

## Особливості порушень пам'яті на ранній стадії розвитку хвороби Альцгеймера у щурів

Д.О. Бевзюк, Н.О. Левічева, В.В. Соколік

ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», Харків;  
e-mail: bevziukdaralex@gmail.com

*Досліджували стан робочої і довгострокової (емоційної) пам'яті на 15 щурах-самцях 15-16-місячного віку з моделлю хвороби Альцгеймера, індукованої одноразовим інтрагіпокампальним введенням 15 нмоль/л агрегатів β-амілоїдного пептиду 40. Контролем слугували 5 інтактних щурів, репрезентативних дослідним за віком і статтю. Імуноферментним методом визначали вміст ендогенного β-амілоїдного пептиду 42 у окремих структурах головного мозку (неокортекс, гіпокамп, нюхові цибулини і нюхові бугри). Встановлено, що збільшення на 27% його вмісту у гіпокампі зумовило розлад робочої пам'яті: порушення здатності до розпізнавання форми знайомих та незнайомих об'єктів. Показано, що підвищення в 2,2 раза сигнальних і зменшення в 1,7 раза екстрасигнальних реакцій разом зі збереженням частки позитивних умовнорефлекторних відповідей на тлі підвищеного рівня тривожності є показником ранніх проявів порушень довгострокової емоційної пам'яті. Ключові слова: пам'ять; хвороба Альцгеймера; щури; β-амілоїдний пептид.*

### ВСТУП

Однією з особливостей нейродегенеративної патології є наявність безсимптомного періоду, при якому прояв специфічних порушень процесів пам'яті і розвиток деменції стримуються компенсаторними механізмами мозку [1, 2]. Виражений когнітивний дефіцит при хворобі Альцгеймера (ХА) проявляється при зниженні синтезу ацетилхоліну в холінергічних нейронах до 80%, що призводить до послаблення їх впливу на неокортекс і гіпокамп – структури мозку, які відповідають за процеси пам'яті і уваги. Гіпокамп бере безпосередню участь у механізмах консолідації енграми пам'яті, здійснюючи трансфер інформації з короткочасної в довготривалу пам'ять, а неокортекс задіяний у довгостроковому її зберіганні [3, 4].

Значну роль у патогенезі ХА відіграють механізми церебрального амілоїдозу, предиктори генетичного пресингу, хронічне нейрозапалення, а також процесинг протеїну – попередника β-амілоїдного пептиду (AβPP)

за амілоїдогенним сценарієм [5–7]. Моделювання ХА ґрунтується на трьох підходах. При цьому використовувалися трансгенні тварини з додатковою експресією гена *AβPP* людини [8], доставка екзогенних токсичних олігомерів β-амілоїдних пептидів (Aβ) до окремих структур головного мозку (шлуночки мозку, базальні ядра Мейнерта, гіпокамп, нюхові цибулини, передні відділи неокортекса [9–11]), а також руйнування ділянок неокортекса або гіпокампа фізичним (електрокоагуляція) або хімічним способом (вплив алюмінію, органічних сполук ртуті тощо). Відомо, що у пацієнтів з ХА саме нейрони цих відділів мозку найбільше потерпають від токсичності олігомерів Aβ, які згодом утворюють сенільні бляшки, характерні для амілоїдогенної патології [12]. Тому інтрагіпокампальне введення агрегатів Aβ є адекватною експериментальною моделлю ХА для дослідження механізмів пам'яті. Тим не менш механізми виникнення та ранньої діагностики цієї патології вивчені недостатньо.

© Д.О. Бевзюк, Н.О. Левічева, В.В. Соколік

Метою нашого дослідження було визначення специфічних особливостей реалізації довгострокової (емоційної) і робочої пам'яті при інтрагіпокампальному введенні агрегатів  $\beta$ -амілоїдного пептиду 40 ( $A\beta_{40}$ ) щурам пізнього зрілого віку.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 20 щурах-самцях пізнього зрілого віку (15-16 міс), масою 350–400 г. Тварин було поділено на 2 групи: контрольну і дослідну. До контрольної групи ввійшли 5 інтактних щурів, а до дослідної – 15 тварин, яким індукували ХА за допомогою стереотаксичного введення в гіпокамп суспензії агрегатів  $A\beta_{40}$  («China Peptides Co.», Китай) у дозі 15 нмоль/л. Пептид розчиняли у бідистильованій воді і агрегували протягом 24 год при 37°C. Надалі великі конгломерати  $A\beta_{40}$  диспергували і стерилізували ультразвуком безпосередньо перед введенням. Операції проводили під загальним наркозом за умов внутрішньоочеревинної ін'єкції тіопенталу натрію (50 мг/кг). Об'єм введеної суспензії  $A\beta_{40}$  у агрегатній формі в лівий гіпокамп становив 10 мкл, швидкість введення через голку хроматографічного шприца – 0,03 мкл/с, тривалість введення – 5 хв. Стереотаксичні координати ділянки гіпокампа визначали за картами Фіфкової і Маршала, цитовано за Бурешем [13]: F = 2 мм, L = 2 мм, H = 3,5 мм.

Характеристики робочої пам'яті у щурів оцінювали за допомогою тесту розпізнавання нових об'єктів [14]. Для цього попередньо впродовж 2 діб їх поміщали в клітку на 10 хв для адаптації за умов експерименту (фаза звикання). На 3-тю добу тварин переводили в центр клітки перед двома однаковими об'єктами (A1 і A2) розташованими на відстані 15 см один від одного. Протягом 5 хв реєстрували тривалість дослідницької реакції: загальний час обнюхування твариною предметів на відстані менше ніж 2 см і/або дотик до них носом/лапкою (фаза навчання). Об'єкти розпізнавання A1 і A2 являли

собою ідентичні дерев'яні кубики розміром 2,0 × 4,5 × 3,0 см. На 4-ту добу проводили аналогічну процедуру (фаза тестування), але один предмет замінювали новим об'єктом – прямокутним паралелепіпедом розміром 1,0 × 8,0 × 1,5 см (Б1) або трикутною пірамідою розміром 4,0 × 5,0 см (Б2). За умов тестування реєстрували час дослідження нових (Б1 або Б2), а також знайомих предметів (А1 або А2). У щурів з модельованою ХА оцінювали стан робочої пам'яті до та на 5-6-ту і 16-17-ту добу після введення агрегатів  $A\beta_{40}$ . Коефіцієнтом дискримінації (КД) вважали час, витрачений на ознайомлення з новим об'єктом, до загального часу дослідження обох об'єктів у фазі тестування [14]:

$$КД = \left( \frac{t_{Б1/Б2}}{t_{Б1/Б2} + t_{А1/А2}} \right) \times 100\%,$$

де КД – коефіцієнт дискримінації;  $t_{Б1/Б2}$  – час дослідження нового об'єкта Б1 або Б2;  $t_{А1/А2}$  – час дослідження знайомого об'єкта А1 або А2.

Емоційну умовнорефлекторну реакцію уникання (УРЕРУ) у тварин виробляли в спеціально обладнаній камері, розділеній на дві частини перегородкою з віконцем. До електродів підлоги подавали напругу (поріг ноцицептивної стимуляції лапок від 3,0 до 3,5 В); струм включався замиканням контактів. Умовним сигналом для щура слугував звук метронома з частотою 120 хв<sup>-1</sup>, а його безумовне підкріплення здійснювали електричним струмом. Тварині у камері пред'являли умовний сигнал, після чого наступні 10 с звучання поєднували з безумовним підкріпленням. Якщо за цей час щур не переходив в іншу частину камери, метроном виключали, а подразнення струмом здійснювали ще протягом 5 с. Тривалість міжсигнального періоду вибирали рандомізовано у діапазоні від 2 до 3 хв, щоб запобігти виробленню у тварини умовного рефлексу на час. Щодня їм пред'являли не більше ніж 6 поєднань умовного сигналу з безумовним підкріпленням. Умовний рефлекс вважали виробленим,

якщо щур протягом одного дослідного дня переходив в іншу частину камери під час дії умовного сигналу не менше ніж 5 разів поспіль [15, 16]. Такі поведінкові міжсигнальні реакції, як екстрасигнальні, сигнальні, реакції уникання, реакції проб і вегетативні реакції, які супроводжують процес вироблення УРЕРУ, виражали у відсотках від числа поєднань умовного сигналу з безумовним підкріпленням, що пред'являлися на окремих стадіях експерименту в середньому по групі. Оцінку функціонального стану пам'яті проводили перед введенням агрегатів  $A\beta_{40}$  та на 5-ту і 17-ту добу.

Усіх тварин декапітували на 20-ту добу дослідження. Окремі структури головного мозку (неокортекс, гіпокамп, нюхові цибулини і нюхові бугри) виділяли на холоді. Зразки нервової тканини гомогенізували у тріс-буфері (50 ммоль/л тріс-НСl, 150 ммоль/л NaCl; рН 7,5), центрифугували при  $14000 \text{ хв}^{-1}$  протягом 5 хв та аліквоти супернатанта зберігали при  $-40^\circ\text{C}$ . Вміст ендogenous  $A\beta_{42}$  визначали за допомогою наборів реагентів для імуноферментного аналізу (ІФА) відповідно до інструкції (ELISA Kit Bioassay Technology Laboratory, Китай). Оптичну щільність зразків вимірювали на ІФА-аналізаторі (GBG Stat Fax 2100, США) при довжині хвилі 450 нм. Результати ІФА перераховували на 1 мг загального протеїну, вміст якого визначали методом Лоурі.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням критерію t Стью-

дента і непараметричного критерію Вілкоксона; значення  $P < 0,05$  вважали вірогідними.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для верифікації валідності використаної моделі ХА визначали вміст ендogenous токсичного  $A\beta_{42}$  у структурах головного мозку (неокортекс, гіпокамп, нюхові цибулини і нюхові бугри) щурів пізнього зрілого віку на 20-ту добу після інтрагіпокампального введення агрегатів екзogenous  $A\beta_{40}$  (рис. 1). Слід відмітити зростання ( $P = 0,03$ ) у гіпокампі на 27% вмісту  $A\beta_{42}$  порівняно з контролем. Результати наших попередніх досліджень і дані інших науковців переконують в тому, що зазначений ефект може бути зумовлений безпосереднім впливом екзogenous агрегатів  $A\beta_{40}$  за умов їх центральної дії, що виступає важливим маркером розвитку ХА [17–19].

При нейроетологічному дослідженні характеристик робочої пам'яті через 5 діб після введення агрегатів  $A\beta_{40}$  встановили статистично значуще скорочення тривалості дослідження тваринами однакових об'єктів: для кубиків А1 і А2  $7,2 \pm 1,8$  і  $7,8 \pm 1,9$  с щодо  $22,8 \pm 8,0$  і  $25,2 \pm 5,4$  с відповідно. Виявилось і вірогідне зростання латентного періоду першого підходу до кубика А1 (на 282%) та до кубика А2 (на 420%) порівняно з вихідними значеннями (рис. 2). Це свідчить про те, що інтрагіпокампальне введення агрегатів  $A\beta_{40}$

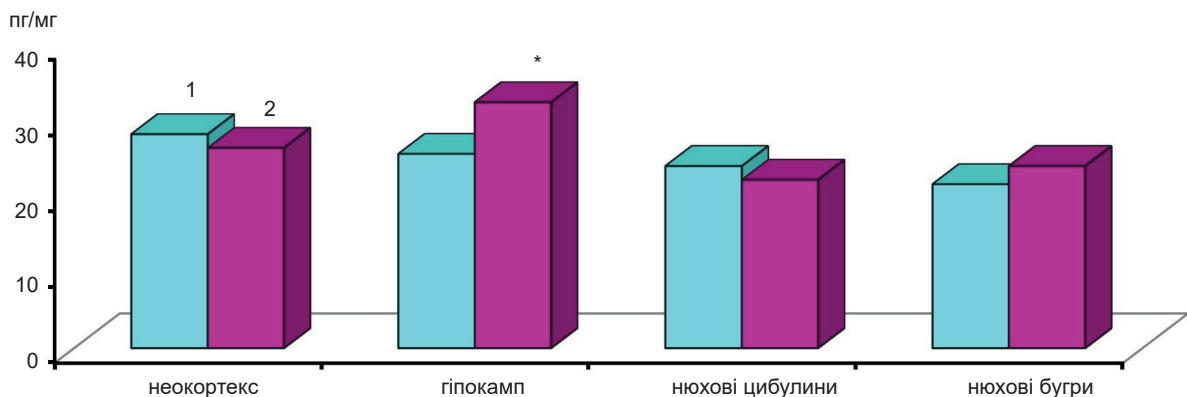


Рис. 1. Вміст ендogenous  $A\beta_{42}$  у структурах головного мозку щурів на 20-ту добу введення агрегатів  $A\beta_{40}$ : 1 – контрольна група; 2 – дослідна група. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем

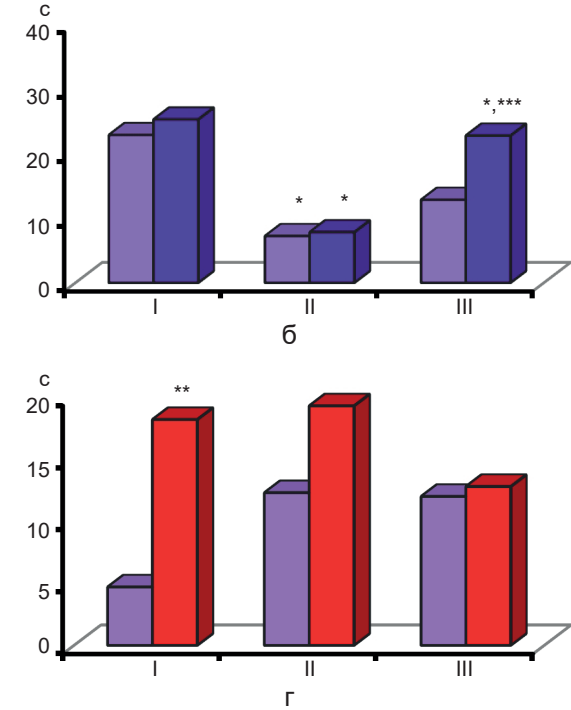
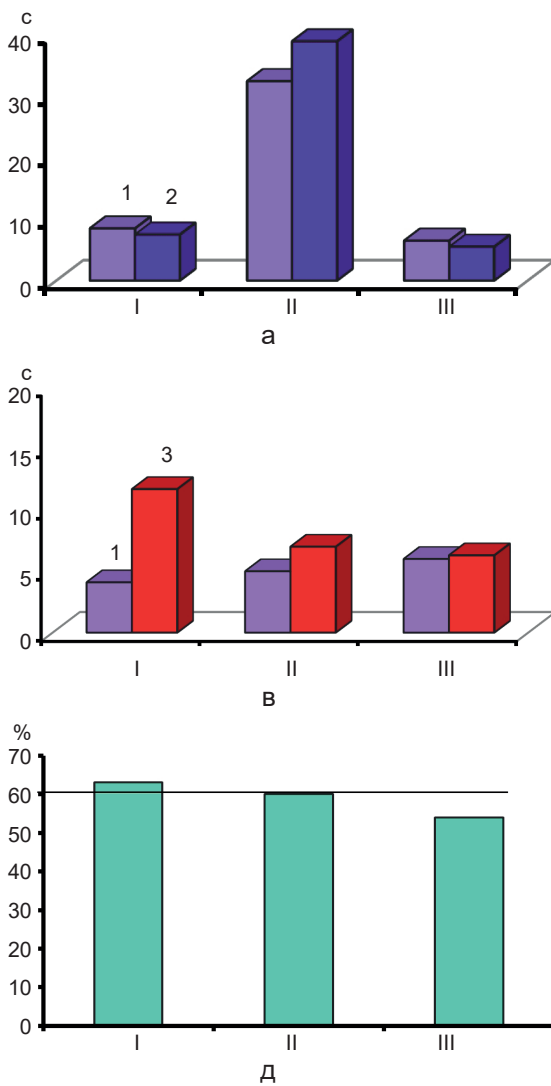


Рис. 2. Латентний період і тривалість дослідження об'єктів у щурів до і після інтрагіпокампального введення агрегатів  $\beta$ -амілоїдного пептиду 40 ( $A\beta_{40}$ ): I – вихідні значення; II – 5-та і 6-та доба після введення  $A\beta_{40}$ ; III – 16-та і 17-та доба після введення  $A\beta_{40}$ ; 1, 2 – знайомі об'єкти (A1 і A2), 3 – незнайомі об'єкти (B1 і B2); а, в – латентний період підходу до знайомих і незнайомих об'єктів; б, г – час дослідження знайомих і незнайомих об'єктів; д – коефіцієнт дискримінації; \* $P \leq 0,05$  порівняно з вихідним станом; \*\* $P \leq 0,05$  щодо значень між двома знайними об'єктами, \*\*\* $P \leq 0,05$  порівняно зі значеннями на 5-ту добу

викликало загальне зниження дослідницької активності тварин разом зі збереженням енграми пам'яті про знайомий об'єкт. На 6-ту добу заміна знайомого кубика незнайомим об'єктом зумовила скорочення латентного періоду першого підходу до об'єкта B1 на 61,5% і зростання вдвічі часу дослідження знайомого об'єкта порівняно з вихідними значеннями цих тварин. КД у цей період знизився до 60% щодо вихідних значень (див. рис. 2, д), що з урахуванням даних літератури свідчить про порушення дослідницької реакції, спрямованої на вивчення незнайомого об'єкта [13].

У тварин на 16-ту добу знижувався час дослідження об'єкта A1 ( $12,8 \pm 3,5$  с) порівняно з об'єктом A2 ( $22,7 \pm 4,8$  с;  $P = 0,04$ ), що відображає не розпізнавання відомих раніше об'єктів як однаково знайомих (див. рис. 2, б). У разі заміни знайомого кубика A1 або A2 незнайомим об'єктом B2 на 17-ту добу порушувалася диференціація між ними. Тривалість дослідження знайомого об'єкта ( $12,0 \pm 4,6$  с) ставала практично однаковою з відповідним показником для незнайомого об'єкта B2 ( $12,8 \pm 2,8$  с), а латентні періоди для кубика і пірамідки теж вірогідно не відрізнялись між собою ( $6,0 \pm$

1,5 і  $6,3 \pm 1,8$  с відповідно; див. рис. 2). КД залишився зниженим до 54%. Таким чином, при інтрагіпокампулярному введенні агрегатів  $A\beta_{40}$  у щурів відбувалося забування раніше знайомого об'єкта та порушення візуальної диференціації їх форми.

На 5-ту добу впливу агрегатів  $A\beta_{40}$  у щурів з міцно виробленими умовними рефлексами уникання виявили зміни характеру і кількості міжсигнальних реакцій (сигнальних, екстрасигнальних реакцій, реакцій проб, безумовних реакцій уникання; рис. 3). Таким чином, програма реалізації цілеспрямованого поведінкового акту, направлено на уникання електричного подразнення, порушувалася. Виходячи з теорії Анохіна [15], в якій поведінковий акт розглядають як системну організацію функції, слід вважати, що суттєве збільшення кількості сигнальних (в 14 разів,  $P < 0,05$ ) та екстрасигнальних (у 1,8 раза,  $P < 0,05$ ) реакцій у щурів порівняно з вихідними значеннями, свідчать про порушення вузлових механізмів структури поведінкового акту. На 17-ту добу кількість сигнальних реакцій продовжувала зростати і була в 2,2 раза більшою порівняно з 5-ю добою. Це супроводжувалося посиленням негативного грумінгу, як показника тривожності, а встановлене зменшення у 1,7 раза кількості

екстрасигнальних реакцій свідчило про гальмування процесів реалізації програми поведінки (див. рис. 3). Слід зазначити, що кількісні характеристики умовнорефлекторних відповідей на 5-ту і 17-ту добу після введення агрегатів  $A\beta_{40}$  у щурів істотно не змінювалися порівняно з вихідними значеннями. Середні значення латентних періодів умовнорефлекторних відповідей у цей період у щурів не розрізнялися (рис. 4). Таким чином, інтрагіпокампулярне введення агрегатів  $A\beta_{40}$  щурам-самцям пізнього зрілого віку на ранніх стадіях розвитку експериментальної ХА призводило до очевидних змін поведінкових характеристик реалізації умовнорефлекторних відповідей.

## ВИСНОВКИ

1. Виявлене порушення диференціації форми об'єктів, а також забування раніше знайомого об'єкта, характеризує зниження обсягу робочої пам'яті у щурів пізнього зрілого віку на ранніх стадіях розвитку ХА.

2. Збільшення у 2,2 раза сигнальних і зменшення у 1,7 раза екстрасигнальних реакцій разом зі збереженням частки умовнорефлекторних відповідей на тлі підвищеного рівня тривожності є показниками перших

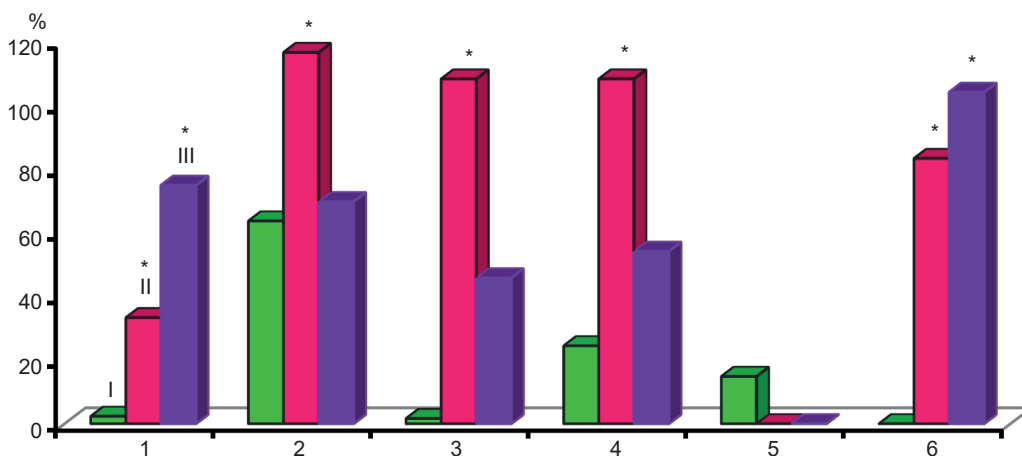


Рис. 3. Динаміка міжсигнальних реакцій у щурів пізнього зрілого віку до і після інтрагіпокампулярного введення агрегатів  $A\beta_{40}$ : I – вихідний стан; II – 5-та доба після введення  $A\beta_{40}$ ; III – 17-та доба після введення  $A\beta_{40}$ ; 1 – сигнальні реакції, 2 – екстрасигнальні реакції, 3 – реакції проб, 4 – безумовні реакції уникнення, 5 – вегетативні реакції, 6 – грумінг; \* $P \leq 0,05$  порівняно з вихідним станом

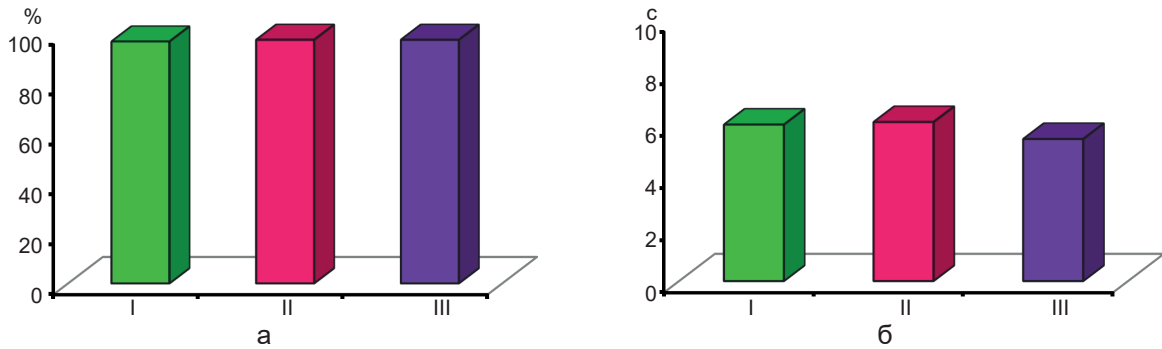


Рис. 4. Динаміка реалізації умовнорефлекторних відповідей: їх частка і латентні періоди у щурів до і після інтрагіпокампального введення агрегатів  $A\beta_{40}$ : I – вихідний стан; II – 5-та доба після введення  $A\beta_{40}$ ; III – 17-та доба після введення  $A\beta_{40}$ ; а – частка умовнорефлекторних відповідей, б – латентний період

проявів порушень довгострокової емоційної пам'яті у щурів пізнього зрілого віку на 17-ту добу розвитку ХА.

*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 coauthors of the article.*

Д. А. Бевзюк, Н. А. Левічева, В. В. Соколік

### ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ ПАМЯТИ НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС

Исследовали состояние рабочей и долгосрочной (эмоциональной) памяти 15 крыс-самцов 15-16-месячного возраста с моделированием болезни Альцгеймера, индуцированной однократным интрагиппокампальным введением 15 нмоль/л агрегатов  $\beta$ -амилоидного пептида 40. Контролем служили 5 интактных крыс, репрезентативных по возрасту и полу. Иммуноферментным методом изучали содержание эндогенного  $\beta$ -амилоидного пептида 42 в отдельных структурах головного мозга (неокортекс, гиппокамп, обонятельные луковицы и обонятельные бугры). Установлено, что увеличение на 27% его содержания в гиппокампе обусловило снижение состояние рабочей памяти: нарушение способности к узнаванию формы знакомых и не знакомых объектов. Показано, что повышение в 2,2 раза сигнальных и уменьшение в 1,7 раза экстрасигнальных реакций наряду с сохранением доли положительных условнорефлекторных ответов на фоне повышенного уровня тревожности является показателем ранних проявлений нарушений долгосрочной эмоциональной памяти.

Ключевые слова: память; болезнь Альцгеймера; крысы;  $\beta$ -амилоидный пептид.

D.O. Bevziuk, N.O. Levicheva, V.V. Sokolik

### FEATURES OF MEMORY DISORDERS IN THE EARLY STAGES OF ALZHEIMER'S DISEASE IN THE RATS

Neuroethological studies of working and long-term (emotional) memory were conducted on 15 male rats aged 15–16 months with the Alzheimer's disease model induced by a single intrahippocampal injection of 15 nmol/l of  $\beta$ -amyloid peptide 40 aggregates. The control group included 5 intact rats, representative by age and sex. The concentration of endogenous  $\beta$ -amyloid peptide 42 was studied in separate brain structures (neocortex, hippocampus, olfactory bulbs, and olfactory tubercles) using the immunoassay. It has been found that an increase in the content of endogenous  $\beta$ -amyloid peptide 42 by 27% in the hippocampus caused a decrease in working memory, namely, violation of the differentiation of the shape of objects and forgetting the familiar object. It has been shown that an increase of signal reactions in 2,2 times and a decrease of extrasignal reactions in 1,7 times while maintaining the proportion of positive conditioned reflex responses against the background of an increased level of anxiety are indicators of early manifestations of impaired long-term emotional memory. Key words: memory; Alzheimer's disease; rats;  $\beta$ -amyloid peptide.

SI, Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the NAMS of Ukraine, Kharkiv;

e-mail: bevziukdaralex@gmail.com

### REFERENCES

1. Purdenko TI. The problem of cognitive impairment in neurological practice (reference review). Buk Med Herald. 2014;18; 4:216-21. [Ukrainian].
2. Ciobica A, Lefter R, Stoica B. The interactions between the

- cholinergic and catecholaminergic systems - focusing on memory and oxidative stress. *Fiziol J.* 2017;63;2:25-33.
3. Huijgen J, Samson S. The hippocampus: a central node in a large-scale brain network for memory. *Rev Neurol (Paris)*. 2015;171:204-16.
  4. Insel N, Takehara-Nishiuchi K. The cortical structure of consolidated memory: a hypothesis on the role of the cingulate-entorhinal cortical connection. *Neurobiol Learn Mem.* 2013;106:343-50.
  5. Querfurth H, Ferla F. Alzheimer's disease. *New Engl J.* 2010;362:329-44.
  6. Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A. Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract.* 2015;24:1-10.
  7. Heneka MT, Carson J, Khoury JE, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet.* 2015;14:388-405.
  8. Iptyshev AM, Gorina YaV, Lopatina OL, et al. Experimental models of Alzheimer's disease: advantages and disadvantages. *Sib Med Rev.* 2016;4:1-17. [Russian].
  9. Kolobov VV, Storozheva ZI. Modern pharmacological models of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2014;8:38-4. [Russian].
  10. Stepanichev MYu, Ivanov AD, Lazareva NA, Moiseeva YuV, Gulyaeva NV. Neurodegenerative changes induced by injection of  $\beta$ -amyloid peptide fragment (25-35) in hippocampus are associated with NGF-signalling activation. *Bull RSMU.* 2016;1:14-9. [Russian].
  11. Lobzin SV, Sokolova MG, Nalkin SA. Influence of brain basal cholinergic system dysfunction on the condition of cognitive functions (literature review). *North-Western State Med Univ.* 2017;9:53-8. [Russian].
  12. Mukhin V. Pathogenesis of the basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Sechenov Russ Physiol J.* 2013; 99:793-804. [Russian].
  13. Bures J, Petranov M, Zahar I. Electrophysiological methods. Translation from Polish. Moscow: Publishing house of foreign literature. 1962. [Russian].
  14. Tzzy-Nan H, Yi-Ping H. Novel object recognition for studying memory in mice. *Neuroscience.* 2014;4:1-7.
  15. Dubrovina NI, Ranneva SV, Khrapova MV, Lipina TV. Deficit of the passive avoidance learning in calyntenin-2-deficient mice. *Russ Physiol J.* 2017;10:1114-24. [Russian].
  16. Bevzuyk DA. Neurophysiological mechanisms of recovery of trace processes in rats under influence of cerebral and distant neurotransplantation of the locus coeruleus tissue of the embryonic brain. *Disser ... PhD in biological sciences: 03.00.13.* Kharkiv. 2001: 159. [Ukrainian].
  17. Sokolik VV, Berchenko OG, Shulga SM. Comparative analysis of nasal therapy of curcumin soluble and liposomal forms of rats with model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis Parkinson.* 2017;7:2-6.
  18. Rasoolijazi H, Azad N, Joghataei MT, et al. The protective role of carnosic acid against beta-amyloid toxicity in rats. *Sci World J.* 2013; Article ID 917082:1-5.
  19. Soheili M, Tavirani MR, Salami M. Clearance of amyloid beta plaques from brain of Alzheimeric rats by *Lavandula angustifolia*. *Neurosci Med.* 2012;3, Article ID 26193:1-6.

*Матеріал надійшов  
до редакції 19.03.2019*