

Г.І. Губіна-Вакулік
Є.М. Зоренко

Харківський національний
медичний університет,
Харків, Україна



Надійшла: 14.08.2021

Прийнята: 11.09.2021

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.3.66-75>

УДК 616.894-053.9-092.9:547.944.3

РОЛЬ СУДИННОГО ПОШКОДЖЕННЯ В УМОВАХ ХОЛІНОДЕФІЦІТУ У ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ СКОПОЛАМІН- ІНДУКОВАНОЇ ДЕМЕНЦІЇ АЛЬЦГЕЙ- МЕРІВСЬКОГО ТИПУ

Gubina-Vakulik G.I. , Zorenko Y.M.  ✉ The role of vascular injury within the conditions of choline deficiency in rats with scopolamine-induced alzheimer's type dementia.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The relationship between choline deficiency and vascular dysfunction continues to be relevant in the study of Alzheimer's disease. **Objective.** To study the morphological characteristics of vascular injury within the conditions of choline deficiency in rats with scopolamine-induced Alzheimer's type dementia. **Methods.** The experiment was performed on 48 WAG population male rats weighing 180-230 gr. Rats from groups Scop-14, Scop-14-SC, Scop-28, Scop-28-SC were injected intraperitoneally with scopolamine (Scop) butylbromide at a dosage of 1 mg/kg of body mass during 14 and 28 days and intravenously with mesenchymal stem cells (SC) at a single dosage of 500000 cells per 1 rat. Control animals (gr.C) were injected with 0.9% sodium chloride. Brain slides were stained with Congo-red and galloyanine-chromium alum according to Einarson's method for total nucleic acids. The VEGF, E-cadherin expression was immunohistochemically determined in the brain cells cytoplasm. **Results.** The congophilic staining of the arteries walls, a decrease in endothelial cells with low the E-cadherin expression and an increase in the number of pericytes in the capillary wall was observed in the experimental groups. In gr.Scop-28 VEGF expression in endothelial cells, hippocampal neurons was greater than in gr.Scop-14. It indicated more intensive activation of angiogenesis and acetylcholine synthesis with correspondingly more pronounced vascular damage and choline deficiency. The cytoplasm of cortical neurons was diffusely labeled with VEGF antibodies in response to hypoxia, but the level of expression was almost no different from that in gr.C. In all groups, the optical density of the neuropile of the large hemispheres according to Einarson's staining was reduced, i.e., the level of RNA in the neuronal processes was reduced. The introduction of stem cells restored the capillary wall due to young endothelial cells, reduced the VEGF synthesis in all studied cells and increased the RNA content in neuronal processes. **Conclusion.** The relationship between choline deficiency, neuronal process loss and vascular damage has been found. The blood vessels self-repair was occurred by substitution, after the stem cells introduction - by restitution.

Key words: Alzheimer's disease, blood vessels, brain, scopolamine butylbromide, rats.

Citation:

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>

 Gubina-Vakulik G.I. 0000-0003-3816-8530

 Zorenko Y.M. 0000-0001-9354-9438

✉ zeekmail@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

В даний час отримує все більше визнання точка зору про значний внесок цереброваскулярної дисфункції в розвиток хвороби Альцгеймера (ХА). Так, в дослідженні Vercllytte S. та співавторів [1], було виявлено зниження церебрального кровообігу в корі лобових і тім'яних часток головного мозку пацієнтів з ранніми стадіями ХА. Виявлено, що гіперперфузія та ішемічне ураження головного мозку (ГМ) супроводжувалися акти-

вацією ферментів, які беруть участь в розщепленні білка-попередника амілоїду АРР, підвищуючи тим самим накопичення бета-амілоїду як в стінці судин (розвиток церебральної амілоїдної ангіопатії (ЦАА), так і в тканині головного мозку [2]. Так само існує гіпотеза, що розвитку ЦАА сприяє порушення виведення бета-амілоїду з мозку: або шляхом захоплення мікроглією, астроцитами та трансцитозу через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) [3], або через періар-

теріальний інтрамуральний і лімфатичний дренаж [4]. Припускають, що даний дренаж працює завдяки локальним скороченням і розслабленням артерій ГМ, тобто завдяки судинній реактивності [5]. Відомо, що регуляція церебрального кровотоку здійснюється за допомогою гладком'язових клітин артерій, іннервованих холінергічними нейронами [6]. Свій початок холінергічна система бере в базальних відділах переднього мозку й в смугастому тілі [7]. Було показано, 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 холінергічної денервації судин, дезактивації eNOS збільшується ендогенна ЦАА [8, 9].

Взаємозв'язок між втратою холінергічних нейронів, дефіцитом ацетилхоліну та судинною дисфункцією залишається актуальним питанням при вивченні факторів прогресування хвороби Альцгеймера.

В експериментальному моделюванні деменції альцгеймерівського типу, де тривале (протягом 27 днів) блокування М-холінорецепторів скополаміном призводило до когнітивного дефіциту, була підтверджена провідна роль холінодефіциту в етіології цього захворювання [10].

Для вивчення внеску судинного фактора в розвиток ХА в умовах холінодефіциту в основу експерименту була взята ця модель. Однак, використаний нами скополамін (гіосцін) бутилбромід 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 [11]. Також в попередній нашій роботі було показано, що скополамін бутилбромід викликає достовірне зниження вмісту ацетилхоліну в гомогенатах ГМ після 28-денного введення цього препарату, в

порівнянні з групою контролю. Після 14 днів ін'єкцій скополаміну рівень ацетилхоліну в гомогенатах ГМ залишався практично таким же, як і у контрольних тварин [12].

Мета

Вивчення морфологічних ознак судинного ураження в умовах холінодефіциту у щурів зі скополамін-індукованою деменцією альцгеймерівського типу.

Матеріали та методи

1. Тварини та групи

В експерименті брали участь 56 щурів-самців популяції WAG масою 180-230г, яких розподілили на 5 груп. Тварини групи Scop-14 (scopolamine butylbromide 14 days, n = 8) і групи Scop-28 (scopolamine butylbromide 28 days, n = 8) отримували внутрішньочеревні ін'єкції водного розчину скополаміну бутилброміду в дозі 1 мг/кг протягом 14 днів і 28 днів відповідно. Тварини групи Scop-14-SC (scopolamine butylbromide 14 days + stem cells, n = 8) і групи Scop-28-SC (scopolamine butylbromide 28 days + stem cells, n = 8) після курсу ін'єкцій скополаміну бутилброміду у відповідні терміни отримували одноразові внутрішньовенні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин (MSC) в дозі 500 тис. клітин на кожного щура (рис. 1). Тварини групи контролю (C (control group), n = 16) отримували ін'єкції 0,9% розчину натрію хлориду в ті ж терміни і тим же шляхом. 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. Виведення щурів з експерименту відбувалося через 14 днів після останнього дня ін'єкцій, щоб оцінити одночасно ступінь пошкодження і регенераторні можливості судин і нейронів ГМ у щурів. Цей період умовно нами названий «періодом регенерації», оскільки регенерація почалась після першого дня пошкодження 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.

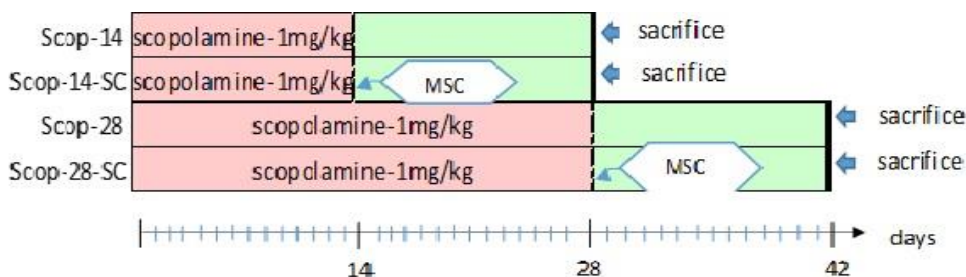


Рис. 1. Дизайн експерименту. Групи Scop-14 - скополамін 14 днів, Scop-28 - скополамін 28 днів, Scop-14-SC- скополамін 14 днів + стовбурові клітини (SC), Scop-28-SC- скополамін 28 днів + стовбурові клітини. MSC - мезенхімальні стовбурові клітини.

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 (MSC) була отримана з 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 см² при щільності 4x10⁵ 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 неадгезивними клітинами відкидали через 24 години культивування, а свіжу середу додавали до адгезованих фібробластоподібних MSC. Їх культивували при 37°C і 5% CO² на повітрі в CO²-інкубаторі протягом 14 днів, середу міняли кожні 3 дні [13]. Всі реактиви були придбані в SIGMA-ALDRICH (США).

3. Виготовлення гістологічних і гістохімічних препаратів, а також імуногістохімічне (ІГХ) визначення експресії ендотеліального фактора росту судин (VEGF) і кадгеріну (Е-кадгерин).

ГМ відразу після декапітації тварин фіксували в 10% нейтральному формаліні з подальшим виготовленням мікропрепаратів з використанням забарвлення галоціанін-хромовими галуном за методом Ейнарсона для оцінки стану ДНК і РНК різних клітин і конго-червоним для визначення конгофільних амілоїдних мас. Для оцінки морфологічного стану відростків нервових клітин порахували оптичну щільність нейропіля при фарбуванні мікропрепаратів за Ейнарсонем (вміст РНК). Для імуногістохімічного 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 (pH = 6) при температурі 95-98 °С. Для виявлення реакції взаємодії антиген-антитіло VEGF і Е-кадгерину використовували систему детекції «Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» (Thermo scientific, США) [14]. Дослідження гістологічних та ІГХ препаратів ГМ проводили на бінокулярному мікроскопі Axiostar plus з цифровою фотокамерою ProgRes C10Plus (Zeiss, ФРН). Вивчали експресію антигену VEGF в нейронах кори тім'яної частки, зони CA1 гіпокампу, в ендотеліоцитах судин мікроциркуляторного русла (МЦР) і в плазмі венозної крові. Наявність Е-кадгерин експресії визначали в епендимі шлуночків, епітелії судинних сплетінь, ендотеліоцитах капілярів і артерій. Рахували середні значення рівнів оптичної щільності [15], що відображають експресію визначаємих антигенів, використовуючи програму растрового графічного редактора GIMP (GNU Image Manipulation Program).

4. Статистичний аналіз.

Оцінка нормальності розподілу вибірки проводилася за допомогою тесту Шапіро-Уїлкі. 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 і тест множинних порівнянь Данна. Якщо значення р 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 та їх обговорення

При фарбуванні зразків тканини ГМ щурів конго-червоним у тварин всіх основних груп звертає на себе увагу наявність різного ступеня вираженості вогнищового фарбування в червоному колір білої речовини ГМ і стінки кровоносних судин - внутрішньомозкових артерій - за типом «жорстких труб», тобто гомогенна конгофільна речовина на великому відрізку повністю заміщує середню оболонку артерій з потовщенням стінки і звуженням просвіту (рис. 2А). Крім накопичення мас амілоїду, в білій речовині зустрічаються вогнищеві, переважно макрофагальні інфільтрати, походження яких швидше пов'язано з гіпоксією, яка розвивається у тварин основних груп (рис. 2В).

Основні етапи механізму, який індукує розвиток амілоїдозу в білій речовині ГМ і в стінці артерій, при введенні тваринам високих доз скополаміну, в даний час, здебільшого, розроблені і пояснюються розвитком холінодефіциту [16]. Проте абсолютно нез'ясованим залишається питання про можливу роль морфологічного

пошкодження ендотелію в початкових етапах механізму розпаду нейрофіламентів в нейропілі та міофіламентів в клітинах гладеньких м'язів артерій з подальшим формуванням амілоїду. Очевидно, що гістологічне дослідження ендотелію зручніше проводити, вивчаючи зміни

капілярів, а в якості досліджуваної та порівняльної ділянки обрана біла речовина великих півкуль і гіпокампу, де при постановці скопламінової моделі амілоїдозу ГМ формується амілоїд [17].

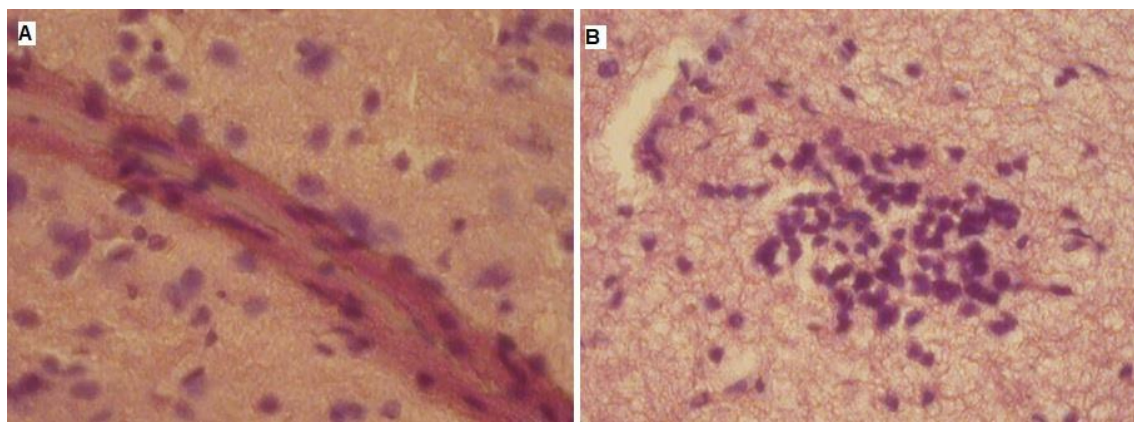


Рис. 2. Гр. Scop-14. А – конгофільна речовина в стінці внутрішньомозкові артерії. В - скупчення клітин мікроглії (макрофагів) в білій речовині кори ГМ. Забарвлення Конго-рот. $\times 400$.

У гр. С біла речовина має добре розвинену капілярну сітку, функціональні можливості ендотеліоцитів оцінені за рівнем оптичної щільності їх цитоплазми при фарбуванні за Ейнарсо-

ном (рис. 3А), а співвідношення ендотеліоцити/періцити (рис. 3В) дозволяє кількісно визначити вихідну «міцність» стінки капіляра інтактної тварини.

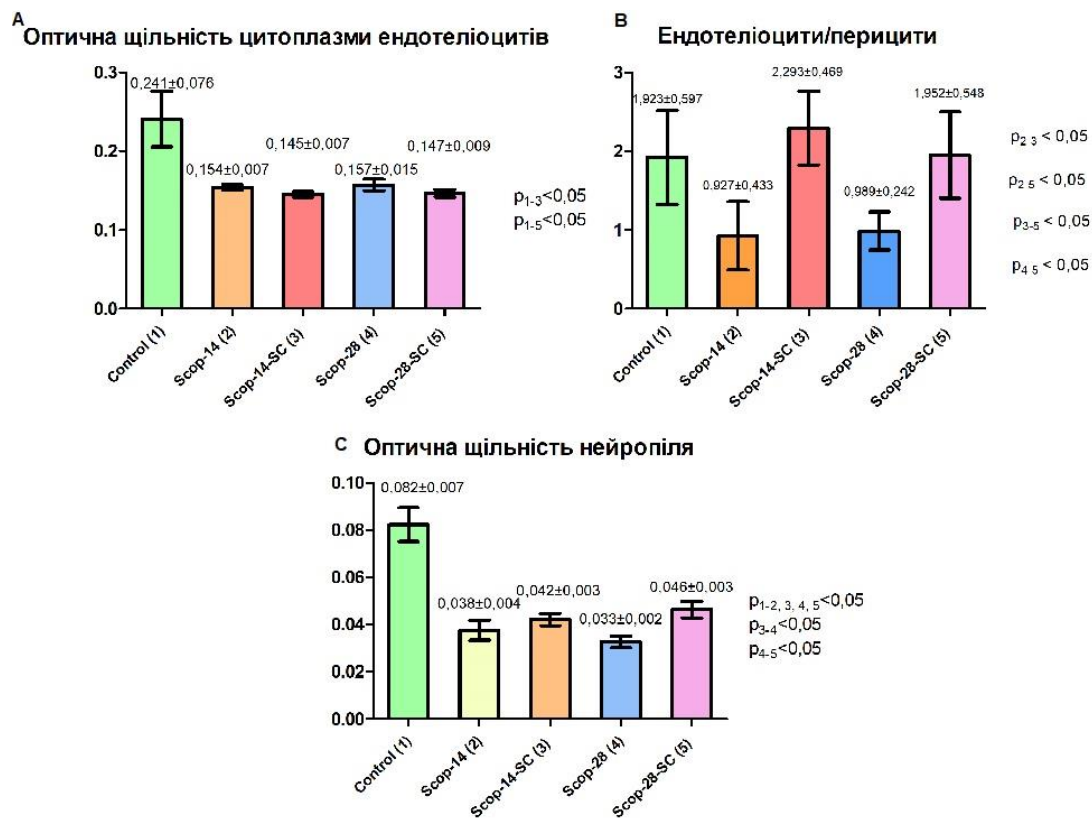


Рис. 3. Результати морфометрії зразків тканини ГМ при фарбуванні галлоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном (умов.од.опт.щільн.); А - оптична щільність цитоплазми ендотеліоцитів; В - відношення ендотеліоцити/періцити в капілярах білої речовини ГМ (прим./прим.); С - оптична щільність нейропілія.

Останній показник переконливо свідчить про те, що ендотелій в основних групах без використання MSC значно пошкоджується, а паралельна регенерація стінки капілярів йде переважно за рахунок проліферації перичитів.

MSC істотно стимулюють відновлення стінки капілярів за рахунок появи нових ендотеліоцитів, причому, в молодих, новостворених капілярах, кількість перичитів ще менше, ніж в гр. С. Крім того, видно, що відновлення стінки капілярів в гр. Scop-14-SC відбувається швидше, більш успішно, ніж в гр. Scop-28-SC, тому що пошкодження ендотелію кровоносних судин при постановці 14 ін'єкцій скополаміну було меншим, ніж при постановці 28 ін'єкцій.

Оптична щільність цитоплазми ендотеліоцитів, виміряна на мікропрепаратах, пофарбованих за Ейнарсоном, у всіх основних групах нижче, ніж в гр. С (приблизно на 37%), що свідчить про зниження вмісту РНК. Тобто підтверджується дистрофізований стан незагиблих ендотеліоцитів в гр. Scop-14 і в гр. Scop-28 і, можливо, що в молодих, незрілих ендотеліоцитах зміст РНК

ще не високий. Ще більш низький (хоча статистично недостовірний) зміст РНК в цитоплазмі ендотеліоцитів в гр. Scop-14-SC і в гр. Scop-28-SC можна пояснити ще більшою кількістю молодих, незрілих ендотеліоцитів.

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.

При постановці ІГХ реакції на VEGF кількість мічених ендотеліоцитів в гр. С становило приблизно 11% від усіх наявних ендотеліоцитів в полі зору. У гр. Scop-14 було виявлено 31% мічених ендотеліоцитів практично з таким же рівнем експресії даного маркера, як в гр. С (табл. 1), а в гр. Scop-14-SC, на наше здивування, ендотеліоцити практично не експресували VEGF. Можна припустити, що після 14-денного введення скополаміну бутилброміду і використання стовбурових клітин шар ендотелію в кровоносних судинах відновився саме завдяки MSC.

Таблиця 1

Результати визначення оптичної щільності експресуючих VEGF структур в тканині ГМ
(умов.од.опт.щільн.)

Параметри	Control 1	Scop-14 2	Scop-14-SC 3	Scop-28 4	Scop-28-SC 5
VEGF експресія в ендотеліоцитах	0,0397± 0,0062	0,0441± 0,0042	-	0,0490± 0,0154	0,0469± 0,0065
VEGF експресія в нейронах кори	0,0394± 0,0056 (3, 5)*	0,0387± 0,0067 (3, 5)*	0,0132± 0,0045 (1, 2, 4)*	0,0393± 0,0056 (3, 5)*	0,0247± 0,0050 (1, 2, 4)*
VEGF експресія в нейронах гіпокампу	0,0355 ±0,0050 (2, 3, 5)*	0,0099± 0,0041 (1)*	0,0020± 0,0061 (4, 5)*	0,0241± 0,0075 (3)*	0,0177± 0,0030 (1, 3)*
VEGF експресія в плазмі венул	0,0249± 0,0074 (2)*	0,0062± 0,0029 (1, 4)*	0,0133± 0,0064	0,0118± 0,0019 (2)*	0,0122± 0,0033

Примітка: значення представлені у вигляді середнього значення ± довірчий інтервал для середнього. * (p < 0,05) - значуща різниця між результатами різних груп (односторонній дисперсійний аналіз Краскела - Уолліса і тест множинних порівнянь Данна).

Поряд з цим, після 28-денного введення скополаміну на тлі зниження загальної кількості мічених ендотеліоцитів (14% в полі зору) в порівнянні з гр. Scop-14, спостерігається незначне підвищення експресії VEGF. Це свідчить про компенсаторну стимуляцію ангіогенезу непошкоджених ендотеліальних клітин, які залишилися, у відповідь на більш значне пошкодження ендотелію у шурів гр. Scop-28. Стовбурові клітини в гр. Scop-28-SC також відновлюють шар ендотелію кровоносних судин і, можливо, активують утворення нових капілярів за рахунок збільшення кількості експресуючих VEGF ендотеліоцитів (44% в полі зору) (рис. 4). Можна

припустити, що відбувається поділ мезенхімальних стовбурових клітин і, потім, диференціювання в «молоді» ендотеліоцити кровоносних судин, в тому числі, в тканині ГМ.

Наші результати та припущення збігаються з даними роботи, де MSC 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 [18].

Цікавим є той факт, що при холінодефіциті, тобто у всіх основних групах, нейрони кори і зони CA1 гіпокампу дифузно фарбуються

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.

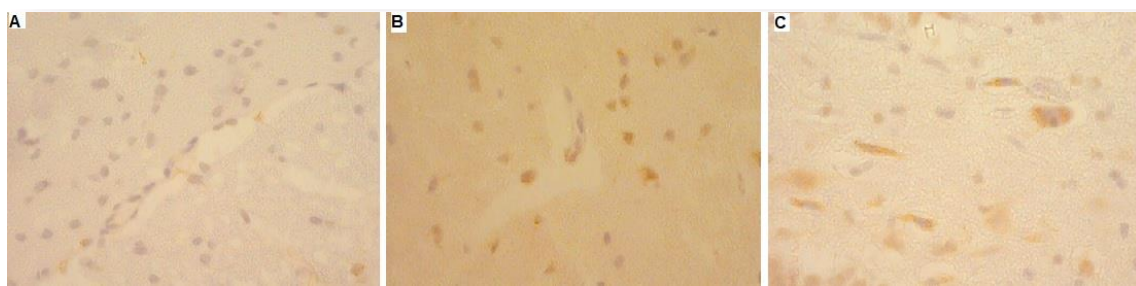


Рис. 4. Експресія VEGF в ендотеліоцитах капілярів в гр.С (А), гр. Scp-28 (В), гр. Scp-28-SC (С). ×400.

Гіперпродукція VEGF - це компенсаторна реакція в нейронах кори та гіпокампу, яка розкриває не тільки ангіогенний ефект VEGF нейронів, а й, за даними інших авторів [19], холінергічний. Було показано, що судинний фактор росту підтримує експресію холінацетильтрансферази, що бере участь в синтезі ацетил-

холіну, тим самим активуючи заповнення його дефіциту в головному мозку.

В нейронах гіпокампу в гр. Scp-14 і в гр. Scp-28 оптична щільність міченої VEGF цитоплазми, в порівнянні з гр. С, менше в 3,6 і 1,5 рази відповідно (рис. 5).

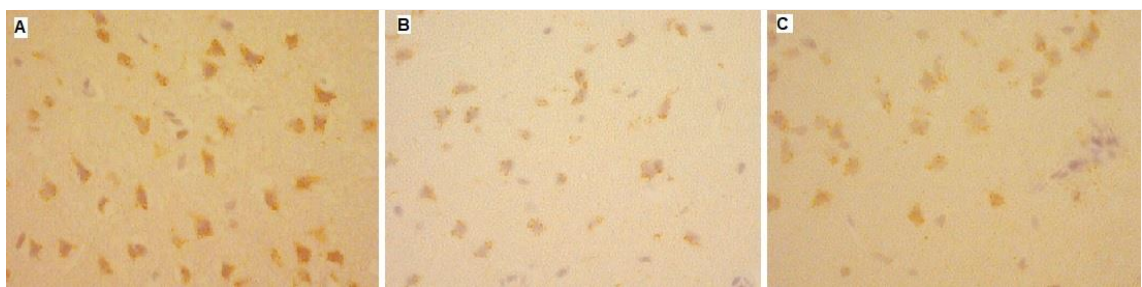


Рис. 5. Експресія VEGF в нейронах кори в гр.С (А), гр. Scp-14 (В), гр. Scp-14-SC (С). ×400.

В нейронах кори рівень експресії судинного фактора практично не відрізняється від такого в гр. С. Як в мічених нейронах кори, так і в нейронах зони CA1 гіпокампу, після введення MSC оптична щільність їх цитоплазми знижена, тобто мало місце більш успішне відновлення капілярної мережі в тканині ГМ, що зменшує ступінь гіпоксії нейронів і знижує необхідність посилення проліферації ендотеліоцитів. Крім того, ймовірно, в нейронах кори ступінь холінодефіциту менше, ніж в нейронах гіпокампу, тому що ацетилхолін також стимулює синтез VEGF [20]. Така гіпофункція нейронів гіпокампу пояснюється тим, що ця область складається з М- і Н-холінорецепторів і щільно інервується холінергічними нейронами, тому біла речовина гіпокампу руйнується при ХА з формуванням амілоїдних бляшок, а тіла нейронів знаходяться в стані глибокої дистрофії [21].

Визначення змісту 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. Scp-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 гіпокампу і ендотеліоцитах.

При постановці ІГХ на кадгерин (Е-кадгерин), було виявлено його експресія не тільки в епендимальних клітинах шлуночків і епітелії судинних сплетень, а й в ендотеліоцитах окремих дрібних артерій. З цього випливає, що клітинна адгезія між клітинами ендотелію артерій збережена. Що стосується капілярів, то тільки в гр. Scp-14 в окремих районах капілярної сітки ендотеліоцити були помічені Е-кадгерином, в інших основних групах ендотеліоцити капілярів не експресували Е-кадгерин.

Швидше за все, порушення експресії Е-кадгерину в судинах МЦР вказує на порушення цілісності ендотелію і збільшення проникності

ГЕБ, що забезпечує розвиток набряків і міграцію плазматичних білків за капілярну стінку, які беруть участь у формуванні амілоїду [22]. У роботах Ткаченко А.С. та співавторів [23], також з використанням ІГХ 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.

Зручним у застосуванні і об'єктивним показником зміненого морфофункціонального стану нервової тканини у тварин основних груп є показник оптичної щільності нейропіля при фарбуванні мікропрепаратів галлоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном.

В нейропії білої речовини великих півкуль ГМ оптична щільність різко знижена у всіх основних групах в порівнянні з групою контролю (рис. 3С): в гр. Scop-14 практично в 2 рази, а в гр. Scop-28 - в 2,5 рази, що прямо вказує на зниження вмісту РНК у відростках нервових клітин. Це відображується на зменшенні кількості відростків через холінодефіцит, його наслідки, а також гіпоксію, яка формується внаслідок розвитку ЦАА. Після введення стовбурових клітин в гр. Scop-14-SC оптична щільність нейропіля підвищується в 1,1 рази в порівнянні з гр. Scop-14, а в гр. Scop-28-SC - достовірно підвищується в 1,4 рази в порівнянні з гр. Scop-28. Іншими словами, стовбурові клітини можуть відновлювати взаємодію ацетилхоліну з М-холінорецепторами, тим самим покращуючи сигнальну пластичність між відростками нейронів. 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 фарбуванні за Ейнарсоном і клітинного складу стінки капілярів - більш виражена реституція стінки капілярів супроводжується збільшенням вмісту РНК в нейропії.

Так само цікаво відзначити, що в дослідженнях Naaldijk Y і ін. [24], 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 цьому експерименті не відзначено резорбційного впливу введення стовбурових клітин на конгофільні (амілоїдні) ділянки в білій речовині (нейропії), проте в збережених ендотеліоцитах і нейронах є ознаки їх морфофункціональної активізації, надаючи нейротрофіч-

ний і ангиогенний регенераторний ефект.

Необхідно також торкнутися питання розвитку холінодефіциту у тварин при постановці скополамінової моделі амілоїдозу ГМ, оскільки, відповідно до інструкції застосування, скополамін бутілбромід не проникає через ГЕБ. Зустрічаються публікації з клінічними спостереженнями про тривалий інгаляційний прийом скополаміну бутілброміду, де розвиваються амнезія, психічні розлади, набряк головного мозку [25, 26]. Тобто тривале введення скополаміну робить проникним ГЕБ. Також відомо, що при передозуванні у пацієнтів старше 65 років, які споживали більше 90 днів бускопан (скополамін бутілбромід), розвивалися когнітивні порушення і функціональна кишкова непрохідність, яка, в свою чергу, може викликати хронічний інтоксикаційний синдром і судинне ушкодження [27]. 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 дістрофізує ендотелій кровоносних судин, а ГЕБ стає проникним для скополаміну, і скополамін, досягнувши М-холінорецепторів, обумовлює накопичення фрагментів патологічно змінених нейрофіламентів у відростках нейронів. Тим більше, в раніше опублікованій нашій роботі [28], було показано одночасне підвищення вмісту ендотеліну-1, VEGF-A, фактора фон Віллебранду і зниження активності ендотеліальної NO-синтази в крові у тих же тварин, морфологічні особливості ГМ яких після введення скополаміну бутілброміду викладаються в даній статті. Можна стверджувати, що у тварин основних груп відбувається розвиток ендотеліальної дисфункції у всьому організмі, а в тканині ГМ це забезпечує участь плазматичних білків в синтезі амілоїду ГМ.

Висновки

1. У експериментальних тварин зі скополамін-індукованою моделлю деменції альцгеймерівського типу через 14 днів періоду «регенерації» в тканині головного мозку були виявлені морфологічні та імуногістохімічні докази пошкодження ендотелію капілярів: достовірно був зменшений вміст РНК в цитоплазмі ендотеліоцитів капілярів, стінка капілярів регенерувала більшою мірою за типом субституції зі збільшенням кількості перичитів, адгезія ендотеліоцитів в ендотеліальному шарі була зменшена, нейрони кори великих півкуль синтезували збільшену кількість VEGF.

2. Введення мезенхімальних стовбурових клітин на наступний день після закінчення курсу ін'єкцій скополаміну бутілброміду сприяло прискоренню регенерації ендотеліального покриву кровоносних судин за типом реституції, про що свідчить збільшення показника ендотеліоцити/перичити в стінці капілярів в тканині голо-

ного мозку, зменшення кількості VEGF, синтезованого нейронами кори великих півкуль, в порівнянні з рівнем VEGF в групах тварин без використання стовбурових клітин. Вміст РНК в збережених відростках нервових клітин, завдяки використанню мезенхімальних стовбурових клітин, збільшується, в порівнянні з таким у тварин основних груп без їх використання, що є ознакою поліпшення морфофункціонального стану головного мозку.

Перспективи подальших розробок

Планується в подальшому вивчити більш детально механізм проникнення скополаміну бутилброміду через гематоенцефалічний бар'єр

після тривалого його введення. Також є цікавим вивчення процесів регенерації тканини головного мозку в інші терміни після останнього дня курсу ін'єкцій скополаміну (зразу після або більше ніж через 14 днів).

Джерела фінансування

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Патогенез шкідливої дії на організм екзогенних факторів в сучасних умовах» (номер державної реєстрації 0115U000991).

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, пов'язаних з цим рукописом, на момент публікації не існує і не передбачається.

Літературні джерела References

1. Vercllytte S, Lopes R, Lenfant P, Rollin A, Semah F, Leclerc X, Pasquier F, Delmaire C. Cerebral Hypoperfusion and Hypometabolism Detected by Arterial Spin Labeling MRI and FDG-PET in Early-Onset Alzheimer's Disease. *J Neuroimaging*. 2016;26(2):207-212. DOI: 10.1111/jon.12264. Epub 2015 May 29. PMID: 26031943.
2. Pluta R, Jabłoński M, Ułamek-Kozioł M, Kocki J, Brzozowska J, Januszewski S, Furmaga-Jabłońska W, Bogucka-Kocka A, Maciejewski R, Czuczwar SJ. Sporadic Alzheimer's disease begins as episodes of brain ischemia and ischemically dysregulated Alzheimer's disease genes. *Mol Neurobiol*. 2013;48(3):500-515. DOI: 10.1007/s12035-013-8439-1. Epub 2013 Mar 22. PMID: 23519520; PMCID: PMC3825141
3. Montagne A, Zhao Z, Zlokovic BV. Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? *J Exp Med*. 2017;214(11):3151-3169. DOI: 10.1084/jem.20171406. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29061693; PMCID: PMC5679168.
4. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012;4(147):147ra111. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003748. PMID: 22896675; PMCID: PMC3551275.
5. 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*. 2019;11:1. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00001. PMID: 30740048; PMCID: PMC6357927.
6. Lecrux C, Sandoe CH, Neupane S, Kropf P, Toussay X, Tong XK, Lacalle-Aurioles M, Shmuel A, Hamel E. Impact of Altered Cholinergic Tones on the Neurovascular Coupling Response to Whisker Stimulation. *J Neurosci*. 2017;37(6):1518-1531. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1784-16.2016. Epub 2017 Jan 9. PMID: 28069927; PMCID: PMC6705676.
7. Lim SA, Kang UJ, McGehee DS. Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front Synaptic Neurosci*. 2014;6:22. DOI: 10.3389/fnsyn.2014.00022. PMID: 25374536; PMCID: PMC4204445.
8. Austin SA, Katusic ZS. Partial loss of endothelial nitric oxide leads to increased cerebrovascular beta amyloid. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020;40(2):392-403. DOI: 10.1177/0271678X18822474. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30614363; PMCID: PMC7370614.
9. Nizari S, Wells JA, Carare RO, Romero IA, Hawkes CA. Loss of cholinergic innervation differentially affects eNOS-mediated blood flow, drainage of A β and cerebral amyloid angiopathy in the cortex and hippocampus of adult mice. *Acta Neuropathol Commun*. 2021;9(1):12. DOI: 10.1186/s40478-020-01108-z. PMID: 33413694; PMCID: PMC7791879.
10. Deiko RD, Shtrygol' SY, Laryanovskaya YB, Gorbach TV, Gubina-Vakulik GI, Devyatkina NM, Shtrygol' DV. [Chronic blockade of central muscarinic receptors in rats induces primary pathogenetic links of alzheimer's disease]. *Actual Problems of the Modern Medicine: Bulletin of Ukrainian Medical Stomatological Academy*. 2017;17,3(59):13-25. Ukrainian.
11. 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*. 2007;13(28):3895-3896. DOI: 10.3748/wjg.v13.i28.3895. PMID: 17657850; PMCID: PMC4611228.
12. Zorenko YM, Pavlova OO, Gorbach TV, Martynova SM. [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]. *Bulletin of Problems Biology and Medicine. Clinical and Experimental Medicine*. 2021;1(159):66-72.

13. Pyatikop V, Msallam M, Shchegelskaya E, Kutovoy I, Gubina-Vakulik G. Migration features of labeled bone marrow mesenchymal stem cells in rats with modeled Parkinson-like syndrome. *Ukrainian Neurosurgical Journal*. 2014;3:42-48. Ukrainian. DOI 10.29254/2077-4214-2021-1-159-66-72.

14. Romaniuk A, Gyryavenko 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.

15. Kaporskij LN, Prohorov AM, Alekseev DM, Baldin AM. [Optical density. Physical encyclopedia]. Moscow: Great Russian Encyclopedia; 1992. 672 p. Russian.

16. Hernández-Rodríguez M, Arciniega-Martínez IM, García-Marín ID, Correa-Basurto J, Rosales-Hernández MC. Chronic Administration of Scopolamine Increased GSK3βP9, Beta Secretase, Amyloid Beta, and Oxidative Stress in the Hippocampus of Wistar Rats. *Mol Neurobiol*. 2020;57(9):3979-3988. DOI: 10.1007/s12035-020-02009-x. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32638218.

17. Gorbach T, Nakonechna O, Tkachenko A, Shcholok T, Onikova A. Levels of thyroid hormones and indices of energy metabolism in the cerebral cortex of rats with experimental Alzheimer's disease. *Neurophysiology*. 2018;50(3):159-165. <https://doi.org/10.1007/s11062-018-9732-4>

18. Garcia KO, Ornellas FL, Martin PK, Patti CL, Mello LE, Frussa-Filho R, Han SW, Longo BM. 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*. 2014;6:30. DOI: 10.3389/fnagi.2014.00030. PMID: 24639647; PMCID: PMC3945612.

19. 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*. 2018;11:241. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00241. PMID: 30050409; PMCID: PMC6052088.

20. 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. *Neurochemistry International*. 2018;118:42-51. DOI: 10.1016/j.neuint.2018.04.012. PMID: 29705288.

21. Haam J, Yakel JL. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J Neurochem*. 2017;142(2):111-121. DOI: 10.1111/jnc.14052. PMID: 28791706; PMCID: PMC5645066.

22. Pilling D, Gomer RH. The Development of Serum Amyloid P as a Possible Therapeutic. *Front Immunol*. 2018;9:2328. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02328

23. Tkachenko AS, Gubina-Vakulyck GI, Polikarpova HV, Onishchenko AI. [Effect of the food additive E407a on E-cadherin expression in the small intestine]. *Health and Ecology Issues*. 2021;(2):94-101. Russian. <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2021-18-2-14>

24. Naaldijk Y, Jäger C, Fabian C, Leovsky C, Blüher A, Rudolph L, Hinze A, Stolzing A. Effect of systemic transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuropathology markers in APP/PS1 Alzheimer mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2017;43(4):299-314. DOI: 10.1111/nan.12319. Epub 2016 Apr 19. PMID: 26918424.

25. Jalali F, Afshari R, Babaei A. Smoking crushed hyoscine/scopolamine tablets as drug abuse. *Subst Use Misuse*. 2014;49(7):793-797. DOI: 10.3109/10826084.2014.880178. Epub 2014 Feb 4. PMID: 24494624.

26. 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*. 2021;135(4):1455-1460. DOI: 10.1007/s00414-021-02583-2. Epub 2021 Apr 23. PMID: 33890166; PMCID: PMC8062144.

27. Mityanand Ramnarine MD. Anticholinergic toxicity [Internet]. *Practice Essentials, Pathophysiology, Epidemiology*. Medscape; 2020 [cited 2021 Sept 7]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/812644-overview>

28. 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.

Губіна-Вакулік Г.І., Зоренко Є.М. Роль судинного пошкодження в умовах холінодефіциту у щурів при моделюванні скополамін-індукованої деменції альцгеймерівського типу.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Взаємозв'язок між холінодефіцитом і судинною дисфункцією залишається актуальним питанням при вивченні хвороби Альцгеймера. **Мета.** Вивчення морфологічних ознак судинного пошкодження в умовах холінодефіциту у щурів зі скополамін-індукованої деменцією альцгеймерівського типу. **Методи.** Експеримент проводили за участю 48 щурів-самців популяції WAG масою

180-230 гр. Шури дослідних груп (Scor-14, Scor-14-SC, Scor-28, Scor-28-SC) отримували внутрішньочеревні ін'єкції скополаміну (Scor) бутилброміду в дозі 1 мг/кг протягом 14 та 28 днів, а також внутрішньочеревні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин одноразово в дозі 500 тис. клітин на 1 шура після останнього дня ін'єкцій Scor. Контрольним тваринам (гр.С) вводили 0,9% натрію хлориду. Мікропрепарати головного мозку шурів фарбували конго-рот і галоціанін-хромовими галунами за методом Ейнарсона на сумарні нуклеїнові кислоти. Імуногістохімічно визначали експресію VEGF, Е-кадгерину в цитоплазмі клітин мозку. **Результати.** В дослідних групах спостерігалось: конгофільне забарвлення стінок артерій, зменшення ендотеліоцитів зі зниженням експресії Е-кадгерину та збільшення кількості перицитів в стінці капілярів. В гр.Scop-28 VEGF експресія в ендотеліоцитах, нейронах гіпокампу більша, ніж в гр.Scop-14, що свідчить про інтенсивну активацію ангиогенезу та синтез ацетилхоліну при відповідно більш вираженому судинному пошкодженні та холінодефіциті. Цитоплазма нейронів кори дифузно мічена антитілами VEGF у відповідь на гіпоксію, але рівень експресії майже не відрізняється від такого в гр.С, що вказує на менший ступінь холінодефіциту. У всіх групах оптична щільність нейропіл'я великих півкуль при фарбуванні за Ейнарсонем знижена, тобто рівень РНК у відростках нейронів зменшений. Введення стовбурових клітин сприяло відновленню капілярної стінки за рахунок молодих ендотеліоцитів, зменшенню синтезу VEGF у всіх досліджених клітинах та збільшенню вмісту РНК у відростках нейронів. **Висновки.** Знайдений зв'язок між рівнем холінодефіциту, втратою відростків нейронів та пошкодженням судин. Самостійна регенерація судин відбувається шляхом субституції, а після введення стовбурових клітин – шляхом реституції.

Ключові слова: хвороба Альцгеймера, судини, головний мозок, скополамін бутилбромід, шури.

Губина-Вакулик Г.И., Зоренко Е.М. Роль сосудистого повреждения в условиях холинодефицита у крыс при моделировании скополамин-индуцированной деменции альцгеймеровского типа.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Взаимосвязь между холинодефицитом и сосудистой дисфункцией остается актуальным вопросом при изучении болезни Альцгеймера. **Цель.** Изучение морфологических признаков сосудистого повреждения в условиях холинодефицита у крыс со скополамин-индуцированной деменцией альцгеймеровского типа. **Методы.** Эксперимент проводили с участием 48 крыс-самцов популяции WAG массой 180-230 гр. Крысы опытных групп (Scor-14, Scor-14-SC, Scor-28, Scor-28-SC) получали внутрибрюшинные инъекции скополамина (Scor) бутилбромидом в дозе 1 мг/кг в течение 14 и 28 дней и в конце - внутривенные инъекции мезенхимальных стволовых клеток однократно в дозе 500 тыс. клеток на 1 крысу. Контрольным животным (гр.С) вводили 0,9% натрия хлорида. Микропрепараты головного мозга крыс окрашивали конго-рот и галоцианин-хромовыми красками по методу Ейнарсона на суммарные нуклеиновые кислоты. Иммуногистохимически определяли экспрессию VEGF, Е-кадгерина в цитоплазме клеток мозга. **Результаты.** В опытных группах наблюдалось: конгофильное окрашивание стенок артерий, уменьшение эндотелиоцитов со снижением экспрессии Е-кадгерина и увеличение количества перицитов в стенке капилляров. В гр.Scop-28 VEGF экспрессия в эндотелиоцитах, нейронах гиппокампа больше, чем в гр.Scop-14, что свидетельствует об интенсивной активации ангиогенеза и синтезе ацетилхолина при соответственно более выраженном сосудистом повреждении и холинодефиците. Цитоплазма нейронов коры - диффузно меченная антителами VEGF в ответ на гипоксию и с уровнем экспрессии, как в гр.С, что указывает на меньшую степень холинодефицита. Во всех группах оптическая плотность нейропиля больших полушарий при окраске по Ейнарсону снижена, то есть уровень РНК в отростках нейронов уменьшен. Введение стволовых клеток способствовало восстановлению капиллярной стенки за счет молодых эндотелиоцитов, уменьшению синтеза VEGF во всех исследуемых клетках и увеличению содержания РНК в отростках нейронов. **Выводы.** Найдена связь между уровнем холинодефицита, потерей отростков нейронов и повреждением сосудов. Самостоятельная регенерация сосудов происходит путем субституции, а после введения стволовых клеток - путем реституции.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, сосуды, головной мозг, скополамин бутилбромид, крысы.