

Вплив інгібітора CDK5 росковітину на життєздатність культури нейронів гіпокампа щурів *in vitro*

Н.М. Розумна, В.В. Ганжа, О.О. Лук'янець

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: nata_nr@biph.kiev.ua

Хвороба Альцгеймера (ХА) – це прогресуюче нейродегенеративне захворювання. Через нього виникають проблеми з пам'яттю, мисленням і поведінкою. Нині не існує ліків, які б попередили або усунули патологічні явища цієї хвороби, але застосовується симптоматичне лікування, котре може покращити стан хворого. У зв'язку з цим метою нашого дослідження було вивчення впливу росковітину, селективного інгібітора нейронспецифічної кінази CDK5, на життєздатність культур нейронів гіпокампа. CDK5 відіграє важливу роль у підтримці структури та функції нейронів, включаючи синаптичну пластичність і цілісність цитоскелета. Виходячи з цього, дослідження нейропротекторного ефекту росковітину відкриває шлях для його потенційного застосування у лікуванні нейродегенеративних захворювань, зокрема ХА. Дослідження проводили на культурі нейронів гіпокампа щурів з використанням подвійного забарвлювання клітин двома барвниками, що зв'язуються з ДНК (Hoechst 33258 та пропідійм йодид). Життєздатність нейронів оцінювали підрахунком за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії, порівнюючи флуоресценцію клітин за контрольних умов та після 24 год інкубації з реагентами. Результати досліджень показали, що росковітин має мінімальний вплив на життєздатність культур клітин гіпокампа щурів за нормальних умов, викликаючи лише незначне збільшення апоптозу та некрозу клітин порівняно з контролем, що свідчить про низьку токсичність препарату. Таким чином, результати нашого дослідження підкреслюють важливість оцінки ефекту росковітину для використання в клітинній моделі ХА і визначення його здатності протидіяти нейродегенерації, викликаній β -амілоїдом. Вони передбачають терапевтичний потенціал інгібіторів CDK5 і створюють основу для подальших досліджень їхньої ролі в пом'якшенні нейродегенеративних процесів.

Ключові слова: росковітин, CDK5; нейродегенеративні захворювання; хвороба Альцгеймера; культура клітин гіпокампа; апоптозу; некроз.

ВСТУП

Нейродегенеративні захворювання є одними з найважливіших медико-біологічних проблем сучасності через їх значний вплив на якість життя пацієнтів та соціально-економічний тягар. Серед них хвороба Альцгеймера (ХА) посідає центральне місце, будучи найпоширенішою формою деменції у світі [1–3]. За даними ВООЗ, кількість людей із цим захворюванням стрімко зростає, і, за прогнозами, до 2050 р. вона може перевищити 150 млн осіб [4]. Попри значний прогрес у розумінні механізмів нейродегенерації, ефективні методи лікування ХА залишаються обмеженими.

© Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 2025

© Видавець ВД “Академперіодика” НАН України, 2025

Одним із ключових механізмів, що сприяють розвитку нейродегенеративних змін, є дисрегуляція кінази, залежної від циклічного аденозинмонофосфату 5 (CDK5), і регульована такими білками, як p35/p39. CDK5 – це серин/треонінова нейронспецифічна кіназа, яка на відміну від інших циклінзалежних кіназ, як то CDK2 або CDK9, що беруть участь у регуляції клітинного циклу та транскрипції, функціонує переважно в постмітотичних нейронах. Вона відіграє важливу роль у підтримці структури та функції нейронів, включаючи синаптичну пластичність, транспорт молекул і ціліс-

ність цитоскелета [5]. Однак надмірна активація CDK5, зумовлена патологічними факторами, порушенням активації її регуляторів (наприклад, p35/p25), може призводити до каскаду змін, що сприяють апоптозу, некрозу та загибелі нейронів. Зокрема, вона асоціюється з накопиченням τ -протеїнів, які утворюють нейрофібрилярні клубки – один із патологічних ознак ХА [6-8].

Оскільки гіпокамп має важливе значення у процесах пам'яті та навчання, а його ураження є характерною рисою ХА, розробка фармакологічних агентів, які здатні впливати на активність CDK5, є перспективним напрямком у терапії нейродегенеративних захворювань. Одним із таких агентів є росковітин – селективний інгібітор CDK5, який продемонстрував ефективність у зниженні рівня фосфорилювання τ -протеїнів та загибелі нейронів, спричиненій β -амілоїдом, і в такий засіб нейропротекцію в різних експериментальних моделях [9]. Крім того, росковітин також впливає на інші CDK, зокрема CDK2 і CDK9, що відкриває перспективи для його застосування в онкології та інших галузях медицини [10, 11]. Також є дані про його здатність зменшувати прояви запалення, оксидативного стресу та підтримувати виживаність нейронів [12–14]. Значний інтерес викликає вивчення дії росковітину на модельних системах, таких як культура нейронів гіпокампа, яка є зручною платформою для оцінки механізмів впливу фармакологічних агентів на життєздатність клітин та апоптотичні процеси. Використання такої моделі дає змогу отримати цінні відомості для подальшої розробки терапевтичних підходів. У зв'язку зі здатністю росковітину інгібувати CDK5, і, таким чином, знижувати патологічну фосфориляцію τ -протеїнів і β -амілоїдом спричинену загибель клітин,

важливо дослідити його потенціал як нейропротекторного агента при нейродегенеративних захворюваннях, зокрема ХА.

Метою нашої роботи було дослідження впливу росковітину на життєздатність культур клітин гіпокампа щурів для оцінки можливості його використання як нейропротекторного агента.

МЕТОДИКА

Усі експериментальні процедури проводили відповідно до Директиви Європейської комісії (86/609/EEC) та етичних рекомендацій Міжнародної асоціації з вивчення болю, а також були схвалені Локальним комітетом з етики тварин Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця (протокол № 1/25 від 08.01.2025). Зусилля спрямовувалися на мінімізацію кількості використаних тварин і їхніх страждань.

Дослідження здійснювали на культурах нейронів гіпокампа щурів за стандартною методикою [15, 16]. Було використано 10 новонароджених щурів лінії Вістар, яких декапітували, після чого гіпокамп виділяли у стерильній холодній чашці Петрі. Його розрізали на кілька частин і переносили на 10 хв у теплий (36°C) розчин ферменту з 0,25%-м трипсином ("Sigma Aldrich", США). Після цього тканину кілька разів промивали холодним живильним середовищем і подрібнювали до однорідної суспензії. Кількість клітин у суспензії регулювали до щільності $3 \cdot 10^5$ клітин/мл, а 200 мкл цієї суспензії наносили на попередньо оброблені полілізином і ламініном скельця (20×20 мм). Через 2 год інкубації при 37°C у середовище додавали живильну суміш. Клітини гіпокампа культивували 11–13 днів при 37°C і 5% CO₂.

Для дослідження впливу на культивовані клітини гіпокампа використовували росковітин («Sigma Aldrich», США)

у концентрації 10 та 20 мкмоль/л, який додавали в чашки Петрі і інкубували клітини 24 год. Його розчиняли у диметилсульфоксиді, концентрація якого не перевищувала 0,5%. Попередні дослідження показали, що така концентрація диметилсульфоксиду не впливає на параметри клітин у культурі [17].

Було проведено три серії експериментів: I – контрольна; II і III – введення росковітину у концентрації 10 і 20 мкмоль/л за 24 год до проведення вимірювання відповідно. Після цього оцінювали типи клітинної загибелі методом подвійного фарбування Hoechst 33258 («Sigma Aldrich», США) та пропідіум йодидом («Sigma Aldrich», США). Hoechst 33258 проникає через мембрани неушкоджених клітин і фарбує ядерний хроматин, даючи змогу ідентифікувати нормальні та апоптотично змінені клітини. В живих клітинах хроматин розподілений більш рівномірно по всьому об'єму ядра і Hoechst 33258 у них флуоресцює слабо блакитним світлом. В апоптотично змінених одиницях відбувається конденсація хроматину та фрагментація ядер, у зв'язку з цим інтенсивність флуоресценції Hoechst 33258 в 3-4 рази вища, ніж у нормальних клітинах (яскраво блакитне світіння). Пропідіум йодид забарвлює ядра клітин з істотно пошкодженою плазмолемою, в яких відбулась некротична трансформація (флуоресцює червоним світлом).

Для отримання флуоресцентних зображень та підрахунку нейронів у дослідженнях використовували конфокальний лазерний скануючий мікроскоп FV1000-BX61WI та програмне забезпечення FluoView («Olympus», Японія) або Image J («Wayne Rasband (NIH)», США). Довжини хвиль збуджувального лазерного випромінювання становили 352/405 нм (при використанні Hoechst 33258) та 543 нм (при викорис-

танні пропідіум йодиду) відповідно.

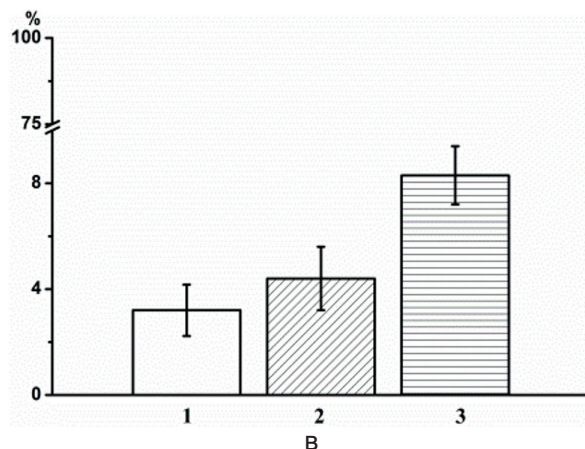
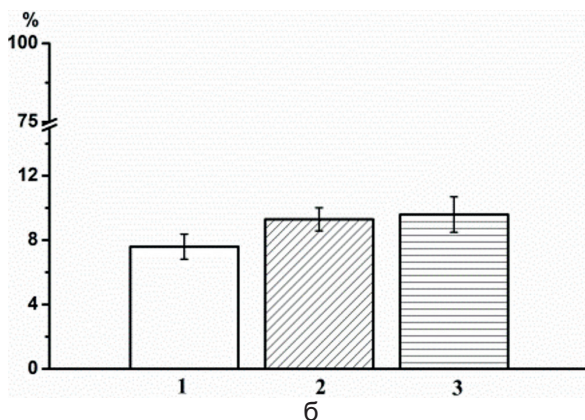
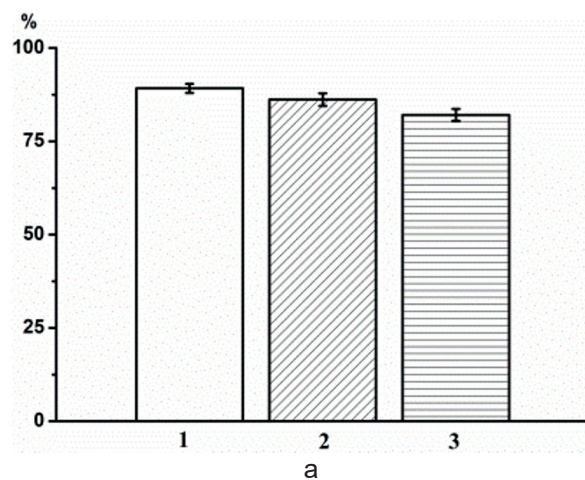
Кількість нейронів підраховували в п'яти просторово віддалених ділянках кожного препарату. Вони диференціювались від гліальних клітин за допомогою фазового контрасту. Обсяг вибірок становив від 100 до 300 клітин; в їх межах на підставі кольору флуоресценції барвників та ступеня інтенсивності Hoechst 33258, зазначених вище, підраховували кількості живих, апоптотичних і некротичних одиниць, та розраховували нормовані значення відповідних показників. Загальна кількість клітин, яку було проаналізовано, становить 1879 клітин (контроль $n = 529$, II група $n = 648$, III група $n = 702$).

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики за допомогою програми Origin 8.0 («Microcall Software Inc.», США). Результати характеризувалися нормальним розподілом, міжгрупове порівняння виконували з використанням дисперсійного аналізу ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень було встановлено, що у контрольній групі переважна більшість клітин залишалася інтактною, їх частка становила $89,2 \pm 1,2\%$, що свідчить про здоровий стан культури клітин гіпокампа. При додаванні росковітину у концентрації 10 мкмоль/л їх кількість незначно зменшилася до $86,2 \pm 1,7\%$, що вказує на слабкий вплив агента. Зі збільшенням концентрації до 20 мкмоль/л спостерігалося подальше незначне зменшення кількості інтактних клітин до $82,1 \pm 1,6\%$ (рисунок). Між середніми значеннями кількостей інтактних клітин у контролі та при введенні росковітину зазначених концентрацій не було достовірної різниці. Отже, результати свідчать, що росковітин сам по собі має обмежений вплив на життєздатність культур клітин гіпокампа щурів.

Кількість клітин з ознаками апоптозу у контрольній групі залишалася низькою і становила $7,6 \pm 0,8\%$. Це свідчить



Діаграми середніх значень відносних кількостей інтактних клітин (а) і клітин з ознаками апоптозу (б) та некрозу (в) у культурі клітин гіпокампа щурів у контролі (1) та при додаванні росковітину у концентрації 10 мкмоль/л (2) і 20 мкмоль/л (3)

про мінімальний рівень програмованої клітинної смерті за стандартних умов. При концентрації росковітину 10 мкмоль/л частка апоптотичних клітин зросла до $9,3 \pm 0,7\%$, а при концентрації 20 мкмоль/л – до $9,6 \pm 1,1\%$, що демонструє слабку індукцію апоптозу препаратом (див. рисунок). Між середніми значеннями кількостей апоптотичних клітин у контролі та при введенні росковітину у зазначених концентраціях не було достовірної різниці.

Кількість некротичних клітин у контрольній групі була мінімальною і становила $3,2 \pm 0,9\%$. Це свідчить про відсутність значного ушкодження клітин (див. рисунок). При концентрації росковітину 10 мкмоль/л кількість некротичних клітин залишалася низькою ($4,4 \pm 1,2\%$), а при концентрації 20 мкмоль/л цей показник зріс лише до $8,3 \pm 1,1\%$, що говорить про слабкий токсичний вплив препарату. Між середніми значеннями кількостей некротичних клітин у контролі та при введенні росковітину не було достовірної різниці.

Таким чином, результати проведеного дослідження показали, що росковітин має обмежений вплив на життєздатність нейронів гіпокампа за нормальних умов культивування. Однак важливим є те, що він може бути ефективним інструментом для вивчення і моделювання механізмів апоптозу та нейрональної загибелі при нейродегенеративних захворюваннях, зокрема ХА. Ці висновки дають змогу ширше розглянути роль CDK5, яка є ключовою мішенню для росковітину, та перспективи його застосування у терапії.

CDK5 – це пролінспрямована серин/треонінова протеїнкіназа, яка регулює різноманітні клітинні процеси в нейронах, порушення регуляції яких ставить під загрозу нормальну роботу мозку [18]. Основна особливість цього ферменту полягає у його активації через зв'язування

з нейроспецифічними білками p35 або p39, а не циклінами, як у разі CDK2 та CDK9 [19]. Ця унікальність забезпечує CDK5 важливе значення у регуляції синаптичної пластичності, транспорту аксонів, нейрональної міграції та підтримки цитоскелета.

CDK2 та CDK9, навпаки, є ключовими регуляторами клітинного циклу та транскрипції. CDK2 бере участь у прогресії через фази S і G2/M клітинного циклу, тоді як CDK9 функціонує у комплексі з циклінами T, забезпечуючи контроль транскрипції фосфорилуванням РНК-полімерази II [20]. Таким чином, CDK5 відіграє нейронспецифічну роль, тоді як CDK2 і CDK9 мають універсальні функції в проліферативних клітинах.

Блокатори CDK, такі як росковітин, діють за допомогою конкурентного зв'язування з активним центром кінази, що пригнічує їх активність. Росковітин є селективним інгібітором CDK5, але також впливає на CDK2 і CDK9, що розширює його терапевтичний потенціал. Блокування CDK5 за допомогою росковітину знижує патологічне фосфорилування τ -протеїнів, що є однією з ключових ознак нейродегенеративних захворювань, зокрема ХА [6, 12]. Окрім цього, інгібітори CDK можуть впливати на процеси апоптозу, знижуючи рівень окисного стресу та запалення в клітинах [14, 21].

Дисрегуляція CDK5, зокрема внаслідок утворення p25 (тривалої форми p35), спричиняє патологічні процеси, які лежать в основі нейродегенеративних змін у нейронах. Надмірна її активація асоціюється з накопиченням τ -протеїнів, нейрофібрилярними клубками, порушенням цитоскелета та індукцією апоптозу [7]. Отже, селективне блокування CDK5 являє собою перспективну стратегію терапії таких захворювань, як ХА, паркінсонізм і

боковий аміотрофічний склероз [3, 22].

Дані попередніх досліджень показали, що росковітин ефективно знижує патологічні прояви в клітинних і тваринних моделях нейродегенеративних хвороб [23–25]. Крім того, його здатність впливати на кілька CDK робить його цікавим агентом для мультимодального лікування. Водночас важливим є зниження побічних ефектів, пов'язаних із пригніченням CDK2 та CDK9, через розробку більш селективних інгібіторів.

ВИСНОВКИ

Результати нашого дослідження демонструють, що росковітин сам по собі має обмежений вплив на життєздатність нейронів гіпокампа: частка інтактних клітин залишається високою, тоді як рівні апоптозу та некрозу зростають незначно. Це свідчить про низьку токсичність препарату за таких умов. Однак ці результати створюють основу для подальшого аналізу впливу росковітину на моделі нейродегенеративних захворювань, зокрема ХА. Порівняння ефекту препарату в умовах здорової культури та моделі ХА може розкрити його потенціал у зниженні нейрональної загибелі та підтриманні клітинної життєздатності, що є ключовим для розробки терапевтичних стратегій.

Робота була підтримана грантом Національного фонду досліджень України № 2023.05/0023, проєкт «Біомедичний центр інноваційних досліджень у галузі нейронаук».

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

N.M. Rozumna, V.V. Hanzha, O.O. Lukyanets

THE EFFECT OF THE CDK5 INHIBITOR ROSCOVITINE ON THE VIABILITY OF RAT HIPPOCAMPAL NEURONS IN CULTURE *IN VITRO*

*Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: nata_nr@biph.kiev.ua*

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that causes problems with memory, thinking, and behavior. Currently, there are no medications available to prevent or eliminate the pathological phenomena of this disease, but symptomatic treatment is used, which can improve the patient's condition. In this context, the aim of our study was to investigate the effect of roscovitine, a selective inhibitor of the neuron-specific kinase CDK5, on the viability of hippocampal neuronal cultures. CDK5 plays an important role in maintaining the structure and function of neurons, including synaptic plasticity and cytoskeletal integrity. Therefore, the study of the neuroprotective effect of roscovitine opens the way for its potential application in the treatment of neurodegenerative diseases, particularly AD. The study was conducted on rat hippocampal neuron cultures using double staining of cells with two DNA-binding dyes (Hoechst 33258 and propidium iodide). Neuronal viability was assessed via confocal laser scanning microscopy by comparing cell fluorescence under control conditions and after 24 hours of incubation with roscovitine. The results showed that roscovitine had minimal effects on neurons viability under normal conditions, causing only a slight increase in apoptosis and necrosis compared to controls, indicating its low toxicity on cells. Thus, our study highlights the importance of evaluating roscovitine's effects for use in a cellular model of AD and determining its potential to counteract amyloid-beta-induced neurodegeneration

Key words: roscovitine; CDK5; neurodegenerative diseases; Alzheimer's disease; hippocampal cell culture; apoptosis; necrosis.

REFERENCES

1. Tyshchenko YN, Lukyanetz EA. Role of mitochondrial disfunction in the development of alzheimer's disease. *Fiziol Zh* 2020;66(6):88-96. doi: 10.15407/FZ66.06.088.
2. Ganzha VV, Lukyanetz EA. The role of beta-amyloid in norm and at alzheimer's disease. *Fiziol Zh* 2021;67(1):57-66. doi: 10.15407/fz67.01.057.
3. Zhang Y, Chen H, Li R, Sterling K, Song W. Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future. *Sig Transduct Target Ther* 2023;8(1):248. doi: 10.1038/s41392-023-01484-7.
4. WHO. Global action plan on the public health response to dementia 2017 - 2025 2017. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/259615/9789241513487-eng.pdf?sequence=1>.
5. Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol Med Rep*. 2019;20(2):1479-87. doi: 10.3892/mmr.2019.10374.
6. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 1999;402(6762):615-22. doi: 10.1038/45159.
7. Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, Shih H, Tsai LH. Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron*. 2003;40(3):471-83. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00627-5.
8. Martin SP, Leeman-Markowski BA. Proposed mechanisms of tau: relationships to traumatic brain injury, Alzheimer's disease, and epilepsy. *Front Neurol* 2024;14. doi: 10.3389/fneur.2023.1287545.
9. Hirokawa T, Horie T, Fukiyama Y, Mimura M, Takai S, Kida T, Oku H. Roscovitine, a cyclin-dependent kinase-5 inhibitor, decreases phosphorylated tau formation and death of retinal ganglion cells of rats after optic nerve crush. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15). doi: 10.3390/ijms22158096.
10. Sánchez-Martínez C, Gelbert LM, Lallena MJ, de Dios A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(17):3420-35. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.05.100.
11. Sava GP, Fan H, Coombes RC, Buluwela L, Ali S. CDK7 inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Metastas Rev*. 2020;39(3):805-23. doi: 10.1007/s10555-020-09885-8.
12. Mushtaq G, Greig NH, Anwar F, Al-Abbasi FA, Zamzami MA, Al-Talhi HA, Kamal MA. Neuroprotective mechanisms mediated by CDK5 inhibition. *Curr Pharm Des*. 2016;22(5):527-34. doi: 10.2174/1381612822666151124235028.
13. Lui A, Vanleuven J, Perekopskiy D, Liu D, Xu D, Alzayat O, Elgokhy T, Do T, Gann M, Martin R, Liu D-Z. FDA-approved kinase inhibitors in preclinical and clinical trials for neurological disorders. *Pharmaceuticals*. 2022;15(12):1546.
14. Tian Z, Feng B, Wang XQ, Tian J. Focusing on cyclin-dependent kinases 5: A potential target for neurological disorders. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:1030639. doi: 10.3389/fnmol.2022.1030639.
15. Hanzha VV, Rozumna NM, Kravenska YV, Spivak MY, Lukyanetz EA. The effect of cerium dioxide nanoparticles on the viability of hippocampal neurons in Alzheimer's disease modeling. *Front Cell Neurosci*. 2023;17:1131168. doi: 10.3389/fncel.2023.1131168.
16. Rozumna NM, Hanzha VV, Lukyanetz EA. Mementin protects the cultured rat hippocampal neurons treated by NMDA and amyloid β 1-42. *Front Neurosci*. 2023;17:1269664. doi: 10.3389/fnins.2023.1269664.
17. Sangweni NF, Dlodla PV, Chellan N, Mabasa L, Sharma JR, Johnson R. The implication of low dose dimethyl sulfoxide on mitochondrial function and oxidative damage in cultured cardiac and cancer cells. *Molecules*. 2021;26(23):7305. doi: 10.3390/molecules26237305.
18. Dhavan R, Tsai L-H. A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(10):749-59. doi: 10.1038/35096019.
19. Hawasli AH, Bibb JA. Alternative roles for Cdk5 in learn-

- ing and synaptic plasticity. Biotechnol J. 2007;2(8):941-8. doi: 10.1002/biot.200700093.
20. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat Rev Cancer. 2009;9(3):153-66. doi: 10.1038/nrc2602.
21. Merce P, Anna MC, Ester V, Clemens A, Susana Garcia de A, Daniel A, Francesc XS, Antoni C. Inhibitors of cyclin-dependent kinases: potential drugs for the treatment of neurodegenerative disorders? Curr Med Chem – Central Nervous System Agents. 2005;5(2):101-9. doi: 10.2174/1568015054022371.
22. Law ME, Corsino PE, Narayan S, Law BK. Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer therapeutics. Mol Pharmacol. 2015;88(5):846-52. doi: 10.1124/mol.115.099325.
23. Liu J, Yang J, Xu Y, Guo G, Cai L, Wu H, Zhao Y, Zhang X. Roscovitine, a CDK5 inhibitor, alleviates sevoflurane-induced cognitive dysfunction via regulation tau/ GSK3 β and ERK/PPAR γ /CREB signaling. Cell Physiol Biochem. 2017;44(2):423-35. doi: 10.1159/000485008.
24. Rousselet E, Létondor A, Menn B, Courbebaisse Y, Quillé ML, Timsit S. Sustained (S)-roscovitine delivery promotes neuroprotection associated with functional recovery and decrease in brain edema in a randomized blind focal cerebral ischemia study. J Cereb Blood Flow Metab. 2018;38(6):1070-84. doi: 10.1177/0271678x17712163.
25. Le Roy L, Letondor A, Le Roux C, Amara A, Timsit S. Cellular and molecular mechanisms of R/S-roscovitine and CDKs related inhibition under both focal and global cerebral ischemia: a focus on neurovascular unit and immune cells. Cells. 2021;10(1):104.

*Матеріал надійшов
до редакції 12.12.2024*