, що розчинні, неправильно згорнуті олігомерні форми  $A\beta$  накопичуються у клітині, порушуючи цим фізіологічний процесинг мономерів  $A\beta$  [75].

Про молекулярні механізми участі мономеру  $A\beta$  в циклі синаптичних везикул і підтримці синаптичних функцій поки ще мало даних, проте дана теорія бета-амілоїдної дисфункції (BAD, Beta Amyloid Dysfunction) спростовує теорію амілоїдного каскаду і дає пояснення, чому терапія інгібіторами секретаз, імунотерапія на мономер та фібрили  $A\beta$  не пройшли клінічних випробувань [76].

### 1.2.2 Гіпотеза таупатії

Доведено, що ХА – це взаємопов'язана патологія двох білків: бета-амілоїду та тау-протеїну. При цьому неправильне укладання  $A\beta$  у вигляді олігомерів активує кінази, глікоген-синтазу 3 ( $GSK3\beta$ ) і циклін-залежну кіназу 5 ( $CDK5$ ), що запускають патологічне фосфорилування та модифікацію тау-протеїну з утворенням нейрофібрилярних клубків (NFT, neurofibrillary tangles) [77].

Тау-білок розташований в аксонах нейронів і відповідає за транспорт органел, везикул та складання мікротрубочок [78]. Гіперфосфорилування тау-білка знижує його спорідненість до тубуліну, інгібує складання мікротрубочок і призводить до формування неправильної конформації білка у вигляді бета-аркушів з подальшим утворенням фібрилярних клубків (NFT) у тілі нейронів і нейропильних ниток уздовж нейрональних відростків [79]. Також останнім часом

обговорюється гіпотеза про те, що олігомеризація тау-протеїну також має нейротоксичний ефект, як і гіперфосфорильований тау [80]. У будь-якому випадку, неправильно сформований тау-протеїн сприяє порушенню цитоскелету нейронів, їх загибелі та порушенню нейротрансмісії [81].

Багато вчених стверджують, що аномальні нерозчинні тау-філаменти формуються в підкоркових ядрах головного мозку, у тому числі і блакитній плямі, в доклінічній стадії ХА і саме поширення NFT пов'язане з клінічним прогресуванням ХА [82]. Є припущення, що наприкінці ранньої фази ХА при тривалому накопиченні аномального тау-протеїну поступово починається розвиток аномальних скупчень бета-амілоїду, тобто патологія тау-білка не пов'язана з впливом олігомерів та фібрил бета-амілоїду [83]. При цьому зміна конформації та патологічна агрегація тау-протеїнів можуть бути пов'язані з впливом кіназ вірусу простого герпесу 1, що проникає в нейрони блакитної плями [84]. Також не слід забувати про первинну вікову таупатію (PART, primary age-related tauopathy), де накопичення NFT відбувається за відсутності бляшок бета-амілоїду і пов'язане з генетичною мутацією H1 гаплотипу гена, асоційованого з тау-протеїном (МАРТ, microtubule associated protein tau), а не з  $\epsilon 4$  алеллю гена АРОЕ [85].

Незважаючи на те, що розбіжності в ролі бета-амілоїду і тау-протеїну в нейродегенеративному процесі при ХА та хронології їх утворення досі дискутуються, дані дві патологічні утворення є невід'ємною частиною даної патології і мають пріоноподібні властивості, передаючи свої аномальні функції подібним білкам [86].

### **1.2.3 Дисфункція нейротрансмісії та холінергічна гіпотеза**

Добре відомо, що при ХА розвивається моноамінергічна патологія, тобто відбуваються «збої» у функціонуванні серотонінергічної системи, дофамінергічної, ГАМК та глутаматергічної, холінергічної систем. У пацієнтів з ХА в результаті нейродегенеративних процесів у зоні переднього мозку, неокортексу, гіпокампа спостерігається зниження рівня серотоніну - нейромедіатора, що відповідає за

пам'ять, навчання, пізнання, настрої, сон [87]. Зниження рівня серотоніну спричиняє дефіцит мелатоніну, який має потужні антиамілоїдогенні ефекти, інгібує гіперфосфорилування тау-протеїну та нормалізує роботу холінергічної системи шляхом покращення синтезу ацетилхоліну та зниженням активності ацетилхолінестерази, пригнічує активність рецепторів NMDA (N-метил-D-аспартату) глутаматергічної системи, зменшуючи цим ексайтотоксичність нейронів [88].

Дегенерація холінергічних нейронів смугастого тіла (стріатуму), базальної частини переднього мозку, кори головного мозку, лімбічну систему, включаючи гіпокамп і енторинальну кору, зниження синтезу ацетилхолінтрансферази, а також дисфункція нікотинових і мускаринових рецепторів тягне за собою холінодефіцит [89, 90].

Ацетилхолін – нейротрансмітер та нейромодулятор у нервовій системі [91]. Даний нейромедіатор також відповідає за нейрогенез, формування синапсів та синаптичну пластичність [92, 93]. Холінергічні нейрони відповідають за асоціативне навчання, увагу, сенсорні функції, поведінкову гнучкість, мотивацію, пам'ять [94]. Було показано, що у пацієнтів з ранньою стадією ХА або з високим ризиком розвитку ХА розвивається атрофія холінергічної системи в базальній частині переднього мозку [95]. Також у деяких пацієнтів із шлунково-кишковими проблемами після тривалого прийому антагоністів М-холінорецепторів реєструвалися випадки деменції, що свідчить про роль холінергічної системи у підтримці когнітивних функцій [96, 97]. Крім того, в експериментах було доведено, що виснаження холінергічної системи сприяє патологічному укладанню бета-амілоїду та тау-протеїну [98]. Також виявлено, що порушення холінергічної іннервації судин призводить до втрати вазомоторного контролю за гематоенцефалічним бар'єром, порушує динаміку артеріального та периваскулярного лімфатичного дренажу бета-амілоїду [99]. Навпаки, стимуляція М1-холінорецепторів, відповідальних за збудження переважно нейронів гіпокампа та які експресуються у дендритах або сомах нейронів, сприяє підвищенню активності  $\alpha$ -секретази та подальшому неамілоїдогенному розпаду APP [100].

Пригнічення ацетилхолінестерази сприяє інгібуванню розпаду ацетилхоліну в синапсах та відновленню холінергічної функції, що клінічно підтверджується покращенням когнітивних функцій, уповільненням прогресування хвороби Альцгеймера [101].

Отже, дефіцит ацетилхоліну та інших нейромедіаторів у головному мозку дуже тісно корелює з іншими патологічними процесами при ХА і є сполучною ланкою між впливом патологічних бета-амілоїдів та тау-протеїном на нервову тканину та нейродегенеративними процесами.

#### **1.2.4 Гіпотеза мітохондріального каскаду та окислювального стресу**

Відомо, що нервові клітини мозку дуже чутливі до енергодефіциту, так як у стані спокою та неспання для нормального функціонування мозку потрібно 25% глюкози та 20% кисню від загальної кількості, що споживається всім організмом [102]. У мітохондріях, як основних «синтезаторах» АТФ, під час перенесення електронів з дихального ланцюга утворюються активні форми кисню (АФК). Мітохондрії регулюють рівень цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  як «вторинних месенджерів» та беруть участь у мітохондріальному апоптозі клітин за допомогою білків сімейства Bcl-2 та активації низки каспаз [103]. Розвиток окислювального стресу, надмірне утворення АФК, «перевантаження»  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі пов'язані зі зміною потенціалу мембран мітохондрій та їх дисфункцією, набуханням внутрішньої та розривом зовнішньої мембрани мітохондрій, вивільненням цитохрому С, апоптотичних білків [104, 105].

У розгляді патогенезу ХА існує дві теорії «мітохондріального каскаду»: первинна та вторинна. Відповідно до теорії «первинного мітохондріального каскаду» при мутації мітохондріальної ДНК, зниження синтезу АТФ, фізіологічний рівень якої запобігає агрегації білків, продукція олігомерів бета-амілоїду та формування амілоїдних бляшок збільшується [106, 107].

Вторинна мітохондріальна дисфункція опосередкована різноспрямованою дією бета-амілоїду. Наприклад, багато авторів вважають, що при взаємодії бета-

амілоїду з мітохондріальною матриксною амілоїд-зв'язувальною алкогольдегідрогеназою (ABAD) відбувається дисбаланс між рівнем естрадіолу та естрону в мітохондріях, що тягне за собою гіперпродукцію АФК і апоптоз клітини [108]. Зміни гомеостазу кальцію, порушення функціонування ферментів дихального ланцюга під час окислювального фосфорилування, перекисне окислення ліпідів мембран з подальшим окисненням білків, нуклеїнових кислот, індуковані бета-амілоїдом, також сприяє ушкодженню мембран мітохондрій, їх дисфункції з подальшим запуском загибелі клітин [105]. Також бета-амілоїд змінює цикл мітохондріальної динаміки: розвиваються дефекти процесів злиття мітохондрій (для обміну ДНК, реорганізації крист, що мають на увазі під собою захисну клітинну функцію) та поділу (фрагментації, що тягнуть за собою апоптоз); порушується антероградний транспорт активних мітохондрій по аксонам в дистальні області, що вимагає багато енергії для передачі імпульсів; мітофагія та кліренс «старих» ушкоджених мітохондрій піддаються інгібуванню; знижується здатність мітохондріального біогенезу [109-112].

З вищевикладеного стає очевидним той факт, що мітохондрії, їх структурні складові (білки, мембрани, кристи, матрикс), є важливими органелами у підтримці життєдіяльності клітин і в той же час «дуже крихкими» при патологічному впливі навколишніх білків, медіаторів, що в результаті призводить до окислювального стресу та загибелі клітин.

### **1.2.5 Гіпотеза нейрозапалення та дисфункції мікроглії**

За підтримання іонного балансу, метаболізму медіаторів, синтезу мієлінових оболонки, синаптичної пластичності, нейрогенезу, а також імунологічного нагляду в тканині головного мозку відповідає нейроглія, що складається з макроглії (астроцити, олігодендроцити, епендимоцити) та мікроглії (резидентні макрофаги) [113].

Мікрогліальні клітини, виявляючи патоген (у тому числі і патологічні білки) у тканині головного мозку, активуються та змінюють свою форму за рахунок

укорочення відростків та збільшення соми, набуваючи «амебоїдного» вигляду та здатності фагоцитувати «клітинне сміття» [114]. Мікроглія відіграє важливу роль як у активації запалення навколо патогену, експресуючи прозапальні цитокіни (M1 фенотип), так і у відновленні місця ушкодження, експресуючи протизапальні цитокіни (M2 фенотип). Секретуючи протеази, такі як неприлізин, інсулін-деградууючий фермент, матриксні металопротеїнази, мікроглія протидіє підвищенню утворення патологічного бета-амілоїду та нейтралізує його [116]. Також мікрогліоцити беруть участь у презентації антигенів Т-лімфоцитів [117]. Таким чином, мікрогліоцити забезпечують імунну відповідь у тканині головного мозку у відповідь на дію патогену та беруть участь у його кліренсі, у тому числі і індукції та виведенні бета-амілоїду. Однак, надмірна активація бета-амілоїдом мікроглії сприяють посиленню активності медіаторів запалення, таких як індукцибельна NO синтаза, фактор некрозу пухлини- $\alpha$ , інтерлейкін (ІЛ)- $1\beta$  та ІЛ-6, що загострює запальну відповідь і запускає загибель нейронів головного мозку [118]. Надмірна стимуляція мікроглії призводить до її сенсibiliзації та перебільшеної неефективної реакції на патоген, а також – до порушення рухливості макрофагів та зниження лізосомальної функції, що спричиняє порушення фізіологічних функцій мікроглії [118, 119]. У той же час, «ослаблена» мікроглія з дефіцитом рецепторів TREM-2, що відповідають за шляхи передачі сигналів та активацію макрофагів, втрачає здатність проліферувати навколо бета-амілоїдних бляшок, їх ефективно поглинати та обмежувати нейротоксичні властивості [120, 121]. Такий дистрофічний стан мікроглії, а також порушення морфологічної структури у вигляді скорочення довжини відростків та площі розгалуження, вчені пов'язують із віком та ХА [122].

Таким чином, мікроглія, як місцевий «пилосос», здатна брати участь у нейтралізації бета-амілоїду, зниженні його патологічного впливу на нервову тканину, а також пригнічувати утворення амілоїду за допомогою протеаз. Однак, у людей похилого віку та з надмірним накопиченням патологічних білків у тканині головного мозку відбувається «збій» у роботі макрофагів, що тягне за собою розвиток хронічного запалення та посилює процес утворення сенільних бляшок.

### 1.2.6 Судинна гіпотеза

Багато авторів переконані, що ХА супроводжується не тільки нейродегенеративними процесами, а й судинною дисфункцією. При цьому патологія судин може виникнути до утворення амілоїдних бляшок та появи клінічних симптомів ХА. Найчастіше деменція альцгеймеровського типу і судинна деменція, тобто змішана форма деменції, зустрічається у людей старше 65 років. Клінічно дуже важко розрізнити ці два захворювання з різним патогенезом, але із загальними факторами ризику, судинною ланкою розвитку даних патологічних процесів та загальними симптомами. Цікавим є той факт, що ЦАА зустрічається при цих двох типах деменції та основним тригером її розвитку є ішемія, що активує секретазу для обробки APP [123]. Однак, при візуалізації та патологоанатомічному дослідженні у людей судинна деменція проявляється мікроінфарктами та лакунарними інфарктами, геморагічними ураженнями, фібриноїдним некрозом, артеріосклерозом та гіалінозом [124].

Торкаючись судинної гіпотези розвитку ХА, згідно з амілоїд-незалежним шляхом, цереброваскулярне ушкодження, що супроводжується дисфункцією гематоенцефалічного бар'єра, зниженням мозкового кровообігу, гіперперфузією, гіпоксією, може спочатку ініціювати ушкодження нейронів і нейродегенеративні процеси [9]. При цьому патологія судин починається з дегенерації перичитів капілярів головного мозку, внаслідок чого знижується надходження кисню до головного мозку. Всі ці події відбуваються до нейронального ушкодження, дисфункції ендотелію та утворення амілоїду [125]. Вченим важко пояснити, що запускає початкову патологію перичитів. Однак, існує припущення, що у експериментальних тварин з носіями 4 алелі APOE судинна дисфункція передуює нейродегенерації і саме це може бути пов'язане із втратою перичитів [126]. Згідно з амілоїд-залежним шляхом, при дисфункції судин відбувається порушення кліренсу бета-амілоїду через периваскулярні шляхи та гематоенцефалічний бар'єр, що призводить до підвищення бета-амілоїду в тканині головного мозку [10]. На дисфункцію судин та розвиток даних патологічних процесів впливають як судинні



та генетичні фактори ризику, перераховані вище, так і спосіб життя та вплив навколишнього середовища [127].

Слід звернути увагу, що наш ґрунт, вода, продукти харчування, у тому числі консервовані м'ясні, рибні вироби, у своєму складі містять нітриту та нітрати. За даними дослідження наших співвітчизників, тривале отримання даних речовин у питній формі у щурів спричиняє розвиток генералізованої ендотеліальної дисфункції [17]. Згідно з результатами інших авторів, було встановлено факт почастищення випадків ХА при надмірному накопиченні нітрозамінів, які утворюються в організмі при взаємодії нітриту натрію з білками після попадання його в організм з водою, їжею і після куріння тютюну, що містить цілий спектр нітрозамінів. Крім канцерогенної дії, нітрозаміни посилюють окислювальний стрес, мають мутагенний ефект, викликають атрофію білої речовини головного мозку, що відіграє важливу роль у розвитку нейродегенеративних змін [128]. Дані результати свідчать про важливу роль нітритів та нітратів у механізмах виникнення альцгеймерівського ушкодження головного мозку на фоні ендотеліальної дисфункції.

Разом з тим, судини головного мозку є основними компонентами безлічі нейроваскулярних одиниць (включають нейрони, астроцити, перицити, гладком'язові клітини судин та ендотеліоцити) і дуже чутливі до впливу екзо- та ендотоксинів, окислювального стресу, запалення, енергодефіциту, холінергічної денервації [129]. Наслідками такого патологічного впливу на судини є: зміни вазомоторної активності, судинна тромбофілія та тромбоутворення, порушення ангиогенезу, підвищення проникності ГЕБ за рахунок ослаблення щільних сполук між ендотеліоцитами та дефіциту перицитів, що тягне за собою збільшення екстравазії білків сироватки крові, плазміну, еритроцитів в тканині головного мозку [52, 130-132].

Стає очевидним, що судинна дисфункція відіграє важливу, можливо вирішальну роль у прогресуванні ХА. У той самий час, суперечки вчених про послідовність подій у разі ХА не припиняються, так як одночасно дуже багато факторів, які впливають на структури та функцію судин та нейронів головного

мозку, у тому числі і серцево-судинні фактори ризику, екологія навколишнього середовища та ін. У цьому дослідженні головним питанням для нас залишається послідовність подій, що призводять до ушкодження судин та нервової тканини при ХА на тлі впливу різних тригерів захворювання.

### **1.3 Основні групи експериментальних моделей деменції альцгеймерівського типу**

Для вивчення патогенетичних механізмів нейродегенеративних захворювань, у тому числі і ХА, та проведення доклінічних випробувань лікарських засобів вчені використовують різні експериментальні моделі нейродегенеративних захворювань.

Незважаючи на наявність великої кількості моделей ХА (не менше 168), неможливо знайти модель, яка повністю відображала б усі патологічні процеси, що відбуваються в мозкових структурах людини [133].

Більшість моделей відображає лише частину основних ланок патогенезу ХА. Тому дуже багато суперечностей виникає, коли, наприклад, у трансгенних мишей накопичується бета-амілоїд, але формування нейрофібрилярних клубків та поширеної нейродегенерації всього мозку не спостерігається [134].

Існують трансгенні та нетрансгенні (фізіологічні, фармакологічні) моделі ХА, а також моделі на клітинних культурах.

Більшість трансгенних мишей і щурів, виведених для моделювання ХА з раннім (сімейним) початком, значною мірою мають експресію різних штамів людських APP та PSEN1 з мутаціями. При цьому ступінь когнітивних порушень, синаптичних порушень у тварин з різними мутаціями даних білків відрізняється, що ускладнює можливість порівняти дані групи тварин між собою. Також існують трансгенні моделі, що експресують мутації людських тау-протеїнів. Однак, дані мутації призводять до значних рухових розладів у гризунів, що ускладнює оцінювання когнітивних функцій тварин [135].

Для моделювання спорадичної форми ХА використовують також мишачі трансгенні моделі з експресією людського АРОЕ та фізіологічні моделі. Проблема експресії різних ізоформ АРОЕ у мишей тягне у себе різний рівень навантаження амілоїдними бляшками і ЦАА, тобто в цих моделях повинні бути спільно експресовані інші людські трансгени (наприклад, локуси GWAS), що важливо для доклінічних досліджень лікарських засобів, націлених на взаємодію між АРОЕ та бета-амілоїдом [136, 137].

Використання фізіологічних моделей має на увазі вивчення ХА у старих собак і нелюдських приматів (мавп), у яких бета-амілоїд природним чином продукується і також розподіляється по головному мозку, як і у людей. У цих тварин легше оцінювати когнітивні порушення та враховувати багато факторів ризику. Незважаючи на це, у більшості з них не формуються нейрофібілярні клубки в тканині головного мозку, дослідження проводять на невеликих групах через великі витрати та з етичних причин, що дає статистично недостовірні результати [138].

Також у світі використовують трансгенних безхребетних тварин (наприклад, дрозофіл) та тварин нижчого порядку (рибок данію). Переваги цих моделей: простота генетичних маніпуляцій, низька вартість та невелика тривалість життя. У той же час відсутність генетичної гомології з людьми та синтезу певних медіаторів у відповідь на утворення патологічних білків обмежує можливість використання даних моделей [138].

Істотні видові відмінності між людиною та тваринами підштовхнули вчених до використання моделей, що досліджують культури клітин людини: індукованих плюрипотентних стовбурових клітин [139]. Все ж таки, клітинні культури не повністю відображають весь патологічний процес у нейронах та інших клітинах головного мозку, а також можуть зберігатися епігенетичні модифікації у донорських клітинах після їх перепрограмування. Для усунення цих проблем вчені розробляють тривимірні моделі клітинних культур, що складаються з гідрогелевого матричного каркасу, глії та нейронів [140].

Хочеться звернути увагу на нетрансгенні моделі деменції альцгеймерівського типу. В основному, в таких моделях використовують внутрішньомозкові ін'єкції бета-амілоїду та тау-протеїну. Дані моделі призводять до гострого збільшення патологічних білків у тканині головного мозку, а не хронічного, поступового їх збільшення і поширення по всьому мозку, як це відбувається у людей, що хворіють [141].

Існує безліч хімічних речовин, які викликають дисбаланс у гомеостазі мозку, а також в обміні нейромедіаторів, що спричиняє розвиток деменції альцгеймерівського типу. Так введення або колхіцину інтрацеребрально, інгібітору ацетилхолінтрансферази, або тривале введення скополаміну внутрішньоочеревинно, М-холіноблокатора, або іботенової кислоти внутрішньогіпокампаально, активатора ацетилхолінестерази, або інших холінотоксинів (наприклад, каїнової кислоти) викликає холінодефіцит, який є однією з головних ланок у механізмі розвитку ХА згідно з холінергічною гіпотезою [142, 143]. Ушкодження холінергічних нейронів, а також порушення в глутаматергічній системі можна викликати і хронічним введенням етанолу. Також відомо, що високі дози етанолу сприяли надмірному виробленню оксиду азоту, що сприяло порушенню пам'яті та навчанню [144]. Інтрацеребровентрикулярне введення стрептозотоцину, отриманого з нітрососечовини глюкозаміну, знижує активність гліколітичних ферментів, тим самим порушуючи синтез АТФ та ацетилкоензиму А, підвищує активність холінестерази, що веде до порушення холінергічної провідності [145]. Азид натрію, як мітохондріальний токсин, при внутрішньоочеревинному введенні, блокуючи цитохромоксидазу і порушуючи дихальний ланцюг у мітохондріях, викликає енергодефіцит, окислювальний стрес, збільшує рівень ацетилхолінестерази, що тягне за собою нейродегенерацію [146].

Існує безліч хімічних фармакологічних речовин, здатних викликати когнітивні порушення, подібні до ХА. Зважаючи на таку різноманітність фармакологічних моделей, жодна з них не відтворює точну патологію ХА. Також є проблеми у дозуванні цих препаратів, так як «Альцгеймер-індукуючі» достатні дози у тварин можуть бути вищими або нижчими за такі у людей [147].

Тим не менш, очевидно, що в кожній вищезгаданій фармакологічній моделі загальною ланкою патогенезу ХА виступає холінодефіцит. Також, орієнтуючись на те, що скополамін-індукована модель деменції альцгеймерівського типу є однією з найчастіше використовуваних фармакологічних моделей, легкодоступною та відтвореною, нами була використана дана модель для вивчення функціонального стану судин, нейронів, глії, а також енергетичного обміну в тканині головного мозку в різні періоди розвитку когнітивних порушень та формування бета-амілоїду.

Враховуючи той факт, що нітросполуки, що входять до складу стрептозотоцину, азиду натрію або утворюються під дією етанолу, здатні індукувати деменцію альцгеймерівського типу в тому числі і викликати ендотеліальну дисфункцію під впливом нітритів і нітратів натрію, перед нами стояла мета створити модель цієї патології, викликаній хронічним введенням нітриту натрію, де судинне ушкодження стане пусковим процесом когнітивних порушень.

Слід пам'ятати, що експериментальні тварини призначені для виявлення певних патологічних процесів, елементів нефізіологічним способом. З кожним роком вчені всього світу намагаються більш точно імітувати патологічний фенотип ХА людини у тварин, створюючи нові трансгенні моделі. Особливу увагу вчених привертає роль судинного чинника у прогресуванні ХА, тому що амілоїдне навантаження не завжди корелює з погіршенням когнітивних функцій [148]. Відомо, що у багатьох трансгенних моделях паралельно створюються умови для розвитку ішемії, гіпертонії, цукрового діабету, гіпоксії, серцево-судинної недостатності з метою оцінювання ступеня судинного ушкодження тварин з ХА. Однак, ще належить вивчити на якій стадії, в який момент розвитку ХА судинні фактори вносять найбільший внесок у ХА [149]. Безсумнівно окремо вивчені ланки одного патологічного нейродегенеративного процесу у тварин з різними експериментальними моделями ХА, такі як: ушкодження судин, окислювальний стрес, гіпоксія, дисфункція мітохондрій - є ключовими моментами збільшення ураження нервової тканини головного мозку неправильно згорнутими

патологічними білками та порушенням в обміні нейротрансмітерів. Проте, актуальним є вивчення ролі судинного чинника не в мережі патологічних подій, а в їх каскаді, тобто вивчення причино-наслідкового взаємозв'язку, глибшого розуміння послідовності подій, одним з яких є судинна подія, при розвитку та прогресуванні ХА.

#### **1.4 Місце мезенхімальних стовбурових клітин в корекції патологічних процесів при хворобі Альцгеймера та механізми реалізації їх терапевтичних ефектів**

Сучасні стратегії лікування засновані на вплив на окремі патологічні механізми хвороби Альцгеймера. Іншими словами, парадигма сучасних терапевтичних підходів у лікуванні ХА – «одні ліки – одна мета» [150].

Багато зусиль було спрямовано на розробку антиамілоїдогенної терапії, заснованої на інгібуванні надмірного формування та агрегації бета-амілоїду та полегшенні його виведення з мозку [151]. Так, клінічні випробування з препаратами, що блокують  $\beta$ - та  $\gamma$ -секретази, зазнавали невдач через безліч небажаних побічних реакцій та відсутності позитивних ефектів [68, 152]. Для прискорення кліренсу бета-амілоїду до клінічного випробування схильні активна імунотерапія, що не дала позитивних результатів через часті аутоімунні реакції, і пасивна імунізація моноклональними антитілами, ефекти якої досі вивчаються [153, 154].

Стратегія «антитау» також має такі ж підходи до зменшення кількості патологічного тау-протеїну, як і антиамілоїдогенна терапія. У зв'язку з тим, що існує прямий зв'язок між прогресуванням когнітивних порушень та формуванням тау-протеїнів/нейрофібрилярних клубків, націлення на цей патологічний процес є дуже актуальним. Однак, більшість клінічних випробувань поки що були перервані через неефективність препаратів і проводяться подальші вивчення застосування даної стратегії у боротьбі з прогресуванням ХА [155].

Іншою цікавою терапевтичною мішенню ХА служить алель  $\epsilon 4$  гена АРОЕ, зниження її експресії, зміна її патологічної структури, функцій шляхом ліпідизації, а також інгібування взаємодії з амілоїд-пептидним фрагментом [156-158].

Також розробляється нейропротективна терапія, спрямована на нейрозапалення та окислювальний стрес, а також покращення нейротрофіки шляхом стимуляції взаємодії нейротрофінів з Trk-рецепторами нейронів [159, 160].

Основна симптоматична терапія інгібіторами ацетилхіолінестерази (Донепезил) та NMDA-рецепторів (Мемантин), а також їх комбінація (Намзарик) дає тимчасове покращення когнітивного та функціонального статусу у пацієнтів з легкою та помірною ХА. Однак, при тривалому застосуванні цих препаратів їхня ефективність знижується, розвиваються побічні реакції [161, 162].

Виходячи зі стандартних вищезазначених підходів витікає, що лікування ХА, як багатofакторного і патогенетично складного захворювання, вимагає одночасного впливу на різні мішені ХА і на ранніх стадіях ХА, коли ще є можливість зворотності процесу [163].

У зв'язку з цим особливий інтерес викликаний терапією стовбуровими клітинами, яка є багатонадійною, ефективною, безпечною терапевтичною стратегією для нейродегенеративних захворювань, у тому числі і ХА [20].

Стовбурові клітини отримують із внутрішньої клітинної мембрани бластоцитів через 5-6 діб від моменту запліднення яйцеклітини (ембріональні), з абортівного матеріалу на терміні гестації 9-12 тижнів (фетальні), постнатально з червоного кісткового мозку, жирової тканини та інших тканин (стромальні), а також шляхом індукції плюрипотентності у соматичних клітинах. Кожні з цих клітин мають свою потентність, тобто здатність диференціюватися. Наприклад, ембріональні стовбурові клітини мають плюрипотенність і диференціюються в клітини ентодерми, мезодерми та ектодерми. Фетальні клітини та мезенхімальні стовбурові клітини – мультипотентні та диференціюються у певні види клітин усередині однієї тканини. Існують олігопотентні клітини попередники, які диференціюються у клітини кількох типів, а уніпотентні – у клітини одного клітинного типу. Слід зазначити, що ембріональні та індуквані плюрипотентні

стовбурові клітини не можуть бути безпосередньо використані в терапії багатьох захворювань через високу онкогенність, а фетальні стовбурові клітини не рекомендують використовувати за етичними принципами. Мезенхімальні стовбурові клітини, володіючи меншою потентністю та проліферативним потенціалом, є легкодоступними та менш онкогенними [164]. Докладніше обґрунтування використання саме мезенхімальних стовбурових клітин у лікуванні ХА описано нижче.

Так, плюрипотентні ембріональні стовбурові клітини мають потужні нейротрофічні та регенераторні ефекти. Однак, при застосуванні даних клітин є ризик імуногенного відторгнення, неконтрольованого зростання клітин, що небажано при їх використанні [165].

Використання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин не тільки з метою моделювання ХА, але й для лікування даного захворювання, також небезпечно через збереження епігенетичних мутацій донорських клітин, імуногенних та онкогенних властивостей [166, 167].

Нейральні стовбурові клітини (NSC) з низьким ризиком імуногенності та онкогенезу, при місцевій трансплантації створюють відповідне мікросередовище для нейронів, що вижили, і підтримки їх функціонування, одночасно покращуючи нейрогенез, синаптогенез та когнітивні функції [168]. У той самий час зрілі нейрони обмежують генерацію і правильне диференціювання NSC. Також вміст введених NSCs у тканини головного мозку з віком знижується [169].

З мультипотентних клітин для лікування ХА вчені рекомендують використовувати мезенхімальні стовбурові клітини (MSC) [170]. Маючи різне походження з пуповинної крові, червоного кісткового мозку, жирової тканини, дані клітини здатні до самооновлення, проникають через гематоенцефалічний бар'єр до ушкоджених структур мозку і можуть вводитися внутрішньовенним шляхом, не викликаючи реакції імуновідторгнення і неконтрольоване зростання нових малодиференційованих клітин [171, 172].

Потрапляючи в організм, MSC можуть взаємодіяти з ділянкою ураження трьома способами: шляхом повного диференціювання в клітини спеціалізованої



тканини, шляхом злиття з клітинами та через паракринні ефекти. Останнім часом обговорюється, що MSC здатні до трансдиференціювання, тобто можливості диференціюватися у клітини інших зародкових листків [173]. Однак, із усіх загально взятих MSC лише невелика кількість продукують маркери нейтрального диференціювання та їх здатність повністю диференціюватися в нейрони в тканині головного мозку при нейродегенеративних захворюваннях досі вивчається [19].

Злиття цитоплазм двох клітин відбувається при ушкодженні та запаленні в органах-мішенях та переслідує регенераторний ефект. Так, у клітинах мозку після введення MSC при взаємодії з нейральними прогеніторними клітинами були виявлені мультиядерні клітини [174]. Проте внесок стовбурових клітин у процеси злиття складно оцінити, тому що багато робіт вказує на регенераторний ефект MSC не через злиття з клітинами, а через паракринні ефекти, тобто через продукцію різних трофічних та нейропластичних факторів.

Доведено, що в умовах ушкодження, запалення, гіпоксії MSC секретують ангіогенні фактори, сприяючи оптимальній неоваскуляризації при ішемії [175]; антиапоптотичні фактори, збільшуючи рівень інгібіторів апоптозу Bcl-2, фосфорильованої форми протеїнкінази (Akt), інгібітора активатора плазміногену-1 (PAI-1) у нейронах [176].

Крім того, MSC, отримані з червоного кісткового мозку, активуючи M2-мікроглію, мають протизапальні та антиамілоїдогенні властивості, підвищують регуляцію нейропротекторних медіаторів [21, 22]. Недоліком MSC служить їхня неконтрольована поширеність по ділянках ураження в моделях ХА у старих тварин, що призводить до низької ефективності і вимагає подальших досліджень їх міграційних здібностей та регулювання поширеності [177].

В дослідженнях нейрохірургів, співробітників Харківського національного медичного університету, у щурів з моделлю паркінсоноподібного синдрому після одноразового внутрішньовенного в дозі 300 000 MSC на одного щура, міченого зеленим флюорохромом, спостерігалася міграція даних клітин до ушкодженого органу, тобто до головного мозку, із відновленням рухових функцій [23].

Беручи до уваги дані результати, а також перспективність і великий обхват патогенетичних ланок терапії ХА стовбуровими клітинами, а саме мезенхімальними стовбуровими клітинами з кісткового мозку, в даній роботі нами розглядається можливість застосування даного методу корекції станів, викликаних хронічним введенням скополаміну і нітриту.

Таким чином, боротьба з прогресуючим перебігом хвороби Альцгеймера, не дивлячись на численні дослідження вчених впродовж століття, є актуальним питанням. Багатофакторність хвороби, чутливість нервової тканини та судин головного мозку до шкідливих умов навколишнього середовища, постійні пошуки методів діагностики доклінічної стадії ускладнюють розробку єдиної ефективної терапії хвороби Альцгеймера. Невід'ємна роль дисфункції ендотелію судин в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу, її місце серед інших ланок амілоїдогенезу в головному мозку, як холінодефіцит, мітохондріальна дисфункція, окислювальний стрес, синаптична дисфункція, нейрозапалення, на тлі впливу різних тригерів захворювання стали для нас головним питанням в цій роботі. Також перспективність і великий обхват патогенетичних ланок терапії деменції альцгеймерівського типу стовбуровими клітинами, а саме мезенхімальними стовбуровими клітинами з червоного кісткового мозку, введеними внутрішньовенно, в даній роботі розкриє можливість і доцільність застосування даного методу корекції нейродегенеративних станів.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1 Опис моделей деменції альцгеймерівського типу

Експеримент проводили за участю 80 щурів-самців популяції WAG масою 180-230 гр., яких розподілили на 10 груп (по 8 щурів в кожній групі). Не дивлячись на те, що на ХА більш хворіють жінки та за даними останніх досліджень при вивченні поведінкових реакцій результати щурів-самок в різні періоди естрального циклу та самців майже не відрізняються [178], нами були використані саме самці, тому що у самок адаптація в новій незнайомій ситуації більш ускладнена, рівень дослідницької та активності змінюється в залежності від естрального циклу. Тобто використання самок при моделюванні нейродегенеративних станів може сприяти отриманню хибних результатів при перевірці поведінкових реакцій та когнітивних функцій. Крім того, дослідження поведінкових реакцій були проведені в осінньо-зимовий період о 15-17:00, коли рівень рухової активності та дослідницької діяльності був середнім і стабільним у самців [179]. Всі тварини були розміщені в клітини 41×41×20см (по 4 щура в кожній клітині) при регульованій температурі 20±2°C і вологості 60±10% в стандартних умовах віварію. Щурів годували забалансованою за складом харчовою сумішшю (гранульований комбікорм, овочі, хліб, корми тваринного походження, зерноsumіш) 2 рази на добу та поїли кип'яченою охолодженою водою з поїлок у вільному доступі.

При роботі з експериментальними тваринами керувалися положенням Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 18.03.1986, переглянута і доповнена в 2006 році), Закону України №3447 - IV, ст.26, 31 «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», прийнятих П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013). Комісія з питань етики та біоетики ХНМУ на 8 засіданні 10.10.2018 затвердила, що даний експеримент відповідає біоетичним вимогам Директиви ЄС 2010/63 / EU про захист тварин, Конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних

тварин (ETS123) і не порушує етичних норм в науці і стандартів проведення біомедичних досліджень.

В експерименті були використані дві нетрансгенні моделі деменції альцгеймерівського типу: скополамін-індукована (холінодефіцитина) та нітрит-індукована (судинного походження).

Відомо, що скополамін блокує взаємодію ацетилхоліну з М-холінорецепторами та при хронічному введенні сприяє активації ацетилхолінестерази (АХЕ) з подальшим розвитком холінодефіциту, що є однією з основних ланок патогенезу ХА [180]. Беручи за основу рекомендації Міронова А.Н. по проведенню доклінічних обстежень ліків [181] та наукові праці Дейко Р.Д. та інших авторів [67, 182-183] в нашому експерименті щурам популяції WAG вводили внутрішньоочеревинно водний розчин скополаміну бутілброміду (Scop) в дозі 1 мг/кг одного щура 1 раз на день щодня впродовж 14 та 28 днів. В роботах Міронова А.Н. для розвитку деменції щурам вводили скополамін впродовж 21 дня, але нами була використана ця модель в модифікації Дейко Р.Д., де введення скополаміну (Sigma, США) було більш довготривалим (впродовж 27-28 днів) [184]. Для оцінювання реалізації моделі проводили порівняння змін в поведінкових реакціях, когнітивних здібностях, судинах та нейропелі головного мозку, визначали роль судинного фактора в розвитку та прогресуванні деменції в умовах холінодефіциту в різні періоди хвороби: не тільки в кінці експерименту (після 28 днів), але й в середині експерименту (після 14 днів ін'єкцій). Відомо, що скополамін (гіосцін) бутілбромід не проникає через ГЕБ і не впливає на центральну нервову систему в терапевтичних дозах у людей. Незважаючи на це, відомі клінічні випадки, коли після внутрішньом'язового введення цієї речовини під час ендоскопії верхніх відділів шлунково-кишкового тракту у пацієнтів розвивався центральний антихолінергічний синдром з розвитком антероградної амнезії [185]. Через те нами було використана саме ця речовина.

Для визначення ролі судинного фактора в патогенезі ХА в умовах холінодефіциту нами була створена нітрит-індукована модель деменції, де саме ендотеліальна дисфункція, викликана хронічним введенням нітриту натрію, є

пусковим фактором розвитку цієї хвороби. Таким чином, порівнюючи ці дві моделі, виникає можливість з'ясувати місце дисфункції ендотелію судин на різних етапах розвитку ХА.

Деменцію альцгеймерівського типу судинного походження (нітрит-індуковану деменцію) моделювали внутрішньоочеревинним введенням водного розчину нітриту натрію (Nitr) в дозі 50 мг/кг на одного щура щодня. Строки введення цього розчину були такі ж самі, як і при введенні Scop. Однак, в розробленій моделі гемічна гіпоксія, ендотеліальна дисфункція та когнітивні порушення з субендотеліальним відкладенням амілоїду вже були виявлені через 14 днів ін'єкції Nitr [18]. Тому ще більш цікавим стало визначення ступеня важкості цих порушень після 28 днів ін'єкцій Nitr, порівнюючи з порушеннями в нервовій тканині ГМ після 28 днів введення Scop.

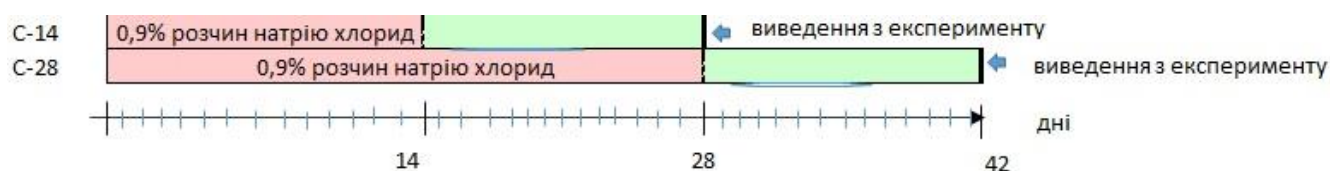
Контрольна група тварин (гр. С) отримувала внутрішньоочеревинні ін'єкції 0,5 мл 0,9% водного розчину натрію хлорид впродовж 14 та 28 днів.

Окрім оцінювання стану патологічних процесів у тканині ГМ у щурів з експериментальною деменцією альцгеймерівського типу, актуальним було питання регенерації ушкоджених структур ГМ, як самостійної, так і після введення стовбурових клітин. Тому половина тварин в нашому експерименті отримувала одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин (MSC), мічених GFP (green fluorescein protein), в дозі 500 тис. клітин на одного щура відразу після останнього дня ін'єкцій Scop або Nitr в різні періоди експерименту. За рекомендаціями Щегельської О.А. та спираючись на досвід наших колег нейрохірургів, які моделювали паркинсоноподібний синдром у щурів і також вводили MSC, була вибрана саме така кількість клітин, достатня для запуску відновлювальних процесів у тканині ГМ, та 14 днів для того, щоб клітини мігрували до органів-мішеней і почали репаративні процеси [186]. Виведення тварин з експерименту відбувалося через 14 днів «періоду регенерації» після останнього дня ін'єкцій Nitr/Scop або MSC методом миттєвої декапітації, щоб оцінити одночасно ступінь ушкодження і регенераторні можливості судин і нервової тканини ГМ у щурів, оскільки регенерація почалась після першого дня

ушкодження та продовжувалась, навіть коли в період з 14 по 28 день ушкоджуючий фактор був прибраний. Кров збирали в стерильні EDTA VACUTAINER пробірки, ГМ витягували для приготування гістологічних зрізів.

Отже, нами були створені такі експериментальні групи, де «14» та «28» – це 14 та 28 днів ін'єкцій препаратів:

1. Групи контролю (гр. С) отримували внутрішньоочеревинні ін'єкції 0,5 мл 0,9% водного розчину натрію хлориду (NaCl) щодня протягом 14 (C=14, n=8) та 28 днів (C-28, n=8) (рис. 2.1). Групи C-14 та C-28 об'єднували в групу С у випадку отримання однакових результатів досліджуваних параметрів.

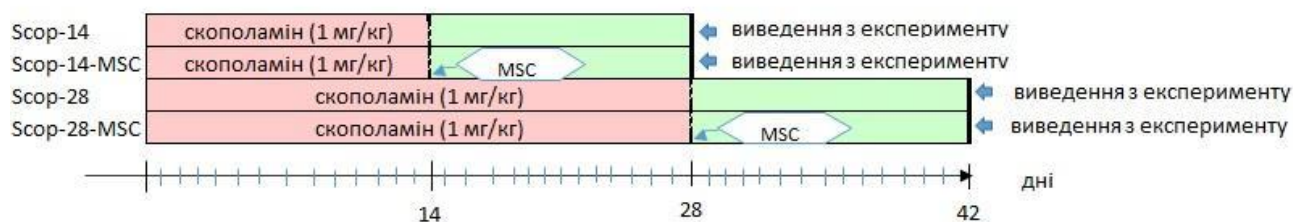


**Рис. 2.1.** Групи контролю.

2. Групи щурів зі скополамін-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу отримували внутрішньоочеревинні ін'єкції водного розчину скополаміну бутілброміду (Scop) в дозі 1 мг/кг щодня протягом 14 та 28 днів:

Scop-14 (n=8) та Scop-28 (n=8);

Scop-14-MSc (n=8) та Scop-28-MSc (n=8) – отримували одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин (MSc) у дозі 500 тис. клітин на одного щура після останнього дня ін'єкцій Scop (рис. 2.2).

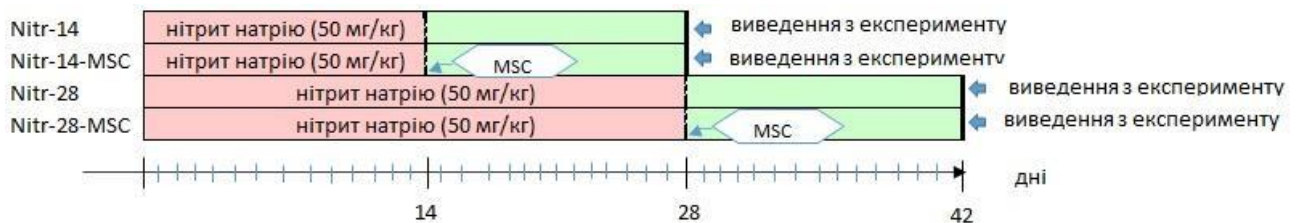


**Рис. 2.2.** Групи щурів зі скополамін-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу.

3. Групи щурів з нітрит-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу отримували внутрішньоочеревинні ін'єкції водного розчину нітриту натрію (Nitr) в дозі 50 мг/кг щодня протягом 14 та 28 днів:

Nitr-14 (n=8) та Nitr-28 (n=8);

Nitr-14-MSC (n=8) та Nitr-28-MSC (n=8) – отримували одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин (MSC) у дозі 500 тис. клітин на одного щура після останнього дня ін'єкцій Nitr (рис. 2.3).



**Рис. 2.3.** Групи щурів з нітрит-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу (судинного походження).

## 2.2 Методи оцінювання поведінкових реакцій та когнітивних функцій у щурів з експериментальною моделлю деменції альцгеймерівського типу

Оцінювання поведінкових реакцій проводили за допомогою тесту «Відкрите поле» (ВП). У віварії ХНМУ відкрите поле являє собою круглу камеру білого кольору зі стінками висотою 50 см. На дні камери намальована сітка чорного кольору, що складається з 42 квадратів, з них 25 квадратів розташовані всередині, а всі інші, зовнішні квадрати, стикаються зі стінками. У місцях перетину квадратів і на стінках розташовані круглі отвори, так звані «норки». При проведенні ВП в темній дослідній кімнаті над полем вмикали світло, щура поміщали в центр поля та впродовж 300 секунд (5 хвилин) фіксували різні показники поведінки о 15-17:00 до початку ін'єкцій фізіологічного розчину/Scop/Nitr/MSC («початок»), відразу після ін'єкцій («кінець»), через 14 днів «періоду регенерації» після останніх ін'єкцій препаратів («регенерація»).

Зазвичай, під час проведення ВП оцінюються такі параметри, як: кількість пересічених квадратів (квадр), стійок, болюсів (бол), грумінгу, знаходження в центрі або на периферії, кількість заглядань у норки (норки). Найбільш яскравим показником дослідницької активності є заглядання в норки, а локомоторної активності – пересічені квадрати. Для оцінювання емоційного стану найбільш показовим параметром є така вегетативна реакція, як дефекація (кількість болюсів), яка відображає тривожність, занепокоєння тварини. Саме низька рухова активність і підвищена дефекація є складовими підвищеної емоційної реактивності. Грумінг (умивання) також відображає рівень тривожності, але цей показник не є таким специфічним, як дефекація. Кількість стійок різні автори оцінюють по-різному: як показник рухової або як неспецифічний показник дослідницької активності [187, 188]. В нашому експерименті ми використовували кількість пересічених квадратів, болюсів та заглядань у норки, тому що це, на нашу думку та думку інших авторів, найбільш характерні показники дослідницької активності та емоційної реактивності щурів у тесті «ВП».

Когнітивні функції були оцінені за допомогою двох тестів: «Умовний рефлекс пасивного уникання» (УРПУ) та «Екстраполяційне позбавлення» (ЕП) 1 раз через 14 днів «періоду регенерації».

Відомо, що гризуни завжди шукають темне місце, де можна сховатися або перебувати впродовж тривалого періоду часу. В тесті «УРПУ» у щурів повинен сформуватися умовний рефлекс уникання темної камери, де їй наносять навчальне електробольове роздратування струмом 5 разів силою 0,45 мА і тривалістю 1 сек кожний. Тобто при пасивному униканні тварина навчається уникати шкідливих факторів після того, як її звичайну поведінку (перехід в темну камеру) штучно пригнічують (нанесенням роздратування електричним струмом). Установка УРПУ складається з двох камер, які між собою з'єднані переходом-отвором 6\*6 см зі гільйотинними дверима. Світла камера складається з білих стінок та висвітлюється лампою потужністю 60 Вт. Темна камера 39\*39\*39см має електродну підлогу та чорні стінки [181, 189-190]. При проведенні тестування щура поміщали задньою частиною тулуба до дверей у світлу камеру та впродовж 180 сек (3хв) спостерігали



за ним, держачи двері до темної камери відкриті. Як тільки тварина переміщувалась до темної камери, двері закривались і наносилось електричне роздратування, сила якого не протирічить етичним принципам і допущена в експериментальному дослідженні. Через 24 години у той же час (15-17:00) щура знову поміщали в світлу камеру й впродовж 180 сек спостерігали за переміщенням щура. Якщо він залишався весь період в світлій камері, значить він «запам'ятав», що в темній камері небезпечно, тобто у нього сформувався умовний рефлекс і він тест пройшов (1). Якщо щур все рівно перейшов в темну камеру, де повторно вже не отримував роздратування електричним струмом, значить умовний рефлекс не сформувався и він тест не пройшов (0).

В тесті «ЕП» вивчається активне уникання стресової ситуації, коли щур, занурений у воду кімнатної температури, за 120 сек повинен піднирнути під нижній край циліндру та вивільнитися з відра води й чим швидше він це зробить, тим краще когнітивні здібності. При проведенні тестування у відро діаметром 35 см, висотою 40 см наповнюється вода на глибину 17,5 см від дна. Посередині розташовується циліндр, поглиблений у воду на 2 см. Зверху через циліндр опускається щур у воду. Якщо він намагається вивільнитися через верх або нічого не робить та просто плаває, значить він не пройшов тест (0). Якщо щур піднирює під нижній край циліндра, значить він пройшов тест (1) [181, 191].

### **2.3 Біохімічні методи аналізу крові та гомогенатів головного мозку щурів**

З біохімічних показників, які оцінюють стан ендотелію, в краніальній артеріо-венозній крові було вивчено два показники, що характеризують ступінь ушкодження і дисфункцію ендотелію (ЕТ-1 - ендотелін-1, (пг/мл) в сироватці та vWF - фактор фон Віллебранда, % в плазмі крові), один з факторів, який відображає компенсаторні можливості ендотеліоцитів (eNOS - ендотеліальна синтаза оксиду азоту, (пг/мл) в сироватці), і фактор, який вказує на регенераторні можливості ендотелію (VEGF-A – фактор росту ендотелію судин А, (пг/мл) в сироватці).

Концентрації ET-1, VEGF-A та eNOS в сироватці крові визначали імуноферментним методом, використовуючи стандартні набори реагентів (Elabscience, Wuhan, Hubei, China, 2019). Вимірювання оптичної щільності проводили на напівавтоматичному імуноферментном аналізаторі STAT FAX 303+.

Визначення рівня vWF було засновано на агрегації ристоміцином фіксованих формаліном тромбоцитів в плазмі крові, отриманих від щурів, фотометричним методом з використанням спектрофотометра Solar PV12521 (Білорусія) [192-194].

Для оцінювання ступеня гіпоксії, викликаной введенням нітриту натрію і скополаміном, був використаний такий біохімічний показник, як вміст 2,3-дифосфогліцерату (2,3-ДФГ) - фізіологічного ліганду гемоглобіну в еритроцитах, який сприяє звільненню кисню з гемоглобіну поблизу тканин, які страждають від дефіциту кисню. Вміст 2,3-ДФГ (мкмоль/мл) визначали за різницею концентрації фосфору в фільтраті безбілкового гемолізату еритроцитів спектрофотометричним методом з використанням спектрофотометра Solar PV12521 (Білорусія) [195].

Також був використаний гомогенат ГМ, який швидко витягували та охолоджували в середовищі виділення, висушували фільтрувальним папером. Відокремлювали півкулі, подрібнювали ножицями в ступках на льоду. Навіску подрібненої тканини (0,5 г) поміщали в скляний гомогенізатор Поттера з тефлоновим товкачиком. Гомогенізували з середовищем виділення на холоді (5 мл) в гомогенізаторі 30 секунд (швидкість обертання 1000 оборотів за хвилину, прозір скло-тефлон 0,2 мм). Середя виділення містила 0,32 М сахарози в 0,025 трис-НСІ буфері, що містить 0,2 мМ трилон Б (рН 7,4). Отриману суспензію центрифугували 15 хв, при 1500 об/хв, частину надосадової рідини використовували для біохімічних досліджень. Іншу частину використовували для виділення мітохондрій [196].

Відомо, що в умовах гіпоксії активується перекисне окислення ліпідів мембран, що призводить до зміни концентрації в них нативних фосфоліпідів. Найважливішим ліпідом мітохондріальних мембран, що грає ключову роль в сполученні роботи окислювальних комплексів дихального ланцюга є кардіоліпін - фосфоліпід внутрішньої мембрани мітохондрій. Виділення мітохондрій з

головного мозку проводили методом диференціального центрифугування [197]. Екстракцію мітохондріальних ліпідів проводили за методом Bligh E. [198]. Поділ ліпідів на фракції проводили методом тонкошарової хроматографії на сілікогелевих пластинах Silufol (Чехія). Для поділу кардіоліпіну і фосфатидної кислоти використовували діетиловий ефір (1 система) і хлороформ/метанол/крижана оцтова кислота/вода в співвідношенні (за обсягом) 80: 25: 8: 0,3 (2 система) [199]. Ліпіди виявляли в парах йоду, ідентифікували шляхом порівняння зі стандартом. Вміст кардіоліпіну (нмоль/мг білка) визначали за методом Bartlett G. [200].

Крім того, в умовах гіпоксії в клітинах і тканинах відбувається низькоенергетичний зсув в аденіловій системі, тобто знижується інтенсивність енергетичного обміну, а також синтез і транспорт ацетилхоліну. Інтегральним показником рівня енергетичного обміну в тканинах є вміст АТФ. Вміст ацетилхоліну (АХ) (мкг/г) і АТФ (мкмоль/г) в гомогенатах головного мозку визначали спектрофотометричними методами [199, 201].

В умовах холінодефіциту в скополаміновій моделі та гемічної гіпоксії, ендотеліальної дисфункції в нітритній моделі для нас було важливим визначення параметрів прооксидантно-антиоксидатної системи в гомогенатах головного мозку: активність антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази (СОД, у.о./мг білка), каталази (мк кат/г білка) та рівень ТБК-активних речовин (нМ/г білка), які формуються при розпаді поліненасичених жирних кислот активними формами кисню. Активність СОД визначали за методом, описаним Костюк В.А. і співавт., заснованому на здатності СОД, що міститься в гомогенатах ГМ, гальмувати реакцію спонтанного окислення кверцетину [202]. Активність каталази визначали шляхом вимірювання швидкості утилізації перекису водню з інкубаційного середовища в кольоровій реакції з молібдатом амонію. В основі методу лежить здатність перекису водню утворювати стійкий забарвлений комплекс із солями молібдену. Оптичну щільність експериментальних, контрольних та стандартних зразків вимірювали на порожніх пробірках на спектрофотометрі Solar PV12521 (Білорусь) на довжині хвилі 410 нм [203-205]. Визначення вмісту ТБК-активних

речовин проводили за методом Гаврилова В., вимірюючи концентрацію малонового діальдегіду (МДА), який при нагріванні взаємодіє з 2-тіобарбітуровою кислотою (2-ТБК), утворюючи забарвлений комплекс з максимумом поглинання при  $\lambda = 533$  нм [206].

#### **2.4 Гістологічні та імуногістохімічні методи дослідження структури тканини головного мозку**

ГМ відразу після декапітації тварин виймали з черепної коробки та фіксували в 10% нейтральному формаліні з подальшою заливкою в парафін і виготовленням мікропрепаратів [207]. Зрізи товщиною 5 мкм забарвлювали конго червоним (конго рот) та гематоксиліном (для визначення конгофільних амілоїдних мас та забарвлення ядер клітин), галоціанін-хромовими галунами за методом Ейнарсона (для оцінювання стану ДНК і РНК різних клітин) [208] і бромфеноловим синім (для вивчення окислювальної модифікації білків нейропіля великих півкуль ГМ) в модифікації Давіденко І.С. [209, 210].

Для імуногістохімічного (ІМГХ) дослідження були підготовлені зрізи товщиною 3-4 мкм, які наносили на предметні скельця з високою адгезивною здатністю SuperFrost (Thermo Scientific, США). Після депарафінізації та стандартної обробки в ксилолі та етанолі, зразки кип'ятили на водяній бані в цитратному буфері (рН = 6) при температурі 95-98 °С. Для оцінювання регуляції проліферації ендотеліоцитів нейронами кори тім'яної частки, зони СА1 гіпокампа, в ендотеліоцитах судин мікроциркуляторного русла (МЦР) і в плазмі венозної крові, а також для оцінювання проліферації всіх клітин визначали експресію VEGF та Ki-67 у щурів двох моделей. Для оцінювання клітинної адгезії між клітинами епендими шлуночків, епітелія судинних сплетінь, ендотеліоцитів капілярів і артерій вивчали експресію Е-кадгерину у щурів зі скополаміновою моделлю, тому що саме в цій моделі в умовах холінодефіциту було важливо визначити, чи має місце порушення цілісності судинних стінок. Для виявлення реакції взаємодії антиген-антитіло VEGF, Ki-67 і Е-кадгерину використовували систему детекції

«Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» (Thermo scientific, США) [211].

Дослідження гістологічних та імуногістохімічних препаратів ГМ проводили на бінокулярному мікроскопі Axiostar plus з цифровою фотокамерою ProgRes C10Plus (Zeiss, ФРН), за допомогою якої робили фотографії ділянки мікропрепарату фіксованої площі (0,024 мм<sup>2</sup>) з використанням об'єкта-мікрметра.

Гістологічний опис мікроструктури тканини ГМ був доповнений морфометрією. На мікропрепаратах ГМ, забарвлених конго червоним (та гематоксиліном) та за методом Ейнарсона, рахували кількість ендотеліоцитів (Е) та перицитів (П) капілярів і визначали їх співвідношення (Е/П) для оцінювання стану цілісності судинної стінки та процеси її відновлення в період регенерації.

Для оцінювання морфофункціонального стану відростків нервових клітин (нейропіля) та ендотеліоцитів капілярів великих півкуль ГМ порахували оптичну щільність при забарвленні мікропрепаратів за Ейнарсонем, що відображає вміст РНК у цитоплазмі відростків нейропіля та ДНК у ядрах ендотеліоцитів [212].

Середні значення рівнів оптичної щільності ядер ендотеліоцитів і цитоплазми відростків нейропіля визначали у програмі растрового графічного редактора GIMP (програма маніпуляції зображеннями GNU). Оптичну щільність (D) розраховували за формулою  $D = -\lg I_o/I_f$ , де  $I_f$  - інтенсивність світлового потоку фону (тобто ділянки без тканини),  $I_o$  - інтенсивність світлового потоку ділянки, що вивчається. Визначали інтенсивність світового потоку (яскравість кольору) в червоній зоні спектра, бо середні значення були найбільші саме в червоній зоні спектра в порівнянні з синьою та зеленою [213].

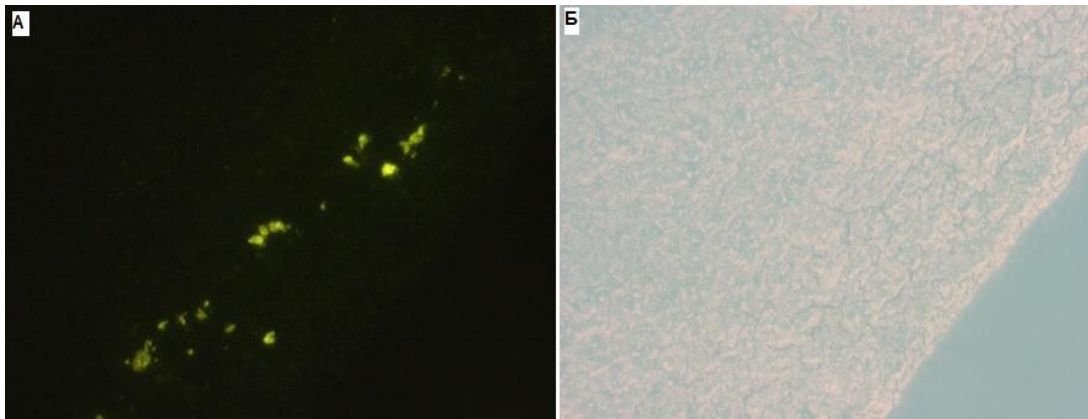
На мікропрепаратах поверхневої білої речовини великих півкуль ГМ, забарвлених бромфеноловим синім, були виміряні середні значення яскравості кольору в червоній (R) і синій зоні спектра (B); визначали співвідношення R/B, за яким судили про рівень окислювальної модифікації білків нейропіля. Визначали оптичну щільність нейропіля поверхневої білої речовини півкуль головного мозку в синій, червоній, зеленій зонах спектра світла.

Рахували середні значення рівнів оптичної щільності VEGF, що відображає експресію визначаємого антигена. Експресію E-кадгерину та Ki-67 оцінювали за наявністю на гістологічних зрізах.

## **2.5 Отримання мезенхімальних стовбурових клітин з червоного кісткового мозку та оцінювання їх міграції**

Первинна культура MSC була отримана з червоного кісткового мозку стегнової кістки лабораторного щура-самця популяції WAG. Суспензії промивали сольовим розчином Хенкса, центрифугували при 450 g протягом 10 хв і поміщали в колби для культивування ємністю 75 см<sup>2</sup> при щільності 4x10<sup>5</sup> клітин/см<sup>2</sup> в середовищі Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM/F12 (1/1), що містить 2 mM L-глутаміну, 10% фетальну бичачу сироватку (Fetal Bovine Serum, FBS) (SIGMA-ALDRICH, F7524) і 2 µl/ml розчину антибіотика-антимикотика (Antibiotic Antimycotic Solution) (SIGMA-ALDRICH, A5955). Середу з неадгезованими клітинами відкидали через 24 години культивування, а свіжу середу додавали до адгезованих фібробластоподібних MSC. Їх культивували при 37°C і 5% CO<sub>2</sub> на повітрі в CO<sub>2</sub>-інкубаторі протягом 14 днів, середу міняли кожні 3 дні. Всі реактиви були виготовлені фірмою SIGMA-ALDRICH (США). Для маркування клітинної суспензії MSC маткові розчини (1 мг/мл) флуорохромів DiO C18 (зелений, λ<sub>em</sub> = 513 нм) в диметилсульфоксиді розводили в 100 разів розчином Хенкса. Потім клітини ресуспендували в 2 мл робочого розчину барвника та інкубували при температурі 37 °C протягом 30 хв. Далі впродовж 10 хв при швидкості 430 g клітини осаджували та потім знову ресуспендували в свіжому розчині Хенкса. Після оцінювання якості забарвлення MSC на предметному склі за допомогою люмінесцентного мікроскопа AxioStar Plus, частину мічених клітин розсівали в чашки Петрі для культивування та знову оцінювали ступінь флуоресценції мічених клітин через 1 і 2 тижнів [23]. Отримані GFP-мічені MSC в дозі 500тис. клітин в 500 мкл розчину Хенкса вводили інсуліновим шприцом в хвостову вену щура одноразово.

Оцінювали міграцію мічених GFP MSC в головний мозок, печінку, нирки, червоний кістковий мозок в двох моделях. Зразки цих органів розміром 2 см<sup>3</sup> взяли у щурів на 14-15ий день після трансплантації клітин і транспортування на льоду до лабораторії, де кріорозрізи товщиною 20-25 мкм були виготовлені з використанням заморожувального мікротома МК-25 (РФ). На кожному слайді було розміщено 10–15 кріорізів. З кожного органу готували 100–120 надрізів. Кісткові мазки червоного кісткового мозку були зроблені з кістки стегнової кістки всіх тварини. Наявність та розповсюдження флуоресцентних клітин на кріозрізах тканин та мазках кісткового мозку оцінювали за допомогою люмінесцентного мікроскопа Axioscope 40 (Carl Zeiss, Німеччина) зі збільшення 50 (пряме світло) та 400 (люмінісценція). Використовувалася програма Instudio для реєстрації мікрофотографії [214]. Зафіксовано, що MSC, мічені GFP, розташовані попарно чи у форм ланцюжків в червоному кістковому мозку, тканині головного мозку, в паренхимі печінки та судинах нирок (рис. 2.4).



**Рис. 2.4.** Мічені зеленим флуорохромом (GFP) MSC кісткового мозку у в структурі головного мозку щурів гр. Scp-28-MSC через 14 днів після їх внутрішньовенного введення. А - люмінесцентна мікроскопія; Б – світлова мікроскопія.  $\times 100$ .

## 2.6 Статистичний аналіз отриманих результатів

Оцінювання нормальності розподілу вибірки проводилася за допомогою тесту Шапіро-Уїлкі. За його результатами були використані непараметричні тести для порівняння незалежних груп змінних. Для оцінювання відмінностей між п'ятьма та більше незалежними групами в дослідженні був обраний односторонній дисперсійний аналіз Краскела-Уолліса і тест множинних порівнянь Данна. Описова статистика включає розраховані середні значення (Mean) та стандартну похибку середнього (SEM, standart error of mean). Якщо значення  $P$  були нижче 0,05, різниця була статистично значущою. Всі чисельні дані були проаналізовані з використанням GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., Каліфорнія, США) і статистичного пакета для соціальних наук (SSPS) [215, 216].

Для аналізу поведінкових реакцій в тесті «ВП» використовували однофакторний дисперсійний аналіз. Він дозволяє порівнювати середні значення залежних груп змінних однієї групи тварин і виявляти вплив фактора на результат. Фактор, який впливає на результат – час, тобто у щурів в кожній групі оцінювали зміни кількості заглядань у норки, пересічених квадратів, болюсів в різні періоди експерименту («початок», «кінець», «регенерація»). Для оцінювання коректності результатів та можливості проведення однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) спочатку розраховується критерій однорідності дисперсій Левеня. При  $p > 0,05$  дисперсії для кожної групи не відрізняються, тобто результати ANOVA можуть бути визнаними коректними. При  $p < 0,05$  достовірно значимі відмінності є, дисперсії є неоднорідними та встановити достовірну відмінність середніх значень групи в різні моменти часу при проведенні ANOVA буде некоректним. Тестування ANOVA показує статистичну значущу динаміку результатів досліджень (різних параметрів поведінкових реакцій) при  $p < 0,05$ .

При оцінюванні когнітивних порушень в тетах «УРПУ» та «ЕП» були враховані такі дані: 1 – тест пройшов (сформувався умовний рефлекс в УРПУ або щур вплив з-під нижнього краю циліндру в ЕП), 0 -тест не пройшов. Вихідні дані представлені різними особами, що робить їх незалежними вибірками. Дані -



нечислові (0 або 1), тому обраний непараметричний тест множинних порівнянь Краскела-Уоліса, заснований на рангах. Нульова гіпотеза: всі 5 вибірок мають однаковий розподіл і середні значення вибірок рівні між собою. Альтернативна гіпотеза: нульова гіпотеза невірна. При асимптоматичній значимості отриманого  $\chi^2$ -критерію  $p < 0,05$ , що відкидає нульову гіпотезу про рівність середніх, групи різні між собою [217].

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. СКОПОЛАМІН-ІНДУКОВАНА МОДЕЛЬ ДЕМЕНЦІЇ АЛЬЦГЕЙМЕРІВСЬКОГО ТИПУ

#### 3.1 Поведінкові реакції та когнітивні функції у щурів групи контролю та зі скополаміновою моделлю

Зовнішній вигляд щурів групи контролю (гр. С-14, С-28) та гр. Scorp-14, Scorp-14-MSС майже не відрізнявся: загальний стан відносно задовільний, шкіряний покрив блідо-рожевий, шерсть охайна з природним блиском, очі звичайного кольору, яскраві. У щурів гр. Scorp-28, Scorp-28-MSС загальний стан погіршився: з'явилися мляві рухи в кінцівках, здавалось, що щури можуть втратити рівновагу та впасти, шкіряний покрив також був блідо-рожевим, але шерсть й очі були без природнього блиску.

В результаті проведення однофакторного дисперсійного аналізу даних поведінкових реакцій в тесті «ВП» у щурів груп контролю тест Левеня показав, що дисперсії всередині груп однакові, тобто проведення тесту ANOVA є коректним. В тесті ANOVA критерій значимості був більше 0,05, що свідчить про те, що час не впливає на зміну показників. Тобто не дивлячись на те, що в гр. С-14, С-28 спостерігається незначне зниження кількості заглядань у норки, можна припустити, що тривале введення ізотонічного розчину натрію хлориду не мало вплив на дослідницьку активність. Значиме зниження кількості пересічених квадратів в гр. С-28 та значиме збільшення кількості дефекацій в гр. С-14 свідчило про те, що хронічне больове роздратування внутрішньоочеревинними ін'єкціями фізіологічного розчину сприяло зниженню рухової активності та збільшенню стресового вегетативного збудження щурів.

У щурів зі скополаміновою моделлю впродовж усіх періодів експерименту («початок» – до ін'єкцій, «кінець» – відразу після ін'єкцій Scorp/MSС, «регенерація» – через 14 днів після завершення ін'єкцій Scorp/MSС) тест Левеня показав велику дисперсію даних з однорідною (однаковою) зміною вибірок в групі Scorp-14, Scorp-

14-MSС (значимість (significant point) $> 0,05$ ), що свідчить про однакове дотримання умов експерименту.

У щурів гр. Scор-14 відзначається достовірне зниження кількості заглядань у норки майже в 3 рази відразу після закінчення ін'єкцій Scор в порівнянні з періодом до початку експерименту. При цьому через 14 днів після завершення ін'єкцій Scор щури майже не заглядають у норки, тобто дослідницька активність продовжує знижуватися, не дивлячись на те, що дія ушкоджуючого фактора припинена. Рухова активність також знижується у щурів цієї групи впродовж всього експерименту. Однак, в період регенерації спостерігається незначне підвищення кількості пересічених квадратів і болюсів. Така зміна кількості пересічених квадратів та болюсів за період регенерації відбувається завдяки припиненню впливу болювого подразника на емоційний стан щурів. Тобто за цей період занепокоєння у щурів знижується, а через 14 днів періоду регенерації декілька знижується і кількість болюсів. Аналогічні за направленістю зміни спостерігаються і у щурів гр. Scор-28. Але ступінь підвищення кількості болюсів або зменшення кількості пересічених квадратів та заглядань у норки більше, ніж у щурів гр. Scор-14.

У щурів гр. Scор-14-MSС також спостерігається достовірне зниження кількості заглядань у норки. Проте після введення MSС в період регенерації в порівнянні з даними від початку експерименту ступінь зниження даного показника менше ніж у щурів, які не отримували MSС, що свідчить про позитивний вплив стовбурових клітин на збереження когнітивних функцій. Слід зазначити, що рівень дефекації за весь період експерименту у щурів гр. Scор-14-MSС майже не змінився, а кількість пересічених квадратів незначно, в 1,5 рази зменшилась. Звідси випливає, що на фоні зниження рухової активності рівень тривожності і занепокоєння не збільшується. Введення MSС у щурів Scор-28-MSС мали деякий інший вплив на рухову та дослідницьку активність. Так, за період регенерації кількість заглядань у норки збільшилась в 1,88 рази, а кількість болюсів зменшилась в 3,2 рази в порівнянні з періодом після закінчення введення Scор та перед ін'єкціями MSС. При цьому локомоторна активність залишилась стабільно низькою в порівнянні з

періодом до введення Scop. Можна припустити, що щури стали менш емоційно реактивними на фоні розвитку захисного гальмування та в них дослідна активність почала відновлюватися після внутрішньовенного введення стовбурових клітин, коли амілоїд в нейропілі та судинах ГМ був вже сформований [187].

Привертає увагу те, що дисперсії даних кількості заглядань у норки у щурів із 28-денною скополаміною моделлю не є рівними, тобто вплив скополаміну в залежності від тривалості введення підтвердити неможливо. Скоріше за всього, тут спрацьовує інший нейрофізіологічний механізм (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Поведінкові реакції, оцінені за допомогою тесту «Відкрите поле», у щурів груп контролю та зі скополамін-індукованою моделлю деменції альгеймерівського типу (Mean±SEM)**

Групи	Досліджувані параметри	Початок	Кінець	Регенерація	Тест Левеня	Тест ANOVA
C-14 (n=8)	квадрати	39,13±6,65	27,75±7,18	16,75±4,04	0,432	0,055
	болюси	0,13±0,13	2,88±0,55	1,88±0,3	0,023	0,000*
	норки	3,25±0,71	3,76±1,1	2,88±0,88	0,805	0,321
C-28 (n=8)	квадрати	39,13±6,65	35,25±1,79	17,25±1,83	0,055	0,003*
	болюси	0,13±0,13	1,63±0,38	2,38±0,46	0,028	0,001*
	норки	3,25±0,7	3,13±0,55	2,63±0,53	0,275	0,74
Scop-14 (n=8)	квадрати	43,5±8,66	29,33±8,65	31,33±11,22	0,471	0,541
	болюси	1,33±0,33	1,67±0,49	1,5±0,62	0,36	0,894
	норки	4,17±0,91	1,33±0,56	0,67±0,49	0,197	0,006*
Scop-14- MSC (n=8)	квадрати	55±5,63	41,75±6,72	35,63±8,08	0,609	0,151
	болюси	2,38±0,5	2,13±0,48	2±0,42	0,554	0,848
	норки	5,88±0,67	3±0,85	2,63±1,16	0,53	0,04*
Scop-28 (n=8)	квадрати	53,17±11,63	33,83±5,97	22,83±4,83	0,093	0,051
	болюси	1,5±0,61	2,5±0,34	1,67±0,43	0,847	0,199
	норки	4,83±1,25	1±0,37	1,33±0,56	0,013	0,008*
Scop-28- MSC (n=8)	квадрати	59,75±4,59	38,88±3,47	36,38±6,47	0,408	0,006*
	болюси	1,63±0,54	1,25±0,42	0,38±0,49	0,345	0,103
	норки	5,25±0,56	2±0,46	3,75±1,28	0	0,043*

\*  $P < 0,05$  – різниця між групами значуща. Оцінювання параметрів поведінки до проведення експерименту («початок»), відразу після експерименту («кінець»),

через 14 тижнів «періоду регенерації» («регенерація»). Кількість пересічених квадратів («квадрати»), болюсів («болюси»), заглядань у норки («норки»).

При оцінюванні результатів у тесті «ЕП» всі зміни когнітивних функцій були значущими. В групі контролю, незалежно від тривалості введення фізіологічного розчину, тільки 37,5% не справилися зі завданням, не винирнули з-під нижнього краю циліндру та намагалися вивільнитися через його верх за допомогою аверсійних рухів та стрибків. В гр. Scop-14 та в гр. Scop-28 навпаки тільки 37,5% здали цей тест. Після введення стовбурових клітин кількість щурів, які пройшли тест, в гр. Scop14-MSС складала 75%, а в гр. Scop-28- MSС – 87,5% (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

**Когнітивні функції, оцінені за допомогою тестів «Екстраполяційне позбавлення», «Умовний рефлекс пасивного уникання», у щурів груп контролю та скополамін-індукованою моделлю деменції альгеймерівського типу**

Тест	Група	1	0	Ранги	Асимптоматична значимість хі-критерію
Екстраполяційне позбавлення (ЕП)	C-14 (n=8)	5	3	30	0,001 < 0,05 – різниця між групами значуща
	Scop-14 (n=8)	3	5	21	
	Scop14-MSС (n=8)	6	2	30	
	C-28 (n=8)	5	3	30	
	Scop -28 (n=8)	3	5	12	
	Scop-28-MSС (n=8)	7	1	24	
Умовний рефлекс пасивного уникання (УРПУ)	C-14 (n=8)	8	0	25	0,255 > 0,05 – різниця між групами не значуща
	Scop-14 (n=8)	5	3	19	
	Scop14-MSС (n=8)	8	0	28	
	C-28 (n=8)	8	0	25	
	Scop -28 (n=8)	2	6	19	
	Scop-28-MSС (n=8)	6	2	31	

\*Примітка. 1 – тест пройшов (сформувався умовний рефлекс в УРПУ або щур вплив з-під нижнього краю циліндру в ЕП), 0 -тест не пройшов. Дані представлені у кількості щурів, які пройшли або не пройшли тести.

В тесті «УРПУ» різниця між даними була незначуща. Так, в групах контролю і в гр. Scor14-MSC у всіх щурів сформувався умовний рефлекс. В гр. Scor-14 37,5% щурів не пройшли тест, а в гр. Scor-28 – 75%. Напроти, після введення MSC 75% щурів з 28-денною моделлю захворювання повторно не пішли зі світлої до темної камери, де їм подавали роздратування електричним струмом (табл. 3.2).

### **3.2 Біохімічні параметри функції ендотелію судин, прооксидантно-антиоксидантної системи, енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну в тканині головного мозку у щурів**

Для оцінки функції ендотелію судин визначали вміст ендотеліну-1 (ET-1), потужного ендотеліального вазоконстриктора, ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS), ендотеліального ферменту, що активує продукцію NO, фактора росту ендотелію судин (VEGF-A) в сироватці крові та вміст фактора фон Вілебранда (vWF), загальноприйнятого критерію ендотеліальної дисфункції, в плазмі крові.

Проведені нами дослідження показали, що у сироватці краніальної артеріо-венозної крові спостерігалось значне підвищення концентрації ET-1 в кожній дослідній групі (гр. Scor-14, Scor-14-MSC, Scor-28-MSC - в 1,42-1,6 разів, Scor-28 – 4,7 разів), порівняно з контрольною групою. Рівень eNOS в крові щурів гр. Scor-14, Scor-14-MSC був достовірно вищим, в порівнянні з групою контролю, а в гр. Scor-28 був найменшим серед усіх груп. Концентрації VEGF-A та vWF були достовірно вищими у всіх групах в порівнянні з групою контролю, за винятком гр. Scor-14-MSC (табл. 3.3).

В гр. Scor-28 рівні ET-1, VEGF-A, vWF в крові були найвищими серед усіх груп та більше, майже в 4,7-, 6,6- і 1,4 рази відповідно, в порівнянні з групою контролю.

Після введення стовбурових клітин в гр. Scor-28-MSC рівні ET-1, vWF в крові були вищими, ніж у контрольній групі, але нижчими, ніж у гр. Scor-28 і приблизно досягали рівнів гр. Scor-14, Scor-14-MSC. Концентрація VEGF-A була

в 3 рази більшою, ніж у контрольній групі, але майже в 2,2 рази нижче, ніж у гр. Scop-28 (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

**Біохімічні параметри стану ендотелію судин щурів зі скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Scop-14 (n=8)	Група (2) Scop-14-MSС (n=8)	Група (3) Scop-28 (n=8)	Група (4) Scop-28-MSС (n=8)
ЕТ-1, пг/мл, сироватка крові	0,87±0,04	1,37±0,15 (С) *	1,24±0,04 (С) *	4,05±0,12 (С) *	1,26±0,03 (С) *
vWF, %, плазма крові	84,37±0,44	90,63±0,57 (С) *	85,15±0,83 (3) *	115,4±4,37 (С, 2) *	89,96±0,42 (С) *
eNOS, пг/мл, сироватка крові	95,96±0,75	107,2±0,93 (С, 3) *	113,1±1,69 (С, 3) *	80,04±0,38 (1, 2, 4) *	100,6±0,75 (3) *
VEGF-A, пг/мл, сироватка крові	39,46±0,54	63,66±0,4 (С) *	58,42±0,27 (3) *	259,3±0,46 (С, 2) *	116,5±0,37 (С) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп (в дужках) статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Паралельно зі змінами показників функціонального стану ендотелію судин організму, в тканині головного мозку щурів через 14 днів після ін'єкцій скополаміну (тобто до моменту морфологічно реєстрованого утворення амілоїду) було зафіксовано зниження активності СОД і каталази при підвищенні концентрації ТБК-активних речовин (табл. 3.4).

На тлі терапії стовбуровими клітинами (у щурів гр. Scop-14-MSС) концентрація ТБК-активних речовин в гомогенаті головного мозку щурів не має статистично значимих відмінностей від такої групи контролю та є нижчою, ніж в гр. Scop-14 (табл. 3.4). У той же час в гр. Scop-14-MSС активність каталази трохи підвищується, в співставленні з такими у гр. Scop-14, але не досягає рівня групи контролю. Активність СОД в гр. Scop-14-MSС та в групі контролю однакова.

В гр. Scop-28 було виявлено підвищення концентрацій ТБК-активних речовин практично вдвічі в порівнянні з групою контролю, гр. Scop-14 та одночасно неухильне зниження активності каталази та СОД у тканині головного мозку. Після введення стовбурових клітин щурам із 28-денною скополаміновою моделлю рівні ТБК-активних речовин, активність СОД і каталази дещо покращилися і майже досягли контрольних значень (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

**Біохімічні параметри прооксидантно-антиоксидантної системи  
головного мозку щурів зі скополамін-індукованою деменцією  
альцгеймерівського типу (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Scop-14 (n=8)	Група (2) Scop-14- MSC (n=8)	Група (3) Scop-28 (n=8)	Група (4) Scop-28- MSC (n=8)
ТБК-активні речовини, нМ/г білка, гомогенат головного мозку	1,82±0,03	2,2±0,07 (С) *	1,86±0,02 (3) *	4,03±0,03 (С, 2) *	2,06±0,04 (С) *
Каталаза, мк кат/г білка, гомогенат головного мозку	224,7±4,43	200,3±1,46 (С) *	208,9±1,37 (3) *	180,7±0,22 (С, 2) *	207±1,28 (С) *
СОД, у.о./мг білка, гомогенат головного мозку	98,31±0,17	91,84±0,15 (4) *	98,3±0,13 (3) *	79,37±0,23 (С, 2, 4) *	99,93±0,24 (1, 3) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп (в дужках) статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

На скополамінової моделі (при блокаді М-холінорецепторів) показано, що рівень ацетилхоліну в гр. Scop-14 не змінювався, в гр. Scop-28- знижувався в 2,1 разів, в порівнянні з таким в гр. С. У той же час рівень ацетилхоліну в гр. Scop-14-MSC перевищував, а в гр. Scop-28-MSC - практично досягав контрольного рівня.



При введенні скополаміну у щурів гр. Scop-14 вміст 2,3-ДФГ в еритроцитах, в порівнянні з контролем, істотно не змінився, в той час як в гр. Scop-28 рівень 2,3-ДФГ достовірно підвищувався, майже в 2 рази в порівнянні з гр. Scop-14-MSС та контролем. Після введення MSС концентрація 2,3-ДФГ в еритроцитах щурів в гр. Scop-14-MSС, Scop-28-MSС зменшувалася і практично досягала рівня відповідних показників гр. С.

Рівень АТФ у головному мозку був достовірно нижче, в порівнянні з гр. С, в гр. Scop-28- в 1,5 рази, а в гр. Scop-14 - в 1,3 рази. Введення MSС щурам практично не дало очікуваних результатів: у щурів гр. Scop-14-MSС, Scop-28-MSС концентрація АТФ у головному мозку залишилася нижче, ніж у щурів контрольної групи (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

**Біохімічні показники енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну у щурів із скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Scop-14 (n=8)	Група (2) Scop-14-MSС (n=8)	Група (3) Scop-28 (n=8)	Група (4) Scop-28-MSС (n=8)
2,3- ДФГ, мкмоль/мл, еритроцити крові	3±0,03	3,5±0,03	3,05±0,03 (3, 4) *	6,1±0,07 (С, 2) *	3,94±0,04 (С, 2) *
Ацетилхолін, мкг/г, гомогенат головного мозку	2,54±0,17	2,48±0,04 (2, 3) *	3,07±0,04 (1, 3) *	1,21±0,09 (С,1,2,4) *	2,49±0,03 (3) *
АТФ, мкмоль/г тканини, гомогенат головного мозку	2,83±0,01	2,19±0,01 (С) *	2,28±0,01 (3) *	1,92±0,01 (С, 2) *	2,24±0,01 (С) *
Кардіоліпін нмоль/мг білка, мітохондрії з головного мозку	51,94±0,06	29,17±0,31 (С) *	29,86±0,08 (С) *	27±0,06 (С, 4) *	39,02±0,08 (3) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп (в дужках) статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

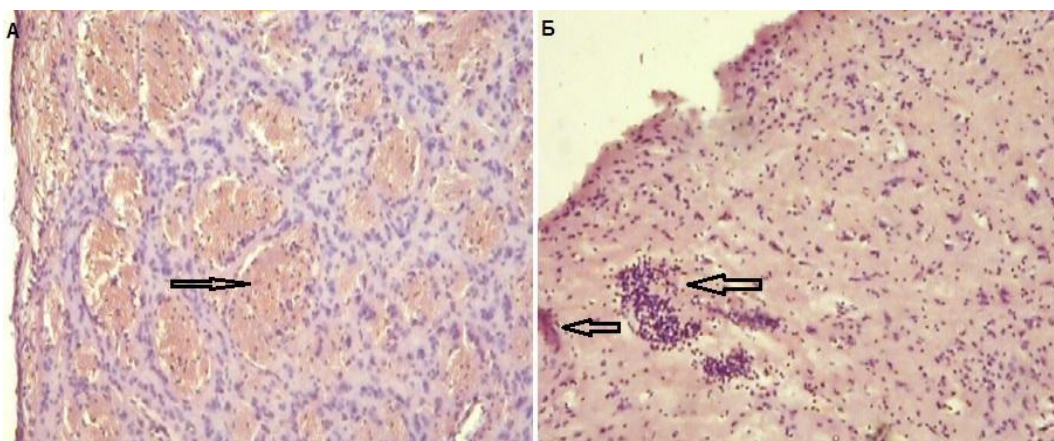
Рівень кардіоліпіну у всіх дослідних групах, окрім Scor-28-MSС, був достовірно нижчий, ніж в гр. С. Однак, після введення стовбурових клітин у щурів гр. Scor-14-MSС рівень кардіоліпіну підвищився до такого, як і в гр. Scor-14, а в гр. Scor-28-MSС – став достовірно вище (в 1,4 рази), в порівнянні з гр. Scor-28 (табл. 3.5).

Отже, порівняльний аналіз показників ендотеліальної функції судин в крові у щурів зі скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу та у щурів контрольної групи виявив, що найбільші зміни вмісту ET-1, vWF, VEGF-A спостерігались у щурів після 28 денного введення скополаміну. Аналогічні за направленістю зміни спостерігались й при оцінюванні прооксидантно-антиоксидантної системи, ступеня гіпоксії та холінодефіциту. Напроти, після 14 денного введення скополаміну відзначались різке зменшення кардіоліпіну та АТФ в гомогенатах головного мозку, порівнюючи з групою контролю, та ці зміни майже не відрізнялись від рівня відповідних показників після 28-денних щоденних ін'єкцій скополаміну. Введення стовбурових клітин сприяло покращенню усіх вищезазначених біохімічних показників як в крові, так і в гомогенаті головного мозку, в найбільшій мірі у щурів з 28-денною моделлю деменції.

### **3.3 Морфофункціональні зміни в тканині головного мозку у щурів**

При препаруванні головного мозку було відмічене важке відокремлювання твердої оболонки мозку від кісток зводу черепа щурів, яким робили ін'єкції скополаміну бутилброміду. При мікроскопічному дослідженні головного мозку щурів були відмічені як зміни нейронів кори, так і зміни нейропіля білої речовини. Нейропіль має сітчасту структуру в ГМ, де перетинаються відростки нервових волокон. В сірій речовині кори ГМ він розташовується між тілами нейронів та гліоцитів, а в білій речовині – між нервовими волокнами та гліальними клітинами. При забарвленні конго червоним та гематоксиліном в групі контролю структура нейропіля – сітчаста, волокниста, блідо-рожевого кольору, з чітко окресленими ядрами. У щурів дослідних груп через 14 днів «періоду регенерації» після дії

скополаміна бутилброміда (ушкоджувального фактора) нейропіль фокально набуває більш гомогенної структури: між нейронами не визначаються нервові волокна. Водночас в гр. Scor-14, і тим більше, у гр. Scor-28, виявлені множинні конгофільні скупчення амیلіодних мас, де-не-де оточених гліальними клітинами (рис. 3.1). Також в корі ГМ, в гіпокампі дослідних груп зустрічаються ділянки з відсутністю нейронів та наявністю порожнин з мікроглією. Збережені нейрони кори ГМ, підкоркових гангліїв та гіпокампа темніші, зменшені в розмірах, де-не-де мають гіперхромні ядра на відміну від нейронів кори ГМ щурів гр. С, де нейрони правильної форми з нормохромними ядрами. Таким чином, було одержано модель амیلіодозу головного мозку з підтвердженням присутності амیلіоду в білій речовині головного мозку конгофільних мас.

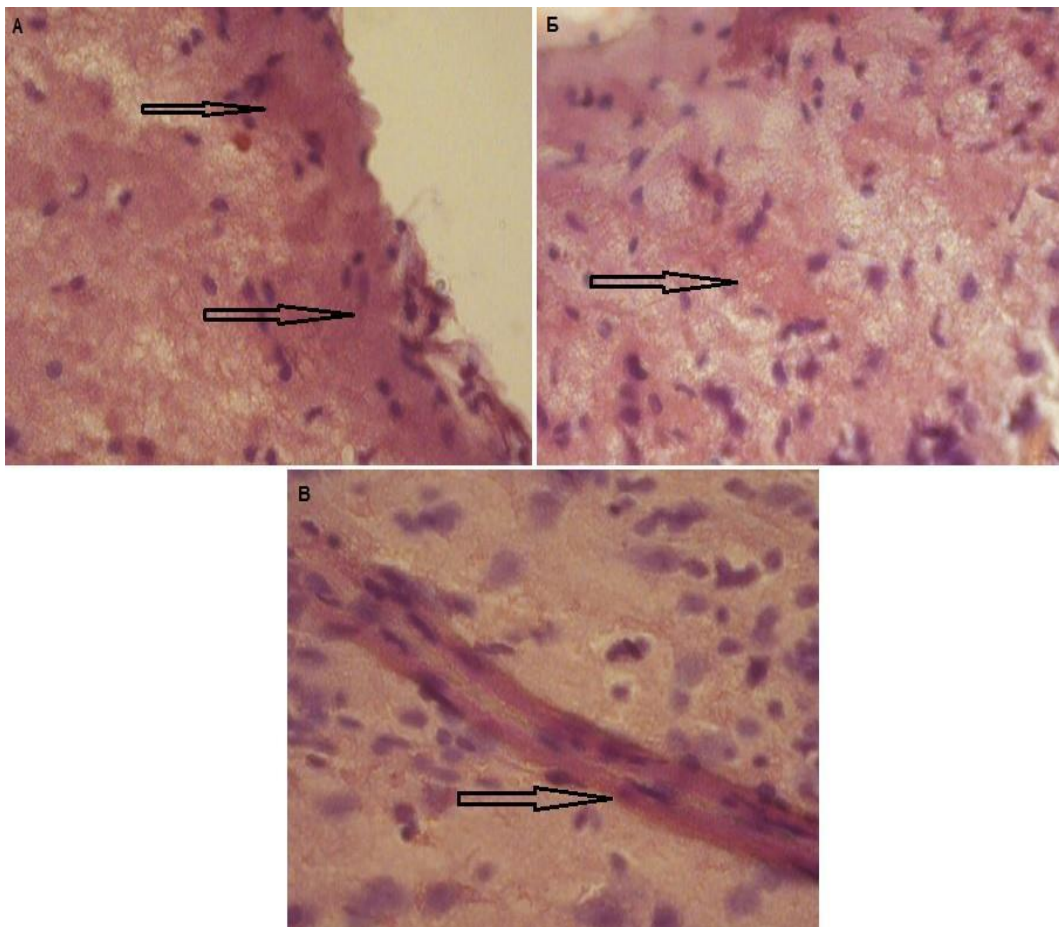


**Рис. 3.1.** А – гр. Scor-28. Конгофільні «пучки» з осередками гомогенізації нейропіля в білій речовині та під корою ГМ. Б - гр. Scor-14. Осередок мікрогліальної інфільтрації в білій речовині ГМ. Забарвлення конго червоним та гематоксиліном.  $\times 100$ .

При забарвленні зразків тканини ГМ щурів конго червоним також було підтверджено присутність амیلіоду в стінці артерій у тварин, які одержували скополамін. В гр. С стінка артерій мала внутрішній шар ендотеліоцитів, середній шар міоцитів та зовнішній шар пухкої волокнистої сполучної тканини блідо-рожевого кольору, тобто конгофільні маси були відсутні. Капілярна сітка - добре розвинена, зі збереженим шаром ендотеліоцитів і незначним периваскулярним

набряком (вірогідно, внаслідок декапітації тварини і «затухання» серцебиття з розвитком венозного повнокров'я). Підрахунок кількості ендотеліоцитів та перицитів в стінці капілярів на площі мікропрепарату 0,024 мм<sup>2</sup> при збільшенні мікроскопу в 400 разів показав, що у щурів гр. С співвідношення кількості ендотеліоцитів до кількості перицитів (Е/П) становило 3:2, тобто переважають ендотеліоцити (табл. 3.6).

У всіх тварин зі скополаміновою моделлю через 14 днів «періоду регенерації» звертає на себе увагу наявність різного ступеня вираженості осередки забарвлення в червоний колір стінки кровоносних судин – крупніших зовнішньомозкових артерій з формуванням гомогенного червоного субендотеліального шару та мілкіших внутрішньомозкових артерій - за типом «жорстких труб» (рис. 3.2).



**Рис. 3.2.** Скополамін-індукована модель деменції альцгеймерівського типу. А – фокус гомогенізації білої речовини над корою ГМ, забарвлений в конго-червоний

(гр. Scop-14). Б –осередкові гомогенні конгофільні забарвлення субкортикальної білої речовини (гр. Scop-28). В – конгофільна речовина в стінці внутрішньомозковій артерії (гр. Scop-14, Scop-28). Забарвлення конго червоним та гематоксилином.  $\times 400$ .

Тобто гомогенна конгофільна речовина на великому відрізку повністю заміщує середню оболонку артерій з потовщенням стінки і звуженням просвіту (рис. 3.2).

При вивченні особливостей мікроциркуляторного русла тканини ГМ, спостерігались, також як і в гр. С, периваскулярні набряки. Ендотеліоцити капілярів мають ядра овальної форми, але їх кількість - зменшена (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

**Співвідношення «Ендотеліоцити/перицити» (Е/П) та оптична щільність (опт.щільн.) ядер ендотеліоцитів судин мікроциркуляторного русла головного мозку щурів зі скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу (забарвлення за методом Ейнарсона) (Mean $\pm$ SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Scop-14 (n=8)	Група (2) Scop-14- MSC (n=8)	Група (3) Scop-28 (n=8)	Група (4) Scop-28- MSC (n=8)
Кількість ендотеліоцитів (екз.)	6,1 $\pm$ 0,8	2,4 $\pm$ 0,4 (С, 2, 4) *	6,2 $\pm$ 0,9 (1) *	5,7 $\pm$ 0,8	8 $\pm$ 2,2 (1) *
Кількість перицитів (екз.)	4,1 $\pm$ 0,7	3,3 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,5	6,9 $\pm$ 1,7	4,1 $\pm$ 0,6
Е/П	1,9 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2 (2, 4) *	2,3 $\pm$ 0,2 (1, 3) *	1 $\pm$ 0,1 (2, 4) *	2 $\pm$ 0,3 (1, 3) *
Опт.щільн. ядер ендотеліоцитів	0,196 $\pm$ 0,012	0,154 $\pm$ 0,004	0,145 $\pm$ 0,003 (С) *	0,157 $\pm$ 0,007	0,147 $\pm$ 0,005 (С) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Так, співвідношення Е/П в групах Scor-14, Scor-28 становить приблизно 2:3 та 5:6 відповідно, тобто переважають перицити, що є компенсаторним механізмом для укріплення стінки капіляра при загибелі значної частини ендотеліоцитів (табл. 3.6).

Після введення стовбурових клітин Е/П становить приблизно 2:1, тобто можна вважати, що стінка судин укріплюється за рахунок молодих ендотеліоцитів. При цьому кількість ендотеліоцитів в гр. Scor-28-MSC найбільша серед усіх груп (табл. 3.6).

Тобто введення скополаміну веде до зменшення кількості ендотеліоцитів в зв'язку з їх загибеллю та до зростання кількості перицитів, що очевидно «зміцнює» стінку капіляра, і є компенсаторним явищем. Використання MSC, в гр. Scor-28-MSC, стимулює появу нових ендотеліоцитів і нових капілярів.

Оптична щільність ядер ендотеліоцитів, виміряна на мікропрепаратах, забарвлених за Ейнарсоном (вміст ДНК), у всіх основних групах нижче (в гр. Scor-14-MSC, Scor-28-MSC достовірно нижче), ніж в гр. С. Можливо, 14-денний період «регенерації» є достатнім для оновлення ендотелію капілярів, і функціональна активність цих ендотеліоцитів є підвищеною, оскільки хроматин ядер стає більш еухромним. Значне ураження ендотелію в гр. Scor-28 обумовлює недостатнє його оновлення до моменту виведення тварин з експерименту, а введення MSC таким тваринам обумовлює підвищений морфофункціональний стан ендотелію капілярів.

Таким чином, ендотеліоцити, що збереглися в основних групах, мають вищу еухромність хроматину в ядрах, що свідчить про більшу морфофункціональну активність ендотеліоцитів. Після введення стовбурових клітин через 14 днів «періоду регенерації» у тварин стан ДНК ядер ендотеліоцитів майже не відрізняється від щурів, яким стовбурові клітини не вводили, скоріш за все, тому що є багато молодих ендотеліоцитів.

Для оцінюванні функціонального стану ендотелію судин, ми використовували в даній в роботі показник VEGF. Імуногістохімічним методом визначали локалізацію VEGF-продувальних клітин і виміряли інтенсивність продукції VEGF. Встановлено, що одночасно зі зміною рівня VEGF в сироватці

крові змінюється продукція цього пептиду, що регулює проліферацію ендотелію, в цитоплазмі нейронів кори великих півкуль, в нейронах гіпокампа (поле CA1), в ендотеліоцитах капілярів, в плазмі крові венул ГМ.

Кількість мічених ендотеліоцитів в гр. С становить приблизно 11% від усіх наявних ендотеліоцитів в полі зору. У гр. Scorp-14 виявлено 31% мічених ендотеліоцитів практично з таким же рівнем експресії даного маркера, як в гр. С, а в гр. Scorp-14-MSc не було виявлено ні одного міченого VEGF ендотеліоцита, що вірогідно свідчить про те, що й через 14 днів «періоду регенерації» стимуляції експресії VEGF ендотеліоцитами в цій групі не відбулось. Поряд з цим, після 28-денного введення скополаміну на тлі зниження загальної кількості мічених ендотеліоцитів (14% в полі зору) в порівнянні з гр. Scorp-14, спостерігається незначне підвищення експресії VEGF. Стовбурові клітини в гр. Scorp-28-MSc сприяють збільшенню кількості ендотеліоцитів, які експресують VEGF (44% в полі зору) (табл. 3.7). Тобто завдяки введенню стовбурових клітин морфофункціональний стан ендотелію судин МЦР гр. Scorp-14-MSc відновився настільки, що продукція VEGF в них припиняється. В той же часу гр. Scorp-28-MSc продовжується активна стимуляція поділу ендотеліоцитів, тобто вихідне ушкодження ендотелію було набагато сильнішим.

В нейронах зони CA1 гіпокампа в гр. Scorp-14 і в гр. Scorp-28, Scorp-28-MSc оптична щільність міченої VEGF цитоплазми, в порівнянні з гр. С, менше в 3,6 і 1,5 рази відповідно (табл. 3.7). В гр. Scorp-14-MSc експресія VEGF найменша серед усіх груп. Тобто спостерігається різке зниження оптичної щільності мічених VEGF цитоплазми нейронів гіпокампа, особливо після введення стовбурових клітин.

В нейронах кори рівень експресії судинного фактора в основних групах практично не відрізнявся від такого в гр. С. Після введення MSc оптична щільність їх цитоплазми знижується (табл. 3.7). Значить нейрони гіпокампа синтезують менше VEGF, ніж нейрони кори ГМ, а стовбурові клітини сприяють зменшенню також і експресії VEGF нейронами кори та частково зони CA1 гіпокампа.

Крім того оптична щільність плазми, міченої VEGF, у всіх основних групах є зниженою, у порівнянні з групою контролю. Такий стан може бути результатом

менш активної продукції VEGF і більш значної рецепції VEGF ендотеліоцитами. При цьому, в гр. Scop-14 цей показник найменший і достовірно (в 4 рази) нижче контрольних значень (табл. 3.7). Зниження продукції VEGF у нейронах кори та гіпокампа можна пояснити розвитком дистрофії нейронів і зниження їх морфофункціональних можливостей, в т.ч. можливості синтезу і продукції VEGF.

Таблиця 3.7

**Результати визначення оптичної щільності структур, що експресують VEGF, в тканині головного мозку (умов.од.опт.щільн.) у щурів зі скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу (Mean±SEM)**

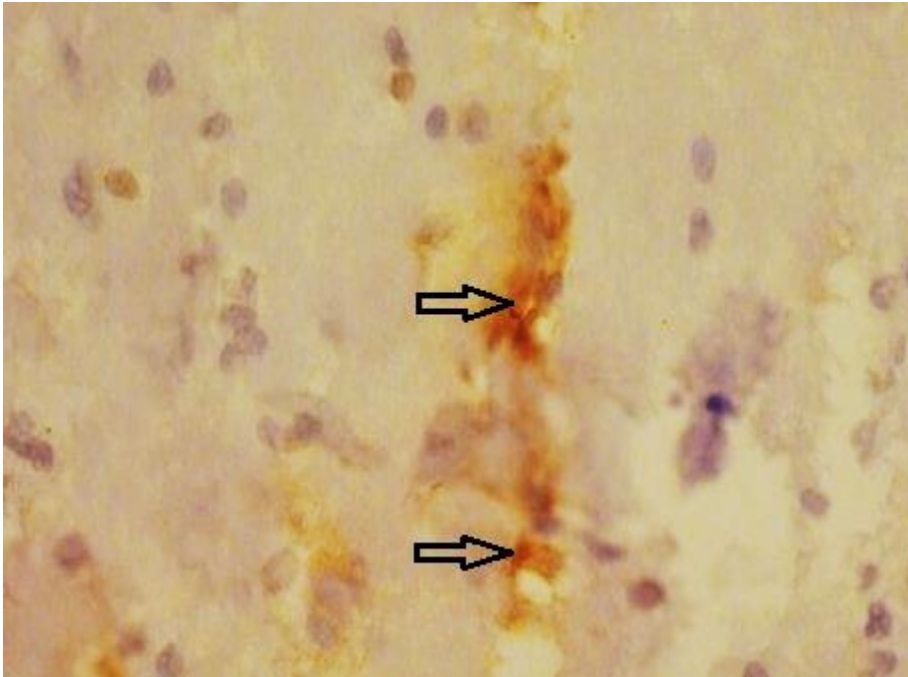
Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Scop-14 (n=8)	Група (2) Scop-14- MSC (n=8)	Група (3) Scop-28 (n=8)	Група (4) Scop-28- MSC (n=8)
VEGF експресія в ендотеліоцитах	0,04±0,003	0,044±0,002	-	0,049±0,01	0,047±0,003
VEGF експресія в нейронах кори	0,039±0,003	0,039±0,003 (2, 4) *	0,013±0,002 (С, 1, 3) *	0,039±0,003 (2, 4) *	0,025±0,002 (С, 1, 3) *
VEGF експресія в нейронах гіпокампа	0,036±0,002	0,01±0,002 (С) *	0,002±0,002 (С, 3, 4) *	0,024±0,003 (2) *	0,018±0,001 (С, 2) *
VEGF експресія в плазмі венул	0,025±0,004	0,006±0,001 (С, 3) *	0,013±0,003	0,012±0,001 (1) *	0,012±0,002

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп (в дужках) статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

При постановці в експерименті ІМГХ реакції на кадгерин (Е-кадгерин) з моделюванням скополамін-індукованої деменції альцгеймерівського типу, виявлена його експресія не тільки в епендимальних клітинах шлуночків і епітелії



судинних сплетінь, а й в ендотеліоцитах окремих дрібних артерій, що стосується капілярів, то тільки в гр. Scor-14 в окремих ділянках капілярної сітки ендотеліоцити помічені Е-кадгерином, в інших основних групах ендотеліоцити капілярів не експресують Е-кадгерин (рис. 3.3), тобто контакти між ендотеліоцитами капілярів стають слабкими.



**Рис. 3.3.** Гр. Scor-14. Поодинокі експресія Е-кадгерину в цитоплазмі ендотеліоцитів капілярів.  $\times 400$ .

Таким чином, не дивлячись на те, що в гр. Scor-14 найменша кількість ендотеліоцитів, які ще експресують Е-кадгерин, в гр. Scor-28 в капілярах спостерігається зниження експресії Е-кадгерину та компенсаторне збільшення кількості перицитів, як було вказано раніше. В цих групах після введення стовбурових клітин експресія Е-кадгерину в капілярах не спостерігається на фоні збільшення кількості нових молодих ендотеліоцитів, які, можливо, ще не сформували міцного міжклітинного контакту.

Постановка ІМГХ реакції на антиген Кі-67 дозволила виявити, що у всіх щурів зі скополамін-індукованою деменцією зафіксовані поодинокі мічені Кі-67

гліальні та епітеліальні клітини ГМ, тобто активація проліферації в період дослідження, коли тварини були виведені з експерименту, відсутня.

Зручним у застосуванні і об'єктивним показником зміненого морфофункціонального стану нервової тканини у тварин основних груп є показник оптичної щільності нейропіля, тобто сітки відростків нейронів та гліоцитів, при забарвленні мікропрепаратів галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсеном (вміст РНК).

В нейропілі білої речовини великих півкуль ГМ оптична щільність різко знижена у всіх основних групах в порівнянні з групою контролю: в гр. Scop-14 практично в 2 рази, а в гр. Scop-28 - в 2,5 рази. Після введення стовбурових клітин в гр. Scop-14-MSС оптична щільність майже не відрізняється від значень гр. Scop-14, а в гр. Scop-28-MSС - достовірно підвищується в 1,4 рази в порівнянні з гр. Scop-28 (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

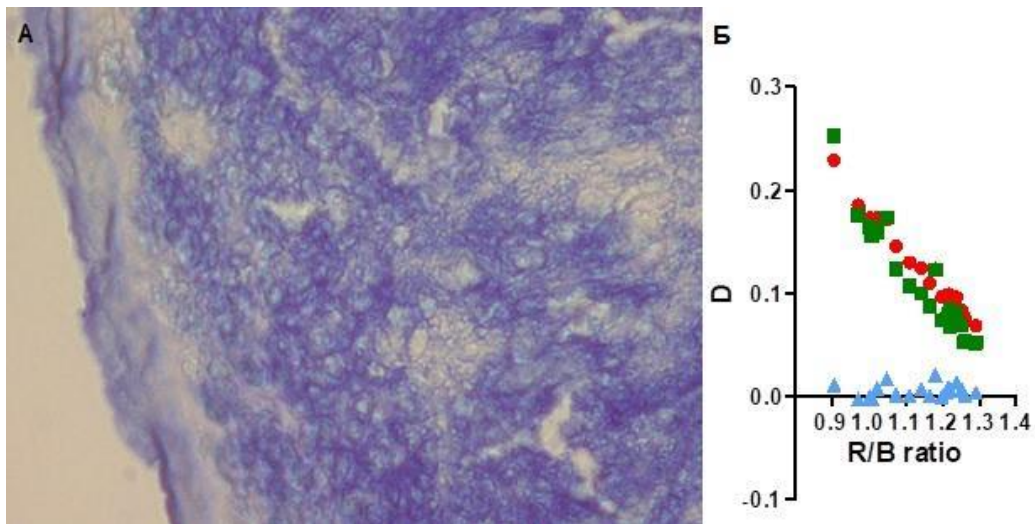
**Оптична щільність цитоплазми відростків нейронів (нейропіля)  
великих півкуль головного мозку у щурів зі скополамін-індукованою  
деменцією альцгеймерівського типу (забарвлення за методом Ейнарсона)  
(Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Scop-14 (n=8)	Група (2) Scop-14- MSС (n=8)	Група (3) Scop-28 (n=8)	Група (4) Scop-28- MSС (n=8)
Оптична щільність нейропіля	0,082±0,003	0,038±0,002 (С) *	0,042±0,001 (С, 3) *	0,033±0,001 (С, 2, 4) *	0,046±0,002 (С, 3) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Отже, введення скополаміну бутилброміду сприяє зменшенню вмісту РНК в цитоплазмі відростків нервових клітин. Стовбурові клітини частково покращують функцію нейропіля, але повністю не відновлюють до рівня стану нейропіля в гр. С.

Забарвлення мікропрепаратів ГМ бромфеноловим синім для нас було важливим, тому, що відображало порушення стану білків у відростках нервових клітин в білій речовині, у так званому нейропіль білої речовини. В групі контролю нейропіль білої речовини структурований, являє собою дрібну мережу волокон, що забарвлюються з домінуванням синіх відтінків (рис. 3.4).



**Рис. 3.4.** Контрольна група. А - нейропіль великих півкуль ГМ. Забарвлення бромфеноловим синім.  $\times 400$ . Б – оптична щільність (D) білків нейропіля у червоному, синьому, зеленому зонах світлового спектра (ось ординат) та співвідношення R/B (ось абсцис).

Показник R/B відображує співвідношення карбоксильних (R) та аміногруп (B) у білках нейропіля великих півкуль та гіпокампа ГМ у щурів. Збільшення значення цього показника свідчить про декомпозицію молекул білка [209], тобто про дистрофічне ураження відростків нервових клітин. Визначення середньої величини R/B нас не задовільнило, тому що нейропіль в основних групах фокально може перебувати в різних станах: близькому до контрольного стану, атрофічному, сильно дистрофізованому та з накопиченням амілоїду, і таким чином середні значення показника R/B в основних групах і в гр. С мало відрізняються. В зв'язку з цим на наступному етапі було важливим встановити зв'язок величини показника R/B і оптичної щільності нейропіля в окремих фокусах білої речовини (табл. 3.9).

**Оптична щільність (опт.щільн.) білків нейропіля великих півкуль  
головного мозку у щурів зі скополамін-індукованою деменцією  
альцгеймерівського типу в різних зонах спектра та співвідношення R/B  
(забарвлення бромфеноловим синім) (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Scop-14 (n=8)	Група (2) Scop-14- MSC (n=8)	Група (3) Scop-28 (n=8)	Група (4) Scop-28- MSC (n=8)
R/B	0,93±0,019	0,817±0,007 (С, 2, 3, 4) *	0,896±0,009 (1) *	0,898±0,012 (1) *	0,875±0,012 (1) *
Опт. щільн. білків нейропіля в червоній зоні спектра	0,169±0,006	0,225±0,004 (С) *	0,237±0,002 (С) *	0,243±0,002 (С) *	0,233±0,005 (С) *
Опт. щільн. білків нейропіля в синій зоні спектра	0,012±0,001	0,019±0,001 (2, 3, 4) *	0,065±0,004 (С, 1) *	0,084±0,004 (С, 1) *	0,066±0,003 (С, 1) *
Опт. щільн. білків нейропіля в зеленій зоні спектра	0,16±0,007	0,272±0,011 (2, 3, 4) *	0,363±0,01 (С, 1) *	0,375±0,009 (С, 1) *	0,332±0,012 (С, 1) *

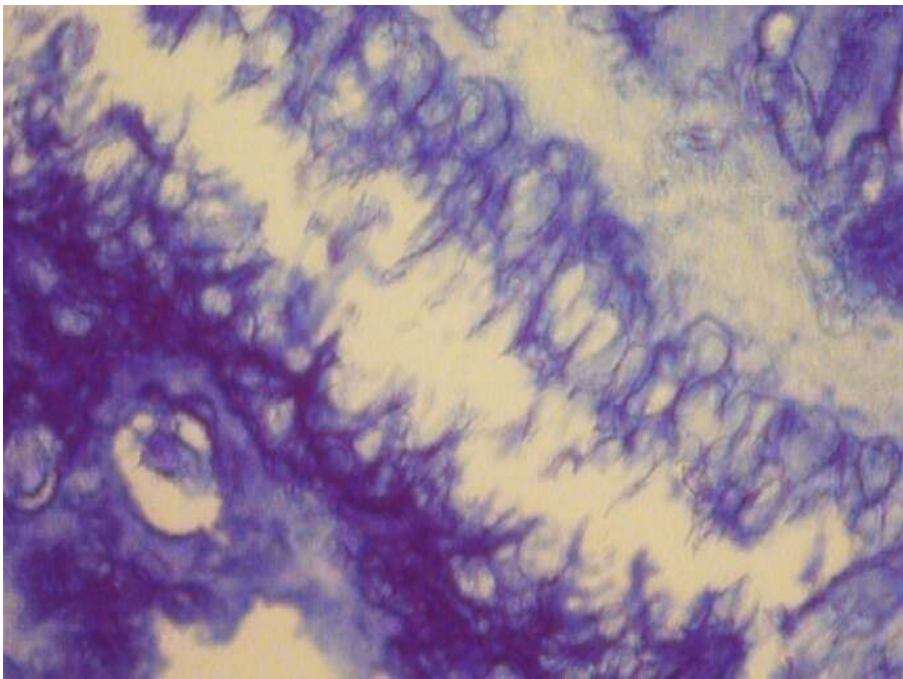
\*P<0,05 - різниця між даними різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Оптична щільність нейропіля відображає вміст в ньому білків, які при забарвленні мікропрепаратів відбивають світло в різній мірі в різних зонах спектра. Якщо аналізувати показники середньої оптичної щільності нейропіля, то можна сказати, що в середньому в нейропілі домінують білки, які відбивають світло в

зеленій і червоній зонах спектра у всіх основних групах і в гр. С, при чому в основних групах значення оптичної щільності і вміст таких білків - вищі, ніж в гр. С, та максимальні – в гр. Scor-28 (табл. 3.9).

Проведений аналіз взаємозв'язку співвідношення R/B та оптичної щільності білків нейропіля в різних зонах світлового спектра (по осі У розташовані значення оптичної щільності (D) в червоній, зеленій, синій зонах світлового спектра, а по осі Х – значення співвідношення R/B) показує, що у білій речовині ГМ контрольних тварин найбільша оптична щільність (тобто кількість білка) - з мінімальними значеннями R/B, що означає: домінують білки з нормальним співвідношенням карбоксильних та аміногруп, тобто більша частка цих білків не дистрофізована, а вміст білків нервових відростків в стані окислювальної модифікації – мінімальний (рис. 3.4).

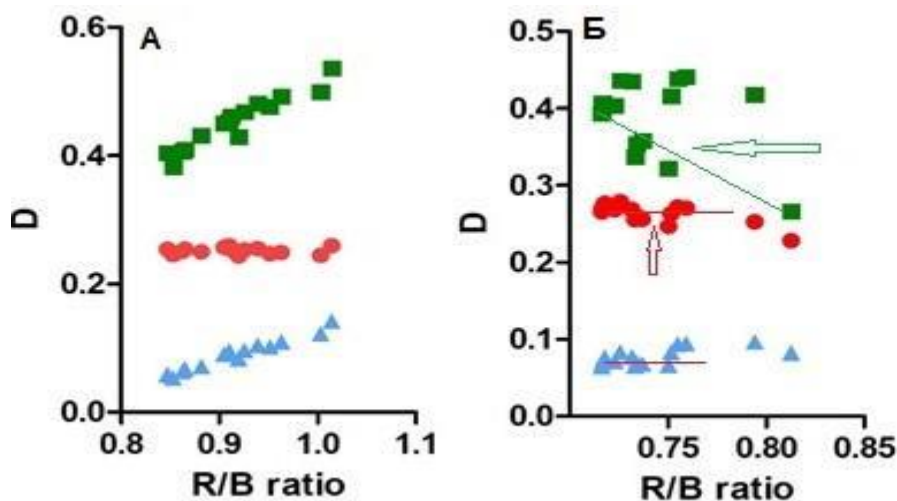
В основних групах нейропіля ГМ має численні ділянки-«пустоти», нерівномірно прокрашується насиченим фіолетовим кольором (рис. 3.5).



**Рис. 3.5.** Гр. Scor-28. А – ділянки-«пустоти» зони СА1 гіпокампа. Забарвлення бромфеноловим синім.  $\times 400$ .

Як було зазначено вище, нейропіль великих півкуль ГМ осередково має різні стани, що можна спостерігати на графіках і мікрофото (рис. 3.6). Так, стан білків нейропіля, близький до атрофії, але без окислювальної модифікації білків на мікропрепаратах ГМ, забарвлених бромфеноловим синім, характеризується низькою оптичною щільністю цитоплазми нервових відростків у всіх зонах світлового спектра та R/B співвідношення зростає при зменшенні значень оптичної щільності.

При станах, близьких до дистрофічних, спостерігається збільшення значень коефіцієнта R/B при збільшенні значень оптичної щільності білків цитоплазми нервових відростків, тобто збільшується окислювальна модифікація білків (рис. 3.6 А).



**Рис. 3.6.** Стан оптичної щільності білка та коефіцієнт R/B при: А при дистрофії (гр. Scor-14); Б – з ознаками відновлення (зелена стрілка) на фоні накопичення амілоїду (червона стрілка) (гр. Scor-28-MSС).

При високих стабільних значеннях оптичної щільності білків та коефіцієнта R/B нижче одиниці можна судити про наявність щільного білка, стійкого до гіпоксії та окиснення, тобто амілоїду.

У щурів, яким вводили стовбурові клітини, простежуються наявність щільного утворення зі стабільними цифрами оптичної щільності при різному

співвідношення R/B (амілоїд) та ділянки, де оптична щільність білків нейропіля зменшується при збільшенні співвідношення R/B (як в гр. С), що можна трактувати як наявність у відростках нових білків, тобто спостерігається морфологічне підтвердження стимуляції внутрішньоклітинної регенерації шляхом використання MSC (рис. 3.6 Б).

Таким чином, завдяки цим графікам можна визначити стан білків нейропіля в різні періоди експериментальної деменції альцгеймерівського типу та можна побачити вплив стовбурових клітин, введених внутрішньовенно, на структуру нейропіля.

Отже, у щурів зі скополаміновою моделлю деменції альцгеймерівського типу через 14 днів «періоду регенерації» одержано підтвердження накопичення амілоїду в нейропілі як на поверхні кори великих півкуль ГМ, так і в субкортикальній білій речовині, в білій речовині гіпокампа, а також в стінці артерій основи ГМ і малих внутрішньоцеребральних артерій.

На цьому тлі спостерігаються різні зміни морфофункціонального стану судин МЦР: зменшення кількості капілярів і ознаки регенерації стінки капілярів за типом субституції, коли при зменшенні кількості ендотеліоцитів, збільшується кількість перицитів. Продукція VEGF в ендотеліоцитах незначно збільшується. Зв'язок між ендотеліоцитами залишається порушеним. У щурів з 28-денною моделлю захворювання в судинах МЦР ураження ендотелію більш значні, а ознаки регенерації – менш активні і слабо виражені.

Використання морфометричних методик (вимірювання оптичної щільності ядер ендотеліоцитів, цитоплазми відростків нейропіля, мічених VEGF ендотеліоцитів, нейронів, плазми) дозволило підтвердити, що ін'єкція MSC після курсу ін'єкцій скополаміну активує проліферацію ендотелію судин МЦР (тенденція до нормалізації відношення ендотеліоцити/перицити, збільшення кількості мічених VEGF ендотеліоцитів паралельно із зменшенням оптичної щільності їх цитоплазми).

Одержані дані щодо збільшення кількості РНК в цитоплазмі відростків нервових клітин може бути свідченням активації синтезу білків. Дослідження з

визначенням коефіцієнту R/V також демонструє появу нових білків на фоні змодельованого ураження нейропіля. Тобто використання ін'єкції MSC веде до покращення морфофункціонального стану судин МЦР із можливою внутрішньоклітинною регенерацією у відростках нервових клітин.



## **РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. НІТРИТ-ІНДУКОВАНА МОДЕЛЬ ДЕМЕНЦІЇ АЛЬЦГЕЙМЕРІВСЬКОГО ТИПУ**

### **4.1 Поведінкові реакції та когнітивні функції у щурів**

У щурів з нітритною моделлю зовнішній вигляд дещо відрізнявся від щурів зі скополаміною моделлю. Вже після 14 днів ін'єкцій нітриту натрію шкіряний покрив набував більш ціанотичного відтінку, щури становились більш малорухомими. Після 28 днів ін'єкцій нітриту натрію зовнішній вигляд щурів був «хворобливим», «кволим», шерсть – неохайна, «дибом», без природнього блиску, очі – «осклянілі» з багряним відтінком, ротова та носова ділянка лицьової частини голови, шкіряний покрив кистей та стоп, хвоста – з ціанотичним відтінком. При тактильному роздратуванні людськими руками щури зберігали малорухомий спосіб життя, перебували в основному в «застиглій» «млявій» позі, не взаємодіяли між собою, спостерігалися випадки членушкодження.

Результати поведінкових реакцій щурів групи контролю були описані в розділі 3.1.1.

В результаті проведення однофакторного дисперсійного аналізу даних поведінкових реакцій в тесті «ВП» у щурів із нітритною моделлю впродовж усіх періодів експерименту («початок» – до ін'єкцій, «кінець» – відразу після ін'єкцій Nitr/MSС, «регенерація» – через 14 днів після завершення ін'єкцій Nitr/MSС) тест Левеня показав велику дисперсію даних з однорідною (однаковою) зміною вибірок в групі Nitr -14, Nitr-14-MSС, Nitr-28-MSС (значимість (significant point) $> 0,05$ ), що свідчить про однакове дотримання умов експерименту (табл. 4.1).

В гр. Nitr-14 спостерігається поступове зменшення кількості заглядань у норки. Так, в період «регенерації» даний показник був достовірно нижче в 3 рази в порівнянні з періодом до початку ін'єкцій і в 1,48 разів нижче в порівнянні з періодом відразу після ін'єкцій. Однак кількість болюсів через 14 днів після завершення ін'єкцій навпаки достовірно збільшилась - в 3,25 рази, а кількість

пересічених квадратів незначно зменшувалась. В той же час в періоді «кінець» спостерігалось незначне збільшення кількості пересічених квадратів та зменшення болюсів, що свідчить про адаптацію тварини до умов тесту «ВП». Не дивлячись на це, за період «регенерації» дослідницька активність не відновилась, а, навпаки, знизилась, та рівень занепокоєння на фоні захисного гальмування підвищився, що свідчить про продовження дії нітриту натрію на функції ГМ через 2 тижня після завершення його ін'єкцій (табл. 4.1).

В гр. Nitr-28 у щурів дослідницька активність в кінці експерименту різко знижується, про що свідчить зниження кількості заглядань у норки практично в 11 разів в порівнянні з початком експерименту. Також щури набагато менше переміщуються по полю (зниження кількості пересічених квадратів майже в 4 рази), а рівень їх занепокоєння поступово збільшується впродовж всього експерименту. Проте дисперсії даних кількості заглядань у норки та пересічених квадратів не є рівними, тобто вплив тривалості введення нітриту натрію підтвердити неможливо (табл. 4.1). Скоріше за все, тут, як і в скополаміновій моделі, причиною зміни показників є не час, не довготривалість введення нітриту натрію, а інший нейрофізіологічний механізм.

Після введення стовбурових клітин спостерігається достовірне зниження кількості пересічених квадратів, при чому більш виражене зменшення локомоторної активності відзначаються в гр. Nitr-28-MSС. Кількість болюсів відразу після закінчення ін'єкцій Nitr+MSС в обох групах збільшується, а через 14 днів періоду «регенерації» в гр. Nitr-14-MSС – навпаки, зменшується на відміну від з гр. Nitr-28-MSС, що відображає зменшення емоційної реактивності. Введення стовбурових клітин сприяє збільшенню кількості заглядань у норки через 2 тижня періоду «регенерації» в гр. Nitr-14-MSС в 1,4 рази та в гр. Nitr-28-MSС в 1,8 рази, порівнюючи з даними відразу після ін'єкцій Nitr+MSС. Можна припустити, що відбувається активація дослідницької діяльності, при чому в гр. Nitr-28-MSС – інтенсивніше (табл. 4.1).

**Поведінкові реакції, оцінені за допомогою тесту «Відкрите поле», у щурів з нітрит-індукованою моделлю деменції альгеймерівського типу (Mean±SEM)**

Групи	Досліджувані параметри	Початок	Кінець	Регенерація	Тест Левеня	Тест ANOVA
Nitr-14 (n=8)	квадрати	36,69±4,52	38,46±4,45	29,5±7,08	0,934	0,622
	болюси	1±0,34	0,92±0,43	3,25±0,75	0,81	0,019*
	норки	3,85±0,53	1,85±0,75	1,25±0,48	0,165	0,044*
Nitr-14- MSC (n=8)	квадрати	41,5±6,72	38,75±5,46	19,5±5,4	0,349	0,031*
	болюси	1,38±0,53	1,75±0,53	1,13±0,44	0,913	0,68
	норки	5,5±1,15	1,75±0,65	2,5±0,53	0,134	0,010*
Nitr-28 (n=8)	квадрати	40,71±4,18	19,71±6,22	10,43±1,67	0,006	0,000*
	болюси	0,57±0,3	0,86±0,55	1,43±0,37	0,112	0,362
	норки	4,86±0,91	0,71±0,36	0,43±0,2	0,017	0,000*
Nitr-28- MSC (n=8)	квадрати	34±4,79	18,63±3,46	13,63±3,38	0,252	0,004*
	болюси	0,38±0,26	0,75±0,37	1,63±0,46	0,317	0,073
	норки	4,13±1,33	1,63±0,46	2,88±0,85	0,163	0,201

\*  $P < 0,05$  – різниця між групами значуща. Оцінювання параметрів поведінки до проведення експерименту («початок»), відразу після експерименту («кінець»), через 14 тижнів «періоду регенерації» («регенерація»). Кількість пересічених квадратів («квадрати»), болюсів («болюси»), заглядань у норки («норки»).

При оцінюванні когнітивних функцій щурів з нітритною моделлю всі отримані дані в тесті «ЕП» мають незначущу різницю. У всіх щурів з 14-денною моделлю захворювання кількість тварин, які здали та не здали тест, була однаковою. В гр. Nitr-28 ні один щур не винирнув з-під нижнього краю циліндру, а після введення стовбурових клітин 62,5% щурів пройшли цей тест (табл. 4.2).

В тесті «УРПУ» різниця між всіма результатами була значуща. Кількість тварин, у яких умовний рефлекс не сформувався, в гр. Nitr-14 складала 62,5%, а гр. Nitr-28 збільшилась до 75%. Введення MSC сприяло тому, що у всіх щурів з 14-денною нітритною моделлю сформувався умовний рефлекс уникання, а у щурів з 28-денною – у 62,5% випадків (табл. 4.2).

**Когнітивні функції, оцінені за допомогою тестів «Екстраполяційне позбавлення», «Умовний рефлекс пасивного уникання», у щурів груп контролю та з нітрит-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу**

Тест	Група	1	0	Ранги	Асимптоматична значимість хі-критерію
Екстраполяційне позбавлення (ЕП)	C-14 (n=8)	5	3	27,5	0,056>0,05 – різниця між групами не значуща
	Nitr-14 (n=8)	4	4	24,5	
	Nitr-14-MSС (n=8)	4	4	24,5	
	C-28 (n=8)	5	3	30,5	
	Nitr -28 (n=8)	0	8	12,5	
	Nitr-28-MSС (n=8)	5	3	27,5	
Умовний рефлекс пасивного уникання (УРПУ)	C-14 (n=8)	8	0	31,5	0,000<0,05 – різниця між групами значуща
	Nitr-14 (n=8)	3	5	16,5	
	Nitr-14-MSС (n=8)	8	0	31,5	
	C-28 (n=8)	8	0	31,5	
	Nitr-28 (n=8)	2	6	13,5	
	Nitr-28-MSС (n=8)	5	3	22,5	

\*Примітка. 1 – тест пройшов (сформувався умовний рефлекс в УРПУ або щур вплив з-під нижнього краю циліндру в ЕП), 0 -тест не пройшов. Дані представлені у кількості щурів, які пройшли або не пройшли тести.

#### **4.2 Біохімічні параметри функції ендотелію судин, прооксидантно-антиоксидантної системи, енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну в тканині головного мозку у щурів**

Оцінювання функціонального стану ендотелію судин у щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу виявила, що в краніальній артеріо-веноній крові вже після 14 днів ін'єкцій препаратів спостерігались значні зміни в динаміці показників, що відображають функції ендотелію. Так, середній рівень ET-1 у сироватці крові тварин гр. Nitr-14 був у 3,8 рази вищим, ніж у гр. С. Після введення стовбурових клітин (на початку періоду відновлення) рівень ET-1 став достовірно нижчим, порівняно з гр. Nitr-14, проте не досяг рівня групи

контролю. У тварин гр. Nitr-28 середнє значення концентрації ET-1 стало приблизно в 7 разів вище, ніж в щурів гр. С. У той же час введення стовбурових клітин щурам гр. Nitr-28-MSC сприяло достовірному зниженню ET-1- в 3,5 рази, порівняно з гр. Nitr-28, що, однак, було вище такого в гр. С та нижче, ніж в гр. Nitr-14-MSC (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

**Біохімічні параметри стану ендотелію судин щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Nitr-14 (n=8)	Група (2) Nitr-14- MSC (n=8)	Група (3) Nitr-28 (n=8)	Група (4) Nitr-28- MSC (n=8)
ET-1, пг/мл, сироватка крові	0,87±0,04	3,36±0,18 (С, 4) *	1,49±0,05	5,33±0,46 (С, 4) *	1,24±0,03 (1, 3) *
vWF, %, плазма крові	84,15±0,42	115,9±0,36 (С) *	94,85±0,53 (4) *	132,8±1,41 (С, 4) *	85,33±10,91 (2, 3) *
eNOS, пг/мл, сироватка крові	95,96±0,75	137,6±1,09 (С, 4) *	104,3±0,83 (4) *	100,5±0,76	90,03±0,48 (1, 2) *
VEGF-A, пг/мл, сироватка крові	39,46±0,54	57,38±0,39 (2, 3) *	62,78±0,39 (С, 1) *	151,8±0,49 (С, 1) *	60,43±0,23 (С) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп (в дужках) статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Аналогічні за спрямованістю відхилень зміни спостерігаються при дослідженні рівня vWF в крові у всіх щурів з експериментальною деменцією альцгеймерівського типу. Слід зазначити, що тварин гр. Nitr-28-MSC концентрація vWF практично досягла контрольних значень.

Встановлено, що введення щурам нітриту натрію протягом 14 днів призводило до достовірного підвищення активності ендотеліальної NO-синтази (eNOS)(в 1,4 рази вище, ніж у гр. С), а введення стовбурових клітин у гр. Nitr-14- MSC – до зниження активності ферменту майже до рівня такого в гр. С.

У гр. Nitr-28, на відміну групи Nitr-14, активність eNOS несуттєво перевищувала таку в гр. С. Ін'єкції стовбурових клітин у гр. Nitr-28-MSС призводили до статистично недостовірного (майже в 1,1 рази порівняно з гр. Nitr-28) зниження активності eNOS, водночас рівень активності ферменту практично не відрізнявся від контрольного (табл. 4.3).

Як видно з отриманих даних (табл. 4.3), під впливом тривалого введення нітриту натрію (через 2 тижні після закінчення його введення) концентрація VEGF-A підвищувалася: у групі Nitr-14 – у 1,4 рази, а у групі Nitr-28 – достовірно у 3,8 рази порівняно з контролем. Після введення стовбурових клітин щурам гр. Nitr-14-MSС відзначалося невелике збільшення рівня VEGF-A, а в гр. Nitr-28-MSС – різке зниження рівня VEGF-A (у 2,5 рази порівняно з групою Nitr -28), проте його концентрація залишалася достовірно вищою, ніж у щурів контрольної групи (табл. 4.3).

В порівнянні з гр. С, у щурів гр. Nitr-14 та гр. Nitr-28 в тканинах головного мозку спостерігалось достовірне збільшення рівня ТБК-активних речовин (в 1,8 та в 2,3 рази відповідно) та достовірне зниження активності каталази та СОД (табл. 4.4). В той же час, активність ферментів антиоксидантної системи у щурів цих двох експериментальних груп майже не відрізнялась між собою. Введення стовбурових клітин сприяло різкому зниженню в гомогенатах головного мозку щурів гр. Nitr-28-MSС вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ТБК-активних речовин), в порівнянні з таким у щурів гр. Nitr-28, що проте мало відрізнялось від такого в гр. Nitr-14-MSС. Активність ферментів антиоксидантної системи каталази та СОД у щурів гр. Nitr-14-MSС, Nitr-28-MSС суттєво не відрізнялася, що однак було більше такого в гр. Nitr-14, Nitr-28 відповідно (табл. 4.4).

**Біохімічні параметри прооксидантно-антиоксидантної системи  
головного мозку щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського  
типу (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Nitr-14 (n=8)	Група (2) Nitr-14- MSC (n=8)	Група (3) Nitr-28 (n=8)	Група (4) Nitr-28- MSC (n=8)
ТБК-активні речовини, нМ/г білка, гомогенат головного мозку	1,82±0,03	3,25±0,12 (С) *	2,98±0,05 (С) *	4,18±0,06 (С, 4) *	2,91±0,04 (3) *
Каталаза, мк кат/г білка, гомогенат головного мозку	224,7±4,43	187,5±0,92 (С) *	203,5±1,64 (3) *	178,2±0,36 (С, 2, 4) *	206,4±0,97 (3) *
СОД, у.о./мг білка, гомогенат головного мозку	98,31±0,17	78,79±0,36 (С, 2) *	88,2±0,35 (1) *	79,6±0,44 (С) *	84,26±0,13

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп (в дужках) статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Вивчення вмісту 2,3-ДФГ в еритроцитах експериментальних тварин виявило, що введення нітриту натрію супроводжувалося достовірним збільшенням його рівня в еритроцитах щурів гр. Nitr-28 (практично в 3 рази), а в гр. Nitr-14 - в 2,8 рази, в порівнянні з таким у щурів контрольної групи. Після введення MSC концентрація 2,3-ДФГ в еритроцитах щурів гр. Nitr-14-MSC зменшувалася і практично досягала рівня відповідних показників у щурів гр. С, в той же час у щурів гр. Nitr-28-MSC рівень 2,3-ДФГ знижувався, в порівнянні з гр. Nitr-28, проте залишався достовірно вище такого в гр. С в 1,9 рази (табл. 4.5).

**Біохімічні показники енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну у щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Nitr-14 (n=8)	Група (2) Nitr-14- MSC (n=8)	Група (3) Nitr-28 (n=8)	Група (4) Nitr-28- MSC (n=8)
2,3-ДФГ, мкмоль/мл, еритроцити крові	3±0,03	9,06±0,07 (С) *	3,98±0,06 (3) *	9,85±0,07 (2, С) *	5,84±0,07 (С) *
Ацетилхолін, мкг/г, гомогенат головного мозку	2,54±0,17	2,17±0,07 (2, 4) *	3,18±0,05 (С, 1, 3) *	2,3±0,03 (2) *	3,08±0,04 (1) *
АТФ, мкмоль/г тканини, гомогенат головного мозку	2,83±0,01	2,3±0,01 (С, 4) *	2,58±0,01 (3) *	2,03±0,02 (С, 2, 4) *	2,7±0,03 (2, 3) *
Кардіоліпін нмоль/мг білка, мітохондрії з головного мозку	51,94±0,06	26,66±0,1 (С, 2) *	40,4±0,25 (1, 3) *	21,84±0,09 (С, 2, 4) *	39,1±0,07 (3) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп (в дужках) статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

У тварин з нітрит-індукованою деменцією рівень АТФ в тканинах головного мозку щурів достовірно знижувався після 14-денного (в 1,2 рази) і 28-денного (в 1,4 рази) введення нітриту натрію, в порівнянні з гр. С. Як видно з отриманих нами даних (табл. 4.5), введення MSC щурам з гіпоксією, викликаною введенням нітриту натрію, сприяло підвищенню концентрації АТФ у щурів гр. Nitr-28-MSС - практично до рівня гр. С, в той же час у щурів гр. Nitr-14-MSС - динаміка концентрації АТФ була виражена в меншій мірі.

Вивчення концентрації кардіоліпіну в мітохондріях головного мозку експериментальних щурів показало, що в порівнянні з групою контролю, зниження його рівня спостерігалось у всіх групах без ін'єкцій MSC (в найбільшій мірі у щурів



гр. Nitr-28 - в 2,3 рази). Стівбурові клітини достовірно - в 1,5 і 1,8 разів (відповідно) підвищили рівень кардіоліпіну в гр. Nitr-14-MSС і Nitr-28-MSС, в порівнянні з таким гр. Nitr -14 і Nitr -28 (табл. 4.5).

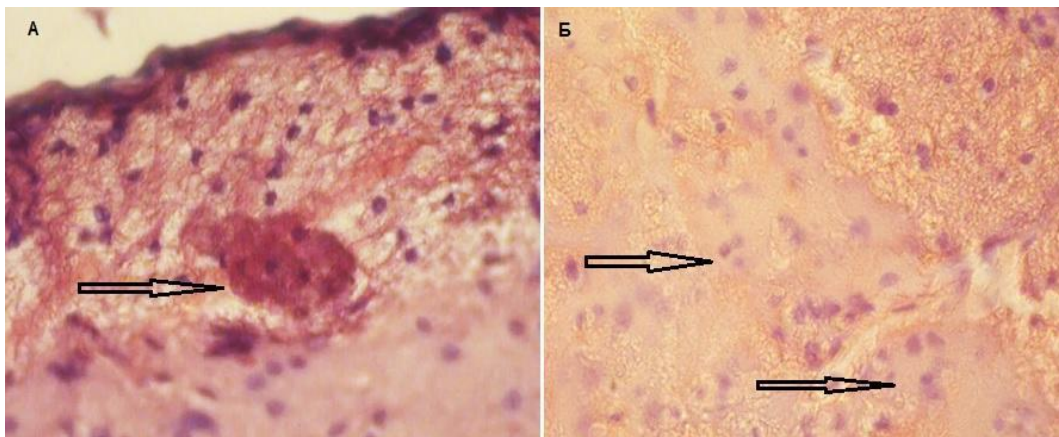
Аналіз вмісту ацетилхоліну в головному мозку щурів після введення нітриту натрію показав деяке зниження його рівня в гр. Nitr -14 і Nitr -28, у порівнянні з таким гр. С. Введення стівбурових клітин призводило до збільшення концентрації ацетилхоліну в головному мозку щурів з нітритною моделлю, при чому у щурів гр. Nitr-14-MSС його рівень став достовірно вище такого в гр. С (табл. 4.5).

Отже, у щурів дослідних груп введення нітриту натрію впродовж 14 днів вже викликає достовірні зміни показників крові, що відображають функції ендотелію судин та показників активності прооксидантно-антиоксидантної системи в гомогенатах головного мозку; з продовженням тривалості введення цього розчину вивчені нами біохімічні параметри в більшій мірі відрізняються від групи контролю. Слід відзначити, що рівень холінодефіциту, гіпоксії та енергозабезпечення тканини (АТФ) майже не відрізняється між групами Nitr-14 та Nitr-28. Однак, рівень кардіоліпіну в гомогенатах головного мозку знижується зі збільшенням тривалості введення нітриту натрію. Введення стівбурових клітин в більшій мірі сприяє покращенню ендотеліальної функції судин, енергетичного обміну, активності каталази в тканині головного мозку у щурів з 28-денною моделлю нітрит-індукованої деменції, а всіх інших показників - у щурів з 14-денною моделлю.

### **4.3 Морфофункціональні зміни в тканині головного мозку у щурів**

При препаруванні головного мозку тверда оболонка мозку щурів, яким робили ін'єкції нітриту натрію, була щільно зрослена з кістками зводу черепа та важко відокремлювалась. Мікроскопічно у щурів гр. С було виявлено, що сіра та біла речовини великих півкуль, епендіма шлуночків і хоріоїдне сплетіння, судини основи ГМ, внутрішньомозкові судини, в тому числі капілярна сітка не мають патологічних змін, окрім незначно вираженого перицелюлярного та

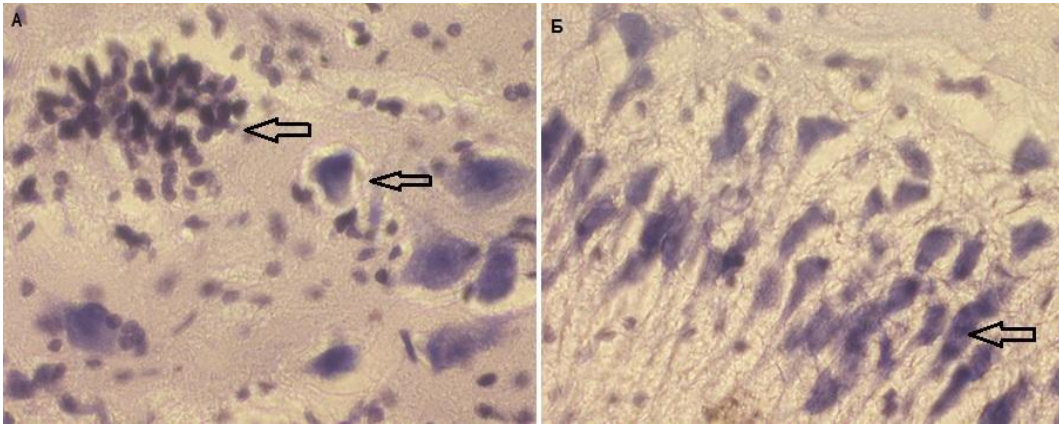
перикапілярного набряку. У всіх тварин основних груп при забарвленні мікропрепаратів ГМ конго червоним та гематоксиліном слабо виражені ознаки накопичення амілоїду в ділянках білої речовини у вигляді гомогенних мас, яскраво забарвлених в червоний колір (рис. 4.1 А). При всіх використаних забарвленнях мікропрепаратів видно, що нейропіль великих півкуль та гіпокампа має осередки ущільнення та гомогенізації, які і є осередками спочатку дистрофізації нейрофіламентів, а потім - накопичення амілоїду, або розрідженості, що можна назвати атрофізацією, особливо у щурів гр. Nitr-28, Nitr-28-MSC (рис. 4.1 Б).



**Рис. 4.1.** Біла речовина поверхні великих півкуль ГМ. А - скупчення конгофільної речовини (амілоїдна бляшка) та розрідженість нейропіля. Гр. Nitr-14-MSC. Б – осередки гомогенізації нейропіля. Гр. Nitr-14. Забарвлення конго червоним та гематоксиліном.  $\times 400$ .

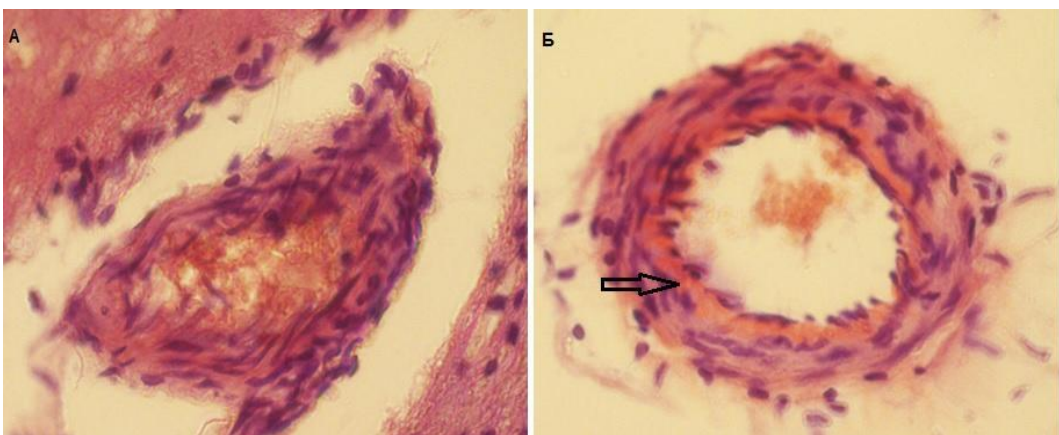
Крім того, у тканині головного мозку тварин основних груп виявляються дрібні осередки мікрогліальної та лімфоцитарної інфільтрації (рис. 4.2 А).

Тіла нейронів кори великих півкуль, підкоркових гангліїв та гіпокампа в основних групах мають морфофункціональні ознаки ураження: якщо тіла нейронів у гр. С – великі, світлі, в ядрі часто можна роздивитись ядерце, то в основних групах – зустрічаються зменшені у розмірах тіла нейронів, з гіперхромними ядрами (рис. 4.2 Б), де-не-де з маргінацією хроматину (скупченням хроматину на внутрішній мембрані ядер), що притаманне апоптозу.



**Рис. 4.2.** Тварина гр. Nitr-14. А – нейрони субкортикального ганглія та осередок мікрогліальної інфільтрації в білій речовині. Б – нейрони зони СА1 гіпокампа з гіперхромними ядрами. Забарвлення за методом Ейнарсона.  $\times 400$ .

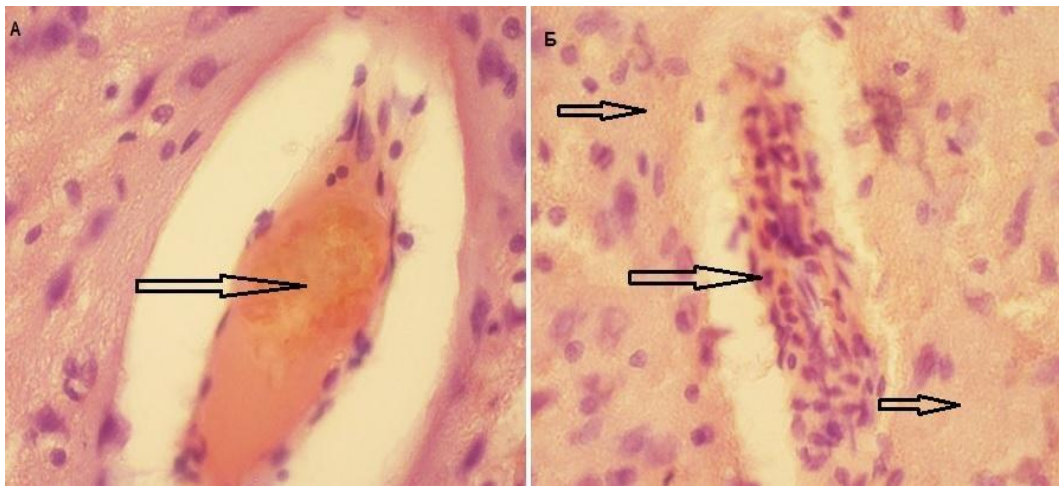
Порівнюючи мікроскопічний стан артерій основи мозку тварин, видно, що в гр. С середній шар артерії представлений гладком'язовими клітинами, а ендотелій інтими збережений. Однак, вже у щурів з гр. Nitr-14, навіть через 14 днів «періоду регенерації» простежуються ділянки з відсутнім ендотелієм судин. При забарвленні мікропрепаратів ГМ конго червоним та гематоксиліном в артеріях, артеріолах спостерігається субендотеліальне скупчення конгофільних мас зі зменшенням кількості гладком'язових клітин в середньому шарі судинної стінки (рис. 4.3). Звертає увагу суттєве зменшення кількості судин МЦР у тканині півкуль ГМ, особливо у тварин гр. Nitr-28.



**Рис. 4.3.** Артерії основи ГМ щурів. А – група контролю, велика кількість гладком'язових клітин в середній оболонці стінки; Б – гр. Nitr-14, субендотеліальне

скупчення конгофільних мас в стінці артерії, зменшення кількості гладкомязових клітин в стінці. Забарвлення конго червоним та гематоксиліном.×400.

Крім того, в основних групах має місце виражений периваскулярний набряк, формування тромбів як парієтальних у великих судинах, так і тих, що обтурують дрібні судини (рис. 4.4 А). Зустрічаються ділянки-пустоти, що повторюють контури капілярів, які, очевидно, загинули, ділянки інфільтрації судин макрофагами та лімфоцитами, тобто ділянки васкуліту (рис. 4.4 Б).

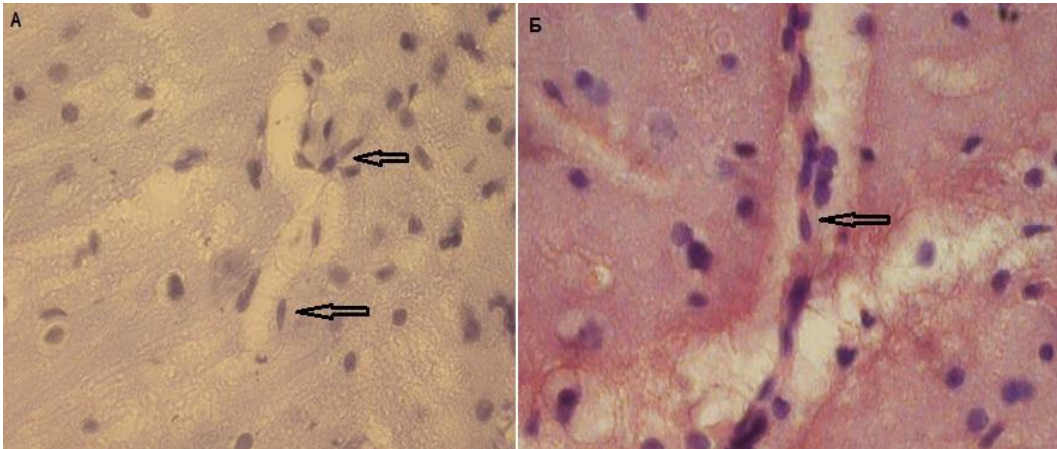


**Рис. 4.4.** Гр. Nitr-14. А – тромб, який обтурує внутрішньомозкові вени із сильним периваскулярним набряком. Б - інфільтрація судини макрофагами та лімфоцитами, осередки гомогенізації нейропіля. Забарвлення конго червоним та гематоксиліном. ×400.

Дуже добре помітно, що у щурів гр. Nitr-28, Nitr-28-MSС амілоїдне ушкодження не тільки білої речовини великих півкуль, але й артерій головного мозку відбувається паралельно зменшенню кількості капілярів. Необхідно відзначити, що за 14 днів «періоду регенерації» у всіх групах спостерігаються ознаки відновлення ендотелію, ріст нових капілярів, а в групах з використанням стовбурових клітин – збільшення загальної кількості ендотеліоцитів в стінці капілярів та поодиноких ендотеліоцитів, формуючих нові капіляри, максимально виражене (рис. 4.5). Однак, субендотеліальні скупчення конгофільних мас в



артеріях ГМ, як і конгофільні ділянки в білій речовині великих півкуль, в групах Nitr-14-MSC та Nitr-28-MSC зберігаються.



**Рис. 4.5.** Капіляри МЦР з ділянками відновлення ендотелію, поодинокі ендотеліоцити та формування капілярів через 14 днів після введення MSC. А – гр. Nitr-14-MSC. Забарвлення за Ейнарсеном. Б – гр. Nitr-28-MSC. Забарвлення конго червоним та гематоксиліном.  $\times 400$ .

Для об'єктивізації результатів гістологічного дослідження морфофункціонального стану судин МЦР, нами були морфометрично оцінені: співвідношення кількості ендотеліоцитів до перицитів для розуміння виду регенерації капілярної стінки, відновлення її міцності за рахунок ендотеліоцитів чи перицитів та оптична щільність ядер ендотеліоцитів на фіксованій площі фотографій мікропрепаратів, забарвлених за методом Ейнарсона, для оцінювання стану ДНК в ядрах ендотеліоцитів (табл. 4.6).

В гр. С співвідношення Е/П становило близько 3:2, а в гр. Nitr-14 навпаки кількість перицитів у стінці капілярів перевищувала кількість ендотеліоцитів та Е/П було 2:3 (табл. 4.6 - в середньому в стінці капілярів на 6 ендотеліоцитів припадає 9 перицитів). В той час, в гр. Nitr-28 на фоні зниженої кількості капілярів співвідношення ендотеліоцитів до перицитів склало від 3,9 до 3,1. У щурів, які отримували стовбурові клітини, співвідношення Е/П збільшилось: в гр. Nitr-14-

MSC приблизно до 2:1, а в гр. Nitr-28-MSC – 4,5:3,5 на фоні появи нових ендотеліоцитів та капілярів, де кількість перицитів менша, ніж в гр. С (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

**Співвідношення «Ендотеліоцити/перицити» (Е/П) та оптична щільність (опт.щільн.) ядер ендотеліоцитів судин мікроциркуляторного русла головного мозку щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу (забарвлення за методом Ейнарсона) (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Nitr-14 (n=8)	Група (2) Nitr-14-MSC (n=8)	Група (3) Nitr-28 (n=8)	Група (4) Nitr-28-MSC (n=8)
Кількість ендотеліоцитів (екз.)	6,1±0,8	6,4±0,6 (3) *	6,2±1	3,9±0,7 (1) *	4,5±0,7
Кількість перицитів (екз.)	4,1±0,7	9±1,4 (С, 2, 3) *	3,5±0,8 (1) *	3,1±0,5 (1) *	3,5±0,6
Е/П	1,9±0,3	0,9±0,1 (С, 2) *	2,2±0,2 (1) *	1,7±0,3	1,7±0,5
Опт.щільн. ядер ендотеліоцитів	0,196±0,012	0,173±0,006	0,176±0,004 (4) *	0,166±0,006	0,144±0,007 (С, 3) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Тобто введення нітриту натрію веде до зменшення кількості ендотеліоцитів в зв'язку з їх загибеллю та зростанням кількості перицитів, що очевидно «зміцнює» стінку капіляра компенсаторно. Використання MSC, як це добре видно в гр. Nitr-14-MSC, стимулює появу нових ендотеліоцитів, нових капілярів.

Оптична щільність ядер ендотеліоцитів капілярів, виміряна на мікропрепаратах, забарвлених за Ейнарсонем (стан ДНК), у щурів гр. Nitr-14 і гр. С однакова, а після введення MSC майже не змінилась (табл. 4.6). В той же час, у щурів гр. Nitr-28-MSC оптична щільність ядер ендотеліоцитів значно нижча, ніж в

гр. С, що вказує на зменшення гетерохромності ядер і підвищення морфофункціональної активності ендотеліоцитів капілярів. При цьому в гр. Nitr-28-MSС цей показник був найнижчий серед усіх груп.

Таким чином, ендотеліоцити, що збереглися в основних групах, окрім гр. Nitr-28-MSС, мають стан ДНК в ядрах майже на рівні гр. С. Тільки в гр. Nitr-28-MSС спостерігається поява еухромності ядер ендотеліоцитів, скоріш за все, тому що є багато молодих ендотеліоцитів.

При постановці ІМГХ реакції на VEGF, у гр. Nitr-14 кількість мічених VEGF ендотеліоцитів більша (83% в полі зору), і оптична щільність цитоплазми в 1,5 разів вища, ніж у групі контролю (11% в полі зору). У той же час у гр. Nitr-28, де ушкодження ендотелію більш значніше, порівняно з гр. Nitr-14, кількість мічених ендотеліоцитів у полі зору менша (38%), а середня оптична щільність цитоплазми мічених ендотеліоцитів не відрізняється від такої в гр. Nitr-14. Введення стовбурових клітин сприяє зменшенню кількості мічених ендотеліоцитів у гр. Nitr-14-MSС (38% в полі зору), які містять невелику кількість гранул VEGF у цитоплазмі, причому оптична щільність їх цитоплазми достовірно знижена. Таку зміну експресії VEGF в ендотеліоцитах можна трактувати як результат успішної регенерації ендотелію до моменту виведення тварин з експерименту. У гр. Nitr-28-MSС зміни мають протилежний характер: збільшення кількості капілярів у тканині мозку з інтенсивно міченими ендотеліоцитами (60% в полі зору), їх оптична щільність є достовірно вищою (в 1,4 рази) порівняно з гр. Nitr-28 (табл. 4.7). Тобто введення MSС веде до активації і продовження процесу регенерації ендотелію в зв'язку із сильним його ураженням при введенні нітриту натрію протягом 28 діб.

В полі зору мікроскопа у СА1 зоні гіпокампа у всіх основних групах кількість мічених VEGF нейронів зменшена (до 10-15 екз. в полі зору, тоді як в гр. С – 30-35 екз.), особливо виражено – у групах із 28 денним введенням нітриту натрію. При аналізі результатів ІМГХ реакції з VEGF (табл. 4.7), наприкінці періоду регенерації спостерігається наступна картина: у гр. Nitr-14– збільшення кількості мічених нейронів (до 26 екз. в полі зору) та невисока (як у гр. С) оптична щільність цитоплазми; у гр. Nitr-14-MSС порівняно з гр. Nitr-14 – зменшення кількості

мічених нейронів та зменшення оптичної щільності їх цитоплазми; в гр. Nitr-28 CA1 поле гіпокампа атрофоване, а нейрони, що залишилися, містять мітку, де оптична щільність цитоплазми низька; у гр. Nitr-28-MSC на тлі аналогічної атрофізації CA1 поля гіпокампа оптична щільність цитоплазми мічених нейронів достовірно підвищується, порівняно з гр. Nitr-28 (у 2,5 рази).

Таким чином, введення нітриту натрію сприяє зниженню кількості та оптичної щільності мічених VEGF нейронів гіпокампа, окрім гр. Nitr-14, де кількість мічених нейронів збільшена, а оптична щільність не відрізняється від контрольних значень. Як в ендотеліоцитах, так і в нейронах гіпокампа, спостерігаються однакові, проте різнонаправлені зміни функціонального стану клітин під впливом MSC, що пов'язано з тривалістю введення нітриту натрію.

У нейронах кори ГМ оптична щільність VEGF у всіх досліджуваних групах вище, ніж у групі контролю. При цьому візуально в гр. Nitr-14-MSC більша кількість нейронів мічена VEGF порівняно з гр. Nitr-14, але рівень експресії VEGF у нейронах кори головного мозку щурів цих двох груп практично не відрізняється між собою. У тварин гр. Nitr-28 у корі великих півкуль кількість нейронів з менш інтенсивною міткою, ніж у гр. Nitr-14, помітно зменшена, зустрічаються «порожні» проміжки між нейронами. Після введення стовбурових клітин гр. Nitr-28-MSC експресія VEGF статистично не відрізняється в порівнянні з гр. Nitr-28 (табл. 4.7).

Значить, в мічених VEGF нейронах кори оптична щільність, порівнюючи з нейронами гіпокампа, навпаки, зростає та майже не змінюється після введення стовбурових клітин.

Морфометричне визначення вмісту в плазмі венозної крові VEGF в мікропрепаратах, що добре відображує різні співвідношення між продукцією VEGF та його використанням у тканині ГМ, показало, що в порівнянні з групою контролю, у тварин гр. Nitr-14 оптична щільність міченої плазми достовірно підвищується в 2,4 рази, а в гр. Nitr-28 знижується у 2,5 рази. Після введення стовбурових клітин у гр. Nitr-14-MSC у плазмі спостерігається достовірне зниження вмісту мітки порівняно з гр. Nitr-14, а у гр. Nitr-28-MSC оптична щільність плазми є достовірно вищою – у 8 разів, ніж в гр. Nitr-28 (табл. 4.7). Тобто



зі збільшенням тривалості введення нітриту натрію в венозній крові в тканині ГМ зменшується кількість VEGF та збільшується його використання клітинами ГМ, а після введення стовбурових клітин динаміка змін оптичної щільності міченої VEGF плазми набуває такого ж характеру, як і зміни в мічених ендотеліоцитах і нейронах гіпокампа.

Таблиця 4.7

**Результати визначення оптичної щільності VEGF структур, що експресують в тканині головного мозку (умов.од.опт.щільн.) у щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу (Mean±SEM)**

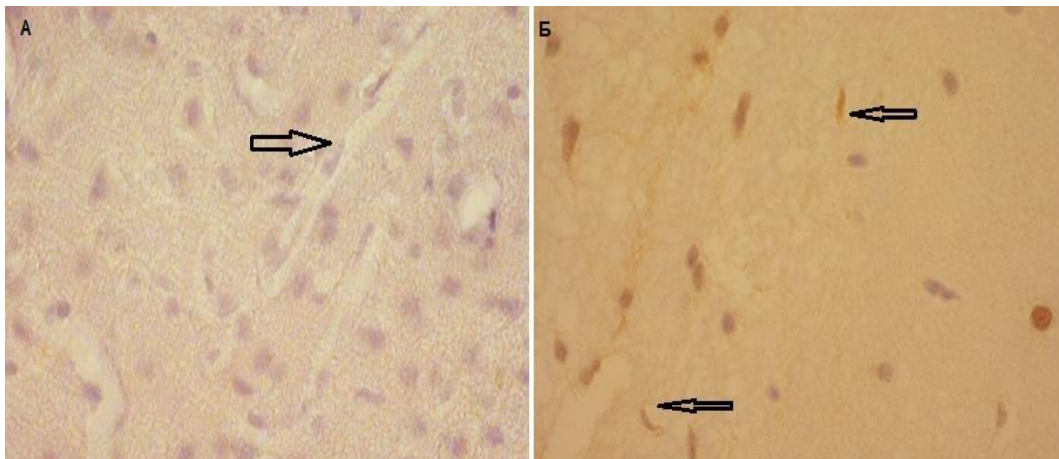
Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Nitr-14 (n=8)	Група (2) Nitr-14- MSC (n=8)	Група (3) Nitr-28 (n=8)	Група (4) Nitr-28- MSC (n=8)
VEGF експресія в ендотеліоцитах	0,039±0,003	0,059±0,004 (2, С) *	0,026±0,002 (1, 3, 4) *	0,057±0,003 (2, 4, С) *	0,08±0,006 (2, 3, С) *
VEGF експресія в нейронах кори	0,039±0,003	0,058±0,002 (3, С) *	0,059±0,002 (3, С) *	0,046±0,003 (1, 2) *	0,052±0,004
VEGF експресія в нейронах гіпокампа	0,036±0,002	0,04±0,003 (2, 3) *	0,024±0,002 (1, 4, С) *	0,016±0,001 (1, 4, С) *	0,04±0,002 (2, 3) *
VEGF експресія в плазмі венул	0,025±0,004	0,061±0,005 (2, 3, С) *	0,018±0,004 (1, 4) *	0,01±0,001 (1, 4) *	0,08±0,006 (2, 3, С) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп (в дужках) статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

ІМГХ реакцію на Е-кадгерин в експерименті з моделюванням нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу не виконували в зв'язку з масивним ендотеліальним ушкодженням судин МЦР, набряком та частим формуванням

тромбів у щурів після введення нітриту натрію впродовж 14 днів. Тобто є передумови відсутності щільних контактів ендотеліоцитів, що збереглися.

Постановка ІМГХ реакції на антиген Ki-67 дозволила виявити, що у тварин дослідних груп в порівнянні з гр. С візуально спостерігається поява поодиноких мічених ядер ендотеліоцитів капілярів у всіх відділах головного мозку, що прямо вказує на регенерацію ендотелію після загибелі частини цих клітин під дією нітриту натрію. Після внутрішньовенного введення стовбурових клітин у щурів гр. Nitr-14-MSC, Nitr-28-MSC мічені ендотеліоцити судин головного мозку зустрічаються частіше, крім того, вони мають більш яскравий колір мітки. Звертає увагу збільшення також кількості мічених Ki-67 епендимоцитів з виникненням ділянок багаторядності епендими в гр. Nitr-14. У щурів гр. Nitr-28-MSC в порівнянні з гр. Nitr-14-MSC, Nitr-28 мічені епітеліоцити судинного сплетіння мають яскравіший відтінок. Також нами були зафіксовані не тільки дифузно розміщені, але й скупчені мічені Ki-67 макрогліоцитів, так звані осередки гліозу (рис. 4.6).



**Рис. 4.6.** А – ендотеліоцити капілярів гр. С без мітки при постановці ІМГХ реакції на VEGF, Ki-67. Б - ядра ендотеліоцитів, мічена Ki-67. Гр. Nitr -14.  $\times 400$ .

Таким чином, при виведенні тварин з експерименту через 14 днів після закінчення курсу ін'єкцій є помітним той факт, що експресія Ki-67 продовжується не тільки в ендотеліоцитах, де спостерігається значне їх ушкодження, але й в

клітинах епендими, епітелії судинних сплетінь, в макроглоцитах. Введення стовбурових клітин сприяє збільшенню експресії Ki-67 у всіх перелічених клітинах.

Про морфофункціональний стан нейропіля поверхневої білої речовини великих півкуль можна судити, вимірюючи оптичну щільність цитоплазми відростків нейронів (нейропіля) на мікропрепаратах ГМ, забарвлених за методом Ейнарсона (вміст РНК). У щурів всіх основних груп в порівнянні з гр. С зустрічаються осередки гомогенізації нейропіля та зниження оптичної щільності цитоплазми відростків нейронів. При цьому найнижчі показники оптичної щільності нейропіля спостерігаються у щурів гр. Nitr-28, Nitr-28-MS (достовірно майже в 2,3 разів менше, ніж в гр. С). Після введення стовбурових клітин встановлено, що в групах Nitr-14-MS, Nitr-28-MS відсутні зміни оптичної щільності в порівнянні з групами тварин, яким стовбурові клітини не вводились (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

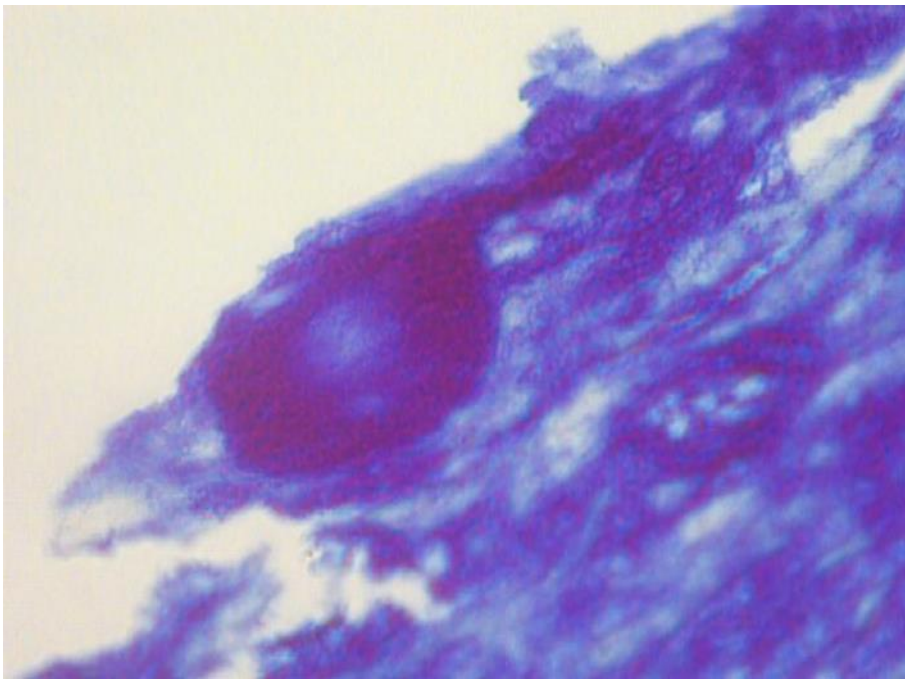
**Оптична щільність цитоплазми відростків нейронів (нейропіля)  
великих півкуль головного мозку у щурів з нітрит-індукованою деменцією  
альцгеймерівського типу  
(забарвлення за методом Ейнарсона) (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Nitr-14 (n=8)	Група (2) Nitr-14- MS (n=8)	Група (3) Nitr-28 (n=8)	Група (4) Nitr-28- MS (n=8)
Оптична щільність нейропіля	0,082±0,003	0,072±0,003 (3, 4) *	0,061±0,002 (С, 3, 4) *	0,036±0,001 (С, 1, 2) *	0,036±0,001 (С, 1, 2) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Тобто, вміст РНК у нейропілі знижується прямо пропорційно використаної дозі нітриту натрію. При використанні MS за 14 днів «періоду регенерації» нормалізації або збільшення вмісту РНК не спостерігається.

Використання гістохімічного забарвлення мікропрепаратів ГМ бромфеноловим синім дає змогу виявити ступінь білкової дистрофії нейропіля великих півкуль ГМ. На мікропрепаратах білої речовини ГМ, забарвлених бромфеноловим синім, в групі контролю нейропіль білої речовини структурований, являє собою дрібну мережу волокон, що забарвлюються з домінуванням синіх відтінків. В основних групах нейропіль поверхневої білої речовини має «пустоти», нерівномірно забарвлюється насиченим фіолетовим кольором з появою скупчень ущільненої речовини, що схоже на амілоїд (рис. 4.7).



**Рис. 4.7.** Біла речовина поверхні великих півкуль ГМ тварин. Скупчення ущільненого утворення з насиченим фіолетовим відтінком (амілоїдна бляшка). Група Nitr-14. Забарвлення бромфеноловим синім.  $\times 400$ .

Співвідношення R/B в обох групах з нітритною моделлю недостовірно більше, ніж у групі контролю. Введення MSC сприяє зниженню R/B в гр. Nitr-14-MSC та, особливо, в гр. Nitr-28-MSC, що вказує на зменшення ступеня дистрофії, декомпозиції білків відростків нервових клітин після введення стовбурових клітин (табл. 4.9). Однак, вимірювання середніх значень показника R/B не задовільнило, тому що, очевидно, що нейропіль в основних групах фокально може перебувати в

різних станах: близькому до контрольного, атрофічному, сильно дистрофізованому та з накопиченням амілоїду.

Оптична щільність нейропіля відображує вміст в ньому білків, які при забарвленні мікропрепаратів відражають світло в різній мірі в різних зонах спектра. Особливо виражено збільшується показник середньої оптичної щільності нейропіля в зеленій і червоній зонах спектра у всіх основних групах (табл. 4.9).

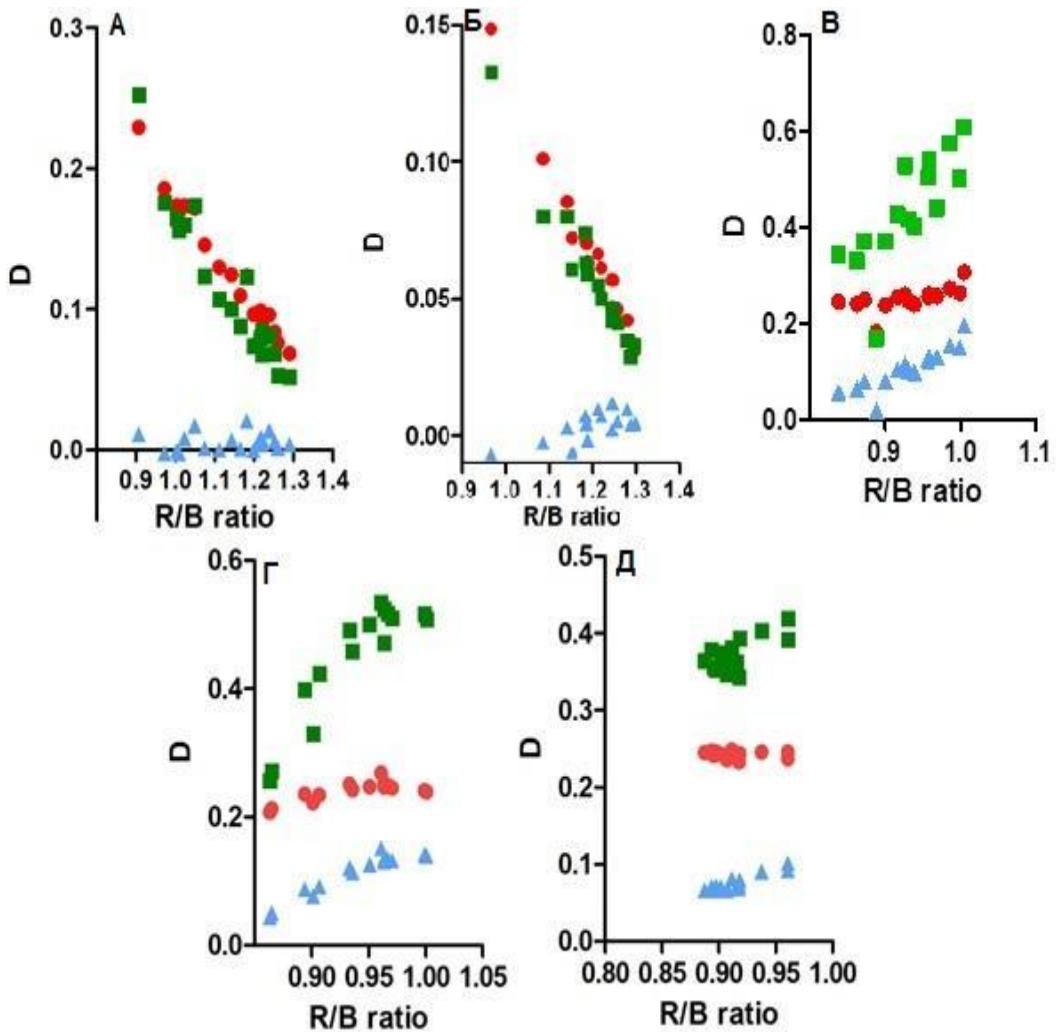
Таблиця 4.9

**Оптична щільність (опт.щільн.) білків нейропіля великих півкуль  
головного мозку у щурів з нітрит-індукованою деменцією  
альцгеймерівського типу в різних зонах спектра та співвідношення R/B  
(забарвлення бромфеноловим синім) (Mean±SEM)**

Параметри	Групи (С) контролю (n=16)	Група (1) Nitr-14 (n=8)	Група (2) Nitr-14- MSC (n=8)	Група (3) Nitr-28 (n=8)	Група (4) Nitr-28- MSC (n=8)
R/B	0,93±0,019	1,001±0,018 (4) *	0,948±0,008 (4) *	0,0943±0,016 (4) *	0,853±0,01 (С, 1, 2, 3) *
Опт. щільн. білків нейропіля в червоній зоні спектра	0,169±0,006	0,169±0,008 (2, 3, 4) *	0,251±0,003 (С, 1) *	0,214±0,009 (С, 1) *	0,249±0,002 (С, 1) *
Опт. щільн. білків нейропіля в синій зоні спектра	0,012±0,001	0,007±0,001 (2, 3, 4) *	0,122±0,006 (С, 1) *	0,094±0,007 (С, 1) *	0,084±0,005 (С, 1) *
Опт. щільн. білків нейропіля в зеленій зоні спектра	0,16±0,007	0,194±0,012 (2, 3, 4) *	0,492±0,016 (С, 1, 3, 4) *	0,367±0,02 (С, 1, 2) *	0,376±0,01 (С, 1, 2) *

\*P<0,05 - різниця між даними різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Для кращого пояснення змін білкового складу нейропіля нами був проведений аналіз динаміки кривих при будові графіків, де по осі ордината розташовані значення оптичної щільності (D) нейропіля поверхневої білої речовини головного мозку в червоній, синій та зеленій зонах спектра світла, а по осі абсциса - співвідношення (ratio) R/B у одного з шурів різних груп (рис. 4.8).



**Рис. 4.8.** Стан оптичної щільності білка нейропіля та коефіцієнт R/B при: А – стані, близькому до контрольного (гр. С); Б - атрофії білої речовини (гр. Nitr-14); В – при дистрофії (гр. Nitr-14-MS); Г – початкова стадія формування амілоїду (гр. Nitr-28); Д – сформований амілоїд (гр. Nitr -28-MS).

До стану, близького до контрольного, у білій речовині ГМ спостерігається найбільша оптична щільність (тобто кількість білка) з мінімальними значеннями

R/V: домінують білки з нормальним співвідношенням карбоксильних та аміногруп, тобто вони не дистрофізовані, а вміст білків нервових відростків в стані окислювальної модифікації – мінімальний (рис. 4.8 А).

В дослідних групах, чим менше значення коефіцієнта R/V, тим більша оптична щільність цього білка в нейропілі при вимірі в червоному та зеленому зонах спектра; а присутність білка, що відбиває синій колір - близько 0. Однак, оптична щільність білків нейропіля у всіх зонах світлового спектра зменшена, що свідчить про розвиток атрофії (рис. 4.8 Б).

При станах, близьких до дистрофічних, спостерігається збільшення значень коефіцієнта R/V при збільшенні значень оптичної щільності білків цитоплазми нервових відростків, тобто збільшується окислювальна модифікація білків (рис. 4.8 В).

Також в нейропілі є ділянки стабільних цифр оптичної щільності білків нейропіля у всіх трьох зонах спектра світла, особливо в червоній зоні, та ділянки зростання оптичної щільності білків нейропіля в зеленій та синій зонах світлового спектра при зростанні співвідношення R/V. Тобто одночасно в нейропілі ГМ існують щільні ділянки, чутливі до гіпоксії та окислювальної модифікації білків, тобто нейропіль набуває стан, близький до дистрофічного, де формуються щільні скупчення білків, стійких до впливу гіпоксії, тобто утворюється амілоїд (рис. 4.8 Г).

Введення стовбурових клітин щурам дослідних груп сприяє зменшенню оптичної щільності білків нейропіля, особливо в зеленій зоні світлового спектра, та збільшенню співвідношення R/V, як в гр. С (рис. 4.8 Д).

Отже, використовуючи нітритну модель деменції альцгеймерівського типу у щурів після 14-денного, а тим паче після 28-денного введення нітриту натрію, нейропіль великих півкуль та гіпокампа має осередки ущільнення та гомогенізації зі зниженим вмістом РНК та зі збільшенням окислювальної модифікації білків, спостерігається поява локусів конгофільності білої речовини великих півкуль де-не-де, субендотеліальне скупчення конгофільних мас зі зменшенням кількості гладком'язових клітин в середньому шарі стінки артерій основи ГМ і малих

внутрішньоцеребральних артерій, формування парієтальних й обтуруючих тромбів, збільшення периваскулярного набряку у судин МЦР, а також інфільтрація судин макрофагами та лімфоцитами.

На цьому тлі спостерігаються різні зміни морфофункціонального стану судин МЦР: зменшення кількості ендотеліоцитів в зв'язку з їх загибеллю та зростанням кількості перицитів (регенерація стінки капілярів за типом субституції), хроматин ядер ендотеліоцитів стає більш еухромним, експресія VEGF та Ki-67 в ендотеліоцитах збільшується на фоні суттєвого зменшення кількості судин МЦР у тканині півкуль ГМ. У щурів з 28-денною моделлю захворювання в судинах МЦР ураження ендотелію більш значні, а регенерація – менш активна.

Використання морфометричних методик (вимірювання оптичної щільності ядер ендотеліоцитів, цитоплазми відростків нейропіля, мічених VEGF ендотеліоцитів, нейронів, плазми) дозволило підтвердити, що у тварин, які одержували розчин нітриту натрію, паралельно до ураження ендотелію судин МЦР спостерігається ураження нейропіля, тоді як використання ін'єкції MSC покращує стан ендотелію судин МЦР (тенденція до нормалізації відношення едотеліоцити/перицити; збільшення експресії VEGF ендотеліоцитами у щурів після 28-денного введення нітриту натрію на відміну щурів після 14-денного введення нітриту натрію, де спостерігалась протилежна картина) з можливою регенерацією відростків нервових клітин (оскільки в ділянках з розвинутою окислювальною модифікацією білків відростків нервових клітин, і, навіть, присутності інертного білку (амілоїду) з'являються фрагменти, в яких співвідношення оптичної щільності білків и коефіцієнт R/V відповідає нормальному стану білків).



## РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Останнім часом все частіше на міжнародних конгресах та конференціях розглядають питання, що стосуються поширення нейродегенеративних захворювань серед людей похилого віку, етіології та профілактики цих захворювань, а також особливостей догляду за такими людьми. Такі захворювання, як судинна деменція та хвороба Альцгеймера (ХА), разом із хворобами серцево-судинної системи та онкологічними захворюваннями є лідируючими серед причин інвалідизації та смертності серед людей похилого віку в різних країнах, у тому числі й України. Тим більше, що в умовах пандемії коронавірусної інфекції все більше людей помирає від неврологічних ускладнень, спричинених SARS-CoV-2, у тому числі й внаслідок прогресування хвороб Альцгеймера, Паркінсона, розсіяного склерозу тощо. Адже доведено, що цей респіраторний вірус ушкоджує не тільки ендотелій судин гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ), але й безпосередньо нейрони шляхом активації мікроглії, розвитку окислювального стресу, гіпоксії та енергодефіциту в тканині головного мозку [218].

Незважаючи на численні дослідження етіопатогенезу ХА та способів впливу на механізми прогресування хвороби, увага багатьох дослідників зосереджена на вивченні взаємозв'язку між нейропатією та васкулопатією головного мозку. Адже роль судинних факторів у механізмах ушкодження функції нейронів при нейродегенеративних захворюваннях є визначальною. Так, в дослідженні Verclutte S. та інших співавторів [219], було виявлено зниження церебрального кровообігу в корі лобових і тім'яних часток головного мозку пацієнтів з ранніми стадіями ХА. Виявлено, що гіпоперфузія та ішемічне ураження головного мозку (ГМ) супроводжуються активацією ферментів, які беруть участь в розщепленні білка-попередника амілоїду APP, підвищуючи тим самим накопичення бета-амілоїду як в стінці судин (розвиток церебральної амілоїдної ангіопатії (ЦАА), так і в тканині головного мозку [123]. Так само існує гіпотеза, що розвитку ЦАА сприяє порушення виведення бета-амілоїду з мозку: або шляхом захоплення мікроглією, астроцитами та трансцитозу через ГЕБ [220], або через періартеріальний

інтрамуральний і лімфатичний дренаж [221]. Припускають, що даний дренаж працює завдяки локальним скороченням і розслабленням артерій ГМ, тобто завдяки наявності судинної реактивності [222]. Відомо, що регуляція церебрального кровотоку здійснюється за допомогою гладком'язових клітин артерій, іннервованих холінергічними нейронами [132]. Свій початок холінергічна система бере в базальних відділах переднього мозку й в смугастому тілі [89]. Доведено, що при стимуляції цієї зони вивільняється ацетилхолін і збільшується церебральний кровотік шляхом активації ацетилхоліном ендотеліальної NO-синтази (eNOS), що сприяє вивільненню NO (оксиду азоту) і локальної вазодилатації. Навпаки, в експерименті на мишах було показано, що при холінергічній денервації судин, дезактивації eNOS збільшується ендогенна ЦАА [223, 224]. З огляду на це, взаємозв'язок між втратою холінергічних нейронів, дефіцитом ацетилхоліну та судинною дисфункцією залишається актуальним питанням при вивченні факторів прогресування хвороби Альцгеймера. Тому для вивчення внеску судинного фактора в розвиток ХА в умовах холінодефіциту в основу експерименту була взята скополамін-індукована модель деменції альцгеймерівського типу.

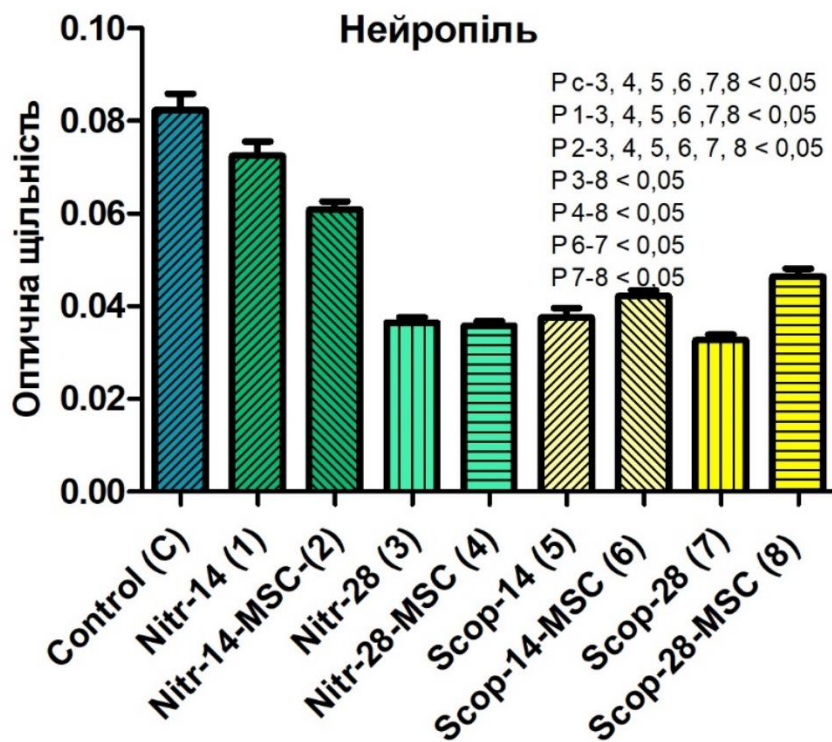
У нашій роботі вивчення ролі дисфункції ендотелію в прогресуванні нейродегенеративних захворювань стало визначальним, так як ендотелій, розташований на базальній мембрані стінки судин, відіграє не тільки бар'єрну функцію між тканиною органів і кров'ю, але й відповідає за зміни проникності судинної стінки, тромбоутворення, тонус судин, ангіогенез, живлення інших шарів судинної стінки. Будь-який тривалий дисбаланс у регуляції цих функцій, що виникає під впливом патогенних факторів і призводить до ушкодження стінки судин, з часом спричиняє розвиток полірегіональної дисфункції ендотеліальної системи і слідом за цим – системи кровообігу в цілому [225]. Незворотні зміни у функціональному стані ендотелію можуть стати запуском каскаду інших патологічних процесів у тканинах різних органів, у тому числі і тканини ГМ. Так, багато авторів вважають, що обов'язковим етапом при скупченні амілоїду та формуванні когнітивних порушень є цереброваскулярна дисфункція, що

супроводжується розвитком хронічної ішемії та гіпоксії [127]. Можливо, нейродегенерація без попереднього порушення функції ендотелія у пацієнтів з ХА не зустрічається [226].

При моделюванні деменції альцгеймерівського типу різного походження шляхом щоденного внутрішньоочеревинного введення водного розчину нітритру натрію або скополаміну бутилброміду протягом 14-28 днів, встановлено, що дані речовини, циркулюючи в крові, мають ушкоджуючу дію на тканину ГМ та ендотелій судин ГМ та організму в цілому.

Скополамін – неселективний антагоніст постгангліонарних М-холінорецепторів, який блокує ці рецептори, збільшує активність ацетилхолінестерази та призводить до дефіциту ацетилхоліну в ГМ і тягне за собою порушення проведення нервового імпульсу, дегенерацію нервових волокон та клітин у базальних відділах [227]. Ацетилхолін – нейромедіатор, який відповідає за формування когнітивних функцій (навчання, пам'яті, уваги), а також за складні рухові функції, емоційну поведінку, реакції гальмування та активації [228]. Внаслідок холінодефіциту та ураження нервової тканини розвивається когнітивний дефіцит, що й дає можливість вченим використовувати скополамін для моделювання хвороби Альцгеймера [229]. Для моделювання ХА у всьому світі використовують скополамін виробництва Sigma Aldrich USA. В Україні існує дві форми скополаміну: скополамін гідробромід та бутилбромід. Використаний нами скополамін (гіосцін) бутилбромід, на відміну від скополаміну гідроброміду, в терапевтичних дозах не проникає через ГЕБ і не впливає на центральну нервову систему людей. Незважаючи на це, відомі клінічні випадки, коли після внутрішньом'язового введення цієї речовини під час ендоскопії верхніх відділів шлунково-кишкового тракту у пацієнтів розвивався центральний антихолінергічний синдром з розвитком антероградної амнезії [185]. Також зустрічаються публікації з клінічними спостереженнями про тривалий інгаляційний прийом скополаміну бутилброміду, де розвиваються амнезія, психічні розлади, набряк головного мозку [230, 231]. Тим не менш, щоденні внутрішньоочеревинні 27-28-денні ін'єкції скополаміну різних виробництв як у

нашому експерименті в дозі 1мг/кг, так і в експериментах Дейко Р.Д., сприяли утворенню скупчень амілоїду в нейропілі великих півкуль ГМ щурів, у стінках дрібних церебральних артерій, гомогенізації нейропіля, тобто при мікроскопії нейропіль набув більш однорідної структури на відміну від групи контролю, де нейропіль мав волокнисту структуру, а судинна стінка не мала конгофільного забарвлення [180]. Слід зазначити, що в нашій роботі фокальна гомогенізація нейропіля та відкладення конгофільних мас у стінці мозкових артерій щурів були виявлені і після введення скополаміну бутилброміду протягом 14 днів. Про відмінності змін нервової тканини в різні періоди експериментальної деменції в нашій роботі можна було судити за морфофункціональним станом нейропіля, рівнем ацетилхоліну в гомогенатах ГМ та 2,3-дифосфогліцерату в еритроцитах щурів (рис. 5.1).



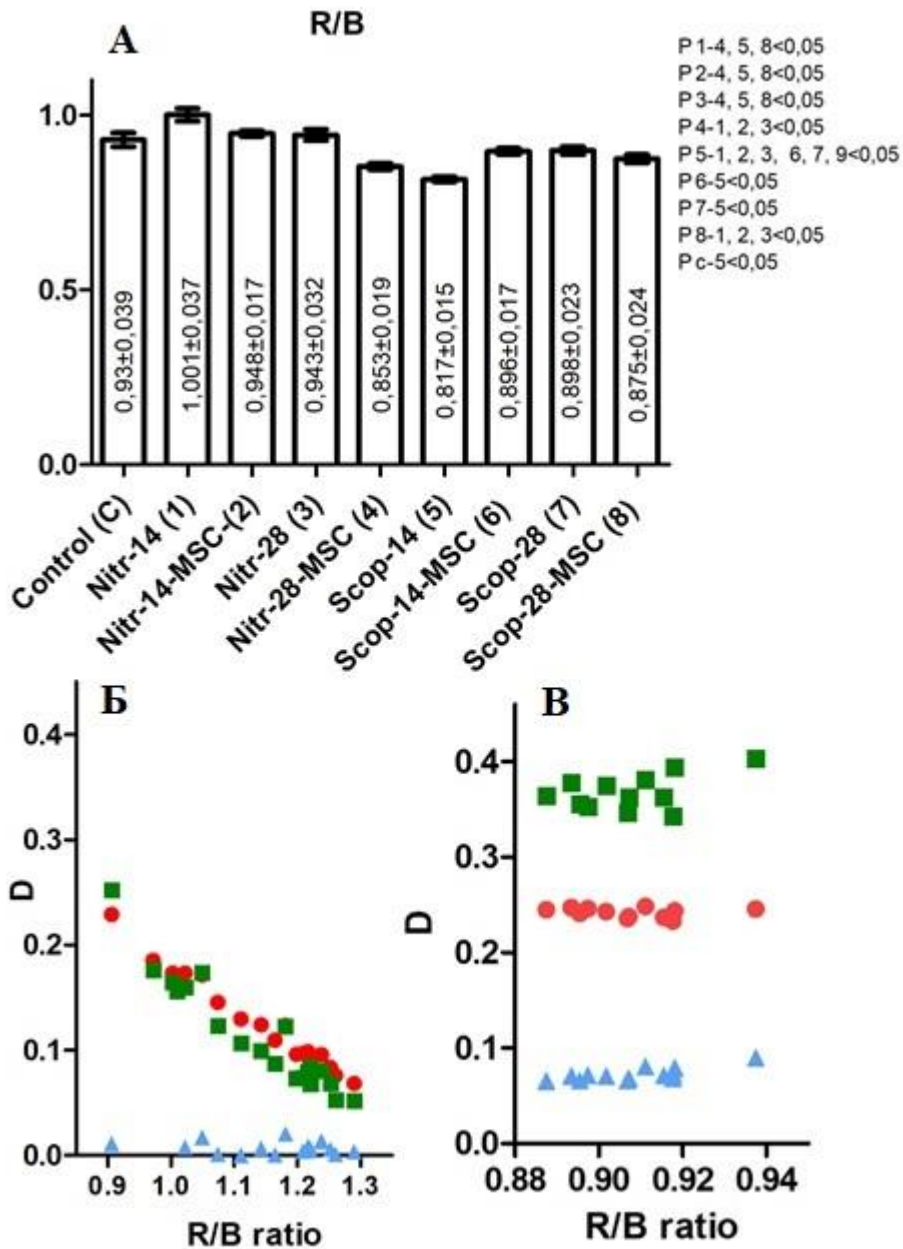
**Рис. 5.1.** Оптична щільність цитоплазми відростків нейронів (нейропіля) (вміст РНК) поверхневої білої речовини великих півкуль головного мозку у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу (забарвлення за методом Ейнарсона).  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими

у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього ( $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ), різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Різке зниження оптичної щільності нейропіля великих півкуль на мікропрепаратах, забарвлених за методом Ейнарсона, в експериментальних групах (гр. Scop-14 практично у 2 рази, а в гр. Scop-28 – у 2,5 рази) порівняно з групою контролю, вказує на зниження вмісту РНК в цитоплазмі нервових відростків. Слід врахувати, що ці зміни були зафіксовані через 14 днів «періоду регенерації» після закінчення ін'єкцій скополаміну бутилброміду (рис. 5.1).

Використовуючи гістохімічне забарвлення бромфеноловим синім, можна судити про окислювальну модифікацію білків. Так, наші колеги вивчали окислювальну модифікацію білків фібріноїдів плаценти при її кальцинозі у вагітних з анемією за допомогою вимірювання середніх значень співвідношень R/V на фотографіях мікропрепаратів плаценти, забарвлених бромфеноловим синім [232]. Аналізуючи кількісні характеристики червоної (R), зеленої (G), синій (B) зон спектра світла (RGB) у програмі GIMP на фотографіях мікропрепаратів ГМ, за співвідношенням R/V можна виявити, які групи амінокислот у білковій структурі переважають: червоні карбоксильні чи забарвлені синім аміногрупи. При окисленні аміногруп переважають карбоксильні групи та співвідношення більше R/V 1 і навпаки [210]. Визначення середньої величини R/V нас не задовільнило, тому що, очевидно, що нейропіль в основних групах фокально може перебувати в різних станах: близькому до контрольного стану, атрофічному, сильно дистрофізованому та з накопиченням амілоїду, і середні значення показника R/V в основних групах і в гр. С мало відрізняються. В зв'язку з цим було вирішено прослідити зв'язок величини показника R/V і оптичної щільності нейропіля в окремих фокусах білої речовини у всіх трьох зонах світлового спектра, так як при побудові графіків, де по осі абсцис розташовані значення співвідношення R/V, а по осі ординат – значення оптичної щільності в режимах RGB, можна спостерігати певну спрямованість та динаміку лінійних кривих, що дає можливість комплексно оцінити ступінь атрофії

або дистрофії нейропіля, а також утворення патологічних білкових скупчень, таких як амілоїд (рис. 5.2).

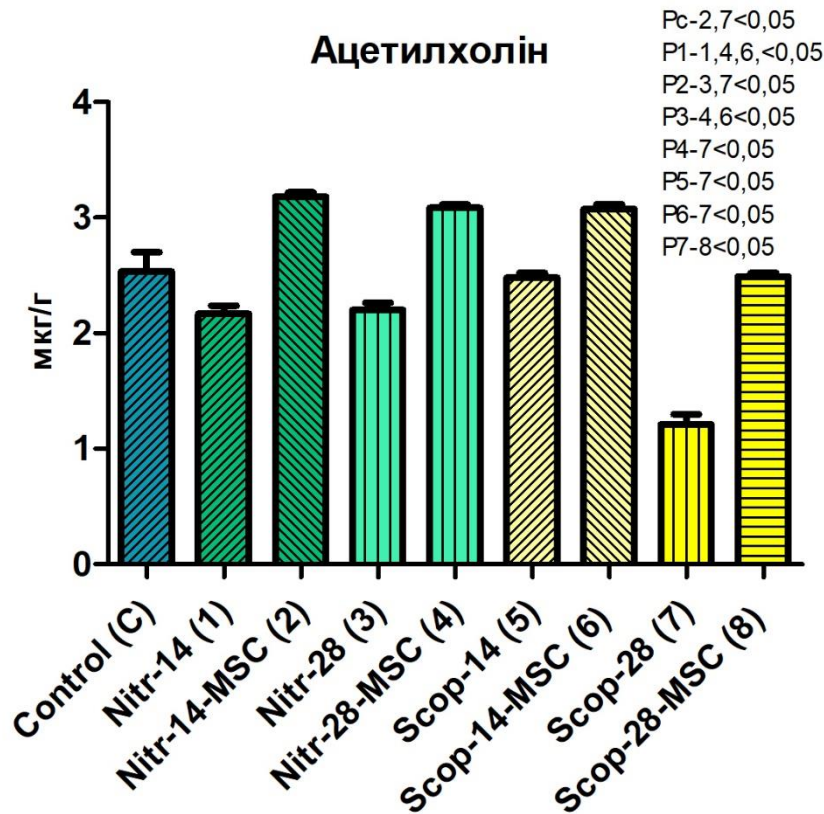


**Рис. 5.2.** А – середні значення співвідношення R/B (середніх значень яскравості кольору в червоній (R) і синій зоні спектра (B)) у всіх щурів. Ось X - R/B ratio (співвідношення), ось Y – D (оптична щільність білків нейропіля в червоній, синій, зеленій зонах світлового спектра): Б – група контролю; В – сформований амілоїд у щурів гр. Scor-28.  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього (Mean ± SEM), різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Так, у групі контролю простежувалася зворотньо-пропорційна залежність між співвідношенням R/B та оптичною щільністю білків в RGB зонах спектра: чим більше було R/B, тим меншою оптична щільність нейропіля в RGB. В основних групах щурів зі скополаміновою моделлю деменції альцгеймерівського типу коефіцієнт R/B був незначно менший, ніж у групі контролю (рис. 5.2 А, Б). При цьому осередково були зафіксовані стани нейропіля, близькі до атрофії, але без окислювальної модифікації білків, де була знижена оптична щільність білків. При одночасному збільшенні значень коефіцієнта R/B, тобто збільшенні окислювальної модифікації білків, та оптичної щільності білків цитоплазми нервових відростків у всіх зонах світлового спектра можна судити про розвиток дистрофічного стану нейропіля. Стабілізація вищенаведених всіх значень у кожній частині спектра, незалежно від значень коефіцієнта R/B у групах з максимальною кількістю ін'єкцій скополаміна вказує на наявність в нейропілі амілоїдних скупчень (рис. 5.2 В).

Зниження кількості РНК у цитоплазмі нервових відростків, збільшення окислювальної модифікації білків, утворення щільних білкових амілоїдних структур, стійких до гіпоксії та токсичної дії в нейропілі великих півкуль ГМ, має своє відображення на зниженні кількості нервових відростків, появі ділянок-розривів або порожніх місць між волокнами, зниження синаптичної передачі через викликаний скополаміном холінодефіцит, який також сприяє відкладенню амілоїду не тільки в нейропілі, але і в судинах ГМ [233].

Достовірне зниження рівня ацетилхоліну в тканині головного мозку підтверджує факт наявності холінодефіциту у щурів гр. Scop-28, що не виявляється у щурів гр. Scop-14 (рис. 5.3).

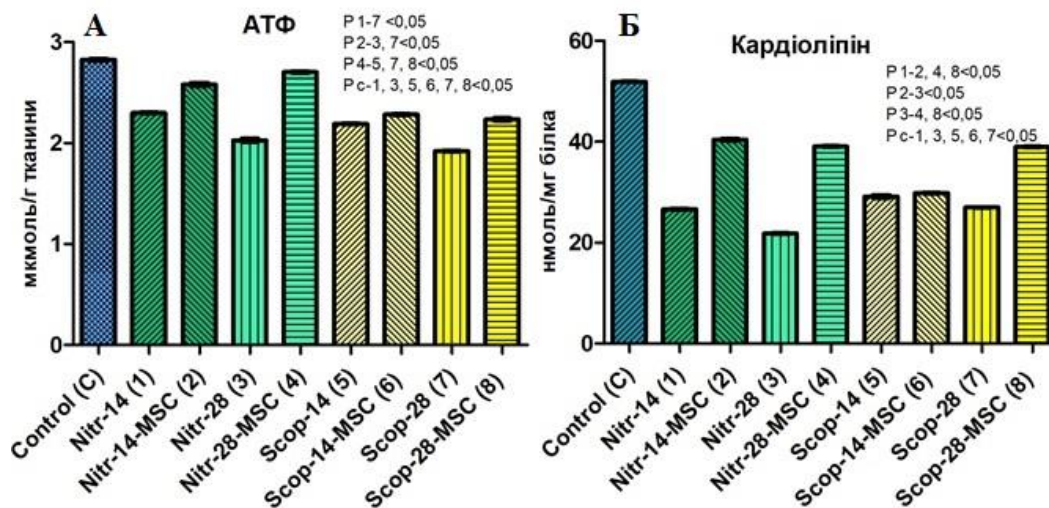


**Рис. 5.3.** Вміст ацетилхоліну (мкг/г) в гомогенатах головного мозку у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу.  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього (Mean±SEM), різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Відомо, що при блокаді М-холінорецепторів скополаміном ацетилхолін не зв'язується з рецепторами і руйнується ацетилхолінестеразою. Дезактивація М-холінорецепторів (зокрема М1, М3-рецепторів), зниження передачі внутрішньоклітинного сигналу відображується на зниженні активації протеїнкінази С, одного з регуляторів неамілоїдогенного розпаду білка APP [234]. З іншого боку, утворення амілоїду сприяє зниженню синтезу ацетилхоліну з холіну та ацетил-коензиму А, який синтезується в мітохондріях [235, 236]. З цього випливає, що при дефіциті ацетилхоліну функція мітохондрій порушується і в нашій роботі підтверджується зниженням синтезу АТФ у тканині головного мозку у щурів після введення скополаміну. Дані результати корелюють з результатами



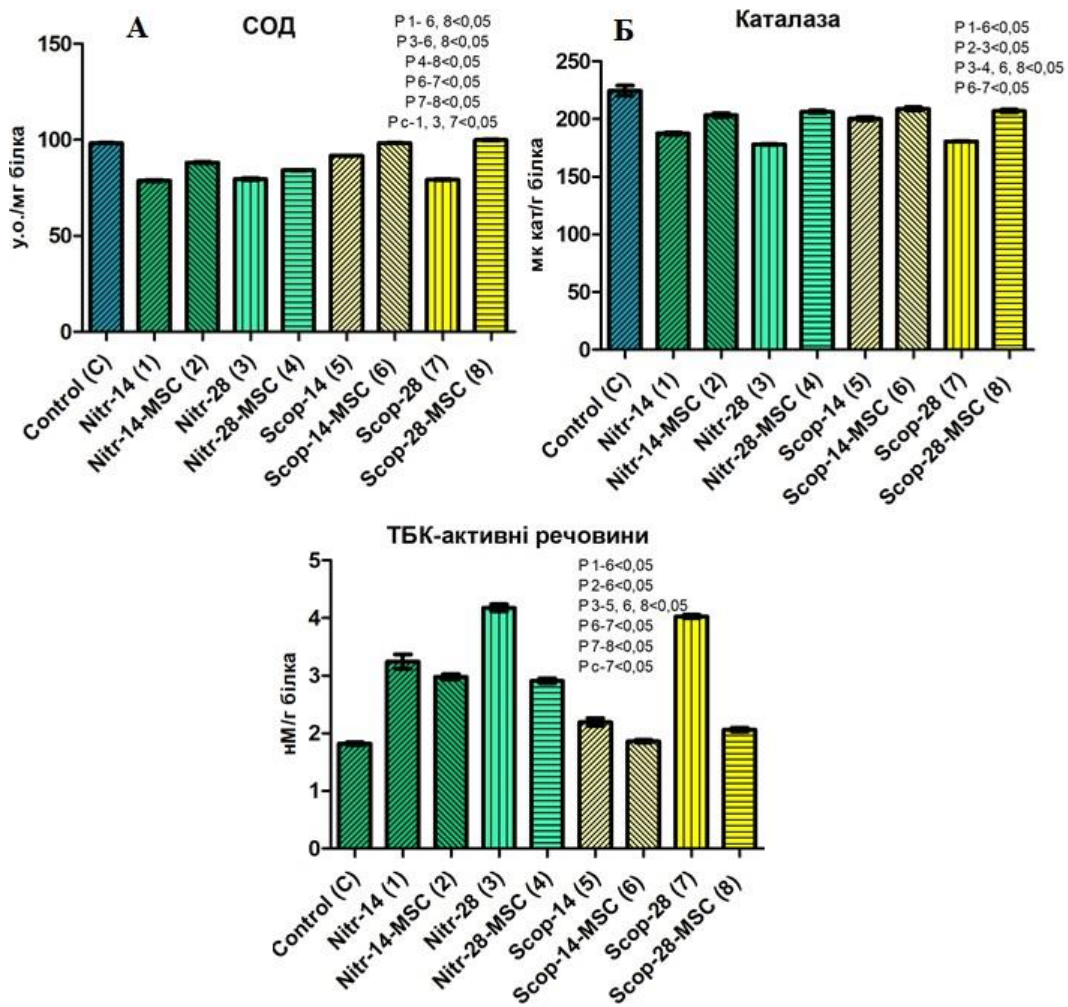
колег, де у щурів зі скополамін-індукованою експериментальною деменцією розвивався локальний гіпотиреоїдизм і зниження синтезу АТФ, призводячи до загибелі нейронів [237]. В даному випадку порушення окислювального фосфорилування може бути пов'язано як з дефіцитом кисню в тканині головного мозку у щурів гр. Scop-14, Scop-28, що видно по збільшенню рівня 2,3-ДФГ в еритроцитах, і зниженню кардіоліпіну - основного фосфоліпіда, що регулює транспорт електронів через мембрану мітохондрій, і призводить до порушення дихального ланцюга, що негативно впливає на синтез АТФ (рис. 5.4, 5.9).



**Рис. 5.4.** Показники енергетичного обміну в тканині головного мозку у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу. А – вміст АТФ в гомогенатах головного мозку, мкмоль/г тканини; Б – вміст кардіоліпіну в мітохондріях головного мозку, нмоль/мг білка.  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього (Mean±SEM), різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Ушкодження мембран мітохондрій в скополамінівій моделі може бути пов'язано і з скополамін-індукованим окислювальним стресом, зменшенням синтезу білків Nrf2 і HO-1, що відповідають за підтримання окислювально-відновного балансу [238]. Адже переважання продуктів перекисного окислення ліпідів, таких як ТБК-активних речовин та інших, над ферментами (каталаза, СОД),

що усувають вільні радикали, викликає окислювальний стрес. У нашому експерименті ін'єкції скополаміну щурам призводили до порушення балансу прооксидантно-антиоксидантної системи, що супроводжувалося зниженням активності СОД та каталази та підвищенням концентрації ТБК-активних речовин (до морфологічно зафіксованого утворення амілоїду). Після 28 днів ін'єкцій скополаміну бутилброміду перекисне окислення ліпідів посилювалось (рис. 5.5).



**Рис. 5.5.** Показники прооксидантно-антиоксидантної системи головного мозку у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу. А – активність СОД в гомогенатах головного мозку, у.о./мг білка; Б – активність каталази в гомогенатах головного мозку, мк кат/г білка; В – рівень ТБК-активних речовин в гомогенатах головного мозку, нМ/г білка.  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими у вигляді середнього значення та стандартної похибки

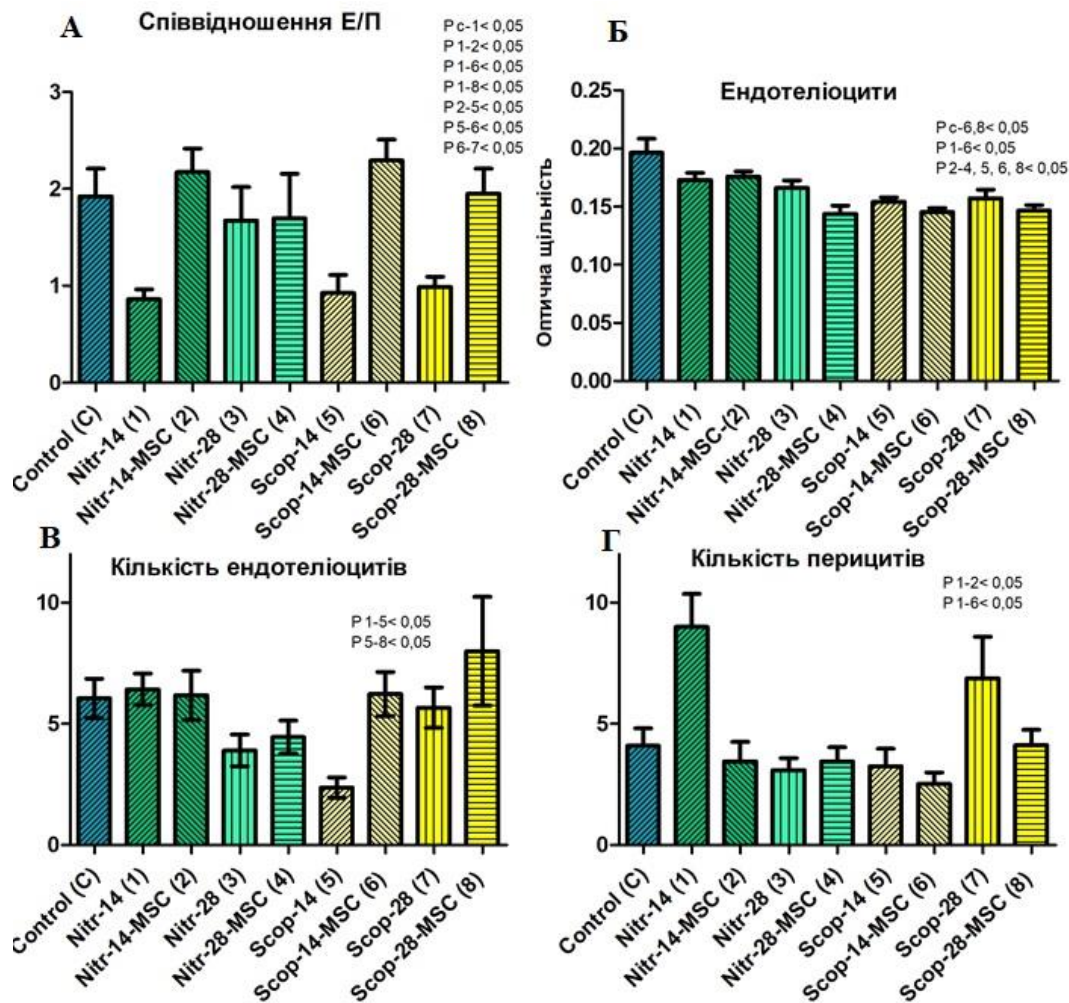
середнього (Mean±SEM), різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Слід зазначити, що дисбаланс в проксидантно-антиоксидантній системі, який був зафіксований у гомогенатах ГМ в дані терміни експерименту та посилювався з продовженням введення скополаміну бутилброміду, супроводжувався посиленням окислювальної модифікації білків і утворенням щільної речовини (амілоїду).

Можна припустити, що блокада М-холінорецепторів скополаміном через зниження передачі внутрішньоклітинного сигналу активує патологічний розщеплення APP-білка і окислювальний стрес, тим самим порушуючи функцію мітохондрій. В результаті ушкодження мітохондрій, відкладення амілоїду в стінках церебральних артерій розвивається гіпоксія мозкових структур, що підтверджується збільшенням 2,3-ДФГ, фізіологічного ліганду гемоглобіну, який сприяє звільненню кисню з гемоглобіну поблизу тканин, які страждають від дефіциту кисню. Однак, багато авторів посилаються на той факт, що на моделях ХА у трансгенних мишах і у пацієнтів із синдромом Дауна перекисне окислення ліпідів відбувається до утворення амілоїдних бляшок і стимулюється переважно прозапальними цитокінами [239]. Розвиток окислювального стресу перед формуванням множинних амілоїдних скупчень після 14 днів ін'єкцій скополаміну бутилброміду узгоджується з цим твердженням.

У більшості випадків окислювальний стрес, який посилюється під впливом амілоїду та гіпоксії, відбувається не тільки в нейропілі, але й в ендотеліоцитах. Показано, що активація транзиторного рецепторного потенціалу меластатину 2 (TRPM2) амілоїдним білком, який регулює  $Ca^{2+}$  канали мітохондрій та ендоплазматичного ретикулу ендотеліоцитів, призводить до внутрішньоклітинного перевантаження  $Ca^{2+}$  та перекисного окислення ліпідів [240]. Під впливом активних форм кисню (АФК), які синтезуються при окислювальному стресі, підвищується проникність ендотелію судин і розвивається його дисфункція [241].

Дійсно, в дослідних групах у щурів зі скополаміною моделлю при морфологічному дослідженні головного мозку в судинах МЦР відмічено зниження кількості капілярів і ендотеліоцитів в них, збільшення кількості перицитів, зниження оптичної щільності ядер ендотеліоцитів (зменшення гетерохромності ядер і компенсаторне підвищення морфофункціональної активності ендотеліоцитів капілярів), формування паріетальних тромбів, відкладення конгофільних речовин у стінці артерій та субендотеліально, особливо після 28 днів введення скополаміну бутилброміду. Ці зміни відбувалися незважаючи на те, що курс ін'єкцій скополаміну бутилброміду був закінчений і вже минуло 14 днів, коли триває лише регенерація ендотелію без його ушкодження (рис. 5.6).



**Рис. 5.6.** Аналіз морфометричного вивчення стінки капілярів ГМ у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу (забарвлення за Ейнарсомом). А – співвідношення Е/П (ендотеліоцитів до

перичитів в стінці капілярів); Б – оптична щільність ядер ендотеліоцитів капілярів (стан ДНК); В – кількість ендотеліоцитів; Г- кількість перичитів в стінці капілярів.  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього ( $Mean \pm SEM$ ), різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

При цьому інші автори вважають, що дегенерація та втрата перичитів, а не ендотеліоцитів, може передувати дисфункції ендотелію та ушкодженню нейронів [125]. Незважаючи на дані протиріччя, морфологічні зміни судин МЦР у щурів скополамінової моделі знаходять своє пояснення у зміні біохімічних та імуногістохімічних параметрів функції ендотелію.

Вивчення біохімічних показників, що характеризують стан ендотелію, показало, що введення скополаміну бутилброміду протягом 28 днів призводило до значного підвищення вмісту ET-1 в сироватці і vWF у плазмі крові, що підтверджує порушення цілісності моношару ендотеліоцитів, посилення вазоконстрикції та тромбоутворення судин. Враховуючи, що ці біохімічні показники відображали загальну реакцію ендотелію кровоносного русла організму, проведене паралельно гістологічне дослідження головного мозку свідчило, що капіляри тканини головного мозку у тварин гр. Scorp-28 були ушкоджені більшою мірою, ніж у гр. Scorp-14 (рис. 5.10 А, В).

Ензим eNOS реагує на ушкодження ендотелію, виконуючи певною мірою компенсаторну роль, він каталізує утворення оксиду азоту (NO). Крім розширення судин, NO має антитромбогенний, протизапальний ефект і сприяє трансендотеліальній міграції ендотеліальних клітин попередників [225]. Різке зниження активності eNOS у гр. Scorp-28 свідчило про сильніше ушкодження ендотеліоцитів і, мабуть, зниження їх компенсаторних можливостей в цілому (рис. 5.10 Б).

Гістологічна регенерація капілярів, проліферація ендотеліоцитів в гр. Scorp-28 розгорталася на тлі більш істотного ушкодження капілярів, ніж гр. Scorp-14, як вказувалося раніше, тому, дійсно ендотелій капілярів тканини головного мозку в

гр. Scorp-28 відновився меншою мірою, ніж у гр. Scorp-14, тобто запропоноване пояснення нижчої активності eNOS у гр. Scorp-28 проти гр. Scorp-14 можна вважати переконливим.

Вміст VEGF у краніальній артеріо-веноній крові був достовірно підвищений у гр. Scorp-28 (рис. 5.10 Г). Очевидно, що такі високі показники VEGF в крові могли сформуватися через високі можливості клітинної регенерації багатьох клітин тканини ГМ, які постраждали від порушення кровопостачання при загибелі ендотелію і руйнуванні капілярів; нові клітини таких тканин активно синтезували VEGF. Саме у гр. Scorp-28 (судячи з гістології головного мозку) була максимальна загибель ендотелію, відновлення якого завершувалося на момент виведення з експерименту, а гр. Scorp-14, зрозуміло, ступінь стимуляції поділу ендотеліоцитів цим активним білком знижувалася до кінця 14 денного періоду регенерації, тобто сталося суттєве, але ще неповне відновлення шару ендотелію в судинах кровоносного русла.

Про втрату (загибель) ендотеліоцитів в даній моделі амілоїдозу ГМ можна судити і по синтезу VEGF в різних клітинах ГМ, завдяки якому активується поділ ендотеліоцитів і відбувається регенерація ендотеліального шару в кровоносних судинах (рис. 5.11).

Цікавим є той факт, що при холінодефіциті, тобто у всіх основних групах, нейрони кори і зони CA1 гіпокампа дифузно забарвлюються міткою VEGF, причому і візуально, і за результатами визначення оптичної щільності, в корі - в більшій мірі, ніж в гіпокампі. Така «загальна» експресія VEGF нейронами зазначених зон, в порівнянні з експресією судинного фактора тільки частиною ендотеліоцитів кровоносних судин, вказує на те, що нейрони продовжують знаходитися в стані недостатнього постачання артеріальною кров'ю, ймовірно, у зв'язку зі зменшенням діаметра внутрішньомозкових артерій при накопиченні амілоїду в стінці. Гіперпродукція VEGF - це компенсаторна реакція в нейронах кори та гіпокампа, яка розкриває не тільки ангіогенний ефект VEGF нейронів, а й, за даними інших авторів [242], холінергічний. Було показано, що судинний фактор



росту підтримує експресію холінацетилтрансферази, що бере участь в синтезі ацетилхоліну, тим самим активуючи заповнення його дефіциту в головному мозку.

В нейронах кори рівень експресії судинного фактора практично не відрізняється від такого в гр. С. Крім того, ймовірно, в нейронах кори ступінь холінодефіциту менше, ніж в нейронах гіпокампа, тому що ацетилхолін також стимулює синтез VEGF [243]. Така гіпофункція нейронів гіпокампа пояснюється тим, що у цій області існують М- і Н-холінорецептори, область щільно інервується холінергічними нейронами, тому біла речовина гіпокампа руйнується при ХА з формуванням амілоїдних бляшок, а тіла нейронів знаходяться в стані глибокої дистрофії [90].

Визначення вмісту VEGF в плазмі венозної крові дозволяє оцінити різницю між рівнем його синтезу клітинами мозку і ступенем рецепції ендотеліоцитами для стимуляції їх розподілу. Помітно, що у всіх основних групах оптична щільність плазми знижена, у порівнянні з групою контролю. При цьому, в гр. Scop-14 цей показник найменший і достовірно (в 4 рази) нижче контрольних значень. Найімовірніше, це може бути пов'язано зі зниженим синтезом даного фактора в нейронах гіпокампа і ендотеліоцитах.

При постановці ІМГХ на кадгерин (Е-кадгерин), встановлено порушення його експресії в судинах МЦР вказуючи на порушення цілісності ендотелію, збільшення проникності ГЕБ, що забезпечує розвиток набряків і міграцію плазматичних білків за капілярну стінку, які беруть участь у формуванні амілоїду [244]. У роботах Ткаченко А.С. та співавторів [245], також з використанням ІМГХ реакції на Е-кадгерин демонструється зниження експресії даної молекули адгезії не тільки в епітеліоцитах кишечника, але і в ендотеліоцитах кровоносних судин при запальних захворюваннях кишечника в експерименті. Тобто тривале введення скополаміну призводить до підвищення проникності ГЕБ. Також відомо, що при передозуванні бускопану (скополаміну бутілброміду) у пацієнтів старше 65 років, які споживали цей препарат більше 90 днів, розвивалися когнітивні порушення і функціональна кишкова непрохідність, яка, в свою чергу, може викликати хронічний інтоксикаційний синдром і судинне ушкодження [246]. Таким чином, можна

уявити наступний шлях розвитку проникності ГЕБ для скополаміну: тривале введення скополаміну викликає порушення моторики шлунково-кишкового тракту, що веде до накопичення кишкових токсинів; ця токсемія дистрофізує ендотелій кровоносних судин, а ГЕБ стає проникним для скополаміну, і скополамін, через М-холінорецептори, обумовлює накопичення фрагментів патологічно змінених нейрофіламентів у відростках нейронів. Можна стверджувати, що у тварин основних груп виникає ендотеліальна дисфункція, яка стосується всіх судин організму, а в тканині ГМ ця дисфункція забезпечує участь плазмових білків в синтезі амілоїду ГМ.

Таким чином, у експериментальних тварин зі скополамін-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу, особливо у щурів гр. Scp-28 через 14 днів періоду «регенерації» в тканині головного мозку були виявлені морфологічні та імуногістохімічні докази ушкодження ендотелію капілярів: зменшена гетерохромність ядер ендотеліоцитів капілярів, стінка капілярів регенерувала більшою мірою за типом субституції зі збільшенням кількості перицитів, адгезія ендотеліоцитів в ендотеліальному шарі була зменшена, нейрони кори великих півкуль синтезували збільшену кількість VEGF, а гіпокампа - зменшену. Подібні дані були отримані в дослідженні, де дисфункцію ендотелію судин було виявлено у тварин із когнітивними порушеннями, спричиненими скополаміном [247]. Однак, порівнюючи результати Safar M. з нашими, слід зазначити, що у тварин із скополамін-індукованою деменцією після внутрішньовенного введення ендотеліальних клітин-попередників з кісткового мозку спостерігалось покращення когнітивних функцій за рахунок посилення судинних і нервових факторів росту та зниження прозапальних факторів.

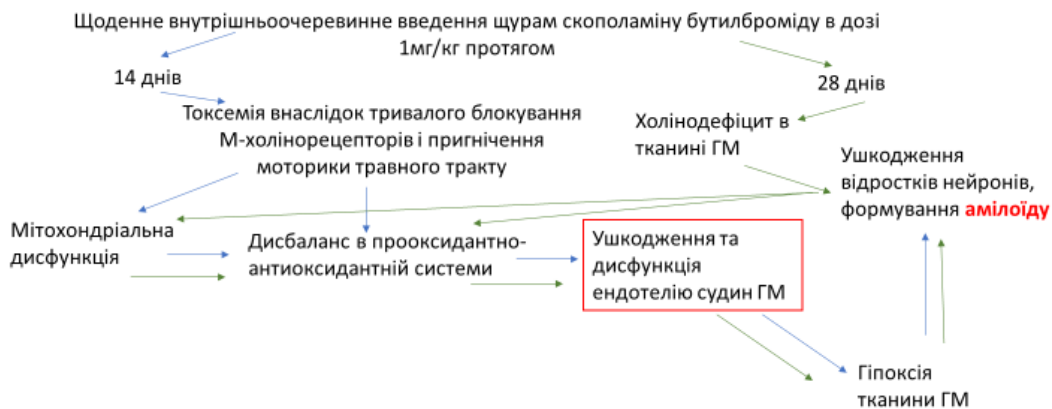
Паралельно у щурів через 14 днів періоду регенерації на тлі холінодефіциту, ушкодження нейропіля, судин та розвитку амілоїдозу клінічно знижувалася рухово-дослідницька активність, тобто кількість квадратів, які перетинали щури, і заглядань у норки зменшувалися, підвищувалася емоційна реактивність за рахунок збільшення кількості болюсів при тестуванні у «Відкритому полі». Зі збільшенням тривалості введення скополаміну бутилброміду, прояви даних поведінкових



реакцій погіршувалися, тобто прогресувало захисне гальмування та зниження дослідницької активності на тлі підвищеної емоційної реактивності. При оцінюванні когнітивних реакцій лише у гр. Scor-28 у більшості щурів не сформувався умовний рефлекс у тесті «Умовний рефлекс пасивного уникнення» на відміну від тесту «Екстраполяційне позбавлення», де щури гр. Scor-14, Scor-28 однаковою мірою не впоралися з цим тестом. Однак, враховуючи наявність похибок у проведенні тесту «ЕП», можна стверджувати, що виражений когнітивний дефіцит сформувався у щурів після 28 днів введення скополаміну бутилброміду, коли судини та нейропіл були уражені значною мірою скупченням амілоїдних мас, що співпадає з даними робіт Дейко Р. Д. [180].

Отже, холінодефіцит, викликаний тривалим введенням скополаміну бутилброміду, сприяє активації патологічного розпаду APP-білка, розвитку окислювального стресу в нейропілі та судинах ГМ, що спричиняє порушення функцій мітохондій, розвиток гіпоксії та розвиток ендотеліальної дисфункції. Дані патологічні процеси супроводжуються зниженням функції нейропіля, його атрофією, формуванням амілоїдних скупчень у нейропілі та артеріях, збільшенням проникності гематоенцефалічного бар'єра, особливо після 28 днів введення скополаміну бутилброміду. Усе це підтверджувалося розвитком когнітивного дефіциту та порушенням поведінкових реакцій. Цікаво відзначити, що 14 днів введення скополаміну не сприяло розвитку холінодефіциту, проте спостерігалися вже початкові ознаки окислювального стресу та ендотеліальної дисфункції, зниження кількості ендотеліоцитів та зміцнення стінок капілярів перицитами, зниження оптичної щільності ендотеліоцитів, підвищення рівня 2,3-ДФГ, різке зниження рівня кардіоліпіну і, як наслідок, мітохондріальна дисфункція. Усі ці зміни відбувалися через 14 днів періоду регенерації. Як було зазначено вище, тривале введення скополаміну веде до порушення перистальтики кишківнику та розвитку токсемії, яка має потужний вплив на функцію мітохондрій, що було видно по різкому зниженню кардіоліпіну в гомогентах головного мозку. Це відобразилось на розвитку дисбалансу в прооксидантно-антиоксидатній системі, ушкодженні судин зі збільшенням їх проникності з подальшим розвитком гіпоксії,

нейродегенеративних процесів і формуванням амілоїду в тканині ГМ. У той час, як деменція альцгеймерівського типу через 28 днів введення скополаміну бутилброміду починається з вираженого холінодефіциту, який спричиняє утворення множинних скупчень амілоїду в нейропілі як на поверхні кори великих півкуль ГМ, так і в субкортикальній білій речовині і в білій речовині гіпокампа та у внутрішньоцеребральних судинах з паралельним розвитком вираженого окислювального стресу, гіпоксії, дисфункції ендотелію та атрофії нейропіля. Тому роль ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку скополамін-індукованої деменції альцгеймерівського типу - вторинна, і є наслідком або мітохондріальної дисфункції та окислювального стресу через 14 днів введення скополаміну бутилброміду, або розвивається внаслідок холінодефіциту через 28 днів (рис. 5.7).



**Рис. 5.7.** Відображення ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку скополамін-індукованої деменції альцгеймерівського типу.

Наступним важливим запитанням є визначення ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу яка виникла у щурів з малодослідженою нітрит-індукованою моделлю.

Нітрит натрію – це неорганічна сіль азотистої кислоти ( $\text{NaNO}_2$ ), яка використовується не тільки як антидот при отруєнні ціанідами, але й у харчовій промисловості для консервації м'ясних та рибних виробів, у сільськогосподарській промисловості для барвників, очищення води, інгібування корозії та утворення

накипу, фотохімії і т.д. Вивчення токсичних властивостей нітриту натрію на організм людини є актуальним питанням, оскільки, наприклад, доведено, що ця речовина, крім метгемоглобінемії, може викликати рак шлунка [248]. Також ще в 2009 році Suzanne M. de la Monte та іншими авторами було встановлено факт почастищення випадків ХА при надмірному накопиченні нітрозамінів, які утворюються в організмі при взаємодії нітриту натрію з білками після попадання його в організм з водою, їжею і т.д. Крім канцерогенної дії, нітрозаміни посилюють окислювальний стрес, надають мутагенний ефект, що відіграє важливу роль у розвитку нейродегенеративних змін [249]. У 2016 році Савицьким І.В. було виявлено розвиток ендотеліальної дисфункції у щурів, які отримували 0,03% розчин нітрату натрію у вільній питній формі замість води [17]. А у щурів-нащадків матерів, які під час вагітності були у стані хронічної нітритної інтоксикації, розвивалася гіпоксична енцефалопатія [250]. Тобто з цього випливає, що між тривалим нітритним навантаженням на організм, розвитком гіпоксичної енцефалопатії та ендотеліальною дисфункцією теж є взаємозв'язок. Це було однією з причин дослідження взаємозв'язку між розвитком ендотеліальної дисфункцією та когнітивними порушеннями у щурів після тривалого прийому нітриту натрію.

Описуючи судинні зміни у щурів, які викликав нітрит натрію після його 14 та 28-денного введення у дозі 50 мг/кг, середньої дози для розвитку гемічної гіпоксії, є сенс спочатку аналізувати зміни нервової тканини ГМ [251].

Слід зазначити, що дана нітритна модель спочатку була створена нами для розуміння, чи може дисфункція ендотелію і гемічна гіпоксія викликати дефіцит ацетилхоліну, утворення амілоїду і розвиток когнітивного дефіциту. Виявилось, що може, тому цю модель ми назвали нітрит-індукована модель деменції альцгеймерівського типу. Так, як було описано в попередньому розділі, в головному мозку щурів з нітритною моделлю, як і зі скополаміновою, нейропіль зазнає змін: стає одноріднішим, подекуди навіть розрідженим, спостерігаються ділянки «пустот» нервових волокон, особливо в зоні гіпокампа при забарвленні бромфеноловим синім. Також спостерігається скупчення амілоїду у нейропіль великих півкуль та гіпокампа. Однак, порівнюючи зі скополаміною моделлю,

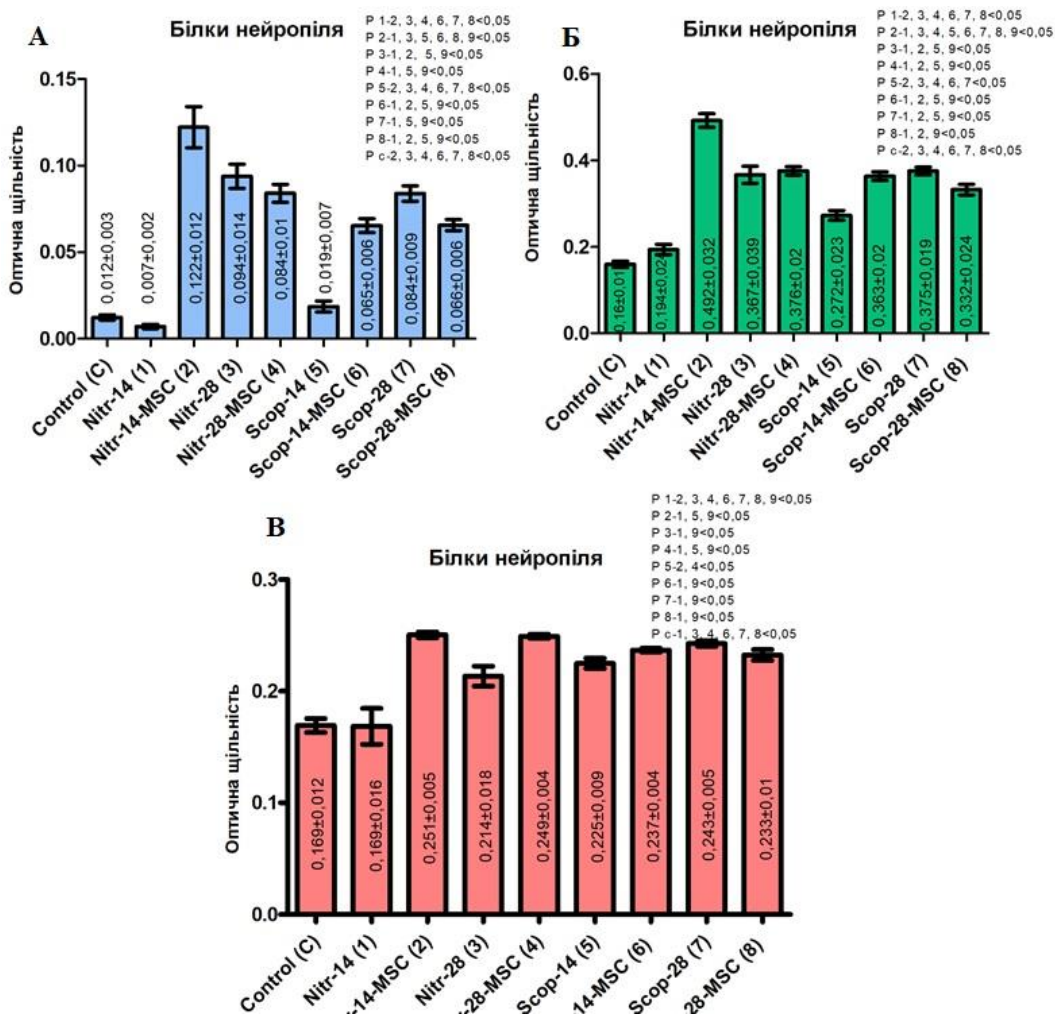
конгофільних мас у нейропілі ГМ щурів із нітритною моделлю зустрічається набагато менше: у гр. Nitr-14 вони майже не виявляються, а гр. Nitr-28 - зустрічаються поодинокі скупчення амілоїду. Такі структурні зміни нейропіля супроводжуються зниженням його функціонального стану. Слід зазначити, що гомогенізація нейропіля йде разом із зниженням його оптичної щільності, вимірної на мікропрепаратах, забарвлених за Ейнарсеном, особливо у гр. Nitr-28 і супроводжується зниженням рівня ацетилхоліну в гомогенатах ГМ, що є підтвердженням гіпофункції нейропіля (рис. 5.1). Холінодефіцит у щурів гр. Nitr-14, Nitr-28 був виражений практично рівною мірою і більше, ніж у гр. Scop-14 та групі контролю, але менше, ніж у гр. Scop-28. Тобто ступінь зниження оптичної щільності нейропіля не позначився на ступені зниження рівня ацетилхоліну в нітритній моделі в порівнянні зі скопопламіною моделлю, що підтверджує зовсім інший механізм розвитку холінодефіциту (рис. 5.3).

Ушкодження нервових відростків та зниження синтезу ацетилхоліну сприяло розвитку порушення поведінкових реакцій та розвитку когнітивного дефіциту. Також, як і в скополамінової моделі, спостерігалось зниження кількості квадратів, що перетинали щури, збільшення кількості болюсів, що відображало підвищення емоційної реактивності на тлі захисного гальмування. Кількість заглядань у норки теж знижувалася, але у щурів гр. Nitr-14 ступінь зниження була меншою, ніж у щурів гр. Scop-14. У щурів із 28-денними моделями деменції спостерігалася зворотна картина: у гр. Nitr-28 щури майже не заглядали в норки на відміну від щурів гр. Scop-28. Можна стверджувати, що різке зниження кількості заглядань у норки у щурів гр. Nitr-28 пов'язано з розвитком незворотніх патологічних змін у тканині ГМ. Однак, за результатами статистичної обробки результатів дослідження у тварин в обох моделях тривалість впливу препаратів (час) не вплинула на зміну кількості пересічених квадратів, болюсів та заглядань у норки у гр. Nitr-28, гр. Scop-28. Швидше за все, тут мало місце запуск каскаду патологічних реакцій в організмі щурів, які сприяли прогресивному зниженню рухової та дослідницької активності щурів. У тестах «УРПУ» та «ЕП» втрата когнітивних функцій була

яскравіше виражена у щурів гр. Nitr-14, гр. Nitr-28, ніж у щурів гр. Scop-14, Scop-28.

Таким чином, 14-денне та 28-денне введення нітриту натрію сприяло виникненню морфоструктурних змін нейропіля великих півкуль та гіпокампа зі зниженням його функції та розвитком поведінкових та когнітивних порушень.

При описанні нейропіля у щурів після впливу нітриту натрію важливо зупинитися на вивченні препаратів ГМ, забарвлених бромфеноловим синім (рис. 5.8).



**Рис. 5.8.** Оптична щільність білків нейропіля великих півкуль ГМ у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу в різних зонах світлового спектра (забарвлення бромфеноловим синім). А – в синій зоні світлового спектра; Б – в зеленій зоні світлового спектра; В – в червоній зоні світлового спектра.  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього (Mean±SEM), різних груп

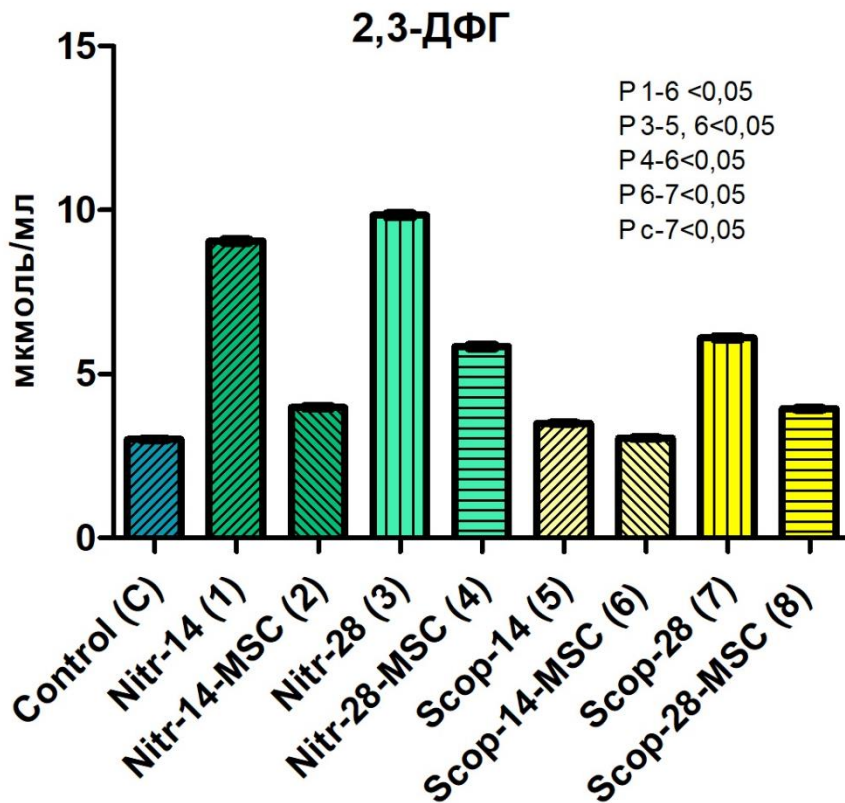
статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Відзначено, що оптична щільність у всіх частинах спектра зростає із збільшенням тривалості введення нітриту натрію. Така ж динаміка спостерігається і в скополаміновій моделі, проте значення оптичної щільності білків нейропіля більше, особливо у червоній та зеленій зонах світлового спектра. Збільшення оптичної щільності нейропіля при забарвленні бромфеноловим синім може свідчити про формування більш щільної речовини, у нашому випадку – скупчення патологічно сформованих білкових структур (амілоїду) (рис. 5.8). При побудові графіків, де по осі X розташовані значення співвідношення R/B, а по осі Y – значення оптичної щільності нейропіля в різних зонах світлового спектра, динаміка кривих була однаковою як у нітритній, так і в скополаміновій групах.

Ми вважаємо, що посилення окислювальної модифікації білків у нейропилі великих півкуль у щурів із нітритною моделлю виникло внаслідок метгемоглобінемії та гіпоксії тканини ГМ. Адже рівень 2,3-ДФГ зріс майже втричі у щурів гр. Nitr-14, Nitr-28 у порівнянні з контрольними значеннями і був значно вищим за значення даного показника у щурів зі скополаміновою моделлю (рис. 5.9).

Ступінь підвищення вмісту 2,3-ДФГ в еритроцитах відповідає зростанню рівня гіпоксії. Тобто, між тривалістю курсу введення нітриту натрію та ступенем вираженості гіпоксії була пряма залежність (рис. 5.9).

Наші дані суперечать даним Тихонової Л.А., де в еритроцитах щурів з наявністю 25-35 фрагментів бета-амілоїду в крові, а також у пацієнтів з ХА, рівень 2,3-ДФГ був знижений, що автор пов'язувала з порушенням енергетичного обміну та зниженням антиоксидантних ферментів в еритроцитах [252]. Дане протиріччя можна пояснити вираженою гіпоксією мозку, спровокованою утворенням метгемоглобіну в крові та ушкодженням судин, про що йтиметься далі.

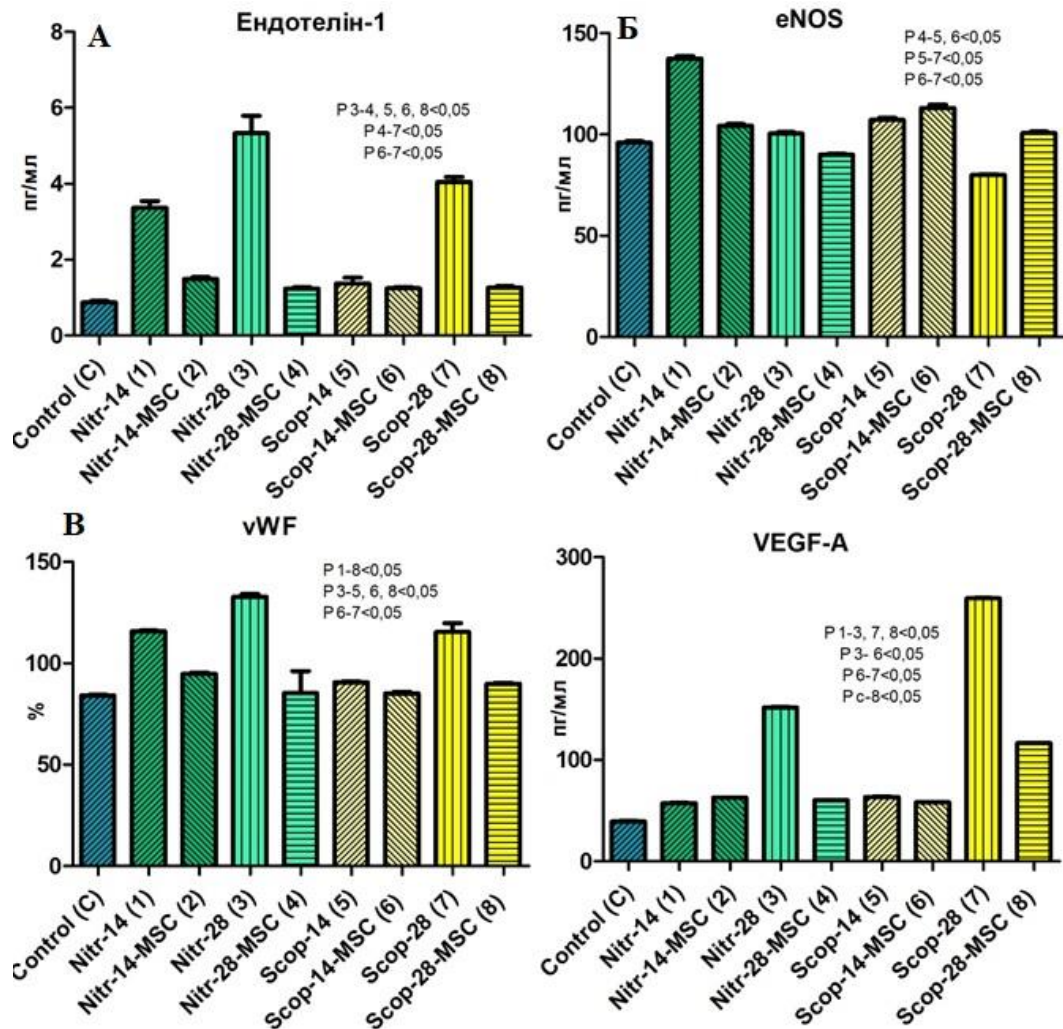


**Рис. 5.9.** Вміст 2,3-ДФГ (мкмоль/мл) в еритроцитах крові у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу.  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього ( $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ), різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

На відміну від скополамінової моделі вже через 14 днів введення нітриту натрію були виявлені яскраві скупчення конгофільних мас субендотеліально. Також візуально при мікроскопії, у порівнянні зі скополаміновою моделлю, у щурів з нітритною моделлю деменції зустрічаються частіше obturating та parietal thrombi, інфільтрація стінок макрофагами та лімфоцитами, що підтверджується вищими значеннями фактора фон Віллебранда, який відіграє у згортанні крові, а також у ангиогенезі та запаленні [253]. Підвищення згортання крові та розвиток васкуліту є реакцією яка виникає у відповідь на ушкодження ендотелію судин, викликане нітритом натрію і супроводжується більш значним підвищенням рівня ET-1 у краніальній крові в порівнянні з контрольними значеннями та значеннями цього показника у щурів, яким вводили скополамін бутилбромід. Незважаючи на



це, оптична щільність ендотеліоцитів судин МЦР ГМ у щурів з нітритною моделлю була вищою, що пояснює вищі значення eNOS у нітритній моделі, ніж у скополаміновій (рис. 5.10).



**Рис. 5.10.** Концентрація біохімічних показників функції ендотелію в крові у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу. А – рівень ендотеліну–1 (ЕТ-1), пг/мл, сироватка; Б – рівень eNOS, пг/мл, сироватка; В – рівень vWF, %, плазма; Г – рівень VEGF-A, пг/мл, сироватка.  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього (Mean±SEM), різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

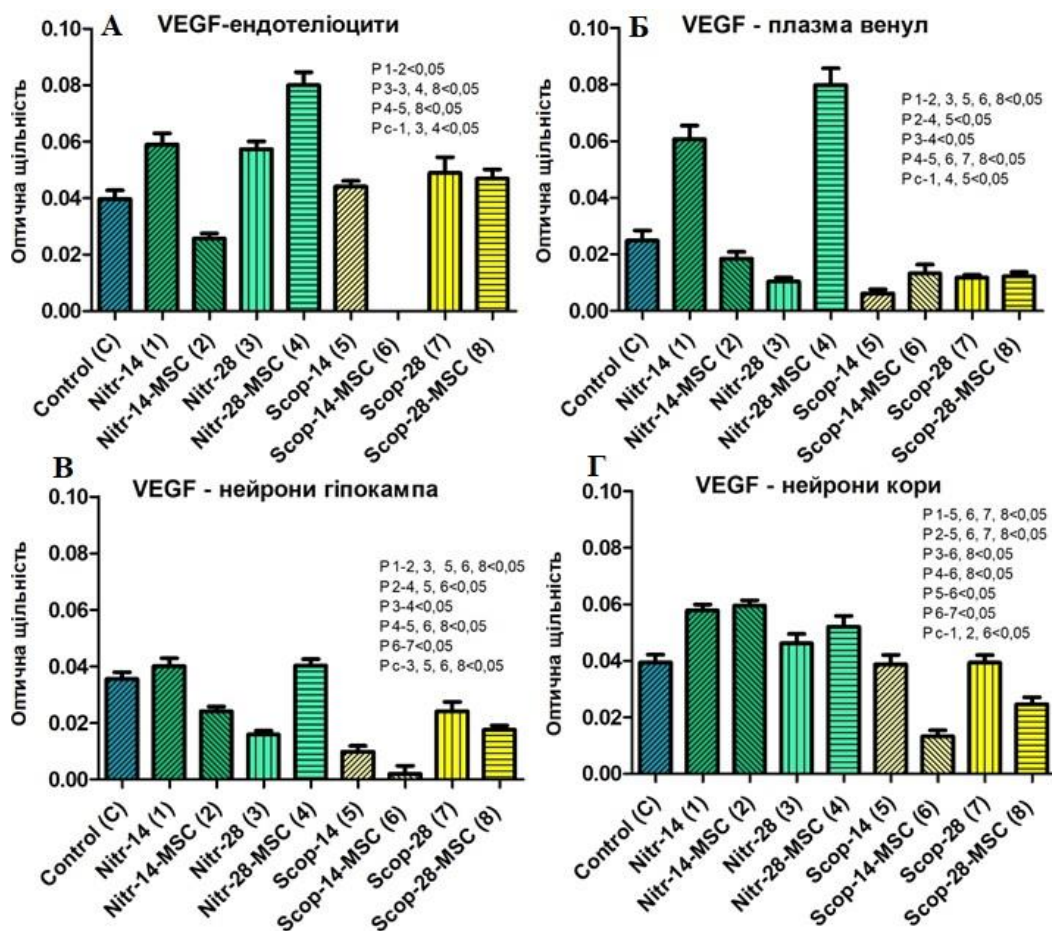
Однак зі збільшенням тривалості введення нітриту натрію значення цих показників зменшувалися. Цікаво, що незважаючи на виражене ушкодження



ендотелію у всьому організмі, через 14 днів «періоду регенерації» у щурів з 14-денною нітритною моделлю співвідношення Е/П (ендотеліоцитів до перицитів) у тканині ГМ не відрізняється від такого у щурів з 14-денною скополаміновою моделлю і є менше 1. Але, якщо у скополамінової моделі зменшується кількість ендотеліоцитів, то у нітритній моделі навпаки збільшується кількість перицитів (рис. 5.6). Тобто компенсаторно на підвищення в крові рівнів ET-1, vWF, що сигналізують про виражене ушкодження ендотелію у всьому організмі під впливом нітриту натрію, в судинах МЦР ГМ компенсаторно починає зростати кількість перицитів. Через 28 днів введення нітриту натрію співвідношення Е/П зростає та перевищує 1, проте не за рахунок збільшення кількості ендотеліоцитів, а за рахунок різкого зниження рівня перицитів. Дані зміни підтверджують судинну гіпотезу розвитку ХА, згідно з якою судинне ушкодження в ГМ починається з дегенерації та втрати перицитів, порушення ГЕБ, ендотеліальної дисфункції, що тягне за собою порушення кліренсу бета-амілоїду через периваскулярні шляхи та ГЕБ та ушкодження нейронів [9, 10, 125]. Адже дійсно, максимально низькі значення оптичної щільності нейропіля, збільшення частоти утворення амілоїдних скупчень у нейропілі великих півкуль та гіпокампа ГМ, є найгіршими показниками при оцінюванні когнітивних функцій щурів і відповідають мінімальній кількості перицитів, нижчому значенню оптичної щільності ендотеліоцитів, максимальним значенням ET-1, vWF в артеріо-венозній крові у щурів після 28 днів введення нітриту натрію. Необхідно зазначити, що це ушкодження ендотелію починається ще до утворення амілоїду в тканині ГМ, оскільки в гр. Nitr-14 скупчення конгофільних мас можна було знайти, в основному, лише субендотеліально, а не в нейропілі. Слід зазначити, що в нітритній моделі спостерігається більше мічених Ki-67 ендотеліоцитів, ніж у скополамінової, де скупчення амілоїду виявляються у нейропілі вже після 14 днів введення скополаміну.

При вивченні вмісту VEGF-A у краніальній артеріо-венозній крові знову виникли протиріччя при порівнянні показників обох моделей (рис. 5.10 Г). Незважаючи на те, що у відповідь на вплив нітриту натрію підвищується рівень даного показника в крові зі збільшенням тривалості введення даної речовини, при

введенні скополаміну продукція VEGF-A в кров була значно вищою і досягала максимальних показників гр. Scop-28. Така виражена стимуляція росту нових капілярів повинна відбуватися при більш вираженому ушкодженні ендотеліоцитів, що підтверджується їх гіпофункцією (нижчими значеннями оптичної щільності мічених VEGF ендотеліоцитів у щурів зі скополаміновою моделлю в порівнянні з нітритною). Однак, з іншого боку, більш високі значення мічених VEGF нейронів кори та гіпокампа ГМ у щурів з нітритною моделлю, порівняно зі скополаміновою, свідчать про більш високу потребу в поліпшенні кровопостачання та доставки кисню до тканини мозку (рис. 5.11).



**Рис. 5.11.** Оптична щільність експресуючих VEGF структур у тканині головного мозку (умов.од.опт.щільн.) у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу. А – VEGF експресія в ендотеліоцитах судин мікроциркуляторного русла; Б - VEGF експресія в плазмі венул; В - VEGF експресія в нейронах гіпокампа; Г - VEGF експресія в нейронах кори головного

мозку.  $P < 0,05$  - різниця між даними, представленими у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього ( $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ), різних груп статистично значуща (дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Тому можна припустити, що даний фактор, синтезуючись у кров ендотеліоцитами, може швидко поглинатися тими самими ендотеліоцитами та нейронами, але вже в тканині ГМ, який є одним із найчутливіших до гіпоксії органів.

Для оцінювання рівня продукції VEGF різними клітинами ГМ та «споживання» було визначено оптичну щільність міченої VEGF плазми крові у венах ГМ (рис. 5.11 Б). Цей показник справді можна розцінювати як показник, що відбиває концентрацію VEGF у венозній крові головного мозку. Виявляється, із тканини мозку з венозною кров'ю у гр. Nitr-14 вийшло значно більше VEGF, ніж у гр. Nitr-28, певне, оскільки у гр. Nitr-28 споживалося значно більше цього білка, такя. регенерація ендотелію ще не завершена. Ці результати не суперечать даним, одержаним Li Huang et. Al, коли у пацієнтів з астмою рівень VEGF був значно нижчим, ніж у хворих з легкими когнітивними порушеннями [254].

При імуногістохімічному визначенні вмісту (тобто продукції) VEGF у нейронах гіпокампа, кори великих півкуль та ендотеліоцитів капілярів у гр. Nitr-14 спостерігалось збільшення кількості мічених відповідних клітин у порівнянні з гр. С і, одночасно, збільшення оптичної щільності мітки, тобто вмісту цього білка в цитоплазмі (рис. 5.11 А, В, Г). У гр. Nitr-28, як було сказано раніше, ушкодження ендотелію капілярів було виражено сильніше і супроводжувалося атрофією кори півкуль і СА1 зони гіпокампа, майже всі нейрони виявилися міченими, але оптична щільність цитоплазми – менше, ніж у гр. Nitr-14, що може бути обумовлено дистрофією нейронів, що «вижили», і їх зниженою здатністю продукувати VEGF. Кількість мічених клітин у капілярному руслі головного мозку у гр. Nitr-14 та гр. Nitr-28 було різко збільшено в порівнянні з гр. С, а оптична щільність цитоплазми у таких ендотеліоцитах підвищена однаково.

Таким чином, у нашому експерименті було показано, що нейрони кори та гіпокампа реагували на ушкодження ендотелію капілярів та стимулювали вироблення фактора росту судин. У дослідженні Okabe K. також було показано, що секретований нейронами кори і гіпокампа VEGF індукував рост судин, що є важливим для кровопостачання ділянок мозку з дистрофічними змінами [255]. Проте, слід зазначити, що продукція VEGF (оптична щільність цитоплазми та кількість мічених клітин) в нейронах кори, гіпокампа, ендотеліоцитах у щурів зі скополаміновою моделлю менша, ніж у щурів з нітритною моделлю. Адже при нітритній моделі, на відміну від скополамінової, ушкодження судин ГМ спостерігалось вже після 14 днів ін'єкцій та посилювалось з подовженням терміну введення нітриту натрію. Тим паче, що нітрит натрію з гемоглобіном утворює метгемоглобін, який погіршує гіпоксичний стан нейронів та ушкоджених ендотеліоцитів [256]. У щурів зі скополаміновою моделлю оптична щільність мічених VEGF ендотеліоцитів є меншою в порівнянні з тваринами з нітритною моделлю, але вища, ніж в контрольній групі, що є результатом наявності ушкодження судин, але менш значного. Причиною нижчих значень оптичної щільності цитоплазми мічених VEGF нейронів кори та гіпокампа після введення скополаміну, порівнюючи з введенням нітриту натрію, полягає в тому, що дефіцит ацетилхоліну має значно більший вплив на функцію нейронів, ніж гіпоксія, викликана судинним ушкодженням і метгемоглобіном. Також, як було вище зазначено, в цитоплазмі нейронів гіпокампа у всіх дослідних групах оптична щільність була менша, ніж в нейронах кори, що, ймовірно, пов'язано з вираженим дефіцитом ацетилхоліну, стимулятора синтезу VEGF в цих зонах ГМ.

Таким чином, нітрит натрію, на відміну від скополаміну бутилброміду через 14 днів «періоду регенерації», має більш виражений шкідливий вплив на судини ГМ і всього організму при його тривалому введенні, незважаючи на те, що оптична щільність ендотеліоцитів капілярів МЦР ГМ вище і синтез ними VEGF теж вище, що відображає їх підвищену компенсаторну реакцію у відповідь на ушкодження ендотелію амілоїдом та гіпоксію. Прогресування гіпоксії ГМ та руйнування нервових волокон з утворенням на їх місці патологічних білків та порушенням

передачі імпульсів є наслідком вираженої ендотеліальної дисфункції, що супроводжується утворення тромбів, розвитком у тканині ГМ васкуліту, порушення ГЕБ та збільшенням потреби нервової тканини у кровопостачанні та кисні. на тлі .

Слід враховувати, що гіпоксія, спричинена судинним ушкодженням та метгемоглобінемією, активація перекисного окиснення ліпідів та порушення тканинного дихання – всі ці процеси йдуть поряд і активно розвиваються при прогресуванні дефіциту кисню в тканинах. Адже в умовах гіпоксії в клітинах і тканинах відбувається нізькоенергетичний зсув в аденіловій системі, тобто знижується інтенсивність енергетичного обміну.

Інтегральним показником рівня енергетичного обміну в тканинах є вміст АТФ, який синтезується мітохондріями, чия роль дуже важлива в таких енерговитратних процесах, як синаптична передача й зростання аксонів. Відомо, що мітохондрії можуть міняти свою форму та розмір в залежності від умов, в яких вони функціонують, і від активації білків «злиття/поділу», що знаходяться на внутрішній і зовнішній мембрані мітохондрій [110]. Наприклад, при дефіциті глюкози посилюється фрагментація мітохондрій, а при збільшенні в дієті поліненасичених жирних кислот спостерігається підвищене злиття мітохондрій [257]. На таку «мітохондріальну динаміку» особливий вплив мають активні форми кисню, надлишок яких руйнує мембрани мітохондрій, збільшуючи їх розподіл, а на фізіологічному рівні - грають захисну роль для нормальної підтримки стану мітохондрій і ремоделювання їх крист [258, 259].

У той же час, доведено, що при взаємодії на зовнішній мембрані мітохондрій бета-амілоїду й тау-протеїну з білком Dynamin related protein 1 (DRP1), збільшується експресія DRP1, що тягне за собою активацію фрагментації мітохондрій [260]. Одночасно при таупатіях і гіпоксії замість підвищення поділу мітохондрій утворюються подовжені мітохондрії (mitochondria-on-a-string, MOAS), які не здатні до поділу і функціонують на залишковому принципі [261]. Як надмірна фрагментація мітохондрій, так і нездатність до поділу, в результаті негативно відображається на цілісності крист і окислювальному фосфорилуванні

[262]. Всі зазначені стани супроводжуються порушенням «аксонального транспорту» мітохондрій, тобто їх переміщення по мікротрубочкам аксонів і дендритів [263]. В підсумку, в тканині головного мозку розвивається мітохондріальна дисфункція та енергодефіцит (порушується доставка АТФ до синапсів, не вистачає енергії для зростання аксонів) [264].

Як було зазначено вище, не тільки патологічні білки можуть викликати порушення функції мітохондрій, а й гіпоксія/ішемія. При цьому відзначено зниження окислювального фосфорилування і накопичення супероксидних радикалів, які у великій кількості підвищують проникність внутрішньої мембрани і порушують різницю потенціалів мембран мітохондрій [265]. Згодом, мітохондрії набухають, вивільняється цитохром С, протеази, що активують каспази та апоптоз клітин [266]. Врегулювати весь цей процес можуть фосфо- і сфінголіпіди, розташовані на мембранах мітохондрій. Так, один з них - це кардіоліпін, який відповідає за обмін електронів через мембрану мітохондрій, активацію цитохромоксидази С, врегулювання процесів «злиття/поділу» мітохондрій при взаємодії з білками мембран [267]. Таким чином, дефіцит цього «корисного» ліпиду в мітохондріях є предиктором загибелі клітин.

Всі ці ствердження щодо мітохондріальної дисфункції та дисбалансу в прооксиданто-антиоксидантної системи на фоні гіпоксії знайшли своє підтвердження й в нашому експерименті, де довготривале введення нітриту натрію сприяло розвитку гемічної гіпоксії та ішемії судинного походження.

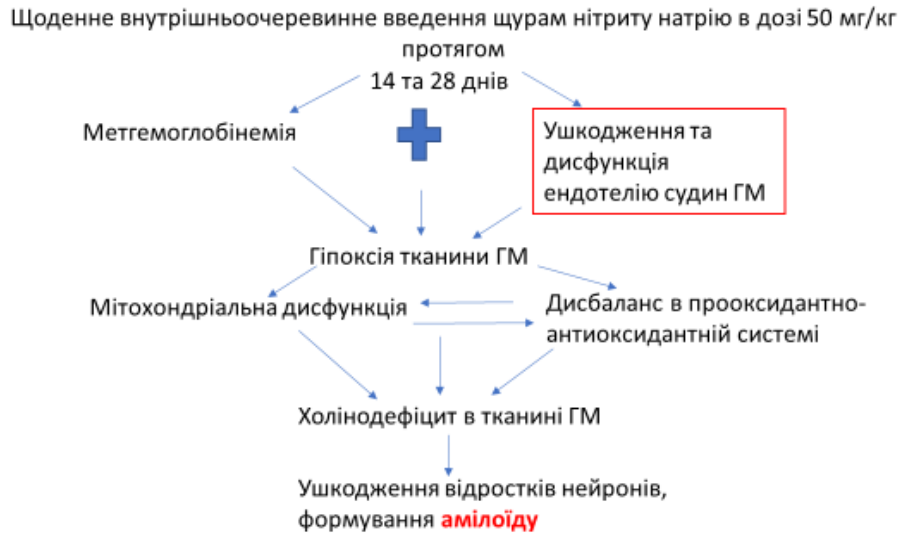
При нітритному навантаженні концентрація фосфоліпідів, в тому числі і кардіоліпіну мітохондріальних мембран мозку щурів, різко, в більшій мірі, ніж після введення скополаміну бутилбромуді, знижується, відображаючи більш виражене ушкодження мембран мітохондрій у щурів з нітрит-індукованою деменцією, не дивлячись на те, що ступінь зниження рівню АТФ в обох моделях, в порівнянні з контрольними значеннями, майже однакова.

Таке більш виражене ушкодження фосфоліпідів внутрішньої мембрани мітохондрій після введення нітриту натрію можна пояснити недостатньою кількістю отримування кисню з крові та більш високою продукцією ТБК-активних

речовин, маючих найбільш виражений ушкоджувальний вплив серед усіх продуктів перекисного окиснення ліпідів на всі компоненти клітин й на їх мембрани [268]. Дисбаланс в антиоксидантній системі також був більш виражений у нітритній моделі, що підтверджено зниженням активності ферментів - СОД, що бере участь у дисмутації супероксидних радикалів, та каталази, що каталізує розщеплення великої кількості пероксиду водню [269]. Звідси і зниження концентрації ацетилхоліну у гомогенатах ГМ у щурів після тривалого введення нітриту натрію. Адже шкідлива дія вільних радикалів на мембрани мітохондрій сприяє зниженню в матриксі мітохондрій під час клітинного дихання утворення ацетил КоА, як одного з важливих компонентів, які беруть участь у синтезі ацетилхоліну.

Як наслідок, ми можемо спостерігати порушення синаптичної передачі, що клінічно підтверджується втратою когнітивних функцій у експериментальних щурів. Так, у роботах Guo L, конвергентні ефекти амілоїду, тау-протеїну та інших факторів викликають дисфункцію мітохондрій, а отже, і зниження синтезу АТФ, порушення гомеостазу кальцію, збільшення синтезу активних форм кисню, що впливає на вироблення нейротрансмітерів та розвиток синаптичної недостатності [270]. Дані наукові твердження збігаються з нашими, де «іншими факторами» є судинне ушкодження та гіпоксія.

Отже, роль судинного ушкодження (ендотеліальної дисфункції та субендотеліального відкладення амілоїду) у розвитку деменції альцгеймерівського типу у щурів після введення нітриту натрію є визначальною і разом з гемічною гіпоксією – первинною в ушкодженні нервової тканини, розвитку окислювального стресу і мітохондріальної дисфункції зі зниженням рівня ацетилхоліну та утворенням амілоїду в нервовій тканині ГМ (рис. 5.12).



**Рис. 5.12.** Відображення ролі ендотеліальної дисфункції в механізмах розвитку нітрит-індукованої деменції альцгеймерівського типу.

Маючи загальне уявлення про судинне ураження та ушкодження нервової тканини за різних умов розвитку деменції, нас зацікавили питання регенерації ендотелію та нервової тканини ГМ через 14 днів «періоду регенерації», коли після закінчення 14-28-денного курсу ін'єкцій скополаміном бутилбромідом/нітритом частина тварин отримувала одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин внутрішньовенно струминно.

Дегенерація і регенерація, ці два протилежні процеси, відбуваються в нервовій тканині ГМ. Думка про те, що нервові клітини не регенерують після їх ушкодження, стала невірною, тому що доведено, що нейрогенез у дорослому віці існує. Так, наприклад, у субвентрикулярній зоні бічних шлуночків і зубчастій звивині гіпокампа («нейрогенні» зони залишків зародкових шарів, які утримують нейральні стовбурові клітини в особливому мікрооточенні) відбудовується нейрогенез та нейритогенез, що підвищує пластичність мозку в умовах різного впливу патологічних факторів та підтримує синаптичну функцію [271]. Тим більше, зараз досліджується питання про те, що гіпоталамус і нижня стінка третього шлуночка, які містять таніцити (епендимоцити дна третього шлуночка), також активно беруть участь у нейрогенезі [272]. Тобто, крім того, що у здорових людей внутрішня регенерація ендотелію та відновлення судин всього організму

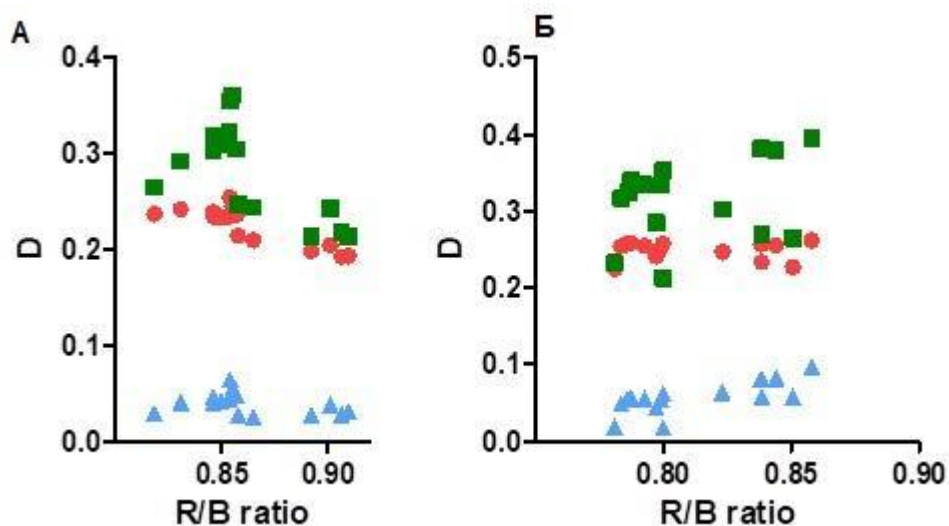


можлива, доведено ще й існування регенерації нейронів, дендритів та формування синапсів у тканині ГМ. Для нас важливо було визначити експериментально за допомогою однократного введення мезенхімальних стовбурових клітин після тривалого впливу ушкоджуючого фактора, буде чи ні відбуватись регенерація даних структур і якщо так, то якою вона буде.

Відомо, що стовбурові клітини мають властивість самооновлення і диференціювання в різні клітини. Мультипотентні клітини дають початок групі клітинних клонів усередині однієї тканини. З мультипотентних клітин останнім часом широко використовуються мезенхімальні стромальні стовбурові клітини, які доступніші, ніж ембріональні, індуковані плюрипотентні, нейральні стовбурові клітини, і показали свій позитивний ефект на експериментальних моделях ушкодження ЦНС у тварин [273]. Так, у дослідженні нейрохірургів у пацієнтів з паркінсоноподібним синдромом через 14 днів після введення мезенхімальних стовбурових клітин з червоного кісткового мозку в дозі  $0,5 \cdot 10^6$  спостерігалось відновлення рухів, а у щурів з моделлю паркінсоноподібного синдрому через 9-10 днів після внутрішньовенного введення MSC з кісткового мозку в різних дозах спостерігалось відновлення рухової активності та при морфологічному дослідженні стовбурові клітини були виявлені в тканині ГМ [23, 186]. Спираючись на досвід наших колег, нами були використані MSC з червоного кісткового мозку, мічені GFP, у дозі  $0,5 \cdot 10^6$  клітин на одного щура і було проведено оцінювання ефективності їх використання через 14 днів «періоду регенерації». Як і в попередніх роботах нейрохірургів, стовбурові клітини мігрували в тканину ГМ через 14 днів після їх внутрішньовенного введення в обох моделях деменції альцгеймерівського типу, тому і всі вищезгадані зміни тканини ГМ підтверджують наявність стовбурових клітин у місцях ушкодження судин та нервової тканини.

При описі морфологічної картини нейропіля ГМ важко судити про ефект MSC, оскільки нейропіль залишився таким же гомогенізованим і розрідженим зі скупченнями амілоїду. Однак, в дослідженнях Naaldijk Y і ін. [274], було доведено, що у щурів з генної моделлю ХА після внутрішньовенного введення MSC відбувається зменшення розмірів амілоїдних бляшок, посилення експресії генів

прозапальних цитокінів на тлі відсутності зміни експресії протизапальних медіаторів і кількості мікроглії. У нашому експерименті не відзначено резорбційного впливу введення стовбурових клітин на конгофільні (амілоїдні) ділянки в білій речовині (нейропілі), проте в збережених ендотеліоцитах і нейронах є ознаки їх морфофункціональної активізації, надаючи нейротрофічний і ангиогенний регенераторний ефект. Так, наприклад, на тлі наявності ушкоджених ділянок нейропіля зустрічаються гіперплазовані ділянки епендими шлуночків. Посилаючись на роботи, де епендиміоцити шлуночків беруть участь у нейрогенезі [275] слід зазначити, що у групах без стовбурових клітин, особливо у гр. Nitr-14, спостерігаються ділянки багаторядності епендиміоцитів шлуночків, мічених Ki-67, що вказує на їх посилену регенерацію. У щурів, яким вводили стовбурові клітини, простежуються наявність щільного утворення зі стабільними цифрами оптичної щільності при різному співвідношенні R/B (амілоїд) та ділянки, де оптична щільність білків нейропіля зменшується при збільшенні співвідношення R/B (як в гр. С), що можна трактувати як наявність у відростках нових білків, тобто спостерігається морфологічне підтвердження стимуляції внутрішньоклітинної регенерації шляхом використання MSC (рис. 5.13).



**Рис. 5.13.** Оптична щільність (D) білків нейропіля в червоній, синій, зеленій зонах світлового спектра та співвідношення R/B (середніх значень яскравості кольору в червоній (R) і синій зоні спектра (B), виміряні на мікропрепаратах

великих півкуль ГМ у щурів з двома експериментальними моделями деменції альцгеймерівського типу (забарвлення бромфеноловим синім). А – гр. Scop-28-MSС; Б – гр. Nitr-28-MSС.

Про поліпшення функціонування нейропіля можна судити і за допомогою вимірної оптичної щільності нейропіля на мікропрепаратах, забарвлених галоціанін-хромовими галунами за методом Ейнарсона, завдяки чому можна робити висновки про вміст РНК в цитоплазмі нервових відростків. У щурів зі скополамін-індукованою деменцією стовбурові клітини сприяли підвищенню оптичної щільності нейропіля та рівня ацетилхоліну в гомогенатах ГМ (рис. 5.1, 5.3). У щурів з нітритною моделлю, незважаючи на те, що рівень ацетилхоліну перевищив значення контрольної та скополамінової груп після ведення MSС, оптична щільність нейропіля незначно знижувалася або не змінювалася. Можливо це пов'язано з тим, що стовбурові клітини прискорили регенерацію нейропіля, яка була запущена нейрогенними зонами ГМ до застосування стовбурових клітин, що дало можливість для формування нових молодих відростків, що видно за графіками оптичної щільності при забарвленні бромфеноловим синім.

Іншими словами, стовбурові клітини можуть відновлювати взаємодію ацетилхоліну з М-холінорецепторами, тим самим покращуючи синаптичну пластичність між відростками нейронів, що ми можемо спостерігати за зміною когнітивних функцій та поведінкових реакцій у щурів. Незважаючи на те, що через 14 днів періоду «регенерації» рухова активність у тварин усіх груп знизилася, порівняно з періодом до початку ін'єкцій препаратів кількість болюсів у щурів, яким вводили MSС, знижувалася, крім щурів гр. Nitr-28-MSС, порівняно з щурами, які не отримували ін'єкції MSС. Звідси можливе припущення, що стовбурові клітини сприяли зниженню емоційної реактивності, зниженню занепокоєння, тривожності та покращенню адаптації, незважаючи на додатковий больовий фактор у вигляді проколу голкою хвостової вени. Поліпшення когнітивної функції було зафіксовано й у мишей з моделлю ХА, яким вводили екзосоми мезенхімальних стовбурових клітин за допомогою стереотаксичної хірургії [276].

Ефект стовбурових клітин на дослідницьку активність видно по зміні кількості заглядань у норки. Однак, якщо порівнювати період до початку ін'єкцій нітриту/скополаміну та через 14 днів періоду регенерації, то у всіх щурів спостерігалось зниження кількості заглядань у норки. Нам стало цікаво порівняти період регенерації у щурів, які отримали і не отримали стовбурові клітини. Так, всі щури, крім щурів гр. Scor-14-MSС, стали заглядати частіше в норки через 14 днів після ін'єкцій стовбурових клітин (періоду «регенерації») в порівнянні з періодом, коли ін'єкції нітриту натрію/скополаміну бутілброміду завершили, а стовбурові клітини ще не ввели. Тобто, можна стверджувати, що MSС сприяли покращенню, але не повному відновленню, дослідницької активності. До того ж, було помічено покращення когнітивних функцій, оцінених у тестах «ЕП», «УРПУ», щодо збільшення кількості тварин, у яких сформувався умовний рефлекс пасивного уникнення темної камери, де вони отримували короточасне електробольове роздратування, або які знайшли правильно вихід, плаваючи у воді і перебуваючи в циліндрі, виринувши з-під його нижнього краю. З цього випливає, що однократне введення стовбурових клітин не лише знизило емоційну реактивність у щурів, але й покращило їх когнітивні здібності, що ще раз підтверджує покращення обміну нейромедіаторів у тканині ГМ та підвищення синаптичної пластичності. Навіть трансплантація MSС, отриманих з жирової тканини, у експериментальних тварин з трансгенною моделлю ХА, сприяла нейрогенезу та поліпшенню мозкової функції [277].

Взагалі аналіз наявних даних щодо корекції нейродегенеративних захворювань стовбуровими клітинами зосереджено на ембріональних стовбурових клітинах. Однак, існують дослідження впливу мезенхімальних стовбурових клітин різного походження на нейродегенеративні процеси. Так, використання MSС інтрацеребрально з пуповинної крові в моделі ХА у трансгенних мишей призвело до зменшення бляшок А $\beta$  та покращення пізнання [278]. Також продемонстровано позитивний вплив нейронних і жирових стовбурових клітин на пам'ять у мишей з трансгенною моделлю ХА [279]. Отримані результати корелюють з нашими

результатами, де щурам з фармакологічними (нетрансгенними) моделями ХА вводили MSC, отримані з червоного кісткового мозку.

Процеси відновлення функції та зростання нервових відростків після сильного їх ушкодження, вимагають багато енергії. У нашому експерименті стовбурові клітини покращили мітохондріальну функцію, що відображалося і на відновленні синтезу АТФ. Однак ушкоджена внутрішня мембрана мітохондрій, де міститься кардіоліпін, після введення MSC все ж повністю не відновилося у щурів обох моделей, можливо з цим і пов'язано неповне відновлення функції нейронів (рис. 5.4). Слід зазначити, що в інших експериментальних роботах у тварин зі скополаміною моделлю деменції введення стовбурових клітин, крім підвищення рівня ацетилхоліну, супроводжувалося і збільшенням синтезу ростових факторів, зменшенням вмісту прозапальних цитокінів, поліпшенням когнітивних функцій [247, 280].

З покращенням енергетичного балансу в тканині ГМ після внутрішньовенного введення MSC активується антиоксидантна система, яка запобігає розвитку окислювального стресу і тим самим уповільнює прогресування захворювання. Наші результати знаходять своє підтвердження і в працях іноземних колег, де у мишей, яким вводили скополамін в дозі 3 мг/кг, після корекції сульфонатом Tanshinone ІІА натрія (STS) спостерігали: підвищення активності холінацетилтрансферази та зниження ацетилхолінестерази, тим самим збільшуючи рівень ацетилхоліну в гіпокампі та корі ГМ мишей, а також була активізована толерантність до окислення в гіпокампі та корі ГМ [281]. Однак, слід врахувати, що саме в скополамінової моделі активація антиоксидантної системи, тобто підвищення активності СОД і каталази, і зниження ТБК-активних продуктів у тканині ГМ було більш вираженим, ніж у нітритній моделі (рис. 5.5). Можливо, це пов'язано з більш вираженим ушкодженням ендотелію судин та внутрішньої мембрани мітохондрій при тривалому впливі нітриту натрію на організм, незважаючи на те, що ендотеліальні клітини виробляють близько 85% енергії завдяки анаеробному диханню, гліколізу [282] та мітохондрії ендотеліоцитів не є основним джерелом продукції активних форм кисню [283]. З іншого боку,

джерелом активних форм кисню в ендотеліальних клітинах є мембранна НАДФН-оксидаза (нікотинамідаденіндіуклеотидфосфат-оксидаза), а точніше одна з її субодиниць NOX2, яка при патологічній дії на мембрани ендотеліоцитів продукується не тільки в мембранах ядер, ендоплазматичного ретикулуму, але і в плазматичній мембрані, що запускає збільшення позаклітинної продукції супероксид аніону, активних форм кисню та розвиток окислювального стресу [284, 285]. Таким чином, MSC у щурів з нітритною моделлю мали менш виражений ефект на зниження прооксидантних речовин, порівняно зі скополаміновою моделлю, у зв'язку з наявністю сильнішого ушкодження мембран ендотеліальних клітин та накопиченням NOX2 у плазматичній мембрані.

Дуже ймовірно, що поліпшення морфофункціонального стану нейропіля в основних групах з використанням MSC пов'язано також з поліпшенням стану капілярної сітки, а, отже, і живлення, і тканинного дихання збережених елементів нервової тканини. На користь наявності другого шляху поліпшення морфофункціонального стану нейропіля свідчать аналогічні за спрямованістю зміни двох досліджуваних нами показників: оптичної щільності нейропіля при забарвленні за Ейнарсоном і клітинного складу стінки капілярів - більш виражена реституція стінки капілярів супроводжується збільшенням вмісту РНК в нейропілі. Адже після введення стовбурових клітин стінки судин зміцнювалися за рахунок молодих еухромних ендотеліоцитів (рис. 5.6). При цьому в скополаміновій моделі реституція судинної стінки капілярів за рахунок нових ендотеліоцитів більш виражена, що також видно за вищими значеннями співвідношення Е/П, ніж нітритної моделі. Також поява нових капілярів та ендотеліоцитів у стінках капілярів після введення стовбурових клітин спостерігається переважно у щурів із 14-денною моделлю деменції альцгеймерівського типу, ніж із 28-денною моделлю захворювання. При цьому однакова кількість ендотеліоцитів у стінці капілярів у гр. Nitr-14, Nitr-14-MSC та в гр. С дає можливість припустити, що за 14 днів «періоду регенерації» стінка капілярів встигла регенерувати за рахунок власних та нових ендотеліоцитів, що підтверджується наявністю мічених Ki-67 ендотеліоцитів капілярів ГМ у щурів із нітритною моделлю.

Про регенерацію ендотелію в судинах сірої та білої речовини головного мозку, яка вже завершуються або завершилась, в гр. Nitr-14-MSС свідчить значне зменшення оптичної щільності цитоплазми ендотелію капілярів, нейронів СА1 поля гіпокампа, тільки нейрони кори півкуль ще продукували VEGF на тому ж рівні, як і без введення стовбурових клітин, але водночас кора має ознаки атрофізації. А ось у гр. Nitr-28-MSС синтез VEGF залишався підвищеним щодо гр. Nitr-28 і в ендотеліоцитах, і в нейронах кори великих півкуль, і в нейронах гіпокампа, тобто стимуляція поділу ендотеліоцитів тривала, оскільки їхнє ушкодження нітритом натрію було більш значним (рис. 5.11).

У скополамінової моделі синтез VEGF в ендотеліоцитах капілярів слабо виражений навіть після введення стовбурових клітин порівняно з нітритною моделлю. Можна припустити, що регенерація ушкоджених судин в умовах холінодефіциту за 14 днів періоду регенерації після введення стовбурових клітин була прискорена за рахунок нових ендотеліоцитів. У мічених нейронах кори та зони СА1 гіпокампа після введення MSС оптична щільність їх цитоплазми знижена, тобто мало місце більш успішне відновлення капілярної сітки в тканині ГМ, що зменшує ступінь гіпоксії нейронів і знижує необхідність посилення проліферації ендотеліоцитів.

Таким чином, внутрішньовенне введення MSС, отриманих із червоного кісткового мозку, за 14 днів періоду «регенерації» прискорило відновлення судин МЦР ГМ у щурів гр. Scor-14-MSС, Scor-28-MSС та Nitr-14-MSС за рахунок нових ендотеліоцитів, де судинна стінка була ушкоджена, але не настільки, як у щурів після 28 днів введення нітриту натрію. При цьому, можна припустити, що тут була виявлена «подвійна» регенерація: «внутрішня» за рахунок неушкоджених ендотеліоцитів капілярів і «зовнішня» за рахунок мезенхімальних стовбурових клітин, які диференціювалися в ендотеліоцити. У ситуації, де ушкодження судин було сильніше, а саме у щурів із 28-денною нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу, стовбурові клітини запустили процеси регенерації судин МЦР, які після 14 днів періоду «регенерації» не закінчились. Наші результати та припущення збігаються з даними роботи, де MSС з кісткового мозку, введені в

бічні шлуночки мозку трансгенних мишей-самців з ХА, в порівнянні з тваринами, яким вводили MSC, надлишково експресуючих VEGF, також сприяли утворенню нових судин і активації мікроглії [286].

Вміст VEGF в загальній крові після введення стовбурових клітин залишався дещо вище в усіх дослідних групах, ніж у гр. С. При цьому після 14 днів введення нітриту натрію/скополаміну бутилброміду ін'єкції стовбурових клітин достовірно не змінювали вміст VEGF у крові, порівняно з тваринами без ін'єкцій стовбурових клітин, а після 28 днів введення препаратів MSC сприяли зменшенню рівня VEGF в артеріо-веноній крові більше, ніж удвічі. Зниження циркулюючого VEGF та поліпшення ангиогенезу були отримані у людей із серцевою недостатністю та розвиненою ендотеліальною дисфункцією, яким вводили аlogenні (від сумісного донора) мезенхімальні стовбурові клітини [287]. Можна припустити, що в тканинах організму в цілому (загалом) необхідність стимулювання ангиогенезу в гр. Nitr-14-MSC, Scop-14-MSC, після попередньої короткої активації (нами не вивченої), знизилася у зв'язку із закінченням періоду активної регенерації ушкодженого ендотелію. В гр. Nitr-28-MSC, Scop-28-MSC, у порівнянні з гр. Nitr-28, Scop-28, відбувається прискорення регенераторних процесів і у зв'язку з цим зниження вмісту VEGF у сироватці краніальної крові. Аналіз оптичної щільності плазми у просвіті дрібних вен (ІМГХ реакція на VEGF) повністю підтвердив висловлене припущення, тому що з венозною кров'ю з тканини мозку в гр. Nitr-14-MSC видалалося невелика кількість цього пептиду (на рівні гр. С), а в гр. Nitr-28-MSC – його концентрація у плазмі дуже велика, тобто потреба в VEGF знизилась. У всіх щурів зі скополаміновою моделлю після введення MSC знижена оптична щільність міченої VEGF плазми, в порівнянні з групою контролю та щурами з нітритною моделлю, що може бути пов'язано зі зменшеним синтезом даного фактора в нейронах гіпокампа та кори.

Покращення стану ендотелію судин та капілярної сітки сприяли зниженню гіпоксії тканини головного мозку, що видно по достовірному зниженню рівня 2,3-ДФГ в еритроцитах крові щурів обох моделей. При цьому в нітритній моделі рівні



2,3-ДФГ не досягають рівнів контролю, на відміну від скополамінової моделі, що свідчить про збереження гіпоксичного стану головного мозку.

Таким чином, стовбурові клітини за рахунок своїх ростових факторів сприяли зниженню потреби організму у VEGF, синтезовані клітинами організму. У той час як у тварин, які не отримували ін'єкції стовбурових клітин, ми спостерігали підвищення секреції VEGF в кров, що свідчить про стимуляцію ангиогенезу, але повільнішу, ніж після введення стовбурових клітин.

При використанні стовбурових клітин в обох моделях спостерігалось різке зменшення вмісту в сироватці й плазмі крові ET-1 і vWF, що свідчить про те, що ушкодження ендотелію кровоносних судин в організмі завдяки введенню стовбурових клітин знизилось до величин гр. С (рис. 5.10). При цьому як у 28-денній нітритній моделі, так і в 28-денній скополамінової моделі після введення стовбурових клітин ступінь зниження рівнів ET-1 і vWF в артеріо-венозній крові була більш виражена, ніж після 14 днів введення цих препаратів. Також введення MSC сприяло зниженню рівнів eNOS в артеріо-венозній крові у щурів з нітритною моделлю та підвищенню рівнів eNOS у крові у щурів зі скополаміновою моделлю. Можливо це пов'язано з тим, що стовбурові клітини швидше відновили ендотелій, який сильніше ушкоджений, в даному випадку це був ендотелій судин після впливу нітритну натрію, в результаті чого секреція eNOS знизилася паралельно зі зниженням ET-1 і vWF. У скополамінової моделі синтез eNOS в кров збільшився не тільки за рахунок відновлення ендотелію судин, а й за рахунок яскравішого відновлення роботи холінергічної системи. Адже ступінь збільшення рівня ацетилхоліну в гомогенатах головного мозку після введення стовбурових клітин у щурів із скополаміновою моделлю був більш виражений, ніж у щурів із нітритною моделлю, особливо після 28 днів введення препаратів. Так, при стимуляції синтезу ацетилхоліну збільшується синтез eNOS. І навпаки, при холінергічної денервації судин eNOS дезактивується та збільшується ендогенна ЦАА [223, 224].

Отже, введення стовбурових клітин покращує функцію ендотелію шляхом нормалізації балансу між вазоконстрикторами та вазодилататорами, зменшуючи

запалення у судинах, ризик тромбоутворення та зміцнюючи стінку гематоенцефалічного бар'єра новими ендотеліоцитами.

Дані дослідження свідчать про те, що тривале введення нітриту натрію та скополаміну бутилброміду веде до розвитку деменції альцгеймерівського типу. При цьому когнітивні та поведінкові зміни спостерігаються у тварин з обома 14-денними моделями захворювання та прогресують із двократним збільшенням тривалості ушкоджуючої дії речовин на тканину ГМ. Цікаво, що в обох моделях із різними механізмами розвитку когнітивного дефіциту як субендотеліально, так і в тканині ГМ формується амілоїд. Досліджувана нами роль судинного ушкодження у механізмах розвитку хвороби Альцгеймера та формуванні амілоїду була розглянута з різних сторін.

Так, з одного боку, у щурів з нітрит-індукованою деменцією розвиток ендотеліальної дисфункції та ушкодження стінки судин МЦР зі збільшенням проникності ГЕБ у комплексі з метгемоглобінемією ініціювали розвиток гіпоксії та міграцію плазматичних білків, що беруть участь в утворенні амілоїду в тканині ГМ. До того ж, гіпоксія негативно позначилася на функції мітохондрій та перекисному окисненні ліпідів, що спричинило за собою розвиток енергодефіциту, мітохондріальну дисфункцію та окислювальний стрес, що разом впливають на рівень ацетилхоліну в тканині ГМ, синаптичну пластичність, окислювальну модифікацію білків нейропіля.

З іншого боку, у щурів зі скополамін-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу холінодефіцит у тканині ГМ розвивається після 28 днів введення скополаміну бутилброміду, а початкові судинні зміни спостерігаються вже після 14 днів введення скополаміну бутилброміду, які з часом прогресують. Тобто з цього випливає, що судинна дисфункція передує холінодефіциту і може відігравати первинну роль у розвитку амілоїду. Однак, слід звернути увагу, що введення даного М-холіноблокатора, що не проникає спочатку через ГЕБ (за інструкцією), викликало мітохондріальну дисфункцію та зниження синтезу АТФ. Тобто, можна припустити, що щоденне введення скополаміну бутилброміду протягом 14 діб сприяло порушенню моторики шлунково-кишкового тракту та

розвитку токсемії, що викликало ушкодження мітохондрій, окислювальний стрес, ушкодження ендотелію судин, гіпоксію з подальшим ушкодженням відростків нейронів. 28-денне введення скополаміну бутилброміду викликало центральний антихолінергічний синдром, тобто розвиток холінодефіциту, який запусив патологічний розпад APP-білка з утворенням амілоїду та з подальшим патологічним впливом на ендотелій судин через гіпоксію, мітохондріальну дисфункцію та окислювальний стрес.

Незважаючи на різні ролі ушкодженого ендотелію судин в утворенні амілоїду і розвитку деменції альцгеймерівського типу, регенерація судин відбувалася як за рахунок перицитів за типом субституції самостійно, так і за рахунок молодих ендотеліоцитів за типом реституції після внутрішньовенного введення мезенхіальних стовбурів. Використання ін'єкції MSC веде до можливої внутрішньоклітинної регенерації у відростках нервових клітин.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі подано вирішення питань ролі ушкодження судин та дисфункції ендотелію в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу в умовах холінодефіциту та нітритного навантаження в різні терміни експерименту та можливість корекції цих патологічних станів мезенхімальними стовбуровими клітинами, отриманих з червоного кісткового мозку та введеними внутрішньовенним шляхом.

1. В групах щурів з різними за походженням моделями деменції альцгеймерівського типу (після тривалого введення М-холіноблокатора скополаміну бутилброміду та водного розчину нітриту натрію) через 14 днів періоду «регенерації», ще до розвитку холінодефіциту, були виявлені ознаки ендотеліального ушкодження судин (артерій, артеріол, капілярів) головного мозку, більш виражені у тварин із нітритною моделлю, ніж зі скополаміновою. Так, у щурів груп Nitr-14 і Nitr-28: спостерігалось субендотеліальне скупчення амілоїду зі зменшенням кількості гладком'язових клітин в середньому шарі стінки артерій основи головного мозку і малих внутрішньоцеребральних артерій, частіше зустрічались парієтальні та обтуруючі тромбози, а також інфільтрація судин макрофагами та лімфоцитами; збільшувалась кількість мічених Ki-67 ендотеліоцитів, епендимоцитів, епітеліоцитів судинних сплетінь та продукція фактора росту ендотелію судин (VEGF) ендотеліоцитами, нейронами кори; зменшувалась загальна кількість капілярів зі зниженням кількості ендотеліоцитів з компенсаторним збільшенням кількості перицитів (гр. Nitr-14) або зі зменшенням ендотеліоцитів і перицитів (гр. Nitr-28). Скополамінова модель (Scor-14, Scor-28) призводила до: накопичення конгофільних мас в середній оболонці стінки артерій основи головного мозку і малих внутрішньоцеребральних артерій з потовщенням їх стінки та звуженням просвіту; збільшенню кількості перицитів в стінці капілярів, на фоні збільшеної морфофункціональної активності ендотеліоцитів; зменшенню експресії Е-кадгерину мало збереженою капілярною сіткою; експресія VEGF нейронами кори та гіпокампа була менше в порівнянні з контролем і з нітритною

моделлю деменції. Ступінь ушкодження ендотелію зростала в залежності від тривалості введення скополаміну бутилброміду та водного розчину нітриту натрію. Підвищення вмісту ендотеліну-1 (ET-1), ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) в сироватці крові та фактора фон Вілебранда (vWF) в плазмі крові було більш вираженим у щурів з нітритною моделлю. Для скополамінової моделі було характерно різке збільшення вмісту VEGF-A в сироватці крові.

2. В гомогенатах головного мозку щурів після 14 та 28-денного введення нітриту натрію в порівнянні з контролем і скополамін-індукованою деменцією, за рахунок гемічної гіпоксії, стимуляції окислювального стресу, розвитку енергетичного дисбалансу клітинних та мітохондріальних мембран спостерігається: підвищення рівня 2,3-діфосфогліцерату в еритроцитах крові (найвищий показник в гр. Nitr-28), продукції ТБК-активних речовин (малонового діальдегіду), зниження активності ферментів антиоксидантної системи - супреоксиддисмутази, каталази (особливо в групах - Nitr-14, Nitr-28 та Scop-28), рівня кардіоліпіну (максимально - в гр. Nitr-28), АТФ. У всіх досліджуваних групах розвинувся холінодефіцит, але найнижчий рівень ацетилхоліну в гомогенатах головного мозку спостерігався в групі Scop-28, де М-холіноблокуюча дія скополаміну бутилброміду була найтривалішою.

3. У всіх групах щурів, обох (нітрит- та скополамін-індукованих) експериментальних моделей деменції альцгеймерівського типу розвинувся амілоїдоз тканини головного мозку. Нейропіль у всіх основних групах фокально перебував в різних станах: близькому до контрольного, атрофічному, сильно дистрофізованому та з накопиченням амілоїду. У щурів з 14-денною нітритною моделлю на відміну від тих, яким вводили скополамін бутилбромід, конгофільні скупчення зустрічались рідше, однак спостерігалась осередкова гомогенізація нейропіля великих півкуль головного мозку зі зниженням його оптичної щільності, що обумовлено зниженим вмістом РНК в цитоплазмі нервових відростків і свідчить про розвиток його гіпофункції. Введення скополаміну бутилброміду призвело до більш суттєвого зниження функціональної активності нейропіля великих півкуль головного мозку та до накопичення амілоїду в нейропілі як на поверхні кори

великих півкуль ГМ, так і в субкортикальній білій речовині і в білій речовині гіпокампа.

4. Відразу після закінчення 14-ти та 28-денного курсу ін'єкцій як нітриту натрію, так і скополаміну бутилброміду, та через 14 днів «періоду регенерації» у тварин спостерігались розлади емоційної реактивності (підвищення кількості болюсів), захисного гальмування (зниження кількості пересічених квадратів) та зниження дослідницької активності (зниження кількості заглядань у норки), прогресування яких на тлі підвищеної емоційної реактивності спостерігалось у щурів з обома моделями в залежності від збільшення тривалості ушкоджуючої дії хімічних речовин на тканину головного мозку. У тестах «Умовний рефлекс пасивного уникання» («УРПУ») та «Екстраполяційне позбавлення» («ЕП») втрата когнітивних функцій була яскравіше виражена у щурів гр. Nitr-14, гр. Nitr-28, ніж у щурів гр. Scor-14, Scor-28.

5. При деменції альцгеймерівського типу, що виникла у щурів після введення нітриту натрію (Nitr-14 і Nitr-28), роль ендотеліальної дисфункції була визначальною та разом з гемічною гіпоксією – первинною в ушкодженні нервової тканини сприяючи: зсуву прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, розвитку енергетичного дисбалансу клітинних та мітохондріальних мембран (мітохондріальної дисфункції) і на тлі зниження рівня ацетилхоліну в гомогенатах головного мозку до субендотеліального відкладення амілоїду та, близьких до атрофічних і дистрофічних змін стану білків нейропіля великих півкуль головного мозку. При деменції альцгеймерівського типу, що виникла після введення скополаміну бутилброміду, роль ендотеліальної дисфункції була вторинною, і в ранні строки (Scor-14) була наслідком окислювального стресу та мітохондріальної дисфункції, а в пізніші строки, через тривалу М-холіноблокуючу його дію - була наслідком холінодефіциту, який і спричинив утворення множинних скупчень амілоїду в нейропілі та судинах, розвиток мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції, тканинної гіпоксії та атрофії, дистрофії нейропіля поверхневої білої речовини великих півкуль головного мозку.

6. При внутрішньовенному введенні мезенхімальних стовбурових клітин (MSC) щурам з нітрит- та скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу в порівнянні з тваринами, яким не вводили MSC, спостерігались різноспрямовані зміни оптичної щільності нейропіля великих півкуль головного мозку. Так, на тлі підвищеного рівня ацетилхоліну: у щурів в групах Nitr-14-MSC та Nitr-28-MSC оптична щільність нейропіля знижувалась, вказуючи на появу нових молодих нервових відростків, а в групах Scop-14-MSC, Scop-28-MSC - підвищувалась за рахунок активації синтезу нових білків нейропіля з вмістом карбоксильних і аміногруп, як і в групі контролю. Резорбційного впливу MSC на конгофільні (амілоїдні) ділянки в нейропілі та в судинах головного мозку не було визначено. Про покращення функціонування, але не повне відновлення нервових відростків та синаптичної пластичності після введення MSC у щурів всіх груп свідчить зниження емоційної реактивності (окрім гр. Nitr-28-MSC), покращення когнітивних здібностей: збільшення кількості заглядань у норки (окрім гр. Scop-14-MSC) в тесті «ВП», формування умовних рефлексів в тесті «УРПУ» та проходження тесту «ЕП».

Введення MSC у щурів всіх груп (особливо в гр. Nitr-28-MSC), за рахунок збільшення синтезу АТФ, сприяло відновленню енергетичного балансу, підвищенню активності ферментів антиоксидантної системи (СОД і каталази), зниженню в тканині головного мозку рівня ТБК-активних продуктів. Проте функція мітохондрій повністю не відновилась.

7. Через 14 днів після внутрішньовенного введення MSC у щурів всіх груп з різною за походженням деменцією спостерігалась: поява нових капілярів та ендотеліоцитів капілярної стінки з високою еухромністю хроматину в ядрах (реституція судинної стінки), особливо у щурів з 14-денними моделями; збільшення кількості мічених VEGF ендотеліоцитів, особливо у щурів з 28-денними моделями. Використання MSC також сприяло різкому зменшенню в крові вмісту ET-1 (в сироватці) і vWF (в плазмі) з найбільшим ступенем зниження в тих групах тварин, де ушкодження судин було сильнішим (Nitr-28-MSC, Scop-28-MSC). Зниження рівня eNOS в сироватці крові у щурів з нітритною моделлю

обумовлене відновленням ендотелію судин після введення MSC, а підвищення eNOS у щурів зі скополаміновою моделлю було результатом відновлення ендотелію судин та функції холінергічної системи. Покращення стану ендотелію судин та капілярної сітки супроводжувалося зниженням рівня 2,3-ДФГ в еритроцитах крові щурів (значно в гр. Scop-14-MSC, Scop-28-MSC), майже до контрольних значень, що вказує на зменшення гіпоксичного ушкодження тканини головного мозку.



## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. За результатами нашої роботи у пацієнтів з хворобою Альцгеймера (деменцією альцгеймерівського типу) треба приділяти увагу ролі ендотеліальної та мітохондріальної дисфункції, профілактиці та лікуванню ушкоджених судин та енергетичного дисбалансу структур головного мозку.

2. Спираючись на результати нашої роботи, де показано, що амілоїдне ураження дрібних судин призводить до гіперперфузії білої речовини головного мозку, дегенерації нервових волокон, слід за допомогою інструментальних досліджень вивчати структуру білої речовини у людей з ризиком розвитку і хронічним перебігом серцево-судинних захворювань. Адже дегенерація нервових волокон білої речовини може бути зафіксованою задовго до появи симптомів деменції.

3. Для діагностики нейродегенеративних захворювань в практиці морфолога можна використовувати забарвлення бромфеноловим синім для визначення окислювальної модифікації білків нейропіля великих півкуль головного мозку, гіпокампа і для підтвердження наявності амілоїдних скупчень, дитрофії або атрофії структур головного мозку.

4. Запропоновані нові морфометричні та гістохімічні методики оцінювання функціонування нейропіля та ендотелію судин головного мозку, що дають змогу використовувати їх в практиці.

5. Внутрішньовенне введення мезенхімальних стовбурових клітин, які можна отримати з червоного кісткового мозку самого пацієнта з хворобою Альцгеймера (аутогенні), або донора (алогенні стовбурові клітини), є можливим та раціональним в різні стадії хвороби: на ранніх етапах розвитку хвороби регенерація тканин прискорюється, а на більш пізніх етапах вона запускається та має потужний ефект - відновлення тканин за рахунок нових клітин.

6. При внутрішньовенному введенні мезенхімальних стовбурових клітин слід враховувати, що вони мігрують не тільки в головний мозок, де є ураження судин та нервової тканини при хворобі Альцгеймера, але й в інші органи, що слід

мати на увазі у пацієнтів, які страждають на коморбідні захворювання, й мають новоутворення.

7. Хронічне нітритне та нітратне навантаження, з яким стикається кожен з нас в харчуванні, промисловості, навколишньому середовищі, є небезпечним для наших судин та органів, в тому числі й для головного мозку. Треба приділяти більш уваги складу продуктів харчування, воді при споживанні, бо довготривалий вплив нітратів та нітритів, які потрапляють до нашого організму, може підвищити ризик виникнення хвороби Альцгеймера та інших нейродегенеративних захворювань.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Armstrong R. What causes neurodegenerative disease? *Folia Neuropathol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 2];58(2):93–112. Available from: <https://doi.org/10.5114/fn.2020.96707>.
2. Adav SS, Sze SK. Insight of brain degenerative protein modifications in the pathology of neurodegeneration and dementia by proteomic profiling. *Mol Brain* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 2];9(1):92. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0272-9>.
3. Tran L, Ha-Duong T. Exploring the Alzheimer amyloid- $\beta$  peptide conformational ensemble: A review of molecular dynamics approaches. *Peptides* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 2];69:86–91. Available from: [doi:10.1016/j.peptides.2015.04.009](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.009).
4. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 2];14:5541–54. Available from: [doi: 10.2147/IJN.S200490](https://doi.org/10.2147/IJN.S200490).
5. Olsson F, Schmidt S, Althoff V, Munter LM, Jin S, Rosqvist S, et al. Characterization of intermediate steps in amyloid beta (Abeta) production under near-native conditions. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 2];289(3):1540–50. Available from: [doi: 10.1074/jbc.M113.498246](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.498246).
6. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 Jan [cited 2021 Aug 2];12:25. Available from: [doi: 10.3389/fnins.2018.00025](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025).
7. Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat. Rev. Neurosci* [Internet]. 2017 May [cited 2021 Aug 2];18(5):281–298. Available from: [doi: 10.1038/nrn.2017.29](https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29).
8. Svedružić ŽM, Popović K, Šendula-Jengiđ V. Decrease in catalytic capacity of gamma-secretase can facilitate pathogenesis in sporadic and Familial Alzheimer's

disease. *Mol. Cell. Neurosci* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 5];67:55–65. Available from: doi: 10.1016/j.mcn.2015.06.002.

9. Sagare AP, Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular defects and faulty amyloid- $\beta$  vascular clearance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 5];33Suppl 1(01):87–100. Available from: doi: 10.3233/JAD-2012-129037.

10. Ramanathan A, Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic BV. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: the role, regulation and restoration of LRP1. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 5];7:136. Available from: doi: 10.3389/fnagi.2015.00136.

11. Kelleher RJ, Soiza RL. Evidence of endothelial dysfunction in the development of Alzheimer's disease: Is Alzheimer's a vascular disorder? *Am J Cardiovasc Dis* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 5];3(4):197–226. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819581/>.

12. Chen C, Li XH, Zhang S, Tu Y, Wang YM, Sun HT. 7,8-dihydroxyflavone ameliorates scopolamine-induced Alzheimer-like pathologic dysfunction. *Rejuvenation Res* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 5];17(3):249–54. Available from: doi: 10.1089/rej.2013.1519.

13. Hritcu L, Stefan M, Brandsch R, Mihasan M. Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-1-nicotine in Alzheimer's disease rat model. *Neurosci Lett* [Internet]. 2015 Mar [cited 2021 Aug 5];591:41–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.014>.

14. Bhuvanendran S, Kumari Y, Othman I, Shaikh MF. Amelioration of Cognitive Deficit by Embelin in a Scopolamine-Induced Alzheimer's Disease-Like Condition in a Rat Model. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 Jun [cited 2021 Aug 5];9:665. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00665>.

15. Bajo R, Pusil S, López M, Canuet L, Pereda E, Osipova D, et al. Scopolamine effects on functional brain connectivity: a pharmacological model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* [Internet]. 2015 July [cited 2021 Aug 5];5:9748. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep09748>.

16. Li X, Bao X, Wang R. Experimental models of Alzheimer's disease for deciphering the pathogenesis and therapeutic screening (Review). *Int J Mol Med* [Internet]. 2016 Feb [cited 2021 Aug 5];37(2):271–83. Available from: doi: 10.3892/ijmm.2015.2428.
17. Савицкий ИВ, Горбач ТВ, Мясковская ИВ, Григорьев ПВ, Якушкин ЕЮ, Слюсарь АА. Динамика эндотелиальной дисфункции под воздействием нитратной нагрузки. *Journal of Education, Health and Sport* [Интернет]. 2016 [цитировано 2021 Серпн 5];6(2):337–348. Доступно: <https://repo.odmu.edu.ua:443/xmlui/handle/123456789/8313>.
18. Ніколаєва ОВ, Павлова ОО, Лук'янова ЄМ, Губіна-Вакулик ГІ, Горбач ТВ, винахідники; Харківський національний медичний університет, патентовласник. Спосіб моделювання деменції альцгеймерівського типу судинного походження у щурів. Патент України № 141759. 2020 Квіт 27.
19. Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 7];59(3):347–56. Available from: doi: 10.1016/j.neuint.2011.06.008.
20. Kocaoglu M, Korucu M, Civlan S, Ozdemir K, Ozdemir M, Cirak B. Stem cell therapy in the treatment of neurological diseases. *Brain Disord Ther* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 7];3:4. Available from: <https://doi.org/10.4172/2168-975X.1000132>.
21. Turgeman G. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease: converging mechanisms. *Neural Regen Res* [Internet]. 2015 [cited 2020 Feb 22 cited 2021 Aug 7];10(5):698–9. Available from: doi: 10.4103/1673-5374.156953.
22. Oh SH, Kim HN, Park HJ, Shin JY, Lee PH. Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and neuronal differentiation by enhancing the Wnt signaling pathway in an Alzheimer's disease model. *Cell Transplant* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 7];24(6):1097–1109. Available from: doi: 10.3727/096368914X679237.
23. Пятикоп В, Мсаллам МА, Щегельская Е, Кутовой И, Губина-Вакулик Г. Особенности миграции меченых мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у крыс с моделированным паркинсонообразным синдромом. *Укр.*

нейрохирург. журн [Интернет]. 2014 [цитовано 2021 Серпн 7]3:42–48. Доступно: <https://doi.org/10.25305/unj.47491>.

24. Державна служба статистики України. Населення України [Интернет]. Київ: Ін-т демографії та соціальних досліджень імені М. В. Птухи НАН України; 2020 [оновлено 2021 Трав 26; цитовано 2021 Серпн 8]. Доступно: <http://www.ukrstat.gov.ua/>.

25. Deuschl G, Beghi E, Fazekas F, Varga T, Christoforidi KA, Eveline Sipido E, et al. The burden of neurological diseases in Europe: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Public Health* [Internet]. 2020 Oct [cited 2021 Aug 8];5:e551–567. Available from: [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(20\)30190-0](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(20)30190-0).

26. Всемирная организация здравоохранения. Деменция [Интернет]; 2020 [оновлено 2022; цитовано 2021 Серпн 8]. Доступно: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

27. Alzheimer Europe. Dementia as a European Priority – A Policy Overview [Internet]. Alzheimer Europe, 2020 [cited 2021 Aug 8]. Available from: [https://issuu.com/alzheimer\\_europe/docs/dementia\\_as\\_a\\_european\\_priority](https://issuu.com/alzheimer_europe/docs/dementia_as_a_european_priority)

28. GBD 2019 Demographics Collaborators. Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950–2019: a comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Viewpoint Lancet* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 8];396:1135–59. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9).

29. Spiers-Jones TL, Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 8];82:756–71. Available from: doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.004.

30. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 8];25(24):5789. Available from: doi: 10.3390/molecules25245789.

31. Caballero MÁA, Suárez-Calvet M, Duering M, Franzmeier N, Benzinger T, Fagan AM, et al. White matter diffusion alterations precede symptom onset in autosomal

dominant Alzheimer's disease. *Brain* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 8];141(10):3065–80. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awy229>.

32. Apostolova LG. Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis, Minn)* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 8];22(2 Dementia):419–34. Available from: doi: 10.1212/CON.0000000000000307.

33. ICD-10-CM Codes. Alzheimer's disease G30 [Internet]. The Web's Free 2022 ICD-10-CM/PCS Medical Coding Reference, 2021[cited 2021 Sept 13]. Available from: <https://www.icd10data.com/ICD10CM/Codes/G00-G99/G30-G32/G30>

34. Bondi MW, Edmonds EC, Salmon DP. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J Int Neuropsychol Soc* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 8];23(9–10):818–831. Available from: doi: 10.1017/S135561771700100X.

35. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens Ph, Aicen P, Andrieu S, et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 9];12(3):292–323. Available from: doi:10.1016/j.jalz.2016.02.002.

36. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 9];14(1):32. Available from: doi: 10.1186/s13024-019-0333-5.

37. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 9];67(2):195–203. Available from: doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.004.

38. Montine TJ, Monsell SE, Beach TG, Bigio EH, Bu Y, Cairns NJ, et al. Multisite assessment of NIA-AA guidelines for the neuropathologic evaluation of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 9];12(2):164–169. Available from: doi: 10.1016/j.jalz.2015.07.492.

39. Fitzpatrick AWP, Falcon B, He S, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, et al. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 9];547(7662):185–190. Available from: doi: 10.1038/nature23002.

40. Overk CR, Masliah E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 9];88(4):508–16. Available from: doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.015.
41. Vidoni ED, Yeh HW, Morris JK, Newell KL, Alqahtani A, Burns NC, et al. Cerebral beta-amyloid Angiopathy is associated with earlier dementia onset in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 9];16(3–4):218–24. Available from: doi: 10.1159/000441919.
42. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 9];1(1):a006189. Available from: doi: 10.1101/cshperspect.a006189.
43. Sengillo JD, Winkler EA, Walker CT, Sullivan JS, Johnson M, Zlokovic BV. Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 10];23(3):303–10. Available from: doi: 10.1111/bpa.12004.
44. Klohs J. An Integrated View on Vascular Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Neurodegener Dis* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 10];19(3–4):109–27. Available from: doi: 10.1159/000505625.
45. Jefferson AL, Cambroner FE, Liu D, Moore EE, Neal JE, Terry JG, et al. Higher Aortic Stiffness Is Related to Lower Cerebral Blood Flow and Preserved Cerebrovascular Reactivity in Older Adults. *Circulation* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 10];138(138):1951–62. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.032410>.
46. Muhire G, Iulita MF, Vallerand D, Youwakim J, Gratuze M, Petry FR, et al. Arterial Stiffness Due to Carotid Calcification Disrupts Cerebral Blood Flow Regulation and Leads to Cognitive Deficits. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 10];8(9):e011630. Available from: <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011630>.
47. Maillard P, Mitchell GF, Himali JJ, Beiser A, Tsao CW, Pase MP, et al. Effects of Arterial Stiffness on Brain Integrity in Young Adults From the Framingham Heart Study. *Stroke* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 10];47(4):1030–6. Available from: doi: 10.1161/STROKEAHA.116.012949.



48. Zarb Y, Weber-Stadlbauer U, Kirschenbaum D, Kindler DR, Richetto J, Keller D, et al. Ossified blood vessels in primary familial brain calcification elicit a neurotoxic astrocyte response. *Brain* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 10];142(4):885–902. Available from: doi: 10.1093/brain/awz032.
49. Ngandu T, Lehtisalo J, Solomon A, Levalahti E, Ahtiluoto RA, Backman L, et al. A 2-year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 10];385(9984):2255–63. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60461-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60461-5).
50. Edwards GA, Gamez N, Escobedo GJr, Calderon O, Moreno-Gonzalez I. Modifiable Risk Factors for Alzheimer’s Disease. *Front. Aging Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 10];11:146. Available from: doi: 10.3389/famyloidnagi.2019.00146.
51. Liu W, Wong A, Law AC, Mok VC. Cerebrovascular disease, plaques, and dementia. *Stroke* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 10];46(5):1402–7. Available from: <https://doi.org/10.1161/strokeaha.114.006571>.
52. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer’s disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 10];12(12):723–38. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrn3114>.
53. Fann JR, Ribe AR, Pedersen HS, Fenger-Grøn M, Christensen J, Benros ME, et al. Long-term risk of dementia among people with traumatic brain injury in Denmark: a population-based observational cohort study. *Lancet Psychiatry* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 10];5:424–31. Available from: doi: 10.1016/s2215-0366(18)30065-8.
54. Blennow K, Brody DL, Kochanek PM, Levin H, McKee A, Ribbers GM, et al. Traumatic brain injuries. *Nat. Rev. Dis Primers* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 12];2:16084. Available from: doi: 10.1038/nrdp.2016.84 29.
55. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Widespread tau and amyloid- $\beta$  pathology many years after a single traumatic brain injury in humans. *Brain Pathol*

[Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 12];22:142–49. Available from: doi: 10.1111/j.1750-3639.2011.00513.

56. Curto M, Martocchia A, Ferracuti S, Comite F, Scaccianoce S, Girardi P, et al. Increased total urinary cortisol (tUC) and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ratio in Alzheimer disease (AD)-affected patients. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 12];31:173–76. Available from: doi: 10.1097/wad.000000000000156.

57. Nobili A, Latagliata EC, Viscomi MT, Cavallucci V, Cutuli D, Giacobuzzo G, et al. Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. *Nat. Commun* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 12];8:14727. Available from: doi: 10.1038/ncomms14727.

58. Di Meco A, Joshi YB, Praticò D. Sleep deprivation impairs memory, tau metabolism and synaptic integrity of a mouse model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Neurobiol. Aging* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 12];35:1813–20. Available from: doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.011.

59. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, et al. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 12];342:373–77. Available from: doi: 10.1126/science.1241224.

60. Shetty AK, Zanirati G. The Interstitial System of the Brain in Health and Disease. *Aging Dis* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 12];11(1):200–11. Available from: doi: 10.14336/AD.2020.0103.

61. Calero M, Gómez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Avila J, Medina M. Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 12];9:138. Available from: doi: 10.3389/fncel.2015.00138.

62. Silva MVF, Loures CMG, Alves LCV, Souza LC, Borges KBG, Carvalho MG. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 12];26(1):33. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>.

63. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 12];51(3):404–13. Available from: doi: 10.1038/s41588-018-0311-9.
64. Mecca C, Giambanco I, Donato R, Arcuri C. Microglia and Aging: The Role of the TREM2-DAP12 and CX3CL1-CX3CR1 Axes. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 14];19(1):318. Available from: doi: 10.3390/ijms19010318.
65. Xiang X, Werner G, Bohrmann B, Liesz A, Mazaheri F, Capell A, et al. TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 14];8:992–1004. Available from: doi: 10.15252/emmm.201606370.
66. Hohman TJ, Koran ME, Thornton-Wells T. Epistatic genetic effects among Alzheimer's candidate genes. *PLOS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 14];8:e80839. Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0080839.
67. 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* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 14];38(9):1205–35. Available from: <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>.
68. Coric V, Dyck CH, Salloway S, Andreasen N, Brody M, Richter RW. (2012). Safety and tolerability of the  $\gamma$ -secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease. *Arch. Neurol* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 15];69:1430–40. Available from: doi: 10.1001/archneurol.2012.2194.
69. Doody RS, Aisen PS, Iwatsubo T. Semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 15];369:1661. Available from: doi: 10.1056/NEJMc1310845.
70. Timmers M, Streffer JR, Russu A, Tominaga Y, Shimizu H, Shiraishi A. Pharmacodynamics of atabecestat (JNJ-54861911), an oral BACE1 inhibitor in patients with early Alzheimer's disease: randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Alzheimers Res. Ther* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 15];10:85. Available from: doi: 10.1186/s13195-018-0415-6.

71. Cebers G, Alexander RC, Haeberlein SB, Han D, Goldwater R, Ereshefsky L. AZD3293: pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in healthy subjects and patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 15];55, 1039–53. Available from: doi: 10.3233/JAD-160701.
72. Egan MF, Kost J, Voss T, Mukai Y, Aisen PS, Cummings JL. (2019). Randomized trial of verubecestat for prodromal Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 15];380:1408–20. Available from: doi: 10.1056/NEJMoa1812840.
73. Smith LM, Strittmatter SM. Binding Sites for Amyloid- $\beta$  Oligomers and Synaptic Toxicity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 15];7:a024075. Available from: doi: 10.1101/cshperspect.a024075.
74. Blennow K, Dubois B, Fagan AM, Lewczuk P, de Leon MJ, Hampel H. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 15];11:58–69. Available from: doi: 10.1016/j.jalz.2014.02.004.
75. Zhao W, Dumanis SB, Tamboli IY, Rodriguez GA, Jo Ladu M, Moussa CE, et al. (2014). Human APOE genotype affects intraneuronal A $\beta$ 1-42 accumulation in a lentiviral gene transfer model. *Hum. Mol. Genet* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 15];23:1365–75. Available from: doi: 10.1093/hmg/ddt525.
76. Hillen H. The Beta Amyloid Dysfunction (BAD) Hypothesis for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 15];13:1154. Available from: doi: 10.3389/fnins.2019.01154.
77. Kuruva CS, Reddy PH. Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Drug Discov Today* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 15];22(2):223–33. Available from: doi:10.1016/j.drudis.2016.10.010.
78. Trinczek B, Ebner A, Mandelkow EM. Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* [Internet]. 1999 [cited 2021 Aug 15];112(Pt14):2355–67. Available from: doi: 10.1242/jcs.112.14.2355.

79. Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain Res Bull* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 15];126(Pt 3):238–92. Available from: doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.018.
80. Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 15];17:22–35. Available from: doi: 10.1038/nrn.2015.1.
81. Jadhav S, Cubinkova V, Zimova I, Brezovakova V, Madari A, Cigankova V, Zilka N. Tau-mediated synaptic damage in Alzheimer's disease. *Transl Neurosci* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 18];6:214–26. Available from: doi: 10.1515/tnsci-2015-0023.
82. Braak H, Del Tredici K. The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic Alzheimer's disease. *Brain* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 18];138(Pt10):2814–33. Available from: doi: 10.1093/brain/awv236.
83. Braak H, Del Tredici K. Are cases with tau pathology occurring in the absence of A $\beta$  deposits part of the AD-related pathological process? *Acta Neuropathol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 18];128: 767–72. Available from: doi: 10.1007/s00401-014-1356-1.
84. Ball MJ, Lukiw WJ, Kammerman EM, Hill JM. Intracerebral propagation of Alzheimer's disease: strengthening evidence of a herpes simplex virus etiology. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 18];9(2):169–75. Available from: doi: 10.1016/j.jalz.2012.07.005.
85. Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA, Scheinder JA, Abisambra JF, Abner EL, et al. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 18];128(6):755–66. Available from: doi:10.1007/s00401-014-1349-0.
86. Walker LC. Prion-like mechanisms in Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol* [Internet] 2018 [cited 2021 Aug 18];153:303–319. Available from: doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00016-7.
87. Šimić G, Babić LM, Wray S, Harrington CR, Delalle I, Jovanov-Milošević N, et al. Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol*

[Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 18];151:101–138. Available from: doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.04.001.

88. Roy J, Tsui KC, Ng J, Fung ML, Lim LW. Regulation of Melatonin and Neurotransmission in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 18];22(13):6841. Available from: doi: 10.3390/ijms22136841.

89. Lim SA, Kang UJ, McGehee DS. Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front. Synaptic Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 18];6:22. Available from: doi: 10.3389/fnsyn.2014.00022.

90. Haam J, Yakel JL. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J Neurochem* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 18];142(Suppl 2):111–121. Available from: doi: 10.1111/jnc.14052.

91. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 18];76(1):116–129. Available from: doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.036.

92. Dannenberg H, Pabst M, Braganza O, Schoch S, Niediek J, Bayraktar M, Mormann F, Beck H. Synergy of Direct and Indirect Cholinergic Septo-Hippocampal Pathways Coordinates Firing in Hippocampal Networks. *J Neurosci* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 18];35(22):8394–410. Available from: doi: 10.1523/JNEUROSCI.4460-14.2015.

93. Paez-Gonzalez P, Asrican B, Rodriguez E, Kuo CT. Identification of distinct ChAT(+) neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nature neuroscience* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 20];17(7):934–42. Available from: doi: 10.1038/nn.3734.

94. Ahmed NY, Knowles R, Dehorter N. New Insights Into Cholinergic Neuron Diversity. *Front. Mol. Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 20];12:204. Available from: doi: 10.3389/fnmol.2019.00204.

95. Teipel S, Heinsen H, Amaro EJr, Grinberg LT, Krause B, Grothe M, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Cholinergic basal forebrain atrophy predicts amyloid burden in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2014 [cited

2021 Aug 20];35(3):482–491. Available from: doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.029.

96. Gray SL, Anderson ML, Dublin S, Hanlon JT, Hubbard R, Walker R, et al. Cumulative use of strong anticholinergics and incident dementia: a prospective cohort study. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 20];175(3):401–7. Available from: doi: 10.1001/jamainternmed.2014.7663.

97. Kalisch Ellett LM, Pratt NL, Ramsay EN, Barratt JD, Roughead EE. Multiple anticholinergic medication use and risk of hospital admission for confusion or dementia. *J Am Geriatr Soc* [Internet] 2014 [cited 2021 Aug 20];62(10):1916–22. Available from: doi: 10.1111/jgs.13054.

98. Ramos-Rodriguez JJ, Pacheco-Herrero M, Thyssen D, Murillo-Carretero MI, Berrocoso E, Spires-Jones TL, et al. Rapid  $\beta$ -amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in APP/PS1 mice. *J Neuropath Exp Neurol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 20]; 72(4):272–85. Available from: doi: 10.1097/NEN.0b013e318288a8dd.

99. Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flugel A, Laman JD, Weller RO. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 20];132(3): 317–38. Available from: doi: 10.1007/s00401-016-1606-5.

100. Welt T, Kulic L, Hoey SE, McAfoose J, Spani C, Chadha AS, et al. Acute effects of muscarinic M1 receptor modulation on A $\beta$ PP metabolism and amyloid-beta levels in vivo: a Microdialysis Study. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 20];46(4):971–82. Available from: doi: 10.3233/JAD-150152.

101. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 21];141(7):1917–33. Available from: doi:10.1093/brain/awy132.

102. Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, Zhu X. Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Mol Neurodegeneration* [Internet].

2020 [cited 2021 Aug 21]15(1):30. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00376-6>.

103. Максимович НЕ, Бонь ЕИ, Дремза ИК. Изучение функций митохондрий в эксперименте. Биомедицина [Интернет]. 2019 [цитировано 2021 Авг 21];(3):71–77. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-3-71-77>.

104. Carraro M, Bernardi P. Measurement of membrane permeability and the mitochondrial permeability transition. *Methods Cell. Biol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 21];155:369–379. Available from: doi: 10.1016/bs.mcb.2019.10.004.

105. Misrani A, Tabassum S, Yang L. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer’s Disease. *Front. Aging Neurosci* [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 21];13:617588. Available from: doi: 10.3389/fnagi.2021.617588.

106. Kukreja L, Kujoth GC, Prolla TA, Van Leuven F, Vassar R. (2014) Increased mtDNA mutations with aging promotes amyloid accumulation and brain atrophy in the APP/Ld transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 21]9:16. Available from: doi: 10.1186/1750-1326-9-16.

107. Ruan L, Zhou C, Jin E, Kucharavy A, Zhang Y, Wen Z, et. al. Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 21]543(7645):443–46. Available from: doi: 10.1038/nature21695.

108. Morsy A, Trippier PC. Amyloid-Binding Alcohol Dehydrogenase (ABAD) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Med Chem* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 21];62(9):4252–64. Available from: doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01530.

109. Stanga S, Caretto A, Boido M, Vercelli A. Mitochondrial Dysfunctions: A Red Thread across Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 22]21(10):3719. Available from: doi: 10.3390/ijms21103719.

110. Flannery PJ, Trushina E. (2019). Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer’s disease. *Mol. Cell Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 22]98:109–120. Available from: doi: 10.1016/j.mcn.2019.06.009.



111. Cai Q, Jeong YY. (2020). Mitophagy in Alzheimer's Disease and Other Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Cells* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 22];9:150. Available from: doi: 10.3390/cells9010150.
112. Sheng B, Wang X, Su B, Lee HG, Casadesus G, Perry G, et al. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurochem* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 22];120(3):419–29. Available from: doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07581.x.
113. Sajja VSSS, Hlavac N, VandeVord PJ (2016) Role of Glia in Memory Deficits Following Traumatic Brain Injury: Biomarkers of Glia Dysfunction. *Front. Integr. Neurosci* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 22];10:7. Available from: doi: 10.3389/fnint.2016.00007.
114. Franco-Bocanegra DK, Gourari Y, McAuley C, Chatelet DS, Johnston DA, Nicoll JAR, Boche D. Microglial morphology in Alzheimer's disease and after A $\beta$  immunotherapy. *Sci Rep* [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 22];11(1):15955. Available from: doi: 10.1038/s41598-021-95535-0.
115. Newcombe EA, Camats-Perna J, Silva ML, Valmas N, Huat TJ, Medeiros R. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* [Internet] 2018 [cited 2021 Aug 22];15:276. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1313-3>.
116. Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, et al. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 22]; 138(Pt 5):1138–59. Available from: doi: 10.1093/brain/awv066.
117. Fakhoury M. Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 22];16(5):508–18. Available from: doi: 10.2174/1570159X15666170720095240.
118. Safaiyan S, Kannaiyan N, Snaidero N, Brioschi S, Biber K, Yona S, et al. Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat Neurosci* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 22];19(8):995–8. Available from: doi: 10.1038/nn.4325.

119. Wendeln AC, Degenhardt K, Kaurani L, Gertig M, Ulas T, Jain G, et al. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 22];556(7701):332–8. Available from: doi: 10.1038/s41586-018-0023-4.
120. Mazaheri F, Snaidero N, Kleinberger G, Madore C, Daria A, Werner G, et al. 2017. TREM2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury. *EMBO Rep* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 23]18(7):1186–98. Available from: doi: 10.15252/embr.201743922.
121. Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 23];217(2):459–72. Available from: doi: 10.1083/jcb.201709069.
122. Davies DS, Ma J, Jegathees T, Goldsbury AC. Microglia show altered morphology and reduced arborisation in human brain during aging and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 23];27(6):795–808. Available from: doi: 10.1111/bpa.12456.
123. Pluta R, Jablonski M, Ulamek-Koziol M, Kocki J, Brzozowska J, Januszewski S, Furmaga-Jablonska W, et al. Sporadic Alzheimer's disease begins as episodes of brain ischemia and ischemically dysregulated Alzheimer's disease genes. *Mol. Neurobiol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 23]48(3):500–15. Available from: doi: 10.1007/s12035-013-8439-1.
124. Kalaria RN. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 23]; 131(5):659–85. Available from: doi: 10.1007/s00401-016-1571-z.
125. Kisler K, Nelson AR, Rege SV, Ramanathan A, Wang Y, Ahuja A, et al. Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat Neurosci* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 25];20(3):406–16. Available from: doi: 10.1038/nn.4489.

126. Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, et al. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 25];485(7399):512–6. Available from: doi: 10.1038/nature11087.
127. Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 25];1862(5):887–900. Available from: doi: 10.1016/j.bbadis.2015.12.016.
128. Yalcin EB, Nunez K, Tong M, de la Monte SM. Differential Sphingolipid and Phospholipid Profiles in Alcohol and Nicotine-Derived Nitrosamine Ketone-Associated White Matter Degeneration. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 25];39(12):2324–33. Available from: doi: 10.1111/acer.12909.
129. Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 25];18(7):419–34. Available from: doi: 10.1038/nrn.2017.48.
130. Мельникова ЮС, Макарова ТП. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней. *Казан. мед. журн* [Интернет]. 2015 [cited 2021 Aug 26];96(4), 659–65. Available from: <https://doi.org/10.17750/KMJ2015-659>.
131. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 26];14(3):133–150. Available from: doi: 10.1038/nrneurol.2017.188.
132. Lecrux C, Sandoe CH, Neupane S, Kropf P, Toussay X, Tong XK, et al. Impact of altered cholinergic tones on the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J Neurosci* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 26];37:1518–1531. Available from: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1784-16.2016>.
133. Vitek MP, Araujo JA, Fossel M, B, Greenberg BD, Howell GR, Sukoff Rizzo SJ, et al. Translational animal models for Alzheimer's disease: An Alzheimer's

Association Business Consortium Think Tank. Alzheimer's Dement [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 26];6(1):e12114. Available from: doi: 10.1002/trc2.12114.

134. Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O. Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 26];10(7):703–11. Available from: doi: 10.1517/17460441.2015.1041913.

135. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 26];133(2):155–75. Available from: doi: 10.1007/s00401-016-1662-x.

136. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- $\beta$  peptide clearance. *Sci Transl Med* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 26];3(89):89ra57. Available from: doi: 10.1126/scitranslmed.3002156.

137. Yamazaki Y, Painter MM, Bu G, Kanekiyo T. Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence. *CNS Drugs* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 26];30:773–89. Available from: doi: 10.1007/s40263-016-0361-4.

138. Hannan SB, Drager NM, Rasse TM, Voigt A, Jahn TR. Cellular and molecular modifier pathways in tauopathies: the big picture from screening invertebrate models. *J Neurochem* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 27];137(1):12–25. Available from: doi: 10.1111/jnc.13532.

139. Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 27];482(7384):216–20. Available from: doi: 10.1038/nature10821.

140. Raja WK, Mungenast AE, Lin YT, Ko T, Abdurrob F, Seo J, Tsai LH. Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 27];11(9):e0161969. Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0161969.

141. Balducci C, Forloni G. In vivo application of beta amyloid oligomers: a simple tool to evaluate mechanisms of action and new therapeutic approaches. *Curr*

Pharm Des [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 27];20(15):2491–505. Available from: doi: 10.2174/13816128113199990497.

142. Kumar A, Prakash A, Pahwa D. Galantamine potentiates the protective effect of rofecoxib and caffeic acid against intrahippocampal Kainic acid-induced cognitive dysfunction in rat. *Brain Res Bull* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 27];85(3–4):158–68. Available from: doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.03.010.

143. Tota S, Nath C, Najmi AK, Shukla R, Hanif K. Inhibition of central angiotensin converting enzyme ameliorates scopolamine induced memory impairment in mice: role of cholinergic neurotransmission, cerebral blood flow and brain energy metabolism. *Behav Brain Res* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 27];232(1):66–76. Available from: doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.015.

144. Cui SQ, Wang Q, Zheng Y, Xiao B, Sun HW, Gu XL, et al. Puerarin protects against damage to spatial learning and memory ability in mice with chronic alcohol poisoning. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 27];48(6):515–22. Available from: doi: 10.1590/1414-431X20144250.

145. Neha RK, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N, Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 27];109(2):73–86. Available from: doi: 10.1016/j.lfs.2014.05.017.

146. Gao C, Chang P, Yang L, Wang Y, Zhu S, Shan H, et al. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on sodium azide-induced oxidative stress in PC12 cells. *Int J Mol Med* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 27];41(1):242–50. Available from: doi: 10.3892/ijmm.2017.3227.

147. Mahdi O, Baharuldin MTH, Nor NHM, Chiroma SM, Jagadeesan S, Moklas MAM. Chemicals used for the induction of Alzheimer's disease-like cognitive dysfunctions in rodents. *Biomedical Research and Therapy* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 27];6(11):3460–84. Available from: <https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i11.575>.

148. Villemagne VL, Pike KE, Chételat G, Ellis KA, Mulligan RS, Bourgeat P, et al. Longitudinal assessment of A $\beta$  and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann Neurol* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 27]; 69(1):181–192. Available from: doi: 10.1002/ana.22248.

149. Scheffer S, Hermkens DMA, Weerd L, Helga E. de Vries HE, Daemen MJAP. Vascular Hypothesis of Alzheimer Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 27];41(4):1265–83. Available from: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.311911>.
150. Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R, et al. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 27];275(3):251–83. Available from: doi: 10.1111/joim.12191.
151. Aprahamian I, Stella F, Forlenza OV. New treatment strategies for Alzheimer's disease: is there a hope? *Indian J Med Res* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 27];138(4):449–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24434253/>.
152. Moussa CE-H. Beta-secretase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 27];26(10):1131–6. Available from: doi: 10.1080/13543784.2017.1369527.
153. Winblad B, Graf A, Riviere ME, Andreasen N, Ryan JM. Active immunotherapy options for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 28];6(1):7. Available from: doi: 10.1186/alzrt237.
154. Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 28];537(7618):50–6. Available from: doi: 10.1038/nature19323.
155. Jia Q, Deng Y, Qing H. Potential therapeutic strategies for Alzheimer's disease targeting or beyond  $\beta$ -amyloid: insights from clinical trials. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 28];2014:837157. Available from: doi: 10.1155/2014/837157.
156. Kuszczuk MA, Sanchez S, Pankiewicz J, Kim J, Duszczuk M, Guridi M, et al. Blocking the interaction between apolipoprotein E and A $\beta$  reduces intraneuronal accumulation of A $\beta$  and inhibits synaptic degeneration. *Am J Pathol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 28];182(5):1750–68. Available from: doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.034.
157. Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CY, Karlo JC, Zinn AE, et al. ApoE-directed therapeutics rapidly clear  $\beta$ -amyloid and reverse deficits in AD mouse

models. *Science* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 28];335(6075):1503–6. Available from: doi: 10.1126/science.1217697.

158. Zhu L, Zhong M, Elder GA, Sano M, Holtzman DM, Gandy S, et al. Phospholipid dysregulation contributes to ApoE4-associated cognitive deficits in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 28];112(38):11965–70. Available from: doi: 10.1073/pnas.1510011112.

159. Devi L, Ohno M. 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 28];37(2):434–44. Available from: doi: 10.1038/npp.2011.191.

160. Mathur R, Ince PG, Minett T, Garwood CJ, Shaw PJ, Matthews FE, et al. A reduced astrocyte response to  $\beta$ -amyloid plaques in the ageing brain associates with cognitive impairment. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 28];10(2):e0118463. Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0118463.

161. Patel L, Grossberg GT. Combination therapy for Alzheimer's disease. *Drugs Aging* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 28];28(7):539–46. Available from: doi: 10.2165/11591860-000000000-00000.

162. Buckley JS, Salpeter SR. A risk-benefit assessment of dementia medications: systematic review of the evidence. *Drugs Aging* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 28];32(6):453–67. Available from: doi: 10.1007/s40266-015-0266-9.

163. Cao J, Hou J, Ping J, Cai D. Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 28]13(1):64. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0299-8>.

164. Бабенко ВИ. Роль межклеточной передачи митохондрий в реализации нейропротекторного действия мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток [диссертация]. Москва: МГУ имени М.В. Ломоносова; 2018. 185 с.

165. Ratajczak MZ, Jadczyk T, Pedziwiatr D, Wojakowski W. New advances in stem cell research: practical implications for regenerative medicine. *Pol Arch Med Wewn* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 29]124(7–8):417–26. Available from: doi: 10.20452/pamw.2355.

166. Panopoulos AD, Ruiz S, Belmonte IJC. iPSCs: induced back to controversy. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 29]8(4):347–8. Available from: doi: 10.1016/j.stem.2011.03.003.
167. Lomax GP, Hull SC, Lowenthal J, Rao M, Isasi R. The DISCUSS project: induced pluripotent stem cell lines from previously collected research biospecimens and informed consent: points to consider. *Stem Cells Trans. Med* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 29]2(10):727–30. Available from: doi: 10.5966/sctm.2013-0099.
168. Ager RR, Davis JL, Agazaryan A, Benavente F, Poon WW, La Ferla FM, Blurton-Jones M. Human neural stem cells improve cognition and promote synaptic growth in two complementary transgenic models of Alzheimer’s disease and neuronal loss. *Hippocampus* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 29]25(7):813–26. Available from: doi: 10.1002/hipo.22405.
169. Lee JH, Oh IH, Lim HK. Stem cell therapy: a prospective treatment for Alzheimer’s disease. *Psychiatry Investig* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 29]13(6):583–589. Available from: doi: 10.4306/pi.2016.13.6.583.
170. Yoo J, Kim HS, Hwang DY. Stem cells as promising therapeutic options for neurological disorders. *J Cell Biochem* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 29]114(4):743–53. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcb.24427>.
171. Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 29]20(8):1297–308. Available from: doi: 10.1089/scd.2010.0466.
172. Yang YHK. Aging of mesenchymal stem cells: implication in regenerative medicine. *Reg Ther* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 30]9:120–122. Available from: doi: 10.1016/j.reth.2018.09.002.
173. Alvarez AA. *Stem Cell Biology and Strategies for Therapeutic Development in Degenerative Diseases and Cancer* [dissertation on the internet]. Orlando, USA: University of Central Florida; 2011. [cited 2021 Aug 30]. Available from: <https://stars.library.ucf.edu/etd/6631>.



174. Recio JS, Alvarez-Dolado M, Diaz D, Baltanas FC, Piquer-Gil M, Alonso JR, et al. Bone Marrow Contributes Simultaneously to Different Neural Types in the Central Nervous System through Different Mechanisms of Plasticity. *Cell Transplantation* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 30];20(8):1179–92. Available from: doi:10.3727/096368910X552826.

175. Honmou O, Onodera R, Sasaki M, Waxman SG, Kocsis JD. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Trends Mol Med* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 30];18(5):292–7. Available from: doi: 10.1016/j.molmed.2012.02.003.

176. Wang SP, Wang ZH, Peng DY, Li SM, Wang H, Wang XH. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection. *Mol Med Rep* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 30];6(4):848–54. Available from:doi: 10.3892/mmr.2012.997.

177. Fabian C, Naaldijk Y, Leovsky C, Johnson AA, Rudolph L, Jaeger C, et al. Distribution pattern following systemic mesenchymal stem cell injection depends on the age of the recipient and neuronal health. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 30]8:85. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0533-2>.

178. Becker JB, Prendergast BJ, Liang JW. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biol Sex Differ* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sept 2];7:34. Available from: doi: 10.1186/s13293-016-0087-5.

179. Бессалова ЕЮ. Половые и сезонные отличия поведения крыс в «Открытом поле». *Світ медицини та біології*. 2011; 4: 12-16.

180. Дейко РД, Штриголь СЮ, Лар'яновська ЮБ, Горбач ТВ, Губіна-Вакулик ГІ, Дев'яткіна НМ, та ін. Хронічна блокада центральних мускаринових рецепторів у щурів відтворює первинні патогенетичні ланки хвороби Альцгеймера. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2017; 17,3(59): 13-25.

181. Миронов АН, редактор. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.: Гриф и К; 2012. Часть первая. 944 с.

182. Дейко РД, Штриголь СЮ, Горбач ТВ, Колобов ОО, Симбірцев АС. Ноотропні властивості тетрапептиду acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (КК-1) на

моделі хвороби Альцгеймера у щурів, зумовленої хронічним введенням скополаміну. Клінічна фармація. 2016; 4: 52-61.

183. Wong-Guerra M, Jiménez-Martin J, Pardo-Andreu GL, Fonseca-Fonseca LA, Souza DO, Assis AM, et al. Mitochondrial involvement in memory impairment induced by scopolamine in rats. *Neurol Res* [Internet]. 2017 [cited 2021 Sept 6];39(7):649–659. Available from: doi: 10.1080/01616412.2017.1312775.

184. Дейко РД. Експериментальне вивчення церебропротекторних та психотропних властивостей нових циклічних і лінійних олігопептидів [автореферат]. Харків: Нац. фармацевт. ун-т; 2017. 23 с.

185. Lee H, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Rhee JC. Unexpected anterograde amnesia associated with Buscopan used as a premedication for endoscopy. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2007 [cited 2021 Sept 6];13(28):3895-6. Available from: doi: 10.3748/wjg.v13.i28.3895.

186. Пятикоп ВА, Мсаллам МА, Щегельская ЕА, Кутовой ИА, Губина-Вакулик ГИ, Горбач ТВ. Сравнительная эффективность внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крысам, у которых моделировали паркинсоноподобный синдром. *Український нейрохірургічний журнал*. 2014; 2: 55-61.

187. Гостюхина АА, Замощина ТА, Светлик МВ, Жукова ОБ, Зайцев КВ, Абдулкина. Поведенческая активность крыс в «Открытом поле» после световой или темновой деприваций и физического переутомления. *Бюллетень сибирской медицины* [Интернет]. 2016 [цитировано 2021 Сент 7];15(3):16–23. Доступно: <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2016-3-16-23>.

188. Бонь ЕИ, Максимович НЕ. Методы оценки неврологических нарушений в эксперименте. *Вестн. Витеб. гос. мед. ун-та* [Интернет]. 2018 [цитировано 2021 Сент 7];17(4):22–28. Доступно: DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2018A.22>.

189. Иноземцев АН. Анализ природы следа памяти в условной реакции пассивного избегания. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2013; 1: 3-7.

190. Eagle AL, Wang H, Robison AJ. Sensitive Assessment of Hippocampal Learning Using Temporally Dissociated Passive Avoidance Task. *Bio Protoc* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sept 8];6(11):e1821. Available from: doi: 10.21769/BioProtoc.1821.
191. Bondarenko N. Anxiety and the Problem of “Inattentive” Animals in Water Maze Tests. *The Russian Journal of Cognitive Science* [Internet]. 2017 [cited 2021 Sept 8];4(4):45–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.47010/17.4.7>.
192. Баркаган ЗС, Момот АП. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Москва: НьюДиаМед; 2001; с. 61–8.
193. Савченко ЕГ, редактор. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда. Национальное гематологическое общество; 2018. 30 с.
194. Камышникова ВС, редактор. Биохимические предикторы и маркеры инфаркта головного мозга. Минск: БелМАПО; 2013. 512 с.
195. Мранова ИС. Определение 2,3ДФГ и АТФ в эритроцитах. *Лаб. дело*. 1975;7:652–4.
196. Мешкова НП, Северин СЕ, редакторы. Практикум по биологии: учеб. пособие для студ. биол. специальностей вузов. Москва: Изд-во Моск. ун-та; 1979. 430с.
197. Лемешко ВВ Сохранение функциональной активности митохондрий при глубоком замораживании. В: Северин СЕ, редактор. Митохондрии : Аккумуляция энергии и регуляции ферментативных процессов. Москва: Наука; 1977. с. 5–11
198. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911–7.
199. Прохорова МИ, редактор. Методы биохимических исследований : (Липид. и энерг. обмен) : учеб. пособие. Ленинград: Изд-во ЛГУ; 1982. 272 с.
200. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*. 1959;234(3):466–8.
201. Трубицына ИЕ, Дроздов ВН, Лазебник ЛБ, Лычкова АЭ, изобретатели. Способ определения ацетилхолина. Патент РФ № 2256920. 2005 Июль 20.

202. Костюк ВА, Потапова АН, Ковалева ЖВ. Простой и чувствительный метод определения активности СОД, основанный на реакции окисления кверцетина. Вопросы мед. химии. 1990; 2: 88-91.
203. Дубинина ЕЕ. Методы определения активности каталазы. Лаб. Дело. 1988; 8:16-19;
204. Щербань НГ, Горбач ТИ, Гусева Н.Р. Лабораторные методики для изучения состояния антиоксидантной системы организма и уровня перекисного окисления липидов. Методические рекомендации для докторантов, аспирантов, магистрантов. исполнителей НИР. Харьков: ХДМУ; 2004. 36 с.
205. Чевари С, Андел Т, Штрелер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. Лаб дело. 1991; 10: 9-13.
206. Гаврилов В, Мишкорудная МИ. Спектрофотометрическое определение содержания ГПР в плазме крови. Лаб. дело. 1983;3:33–36.
207. Варенюк ІМ, Держинський МЕ. Методи цито-гістологічної діагностики: навчальний посібник. Київ: Інтерсервіс; 2019. с. 26-37.
208. Culling CFA. Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques: Including Museum Techniques. 3 ed. London: Butterworth-Heinemann; 1974. 712 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-04011-X>.
209. Іліка ВВ, Давиденко ІС, Давиденко ОМ. Гістохімічна оцінка процесів окислювальної модифікації білків в ендотеліоцитах кровоносних судин базальної пластинки плаценти при поєднанні запалення посліду та залізодефіцитної анемії вагітних. Клінічна та експериментальна патологія. 2016; XV, 4 (58):54-57.
210. Давиденко ІС, Грицюк МІ, Давиденко ОМ. Методика кількісної оцінки результатів гістохімічної реакції з бромфеноловим синім для встановлення співвідношення між аміно- та карбоксильними групами в білках. Вісник морської медицини. 2017; 4 (77):141-148.
211. Romaniuk A, Guryavenko N, Lyndin M, Piddubnyi A, Sikora V, Korobchanska A. Primary cancer of the fallopian tubes: histological and immunohistochemical features. Folia medica Cracoviensia. 2016;4:71-80

212. Слинько ЮА, Губина-Вакулик ГИ, Рябокони ЕН, Соколова ИИ. Морфофункциональные особенности строения эпителия десны крыс при разном двигательном режиме их матерей в период вынашивания. Український стоматологічний альманах. 2013; 6: 6-9.
213. Прохоров АМ, редактор. Оптическая плотность. Физическая энциклопедия М.: Большая Российская энциклопедия; 1992. с. 441.
214. Shchegelskaya EA, Grigorieva TG, Omelchenko EA, Zabirnyk AS, Markelova EV, Panibrattseva SG, et al. Migration of labeled bone marrow MSCs and skin fibroblasts after systemic and local transplantation in rat burn wound model. *Biopolymers and Cell* [Internet]. 2015 [cited 2021 Sept 10];31(5):387–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008FB>.
215. Гржибовский АМ, Иванов СВ, Горбатова М.А. Сравнение количественных данных трех и более независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии. *Наука и здравоохранение*. 2016; 4: 5-37.
216. Гланц Стентон, редактор. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998. 459 с.
217. Юнкеров ВИ, Григорьев СГ, редакторы. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. Спб: ВМедА; 2002. 266 с.
218. Dewanjee S, Vallamkondu J, Kalra RS, Puvvada N, Kandimalla R, Reddy PH. Emerging COVID-19 Neurological Manifestations: Present Outlook and Potential Neurological Challenges in COVID-19 Pandemic. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sept 16];58(9):4694–4715. Available from: doi: 10.1007/s12035-021-02450-6.
219. Verclytte S, Lopes R, Lenfant P, Rollin A, Semah F, Leclerc X, et al. Cerebral Hypoperfusion and Hypometabolism Detected by Arterial Spin Labeling MRI and FDG-PET in Early-Onset Alzheimer's Disease. *J Neuroimaging* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sept 16];26(2):207–12. Available from: doi: 10.1111/jon.12264.
220. Montagne A, Zhao Z, Zlokovic BV. Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? *J Exp Med* [Internet]. 2017 [cited 2021 Sept 16];214(11):3151–69. Available from: doi: 10.1084/jem.20171406.

221. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Sci Transl Med* [Internet]. 2012 [cited 2021 Sept 16];4(147):147ra111. Available from: doi: 10.1126/scitranslmed.3003748.

222. Aldea R, Weller RO, Wilcock DM, Carare RO, Richardson G. Cerebrovascular Smooth Muscle Cells as the Drivers of Intramural Periarterial Drainage of the Brain. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2021 Sept 16];11:1. Available from: doi: 10.3389/fnagi.2019.00001.

223. Austin SA, Katusic ZS. Partial loss of endothelial nitric oxide leads to increased cerebrovascular beta amyloid. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sept 16];40(2):392–403. Available from: doi: 10.1177/0271678X18822474.

224. Nizari S, Wells JA, Carare RO, Romero IA, Hawkes CA. Loss of cholinergic innervation differentially affects eNOS-mediated blood flow, drainage of A $\beta$  and cerebral amyloid angiopathy in the cortex and hippocampus of adult mice. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sept 16];9(1):12. Available from: doi: 10.1186/s40478-020-01108-z.

225. Кузнецова АС, Гоженко АИ, Кузнецова ЕС, Шухтин ВВ, Кузнецова ЕН, Кузнецов СГ. Эндотелий. Физиология и патология: монография. Одесса: Феникс, 2018. 284 с.

226. Kapasi A., Schneider J.A. (2016) Vascular contributions to cognitive impairment, clinical Alzheimer's disease, and dementia in older persons. *Biochimica et biophysica acta* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sept 16];1862(5):878–86. Available from: doi: 10.1016/j.bbadis.2015.12.023.

227. Lee S, Kim J, Seo SG, Choi BR, Han JS, Lee KW, et al. Sulforaphane alleviates scopolamine-induced memory impairment in mice. *Pharmacol Res* [Internet] 2014 [cited 2021 Sept 16];85:23–32. Available from: doi: 10.1016/j.phrs.2014.05.003.

228. Дзяк ЛА, Цуркаленко ЕС. Роль холинергического дефицита в патогенезе психоневрологических заболеваний. *Міжнар. невролог. журн*

[Интернет]. 2019 [цитировано 2021 Сент 16];3(105):68–76. Доступно: <http://repo.dma.dp.ua/id/eprint/4622>.

229. Haider S, Tabassum S, Perveen T. Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: a comparative study. *Brain Res. Bull* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sept 17];127:234–247. Available from: doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.10.002

230. Jalali F, Afshari R, Babaei A. Smoking crushed hyoscine/scopolamine tablets as drug abuse. *Subst Use Misuse* [Internet]. 2014 [cited 2020 Feb 22021 Sept 17];49(7):793–7. Available from: doi: 10.3109/10826084.2014.880178.

231. Strano-Rossi S, Mestria S, Bolino G, Polacco M, Grassi S, Oliva A. Scopolamine fatal outcome in an inmate after buscopan® smoking. *Int J Legal Med* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sept 17];135(4):1455–1460. Available from: doi: 10.1007/s00414-021-02583-2.

232. Popovych AI, Davydenko IS, Davydenko OM. Histochemical evaluation of protein oxidative modification in fibrinoid of the placenta, depending on calcium deposits, combined with iron deficiency anemia of pregnancy. *Arch Balk Med Union* [Internet]. 2018 [cited 2021 Sept 17];53(2):200–4. Available from: DOI 10.31688/ABMU.2018.53.2.04.

233. Lydon GR. Cholinergic neurons and memory: An historical perspective and overview of current research. In: Stone TW. *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators*. London ; Tokyo: CRC Press, 2020. p. 197–232.

234. Potter PE, Rauschkolb PK, Pandya Y, Sue LI, Sabbagh MN, Walker DG, et al. Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2011 [cited 2021 Sept 18];122(1):49–60. Available from: doi: 10.1007/s00401-011-0831-1.

235. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2016 [cited

2021 Sept 20];14(1):101–15. Available from: doi: 10.2174/1570159x13666150716165726.

236. Grimaldi M, Marino SD, Florenzano F, Ciotta MT, Nori SL, Rodriguez M, et al.  $\beta$ -Amyloid-acetylcholine molecular interaction: new role of cholinergic mediators in anti-Alzheimer therapy? *Future Med Chem* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sept 20];8(11):1179–89. Available from: doi: 10.4155/fmc-2016-0006.

237. Gorbach TV, Nakonechna OA, Tkachenko AS, Shcholak TS, Onikova AO. Levels of thyroid hormones and indices of energy metabolism in the cerebral cortex of rats with experimental Alzheimer's disease. *Neurophysiology* [Internet]. 2018 [cited 2021 Sept 21];50(3):159–65. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11062-018-9732-4>.

238. Muhammad T, Ali T, Ikram M, Khan A, Alam SI, Kim MO. Melatonin rescue oxidative stress-mediated neuroinflammation/ neurodegeneration and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice model. *J Neuroimmune Pharmacol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Sept 21];14(2):278–94. Available from: doi: 10.1007/s11481-018-9824-3.

239. Cenini G, Dowling AL, Beckett TL, Barone E, Mancuso C, Murphy MP, et al. Association between frontal cortex oxidative damage and beta-amyloid as a function of age in Down syndrome. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2012 [cited 2021 Sept 21];1822(2):130–8. Available from: doi: 10.1016/j.bbadis.2011.10.001.

240. Koizumi K, Wang G, Park L. (2015b). Endothelial Dysfunction and Amyloid- $\beta$ -Induced Neurovascular Alterations. *Cellular and Molecular Neurobiology* [Internet]. 2015 [cited 2021 Sept 21];36(2):155–165. Available from: doi: 10.1007/s10571-015-0256-9.

241. Ago T. [The neurovascular unit in health and ischemic stroke]. *Nihon Rinsho* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 2];74(4):583–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27333744/>.

242. Acosta L, Morcuende S, Silva-Hucha S, Pastor AM, de la Cruz RR. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Prevents the Downregulation of the Cholinergic



Phenotype in Axotomized Motoneurons of the Adult Rat. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 2];11:241. Available from: doi: 10.3389/fnmol.2018.00241.

243. Kimura K, Matsumoto K, Ohtake H, Oka JI, Fujiwara H. Endogenous acetylcholine regulates neuronal and astrocytic vascular endothelial growth factor expression levels via different acetylcholine receptor mechanisms. *Neurochem Int* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 2];118:42–51. Available from: DOI: 10.1016/j.neuint.2018.04.012.

244. Pilling D, Gomer RH. The Development of Serum Amyloid P as a Possible Therapeutic. *Front. Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 5];9:2328. Available from: doi: 10.3389/fimmu.2018.02328.

245. Ткаченко АС, Губина-Вакулик ГИ, Поликарпова АВ, Онищенко АИ. Влияние пищевой добавки Е407а на экспрессию Е-кадгерина в тонком кишечнике крыс. *Проблемы здоровья и экологии* [Интернет]. 2021 [цитировано 2021 Окт 5];18(2):94–101. Доступно: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2021-18-2-14>.

246. Mityanand Ramnarine, Danish A Ahmad. Anticholinergic Toxicity [Internet]. *Medscape*; 2020 Jun [cited 2021 Oct 5]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/812644-overview>

247. Safar M, Arab H, Rizk S, El-Maraghy S. Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells Protect Against Scopolamine-Induced Alzheimer-Like Pathological Aberrations. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 5];53(3):1403–18. Available from: DOI: 10.1007/s12035-014-9051-8.

248. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 23668193, Sodium nitrite; [cited 2021 Dec. 9]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-nitrite>.

249. Monte SM, Tong M. Mechanisms of nitrosamine-mediated neurodegeneration: potential relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2009 [cited 2021 Oct 10];17(4):817–25. Available from: doi: 10.3233/JAD-2009-1098.

250. Соседова ЛМ, Вокина ВА, Рукавишников ВС, изобретатели. Способ моделирования гипоксической энцефалопатии в пренатальный период у мелких лабораторных животных. Патент РФ № 2497202С1. 2013. Окт. 27.

251. Иваницкая НФ. Методика получения разных стадий гемической гипоксии у крыс введением нитрита натрия. Патол. физиология и эксперимен. терапия. 1976;3:69–71.

252. Тихонова ЛА. Токсическое действие бета-амилоидного пептида 25-35 на эритроциты разных возрастных популяций [диссертация]. Пущино: Пущин. гос. естественно-науч. ин-т; 2017. 112 с.

253. Randi A, Laffan M (2017). Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 10];15(1):13–20. Available from: DOI: 10.1111/jth.13551.

254. Huang L, Jia J, Liu R. Decreased serum levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- $\beta$ 1 in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Neurosci Lett* [Internet]. 2013 [cited 2021 Oct 15]; 550:60–3. Available from: doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.031.

255. Okabe K, Fukada H, Tai-Nagara I, Ando T, Honda T, Nakajima K, et al. Neuron-derived VEGF contributes to cortical and hippocampal development independently of VEGFR1/2-mediated neurotrophism. *Dev Biol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 15];459(2):65–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.11.016>.

256. Katabami K, Hayakawa M, Gando S, Severe Methemoglobinemia due to Sodium Nitrite Poisoning, *Case Reports in Emergency Medicine* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 15];2016, Article ID 9013816. 3 p. Available from: <https://doi.org/10.1155/2016/9013816>.

257. Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front Physiol* [Internet]. 2015[cited 2021 Oct 15];6:109. Available from: doi: 10.3389/fphys.2015.00109.

258. Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of Alzheimer's

disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease: A mini review. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 18];2016:8590578. Available from: doi: 10.1155/2016/8590578.

259. Cid-Castro C, Hernández-Espinosa DR, Morán J. ROS as regulators of mitochondrial dynamics in neurons. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 18];38(5):995–1007. Available from: doi: 10.1007/s10571-018-0584-7.

260. Manczak M, Kandimalla R, Fry D, Sesaki H, Reddy PH. Protective effects of reduced dynamin-related protein 1 against amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 18];25(23):5148–66. Available from: doi: 10.1093/hmg/ddw330

261. Zhang L, Trushin S, Christensen TA, Bachmeier BV, Gateno B, Schroeder A, et al. Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's Disease. *Sci Rep* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 18];6:18725. Available from: doi: 10.1038/srep18725.

262. Darshi M, Mendiola VL, Mackey MR, Murphy AN, Koller A, Perkins GA, et al. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 [cited 2021 Oct 18];286(4):2918–32. Available from: doi: 10.1074/jbc.M110.171975.

263. Cai Q, Tammineni P. Mitochondrial aspects of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 18];57(4):1087–103. Available from: doi: 10.3233/JAD-160726.

264. Lin MY, Sheng ZH. Regulation of mitochondrial transport in neurons. *Exp Cell Res* [Internet]. 2015 [cited 2021 Oct 18];334(1):35–44. Available from: doi:10.1016/j.yexcr.2015.01.004

265. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2010 [cited 2021 Oct 23];1797(6–7):1171–7. Available from: doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.011.

266. Ham PB, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 23];157:92–116. Available from: doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.06.006.

267. Joshi AS, Thompson MN, Fei N, Hüttemann M, Greenberg ML. Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 [cited 2021 Oct 23];287(21):17589–97. Available from: doi: 10.1074/jbc.M111.330167.

268. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 23];53:4094–4125. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9337-5>.

269. Таганович АД, Олецкий ЭИ, Котович ИЛ. Патологическая биохимия. Москва: Изд-во БИНОМ, 2013; с. 98.

270. Guo L, Tian J, Du H. Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Transmission Failure in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 23];57(4):1071–86. Available from: doi: 10.3233/JAD-160702.

271. Binan L, Aji A, De Crescenzo G, Jolicoeur M. Approaches for neural tissue regeneration. *Stem Cell Rev Rep* [Internet]. 2014 [cited 2021 Oct 23];10(1):44-59. Available from: doi: 10.1007/s12015-013-9474-z.

272. Feliciano DM, Bordey A, Bonfanti L. Noncanonical Sites of Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2015 [cited 2021 Oct 23];7(10):a018846. Available from: doi: 10.1101/cshperspect.a018846.

273. Tam RY, Fuehrmann T, Mitrousis N, Shochet MS. Regenerative Therapies for Central Nervous System Diseases: a Biomaterials Approach. *Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Oct 23];39:169–188. Available from: <https://doi.org/10.1038/npp.2013.237>.

274. Naaldijk Y, Jäger C, Fabian C, Leovsky C, Blüher A, Rudolph L, et al. Effect of systemic transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuropathology markers in APP/PS1 Alzheimer mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 23];43(4):299–314. Available from: doi: 10.1111/nan.12319.

275. Robins SC, Stewart I, McNay DE, Taylor V, Giachino C, Goetz M, et al.  $\alpha$ -Tanyocytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun* [Internet]. 2013 [cited 2021 Oct 23]4:2049. Available from: doi: 10.1038/ncomms3049.
276. Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, Gutiérrez-Mercado YK, Sandoval-Ávila S, Gomez-Pinedo U, Márquez-Aguirre AL, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote neurogenesis and cognitive function recovery in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 23];14(9):1626–34. Available from: doi: 10.4103/1673-5374.255978.
277. Yan Y, Ma T, Gong K, Ao Q, Zhang X, Gong Y. Adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes adult neurogenesis in the brains of Alzheimer's disease mice. *Neural Regen Res* [Internet]. 2014 [cited 2021 Oct 29];9(8):798–805. Available from: doi: 10.4103/1673-5374.131596.
278. Lee HJ, Lee JK, Lee H, Carter JE, Chang JW, Oh W, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2012 [cited 2021 Oct 29];33(3):588–602. Available from: doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.024.
279. Bali P, Bammidi S, Banik A, Nehru B, Anand A. CD34 and CD117 Stemness of Lineage-Negative Cells Reverses Memory Loss Induced by Amyloid Beta in Mouse Model. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 29];12:222. Available from: doi: 10.3389/fnbeh.2018.00222.
280. Qin C, Lu Y, Wang K, Bai L, Shi G, Huang Y, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells improves cognitive deficits and alleviates neuropathology in animal models of Alzheimer's disease: a meta-analytic review on potential mechanisms. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 29];9(1):20. Available from: doi: 10.1186/s40035-020-00199-x.
281. Xu QQ, Xu YJ, Yang C, Tang Y, Li L, Cai HB, et al. Sodium Tanshinone IIA Sulfonate Attenuates Scopolamine-Induced Cognitive Dysfunctions via Improving Cholinergic System. *BioMed Research International* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct

29];2016. Article ID 9852536. 9 p. Available from: <https://doi.org/10.1155/2016/9852536>.

282. Fitzgerald G, Soro-Arnaiz I, Bock K. The Warburg effect in endothelial cells and its potential as an anti-angiogenic target in cancer. *Front. Cell Dev. Biol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Nov 3];6:100. Available from: doi: 10.3389/fcell.2018.00100.

283. Aldosari S, Awad M, Harrington EO, Sellke FW, Abid MR. (2018). Subcellular reactive oxygen species (ROS) in cardiovascular pathophysiology. *Antioxidants* [Internet]. 2018 [cited 2021 Nov 3];7:14. Available from: doi: 10.3390/antiox7010014.

284. Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: Which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol. Metab* [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 3];25:452–463. Available from: doi: 10.1016/j.tem.2014.06.012.

285. Alhayaza R, Haque E, Karbasiafshar C, Sellke FW, Abid MR. The Relationship Between Reactive Oxygen Species and Endothelial Cell Metabolism. *Front. Chem* [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 3];8:592688. Available from: doi: 10.3389/fchem.2020.592688.

286. Garcia KO, Ornellas FL, Martin PK, Patti CL, Mello LE, Frussa-Filho R, et al. Therapeutic effects of the transplantation of VEGF overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells in the hippocampus of murine model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 3];6:30. Available from: doi: 10.3389/fnagi.2014.0003.

287. Fish KM, Hajjar RJ. Mesenchymal Stem Cells & Endothelial Function. *EBioMedicine* [Internet]. 2015 [cited 2021 Nov 3];2(5): 376–7. Available from: doi: 10.1016/j.ebiom.2015.04.015.

## ДОДАТОК А

### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Лук'янова ЄМ. Вплив хронічного нітритного навантаження на морфофункціональний стан головного мозку щурів. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019;4(22):52-9. Доступно: <https://jmbs.com.ua/archive/4/6/52> DOI: 10.26693/jmbs04.06.052.

2. Lukyanova Y, Nikolaeva O, Pavlova O, Vasyleva I, Naglov O, Shchegelskaya E, Omelchenko E. Behavioral reactions and cognitive functions in rats with vascular model of Alzheimer's type dementia at different stages of disease before and after stem cell correction. *Inter Collegas*. 2020;7(3):118-124. Available from: <https://inter.knmu.edu.ua/article/view/338> DOI: 10.35339/ic.7.3.118-124.

3. Губіна-Вакулік ГІ, Павлова ОА, Зоренко ЄМ. Гістологічні аспекти при моделюванні деменції альцгеймерівського типу судинного походження та прояви подальшої клітинної регенерації тканини головного мозку у щурів. *Morphologia*. 2020;14(3):29–35. Доступно: <http://morphology.dma.dp.ua/article/view/219460> DOI: 10.26641/1997-9665.2020.3.29-35.

4. Зоренко ЄМ, Павлова ОО, Горбач ТВ, Мартинова СМ. Роль гіпоксії та мітохондріальної дисфункції в механізмах розвитку експериментальної деменції альцгеймерівського типу різного генезу у щурів, оцінка можливості корекції даного стану мезенхімальними стовбуровими клітинами. *Вісник проблем біології і медицини*. 2021;1(159):66-72. Доступно: [https://vpbm.com.ua/ua/vyipusk-1-\(159\),-2021/14506](https://vpbm.com.ua/ua/vyipusk-1-(159),-2021/14506) DOI: 10.29254/2077-4214-2021-1-159-66-72.

5. Губіна-Вакулік ГІ, Зоренко ЄМ. Роль судинного пошкодження в умовах холінодефіциту у щурів при моделюванні скополамін-індукованої деменції альцгеймерівського типу. *Morphologia*. 2021;15(3):66-75. Доступно: <http://morphology.dma.dp.ua/article/view/248548> DOI: 10.26641/1997-9665.2021.3.66-75.

6. Zorenko Y, Gubina-Vakulyck G, Pavlova O, Gorbach T, Shchegelskaya E, Omelchenko E. Dynamics of indicators of the endothelium morphofunctional state of the brain microcirculatory bed vessels in rats with nitrite-induced Alzheimer's type dementia on the background of mesenchymal stem cell administration. Med. čas. 2021;55(1):18-26. Available from: <https://scindeks.ceon.rs/Article.aspx?artid=0350-12212101018Z> DOI: 10.5937/mckg55-31775.

7. Zorenko Y, Pavlova O, Shchegelskaya E, Omelchenko E, Gorbach T, Vasylyeva I. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Scopolamine-Induced Dementia Of Alzheimer's Type. Teikyo Medical Journal. 2021;44 (3):793-805. Available from: <https://www.teikyomedicaljournal.com/article/mesenchymal-stem-cells-ameliorate-scopolamine-induced-dementia-of-alzheimers-type>.

**Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:**

8. Ніколаєва ОВ, Павлова ОО, Лук'янова ЄМ, Губіна-Вакулік ГІ, Горбач ТВ; Харківський національний медичний університет, патентовласник. Спосіб моделювання деменції альцгеймерівського типу судинного походження у щурів. Патент України № 141759. 2020 Квіт 27.

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

9. Лук'янова ЄМ, Павлова ОО. Можливість розвитку енцефалопатії у щурів з гемічною гіпоксією. В: Бойчук ТМ, редактор. Збірник матеріалів Буковинського міжнародного медико-фармацевтичного конгресу студентів і молодих учених, ВІМСО; 2019 Квіт 2-5 квітня; Чернівці. Чернівці: СНТ БДМУ; 2019, с.295.

10. Lukyanova Y, Pavlova O. Nitrite-Induced Changes Of Endothelium Functional State And Cognitive Brain Functions In Rats. In: Marcin Gruchala, editor. Book of abstracts of 25th International Student Scientific Conference; 2019 April 12-13; Gdansk. Medical University of Gdansk; 2019, p.8.

11. Lukyanova Y, Pavlova O. Probability Of Encephalopathy Developing In Rats With Hemic Hypoxia. In: Mateusz Zając, editor. Abstact Book of 19th International



Congress Of Young Medical Scientists. 2019 May 30th – June 1st; Poznan. Poznan University of Medical Sciences; 2019, p.172.

12. Лук'янова ЄМ, Павлова ОО. Зміни поведінкових реакцій у щурів з експериментальною скополамін-індукованою та судинною нейродегенерацією. В: Гоженко АІ, редактор. Тези доповідей VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю. 2020 Трав 13-15; Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту; 2020, Т.1., с.131-132.

13. Зоренко ЄМ, Павлова ОО. Проліферативні процеси в головного мозку щурів з різними експериментальними моделями деменції. Збірник наукових праць Всеукраїнської науково-практичної конференції (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна). Перші читання, присвячені Д. О. Альперну: «Актуальні питання патологічної фізіології». 2021 Бер 26; Харків. Х: ХНМУ; 2021, с. 46.

14. Зоренко ЄМ, Горбач ТВ. Порівняльний аналіз окремих ланок патогенезу експериментальної деменції альцгеймерівського типу в умовах двох моделей. В: Корда ММ, редактор. Матеріали XXV Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених. 2021 Квіт 12-14; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2021, с.281-282.

15. Зоренко ЕМ, Губина-Вакулик ГИ. Роль микроглии в морфогенезе болезни Альцгеймера. В: Кучин ЮЛ, редактор. Ukrainian scientific medical youth journal. Міжнародна науково-практична онлайн-конференція «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку». 2021 Квіт 22-23; Україна. Київ: Національний медичний університет імені О.О.Богомольця; 2021, 2 (123), с. 19.

16. Lukyanova Y. Functional state of the brain endothelium and energy metabolism in rats with dementia of the Alzheimer's type induced by different ways. In: Zaharinova Stela, editor. Abstract book of XIX International Congress Of Medical Sciences For Students And Young Doctors. 2021 May 13-16; Sofia. Sofia; 2021, p. 65.

17. Zorenko Y, Gubina-Vakyulyk G. Assessment of the endotheliocytes to pericytes ratio in the brain capillary wall in rats with experimental dementia. In: Johannes

A. Hainfellner, editor. Abstracts of 12th European Congress of Neuropathology. 2021 May 31 – June 3; Copenhagen. *Clinical Neuropathology*. 2021; 40 (4/2021): S19.

18. Зоренко ЄМ, Павлова ОО. Участь мезенхімальних стовбурових клітин в процесах відновлення морфофункціонального стану нейропіля білої речовини великих півкуль головного мозку щурів з деменцією альцгеймерівського типу судинного походження. В: Гоженко АІ, редактор. Тези доповідей VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України. 2021 Жовт 6-8; Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту; 2021, Т.2., с.91-93.

19. Zorenko Y, Singh Rhea. Staining with bromophenol blue as method for studying the neuropil protein of cerebral hemispheres in rats with experimental Alzheimer's type dementia. In: Kapustnyk V.A., editor. Abstract book of International Scientific Interdisciplinary Conference, ISIC. 2021 Oct 20-21; Kharkiv. Kharkiv: KhNMU; 2021, p. 34-35.

20. Зоренко ЄМ, Павлова ОО. Особливості міграції мезенхімальних стовбурових клітин у щурів з експериментальною деменцією альцгеймерівського типу різного походження. В: Котвіцька АА, редактор. Тези доповідей IV Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнародною участю. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція. 2021 Лист 18 ; Харків. Х.: Вид-во НФаУ; 2021, с.116.

21. Лук'янова Є.М. Амілоїдоз головного мозку судинного генезу в експериментальних умовах. В: Капустник ВА, редактор. Збірник тез міжвузівської конференції Фестивалю молодіжної науки "Медицина третього тисячоліття". 2022 Січ 24-26; Харків. Х: ХНМУ; 2022, с. 48-50.

22. Lukyanova Y, Pavlova O, Gubina-Vakulyck G. The morphofunctional state of cerebral hemispheres neuropil in rats with scopolamine-induced dementia of Alzheimer's type after mesenchymal stem cells intravenous injections. *Medicina (Kaunas)* 2022;58(Supplement 1):206.

## АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. VI Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих вчених, ВІМСО 2019 (2-5 квітня, 2019, м.Чернівці, форма участі – усна доповідь, публікація тез).
2. 25th International Student Scientific Conference (12-13th April 2019, Gdansk, Poland, форма участі – публікація тез).
3. 19th International Congress Of Young Medical Scientists (May 30th – June 1st 2019, Poznan, Poland, форма участі – усна доповідь, публікація тез).
4. VIII Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю (13-15 травня, 2020, м.Одеса, форма участі – публікація тез).
5. Всеукраїнська науково-практична конференція (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна) (26 березня, 2021, м.Харків, форма участі – публікація тез).
6. XXV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (12-14 квітня 2021, м. Тернопіль, форма участі – усна доповідь, публікація тез).
7. XIX International Congress Of Medical Sciences For Students And Young Doctors (13-16 May, 2021, Sofia, Bulgaria, форма участі – усна доповідь, публікація тез).
8. 12th European Congress of Neuropathology (May 31 – June 3, 2021, Copenhagen, Denmark, форма участі – усна доповідь, публікація тез).
9. International Scientific Interdisciplinary Conference, ISIC – 2021 (October, 20-21, 2021, Kharkiv, форма участі – усна доповідь, публікація тез).
10. IV Науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю “Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція” (18 листопада, 2021, м. Харків, форма участі – усна доповідь, публікація тез).
11. Міжвузівська конференція молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» (26-28 січня, 2022, м.Харків, форма участі – усна доповідь, публікація тез).

12. International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 80th International Scientific Conference of the University of Latvia (25-26 March, 2022, Riga, Latvia, форма участі – усна доповідь, публікація тез).

## ДОДАТОК Б

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. проректора з науково-педагогічної  
роботи Одеського національного  
медичного університету МОЗ України  
професор



Шмакова І.П.

2021 р.

**АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ**  
результатів наукових досліджень

1. **Найменування пропозиції:** «Особливості пошкодження судин, макрофагально-лімфоцитарного запалення та регенераторних процесів в тканині головного мозку у щурів з деменцією альцгеймерівського типу судинного походження».
2. **Ким і коли запропонований:** аспірантом кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, Зоренко (Лук'яноюю) Євгенією Михайлівною, 2021 р.
3. **Джерело інформації:**
  - Hubina-Vakulick NI, Pavlova OO, Zorenko YeM. Histological aspects in the designing of alzheimer's type dementia of vascular origin and the manifestation of the brain tissue cellular regeneration in rats. Morphologia. 2020;14(3):29-35. Russian. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.3.29-35>
4. **Де і коли впроваджено:** у навчальний і науковий процеси кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету за 2021-2022 навчальний рік.
5. **Результати застосування** методу за період 2021-2022 рр.: матеріали використовуються в науковому та в навчальному процесі кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології при вивченні розділів «Запалення», «Патофізіологія серцево-судинної системи» та «Патофізіологія нервової системи».
6. **Ефективність впровадження** за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): використання результатів наукових досліджень у навчальному та науковому процесах дозволяє розширити знання студентів та підвищити їх якість з питань особливостей патогенезу патологічних процесів в тканині головного мозку під впливом екзогенних чинників, індукуючих деменцію альцгеймерівського типу у щурів.
7. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології, протокол №1 від 30 серпня 2021 р.

**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач кафедри загальної та клінічної патологічної  
фізіології імені В. В. Підвисоцького Одеського  
національного медичного університету  
З.д.н.т України, професор

Вастьянов Р.С.

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

В.о. проректора з науково-педагогічної  
роботи Одеського національного  
медичного університету МОЗ України  
професор

Шмакова І.П.

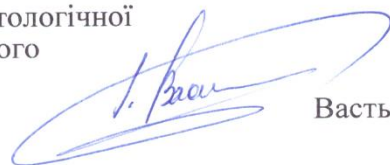
«\_\_\_\_\_» 2021 р.

### АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ результатів наукових досліджень

1. **Найменування пропозиції:** «Поведінкові реакції та когнітивні функції у щурів з деменцією альцгеймерівського типу судинного походження».
2. **Ким і коли запропонований:** аспірантом кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, Зоренко (Лук'яновою) Євгенією Михайлівною, 2021 р.
3. **Джерело інформації:**
  - Лук'янова Є. М. Вплив хронічного нітритного навантаження на морфофункціональний стан головного мозку щурів. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019;4(6 (22)): 52-59. DOI: 10.26693/jmbs04.06.052
  - Lukyanova Y., Nikolaeva O., Pavlova O., Vasyleva I., Naglov O., Shegelskaya E., Omelchenko E. Behavioral reactions and cognitive functions in rats with vascular model of alzheimer's type dementia at different stages of disease before and after stem cell correction. Inter Collegas. 2020;7 (3):118-125. DOI: 10.35339/ic.7.3.118-124
4. **Де і коли впроваджено:** у навчальний і науковий процеси кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету за 2021-2022 навчальний рік.
5. **Результати застосування** методу за період 2021-2022 рр.: матеріали використовуються в науковому та в навчальному процесі кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології при вивченні розділу «Патофізіологія нервової системи».
6. **Ефективність впровадження** за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): використання результатів наукових досліджень у навчальному та науковому процесах дозволяє розширити знання студентів та підвищити їх якість з питань особливостей поведінкових реакцій та формуванню когнітивних дисфункцій щурів під впливом екзогенних факторів.
7. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології, протокол №1 від 30 серпня 2021 р.

**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології імені В. В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету З.д.н.т України, професор



Вастьянов Р.С.





Проректор з наукової роботи  
Харківського національного медичного  
університету МОЗ України

В.В. М'ясоєдов

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 р.

### АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ результатів наукових досліджень

1. Найменування пропозиції: «Поведінкові реакції та когнітивні функції у щурів з деменцією альцгеймерівського типу судинного походження».
2. Ким і коли запропонований: аспірантом кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, Зоренко (Лук'яновою) Євгенією Михайлівною, 2021р.
3. Джерело інформації:
  - Лук'янова Є. М. Вплив хронічного нітритного навантаження на морфофункціональний стан головного мозку щурів. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019;4(6 (22)): 52-59. DOI: 10.26693/jmbs04.06.052
  - Lukyanova Y., Nikolaeva O., Pavlova O., Vasyleva I., Naglov O., Shchegelskaya E., Omelchenko E. Behavioral reactions and cognitive functions in rats with vascular model of alzheimer's type dementia at different stages of disease before and after stem cell correction. Inter Collegas. 2020;7 (3):118-125. DOI: 10.35339/ic.7.3.118-124
4. Де і коли впроваджено: у навчальний і науковий процеси кафедри загальної та клінічної патофізіології Харківського національного медичного університету за 2021-2022 навчальний рік.
5. Результати застосування методу за період 2021-2022 рр.: матеріали використовуються в навчальному та науковому процесах кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна на практичних заняттях та лекціях з тем: «Патофізіологія нервової системи», «Особливості роботи з лабораторними тваринами при проведенні тестувань «Відкрите поле», «Умовний рефлекс пасивного уникання», «Екстраполяційне позбавлення»».
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): використання результатів наукових досліджень у навчальному та науковому процесах дозволяє розширити знання студентів щодо особливостей поведінкових реакцій та когнітивних функцій щурів під впливом екзогенних факторів, що сприяє підвищенню якості їх медичної освіти.
7. Зауваження, пропозиції: не вносилися. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна, протокол № 17 від «13» вересня 2021 р.

#### Відповідальний за впровадження:

В.о. завідувача кафедри

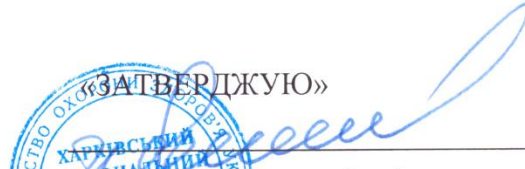
загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна

Харківського національного медичного університету

д. мед. н., професор

 О.О. Павлова

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з наукової роботи  
Харківського національного медичного  
університету МОЗ України

В.В. М'ясоєдов

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 р.

### АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ результатів наукових досліджень

1. Найменування пропозиції: «Особливості пошкодження судин, макрофагально-лімфоцитарного запалення та регенераторних процесів в тканині головного мозку у щурів з деменцією альцгеймерівського типу судинного походження».
2. Ким і коли запропонований: аспірантом кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, Зоренко (Лук'яновою) Євгенією Михайлівною, 2021р.
3. Джерело інформації:
  - Hubina-Vakulick NI, Pavlova OO, Zorenko YeM. Histological aspects in the designing of alzheimer's type dementia of vascular origin and the manifestation of the brain tissue cellular regeneration in rats. Morphologia. 2020;14(3):29-35. Russian. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.3.29-35>
4. Де і коли введено: у навчальний і науковий процеси кафедри загальної та клінічної патофізіології Харківського національного медичного університету за 2021-2022 навчальний рік.
5. Результати застосування методу за період 2021-2022 рр.: матеріали використовуються в навчальному та наукових процесах кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна на практичних заняттях та лекціях з тем: «Роль пошкодження судин в розвитку нейродегенеративних захворювань», «Запалення в головному мозку», «Регенераторні можливості клітин нервової тканини при хворобі Альцгеймера».
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): використання результатів наукових досліджень у навчальному та науковому процесах дозволяє розширити знання студентів щодо особливостей патологічних процесів в тканині головного мозку під впливом екзогенних факторів, викликаючих деменцію альцгеймерівського типу у щурів, що сприяє підвищенню якості їх медичної освіти.
7. Зауваження, пропозиції: не вносилися. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна, протокол № 17 від «13» вересня 2021 р.

**Відповідальний за впровадження:**

В.о. завідувача кафедри  
загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна  
Харківського національного медичного університету  
д. мед. н., професор

 О.О. Павлова





**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Проректор з науково-педагогічної роботи  
Національного фармацевтичного університету  
І.М. Владимирова

\_\_\_\_\_ 2021 року

**АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ**  
результатів наукових досліджень

1. Найменування пропозиції: «Поведінкові реакції та когнітивні функції у щурів з деменцією альцгеймерівського типу судинного походження».
2. Ким і коли запропонований: аспірантом кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, Зоренко (Лук'яноюю) Євгенією Михайлівною, 2021р.
3. Джерело інформації:
  - Лук'янова Є. М. Вплив хронічного нітритного навантаження на морфофункціональний стан головного мозку щурів. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019;4(6 (22)): 52-59. DOI: 10.26693/jmbs04.06.052
  - Lukyanova Y., Nikolaeva O., Pavlova O., Vasyleva I., Naglov O., Shchegelskaya E., Omelchenko E. Behavioral reactions and cognitive functions in rats with vascular model of alzheimer's type dementia at different stages of disease before and after stem cell correction. Inter Collegas. 2020;7 (3):118-125. DOI: 10.35339/ic.7.3.118-124
4. Де і коли впроваджено: у навчальний і науковий процеси кафедри нормальної та патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету за 2021-2022 навчальний рік.
5. Результати застосування методу за період 2021-2022 рр.: матеріали використовуються в навчальному та наукових процесах кафедри нормальної та патологічної фізіології на практичних заняттях та лекціях з тем: «Патофізіологія нервової системи», «Особливості роботи з лабораторними тваринами при проведення тестувань «Відкрите поле», «Умовний рефлекс пасивного уникання», «Екстраполяційне позбавлення»».
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): використання результатів наукових досліджень у навчальному та науковому процесах дозволяє розширити знання студентів щодо особливостей поведінкових реакцій та когнітивних функцій щурів під впливом екзогенних факторів, що сприяє підвищенню якості їх медичної освіти.
7. Зауваження, пропозиції: не вносилися. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри нормальної та патологічної фізіології, протокол № 3 від «12» жовтня 2021 р.

**Відповідальний за впровадження:**  
завідувач кафедри патологічної  
фізіології Національного фармацевтичного  
університету, д. мед. н., проф.

Н. М. Кононенко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи Полтавського державного медичного університету,  
 професор Дворник В.М.



2021 р.

## АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції: «Поведінкові реакції та когнітивні функції у щурів з деменцією альцгеймерівського типу судинного походження».
2. Ким і коли запропонований: аспірантом кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, Зоренко (Лук'яноюю) Євгенією Михайлівною.
3. Джерело інформації:  
 Лук'янова Є. М. Вплив хронічного нітритного навантаження на морфофункціональний стан головного мозку щурів. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019;4(6 (22)): 52-59. DOI: 10.26693/jmbs04.06.052  
 Lukyanova Y., Nikolaeva O., Pavlova O., Vasyleva I., Naglov O., Shchegelskaya E., Omelchenko E. Behavioral reactions and cognitive functions in rats with vascular model of alzheimer's type dementia at different stages of disease before and after stem cell correction. Inter Collegas. 2020;7 (3):118-125.
4. Де і коли введено: у навчальний і науковий процеси кафедри патофізіології Полтавського державного медичного університету, лютий-березень 2021 р.
5. Результати застосування методу: матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патофізіології на практичних заняттях та лекції з теми: «Патофізіологія нервової системи», науковій роботі.
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): використання результатів наукових досліджень у в навчальному та наукових процесах дозволяє розширити знання студентів щодо особливостей поведінкових реакцій та когнітивних функцій щурів під впливом екзогенних факторів, що сприяє підвищенню якості їх медичної освіти.
7. Зауваження, пропозиції: не вносилися. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри патофізіології, протокол № 5 від 19.10.2021 р.

**Відповідальний за впровадження:**

завідувач кафедри патофізіології  
 Полтавського державного  
 медичного університету  
 доктор медичних наук, професор

В.О. Костенко



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи Полтавського державного медичного університету,  
 професор Дворник В.М.



2021 р.

## АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

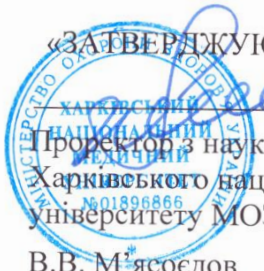
1. Найменування пропозиції: «Особливості пошкодження судин, макрофагально-лімфоцитарного запалення та регенераторних процесів в тканині головного мозку у щурів з деменцією альцгеймерівського типу судинного походження».
2. Ким і коли запропонований: аспірантом кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, Зоренко (Лук'яноюю) Євгенією Михайлівною.
3. Джерело інформації:  
 Hubina-Vakulick NI, Pavlova OO, Zorenko YeM. Histological aspects in the designing of alzheimer's type dementia of vascular origin and the manifestation of the brain tissue cellular regeneration in rats. Morphologia. 2020;14(3):29-35. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.3.29-35>
4. Де і коли введено: у навчальний і науковий процеси кафедри патофізіології Полтавського державного медичного університету, лютий-березень 2021 р.
5. Результати застосування методу: матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патофізіології на практичних заняттях та лекції з теми: «Патофізіологія нервової системи», науковій роботі.
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): використання результатів наукових досліджень у навчальному та науковому процесах дозволяє розширити знання студентів щодо особливостей патологічних процесів в тканині головного мозку під впливом екзогенних факторів, викликаючих деменцію альцгеймерівського типу у щурів, що сприяє підвищенню якості їх медичної освіти.
7. Зауваження, пропозиції: не вносилися. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри патофізіології, протокол № 5 від 19.10.2021 р.

**Відповідальний за впровадження:**

завідувач кафедри патофізіології  
 Полтавського державного  
 медичного університету  
 доктор медичних наук, професор

В.О. Костенко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

  
 Проректор з наукової роботи  
 Харківського національного медичного  
 університету МОЗ України  
 В.В. М'ясоєдов  
 «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

**АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ  
результатів наукових досліджень**

1. Найменування пропозиції: «Особливості морфофункціонального стану судин головного мозку у щурів з експериментальною нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу».
2. Ким і коли запропонований: аспірантом кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, Зоренко (Лук'яною) Євгенією Михайлівною, 2021р.
3. Джерело інформації:
  - Zorenko Y, Gubina-Vakulyck G, Pavlova O, Gorbach T, Shchegelskaya E, Omelchenko E. Dynamics of indicators of the endothelium morphofunctional state of the brain microcirculatory bed vessels in rats with nitrite-induced Alzheimer's type dementia on the background of mesenchymal stem cell administration. Med. čas. 2021; 55(1): 18-26.
4. Де і коли введено: у навчальний і науковий процеси кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету за 2021-2022 навчальний рік.
5. Результати застосування методу за період 2021-2022 рр.: матеріали використовуються в навчальному та наукових процесах кафедри патологічної анатомії на практичних заняттях та лекціях з тем: «Роль пошкодження судин в розвитку нейродегенеративних захворювань», «Морфофункціональні зміни судин головного мозку при нітрит-індукованій деменції альцгеймерівського типу», «Регенераторні зміни в судинах головного мозку при деменції альцгеймерівського типу».
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): використання результатів наукових досліджень у навчальному та науковому процесах дозволяє розширити знання студентів щодо особливостей пошкодження ендотелію судин та їх регенераторних можливостей в тканині головного мозку під впливом екзогенних факторів (нітрит натрію), викликаючих деменцію альцгеймерівського типу у щурів, що сприяє підвищенню якості їх медичної освіти.
7. Зауваження, пропозиції: не вносилися. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри патологічної анатомії, протокол № 9 від «22» чэрня 2021 р.

**Відповідальний за впровадження:**

В.о. завідувача кафедри патологічної анатомії  
 Харківського національного медичного університету  
 д. мед. н., професор


 I.V. Сорокіна



«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з наукової роботи  
Харківського національного медичного  
університету МОЗ України

В.В. М'ясоєдов

« \_\_\_\_\_ » 2021 р.

### АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ результатів наукових досліджень

1. Найменування пропозиції: «Особливості морфофункціонального стану судин головного мозку у щурів з експериментальною скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу».
2. Ким і коли запропонований: аспірантом кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, Зоренко (Лук'яною) Євгенією Михайлівною, 2021р.
3. Джерело інформації:
  - Gubina-Vakulik GI, Zorenko YM. [The role of vascular injury within the conditions of choline deficiency in rats with scopolamine-induced Alzheimer's type dementia]. Morphologia. 2021;15(3):66-75. Ukrainian.DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.3.66-75>
4. Де і коли впроваджено: у навчальний і науковий процеси кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету за 2021-2022 навчальний рік.
5. Результати застосування методу за період 2021-2022 рр.: матеріали використовуються в навчальному та наукових процесах кафедри патологічної анатомії на практичних заняттях та лекціях з тем: «Роль пошкодження судин в розвитку нейродегенеративних захворювань», «Морфофункціональні зміни судин головного мозку при холінодефіциті, викликаним довготривалим введенням скополаміну бутілброміду», «Регенераторні зміни в судинах головного мозку при деменції альцгеймерівського типу».
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): використання результатів наукових досліджень у навчальному та науковому процесах дозволяє розширити знання студентів щодо особливостей пошкодження ендотелію судин та їх регенераторних можливостей при розвитку дефіциту ацетилхоліну в тканині головного мозку, що сприяє підвищенню якості їх медичної освіти.
7. Зауваження, пропозиції: не вносилися. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри патологічної анатомії, протокол № 9 від «21» грудня 2021 р.

#### Відповідальний за впровадження:

В.о. завідувача кафедри патологічної анатомії  
Харківського національного медичного університету  
д. мед. н., професор

I.V. Сорокіна



## ДОДАТОК В

