



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ**

Д-Р ХРИСТИНА ЦАНКОВА АНГЕЛОВА

**РОЛЯ НА КИТОРФИНА В ПОВЕДЕНЧЕСКИТЕ И
ХИСТОЛОГИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРЕДИЗВИКАНИ ОТ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА БОЛЕСТТА НА
АЛЦХАЙМЕР**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация за присъждане
на образователната и научна степен “ДОКТОР”

Научни ръководители:
доц. д-р Даниела Пехливанова – ИНБ-БАН
проф. д-р Елена Джамбазова – МФ, СУ ”Св. Климент Охридски”

София, 2023 г.



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ**

Д-Р ХРИСТИНА ЦАНКОВА АНГЕЛОВА

**РОЛЯ НА КИТОРФИНА В ПОВЕДЕНЧЕСКИТЕ И
ХИСТОЛОГИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРЕДИЗВИКАНИ ОТ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА БОЛЕСТТА НА
АЛЦХАЙМЕР**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация за присъждане на образователната и научна
степен “ДОКТОР” в професионално направление 7.1 Медицина
научна специалност Фармакология

Научни ръководители:

доц. д-р Даниела Пехливанова – ИНБ-БАН

проф. д-р Елена Джамбазова – МФ, СУ ”Св. Климент Охридски”

София, 2023 г.

Дисертационната работа съдържа 101 стандартни машинописни страници и е онагледена с 26 фигури и 7 схеми. Библиографията обхваща 358 заглавия, от които 5 на кирилица и 358 английски.

Изследванията по дисертационната работа са извършвани в Институт по невробиология – БАН, Медицински Университет – София и Институт по микробиология – БАН. На заседание на Научния съвет на ИНБ-БАН бе разкрита процедура за защита с протокол № 2 / 21.03 2023 г.

Защитата на дисертационната работа ще се състои на **04.07.2023 г. от 11.00 ч.** в залата на Институт по невробиология – БАН, ул. "Академик Г. Бончев", бл. 23, ет. 2, на открито заседание на научното жури, утвърдено от НС със Заповед на Директора на ИНБ-БАН № 37/26.04.2023 г. в състав:

Председател: проф. д-р Яна Чекаларова, рецензент

Членове:

проф. д-р Росица Замфирова (ИНБ-БАН), становище

проф. д-р Александър Стойнев, дмн (МУ София),
рецензент

проф. д-р Албена Йорданова (СУ „Св. Климент
Охридски”), становище

доц. д-р Христина Ночева (МУ София), становище

Материалите по защитата са на разположение на интересуваните се в библиотеката на Институт по невробиология на БАН, бл. 23, ет. 2.



АК - аминокиселини
КТР - киоторфин
ПЕТ - позитронно-емисионна томография
ССЗ - сърдечно-съдови заболявания
ЦАА - церебрална амилоидна ангиопатия
ЦНС - централна нервна система
ЯМР- ядрено-магнитен резонанс
AD - Болест на Алцхаймер
AMPA - α -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионова киселина
ApoE - аполипопротеин E
APP - амилоид прекурсорен протеин
A β - бета амилоидни пептиди
CSF - цереброспинална течност
DG – зъбчата гънка
EOAD - болест на Алцхаймер с ранно начало
fAD - фамилна форма на болестта на Алцхаймер
HP-tau - хиперфосфорилиран тау протеин
HTERT – човешка теломеразна обратна транскриптаза
icv - интрацеребро-вентрикуларно
IP3 - инозитол-трифосфат
LOAD - болест на Алцхаймер с късно начало
LTP – дълготрайно потенциране
NFT - неврофибрилари сплитания (възли)
NMDA - N-метил d-аспартат
NO - азотен оксид
NOS - азотноокисна синтаза
MTHFR – метилен-тетрахидрофолат редуктаза
PAG - периакведуктусно сиво вещество
PHF - сдвоени спирални нишки
PLC - фосфолипаза C
PSEN - пресенилин
sAD - спорадична форма на болестта на Алцхаймер
SAM - S-аденозил метионин
SP - сенилни плаки
STZ - стрептозотоцин
TNF α - тумор-некротизиращ фактор алфа



Болестта на Алцхаймер (AD) е широко разпространено невродегенеративно заболяване, свързано с прогресивна загуба на паметта, която се проявява след продължителна пресимптоматична фаза. Интрацеребро-вентрикуларното (icv) инжектиране на стрептозотонин (STZ) у плъхове е един от утвърдените експериментални модели на AD. В процеса на търсене на нови биомаркери за ранна диагностика на заболяването, е установено понижено ниво на ендогенния дипептид киоторфин (КТР) в цереброспинална течност на хора болни от AD, което е съпроводено с повишено съдържание на фосфорилиран тау-протеин. Нашата хипотеза е, че невропептидът КТР играе определена роля в патофизиологията на заболяването. Литературните данни показват, че той е невромедиатор и невромодулятор в централна нервна система (ЦНС), който играе съществена роля в регулацията на поведенческите отговори и възстановяването на нарушената хомеостаза при стрес. Наред с данните за аналгетичното и невромодулаторно действие на КТР, в литературата съществуват данни и за потенциалния му невропротективен ефект. В достъпната ни литература не намерихме данни за механизмите, лежащи в основата на ефектите на КТР в процесите на запаметяване и невродегенеративните изменения свързани с AD.



Целта на настоящия труд е да се проучи ролята на неuropeптида КТР – неuropeпид/невромедиатор в ЦНС, в развитието на поведенческите и хистологични изменения предизвикани от ICV инжектиране на стрептозотоцин (STZ, експериментален модел на sAD) у плъхове от порода Wistar.

За постигането на поставената цел бяха предвидени следните основни задачи:

1. Оценка на въздействието на различни дози КТР върху болковата чувствителност, основни параметри на изследователското поведение и паметта у здрави плъхове.
2. Изследване на промените в двигателната и изследователска активност, състоянието на безпокойство в непозната среда, пространствена и работна памет, отлагане на β -амилоид в хипокамп и мозъчни кръвоносни съдове през ранната фаза на развитие на AD (един месец след инжектиране на STZ) у плъхове третирани с КТР или с физиологичен разтвор, спрямо поведението на здрави контролни плъхове.
3. Изследване на динамиката в двигателната и изследователска активност, състоянието на безпокойство в непозната среда, пространствена и работна памет, нива на карбонилирани протеини в хипокампус и префронтална мозъчна кора, загуба на неврони в CA1 и CA3 полета на хипокампус, отлагане на β -амилоид в хипокамп и мозъчни кръвоносни съдове през късната фаза на развитие на AD (четири месеца след инжектиране на STZ) у плъхове третирани с КТР или с физиологичен разтвор, спрямо поведението на здрави контролни плъхове.



Експериментите бяха проведени върху 110 мъжки бели плъха от порода Wistar (180-200g). Животните бяха отглеждани в специални кафези застлани с талаш, в групи по пет животни, при стандартни лабораторни условия - температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$, влажност на въздуха 55 % и свободен достъп на храна и вода, с изключение на времето за провеждане на експериментите. Светлината бе с регулиран цикъл: 8-20 часа светло/ 20-8 часа тъмно. Всички опити бяха проведени между 10.00 и 13.00 ч през сезоните пролет и есен.

Всички експериментални процедури са съобразени с изискванията за хуманно отношение към експерименталните животни, които са в съгласие с EC Directive 2010/63/EU и одобрени (No 176/2019) от Българската Агенция за Безопасност на Храните (БАБХ).

I. *In vivo* методи

1. Стереотаксична имплантация на водещи канюли и интрацеребровентрикуларно инжектиране

Преди имплантиране на канюлата животните бяха анестезирани с с кетамин /100 mg/kg.i.m/ и ксилазин /4 mg/kg. интраперитонеално/ и фиксирани в стереотаксичен апарат. След надлъжен срез, беше отстранена кожата и надкостницата на черепа. С помощта на зъботехническа бормашина, в черепа беше пробит отвор с диаметър 0.5 mm и координати спрямо брегмата $P = -1.0 \text{ mm}$, $L = 1.6 \text{ mm}$ и $h = -4.0 \text{ mm}$ съгласно атласа на Paxinos and Watson (1998). Водещите канюли изработени от неръждаема стомана с дължина 10 mm и диаметри: вътрешен = 0.413 mm и външен = 0.718 mm, бяха въведени посредством прикрепване на канюлите към държател на стереотаксичен апарат на $h = -4.0 \text{ mm}$ и фиксирани със зъболекарски цимент

към две предварително монтирани към париеталната кост винтчета. Раната беше затворена с хирургически шевове, обработена с антисептици и антибиотик гентамицин, след което животните бяха поставени под наблюдение до пълно излизане от наркозата. Появата на цереброспинална течност в канюлата след имитация на инжектиране 24 часа по-късно е проверка за правилното поставяне на водещата канюла в латералния мозъчен вентрикул.

ICV инжектирането на плъхове беше осъществено посредством микроинжек-ционна спринцовка Hamilton с обем на инжектиране от 10 μ l, която предварително е свързана посредством мека тръбичка със стерилна инжекционна канюла 26 G. След период на възстановяване от 5 дни, в латералния вентрикул се инжектира KTP (еднократни дози от 25, 50, 100 μ g/плъх, субхронично третиране в доза 100 μ g/плъх/ден) или изкуствена цереброспинална течност (aCSF) посредством микроинжекционна спринцовка свързана чрез гъвкава връзка с инжекционна канюла. Разтворът се инфузира бавно в продължение на една минута, за да се разпространи във вентрикулите и да се избегне излизането му от водещата канюла. Kyotorphin (L-Tyrosyl-L-arginine; KTP; Sigma-Aldrich), беше разтворен в aCSF с концентрация на разтвора съответна на еднократната доза в 5 μ l. Периодът на субхроничното третиране е 14 дневен – 7 дни преди icv прилагането на STZ, и 7 дни след инжектирането на токсина.

2. Експериментален модел на AD

Streptozotocin (N(Methyl-nitrosocarbamoyl)- α -d-glucosamine; STZ; Sigma-Aldrich) беше разтворен непосредствено преди инжектиране в 5 μ l стерилна aCSF и цитратен буфер (pH 4.5) в съотношение 1:1. до получаване на бистър разтвор с бледо жълт цвят. След периода на предварителното третиране, във всяка от канюлите се инжектира STZ в доза 3 mg/kg телесна маса, два пъти с интервал от 48 ч., в обем от 5 μ l (по 2.5 μ l във всеки от

латералните вентрикули). Sham и КТР групите се инжектират с еквивалентен обем разтворител.

3. Методи за изследване на състояние на двигателна и изследователска активност и тревожност

3.1. *Open-field* тест

Процедурата се състои в поставяне на изследваното животно в центъра на апарат, който се състои от непрозрачна кутия с размери 100 x 100 x 60 cm, разделена на две зони – периферна (20 cm покрай стените) и централна (60 x 60 cm) и видео камера свързана с компютърна програма video tracking system (SMART PanLab software) на Harvard Apparatus, USA. Проследява се дължината на изминатата траектория и престоя на животното в периферната и централна зони за период от 1 min в продължение на 5 min. Централната зона е възприета за аверсивна, като престоя и дължината на изминатата в него траектория, изчислени като процент от общата стойност и повторните влизания в зоната изразяват нивото на безпокойство. Хабикуацията (привикване) към непознатата околна среда беше оценена като намаляване на изминатата траектория след първата минута на наблюдение. Този тест позволява оценка на общата двигателна активност и влиянието ѝ върху изследователското поведение [Broadhurst, 1957; Broadhurst, 1958].

3.2. *Elevated plus-maze* тест

Използва се непрозрачен лабиринт, който се състои от две отворени рамене (50 x 10 cm), две затворени рамене (50 x 10 x 50 cm) и централна платформа (10 x 10 cm). Апаратът е повдигнат на 50 cm от основата [Pellow and File, 1986]. Животните се поставят върху централната платформа с глава насочена към едно отворено рамо. Отворените рамене са приети за нежелани и движението или престоят в тях е

показател за понижено поведение на безпокойство. Отчитат се общата измината траектория, процентът на изминатата траектория в отворените рамене и процентът на времето прекарано в отворените рамене от общите стойности.

4. Метод за изследване на болковата чувствителност – ***Paw-pressure*** тест

Чрез аналгезиметър (Ugo Basile) се изследва праговата стойност на рефлексът на болково отдръпване [Randall & Selitto, 1957]. Последователно върху задната дясна и лява лапа на плъх се прилага механичен натиск с автоматично зададена нарастваща стойност до отдръпване на лапата. Стойността на механичния натиск (в грамове) се приема за механичен болков праг, като се взима средната стойност от двете измервания. Точността на метода се оптимизира с еднократно трениране на животните 1 ден преди теста без прилагане на болков стимул [Anseloni et al., 2003].

5. Методи за изследване на паметта

5.1. ***T-maze*** тест

Тестът се предхожда от едноседмичен режим с ограничение на количеството храна, с цел активиране на безусловен рефлекс за търсене на храна. Изследва се пространствената памет базирана на присъщото редуване (алтернация) на познати с непознати части от пространството [Deacon & Rawlins, 2006]. Преди началото на теста всяко животно се поставя за 15 min в апарата с разпръснати в него хранителни примамки, за да се постигне хабитуация към новата среда. Апаратът се състои от Т-образно кръстосан лабиринт със затварящи се рамене (50 x 10 x 10 cm). Процедурата включва 10 последователни сесии с интервал между тях от 1–2 min в три последователни дни. Всяка сесия се състои от поставяне на хранителна примамка в двете странични рамене, като при първото поставяне на животното в стартовото

рамо една от вратите е затворена и се предоставя възможност за консумиране само на примамката от едното рамо. Във втората част на сесията вратата се отваря и се дава възможност на поставеното в стартовото рамо животно да избере алтернативното на посетеното рамо (правилен отговор) или вече посетеното рамо (грешен отговор).

5.2. Novel object recognition тест

Тестът изследва работната памет и се базира на разпознаването на познат и нов обект, които се представят на животното с известен интервал. Апаратът се състои от равномерно осветена звукоизолирана непрозрачна кутия /50 x 50 x 60 cm/ и поведението на плъхове се наблюдава от два независими експериментатора. В деня преди експерименталната сесия плъховете се поставят за 15 min в арената на отвореното поле за привикване към обстановката. Експерименталната сесия се състои от два етапа. В първия етап се предоставя на животното два еднакви обекта (F), поставени в притивоположни позиции, на 5 cm от ъглите и се отчита общото време на изследване на обектите за 5 min. Вторият етап се провежда 15 min след първия, като към F се добавя нов обект (N) и плъхът се оставя да разглежда двата обекта в продължение на 5 min. Обектите не приличат на храна и вода и се почистват след всеки тест заедно със цялата кутия с алкохол за предотвратяване на следи от миризма. Измерва се общото време, което плъхът прекарва в изследване на всеки един от обектите, като насочва носа си на разстояние по-малко от 2 cm и подушва обекта. Изчислен беше Индекс за разпознаване *RI* [Pezze et al., 2015]:

$$RI = \frac{t_N}{t_N + t_F} \times 100$$

където t_N – време за разпознаване на N; t_F – време за разпознаване на F

II. *In vitro* методи за изучаване на късните изменения в мозъчните структури

1. Хистологични методи

След поведенческото изследване, животните $n = 6$ на група/бяха перфузирани перкардиално първоначално с 0,05M фосфатно-буфериран физиологичен разтвор при pH 7,3, последвано от 4% параформалдехид в 0,1M фосфатен буфер под дълбока анестезия /тиопентал, 40 mg / kg, I.P./. Мозъците бяха отстранени, поставени фиксирани в същото фиксиращо вещество за 24 часа при 4 ° C, промити с вода и дехидратирани в повишаващи се концентрации на етанол. Всеки мозък беше разчленен и разделен по протежение на септотемпоралната ос на хипокампата на три сектора: септален, септотемпорален и темпорален. Пробите се изплакнаха в ксилол, вградиха се в парафинови блокове и се секционираха в короналната равнина /от брегма -2.12 mm до -6.04 mm/ с дебелина 5 μ m [Paxinos & Watson, 1998]. За записи бяха избрани три произволно подбрани среза, от всеки сектор, от всички изследвани тъканни блокове. Всички проби бяха изследвани на микроскоп Nikon Eclipse 80i и заснети с цифрова камера Nikon DMX 1200 в идентичните зони на хипокампуса.

Рутинната техника за оцветяване с Cresyl violet се използва за изследване на цялостната морфология и локализация на клетъчните тела в хипокампуса. Оцветени с Nissl секции бяха използвани за определяне броя на клетките и бе изчислена средна стойност на клетките. Броят на пирамидалните клетки в хипокампуса беше преброен в CA1 и CA3 регион. Плътноста на телата на нервните клетки и количеството на клетката в хипокампа в областите CA1 и CA3 бяха оценени, като се използваше същия софтуер на Nikon NIS Elements Digital Imaging. Невроналната плътност в избраните мозъчни области се определи количествено чрез определяне на процента

измервателна решетка, заета от оцветени клетки. Стойностите осигуряват относителен индекс на броя на оцветените неврони в избраните области на мозъка. Рутинното оцветяване с Congo Rot се направи за проверка на А β амилоидни отлагания в хипокампа и кръвоносните съдове.

2. Биохимични методи

След края на поведенческите изследвания, животните се декапират посредством гилотина и непосредствено след това се събира проба от кръвта във вакутейнери с ЕДТА за предотвратяване на хемокоагулацията. Кръвните проби се центрофугират 3 минути при 5000 оборота в минута при температура 4° C, след което се изолира кръвната плазма, която се използва за определяне на карбонилираните увредени протеини. Непосредствено след събиране на кръвните проби, главният мозък се отпрепарира върху лед и се изолират двата хипокампуса и префронталната кора, съответно на техните координати, съгласно атласа на плъшия мозък [Paxinus and Watson, 1998]. Изолираният тъканен материал се хомогенизира във фосфатен буфер с рН 7.8, след което се центрофугира и обработва съгласно протокола на производителя на кита за определяне на карбонилирани протеини. Образуването на карбонилни съединения е най-общият и широко използван маркер за окислението на протеина, както *in vitro*, така и *in vivo*. Беше използван анализа за откриване на протеинови карбонилни групи, а именно дериватизация на карбонилната група с 2,4-динитрофенилхидразин (DNPH), което води до образуване на стабилен динитрофенил (DNP) хидразин, който може да се определи количествено спектрофотометрично при 276 и 370 nm. Пиковата абсорбция около 360 nm определи съдържанието на карбонил [Dalle-Donne et al., 2006 г]. Общото съдържание на протеини бе намерено с помощта на рутинния метод на Лоури [Lowry, 1951].

III. Статистически анализ на данните

Експерименталните данни са обработени с one-way ANOVA с фактори третиране с КТР (нива физиологичен разтвор и КТР) или АД (нива контроли и със заболяване) с Dunnett's пост-тест, който е най-подходящ за сравняване на различни видове третиране спрямо контролната група. При тестове с многократно измерване на параметри е използван one-way ANOVA repeated measures. $P < 0.05$ се приема за статистически значимо. Получените резултати са представени като средноаритметични стойности и стандартните им грешки ($\bar{x} \pm \text{SEM}$).

IV. Експериментален дизайн

Експерименталните животни бяха разпределени в групи по 10, като всяка задача беше свързана с последователно изпълнение етапи както следва:

1. За изпълнение на първата задача бяха използвани: група Sham – с имплантирани канюли в латералните мозъчни вентрикули и инжектирани с изкуствена цереброспинална течност интрацеребровентрикуларно /ICV/; групи КТР – здрави плъхове, третирани с киоторфин в еднократни дози от 25, 50, 100 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ плъх и субхронично 100 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}/\text{плъх}$ /ден, 10 ден, ICV;

1.1. Оперативно имплантиране на водещи инжекционни канюли в латералните мозъчни вентрикули.

1.2. Период на възстановяване и адаптация – 5 дни след операцията животните се наблюдават и хендлират ежедневно от обучен експериментатор.

1.3. Изследване на ефектите от еднократно прилагане на дози КТР 25, 50 и 100 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}/\text{плъх}$, ICV, върху болковата чувствителност при метод за предизвикване на болка чрез механичен натиск върху задната лапа на плъх. Болковият праг беше изследван 15 min след инжектиране на пептида.

1.4. Изследване на ефектите от еднократно прилагане на дози КТР 25, 50 и 100 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}/\text{плъх}$, ICV, върху

изследователското поведение и хабиутация при тест „open field”, поведение на безпокойство при тест „elevated plus maze”, оперативната памет при тест „novel object recognition”, 15 min след инфузията на пептида.

1.5. Изследване на ефектите от субхроничното третиране с КТР в доза 100 µg/5µl/ден, ICV, върху изследователското поведение и хабиутация при тест „open field”, 15 min след осмата инфузия на пептида.

1.6. Изследване на ефектите от субхроничното третиране с КТР в доза 100 µg/5µl/ден, ICV, върху поведение на безпокойство при тест „elevated plus maze”, 15 min след осмата инфузия на пептида.

1.7. Изследване на ефектите от субхроничното третиране с КТР в доза 100 µg/5µl/ден, ICV върху болковата чувствителност при метод за предизвикване на болка чрез механичен натиск върху задната лапа на плъх. Болковият праг беше изследван 15 min след деветата инфузия на пептида.

1.8. Изследване на ефектите от субхроничното третиране с КТР в доза 100 µg/5µl/ден, ICV, върху оперативната памет при тест „novel object recognition”, 15 min след десетата инфузия на пептида.

1.9. Изследване на нивата на карбонилираните протеини в кръвна плазма и хипокампус след субхроничното третиране с КТР в доза 100 µg/5µl/ден, 10 дни, ICV.

2. Втора задача: Sham (Controls) – ICV; AD - /STZ, 3 mg/kg, ICV /; AD + КТР - третирани ICV с КТР µg/5µl/плъх /ден, 7 дни преди и 7 дни след STZ 3 mg/kg, ICV.

2.1. Оперативно имплантиране на водещи инжекционни канюли в латералните мозъчни вентрикули.

2.2. Период на възстановяване и адаптация – 5 дни след операцията животните се наблюдават и хендлirat ежедневно от обучен експериментатор.

2.3. Субхронична инфузия на КТР в дневна доза от 100

µg/5µl/ден, в продължение на 7 дни. Инжектиране на пряно приготвен разтвор на стрептозотоцин (STZ) в доза 3 mg/kg/5µl, ICV, 1 час след инфузията на КТР и втора доза след 48 часа. Субхронична инфузия на КТР в дневна доза от 100 µg/5µl/ден, в продължение на 7 дни след първото прилагане на STZ.

2.4. Изследване на въздействието на STZ-ICV, един месец след прилагане на токсина, върху поведението на безпокойство, и изследователското поведение чрез тест „open field”, оперативната памет при тест „novel object recognition”, както и хистологично установяване на амилоид бета (Aβ) пептид в хипокампус и мозъчни кръвоносни съдове чрез селективно оцветяване с Congo rod.

2.5. Изследване на ефектите на субхроничното третиране с КТР (100 µg/5µl/ден, ICV, 14 дни) върху последствията от STZ-ICV, един месец след прилагане на токсина, върху поведението на безпокойство, и изследователското поведение чрез тест „open field”, оперативната памет при тест „novel object recognition”, както и хистологично установяване на амилоид бета (Aβ) пептид в хипокампус и мозъчни кръвоносни съдове чрез селективно оцветяване с Congo rod.

3. Трета задача: Sham (Controls) – ICV; AD - STZ, 3 mg/kg т.м., ICV ; AD + КТР - третирани icv с КТР µg/5µl/плъх /ден, 7 дни преди и 7 дни след 3 mg/kg, ICV.

3.1. Оперативно имплантиране на водещи инжекционни канюли в латералните мозъчни вентрикули.

3.2. Период на възстановяване и адаптация – 5 дни след операцията животните се наблюдават и хендлират ежедневно от обучен експериментатор.

3.3. Субхронична инфузия на КТР в дневна доза от 100 µg/5µl/ден, в продължение на 7 дни. Инжектиране на пряно приготвен разтвор на стрептозотоцин (STZ) в доза

3 mg/kg/5 μ l, ICV, 1 час след инфузията на КТР и втора доза след 48 часа. Субхронична инфузия на КТР в дневна доза от 100 μ g/5 μ l/ден, в продължение на 7 дни след първото прилагане на STZ.

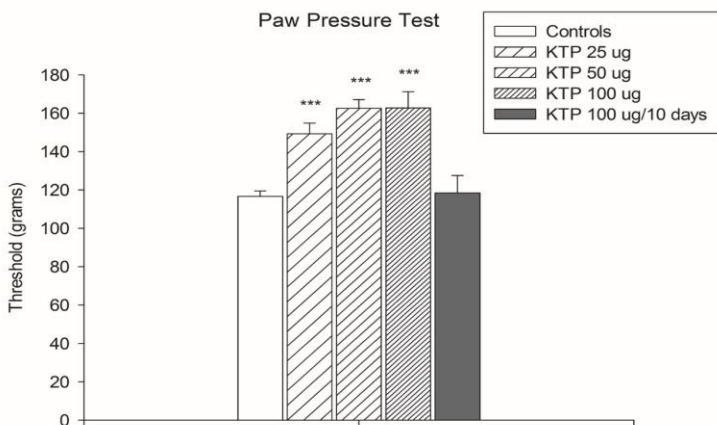
3.4. Изследване на въздействието на STZ-ICV, четири месеца след прилагане на токсина, върху изследователското поведение и хабитуация („open field”), поведението на безпокойство (“elevated plus maze”, „open field”), оперативната памет („novel object recognition”), пространствена памет (“T-maze”), хистологично изследване (оцветяване с Cresyl violet, Nissl) на общ брой неврони в CA1 и CA3 полета на хипокампус и биохимично определяне на нивото на карбонилирани протеини в префронтална мозъчна кора и хипокампус.

3.5. Изследване на ефектите на субхроничното третиране с КТР (100 μ g/5 μ l/ден, ICV, 14 дни) върху последствията от STZ-ICV, четири месеца след прилагане на токсина, върху изследователското поведение и хабитуация („open field”), поведението на безпокойство (“elevated plus maze”, „open field”), оперативната памет („novel object recognition”), пространствена памет (“T-maze”), хистологично изследване (оцветяване с Cresyl violet, Nissl) на общ брой неврони в CA1 и CA3 полета на хипокампус и биохимично определяне на нивото на карбонилирани протеини в префронтална мозъчна кора и хипокампус.



I. ЕФЕКТИ НА АНТИНОЦИЦЕПТИВНИ ДОЗИ КТР ВЪРХУ МОТИВАЦИЯТА, ТРЕВОЖНОСТТА И ПАМЕТА ПРИ ПЛЪХОВЕ

Данните от фиг. 1 показват, че еднократното ICV инжектиране на КТР в дози от 25, 50 и 100 μg /плъх предизвиква значителна антиноцицепция при тест raw pressure у плъхове ($F(3,33) = 15,373$, $p < 0,001$). Субхроничното третиране с дипептида при дневна доза от 100 μg /плъх обаче не доведе до съществени промени в нормалния праг на болка ($H = 0.121$, $P = 0.728$).



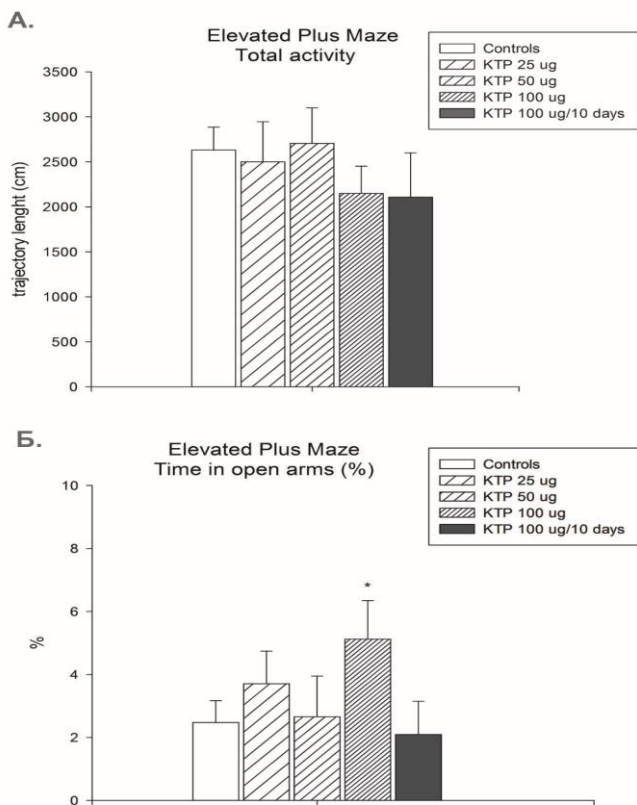
Фиг. 1 Антиноцицептивен ефект на КТР, инжектиран ICV в дози от 25, 50 и 100 μg /плъх, 15 минути преди тест raw pressure, проведен с аналгезиметър. Данните представят средни стойности $\pm$ SEM при $n = 10$. *** $p < 0,001$ спрямо контролите инжектирани с aCSF.

Изследването на тревожното поведение в непозната, аверсивна среда чрез теста повдигнат кръстосан лабиринт (ЕРМ) показва, че и трите използвани дози нямат никакво въздействие върху общата активност в тази предизвикателна среда ($F(3, 37) = 0,526, p > 0,05$, фиг. 2А) и само най-високата единична доза от 100 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ предизвика анксиолитичен ефект, увеличавайки съотношението на времето, прекарано в отворените аверсивни рамене на лабиринта, спрямо общото време на теста ($F(1, 21) = 4,199, p = 0,054$, фиг. 2Б). Субхроничното третиране с пептида не промени изследователското поведение на плъховете (Фиг. 2АБ).

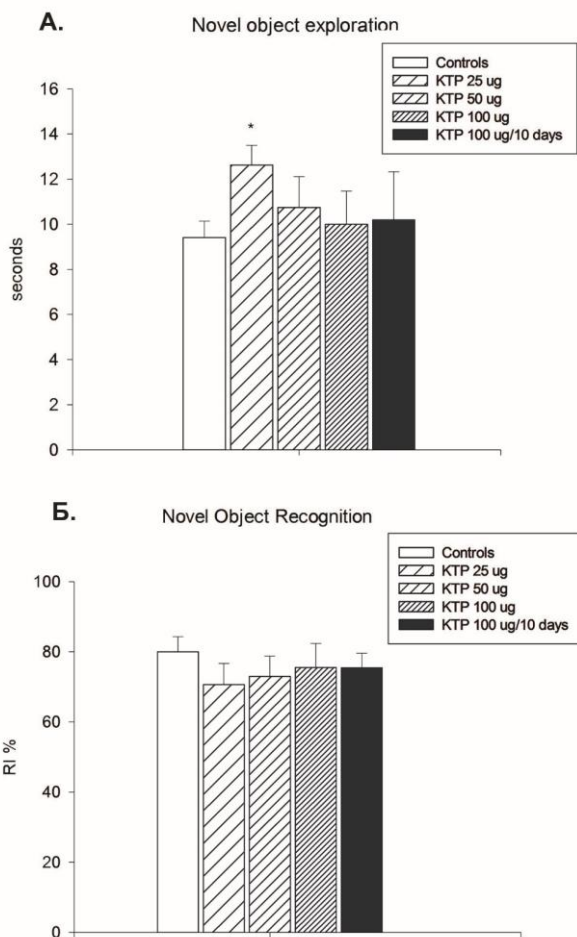
Novel object recognition test (NORT) също предоставя и данни за изследователското поведение. Времето, прекарано в изследване на двата нови обекта по време на тренировъчната фаза на теста, беше значително увеличено при плъхове, третирани с КТР в доза от 25 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ ($F(1, 19) = 8,027, p = 0,011$; Фиг. 3А). Другите дози нямаха ефект върху изследователското поведение, а всички използвани дози не оказват влияние върху нормалната работна памет по време на тестовата фаза ($p > 0,05$; Фиг. 3Б).

Резултатите от теста за проучване на общата двигателна активност, изследователско поведение и хабитуация open field (OFT) показват значителен, зависим от времето ефект на всички експериментални групи ($F(4, 174) = 23,882, p < 0,001$) (фиг. 4). В контролната група, движението намалява с времето ($F(4, 69) = 6,958, p < 0,001$), което демонстрира нормално привикване към новата околна среда. Третирането с КТР в доза от 25 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ не повлиява изследователското поведение в сравнение с контролите ($p \gg 0,05$), но по-висока доза от 50 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ предизвика понижаване на двигателната активност в последните 5 минути ($t = 2,571, p = 0,012$), увеличавайки скоростта на хабитуацията. Най-високата остра доза от 100 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ провокира значителен лекарствен ефект ($F(4, 109) = 6,146, p = 0,015$), намаляващ активността по време на 4 -та и 5 -та минута на теста ($t = 2,165, p = 0,033$; $t = 2,346, p = 0,021$). Най-изразеното намаление на амбулацията през всички периоди на наблюдение е регистри-

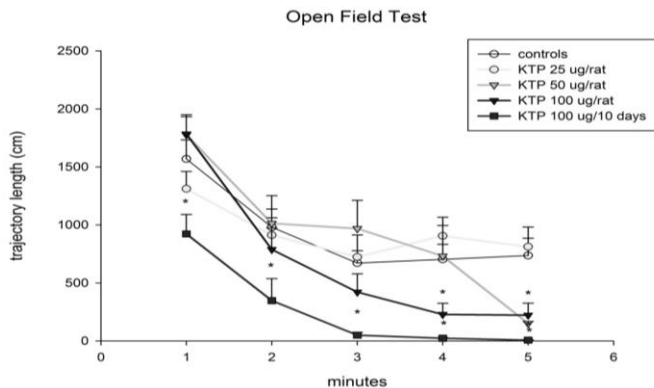
рано в групата, субхронично третирана с KTP ($F(4, 104) = 44.111, p < 0.001$), но моделът, свързан с хабитуацията се запазва ($H = 21.195, p < 0.001$).



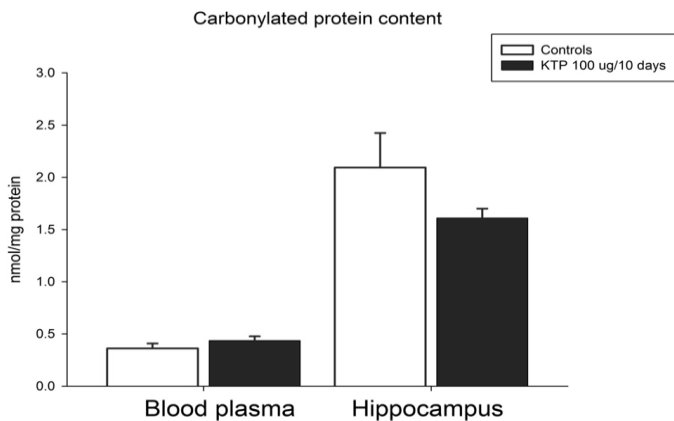
Фиг. 2. Изследователско поведение изразено с общата дължина на траекторията (в сантиметри), измината във всички зони на апарата Elevated plus maze (A) и поведение на безпокойство като съотношението (%) на времето, прекарано в отворените рамене, спрямо общото време (5 min) за провеждане на теста (B) 15 min след ICV инжектиране на aCSF (контроли) или KTP в дози 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ и 100 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ в продължение на 10 дни. Данните представят средно $\pm$ SEM с $n = 10$. * $p < 0,05$ спрямо контролите.



Фиг. 3. Общото време (в секунди), прекарано в изследването на новите обекти по време на фазата на обучение при NORT (А), и индексът на разпознаване (%), изразяващ работната памет при проучване на нов обект по време на тестовата фаза (Б) след ICV инжектеране на aCSF (контроли) или KTP в дози от 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ и 100 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ в продължение на 10 дни. Данните представят средно $\pm$ SEM с $n = 10$. * $p < 0,05$ спрямо контролите.



Фиг. 4. Общата дължина на изминатата траектория в апарата на open field (в сантиметри) за всяка минута, в продължение на 5-минутен тест, след ICV инжектиране на aCSF (контроли) или KTP в дози от 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ и 100 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ в продължение на 10 дни. Данните представят средно $\pm$ SEM с $n = 10$. * $p < 0,05$ спрямо контролите.

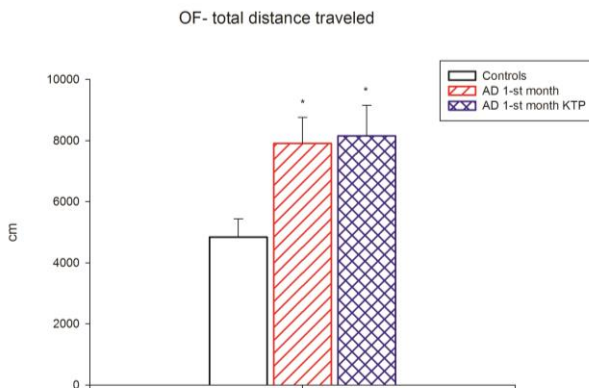


Фиг. 5. Обща концентрация на карбонилираните протеини (в nmol/mg протеини) в кръвната плазма и изолирания хипокампус след ICV инжектиране на aCSF (контроли) или KTP в доза от 100 $\mu\text{g}/\text{плъх}$ за 10 дни. Данните представят средно $\pm$ SEM с $n = 10$.

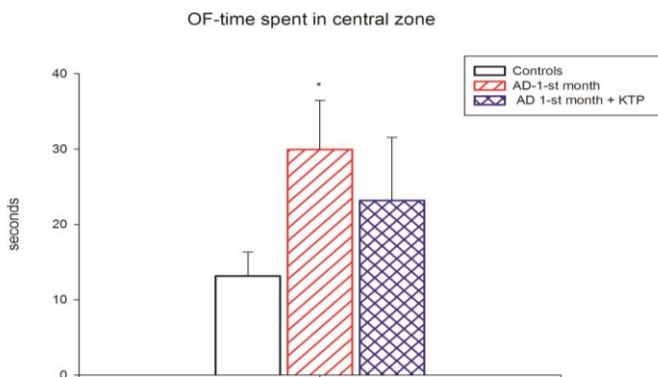
Анализът на карбонилираните протеини в кръвната плазма и хомогенат от изолиран хипокампус показва, че субхроничното третиране с КТР не променя значително нивото на увредените протеини както в кръвта, така и в мозъчната структура ($p > 0,05$; Фиг.5).

II. ЕФЕКТИ НА ХРОНИЧНОТО ТРЕТИРАНЕ С КИОТОРФИН ВЪРХУ РАННИТЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОВЕДЕНИЕТО И ХИСТОЛОГИЧНАТА СТРУКТУРА НА МОЗЪКА У ПЛЪХОВЕ С ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА AD

Интрацеребровентрикуларното инжектиране на стрептозотоцин предизвика съществени изменения в поведението на изследваните Wistar плъхове. През първия месец след инжектирането на токсина бяха наблюдавани спорадични клонични гърчови пристъпи, които не са включени в статистическата обработка, поради тяхната малка честота. Един месец след индуцирането STZ модел на деменция, тестът open field показва значително повишаване на общата двигателна активност ($F_{1, 16} = 8.647$, $p = 0.011$) у дементните животни (Фиг. 6), съпроводено с увеличаване на времето, прекарано в централната, аверсивна зона ($H = 4.339$, $p = 0.037$) (фиг. 7). а хроничното третиране с КТР не промени тези параметри.



Фиг. 6. Обща двигателна активност, изразена с дължина на изминатата траектория в тест open field у плъхове Wistar, един месец след индуциране на експериментален модел на AD, третирани 14 дни с aCSF или KTP в доза 100 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}/\text{ден}$. Данните представят средно $\pm$ SEM, $n = 10$, * $p < 0.05$.

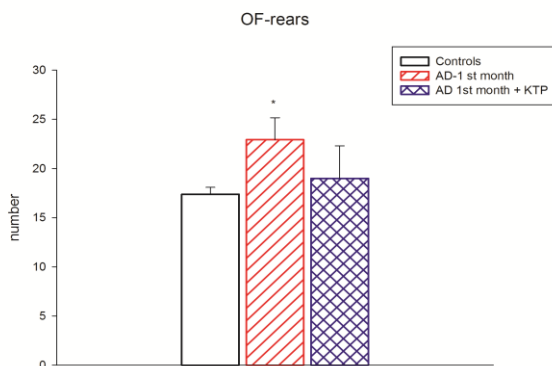


Фиг. 7. Продължителност на престоя в аверсивната централна зона на апарата при тест open field у плъхове Wistar, един месец след индуциране на експериментален модел на AD, третирани 14 дни с aCSF или KTP в доза 100 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}/\text{ден}$. Данните представят средно $\pm$ SEM, $n = 10$, * $p < 0.05$.

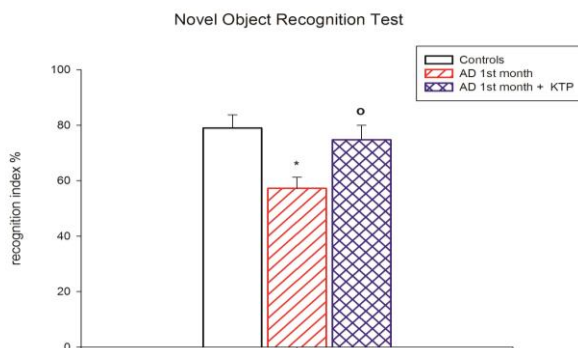
Вертикалната двигателна активност (брой изправяния), която изразява изследователската активност, също беше увеличена при групата STZ ($H = 5.624$, $p = 0.018$), а групата третирана с КТР бележи тенденция към нормализиране на изследователската активност до нивата на контролата (фиг. 8).

Един месец след индуцирането на модела на AD плъховете демонстрират значително нарушение в работна памет ($F_{1, 17} = 4.662$, $p = 0.046$), а третирането с КТР показва достоверно подобряване на когнитивните функции (Фиг. 9).

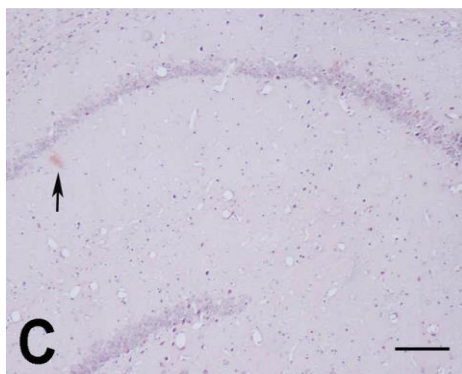
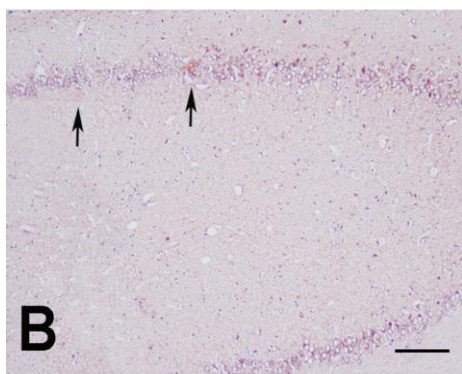
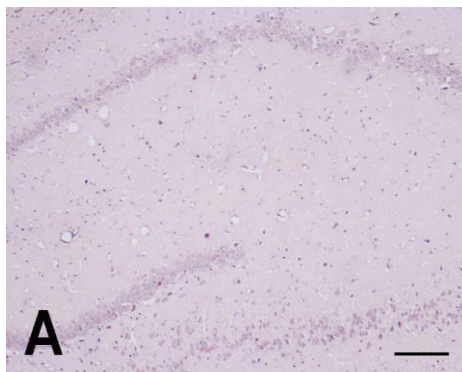
Един месец след индуциране на STZ модел се наблюдава отлагане на $A\beta$ в хипокампа на животните от AD и AD + КТР групите (Фиг. 10). Отлагането на $A\beta$ е представено със слабо разпространени амилоидни плаки, които най-често се наблюдават в CA1 и CA2 хипокампаални области и gyrus dentatus (Фиг. 10 и 11). Значителни натрупвания на $A\beta$ също се наблюдават в лептоменингеалните и мозъчните кръвоносни съдове, видими между tunica intima и tunica media на средните менингеални артерии при плъхове с AD и AD + КТР (фиг. 11).



Фиг. 8. Обща вертикална двигателна активност, изразена с брой на изправявания (*rears*) в тест *open field* у плъхове Wistar, един месец след индуциране на експериментален модел на AD, третиран 14 дни с aCSF или KTP в доза 100 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}/\text{ден}$. Данните представят средно $\pm$ SEM, $n = 10$, * $p < 0.05$.

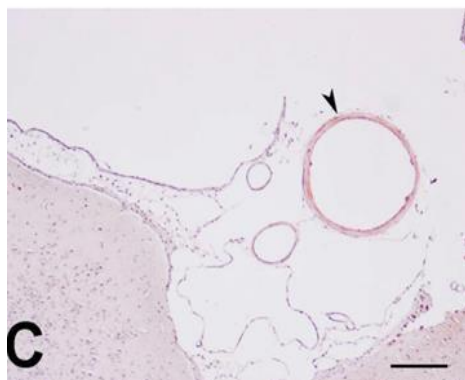
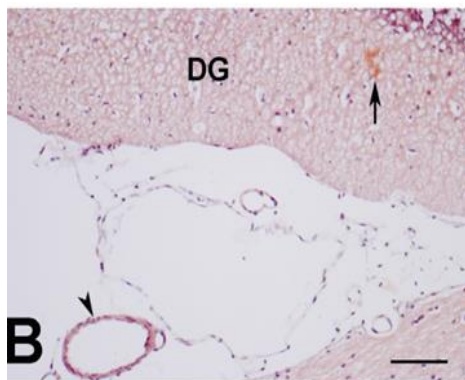
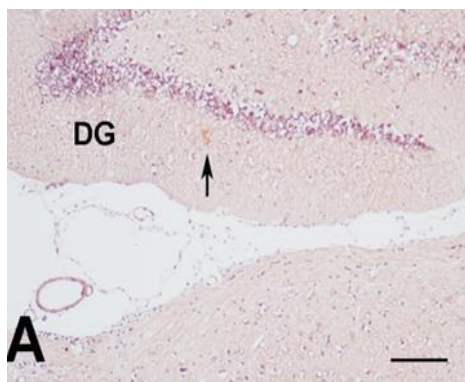


Фиг. 9. Ранни ефекти на STZ-индуцирания експериментален модел на AD (един месец след инжектиране на токсина) и третирането с KTP 14 дни в доза 100 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}/\text{ден}$, у плъхове Wistar, върху работната памет изследвана с тест за разпознаване на нов обект (*Novel object recognition test*). Данните представят средни $\pm$ SEM на индекс за разпознаване при $n = 10$, * $p < 0.05$ спрямо контролите; ° $p < 0.05$ спрямо третираните само със STZ.



Фиг. 10 Отлагане на $A\beta$ протеин в хипокамп на плъх. Оцветяване на препарата с Congo red. Черните стрелки показват амилоидните плаки. Линията е равна на 800 μ m.

A - контролна група,
B - група ICV
инжектирана с STZ
C - група ICV
инжектирана с STZ
+KTP

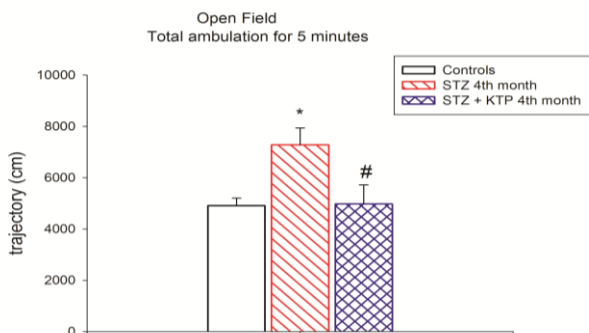


Фиг. 11 Микроскопски снимки на отлагане на $A\beta$ протеин в мозък на плъх. Оцветяване с Congo red. Dentate gyrus (DG), кръвоносен съд (връх на стрелка), $A\beta$ плаки (стрелки).

A - група инжектирана ICV със STZ. Линията е еквивалентна на 800 μ m; B - група инжектирана ICV със STZ. Линията е еквивалентна на 400 μ m; C - група инжектирана със STZ + KTP. Линията е еквивалентна на 800 μ m.

III. ЕФЕКТИ НА ХРОНИЧНОТО ТРЕТИРАНЕ С КИОТОРФИН ВЪРХУ КЪСНИТЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОВЕДЕНИЕТО И ХИСТОЛОГИЧНАТА СТРУКТУРА НА МОЗЪКА У ПЛЪХОВЕ С ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА AD

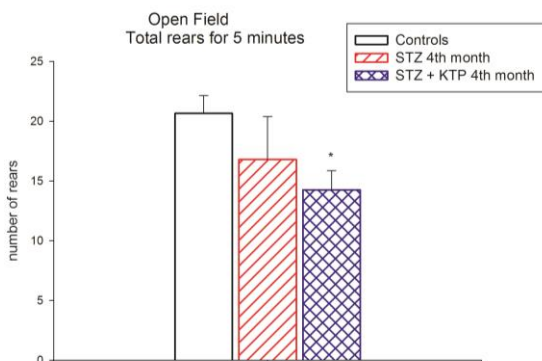
Третата серия експерименти включваше идентичен начин на третиране с този, използван за изследване на ранните последици от предизвикването на стрептозотоцин-индуцирана деменция, но периодът между индуцирането на модела и провеждането на изследванията беше четири месеца. Изследването на общата двигателна активност чрез метода open field показва запазване на STZ-индуцираната хиперактивност и след четвъртия месец от третирането ($F_{1, 17}=9.183$, $p=0.008$), но при групата третирана с КТР беше отчетено достоверно намаляване на дължината на изминатата траектория ($F_{1, 14}=4.604$, $p=0.051$; фиг. 12).



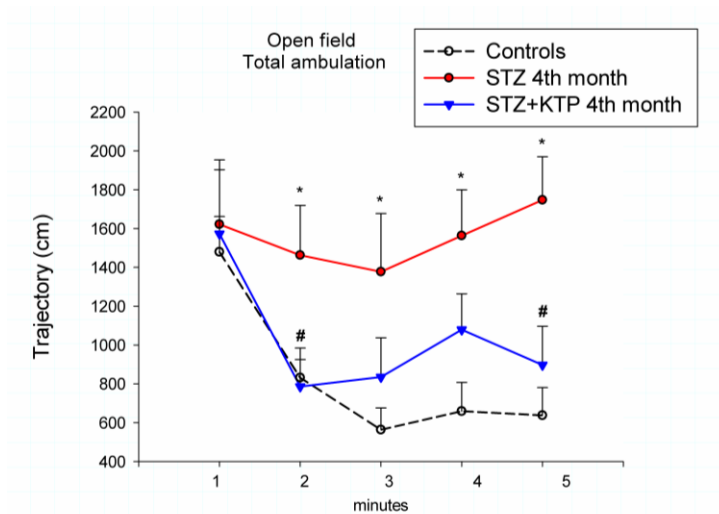
Фиг. 12 Общата двигателна активност, изразена с дължината на изминатата траектория за период от 5 min в апарата open field. Стойностите са средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar контролни, третирани с цереброспинална течност (Controls), плъхове със стрептозотоцинов модел на AD (STZ 4th month) и плъхове третирани с киоторфин и стрептозотоцин (КТР 100 $\mu\text{g}/\text{ден}/14$ дни, ICV + STZ 4th month). Изследването е проведено 4 месеца след края на третирането. * $p < 0,05$ спрямо контролите; # $p < 0.05$ спрямо групата третирана само със стрептозотоцин.

В сравнение с общата двигателна активност през първия месец след индуциране на модела, животните третираните със STZ не показаха съществени различия по отношение на фактора време ($F_{1, 18} = 0.0846$, $p = 0.775$), но при третираните с КТР беше отчетено значително намаляване на двигателната активност на четвъртия спрямо първия месец ($F_{1, 19} = 4.626$, $p = 0.040$).

Здравите контролни животни проявяват характерно намаляване на двигателната активност в непозната среда, типично за процеса на хабитуация по отношение на хоризонталната амбулация (one way Repeated Measure $F=6.306$, $p<0.001$; фиг. 13) и вертикалните изправяния (One Way Repeated Measure $F=7.881$, $p<0.001$; фиг. 14).



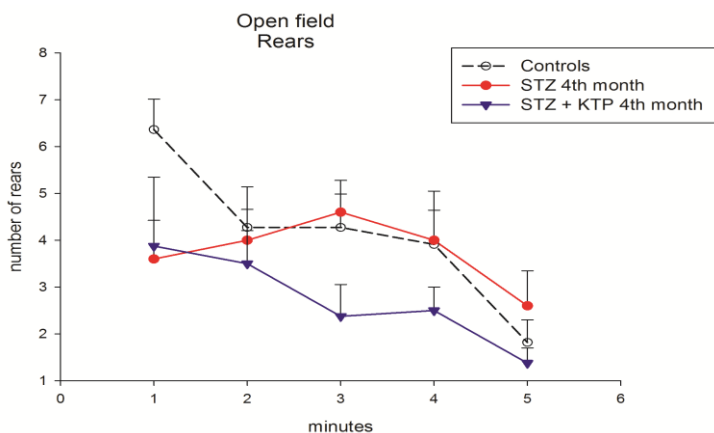
Фиг. 13. Обща вертикална двигателна активност, изразена с брой на изправянията на задните лапи за период от 5 min в апарата open field. Стойностите са средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar контролни, третираните с цереброспинална течност (Controls), плъхове със стрептозотоцинов модел на AD (STZ 4th month) и плъхове третираните с киоторфин и стрептозотозин (КТР 100 $\mu\text{g}/\text{ден}/14$ дни, ICV + STZ 4th month). Изследването е проведено 4 месеца след края на третирането. * $p < 0,05$ спрямо контролите.



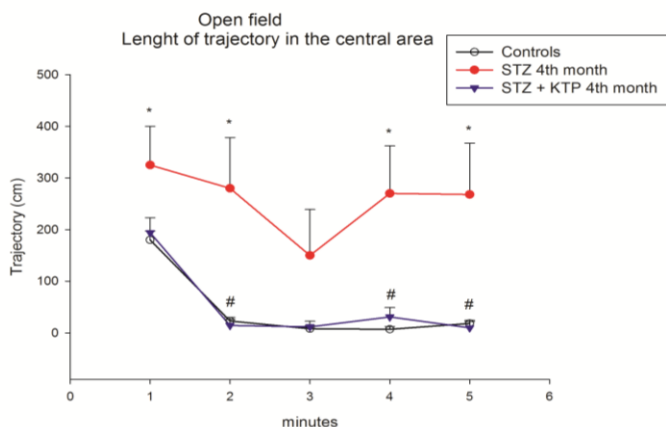
Фиг. 14. Хабитуация към непозната околна среда, изразена с намаляване на изминатата траектория за всяка минута от 5 минутен период в апарата open field. Стойностите са средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar контролни, третирани с цереброспинална течност (Controls), плъхове със стрептозотоцинов модел на AD (STZ 4th month) и плъхове третирани с киоторфин и стрептозотозин (KTP 100 $\mu\text{g}/\text{ден}/14$ дни, ICV + STZ 4th month). Изследването е проведено 4 месеца след края на третирането. * $p < 0,05$ спрямо контролите; # $p < 0,05$ спрямо групата третирана само със стрептозотозин.

Животните с индуциран STZ модел, не показаха подобно намаляване в хоризонталната (one-way Repeated measure $F=0.654$, $p > 0.05$; фиг. 13) и вертикална двигателна активност (one-way Repeated measure $F=1.048$, $p > 0.05$; фиг. 14) 4 месеца след инжектирането на токсина. Хроничното третиране с KTP нормализира хабитуацията свързана с хоризонталната (one-way repeated measure $F=3.301$, $p=0.031$; фиг. 13) и вертикалната двигателна активност (one-way repeated measure $F=4.016$, $p=0.011$; фиг. 14) у плъхове със STZ модел, 4 месеца след неговото индуциране.

Двигателната активност в централната аверсивна зона на апарата open field при здравите контроли е много ниска след началния период на придвижване от началната точка в центъра на апарата към периферията му (фиг. 15). Плъховете, инжектирани със STZ, демонстрират нарушено тревожно поведение, изразено чрез увеличаване на двигателната активност в централната зона ($F_{1, 100} = 33.995$, $p < 0.001$ фиг. 16) и увеличен брой повторни влизания в тази област през 5-те минути на наблюдение ($F_{1, 100} = 40,247$, $p < 0,001$; фиг. 17).



Фиг. 15. Общата вертикална двигателна активност, изразена с брой повдигания на задните лапи за всяка минута от 5 минутния тест в апарата open field. Стойностите са средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar контролни, третирани с цереброспинална течност (Controls), плъхове със стрептозотоцинов модел на AD (STZ 4th month) и плъхове третирани с киоторфин и стрептозотозин (KTP 100 $\mu\text{g}/\text{ден}/14$ дни, ICV + STZ 4th month). Изследването е проведено 4 месеца след края на третирането.

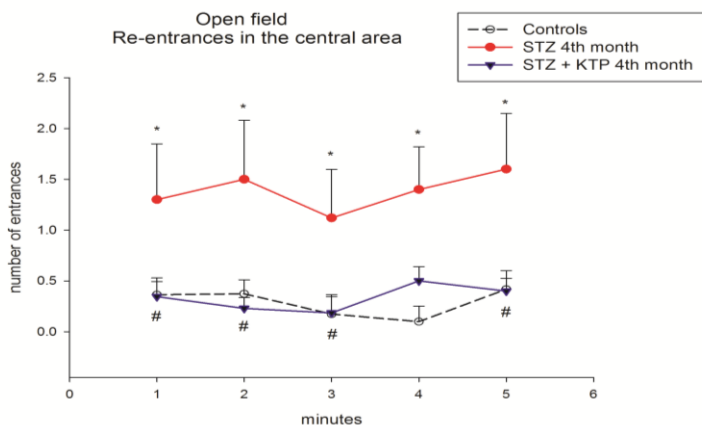


Фиг. 16. Поведение на тревожност, изразено с дължина на изминатата траектория за всяка минута от 5 минутен период в централната зона на апарата open field. Стойностите са средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar контролни, третиран с цереброспинална течност (Controls), плъхове със стрептозотоцинов модел на AD (STZ 4th month) и плъхове третиран с киоторфин и стрептозотозин (KTP 100 μ g/ден/14 дни, ICV + STZ 4th month). Изследването е проведено 4 месеца след края на третирането. * $p < 0,05$ спрямо контролите; # $p < 0,05$ спрямо групата третирана само със стрептозотозин.

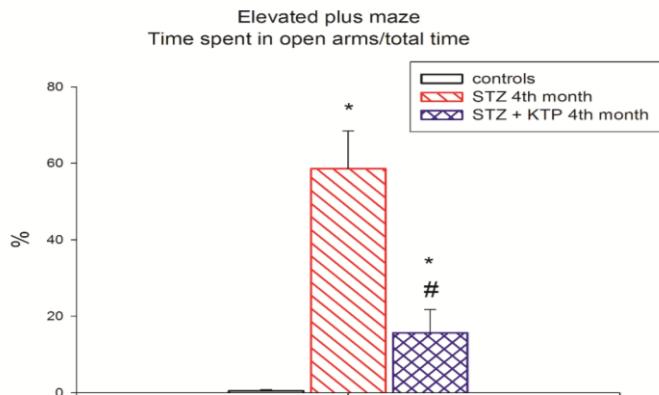
Третирането с KTP по време на ранната фаза от развитието на STZ-индуцирания модел намалява активността в централната зона ($F 1, 69 = 13,033$, $p < 0,001$; фиг. 16) и броя на повторните влизания в нея ($F 1, 69 = 13,412$, $p < 0,001$; фиг. 17) 4 месеца след прилагането на токсина STZ.

Увеличеното съотношение между времето, прекарано в отворени рамене, спрямо общото време на теста в elevated plus maze, се приема като индикатор за намаленото ниво на тревожност, тъй като отворените рамене не предлагат защита и са аверсивни. Четири месеца след инжектирането на STZ, плъховете развиват анксиолитично подобно поведение с увеличен процент от времето, прекарано в отворените рамене ($H = 8.609$, $p = 0.002$, фиг. 18). Освен това, съотношението на

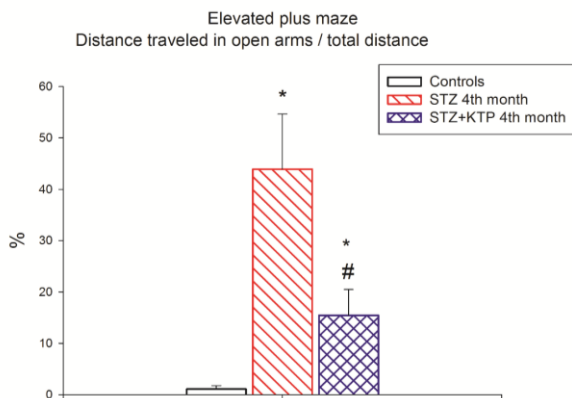
траекторията, измината в отворените рамене, спрямо общата траектория по време на теста, нараства в групата STZ ($H = 7.857$, $p = 0.004$, 19), което потвърждава по-висока активност на STZ-инжектирани плъхове в аверсивните зони на апарата. Третирането с KTP премахна индуцирания от STZ анксиолитичен ефект като процент от времето ($F 1, 10 = 12.361$, $p = 0.007$ спрямо групата STZ; фиг. 18) и траекторията ($F 1, 10 = 5.047$, $p = 0.051$ спрямо групата STZ; фиг.19) в отворените рамене, в сравнение с общото време и дължина на траекторията по време на теста.



Фиг. 17. Поведение на тревожност, изразено с повторни влизания в централната зона на апарата open field за всяка минута от 5 минутен тест. Стойностите са средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar контролни, третирани с цереброспинална течност (Controls), плъхове със стрептозотоцинов модел на AD (STZ 4th month) и плъхове третирани с киоторфин и стрептозотоцин (KTP 100 μ g/ден/14 дни, ICV + STZ 4th month). Изследването е проведено 4 месеца след края на третирането. * $p < 0.05$ спрямо контролите; # $p < 0.05$ спрямо групата третирана само със стрептозотоцин.



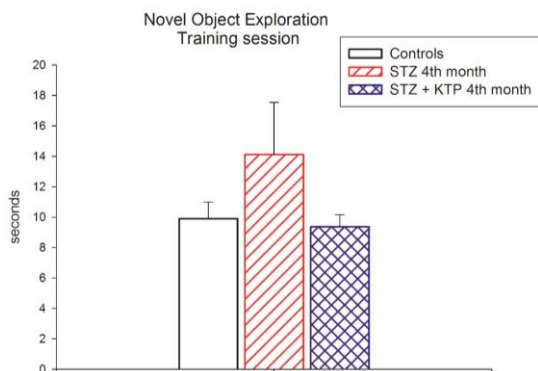
Фиг. 18. Поведение на тревожност, изразено с относителния престой на плъховете в отворените рамене на апарата *elevated plus maze* за 5 минутен тест. Стойностите са средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar контролни, третиран с цереброспинална течност (Controls), плъхове със стрептозотоцинов модел на AD (STZ 4th month) и плъхове третиран с кикторфин и стрептозотонин (KTP 100 $\mu\text{g}/\text{ден}/14$ дни, ICV + STZ 4th month). Изследването е проведено 4 месеца след края на третирането. * $p < 0,05$ спрямо контролите; # $p < 0.05$ спрямо групата третирана само със стрептозотонин.



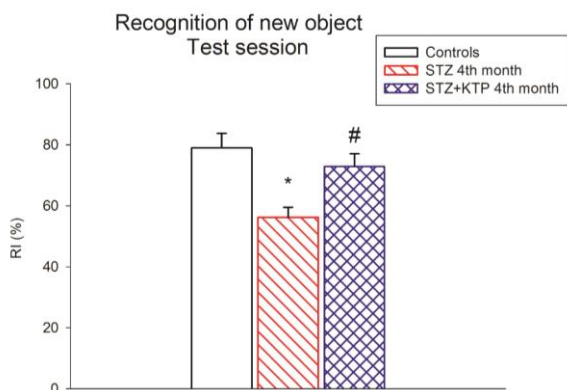
Фиг. 19. Поведение на тревожност, изразено с относителната дължина на изминатата от на плъховете траектория в отворените рамене на апарата *elevated plus maze* за 5 минутен тест. Стойностите са средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar контролни, третиран с цереброспинална течност (Controls), плъхове със стрептозотоцинов модел на AD (STZ 4th month) и плъхове третиран с киоторфин и стрептозотонин (KTP 100 μ g/ден/14 дни, ICV + STZ 4th month). Изследването е проведено 4 месеца след края на третирането. * $p < 0,05$ спрямо контролите; # $p < 0.05$ спрямо групата третирана само със стрептозотонин.

Не бяха отчетени значителни разлики между контролите и инжектираната STZ група по отношение на времето, прекарано в проучване на нови обекти по време на обучителната сесия при метода за изследване на работна памет novel object recognition (фиг. 20).

По време на теста, плъховете инжектирани със STZ, показаха нарушена работна памет, изразена чрез намален индекс на разпознаване (one-way ANOVA, factor STZ, $F_{1,21}=7.245$, $p=0.014$; фиг. 21). Предварителното третиране с KTP е в състояние да увеличи RI и значително да подобри работната памет при плъхове със STZ модел на AD (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks, factor KTP $H=4.339$, $p=0.037$; фиг. 21).

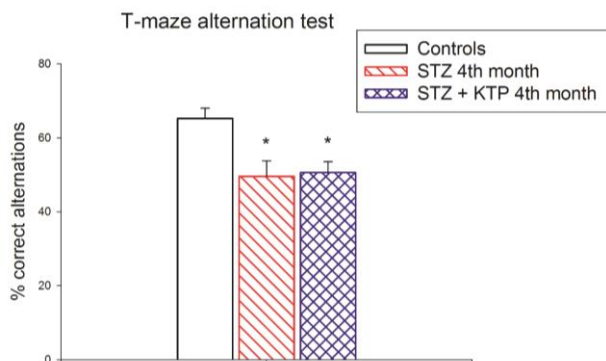


Фиг. 20. Изследователско поведение, изразено в секунди за изследване на два идентични нови обекта по време на тренировъчната сесия на теста за работна памет Novel object recognition.



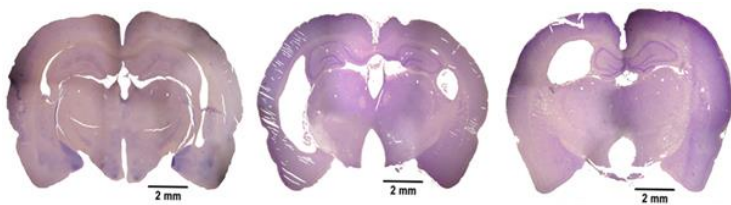
Фиг. 21. Изследване на работната памет за разпознаване на нов от познат обект чрез Novel object recognition теста, изразена като индекс на разпознаване (RI, в проценти). Стойностите са средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar с експериментален модел на sAD, третирани с физиологичен разтвор (STZ 4 -ти месец) или KTP (100 $\mu\text{g}/\text{ден}/14$ дни, ICV; STZ + KTP 4 -ти месец). * $p < 0,05$ спрямо контролите; # $p < 0,05$ спрямо групата със STZ-индуциран модел, 4 -ти месец след инжектиране на токсина.

Пространствената памет е значително нарушена 4 месеца след инжектирането на STZ, което е представено чрез намален процент на правилно редуване на влизанията в страничните рамене на Т-лабиринта ($F_{1,11} = 10,408$, $p = 0,009$). Третирането с КТР не промени STZ-индуцираното нарушение на паметта (фиг. 22).



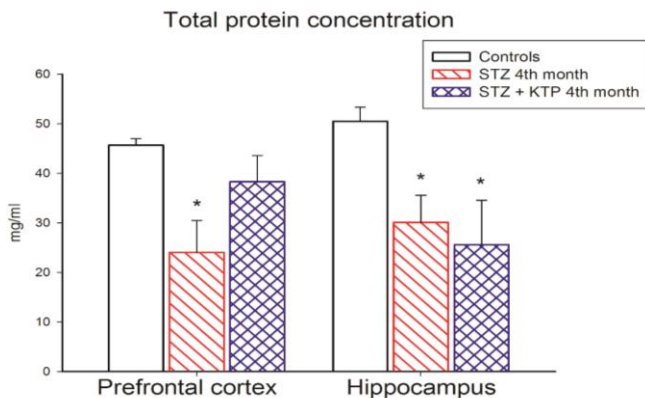
Фиг. 22. Изследване на пространствената памет, изразена с процент на правилно редуване (алтернация) на влизанията в страничните рамене на Т-лабиринта. Данните са представени като средни $\pm$ SEM ($n = 10$) при плъхове Wistar с експериментален модел на sAD, третирани с физиологичен разтвор (STZ 4-ти месец) или КТР (100 μ g/ден/14 дни, ICV; STZ + КТР 4-ти месец). * $p < 0,05$ спрямо контролите.

След края на поведенческите изследвания, част от животните бяха подложени на декапитация и изолиране на мозъчната тъкан за биохимични изследвания, а другата част бяха перфузирани транкардиално с фиксатор за последващи хистологични изследвания. Макроскопските снимки на оцветените коронарни срези на мозъчната тъкан показваха видими разлики между животните от трите изследвани групи. При животните третирани със STZ бяха наблюдавани свиване на хипокампуса, изтъняване на неокортекса; разширяване на мозъчните вентрикули. Третирането с КТР показва недостоверна тенденция към намаляване на ефекта на токсина (фиг. 23).



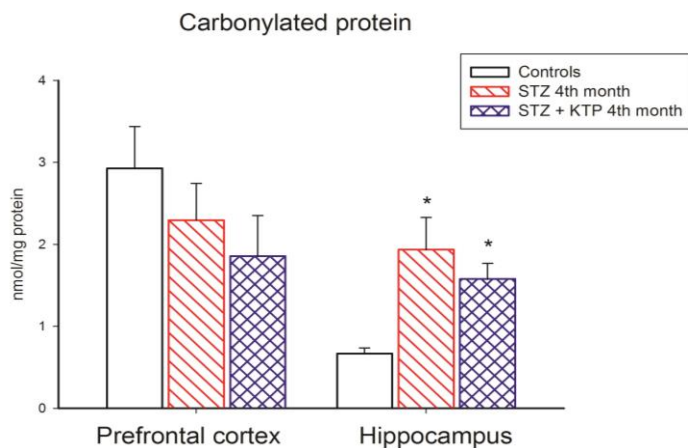
Фиг. 23. Макроскопски снимки на структурните изменения в мозък на плъх, четири месеца след индуциране на експериментален модел на AD. Коронарните срези са стандартно оцветяване с Cresyl violet, Nissl.

Биохимичният анализ показва по-малко съдържание на общ протеин в групата, третирана със STZ както в префронталната кора, така и в хипокампуса ($H = 9.375$, $p = 0.002$; $F_{1,11} = 12.983$, $p = 0.005$, респ.; фиг.24). Третирането с КТР не повлиява ефекта на STZ върху съдържанието на протеин в тези селективни области на мозъка (фиг. 24).

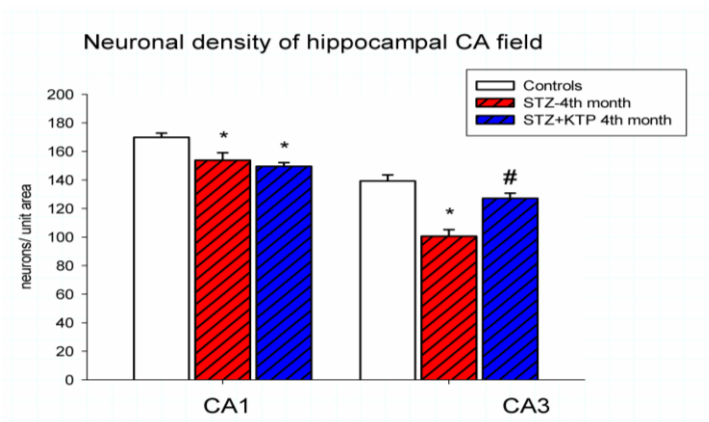


Фиг. 24. Ниво на общото съдържание на протеин в mg/ml хомогенат от префронталната мозъчна кора и хипокампуса при плъхове Wistar контролни и с експериментален модел на sAD, третиран с физиологичен разтвор (STZ 4 -ти месец) или КТР (100 μ g/ден/14 дни, ICV; STZ + KTP 4-ти месец). Данните са представени като средни $\pm$ SEM ($n = 10$). * $p < 0,05$ спрямо контролите.

Съдържанието на карбонилираните протеини в префронталната кора на плъхове от трите различни групи не се различава значително (фиг. 25). Хипокампусът изолиран от STZ-инжектираната група показва значително по-високо съдържание на увредени протеини ($F_{1,9} = 12.846$, $p = 0.009$) и третирането с КТР не променя тази тенденция (фиг. 26).



Фиг. 25. Ниво на карбонилирани протеини в nmol/mg протеин в префронталната мозъчна кора и хипокампуса при плъхове Wistar контролни и с експериментален модел на *sAD*, третиран с физиологичен разтвор (STZ 4 -ти месец) или КТР ($100 \mu\text{g/ден/14}$ дни, ICV; STZ + КТР 4 -ти месец). Данните са представени като средни $\pm$ SEM ($n = 10$). * $p < 0,05$ спрямо контролите.



Фиг. 26. Плътност на невроните в CA1 и CA3 полета на хипокампус на плъхове Wistar с експериментален модел на SAD, третиран с физиологичен разтвор (STZ 4 -ти месец) или KTP (100 µg/ден/14 дни, ICV; STZ + KTP 4 -ти месец). * $p < 0,05$ спрямо контролите; # $p < 0,05$ срещу STZ 4-ти месец



ОБСЪЖДАНЕ

Богатството и разнообразието в неuropeптидната невробиология изцяло пречупват нашето разбиране за функцията на нервната система. Неuropeптидите могат да предизвикат пластични промени в постсинаптичната мембрана, които да доведат до по-фино регулирани и по-дълготрайни ефекти. Тяхното тъканно разпределение разгръща нова функционална анатомия на мозъка, базирана на комуникационни схеми, които свързват нервната тъкан с други системи, като ендокринната и имунната, подчертавайки еволюционната взаимосвързаност на животинските видове. Много от неuropeптидите не отговарят на

класическите критерии за невротрансмитери, освобождават се в много по-ниска концентрация, имат по-дълъг период на активност и котрансмисия с класическите невротрансмитери [Moore and Black, 1991]. КТР често се класифицира като един „нетипичен“ опиоиден пептид, който проявява структурно и функционално сходство с „класическите“ опиоидни пептиди. Изследването на ендогенните и екзогенни опиоиди през последните 50 години показва, че опиоидните пептиди участват в медирането на аналгезия [Belluzzi et al., 1976; Buscher et al., 1976; Ferdousi and Finn, 2018], стрес [Laatikainen, 1991; Terenius, 1992; Tyagi et al., 2020], памет [Izquierdo et al., 1980; Terenius, 2000; Torres-Berrio and Nava-Mesa, 2019], имунни отговори [Plein and Rittner, 2018; Machelska and Celik, 2020], хранене [Liu and Udenigwe, 2019], регулации на кръвното налягане [Smolensky et al., 2017], туморен растеж [Su, 2000] и ендокринна регулация [Esparza et al., 2020]. Има данни, че поне отчасти аналгетичния ефект на КТР е резултат от модулирането на опиоидергичната невротрансмисия чрез стимулиране на транспорта на опиоидни пептиди [Thakkar et al., 2008]. Изобилието на опиоидни и киоторфинови рецептори в различни мозъчни структури предполага разнообразие в изявата на техните ефекти. Повечето аналгетици имат нежелани странични ефекти, свързани с обща седация и/или увреждане на вниманието, мотивацията или паметта. За разлика от опиоидите, при някои КТР деривати са демонстрирани силна аналгетична активност, съпроводена с по-слабо изразени странични ефекти, свързани главно с намалена диуреза и леки двигателни нарушения [Sá Santos et al., 2016; Ribeiro et al., 2011]. Влиянието на ефективни дози аналгетици на дипептида върху когнитивното поведение и процесите на паметта при здрави плъхове обаче все още не е изяснено.

Настоящото изследване потвърди антиноцицептивния ефект на КТР след директно въвеждане в церебралния вентрикул [Angelova et al., 2021; Takagi et al., 1979; Sakurada et al., 1984; Kawabata et al., 1993; Bocheva et al., 2004; Dzambazova et al., 2010].

Един от предполагаемите механизми на аналгетичното действие на дипептида е, че след разграждането му L-Arg служи като прекурсор на азотен оксид синтазата (NOS). Синтезираният азотен оксид (NO) активира образуването на цГМФ, активиращ протеинкиназа G, която фосфорилира и отваря АТФ-чувствителни калиеви каналчета (сGMP/PKG/K_{АТР} път) [Lima et al., 2010]. Данни от литературата показват, че и двата метаболита на киоторфина - L-Arg [Kamei et al., 1994] и L-Tyr [Kawabata et al., 1993] проявяват опиоид-зависим антиноцицептивен ефект. Азотният оксид има двойствена роля в модулирането на ноцицептивната информация. Освен известното си участие в ендогенната и екзогенна антиноцицепция, той може да участва в развитието на вторична хипералгезия посредством повишено освобождаване на субстанция Р и калцитонин-ген-свързания пептид или глутамат от първичните ноцицептивни окончания. При възпалителната реакция също се отделя NO, който от своя страна стимулира синтеза на простагландин E2 [Cury et al., 2011]. Други предполагаеми механизми на киоторфиновия антиноцицептивен ефект включват освобождаване на мет-енкефалин [Ribeiro et al., 2011] или активиране на моноаминергичните антиноцицептивни системи [Kolaeva et al., 2000; Ochi et al., 2002; Dzambazova-Maximova et al., 2003, 2005; Landzhov et al., 2014].

Субхроничното третиране с пептида, обаче не доведе до промени в болковия праг в сравнение с контролите. Този резултат предполага настъпване на адаптация или развитие на толерантност към антиноцицептивното действие на КТР. Известно е, че развитието на толерантност към опиоид-индуцираната аналгезия включва не само десенсибилизация, понижаване или интернализация на опиоидните рецептори, но и освобождаване на антиопиоидни пептиди, които участват в механизма на развитие на опиоидна толерантност [Mudgal & Pasha, 2015]. Освен антиноцицептивните си свойства, е доказано, че КТР намалява индуцираната от морфин аналгезия при тест hot plate у плъхове, действайки като антиопиоиден пептид [Dzambazova-Maximova et al., 2006]. Само няколко проучвания

предоставят данни за съществуването на инхибиращ ефект на КТР върху селективното внимание на плъховете към различни сензорни стимули, съпроводени със слабо намалена двигателна активност [Kolaeva et al., 2000]. Авторите предполагат участието на мозъчната серотонинергична система в КТР-индуцираната модулация на тези поведенчески параметри. Литературните данни показват, че КТР не предизвиква забележими промени като хипермоторика, атаксия или каталепсия в условия на нова или променяща се среда при различни експериментални постановки. Настоящите ни данни от теста Elevated plus maze показват, че само най-високата единична доза КТР може да потисне тревожното поведение. Този лек успокояващ ефект не може да бъде обяснен с КТР-индуциран опиоидно-зависим механизъм, тъй като според литературата приложението на морфин предизвиква обратния ефект, но не може да се пренебрегне участието на КТР рецептора при проявата на този анксиолитичен ефект [Nobre et al., 2000].

Резултатите от open field теста показват доза-зависимо подобряване в хабитуацията към нова среда на плъхове, третирани с КТР, в сравнение с контролите [Angelova et al., 2021]. Единствените намерени подобни литературни данни са свързани с два халогенни аналога на КТР, които подобряват привикването към нова среда след две или три ICV инжекции, но не и след еднократна инжекция [Bocheva et al., 1994]. Подобряването на хабитуацията се изразява в постепенно намаляване на изследователската активност след първоначално попадане на организма в нова, непозната околна среда. Привикването към непознати стимули без биологично значение за индивида е един от най-простите модели на обучение, широко приет като форма на имплицитна памет [Zaman et al., 2017]. Нашите данни от теста за изследване на работната памет подчертават специфичното действие на дипептида върху обучението и паметта. Беше установено, че прилагането на КТР в ниска доза увеличи времето за изследване на нови обекти във фазата на обучение на NORT, но не повлиява нормалната работна памет. Мозъчният хипокампус е високоорганизирана

анализираща невронна мрежа, участваща в контрола на изследователското поведение, тревожността, пространствената, семантична и епизодична дългосрочна памет [Belzung, 1992; Prior et al., 2004; Alvarez & Alvarez, 2008; Paretkar & Dimitrov, 2018]. Образуването на карбонилирани протеини е един неселективен и широко използван маркер за протеиново окисляване както *in vitro*, така и *in vivo*. Нашето проучване показва, че нито остро инжектиране на КТР, нито неговото хронично приложение повлияват нивата на карбонилираните протеини в кръвната плазма и в изолирания хипокампус. Тези данни отхвърлят потенциалната възможност остро и хронично приложение на КТР да води до промени в оксидативния баланс на мозъчната тъкан и до увреждане на протеиновите молекули.

Обобщените резултати от изпълнението на първата задача сочат, че КТР, приложен директно в мозъчните вентрикули, упражнява основния си антиноцицептивен ефект, без да повишава нивата на карбонилирани протеини в кръвта и хипокампа, както и без да влияе отрицателно върху основните поведенчески параметри, свързани с мотивацията, обучението и формирането на паметта при здрави плъхове.

Експерименталният модел на деменция от Алцхаймеров тип предизвикан чрез инжектиране на STZ интрацеребровентрикуларно е установен метод за разрушаване на енергийния баланс на мозъка и развитие на когнитивен дефицит [Hoyer et al., 1994; Grünblatt et al., 2007; Salkovic-Petrisic et al., 2013; Vignon et al., 2021]. Известно е, че при този модел се развива характерната за невродегенеративното заболяване патология свързана с неврофиброматозни повлекла от хиперфосфорилиран тау-протеин и A β плаки, които се проявяват поне три месеца след *icv* прилагането на STZ [Salkovic-Petrisic et al., 2006; Lester-Coll et al., 2006; Salkovic-Petrisic et al., 2013, Shingo et al. 2013; Sadigh-Eteghad et al., 2015]. Данните от настоящото изследване показва, че прилагането на този експериментален модел води до увреждане на когнитивното поведение и работната памет още на първия месец след инфузирането на токсина в цереброспиналната течност на плъх. Тези поведенчески

изменения бяха съпроводени с натрупване на $A\beta$ в хипокампа, който структурно и функционално контролира формирането на дълготрайната епизодична памет и опосредства дискриминационния потенциал на мозъка при обработката на сетивната информация [Kesner et al., 2016; Rolls, 2016].

През ранният етап на развитието на модела отчетохме наличие на спорадични двигателни гърчове, които изчезват с времето. Тези спорадични гърчове са характерни главно за междинния, умерен стадий на ADs при хора, както и при трансгенни мишки модели на AD. Сред предполагаемите механизми на тяхното възникване са допълнително синаптично освобождаване на глутамат, дължащо се на нарушения в транспорта на глутамат в невроните или в глията, протеин Тау-индуцирано усилване на пресинаптичното освобождаване на глутамат, намален аксонен и дендритен транспорт, променена експресия и транспорт на постсинаптични AMPA, NMDA рецептори и потенциал-зависими йонни канали, селективно увреждане на GABAergic интерневрони в хипокампуса и париеална кора, повишаване на холинергичния тонус преди дегенерацията на холинергичните пътища [Vossel et al. 2017].

Оригиналните данни от тестове за изследователско поведение показаха развита двигателна хиперактивност, паралелно с намалено тревожно поведение през ранния период (един месец) на AD при плъхове Wistar [Angelova et al., 2018]. Нашите резултати са в съответствие с предишните данни от експерименталния модел на спорадичен AD при мишки [Chen et al., 2013] и трансгенен модел на AD при мишки [Musilli et al., 2012]. Несъответствието с литературните данни при плъхове, третирани със STZ, които не развиват хиперактивност, може да се дължи на различните използвани дози и схема на третиране [Walker et al., 2015]. Независимо от повишения интензитет на изследователското поведение, плъховете с модел на AD показаха значимо увреждане на краткотрайната памет. Съгласно с литературните данни, нашите изследвания показаха, че периодът от един месец след прилагане на токсина е достатъчен, за да предизвика достоверно увреждане на краткотрайната памет за

разпознаване на нов от вече познат обект [Luo et al., 2019]. Хистологичните изследвания подкрепят резултатите от поведенческите експерименти, с установяването на амилоидни агрегати в хипокампуса. Дегенерация на невронни популации в структурите, отговорни за създаването на паметта, каквито са неокортекса и особено хипокампуса, са типични характеристики за развитието на AD [Grieb, 2016]. Подобно на данните от литературата, ние установихме изразено отлагане на амилоидни агрегати в лептоменингеални и мозъчни кръвоносни съдове [Salkovic-Petrisic et al., 2011]. Третирането с КТП предотвратява увреждането на работната памет и частично премахва анксиолитичния тип поведение при плъхове с експериментален AD, но не оказва значим ефект върху амилоидните агрегати. Публикувани неотдавна данни от изследвания на пациенти показват, че прогресията на AD е свързана със загуба на неврони, освобождаване на хиперфосфорилиран тау-протеин и нарушена синтеза и освобождаване на КТП [Santos et al., 2013]. Понижените нива на КТП в мозъка вероятно допринасят за намалената активност на синтазата на NO (NOS), което води до NO дефицит и нарушена функция на невроните, свързана с насърчаване на невродегенеративните процеси характерни за AD. Известно е, че нарушаването на NO хомеостазата ускорява развитието на AD [de la Torre et al., 2000]. Хистологичните изследвания на мозъчна тъкан, взета post mortem от болни с AD показва, че оцветяването с NADPH-d в хипокампуса намалява драстично при пациенти с AD [Rebeck et al., 1993]. NADPH-диафоразната активност се използва като хистохимичен маркер за откриване на неврони продуциращи NO и специфично за невроналната nNOS [Bredt et al., 1991; Hope et al., 1991]. Клетките, съдържащи NADPH-d, са в изобилие в CA1, CA2 и CA3 на хипокампуса и gyrus dentatus, където са колокализирани с GABA, соматостатин и невропептид Y [Valtschanoff et al., 1993]. Предишни проучвания показват, че системното инжектиране на КТП е в състояние да увеличи NADPH-d положителните неврони в мозъчната кора [Dzambazova et al., 2011]. Тези данни ни позволяват да предположим, че

механизмът, чрез който КТР предизвиква своя протективен ефект при модела на AD поне отчасти включва NO-зависим път [Angelova et al., 2020].

Последният етап от нашето изследване целеше да установи късните ефекти на STZ-индуцирания модел на спорадична AD, четири месеца след прилагане на невротоксина. Данните от настоящото проучване, включващо различните методи показват, че модела провокира продължителни и устойчиви във времето поведенчески аномалии свързани главно с тежки нарушения на пространствената и работната памет, повишена двигателна активност и намалено ниво на тревожност [Angelova et al., 2019]. Тези аберации бяха придружени от хистологични и биохимични промени в мозъчни структури, които играят критична роля за формирането на експлицитната памет, емоциите, мотивацията и когнитивното поведение. Увеличеният интензитет на изследователското поведение в непозната среда (повишена амбулация и вертикални изправяния при теста open field) и пониженото поведение на тревожност, представено с увеличена измината траектория в централната зона на откритото поле, са характерни изменения и при други експериментални модели на AD [Rodgers et al., 2012; Dehghan-Shasaltaneh et al., 2016]. Трансгенни мишки със свръхекспресия на амилоид прекурсорния протеин (APP), които са често използван експериментален модел на ранна AD, се характеризират с развитие на двигателна хиперактивност още през най-ранния постнатален стадий, подчертавайки ролята на нарушения метаболизъм на амилоид бета протеина по време на постнаталното развитие на мозъка върху този аспект на поведението [Rodgers et al., 2012]. При други изследвания не са отчетени промени в локомоторната активност след инжектиране на STZ [Sachdeva et al. 2015]. Литературните данни сочат, че плъхове със STZ-ICV 3 mg/kg развиват най-висока скорост за намиране на платформата при тест за пространствена памет Morris water maze, паралелно с увеличената траектория за постигане на целта. От това следва, че споменатата доза води до увреждане на обучението и пространствената памет по време на

тренировъчните сесии, но също така стимулира двигателната активност и води до промяна в когнитивния процес [Dehghan-Shasaltaneh et al., 2016]. Подобни поведенчески аномалии често са свързани с наличие на хипокампазни лезии, тъй като предишни проучвания са установили, че дори малки лезии в дорзалното CA1 поле на хипокампус на мишки водят до хиперактивност при излагане на нова околна среда [Dillon et al., 2008ab]. Нашите данни показваха, че двигателната хиперактивност е съпроводена с намалено ниво на безпокойство в непозната среда. Това се вижда от резултатите, които сочат, че плъховете третирани със STZ-ICV, прекарват повече време и изминават по-голямо разстояние в отворените рамене на повдигнатия кръстосан лабиринт (elevated plus maze), един тест, който се използва като „златен стандарт“ за изследване на нарушения свързани с поведението на безпокойство. Изследователското поведение в теста open field, също показва ниско ниво на тревожност, свързано с по-дълга траектория в централната, нежелана за изследване зона на апарата, както и увеличен брой на повторните влизания в тази зона. Повишената двигателна активност и ниско ниво на тревожност са показателни за наличието на невродегенеративни процеси и разрушаването на невронните мрежи в хипокампуса не само при модели на болест на Алцхаймер, но също така и при експериментален модел на епилепсия на темпорален лоб [Ivanova et al., 2015]. Тази мозъчна структура има богати връзки със структури, които регулират мотивацията и емоциите. Сред най-ранните научни доказателства за участието на хипокампуса в регулацията на емоциите е находката на Kluver & Bucy (1937), че отстраняването на медиалния лоб води до дълбоки емоционални разстройства при маймуни. Хипокампусът е мозъчна структура, която упражнява силен регулаторен контрол и върху оста хипоталамус-хипофиза-надбъбречна жлеза. Хипокампазните лезии нарушават контрола върху отговора на хормоналния стрес [Dedovic et al., 2009; Jacobson & Sapolsky, 1991]. Повишаването на хормоните на стреса, от своя страна, води до хипокампазна дисфункция както при хора, така и при

гризачи [McEwen et al., 1997; Herman et al., 2005]. При хората, намаленият обем на хипокампа и хипокампалната дисфункция често са свързани с психологически разстройства съпроводени със силни афективни компоненти, каквито са посттравматичното стрес-индуцирано разстройство, биполярното разстройство и депресията [Bonne et al., 2008; Frey et al., 2007]. Gray и McNaughton (2000) публикуват хипотеза относно начина, по който хипокампалната формация обработва информацията и формира емоциите. Те предполагат, че обработката се основава на поредица от паралелни сравнявания на множество цели и инициране на коригиращи действия. Тези видове обработка на информацията са точно това, което се случва и при навигацията; текущата позиция трябва да бъде сравнена с текущия курс и целта, а след това трябва да се направят корекции на курса. Установено е, че дорзалният хипокампус участва в регулацията на поведението, свързано с мотивираното изследване на нова околна среда. Поне един от механизмите в тази невронна мрежа включва инхибиторен контрол на серотонинергичните неврони от медиалните рафе ядра върху невроните в дорзалния хипокампус, които стимулират изследователското поведение посредством двупосочни връзки с nucleus accumbens [van den Buuse et al., 2005]. Подробно проучване върху ролята на хипокампалните лезии в развитието на анксиолитичен тип поведение при плъхове показва, че вентралната част на тази структура участва във формирането на безусловния страх, тъй като селективната лезия на вентралния хипокампус значително увеличава траекторията в отворените рамене на повдигнатия кръстосан лабиринт, без да се нарушава пространствената навигация и условията на контекстуален страх [Kjelstrup et al. 2002]. Промените в тревожното поведение в процеса на развитие на AD показват значителни флуктуации. Различните модели на невродегенеративното заболяване също нямат еднозначно влияние върху емоционално свързаните параметри на поведението. Така например, експериментални модели на мишки с предразположение към натрупване на амилоид бета или

инфузия на този пептид, както и STZ-ICV модела развиват тревожно поведение [Vloeberghs et al. 2007; España et al. 2010].

От друга страна, хипокампусът разполага със сложно устроена мрежа от неврони, които отговарят за пространствената ориентация, позиционирането на главата в пространството и идентификацията на обектите в околната среда. Тази невронна мрежа служи не само като пространствена карта и „пътеводител“, но и като основа на пространствената памет [O'Keefe & Dostrovsky, 1971]. Ето защо, невродегенеративните изменения в хипокампуса и енториналната кора се проявяват със значително увреждане на пространствената памет [Sharma et al., 2010]. Нашите изследвания потвърдиха валидността на използвания модел на спорадична форма на AD, с развитието на тежки нарушения в пространствената памет при използвания тест T-maze, четири месеца след инжектиране на токсина. Този тест е основан на съществуващата естествено програма на поведение, свързана главно с търсене на храна и партньор, която се изразява в редуване на вече изследвана част от околната среда, с нова. За реализирането на тази програма е необходимо животното да помни ясно, коя част от пространството (едно от напречните рамене на лабиринта) вече е посетено, и кое не е. Тестът дава възможност за изследване на оперативна и пространствена памет, без възможност за асоциативно въздействие [Sharma et al., 2010; Luo et al., 2019]. Намаленият брой правилни отговори в Т-лабиринта при плъхове със STZ-ICV показва не само нарушена пространствена работна памет, но и нарушена поведенческа гъвкавост, свързана с пространствената двигателна стратегия, която се реализира чрез взаимовръзки между хипокампаалните place и grid клетки с префронталната кора [Yang & Mailman, 2018]. Освен значимото увреждане на пространствената памет, нашите изследвания с теста за разпознаване на познати от непознати обекти показва изразения амнезичен ефект на използвания токсин по отношение на реферативната памет. Хистологичните данни показаха загуба на неврони в двете изследвани полета на хипокампуса през късната фаза на модела, както и повишено ниво на увредени

протеини в тези мозъчни структури. Литературните данни показват, че разпознаването на нови обекти, без да се отчита тяхната пространствена ориентация, се свързва главно с връзката между енториналната кора и субикулума. Лезии в тези структури е доказано, че водят до дефицит специфично в паметта за разпознаване на обекти и играят важна роля в *novel object recognition* теста [Galani et al., 1998]. Наскоро публикувани данни подчертаха основната роля на СА3 в хипокампуса за кодиране, съхранение и извличане на паметта от едната страна, и на DG за модела на разделяне (*pattern separation*) на входящата сетивна информация от енториналната кора, от друга [Senzai, 2019]. Изследването на нови обекти активира пътя от перириналната кора към латералната енторинална кора, а след това към DG и СА3; цялостното излагане на познати обекти е свързано с активирането на пътя, който достига до СА1 полето [Kinnavane et al., 2015]. Експерименталните данни от прилагане на селективни лезии показват, че хипокампусът не е най-важната структура при паметта за разпознаване на обекти, а че перириналната кора е ключова за този вид памет [Barker & Warburton, 2011]. Установените структурни и биохимични промени по време на развитието на AD са предпоставка за по-нататъшния упадък на повечето видове памет, включително пространствена памет и затруднения в когнитивното поведение като цяло. Един от важните ефекти на третирането с КТР през ранната фаза на експерименталната деменция, който установихме в нашето проучване е, че пептидът предотвратява увреждането на работната памет за разпознаване на обекти и загубата на неврони в СА3 полето на хипокампуса, но не оказва въздействие върху увреждането на пространствената памет и невроните в СА1 полето. Въз основа на литературните и наши собствени данни можем да предположим, че КТР проявява селективно невропротективен ефект в споменатите мозъчни структури, които участват във формирането на семантичната памет, но не засягат увреждането на невронните мрежи, свързани с пространствената памет.

При нормални физиологични условия има равновесие между антиоксидантите и прооксидантите в клетката. Резките промени във факторите на околната среда или стресорите могат да променят този редокс баланс, в полза на генерирането на прооксиданти, което е предпоставка за оксидативен стрес. Натрупаните свободни радикали или техни крайни продукти могат да атакуват различни клетъчни протеини и да увредят тяхната структура и функции [Halliwell, 2006]. Мозъчната тъкан е особено уязвима към окислителна атака поради относително ниския си антиоксидантен капацитет, високата консумация на кислород, високото съдържание на полиненаситени мастни киселини и натрупването на редокс-активни преходни метали като желязо и мед [Skoumalová & Hort, 2012]. Това предполага, че оксидативният стрес е ключов компонент в хода на патогенезата на заболяването [Shen et al., 2015]. Повишеното съдържание на карбонилирани протеини е един от най-широко използваните маркери за окислителна модификация на протеините, които характеризират различни стадии на AD [Sultana & Butterfield, 2013]. Нашите данни показаха едно значително увеличение в относителната концентрация на карбонилираните протеини в хипокампуса на плъховете със STZ-ICV. Трябва да отбележим, че не беше отбелязан значителен спад в процентното съдържание на увредените карбонилирани протеини в префронталната кора при плъховете със STZ-ICV, но тази структура показва по-ниско съдържание на общ протеин, което може да е резултат от предшестващи измерването дегенеративни процеси. Третирането с КТР показва тенденция към намаляване, но не оказва достоверен ефект върху общото ниво на карбонилирани протеини в изследваните мозъчни структури. Азотният оксид играе важна роля в баланса на свободно-радикалните процеси в невроните и кръвоносните съдове. Невропротективната активност на NO в началните етапи на AD се дължи на неговите силни антиоксидантни способности и директно улавяне на реактивни кислородни радикали (например супероксиден радикал). Повишаване на биологичната стабилност и активността на тиол-съдържащите антиоксиданти

чрез физиологични механизми (напр. нитрозо-GSH) е доказано в проучвания при животни, но прекомерното повишаване на нивата на NO се оказва вредно за жизнеността на невроните (Wink et al., 2001). PI3-киназната сигнализация активира ендотелната NOS, която подобрява синаптичната пластичност и LTP чрез NO [Susswein et al., 2004]. В подкрепа на това е установено, че директното инхибиране на eNOS уврежда дълготрайната памет при птици [Rickard et al., 1999], а регулацията надолу на PI3-киназата след STZ-ICV отключва механизъм на деменция при гризачи [Javed et al., 2012; Gulati et al., 2014]. Съпоставянето на общите механизми на регулация на оксидативния стрес и ефектите на азотния оксид върху молекулните и клетъчни механизми на паметта ни позволява да допуснем, че КТР осъществява протективните си ефекти върху селективни мозъчни структури, където са концентрирани неговите рецептори и прицелни ензими. Неравномерното разпределение на КТР рецептори от една страна и на трите различни форми на NOS от друга може да е причината за модулаторната роля на пептида върху различни параметри на поведението, вариращи от минимални до изразено протективни на фона на разгърнат оксидативен стрес.

Обобщените данни от проведените изследвания през късната фаза на експерименталния модел на sAD показаха, че хроничната ICV инфузия на КТР упражнява умерен защитен ефект срещу STZ-индуцираните нарушения в поведението на тревожност и хабитуация към непозната околна среда, увреждането на работната памет и загубата на неврони в СА3 областта на хипокампуса.



1. Киоторфинът проявява значителен антиноцицептивен ефект след директно прилагане в мозъчните вентрикули, като само най-високата използвана доза понижава слабо изследователското поведение и стимулира хабитуацията при здрави плъхове от порода Wistar.
2. Хроничното третиране с киоторфин предотвратява отклоненията в поведението на безпокойство и премахва стрептозотоцин – индуцираната амнезия един месец след прилагането на модела.
3. Хроничната ICV инфузия на киоторфин през ранната фаза на експерименталния модел на sAD упражнява умерен защитен ефект срещу стрептозотоцин-индуцираните нарушения в поведението на тревожност и хабитуация към непозната околна среда през късната фаза на модела.
4. Инфузията на киоторфин в мозъчните вентрикули през ранната фаза на експерименталния модел на sAD упражнява умерен защитен ефект срещу стрептозотоцин-индуцираното увреждане на работната памет и загубата на неврони в СА3 областта на хипокампуса през късната фаза на модела.



1. За пръв път бяха установени благоприятните ефекти на хроничното интрацеребровентрикуларно третиране с дипептида киоторфин върху отклоненията в нормалното когнитивно поведение през ранния и късния етапи от развитие на експерименталния модел на спорадична болест на Алцхаймер у плъхове.
2. За пръв път беше докладван умереният защитен ефект на хроничната интрацеребровентрикуларна инфузия на киоторфин срещу стрептозотоцин-индуцираните нарушения в работната памет.
3. Беше установен специфичен невропротективен ефект на хроничната интрацеребровентрикуларна инфузия на киоторфин в СА3 областта на хипокампуса през късния етап от развитие на експерименталния модел на спорадична болест на Алцхаймер у плъхове.

СПИСЪК НА ПРОЕКТИ, ПУБЛИКАЦИИ, ЦИТИРАНИЯ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПРОЕКТИ:

1. Договор № 18/2016 с Медицински Университет, София по проект на тема: Роля на кинторфина в поведенческите и хистологични изменения предизвикани от експериментален модел на Болестта на Алцхаймер.
2. Договор № 80-10-1/2020 с ФНИ СУ „Св. Климент Охридски”, по проект на тема: Характеризиране на въздействието на атипични опиоидни пептиди върху основни параметри на поведението.

ПУБЛИКАЦИИ:

1. **Angelova H.**, D. Pechlivanova, E. Dzhambazova, B. Landzhov. Effects of kyotorphin on the early behavioral and histological changes induced by an experimental model of Alzheimer's disease in rats. *Compt Rend Acad Bulg Sci*, 71(3), 424-430, 2018. **SJR 0.210, Q2, IF=0.270** Точки: 60/4=15
2. **Angelova H.**, D. Pechlivanova, E. Krumova, J. Miteva-Staleva, N. Kostadinova, E. Dzhambazova, B. Landzhov. Moderate protective effect of Kyotorphin against the late consequences of intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease. *Amino Acids*. 51(9), 1-13, 2019 doi: 10.1007/s00726-019-02784-5. **IF = 2.52**

Точки: 60/7=8,6

Цитирания: 6

- 2.1. Song L., Piao Zh., Yao L., Zhang L., Lu Y. *Schisandrin ameliorates cognitive deficits, endoplasmic reticulum stress and neuroinflammation in STZ-induced Alzheimer's disease rats. Experimental Animals*, 2020, 10.1538/expanim.19-0146, **Q2, SJR 0.5, IF= 1.208**

- 2.2. Rita F Belo · Margarida L F Martins · Liana Shvachiy · Tiago Costa-Coelho et al. *The Neuroprotective Action of Amidated-Kyotorphin on Amyloid β Peptide-Induced Alzheimer's Disease Pathophysiology*. *Front. Pharmacol.*, 09 July 2020 <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00985>, **Q1**, **SJR = 1,228**, **IF = 4.225**
- 2.3. Ueda H. *Review of Kyotorphin Research: A Mysterious Opioid Analgesic Dipeptide and Its Molecular, Physiological, and Pharmacological Characteristics*. *Frontiers in Medical Technology*, 3:662697. doi: 10.3389/fmedt.2021.662697
- 2.4. Eva Svobodová. *Comparison of transgenic and streptozotocin models of Alzheimerin rats: validation of IntelliCage system for behavioral phenotypization*. Thesis, Praha, 2021.
- 2.5. Latina V, Giacobazzo G, Calissano P, Atlante A, La Regina F, Malerba F, Dell'Aquila M, Stigliano E, Balzamino BO, Micera A, Coccurello R, Amadoro G. *Tau Cleavage Contributes to Cognitive Dysfunction in Strepto-Zotocin-Induced Sporadic Alzheimer's Disease (sAD) Mouse Model*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(22):12158. <https://doi.org/10.3390/ijms222212158> **Q1**, **SJR=1.46** **IF: 5.923**
- 2.6. Heiba, Hana. *Association of Gut Microbiota Composition with Alzheimer's-Like Disease in A Rat Model*. 2023. American University in Cairo, Master's Thesis. AUC Knowledge Fountain. <https://fount.aucegypt.edu/etds/2074>
3. **Angelova H.**, D. Pechlivanova, B. Landzhov, E. Dzhambazova. *The neuropeptide kyotorphin as a possible biomarker and neuroprotective agent in Alzheimer's disease*. *JBCR*, 13(1), 8-18, 2020. 30/4=7,5
4. **Angelova H.**, E. Krumova, E. Dzhambazova, D. Pechlivanova. *Effects of the antinociceptive dipeptide L-tyrosine-L-arginine (kyotorphin) on the motivation, anxiety, and memory in rats*. *Folia medica*, 63(2), 189-196, 2021, **SJR 0.252***, **Q3**

Цитирания: 2

- 4.1. Mi GIL JRR. *Evaluación del efecto antinociceptivo de fosfoserinas α -metiladas en roedores. TESIS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS, , FACULTAD DE MEDICINA, Cuernavaca, Morelos, México, 2022.*
- 4.2. Sedik A, Hassan A, Saleh D. *Neuromodulatory Role of L-arginine; Nitric Oxide Precursor Against Thioacetamide Induced-Hepatic Encephalopathy in Rats via Downregulation of Nrf-2/NF- κ B-mediated Apoptosis. Metabolic Brain Disease, 2022, DOI: [10.21203/rs.3.rs-1256551/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1256551/v1) Q2, IF = 3.655 (2021)*

УЧАСТИЯ:

1. **Angelova H.**, Iliev A., Stanchev S., Malinova L., Pechlivanova D., Dzhambazova E., Landzhov B. Expression of NADPH-d reactive neurons in hippocampus of Alzheimer's disease rat model. A histochemical study. **X International Symposium on Clinical Anatomy**, 6 – 8 October, Varna, Bulgaria, 2016, p. 42.
2. **Angelova Hr.**, Pechlivanova D., Dzhambazova E., Landzhov B. Role of kyotorphin in the behavioral changes induced by an experimental model of Alzheimer's disease in rats. Scientific Meeting organized by Bulgarian Society of Physiological Sciences - Sofia branch, 25 Nov, Sofia, Bulgaria, 2016, p. 12.
3. **Angelova Hr.**, Pechlivanova D., Dzhambazova E., Landzhov B. Impact of subchronic intracerebroventricular injection of the dipeptide kyotorphin on the experimental model of sporadic Alzheimer disease. **Royal Society Discussion Meeting 'Of mice and mental health: facilitating dialogue between basic and clinical neuroscientists'**, 24 – 25 April, London, Great Britain, 2017.

4. **Angelova Hr.**, Pechlivanova D., Dzhambazova E., Landzhov B., Katsiou A-F. Behavioral alterations induced by a model of sporadic Alzheimer disease: influence of an intracerebroventricular injection of the kyotorphin. **16th International Congress of Medical Sciences for Students and Young doctors**, May 11-14, Sofia, Bulgaria, 2017, p. 91.
5. Korcheva K., **Angelova Hr.**, Dzhambazova E., Pechlivanova D., Landzhov B. Changes in rat's brain on 2nd and 5th month after Alzheimer's disease model. **16th International Congress of Medical Sciences for Students and Young doctors**, May 11-14, Sofia, Bulgaria, 2017, p. 97.
6. Katsiou A-F., Papageorgiou Ch., **Angelova Hr.**, Pechlivanova D., Dzhambazova E., Landzhov B. Late effects of sub-chronic intracerebroventricular injection of kyotorphin on the experimental model of sporadic Alzheimer disease. **XXVII International Conference of the Union of Scientists in Stara Zagora**, June 1-2, Starozagorski Mineralni Bani, Bulgaria, 2017, p. 26.
7. Landzhov B, **Angelova H**, Iliev A, Stanchev S, Malinova L, Pechlivanova D, Dzhambazova E. Effects of kyotorphin on the morphological changes in the somatosensory cortex and meningeal blood vessels of Alzheimer's Disease model rats. **XXIII Congress of the Bulgarian anatomical society**, 5-7 Oct, Varna, Bulgaria, 2017.
8. Pechlivanova D., **Angelova Hr.**, Dzhambazova E., Krumova E., Miteva-Staleva J., Kostadinova N., Landzhov B. Biochemical, histological and behavioral impact of a subchronic intracerebroventricular treatment with kyotorphin on an experimental model of sporadic AD in rats. **AAIC, Aging and Alzheimer's disease: Opportunities for Therapeutic Interventions**, October 19-20, Varna, Bulgaria, 2017.
9. Angelov T., **Angelova Hr.**, Pechlivanova D., Dzhambazova E., Landzhov B. Protective effects of kyotorphin in gyrus dentatus in experimental model of Alzheimer's disease in rats. **7th**

**National Conference with International Participation
“Morphological Days” June 8 - 10, Sofia, Bulgaria, 2018.**

10. Pechlivanova D., B. Assenov, Chan I., **Hr. Angelova**, E. Dzhambazova. Effects of kyotorphin on motivation, habituation and working memory. **3rd Scientific Conference “Neurosciences – from the theory to the experiment and practice”**, 23-25 October, Bachinovo - Blagoevgrad, 2020.
/доклад/
11. Chan I., **Hr. Angelova**, E. Dzhambazova, B. Assenov, Pechlivanova D. Behavioral characteristics of antinociceptive doses of kyotorphin. **19th International Congress of Medical Sciences for Students and Young doctors**, May 13-16, Sofia, Bulgaria, 2021. P. 94.

Благодарности:

- *Изказвам своята най-искрена благодарност на научните ми ръководители доц. д-р Даниела Пехливанова и проф. д-р Елена Джамбазова за помощта и подкрепата при разработването и оформянето на настоящата дисертация.*
- *Изказвам благодарност на проф. д-р Бойчо Ланджов от Катедрата по анатомия и хистология на МУ – София, за съдействието му при извършване на хистохимичните изследвания и на доц. д-р Екатерина Крумова от Институт по микробиология, Българска Академия на Науките за подкрепата при провеждане на биохимичните изследвания.*

ROLE OF KYOTORPHINE ON BEHAVIORAL AND HISTOLOGICAL CHANGES CAUSED BY AN EXPERIMENTAL MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

/PhD Thesis/

DR. HRISTINA TSANKOVA ANGELOVA

Institute of neurobiology, Bulgarian Academy of Science

SUMMARY:

Alzheimer's disease (AD) is a widespread neurodegenerative disease associated with progressive memory loss that occurs after a prolonged presymptomatic phase. Intracerebroventricular (icv) injection of streptozotocin (STZ) in rats is one of the established experimental models of AD. In the process of searching for new biomarkers for early diagnosis of the disease, a reduced level of the endogenous dipeptide kyotorphin (KTP) in the cerebrospinal fluid of people with AD was found, which was accompanied by an increased content of phosphorylated tau protein. Our hypothesis is that the neuropeptide KTP plays a role in the pathophysiology of the disease. Literature data show that it is a neurotransmitter and neuromodulator in the central nervous system (CNS), which plays an essential role in the regulation of behavioral responses and the restoration of stress-disturbed homeostasis. Along with the data on the analgesic and neuromodulatory action of KTP, there are data in the literature on its potential neuroprotective effect. In available literature we did not find data on the mechanisms underlying the effects of KTP on memory processes and neurodegenerative changes associated with AD.