

# Патогенетичні особливості експресії iNOS у базальному магноцелюлярному ядрі щурів на тлі експериментальної нейродегенерації

М. В. Данукало<sup>ID</sup>\*<sup>A,B,C,D</sup>, Ю. М. Колесник<sup>ID</sup><sup>A,E,F</sup>

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

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

**Мета роботи** – характеризувати особливості експресії iNOS у нейронах базального магноцелюлярного ядра на тлі нітрозативного стресу при експериментальній колхіцин-індукованій нейродегенерації.

**Матеріали і методи.** Дослідження здійснили на 30 щурах-самцях лінії Wistar. На першому етапі експерименту частині тварин (n = 10) змоделивали когнітивні порушення за допомогою інтрацеребровентрикулярного введення колхіцину. Порівняно з групою псевдооперованих та інтактних тварин довели валідність моделі з використанням восьмиплечового радіального лабіринту LE760 (PanLab Harvard Apparatus, Spain). Надалі тварин евтаназували тіопенталом натрію і вилучали головний мозок для гістохімічних, імунофлуоресцентних і біохімічних досліджень.

**Результати.** Встановлено, що інтрацеребровентрикулярне введення колхіцину порівняно з інтактними та псевдооперованими тваринами призводить до порушення гістоархітекtonіки в базальному магноцелюлярному ядрі щурів із достовірним зменшенням площі речовини Ніссля в нейронах на 47,3 % і 35,9 % відповідно. При цьому рівень нітритів у гомогенатах головного мозку тварин з експериментальною нейродегенерацією перевищував показник групи порівняння майже в 10 (інтакт) і 7 (псевдооперовані щури) разів. У результаті імунофлуоресцентного дослідження особливостей експресії iNOS в базальному магноцелюлярному ядрі щурів з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину порівняно з інтактними та псевдооперованими тваринами встановили достовірно більший показник сумарної коригованої клітинної флуоресценції на 22,7 % і 45,3 % відповідно. Виявили також, що експериментальна колхіцин-індукована нейродегенерація супроводжується достовірно більшою кількістю iNOS<sup>+</sup> клітин у базальному магноцелюлярному ядрі порівняно з групами контролю.

**Висновки.** Інтрацеребровентрикулярне введення колхіцину експериментальним щурам спричиняє морфологічні ознаки нейродеструкції в базальному магноцелюлярному ядрі на тлі нітрозативного стресу. Експресія iNOS у щурів після інтрацеребровентрикулярного введення колхіцину в клітинах базального магноцелюлярного ядра характеризується більшим вмістом ферменту порівняно з інтактними та псевдооперованими тваринами. Площа імунопозитивних клітин не мала статистично значущих змін у різних групах дослідження. Інтрацеребровентрикулярне введення колхіцину експериментальним щурам спричинило збільшення кількості імунопозитивних клітин до iNOS у базальному магноцелюлярному ядрі.

## Ключові слова:

синтаза оксиду азоту, нітрозативний стрес, нітрити, нейродегенерація.

## Патологія. 2024.

Т. 21, № 2(61).

С. 93-99

## \*E-mail:

danukalo.mv@zsmu.zp.ua

## Pathogenetic features of iNOS expression in the basal magnocellular nucleus of rats against the background of experimental neurodegeneration

M. V. Danukalo, Yu. M. Kolesnyk

**Aim.** To characterize the features of iNOS expression in neurons of the basal magnocellular nucleus against the background of nitrosative stress during experimental colchicine-induced neurodegeneration.

**Materials and methods.** The study was conducted on 30 male Wistar rats. At the first stage of the experiment, cognitive impairments were modeled in rats (n = 10) by intracerebroventricular injection of colchicine, and compared with sham-operated and intact animal groups, the validity of the model was demonstrated using an 8-arm radial maze LE760 (PanLab Harvard Apparatus, Spain). Subsequently, the animals were euthanized with sodium thiopental, and the brain was removed for histological, immunofluorescence, and biochemical analyses.

**Results.** It was found that intracerebroventricular injection of colchicine compared to intact and sham-operated animals leads to disruption of histoarchitecture in the basal magnocellular nucleus of rats with a significant decrease in the Nissl substance area in neurons by 47.3 % and 35.9 %, respectively. At the same time, the level of nitrites in the brain homogenates of animals with experimental neurodegeneration exceeded the comparison groups almost 10 times (intact) and 7 times (sham-operated rats). Meanwhile, immunofluorescence investigation of iNOS expression in the basal magnocellular nucleus of rats with intracerebroventricular colchicine administration, compared to intact and sham-operated animals, revealed a significantly higher value of corrected total cell fluorescence by 22.7 % and 45.3 %, respectively. Simultaneously, it was established that experimental colchicine-induced neurodegeneration is accompanied by a significantly greater number of iNOS<sup>+</sup> cells in the basal magnocellular nucleus compared to control groups.

**Conclusions.** Intracerebroventricular injection of colchicine to experimental rats is accompanied by morphological signs of neurodestruction in the basal magnocellular nucleus against the background of nitrosative stress. iNOS expression in rats after

## Keywords:

nitric oxide synthase, nitrosative stress, nitrites, neurodegeneration.

## Pathologia.

2024;21(2):93-99

intracerebroventricular colchicine administration in the cells of the basal magnocellular nucleus is characterized by a higher enzyme content compared to intact and sham-operated animals. The area of immunopositive cells between experimental groups does not change statistically. Intracerebroventricular administration of colchicine to experimental rats is accompanied by an increase in the number of immunopositive cells for iNOS in the basal magnocellular nucleus.

Вивчення патохімічних механізмів нейродегенерації є важливим елементом поглиблення фундаментальних уявлень про патологічні процеси, що лежать в основі загибелі нейронів при низці нейродеструктивних захворювань: хворобі Альцгеймера, хворобі Паркінсона, фронто-темпоральній деменції тощо. Нині одним із найкращих інструментів для цього є модельні експерименти на тваринах.

Серед великої кількості підходів до відтворення нейродеструкції в лабораторних умовах [1] особливе місце належить інтрацеребровентрикулярному введенню (ІЦВ) колхіцину дослідним тваринам [2]. Так, показано, що холінергічні нейрони вентромедіального палідуму, відомого як базальне магноцелюлярне ядро (БМЯ), або ядро Мейнерта, чутливі до цього нейротоксину [3]. Дослідження механізмів нейродеструкції саме в цій ділянці головного мозку є цікавим, оскільки вона, по-перше, є важливим джерелом ацетилхоліну в неокортексі [4], а отже бере участь у регуляції вищих когнітивних функцій [5,6]; по-друге, нейродегенерація в цьому ядрі починається ще на доклінічній стадії хвороби Альцгеймера [7]. Це обґрунтовує патогенетичну роль загибелі нейронів БМЯ у прогресуванні деменції.

Важливим механізмом, через який колхіцин реалізує свою нейротоксичну дію, є нейрозапалення [8]. Водночас через високу метаболічну активність нейронів у ролі медіаторів вторинної альтерації при такому запаленні на перший план виходять активні форми кисню й азоту з наступним розвитком оксидативного та нітрозативного стресів [9].

Провідну роль у гіперпродукції оксиду азоту (NO) з наступним утворенням перксинітриду (ONOO-) відіграє індукцйбельна ізоформа синтази оксиду азоту (iNOS, або NOS2). Вона може продукувати NO у мікромолярних кількостях, на відміну від конститутивних ізоформ синтази оксиду азоту (nNOS та eNOS), що продукують його у наномолярних кількостях [10]. У результаті утворений пероксинітрид індукуює перекисне окиснення ліпідів, запускає процеси S-нітрозилування цистеїну та нітрування тирозину, порушуючи інтранейрональний протеостаз та активуючи Ca<sup>2+</sup>-залежні механізми нейрональної загибелі [11]. Важливим біологічним аспектом дії NO є його коротка тривалість існування, а отже здатність реалізувати свої ефекти лише паракринно [12]. Цей факт обмежує методологічні підходи у дослідженні патогенетичної ролі iNOS у нейродеструкції окремих мозкових структур. Разом із тим, поєднання сучасних мікроскопічних технік із застосуванням програм аналізу зображень дає змогу отримати об'єктивну картину щодо характеру експресії ферменту в конкретній структурі. Це сприяє розширенню сучасних наукових даних про патогенетичну роль iNOS і нітрозативного стресу в експериментальній нейродеструкції БМЯ.

## Мета роботи

Схарактеризувати особливості експресії iNOS у нейронах базального магноцелюлярного ядра на тлі нітрозативного стресу при експериментальній колхіцин-індукованій нейродегенерації.

## Матеріали і методи дослідження

До експерименту залучили 30 щурів-самців лінії Wistar віком 10–11 місяців, маса тіла – 250–350 г. Усіх щурів утримували за стандартних умов у Навчально-науковому медико-лабораторному центрі з віварієм Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Дослідження схвалено Комісією з питань біоетики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Під час роботи дотримувалися національних «Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна 2001), що узгоджені з Директивою 2010/63 ЄС Європейського парламенту та Ради від 22 вересня 2010 року «Про захист прав тварин, що використовуються для наукових цілей».

Для досягнення поставленої мети використали функціональні, гістохімічні, імунофлуоресцентні та біохімічні методи досліджень.

Експериментальних тварин поділили на 2 групи. У першій групі – 10 тварин, які сформували групу інтакту. У другій групі (n = 20) здійснили вхідне дослідження локомоторної активності та когнітивних функцій за допомогою тесту «відкрите поле» та апаратного комплексу, що включав восьмиплечовий радіальний лабіринт LE760 (PanLab Harvard Apparatus, Spain) та камеру SONY (Japan) з програмою аналізу відеофайлів Smartv.3.0 (PanLab Harvard Apparatus, Spain) (s/n DD347-0E6). Після цього тварин другої групи поділили на підгрупи: 2a (n = 10) – група контролю, яким під телязолімовим наркозом інтрацеребровентрикулярно вводили фізіологічний розчин NaCl (37 °C); 2б (n = 10) – щури, яким під тим самим наркозом інтрацеребровентрикулярно вводили розчин колхіцину (37 °C). Після цього через 14 днів здійснювали повторний запис, аналіз локомоторної активності та когнітивних функцій тварин із підгруп 2a і 2б. У результаті виявили погіршення когнітивних функцій у підгрупі 2б щодо показників щурів із групи контролю. У такий спосіб доведено валідність моделі [13].

З експерименту тварин виводили шляхом одномоментної декапітації під тіопенталовим наркозом (тіопентал натрію 120 мг/кг внутрішньочеревинно). Потім у щурів вилучали головний мозок. Після стандартної гістологічної обробки (фіксація, дегідратація у висхідних концентраціях етанолу, розчинах етанолу 100 % із хлороформом у співвідношеннях 2:1, 1:1, 1:2, чистому хлороформі та хлороформі з парапластом) зразки заливали в парапласт (MkCormick, США). На мікротомі «Microm-325» (MicromCorp., Німеччина) із виготовлених блоків готували серійні зрізи мозку

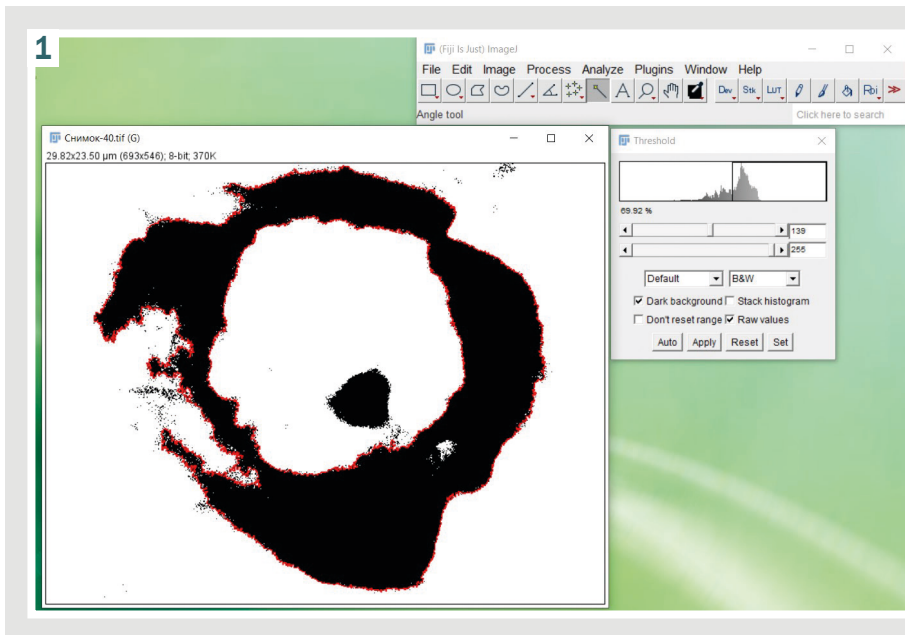


Рис. 1. Напівавтоматичне визначення площі речовини Ніссля в програмі цифрового аналізу зображення ImageJ.

(завтовшки 7 мкм). Топографічно ділянки зрізу, що відповідали БМЯ, ідентифікували за стереотаксичним атласом мозку щура [14].

Для визначення площі хромафінної субстанції в нейронах БМЯ здійснили гістохімічне забарвлення речовиною Ніссля серійних зрізів головного мозку [15]. Надалі проаналізували у видимому спектрі на мікроскопі «PrimoStar» (Carl Zeiss, Німеччина) з камерою «AxioCam 105color» (Carl Zeiss, Німеччина). Отримані в результаті мікроскопії зображення аналізували в програмі ImageJ (National Institutes of Health, США). На мікрофотографіях препаратів у напівавтоматичному режимі визначали площу речовини Ніссля в нейронах БМЯ, як показано на рис. 1.

Особливості експресії iNOS у нейронах БМЯ вивчали імунофлуоресцентним методом. Для цього гістологічні зрізи депарафінували, регідрували та демаскували в РТ-модулі (Thermo Fisher Scientific, США) у цитратному буферному розчині (Thermo Fisher Scientific, США). Після цього наносили відповідні моноклональні мишачі антитіла, кон'юговані з FITC (SantaCruz Biotechnology, USA), відповідно до інструкції виробника [16].

Імунофлуоресцентне дослідження здійснили в ультрафіолетовому спектрі збудження за допомогою світлофільтра 38HE з високою емісією на мікроскопі «AxioImager-M2» (Carl Zeiss, Німеччина) з камерою «AxioCam-ERc 5s» (Carl Zeiss, Німеччина). Мікрофотографії, що одержали, також аналізували в ImageJ. Обраховували такі показники:

– скориговану загальну клітинну флуоресценцію (corrected total cell fluorescence, CTCF), що характеризувала вміст імунореактивного матеріалу в клітині. Виразали цей показник в умовних одиницях імунофлуоресценції ( $OD_{\text{фл}}$ ) та обраховували за формулою:  $CTCF = ID_1 - (S \times ID_0)$ , де  $ID_1$  – параметр інтегрованої щільності імунопозитивної клітини, автоматично визначений програмою,  $S$  – площа імунопозитивної клітини;  $ID_0$  – показник інтегрованої щільності фону (клітини, що не мала видимої флуоресценції);

– кількість імунопозитивних клітин у зрізі мозку в зоні інтересу.

Окремо в гомогенатах головного мозку експериментальних щурів оцінювали рівень нітритів з реактивом Гріса спектрофотометричним способом на спектрофотометрі «Libra S32» (Biochrom Ltd, USA) при 540 нм [17].

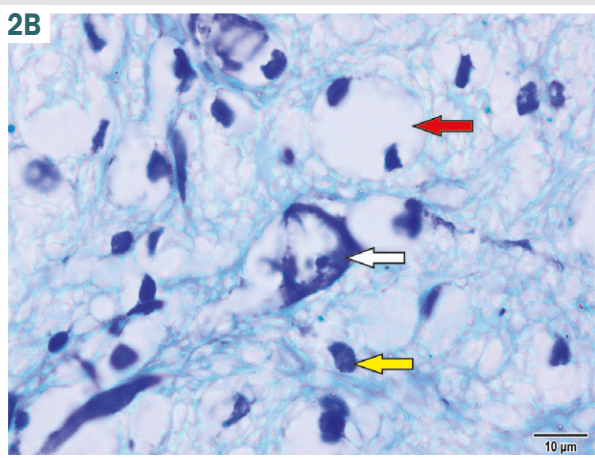
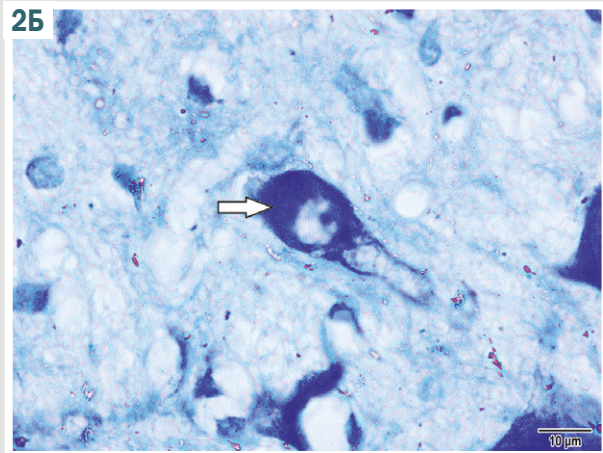
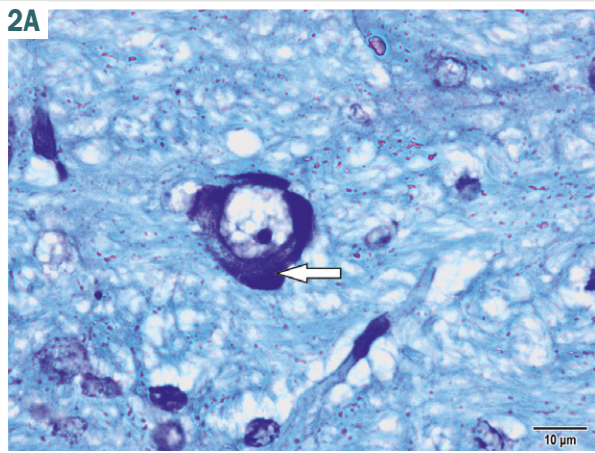
Усі експериментальні дані опрацювали, застосувавши пакет прикладних і статистичних програм Statistica v.13 ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J і Microsoft Excel 7.0 (Microsoft Corp., США). Перевірку нормальності розподілу даних у вибірці виконали за критерієм Шапіро–Вілка. Для виявлення достовірності відмінностей результатів досліджень між експериментальними групами щурів визначили коефіцієнт Стюдента ( $t$ ) для вибірки, що відповідала нормальному закону розподілу даних, а також критерій Манна–Вітні ( $U$ ) для вибірки, в якій дані не відповідали закону нормальності розподілу [18].

## Результати

У результаті дослідження встановили особливості нейродеструктивного впливу ІЦВ колхіцину на нейрони БМЯ на фоні зміни рівня нітритів у гомогенатах головного мозку та характеру експресії iNOS. Так, на препаратах БМЯ, забарвлених на речовину Ніссля, у щурів після ІЦВ колхіцину (підгрупа 2б) візуально визначено порушення гістоархітекtonіки структури, зокрема з'явилася велика кількість дрібних інтенсивно забарвлених тілець і порожнини навколо них, а в зразках від інтактних (група 1) і псевдооперованих (підгрупа 2а) тварин такі ознаки не виявили (рис. 2).

Об'єктивно у нейронах БМЯ щурів підгрупи 2б визначено достовірно меншу площу речовини Ніссля порівняно з групою 1 та підгрупою 2а – на 47,3 % та 35,9 % відповідно ( $p_s < 0,05$ ). Зазначимо, що між групами інтакту та псевдооперованих щурів статистичної різниці за цим показником не було (рис. 3).

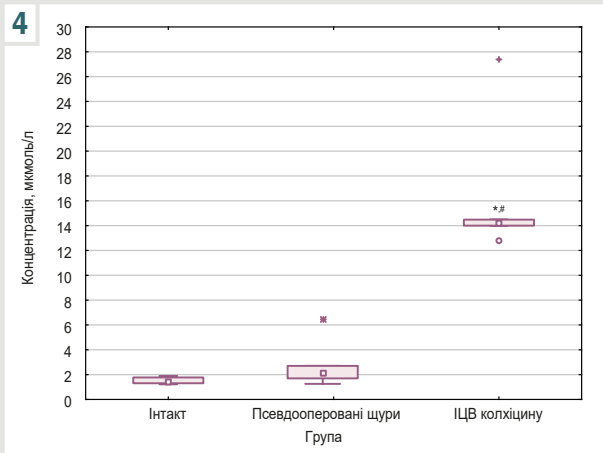
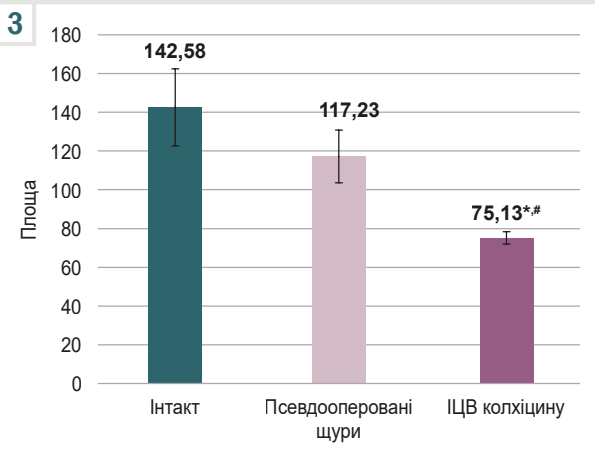




**Рис. 2.** Нейрони базального магноцелюлярного ядра у щурів експериментальних груп (забарвлення за Нісслем). А: у щурів групи 1; Б: у щурів групи 2а; В: у щурів групи 2б; біла стрілка: речовина Ніссля; жовта стрілка: щільно забарвлене тільце; червона стрілка: порожнина навколо щільно забарвлених тілець.

**Рис. 3.** Площа речовини Ніссля (μm<sup>2</sup>) у нейронах базального магноцелюлярного ядра щурів експериментальних груп. \*: достовірна різниця щодо показника інтактних тварин ( $p_{st} < 0,05$ ); #: вірогідна різниця щодо псевдооперованих тварин ( $p_{st} < 0,05$ ).

**Рис. 4.** Вміст нітритів у гомогенатах головного мозку щурів з експериментальних груп. \*: достовірна різниця щодо показника інтактних тварин ( $p_U < 0,05$ ); #: вірогідна різниця щодо псевдооперованих тварин ( $p_U < 0,05$ ).

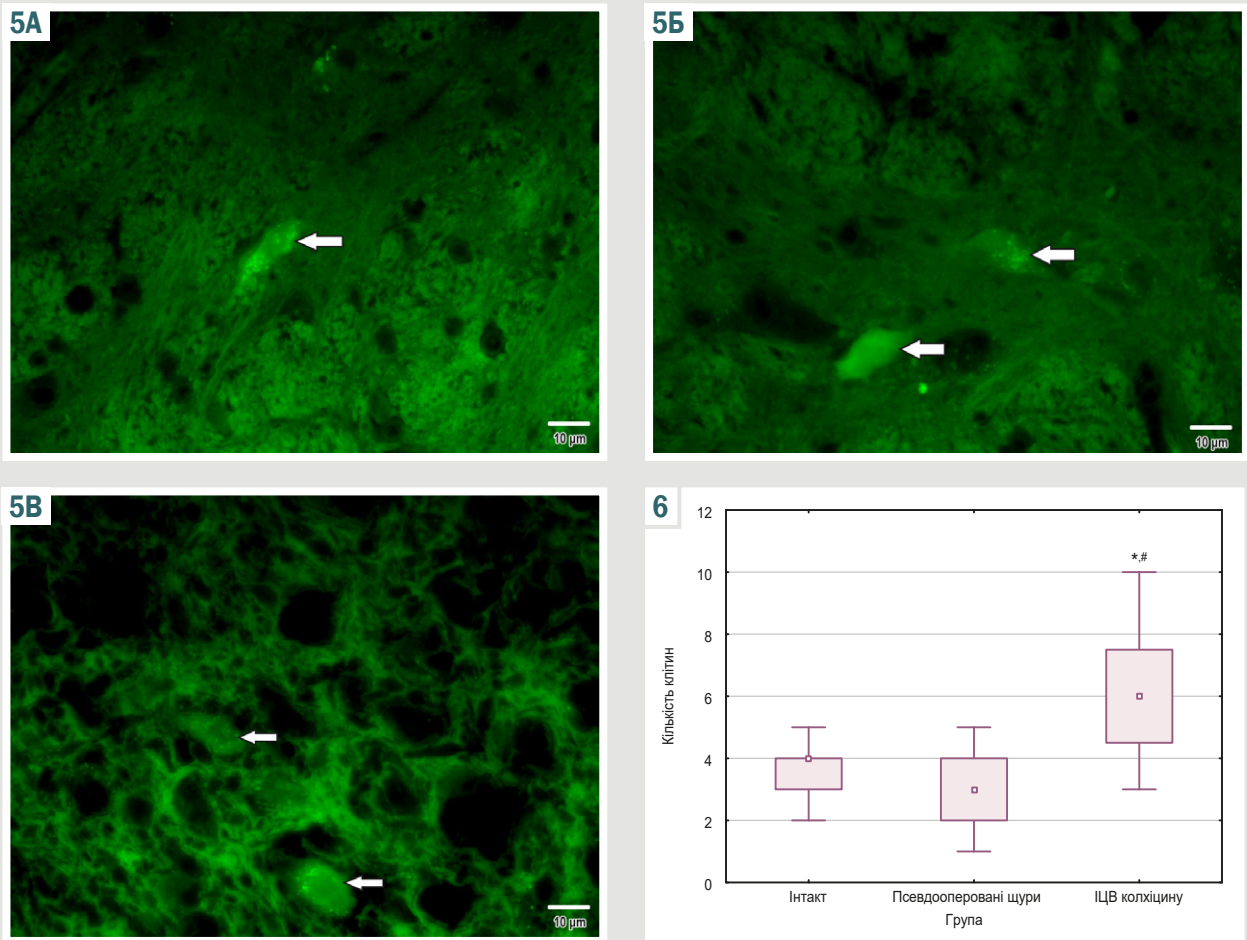


Така морфологічна картина в групі 2б визначена на фоні статистично значущо більших показників рівня нітритів у гомогенатах головного мозку порівняно з групою 1 і підгрупою 2а (майже в 10 і 7 разів відповідно). Разом з тим, за вмістом нітритів групи інтакту й псевдооперованих щурів не відрізнялися (рис. 4).

У результаті імунофлуоресцентного аналізу експресії iNOS у нейронах БМЯ виявили певні особливості в експериментальних групах щурів (табл. 1, рис. 5).

Так, площа імунопозитивних клітин до iNOS достовірно не відрізнялася в групах дослідження. Разом

із тим встановили, що показник CTCF у групі тварин з ІЦВ колхіцину максимальний, достовірно перевищував відповідні значення інтактних тварин на 22,7 %, псевдооперованих щурів – на 45,3 % (табл. 1). Важливий етап роботи – дослідження кількості iNOS<sup>+</sup> клітин у БМЯ в одному зрізі мозку. Визначили, що кількість клітин, які експресують iNOS, у групі 1 (інтактні) і підгрупі 2а (псевдооперовані) статистично не відрізнялася. У підгрупі 2б (ІЦВ колхіцину) кількість клітин, імунопозитивних до iNOS, достовірно перевищувала відповідний показник групи 1 на 50 %, підгрупи 2а – на 100 % (рис. 6).



**Рис. 5.** Експресія iNOS у нейронах БМЯ щурів експериментальних груп. Реакція прямої імунофлуоресценції. **А:** у щурів групи 1; **Б:** у щурів підгрупи 2а; **В:** у щурів підгрупи 2б (стрілка вказує на імунопозитивну клітину).

**Рис. 6.** Кількість iNOS<sup>+</sup> клітин у БМЯ щурів експериментальних груп у зрізі головного мозку. \*: достовірна різниця щодо показника інтактних тварин ( $p_0 < 0,05$ ); #: вірогідна різниця щодо показника псевдооперованих тварин ( $p_0 < 0,05$ ).

**Таблиця 1.** Показники експресії iNOS у нейронах БМЯ щурів експериментальних груп, Ме [Q1; Q4]

Показник, одиниці вимірювання	Інтакт (група 1)	Псевдооперовані щури (підгрупа 2а)	ІЦВ колхіцину (підгрупа 2б)
Площа імунопозитивних клітин, мкм <sup>2</sup>	96,82 [71,88; 141,09]	105,59 [86,81; 131,16]	111,3 [84,58; 144,64]
СТСФ, Од <sub>ф</sub>	5014,17 [3357,01; 6827,85]	4234,14 [3098,01; 6068,97]	6150,72 [4213,97; 9552,74] <sup>1,2</sup>

1: вірогідна різниця показників ( $p_0 < 0,05$ ) щодо групи 1; 2: достовірна різниця показників ( $p_0 < 0,05$ ) щодо групи 2а.

## Обговорення

Дослідження дало змогу визначити участь нітрозативного стресу в колхіцин-індукованій нейродегенерації, а також виявити особливості експресії iNOS у нейронах БМЯ експериментальних щурів.

Гістохімічне забарвлення за Нісслем є досить поширеним методом візуального оцінювання нейродегенерації, зокрема при ІЦВ колхіцину експериментальним щурам [19]. Так, відомо, що типовою морфологічною ознакою дегенерації нейронів у зрізах мозку, які забарвлені за цим методом, є наявність зморщених аномально гіперхромних тілець, а самі нейрони набувають кутастої форми. Крім того, визначають втрату субстанції Нісслея у нейронах, що дегенерують. Ці характеристики допомагають чітко

відізнати такі нейрони від нормальних [19,20]. Отже, крім візуального оцінювання, цей спосіб гістохімічного забарвлення дає змогу об'єктивно визначити нейродегенерацію на підставі метричних показників. Це спостерігали під час дослідження, яке здійснили, та підтверджено результатами інших учених [9,21].

Підвищення рівня нітритів як один із показників нітрозативного стресу після введення колхіцину також неодноразово визначали [19,22]. Проте локальна патогенетична роль iNOS у БМЯ як важливої ланки розвитку нітрозативного стресу у науковій літературі описана недостатньо.

У цьому контексті зауважимо: якщо 25 років тому питання щодо експресії цього ферменту в головному мозку інтактних тварин було дискусійним, оскільки окремі дослідники у нейронах контрольних тварин

не виявляли імунофлуоресценцію до iNOS на фоні мінімальної базальної експресії mPFC та самого білка (оцінені методом полімеразної ланцюгової реакції та вестерн-блоттингу відповідно) [23], то нині виявлено ензим у головному мозку здорових тварин, ба більше, показано збільшення експресії iNOS з віком [24]. Отже, вік тварини впливає на експресію iNOS.

Крім того, слід звернути увагу на неоднорідність популяції імунопозитивних нейронів за показником площі в усіх експериментальних групах (табл. 1). Традиційно вважали, що за експресію iNOS відповідають переважно мікрогліальні клітини, для яких характерні малі розміри порівняно з нейронами [25,26]. Дані, що наведені в цій роботі, підтверджують залученість до експресії iNOS широкого спектра клітин за показником площі в усіх експериментальних групах. Це може свідчити про наявність цього ферменту і в гліальних клітинах, і безпосередньо в нейронах. Подібні результати одержали інші вчені, змодельювавши хворобу Альцгеймера у щурів [27]. Разом із тим, при моделюванні хвороби Паркінсона M. Bortolanza et al. не виявили iNOS<sup>+</sup> нейронів, визначивши тільки глієподібні клітини, що експресували цей фермент [28]. Такі розбіжності результатів можуть свідчити про певну специфічність патерну клітин головного мозку, що залучені до експресії iNOS у відповідь на різні нейродеструктивні агенти.

Зауважимо, що у щурів після ІЦВ колхіцину порівняно з іншими експериментальними групами істотне підвищення рівня нітритів у гомогенатах головного мозку визначається не тільки надмірною експресією iNOS, але й збільшенням кількості iNOS<sup>+</sup> клітин у БМЯ.

## Висновки

1. Інтрацеребровентрикулярне введення колхіцину експериментальним щурам спричиняє морфологічні ознаки нейродеструкції в базальному магноцелюлярному ядрі на тлі нітрозативного стресу.

2. Експресія iNOS у щурів після інтрацеребровентрикулярного введення колхіцину в клітинах базального магноцелюлярного ядра характеризується більшим вмістом ферменту порівняно з інтактними та псевдооперованими тваринами. При цьому площа імунопозитивних клітин не мала статистично значущих змін у різних групах дослідження.

3. Інтрацеребровентрикулярне введення колхіцину експериментальним щурам спричинило збільшення кількості імунопозитивних клітин до iNOS у базальному магноцелюлярному ядрі.

## Фінансування

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

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 06.05.2024

Після доопрацювання / Revised: 05.06.2024

Схвалено до друку / Accepted: 11.06.2024

## Відомості про авторів:

Данукало М. В., PhD, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.  
ORCID ID: 0000-0003-3413-945X

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, ректор Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, заслужений діяч науки і техніки України.  
ORCID ID: 0000-0002-1556-5085

## Information about the authors:

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

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

## References

- Rapaka D, Adiukwu PC, Bitra VR. Experimentally induced animal models for cognitive dysfunction and Alzheimer's disease. *MethodsX*. 2022;9:101933. doi: 10.1016/j.mex.2022.101933
- Som Chaudhury S, Nandi M, Kumar K, Ruidas B, Sur TK, Prasad P, et al. Rodent model preclinical assessment of pegylated block copolymer targeting cognition and oxidative stress insults of alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2023;60(4):2036-50. doi: 10.1007/s12035-022-03194-7
- Dhapola R, Kumari S, Sharma P, HariKrishnaReddy D. Insight into the emerging and common experimental in-vivo models of Alzheimer's disease. *Lab Anim Res*. 2023;39(1):33. doi: 10.1186/s42826-023-00184-1
- Oswald MJ, Han Y, Li H, Marashli S, Oglo DN, Ojha B, et al. Cholinergic basal forebrain nucleus of Meynert regulates chronic pain-like behavior via modulation of the prefrontal cortex. *Nat Commun*. 2022;13(1):5014. doi: 10.1038/s41467-022-32558-9
- Soma S, Suematsu N, Sato AY, Tsunoda K, Bramian A, Reddy A, et al. Acetylcholine from the nucleus basalis magnocellularis facilitates the retrieval of well-established memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2021;183:107484. doi: 10.1016/j.nlm.2021.107484
- Byun J-I, Cha KS, Kim M, Lee W-J, Lee HS, Sunwoo J-S, et al. Association of nucleus basalis of Meynert functional connectivity and cognition in idiopathic rapid-eye-movement sleep behavior disorder. *J Clin Neurol*. 2022;18(5):562-70. doi: 10.3988%2Fjcn.2022.18.5.562
- Aisen PS, Jimenez-Maggiore GA, Rafii MS, Walter S, Raman R. Early-stage alzheimer disease: Getting trial-ready. *Nat Rev Neurol*. 2022;18(7):389-99. doi: 10.1038/s41582-022-00645-6
- Saini N, Singh D, Sandhir R. Bacopa monnieri prevents colchicine-induced dementia by anti-inflammatory action. *Metab Brain Dis*. 2019;34(2):505-18. doi: 10.1007/s11011-018-0332-1
- Sil S, Ghosh R, Sanyal M, Guha D, Ghosh T. A comparison of neurodegeneration linked with neuroinflammation in different brain areas of rats after intracerebroventricular Colchicine Injection. *J Immunotoxicol*. 2015;13(2):181-90. doi: 10.3109/1547691X.2015.1030804
- Balez R, Ooi L. Getting to no alzheimer's disease: Neuroprotection versus neurotoxicity mediated by nitric oxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3806157. doi: 10.1155/2016/3806157
- Piacenza L, Zeida A, Trujillo M, Radi R. The superoxide radical switch in the biology of nitric oxide and peroxynitrite. *Physiol Rev*. 2022;102(4):1881-906. doi: 10.1152/physrev.00005.2022
- Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Muñoz FJ. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(8):1949-67. doi: 10.1016/j.bbdis.2018.11.007
- Danukalo MV, Kolesnyk YM, Hancheva OV. Contemporary comprehensive approaches to assessing the effectiveness of experimental model of neurodegenerative disorders with cognitive status changes. *Modern medical technology*. 2023;0(4):51-8. doi: 10.34287/MMT.4(59).2023.7
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. London: Elsevier, Academic Press; 2018.
- Zhu Y, Liu F, Zou X, Torbey M. Comparison of unbiased estimation of neuronal number in the rat hippocampus with different staining methods. *J Neurosci Methods*. 2015;254:73-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.07.022



16. Santa Cruz Biotechnology. Immunofluorescence Cell Staining [Internet]. www.scbt.com. [cited 2024 Jul 4]. Available from: <https://www.scbt.com/resources/protocols/immunofluorescence-cell-staining>
17. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5(1):62-71. doi: 10.1006/niox.2000.0319
18. Holovanova IA, Bielikova IV, Liakhova NO. Osnovy medychnoi statystyky [Basics of medical statistics]. Poltava, Ukrainian Medical Stomatological Academy; 2017. Ukrainian. Available from: <https://core.ac.uk/download/211228894.pdf>
19. Sil S, Ghosh T, Ghosh R, Gupta P. Nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine reduces intracerebroventricular colchicine induced neurodegeneration, memory impairments and changes of systemic immune responses in rats. *J Neuroimmunol*. 2017;303:51-61. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.12.007
20. Memudu AE, Adewumi AE. Alpha lipoic acid ameliorates scopolamine induced memory deficit and neurodegeneration in the Cerebello-hippocampal cortex. *Metab Brain Dis*. 2021;36(7):1729-45. doi: 10.1007/s11011-021-00720-9
21. Liang Y, Li S, Wen C, Zhang Y, Guo Q, Wang H, et al. Intrastratial injection of colchicine induces striatonigral degeneration in mice. *J Neurochem*. 2008;106(4):1815-27. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05526.x
22. Kumar A, Dogra S. Neuroprotective effect of Carvedilol, an adrenergic antagonist against colchicine induced cognitive impairment and oxidative damage in rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;92(1):25-31. doi: 10.1016/j.pbb.2008.10.005
23. Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernández AP, Bentura ML, et al. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci*. 1998;10(2):445-56. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00028.x
24. El Azab EF, Abdulmalek S. Amelioration of age-related multiple neuronal impairments and inflammation in high-fat diet-fed rats: The prospective multitargets of Geraniol. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4812993. doi: 10.1155/2022/4812993
25. Pourbagher-Shahri AM, Farkhondeh T, Talebi M, Kopustinskiene DM, Samarghandian S, Bernatoniene J. An overview of no signaling pathways in aging. *Molecules*. 2021;26(15):4533. doi: 10.3390/molecules26154533
26. Doherty GH. Nitric oxide in neurodegeneration: potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories. *Neurosci Bull*. 2011;27(6):366-82. doi: 10.1007/s12264-011-1530-6
27. Chen M-H, Wang T-J, Chen L-J, Jiang M-Y, Wang Y-J, Tseng G-F, et al. The effects of astaxanthin treatment on a rat model of alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2021;172:151-63. doi: 10.1016/j.brainresbull.2021.04.020
28. Bortolanza M, Cavalcanti-Kiwiatkoski R, Padovan-Neto FE, da-Silva CA, Mitkovski M, Raisman-Vozari R, et al. Glial activation is associated with L-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2015;73:377-87. doi: 10.1016/j.nbd.2014.10.017