**УДК: 616.89-008.454-001.8-092.9-08:602.9:591.476**

**РОЛЬ ГІПОКСІЇ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ В МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ** **ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ДЕМЕНЦІЇ АЛЬЦГЕЙМЕРІВСЬКОГО ТИПУ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ У ЩУРІВ, ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ КОРЕКЦІЇ ДАНОГО СТАНУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ**

Зоренко Є.М., Павлова О.О., Горбач Т.В., Мартинова С.М.

Харківський національний медичний університет (м.Харків)

zeekmail@ukr.net

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

Робота виконана у межах наукової теми НДР «Патогенез ушкоджуючої дії на організм екзогенних факторів в сучасних умовах», № держ. реєстрації 0115U000991.

**Вступ.** Хвороба Альцгеймера (ХА) - одне з найпоширеніших нейродегенеративних захворювань у всьому світі. Незважаючи на багаторічне вивчення етіології й патогенезу захворювання, багато аспектів залишаються невивченими. Встановлено, що втрата нейронами здатності передавати нервовий імпульс тягне за собою розвиток нейродегенеративних захворювань, що супроводжуються прогресивної загибеллю нервових клітин. Активну участь в синаптичній передачі й в зростанні аксонів, крім нейромедіаторів, беруть і мітохондрії, тому що дані процеси - енерговитратні.

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 [1]. Наприклад, при дефіциті глюкози посилюється фрагментація мітохондрій, а при збільшенні в дієті поліненасичених жирних кислот спостерігається підвищене злиття мітохондрій [2, 3]. 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 [4, 5]. 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 [6]. 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 [7]. Як надмірна фрагментація мітохондрій, так і нездатність до поділу, в результаті негативно відображається на цілісності крист і окисного фосфорилювання [8]. Всі зазначені стани супроводжуються порушенням «аксонального транспорту» мітохондрій, тобто їх переміщення по мікротрубочкам аксонів і дендритів [9]. В підсумку, в тканині головного мозку розвивається мітохондріальна дисфункція та енергодефіцит (порушується доставка АТФ до синапсів, не вистачає енергії для зростання аксонів) [10].

Вивчено, що не тільки патологічні білки можуть викликати порушення функції мітохондрій, а й гіпоксія/ішемія. При цьому відзначено зниження окисного фосфорилювання і накопичення супероксидних радикалів, які у великій кількості підвищують проникність внутрішньої мембрани і порушують різницю потенціалів мембран мітохондрій [11]. Згодом, мітохондрії набухають, вивільняється цитохром С, протеази, що активують каспази та апоптоз клітин [12]. 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 [13]. Таким чином, дефіцит цього «корисного» ліпіду в мітохондріях є предиктором загибелі клітин.

З усього вище викладеного, стає ясно, що дисфункція мітохондрій, гіпоксія, накопичення патологічних білків в нервовій тканині тісно взаємопов'язані між собою й при нейродегенеративних захворюваннях. Однак, які механізми їх взаємозв'язку, що є первинною ланкою, як себе ведуть дані патологічні процеси і чи можуть стовбурові клітини надати позитивний ефект протягом різних періодів захворювання, залишається актуальним питанням.

**Мета дослідження**: визначення ролі гіпоксії та мітохондріальної дисфункції в механізмах розвитку експериментальної деменції альцгеймерівського типу різного генезу у щурів і можливість корекції даного стану мезенхімальними стовбуровими клітинами.

**Об’єкт і методи дослідження.**

1.Тварини та групи

Експеримент був проведений за участю 80 щурів-самців популяції WAG масою 180-250г, яких розділили на 9 груп (у кожній експериментальній групі по 8 щурів, в контрольній групі-16). Тваринам з нітрит-індукованої деменцією альцгеймерівського типу внутрішньочеревно протягом 14-ти (гр.Н-14) і 28-и днів (гр. Н-28) вводили водний розчин нітриту натрію в дозі 50 мг/кг [14] . Після ін'єкцій нітриту натрію половина тварин груп НС-14 і НС-28 у відповідний термін отримувала одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) в дозі 500 тис. клітин на кожного щура. Тварини зі скополаміновою моделлю деменції альцгеймерівського типу за відповідною нітритній моделі схемою, отримували внутрішньочеревні ін'єкції скополаміну бутилброміду в дозі 1 мг/кг і внутрішньовенні ін’єкції МСК (гр.СК-14, СК-28, СКС-14, СКС-28) [15]. Тваринам контрольної групи (гр. К) щодня протягом 14 днів і 28 днів внутрішньочеревно вводили по 0,2 мл 0,9% водного розчину натрію хлориду. Всі тварини були розміщені в клітини 41×41×20см (по 4 щури в кожній клітині) при регульованій температурі 20±2 ̊С і вологості 60±10% в стандартних умовах віварію. Виведення щурів з експерименту відбувалося через 14 днів після останнього дня ін'єкцій МСК. Краніальна кров була зібрана, виділяли еритроцити і використовували їх для біохімічних досліджень. Витягували головний мозок, готували 10% гомогенат головного мозку на 0,1 М трис-НСl буфер, рН 7,4, який (після центрифугування і відбору супернатанта) використовували для біохімічних досліджень [16].

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.

2. Отримання стовбурових клітин

Первинна культура мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) була отримана з кісткового мозку стегнової кістки. Суспензії промивали сольовим розчином Хенкса, центрифугували при 450 g протягом 10 хв і розміщували в колби для культивування ємністю 75 см2 при щільності 4х105 клітин/см2 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-антимікотика (Antibiotic Antimycotic Solution) (SIGMA-ALDRICH, A5955). Середу з неадгезірованними клітинами відкидали через 24 години культивування, а свіжу середу додавали до адгезірованних фібробластоподібних МСК. Їх культивували при 37ºC і 5% CO2 на повітрі в CO2-інкубаторі протягом 14 днів, середу міняли кожні 3 дні [17]. Всі реактиви були придбані в SIGMA-ALDRICH (США).

3. Вміст 2,3-дифосфогліцерату (мкмоль/л) визначали за різницею концентрації фосфору в фільтраті безбілкового гемолізату еритроцитів спектрофотометричним методом [18].

4. Вміст ацетилхоліну (мкг/г) і АТФ (мкмоль/г) в гомогенатах головного мозку визначали спектрофотометричним методами [19, 20].

5. Виділення мітохондрій з головного мозку проводили методом диференціального центрифугування [21]. Екстракцію мітохондріальних ліпідів проводили за методом Bligh E. [22]. Поділ ліпідів на фракції проводили методом тонкошарової хроматографії на cілікогелевих 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) [20]. Ліпіди виявляли в парах йоду, ідентифікували шляхом порівняння зі стандартом. Зміст кардіоліпіну (нмоль/мг білка) визначали за методом Bartlett G. [23].

6. Статистичний аналіз.

Оцінка нормальності розподілу вибірки проводилася за допомогою тесту Шапіро-Уілкі. За його результатами були використані непараметричні тести для порівняння незалежних груп змінних. Для оцінки відмінностей між п'ятьма незалежними групами в дослідженні був обраний односторонній дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса. За ним послідував тест множинних порівнянь Данна. 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).

**Результати досліджень та їх обговорення.**

Для оцінки ступеня гіпоксії, викликаної введенням нітриту натрію і скополаміном, був використаний такий біохімічний показник, як вміст 2,3- дифосфогліцерату (2,3-ДФГ) - фізіологічного ліганду гемоглобіну, який сприяє звільненню кисню з гемоглобіну поблизу тканин, які страждають від дефіциту кисню. Вивчення вмісту 2,3-ДФГ в еритроцитах експериментальних тварин показало, що введення нітриту натрію (в гр. Н-14 і Н-28) супроводжувалося достовірним збільшенням його рівня в еритроцитах щурів гр. Н-28 практично в 3 рази, а в гр. Н-14 - в 2,8 рази в порівнянні з таким у контрольній групі (табл.1).

При введенні скополаміну у щурів гр. СК-14 вміст 2,3-ДФГ в еритроцитах, в порівнянні з контролем, істотно не змінився, в той час як в гр. СК-28 рівень 2,3-ДФГ достовірно підвищувався, однак в меншій мірі, ніж після введення нітриту натрію в ті ж терміни (табл.2).

Таблиця 1

Біохімічні показники енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну у щурів з нітрит-індукованою деменцією альцгеймерівського типу

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Біохімічні показники | Група К (контроль), n=16 | Група Н-14 (1), n=8 | Група НС-14(2), n=8 | Група Н-28 (3), n=8 | Група НС-28 (4), n=8 |
| 2,3- дифосфогліцерат, мкмоль/мл | 3,004±0,064 | 9,055±0,159 р<0,05 vs гр. Кр >0,05 vs гр. 2, 3 | 3,983±0,136р<0,05 vs гр. 3р >0,05 vs гр. К, 1, 4 | 9,846±0,175р<0,05 vs гр. К, 2р >0,05 vs гр. 1, 4 | 5,838±0,161р<0,05 vs гр. Кр >0,05 vs гр. 1, 2, 3 |
| Ацетилхолін,мкг/г  | 2,535±0,366 | 2,167±0,154р<0,05 vs гр. 2, 4р >0,05 vs гр. К, 3 | 3,18±0,11р<0,05 vs гр. К, 1, 3р >0,05 vs гр. 4 | 2,301±0,072р<0,05 vs гр. 2р >0,05 vs гр. К, 1, 4 | 3,083±0,09р<0,05 vs гр. 1,р >0,05 vs гр. К, 2, 3 |
| АТФ, мкмоль/г тканини | 2,826±0,022 | 2,3±0,014р<0,05 vs гр. К, 4р >0,05 vs гр. 2, 3 | 2,581±0,019р<0,05 vs гр. 3р >0,05 vs гр. К, 1, 4 | 2,029±0,044р<0,05 vs гр. К, 2, 4р >0,05 vs гр. 1 | 2,703±0,019р<0,05 vs гр. 1, 3р >0,05 vs гр. К, 2 |
| Кардіоліпін нмоль/мг білка (митохондрій) | 51,94±0,13 | 26,66±0,22р<0,05 vs гр. К, 2р >0,05 vs гр. 3, 4 | 40,4±0,6р<0,05 vs гр. 1, 3р >0,05 vs гр. К, 4 | 21,84±0,22р<0,05 vs гр. К, 2, 4р >0,05 vs гр. 1 | 39,1±0,18 р<0,05 vs гр. 3р >0,05 vs гр. К, 1, 2 |

Середнє значення ± довірчий інтервал (Mean ± Confidence Interval). P< 0.05 – різниця між даними значуща (тест Краскела – Уолліса та тест множинних порівнянь Данна).

Таблиця 2

Біохімічні показники енергетичного обміну, ступеня гіпоксії, вмісту ацетилхоліну у щурів зі скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Біохімічні показники | Група К (контроль), n=16 | Група СК-14 (1), n=8 | Група СКС-14 (2), n=8 | Група СК-28 (3), n=8 | Група СКС-28 (4), n=8 |
| 2,3- дифосфогліцерат, мкмоль/мл | 3,004±0,064 | 3,498±0,081 р >0,05 vs гр. К, 2, 3, 4 | 3,045±0,081р<0,05 vs гр. 3, 4р >0,05 vs гр. К, 1 | 6,103±0,181р<0,05 vs гр. К, 2р >0,05 vs гр. 1, 4 | 3,938±0,091р<0,05 vs гр. К, 2р >0,05 vs гр. 1, 3 |
| Ацетилхолін,мкг/г  | 2,535±0,366 | 2,483±0,09р<0,05 vs гр. 2,3р >0,05 vs гр. К, 4 | 3,074±0,094р<0,05 vs гр. 1,3р >0,05 vs гр. К, 4 | 1,212±0,198р<0,05 vs гр. К, 1,2,4.  | 2,491±0,067р<0,05 vs гр. 3р >0,05 vs гр. К, 1,4 |
| АТФ, мкмоль/г тканини | 2,826±0,022 | 2,192±0,012р<0,05 vs гр. Кр >0,05 vs гр. 2, 3, 4 | 2,284±0,016р<0,05 vs гр. 3р >0,05 vs гр. К, 1, 4 | 1,923±0,017р<0,05 vs гр. К, 2р >0,05 vs гр. 1, 4 | 2,237±0,029р<0,05 vs гр. Кр >0,05 vs гр. 1, 2, 3 |
| Кардіоліпін нмоль/мг білка (митохондрій) | 51,94±0,13 | 29,17±0,22р<0,05 vs гр. Кр >0,05 vs гр. 2, 3, 4 | 29,86±0,19р<0,05 vs гр. Кр >0,05 vs гр. 1, 3, 4 | 27±0,16р<0,05 vs гр. К, 4р >0,05 vs гр. 1, 2 | 39,02±0,19р<0,05 vs гр.3р >0,05 vs гр. К, 1, 2 |

Середнє значення ± довірчий інтервал (Mean ± Confidence Interval). p< 0.05 – різниця між даними значуща (тест Краскела – Уолліса та тест множинних порівнянь Данна).

Аналіз вмісту 2,3-ДФГ в еритроцитах експериментальних тварин показав, що після введення МСК його концентрація в еритроцитах щурів в гр. НС-14, СКС-14, СКС-28 зменшувалася і практично досягала рівня відповідних показників гр. К, в той же час в гр. НС-28 рівень 2,3-ДФГ знижувався, в порівнянні з гр. Н-28, проте залишався достовірно вище такого в гр. К в 1,9 рази.

Так, в умовах гіпоксії в клітинах і тканинах відбувається нізкоенергетичний зсув в аденіловій системі, тобто знижується інтенсивність енергетичного обміну. Інтегральним показником рівня енергетичного обміну в тканинах є зміст АТФ. Проведені нами дослідження показали, що у тварин з нітрит-індукованою деменцією рівень АТФ в тканині 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. К. Як видно з отриманих нами даних, введення МСК щурам з гіпоксією, викликаною введенням нітриту натрію, сприяло підвищенню концентрації АТФ в гр. НС-28 - практично до рівня гр. К, в той же час в гр. НС-14 - динаміка концентрації АТФ була виражена в меншій мірі.

У щурів зі скополаміновою моделлю рівень АТФ був достовірно нижче, в порівнянні з гр. К, в обох групах, таким чином: в гр. СК -28 - в 1,5 рази, а в гр.СК-14 - в 1,3 рази. Введення МСК щурам зі скополаміновою моделлю практично не дало очікуваних результатів: у щурів гр. СКС-14 і СКС-28 концентрація АТФ нижче, ніж у щурів контрольної групи.

Також 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 кардиоліпін - фосфоліпід внутрішньої мембрани мітохондрій. Вивчення концентрації кардіоліпіну в мітохондріях головного мозку експериментальних щурів показало, що в порівнянні з гр. К, зниження його рівня спостерігалося у всіх групах без ін'єкцій МСК (в найбільшій мірі у щурів гр.Н-28 - в 2,3 рази). Слід зазначити, що у щурів з нітритною моделлю ступінь зниження концентрації кардіоліпіну в мембранах мітохондрій більш виражена, ніж у щурів зі скополаміновою моделлю. Стовбурові клітини достовірно - в 1,5 і 1,8 разів (відповідно) підвищили рівень кардіоліпіну в гр. НС-14 і НС-28, в порівнянні з таким гр. Н-14 і Н-28. У гр. СКС-14 рівень кардіоліпіну такий же, як і в гр. СК-14, а в гр. СКС-28 - достовірно вище (в 1,4 рази), в порівнянні з гр. СК-28.

Відомо, що на тлі низькоенергетичних зсувів в аденіловій системі може знижуватися синтез і транспорт ацетилхоліну. Аналіз змісту ацетилхоліну в головному мозку щурів після введення нітриту натрію показав деяке зниження рівня ацетилхоліну в гр. Н-14 і Н-28, у порівнянні з таким гр. К. Введення стовбурових клітин призводило до збільшення концентрації ацетилхоліну в головному мозку щурів з нітритною моделлю, при чому в гр. НС-14 його рівень став достовірно вище такого в гр. К.

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

Відомо, що ключову роль в прогресуванні хвороби Альцгеймера грає відкладення β-амілоїду в тканині і судинах головного мозку в результаті патологічного розщеплення АРР-білка β-секретазою. Багато авторів вважають, що тригером цього патологічного процесу є гіпоксія, викликана судинною дисфункцією [24].

Незважаючи на численні дослідження, присвячені вивченню патогенезу ХА, роль судинних змін сьогодні мало вивчена.

У нашій роботі було використано дві експериментальні моделі деменції альцгеймерівського типу, які мають два різноспрямованих шляхи активації утворення амілоїду. Так, в нітрит-індукованій моделі деменції при взаємодії нітриту натрію і гемоглобіну утворюється метгемоглобін і розвивається гемічна гіпоксія. У той же час, в наших дослідженнях було показано формування дисфункції ендотелію, що супроводжується відкладенням амілоїду субендотеліально і загибеллю судин мікроциркуляторного русла [14, 25]. В результаті знижується надходження кисню в головний мозок щурів, тобто розвивається ішемія судинного генезу, що обумовлює енергодефіцит і нейрональну дисфункцію. Аналогічні процеси в кінцевому підсумку, мають місце і в скополамін-індукованій моделі деменції. Однак, в цьому випадку основою розвитку когнітивних порушень є штучно викликаний холінодефіціт, що зменшує синаптичну передачу і сприяє відкладенню амілоїду в тканині і в судинах головного мозку, що доведено в зарубіжних і наших роботах [26, 27]. Звідси випливає питання, чи можуть ці два різноспрямовані патологічні процеси нейродегенерації мати загальні ланки патогенезу?

У нашому експерименті було показано, що тканина головного мозку щурів з нітрит-індукованою експериментальною деменцією підпадала під вплив гіпоксії, про що свідчило достовірне збільшення рівня 2,3-ДФГ. Крім того, між тривалістю курсу введення нітриту натрію і ступенем вираженості гіпоксії була пряма залежність. Схоже гіпоксичне пошкодження, виходячи з рівня 2,3-ДФГ, так само відчував мозок щурів і при тривалому холінодефіціті (скополамін-індукована деменція (гр. СК-28)).

Достовірне зниження рівня ацетилхоліну в тканині головного мозку підтверджує факт наявності холінодефіціту у щурів гр. СК-28, що не виявляється в нітритній моделі та у щурів гр. СК-14. 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 неамілоідогенного розпаду білка АРР [28]. З іншого боку, утворення амілоїду сприяє зниженню синтезу ацетилхоліну з холіну та ацетил-коензиму А, що поставляється мітохондріями [29, 30]. З цього випливає, що при дефіциті ацетилхоліну функція мітохондрій порушується і в нашій роботі підтверджується зниженням синтезу АТФ в тканині головного мозку у щурів після 14 і 28-денного введення скополаміну. Дані результати корелюють з нашими минулими результатами, де у щурів зі скополамін-індукованою експериментальною деменцією розвивався локальний гіпотиреоідизм і зниження синтезу АТФ, призводячи до загибелі нейронів [27]. В даному випадку порушення окисного фосфорилювання може бути пов'язано як з дефіцитом кисню в тканини головного мозку у щурів гр.СК-14, СК-28, так і зі зниженням кардіоліпіну - основного фосфоліпіда, що регулює транспорт електронів через мембрану мітохондрій, що призводить до порушення дихального ланцюга і негативно відзначається на синтезі АТФ. Пошкодження мембран мітохондрій в скополаміновій 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 [31]. Можна припустити, що блокада М-холінорецепторів скополаміном активує патологічний розщеплення АРР-білка і окислювальний стрес, тим самим порушуючи функцію мітохондрій. В результаті пошкодження мітохондрій розвивається гіпоксія мозкових структур, що супроводжується збільшенням 2,3-ДФГ (фізіологічного ліганду гемоглобіну).

На нітритній моделі, в умовах дефіциту кисню, обумовленого утворенням метгемоглобіну і судинною дисфункцією, недостатній синтез АТФ в тканині головного мозку можна легко пояснити. Згідно з результатами дослідження Suzanne M. de la Monte та ін., під дією стрептозотоцину, схожого за будовою з нітрозамінами, похідними нітриту натрію, знижується експресія рецепторів інсуліну, що тягне за собою порушення енергетичного обміну, міотохондріальну дисфункцію та активацію перекисного окислення ліпідів в тканині головного мозку [32]. Можливо й при нітритному навантаженні концентрація фосфоліпідів, в тому числі і кардіоліпіну мітохондріальних мембран мозку щурів, різко, в більшій мірі, ніж після введення скополаміну, знижується, відображаючи більш виражене пошкодження мембран мітохондрій у щурів з нітрит-індукованої деменцією.

Внутрішньовенне введення МСК супроводжується зміною рівня 2,3-ДФГ в еритроцитах у всіх експериментальних групах і відображає відновлення оксигенації. При цьому, чим більш тривалий вплив нітриту натрію на організм експериментальних тварин (28-днів), тим менш виражені процеси відновлення оксигенації, що, мабуть, пов'язано зі значним вихідним пошкодженням еритроцитів.

Введення МСК позитивно впливало на холінергичну систему, збільшуючи вміст ацетилхоліну, покращуючи нейросинаптичну передачу і мітохондріальну функцію, що відображалося і на відновленні вироблення АТФ. За нашими даними, у щурів зі скополаміновою моделлю деменції дефіцит ацетилхоліну поповнюється в більшій мірі, ніж у тварин з нітритною моделлю.

Однак пошкоджена внутрішня мембрана мітохондрій, де міститься кардіоліпин, після введення МСК все ж повністю не відновлювалася, можливо з цим і пов'язано неповне відновлення функції нейронів. Слід зазначити, що в інших експеріментальних роботах у тварин зі скополаміновою моделлю деменції введення стовбурових клітин, крім підвищення рівня ацетилхоліну, супроводжувалося і збільшенням синтезу ростових факторів, зменшенням вмісту прозапальних цитокінів, поліпшенням когнітивних функцій [33, 34].

**Висновки**.

1. У тварин з нітритною моделлю деменції гемічна гіпоксія є визначальним фактором порушення функцій мітохондрій.

2. При скополаміновій моделі гіпоксичне пошкодження тканини головного мозку є результатом активації амілоідом окислювального стресу, зниження концентрації кардіоліпіну і, як наслідок, зниження рівня окисного фосфорилювання.

3. Загальною ланкою в механізмах пошкодження мозку щурів як при нітритній, так і скополаміновій моделі деменції, є мітохондріальна дисфункція, яка розвивається внаслідок пошкодження ендотелію судин: нітритного пошкодження - при нітритній моделі і опосередкованого амілоідом і вільнорадикального - при скополаміновій моделі відповідно.

4. Корекція гіпоксії та мітохондріальної дисфункції при експериментальній деменції альцгеймерівського типу різного генезу є можливою за допомогою внутрішньовенного введення мезенхімальних стовбурових клітин, однак в нашому дослідженні повного відновлення мембран мітохондрій не спостерігалося.

**Перспективи подальших досліджень.**

Нами планується більш детальне вивчення особливостей енергетичного обміну в головному мозку щурів з експериментальною деменецією альцгеймерівського типу різного генезу за вмістом сфінголіпідів в мітохондріях та інших відповідних показників в гомогенатах головного мозку, отриманих в різні терміни експерименту (зразу після завершення ін’єкцій нітриту натрію, скополаміну та мезенхімальних стовбурових клітин, через тиждень і т.д.).

**Література.**

1. Flannery PJ, Trushina E. Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer’s disease. Mol Cell Neurosci. 2019;98:109–20.
2. Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. Front Physiol. 2015;6:109.
3. Lionetti L, Mollica MP, Donizzetti I, Gifuni G, Sica R, Pignalosa A, et al. High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. PLoS One. 2014;9(3):e92753.
4. 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. 2016;2016:8590578.
5. Cid-Castro C, Hernández-Espinosa DR, Morán J. ROS as regulators of mitochondrial dynamics in neurons. Cell Mol Neurobiol. 2018;38(5):995–1007.
6. 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. 2016;25(23):5148–66.
7. 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. 2016;6:18725.
8. 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. 2011;286(4):2918–32.
9. Cai Q, Tammineni P. Mitochondrial aspects of synaptic dysfunction in Alzheimer’s disease. J Alzheimers Dis. 2017;57(4):1087–103.
10. Lin M-Y, Sheng Z-H. Regulation of mitochondrial transport in neurons. Exp Cell Res. 2015;334(1):35–44.
11. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. Biochim Biophys Acta. 2010;1797(6–7):1171–7.
12. Ham PB, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. Prog Neurobiol. 2017;157:92–116.
13. 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. 2012;287(21):17589–97.
14. Nikolayeva OV, Pavlova OO, Lukyanova YM, Gubina-Vakulik GI, Gorbach TV. Sposib modelyuvannya dementsiyi altsgeymerivskogo typu sudynnogo pokhodzhennya u shchuriv. Patent. UA 141759, 2020. [in Ukrainian].
15. Dejko R, Shtrigol S, Laryanovskaya Y, Gorbach TV, Gubina-Vakulik G, Devyatkina N, Shtrygol D. Chronic blockade of central muscarinic receptors in rats reproduces primary pathogenetic links of Alzheimer's disease. Actual Problems of Modern Medicine. 2017;17(3):13-25. [in Ukrainian].
16. Meshkova NP SSE. Praktykum po byokhymyy. Moscow: yzdatelstvo moskovskogo unyversyteta; 1979. 430 p. [in Russian].
17. Pyatikop V, Msallam MA Jr, Shchegelskaya E, Kutovoy I, Gubina-Vakulik G. Migration features of labeled bone marrow mesenchymal stem cells in rats with modeled Parkinson-like syndrome. Ukr Neurosurg J. 2014;0(3):42–8. [in Russian].
18. Mranova YS. Opredelenye 2,3DFG y ATF v erytrotsytakh. Laboratornoe delo. 1975;7:652–654. [in Russian].
19. Trubytsyna YE, Drozdov VN, Lazebnyk LB, Lychkova AE. Sposob opredelenyya atsetylkholyna. Patent. RUS 2256920, 2003. [in Russian].
20. Prokhorova MY. Metody byokhymycheskykh yssledovanyy (lypydnyy y energetycheskyy obmen). Lenyngrad: Yzdatelstvo Lenyngradskogo unyversyteta; 1982. 272 p. [in Russian].
21. Lemeshko VV. Sokhranenye funktsyonalnoy aktyvnosty mytokhondryy pry glubokom zamorazhyvanyy. V: Mytokhondryy, Nauka. 1977; 5-11. [in Russian].
22. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959;37(8):911–7.
23. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem. 1959;234(3):466–8.
24. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Hypoxia/ischemia activate processing of Amyloid Precursor Protein: impact of vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. J Neurochem. 2017;140(4):536–49.
25. Lukyanova YM. Influence of chronic administration of sodium nitrite on morphofunctional state of brain in rats. Ukr ž med bìol ta sportu. 2019;4(6):52–9. [in Ukrainian].
26. Grette Lydon R. Cholinergic neurons and memory: An historical perspective and overview of current research. In: CNS Neurotransmitters and Neuromodulators. CRC Press; 2020. p. 197–232.
27. Gorbach TV, Nakonechna OA, Tkachenko AS, Shcholok TS, Onikova AO. Levels of thyroid hormones and indices of energy metabolism in the cerebral cortex of rats with experimental Alzheimer’s disease. Neurophysiology. 2018;50(3):159–65.
28. Beach TG, Kuo Y-M, Spiegel K, Emmerling MR, Sue LI, Kokjohn K, et al. The cholinergic deficit coincides with Aβ deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2000;59(4):308–13.
29. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer’s disease: Targeting the cholinergic system. Curr Neuropharmacol. 2016;14(1):101–15.
30. Grimaldi M, Marino SD, Florenzano F, Ciotta MT, Nori SL, Rodriquez M, et al. β-Amyloid-acetylcholine molecular interaction: new role of cholinergic mediators in anti-Alzheimer therapy? Future Med Chem. 2016;8(11):1179–89.
31. 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. 2019;14(2):278–94.
32. de la Monte SM, Tong M. Mechanisms of nitrosamine-mediated neurodegeneration: potential relevance to sporadic Alzheimer’s disease. J Alzheimers Dis. 2009;17(4):817–25.
33. Safar MM, Arab HH, Rizk SM, El-Maraghy SA. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells protect against scopolamine-induced Alzheimer-like pathological aberrations. Mol Neurobiol. 2016;53(3):1403–18.
34. 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. 2020;9(1):20.

**Резюме.**

**РОЛЬ ГІПОКСІЇ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ В МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ДЕМЕНЦІЇ АЛЬЦГЕЙМЕРІВСЬКОГО ТИПУ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ У ЩУРІВ, ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ КОРЕКЦІЇ ДАНОГО СТАНУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ**

**Зоренко Є.М., Павлова О.О., Горбач Т.В., Мартинова С.М.**

**Актуальність**. Відомо, що порушення синаптичної передачі імпульсів лежить в основі багатьох нейродегенеративних захворювань, в том числі при хворобі Альцгеймера. Доказано, що ключову роль в синаптичній дисфункції відіграють не тільки амілоїдні бляшки, але й гіпоксія та порушення функції мітохондрій. Водночас, яку роль в механізмах виникнення деменції альцгеймерівського типу різного походження відіграють ці фактори - мало відомо. **Мета дослідження**: визначення ролі гіпоксії та мітохондріальної дисфункції в механізмах розвитку деменції альцгеймерівського типу різного генезу у щурів, а також можливості корекції даного стану мезенхімальними стовбуровими клітинами. **Матеріали та методи**. 32 щура-самця популяції WAG масою 180-250 гр (n=8 в кожній групі) впродовж 14 та 28 днів отримували внутрішньочеревні ін’єкції водного розчину нітриту натрію в дозі 50 мг/кг (групи Н-14, Н-28 зі нітрит-індукованою деменцією) та розчин скополаміна бутилброміду в дозі 1 мг/кг (групи СК-14, СК-28 зі скополамін-індукованою деменцією). Інші 32-щура-самця груп НС-14, НС-28, СКС-14, СКС-28 отримували внутрішньовенно мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) після закінчення ін’єкцій нітриту натрію та скополаміну. Щури групи контролю (гр. К, n=16) отримували ін’єкції фізіологічного розчину за тією ж схемою. З експерименту щурів виводили через 14 днів після останньої ін’єкції мезенхімальних стовбурових клітин. Концентрацію 2,3-дифосфогліцерату в еритроцитах крові (2,3-ДФГ, мкмоль/л), ацетилхоліну (АХ, мкг/г) й АТФ (мкмоль/г) – в гомогенатах головного мозку (ГМ), кардіоліпіну (нмоль/мг білка) – в мітохондріях ГМ визначали cпектрофотометрично. **Результати.** Рівень 2,3-ДФГ (нітритна модель) дозозалежно був збільшеним у щурів гр.Н-14, Н-28, в той час як у щурів зі скополамін-індукованою деменцією збільшення цього показника вдвічі спостерігалось тільки в гр. СК-28 в порівнянні з гр. К, але було менш виразним, ніж в гр. Н-28. Концентрація АТФ та кардіоліпіну в усіх експериментальних групах була зниженою в порівнянні з гр.К, проте слід відзначити, що в гр. Н-14, Н-28 вміст кардіоліпіну в мітохондріях був значно нижче, ніж в гр.СК-14, СК-28. Рівень АХ в гр. Н-14, Н-28, СК-14 майже не змінювався, в той час як в гр. СК-28 був зниженим максимально в порівнянні з таким в гр. К. Введення МСК сприяло поліпшенню енергетичного обміну, зниженню рівня гіпоксії, нормалізації рівня АХ, але рівень кардіоліпіну не відновлювався до контрольного рівня. **Висновки.** Загальним фактором патогенезу в умовах обох досліджуваних моделей була мітохондріальна дисфункція. Початковим фактором порушення функцій мітохондрій в нітритній моделі була гемічна гіпоксія та ендотеліальна дисфункція, а в скополаміновій – дефіцит ацетилхоліну з подальшим відкладенням амілоїду в тканині та судинах. Корекція деменції альцгеймерівського типу різного генезу можлива за допомогою мезенхімальних стовбурових клітин, внутрішньовенне введення яких загалом сприяло поліпшенню функцій митохондрій, але без повного їх відновлення.

**Ключові слова**: деменція, гіпоксія, мітохондрії, стовбурові клітини, щури.

**Abstract.**

**ROLE OF HYPOXIA AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN THE MECHANISM OF THE EXPERIMENTAL ALZHEIMER'S TYPE DEMENTIA INDUCED BY DIFFERENT WAYS IN RATS AND ASSESSMENT OF POSSIBILITIES TO CORRECT THIS CONDITION BY USING MESENCHYMAL STEM CELLS**

**Zorenko Y.M., Pavlova O.O., Gorbach T.V., Martynova S.M.**

**Introduction**. It is known that the synaptic dysfunction a key to many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease. It has been shown that not only amyloid plaques but also hypoxia and mitochondrial dysfunction are crucial for the synaptic dysfunction. At the same time, it is poorly known the role of these factors in the mechanisms of Alzheimer's type dementia of various origins. **The aim of the study**: to determinate the role of hypoxia and mitochondrial dysfunction in the mechanisms of the experimental Alzheimer's type dementia development induced by different ways in rats, as well as the possibility of correction of this condition by mesenchymal stem cells. **Materials and methods**. 32 male WAG rats weighing 180-250 g (n = 8 in each group) for 14 and 28 days received intraperitoneal injections of an aqueous solution of sodium nitrite at a dose of 50 mg/kg (gr. N-14, N-28 with nitrite-induced dementia) and a solution of scopolamine butylbromide at a dose of 1 m/ kg (gr. SC-14, SC-28 with scopolamine-induced dementia). Other 32 male rats of gr. NS-14, NS-28, SCS-14, SCS-28 were intravenously administered with mesenchymal stem cells (MSCs) after injections of sodium nitrite and scopolamine. Control rats (gr. C, n = 16) received sodium chloride injections according to the same experimental design. Rats were sacrificed 14 days after the last injection of MSCs. The concentration of 2,3-diphosphoglycerate in blood erythrocytes (2,3-DFG, μmol/l), acetylcholine (AСh, μg/g) and ATP (μmol/g) - in brain homogenates, cardiolipin (nmol/mg protein) – in mitochondria of brain tissue were determined by using spectrophotometer. **Results.** The level of 2,3-DFG (nitrite model) was dose-dependently increased in rats gr. N-14, N-28. In rats with scopolamine-induced dementia, an increase in this indicator was observed only twice in gr. SC-28 in comparison with gr. C, but was less pronounced than in gr. N-28. The ATP and cardiolipin concentration in all experimental groups was reduced compared to gr. C. It should be noted that in gr. N-14, N-28 the cardiolipin content in mitochondria was significantly lower than in gr. SC-14, SC-28. The ACh level in gr. N-14, N-28, SC-14 almost did not change, while in gr. SC-28 was reduced as much as possible compared to that in gr. C. The introduction of MSCs improved energy metabolism, reduced hypoxia, normalized the ACh level, but the cardiolipin content was not restored to the control level. **Conclusions**. A common factor in the pathogenesis of both studied models was mitochondrial dysfunction. The initial factor of mitochondrial dysfunction in the nitrite model was hemic hypoxia and endothelial dysfunction, and in scopolamine - acetylcholine deficiency with subsequent amyloid deposition in brain tissue and blood vessels. Correction of Alzheimer's type dementia of various genesis is possible with the mesenchymal stem cells introduction. Intravenous administration of MSCs improved mitochondrial function, but without their full recovery.

**Key words**: dementia, hypoxia, mitochondria, stem cells, rats.

Відповідальний автор: Зоренко Євгенія Михайлівна, аспірант кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна ХНМУ, zeekmail@ukr.net, +380675723294