

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“
КАТЕДРА „АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ И БИОЛОГИЯ“

Калина Стефчева Илиева

**ЕФЕКТИ НА МЕЛАТОНИНЕРГИЧНИ ПРЕПАРАТИ ВЪРХУ
ЖИВОТИНСКИ МОДЕЛИ НА НЕВРОДЕГЕНЕРАТИВНИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
“ДОКТОР”

Област на висше образование: 7. “Здравеопазване и спорт”

Професионално направление: 7.1 “Медицина”

Докторска програма: “Медицинска биология”

Научни ръководители:

проф. Милена Атанасова Атанасова- Радева, д.б.

проф. д-р Яна Димитрова Чекаларова, д.м.

ПЛЕВЕН, 2025 г.

Дисертационният труд е написан на 146 страници, от които литературен обзор – 45, цел, задачи, материали и методи – 13, резултати – 43, обсъждане, изводи приноси, списък на публикациите, свързани с дисертацията – 13. Библиографската справка включва 167 литературни източника, всички от които на латиница. Дисертационният труд съдържа 31 фигури и 2 таблици.

Докторантът е зачислен в редовна докторантура на 11.05.2020 г. към катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология”, (заповед № 945/19.05.2020 г. на Ректора на МУ Плевен).

Дисертационният труд е обсъден и приет за официална защита на заседание на разширен катедрен съвет на катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология”, на 07.03.2025 г. и насочен за защита пред научно жури.

Научно жури:

1. Доц. Даниела Маринова Пехливанова, д.м.,
2. Проф. Спаска Ангелова Станилова д.б.н.,
3. Доц. Христина Христова Ночева-Димитрова, д.м.,
4. Проф. д-р Галя Цветанова Ставрева, д.м.,
5. Проф. Анелия Александрова Димитрова, д.м.

Официалната защита на дисертацията ще се състои на 23.05.2025 г. от 11:00 часа в зала „Амброаз Паре“, МУ – Плевен.

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на МУ – www.mu-pleven.bg

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята искрена признателност към моите научни ръководители – проф. Милена Атанасова, д.б., и проф. д-р Яна Чекаларова – за оказаното доверие, подкрепа и търпение, както и за ценната помощ и насоките по време на експерименталната работа и анализа на резултатите.

Изявявам дълбока благодарност към моите колеги от сектор „Биология“ при МУ – Плевен: доц. Александър Блажев, гл. ас. Лидия Петрова, ас. Петя Драгомирова, ас. Владислав Нанков и ас. Виктория Тодорова, както и към нашите лаборанти – за тяхното разбиране, постоянна подкрепа и ценна помощ в хода на работата.

Специални благодарности отправям към доц. д-р Димитринка Атанасова за съдействието в морфологичните изследвания и изготвянето на хистологични препарати.

Благодаря от сърце на своето семейство за безрезервната подкрепа, търпение и вяра в мен.

Използвани съкращения

БА	болест на Алцхаймер
сБА/LOAD	спорадична болест на Алцхаймер/ Болест на Алцхаймер с късно начало
фБА/EOAD	фамилна болест на Алцхаймер/Болест на Алцхаймер с ранно начало
ЦНС	централна нервна система
A β	амилоид бета
aCSF	синтетична гръбначномозъчна течност
Ago	агомелатин
Apo E	аполипопротеин E
APP	амилоид прекурсорен протеин
BACE1	бета секретаза/ ензим разцепващ APP в бета локацията
BBB	кръвно-мозъчна бариера
BL	базолатерално ядро на амигдалата
CA1, CA2, CA3	три полета, съставлящи хипокампа, (съкращение от „cornu ammonis“-рогът на Амон Ра)
CTF	карбоксил-терминални фрагменти
DG	зъбчата/дентатна гънка
ELISA	ензимно-свързан имуносорбентен анализ
EPM	тест с повдигнат кръстосан лабиринт
FDA	Американска администрация по храните и лекарствата
GABA	гама-аминобутирова киселина
HPA ос	хипоталамо-хипофизо-надбъбречна ос
icv	интрацеребровентрикуларно
IL-1 β	Интерлевкин 1 β
IWG-2	Международна работна група 2

LDT	тест светло/тъмно поле
MCI	леко когнитивно разстройство
MRI	ядрено-магнитен резонанс
NMDA	N-метил-D-аспартат
NFT	неврофбриларни възли
OF	тест открито поле
PET	позитронно емисионна томография
Pir	пириформена кора
PSEN	пресенилин
RAM	тест с осемраменен радиален лабиринт
SPT	тест за предпочитане на сладки разтвори
TNF- α	туморнекротичен фактор алфа

СЪДЪРЖАНИЕ

Въведение.....	8
Цел	9
Задачи	9
Материали и методи.....	10
1. Експериментални животни.....	10
2. Индуциране на сБА	10
2.1. STZ-индуциран плъши модел на сБА (Стрептозотоцинов модел).....	10
2.2. Аβ-индуциран плъши модел на сБА (Амилоиден модел).....	11
3. Поведенчески тестове	13
3.1. Тест „Открито поле“(OF)	13
3.2. Тест повдигнат кръстосан лабиринт (EPM).....	13
3.3. Тест „Светло-тъмно поле“ (LDT)	13
3.4. Тест за изследване на предпочитание към сладки разтвори (SPT)	13
3.5. Тест за принудително плуване	14
3.6. Изследване на пространствената памет чрез осем-раменен радиален лабиринт (RAM)	14
4. Биохимични показатели, измерени чрез ELISA.....	14
4.1. Измерване на Аβ, TNF-α и IL-1β чрез ELISA.....	14
4.2. Western blot за измерване на тау протеин	15
4.3. Измерване на α-секретаза, β-секретаза и γ-секретаза чрез ELISA	15
5. Хистология.....	15
6. Статистически анализ	16
Резултати.....	16
1. Изследване ефектите на хронично третиране с агомелатонин върху върху емоционален и когнитивен дефицит при модел на БА	16
1.1. Изследване нивата на тревожност и двигателна активност.....	16
1.2. Изследване за наличие на коморбидна депресия, свързана с БА.	20
1.3. Тест за изследване на хипокамп-зависима пространствена памет – радиален осем-раменен лабиринт – RAM	26
2. Влияние на третирането с агомелатин върху нивата на биохимични показатели 29	
2.1. Ефекти на агомелатин върху нивата на Аβ във фронтална кора /ФК/ и хипокамп.	29
2.2. Ефекти на агомелатин върху нивата на тау-протеин във ФК и хипокамп.(Стрептозотоцинов модел)	32

2.3. Ефекти на агомелатин върху сигнални маркери на възпалението: TNF- α и IL-1 β , във ФК и хипокамп.(STZ модел)	33
2.4. Секретазни ензими (A β модел)	34
3. Влияние на третирането с агомелатин върху невроналната загуба.	36
4.1. Морфологични ефекти на агомелатин върху различни мозъчни структури при STZ модел на БА	36
4.2. Морфологични ефекти на агомелатин върху различни мозъчни структури при амилоиден модел на БА	40
Обсъждане.....	45
Изводи	51
Справка за приносите на дисертационния труд	51
1. Приноси с оригинален характер:	51
2. Приноси с потвърдителен характер:	51
Приложения	52
1. Списък с научни публикации.....	52
2. Списък на участия в научни форуми и конференции.....	52
3. Реализирани проекти по темата на дисертационния труд	52

Въведение

Болестта на Алцхаймер (БА) е прогресивно невродегенеративно заболяване, което води до нарушаване на паметта, когнитивните функции и ежедневната активност. Тя е най-честата форма на деменция, засягаща основно възрастни хора и е свързана със загуба на мозъчни клетки и увреждане на междуневроналната комуникация.

Цялостно лечение за БА няма, но са налични терапии, които могат да забавят прогресията на заболяването или да облекчат някои от симптомите. Усилията на изследователите са насочени към регулиране баланса на метаболизма на амилоид бета (А β) и тау-протеини, поддържане на нивата на невротрансмитери, както и към терапии за поддържане на когнитивните способности и облекчаване на съпътстващата депресия.

Експерименталните животински модели играят критична роля в разбирането на патофизиологията на болестта на Алцхаймер (БА). Тези модели позволяват изследвания в контролирана среда, което дава възможност да се изследват причините и основните молекулни механизми характеризиращи заболяването, да се тестват нови медикаменти и да се откриват потенциални терапевтични подходи, преди да бъдат изпитвани върху хора.

Агомелатинът (Ago) е нов вид антидепресант, който е селективен агонист на мелатониновите MT1 и MT2 рецептори и антагонист на 5-HT_{2C} рецепторите. В редица проучвания се откриват и доказват неговите способности не само да повлиява благоприятно симптомите на лека и средна депресия, но и подобно на мелатонина, да проявява хронобиотичен ефект и да повлиява нарушенията в циркадните ритми, като същевременно подобрява когнитивните функции.

С оглед на гореизложеното и установените противовъзпалителни и невропротективни ефекти на Ago при други модели на невродегенеративни заболявания, в две последователни проучвания, изследвахме ефекта на лекарството прилагано профилактично (веднага след индуциране на модела) или палиативно (месеци след индуциране на модела) върху поведенческите, биохимичните и хистологичните нарушения при два модела на БА, индуцирани чрез стрептозотозин (STZ) и амилоид-бета (А β) при мъжки половозрели плъхове.

Изясняването ефикасността на този мелатонинов аналог върху определени аспекти от патогенезата при модели на БА би допринесло за разширяване на терапевтичното му приложение и по-нататъшни клинични проучвания.

Цел

Да се проучи ефикасността на антидепресанта агомелатин, прилаган по време на ранния и/или на късния етап от прогресията на БА върху патогенезата, индуцирана чрез интрацеребровентрикуларна инфузия на токсини и свързана с поведенчески, биохимични и клетъчни аномалии при два животински модела на БА.

Задачи

1. Да се създаде модел на спорадичен Алцхаймер в мъжки плъхове, чрез интрацеребровентрикуларно инжектиране на стрептозотцин.
2. Да се създаде втори модел на спорадична болест на Алцхаймер, чрез интрацеребровентрикуларно инжектиране на $A\beta_{1-42}$.
3. Да се валидират моделите чрез доказване на когнитивни и поведенчески промени (тестове, отчитащи: памет, тревожност и депресивно-подобно поведение).
4. Да се изследва ефекта на агомелатин върху модел-индуцираните нарушения в нивата на тревожност и безпокойство, паметовите и когнитивни функции.
5. Да се изследват биохимични маркери за невродегенерация и възпаление във фронтална кора и хипокамп при два плъши модела на БА – стрептозотцинов и амилоиден.
6. Да се направи хистологичен анализ на специфични мозъчни структури (пириформена кора, хипокамп, амигдала) от животни от двата изследвани модела, за оценка на морфологични промени и невронална загуба.

Материали и методи

1. Експериментални животни

За експериментите, проведени за постигане на целите на дисертационния труд бяха използвани осемдесет и седем тримесечни мъжки плъхове от породите Sprague Dawley (40 бр.) и Wistar (47 бр.), придобити от лицензиран развъдник - Вивариум към Институт по невробиология, БАН, гр. Сливница.

Експерименталните животни бяха адаптирани към помещенията за отглеждането им в Институт по невробиология (ИНБ), Българска Академия на Науките (БАН) седем дни преди процедурите за индуциране на БА. Условиата на отглеждане бяха стандартизирани: малки групи от по 3-4 животни в плексигласови клетки, 12/12-часов цикъл светло-тъмно, с начало на светлата фаза 08:00 ч., а на тъмната в 20:00ч.; температура на въздуха $21-22 \pm 2-3$ °C; относителна влажност 40-50% и свободен достъп до храна и вода, с изключение на времето, в което бяха провеждани поведенческите тестове.

При работата с опитните животни бяха спазвани правилата на Етичната комисия към ИНБ, БАН (регистрация FWA 00003059 US Department of Health and Human Services) и условията на Комисия по етика на научно-изследователската дейност към Медицински университет-Плевен. Издадено е и разрешително за използване на животни опити от Българска агенция по безопасност на храните (№121, валидно до 18.06.2020 г.). Провеждането на поведенческите опити беше съобразено със сезонните циркадни ритми при гризачите и е осъществено през есенно-зимния период.

2. Индуциране на сБА

2.1. STZ-индуциран плъши модел на сБА (Стрептозотоцинов модел)

Плъховете от порода Sprague-Dawley бяха упоени с комбинация от кетамин (80 mg/kg) и ксилазин (20 mg/kg), инжектирани интраперитонеално. След това бяха обездвижени върху стереотаксичен апарат (Narishige Sci. Inst. Labs, Japan) и им беше направен надлъжен разрез в средата на кожата, покриваща черепа, и на периостеума. Билателарно през калварията, над латералните вентрикули, използвайки зъботехническа бормашина, бяха направени два малки отвора, с координати (AP= -0.8, L= ± 1.5 , H= 3.8) според атласа на Paxinos и Watson, (2006). Във всеки от отворите бяха имплантирани стоманени канюли. Прясно приготвен разтвор на стрептозотозин в доза от 3mg/kg разтворен в синтетична гръбначномозъчна течност (aCSF) беше инфузиран със скорост 1 μ l/мин по 3 μ l за всяка канюла (общо 6 μ l за двата вентрикула). Инфузирането осъществихме с 28^{ми} размер стоманена игла и 10- μ l Хамилтонова спринцовка (Hamilton®). Инжекционната игла беше оставяна на място за пет минути, за да се избегне обратната дифузия на разтвора.

Процедурата на инфузиране на STZ беше проведена три пъти в рамките на три дни. След третата инфузия скалпът на животните беше затворен с медицински шев и раната беше третирана с антисептична антибиотична пудра. Sham-veh групите бяха третирани

по същия начин, но билателарно бяха инфузирани само с еквивалентно количество aCSF. За възстановяването им след операцията, в продължение на една седмица, животните бяха инжектирани с разтвор на Рингер (2 ml/100 g телесно тегло/ден, подкожно), получаваха витамини и бяха хранени с овлажнена храна.

Инжектирането на Ago стартира деветдесет дни след инфузията със STZ и продължи тридесет дни. Използвана беше доза от 40 mg/kg, i.p., разтворен в хидроксиетилцелулоза (1%) и инжектирана ежедневно в 16:00ч. (два часа преди началото на тъмната фаза). Това количество е доказано ефективно при поведенчески и невробиологични тестове (Shingo et al., 2013; Tchekalarova et al., 2016). Използваният Ago беше любезно предоставен от компания Servier, Франция.

Опитните животни бяха разделени в три групи, както следва:

- шам (фалшиво) оперирани плъхове (sham-veh), третирани само с разтворител (n= 12);
- плъхове, третирани със STZ и без последващо лечение с Ago (STZ-veh) (n= 11);
- плъхове, инфузирани със STZ, третирани с Ago (STZ-Ago) (n= 13).

Експерименталният дизайн е показан на Фигура 1.



Фигура 1. Схематично изображение на експерименталния протокол за индуциране на сБА чрез icv-STZ и последваща терапия с Ago.

2.2. Аβ-индуциран плъши модел на сБА (Амилоиден модел)

Процедурата по анестезия и амплантиране на канюлите беше аналогична на приложената при STZ модел. Бяха използвани мъжки плъхове от порода Wistar. Амилоид β_{1-42} (100 μ g; Tocris Bioscience Bristol, UK) беше разтворен в 100 μ L aCSF и инкубиран при стайна температура в продължение на една седмица преди употреба, за да се получат невротоксични олигомери (Asadbegi et al., 2016). Инфузирането на $A\beta_{1-42}$ беше извършено при същите условия, като описаното за STZ модел. Същата процедура беше приложена и за шам-опериранията групата, с изключение на вливането на aCSF. Грижите за оперираните животни, осъществени в рамките на една седмица, бяха подобни на тези описани при STZ модел.

Опитните животни, разделихме в две експериментални групи, като на всяка беше приложен различен протокол за третиране с Ago. При първата група, наречена „Експеримент 1“, третирането с Ago, разтворен в 1% хидроксиетилцелулоза, в доза 40 mg/kg, започна паралелно с *icv* A β ₁₋₄₂. При втората група, „Експеримент 2“, третирането с Ago беше стартирано 30 дни след инфузията на A β ₁₋₄₂.

И при двата експеримента Ago беше инжектиран *i.p.*, около два часа преди началото на тъмната фаза в продължение на 30 дни, по аналогичен начин със STZ-индуцирания модел.

В Експеримент 1 бяха изследвани следните групи:

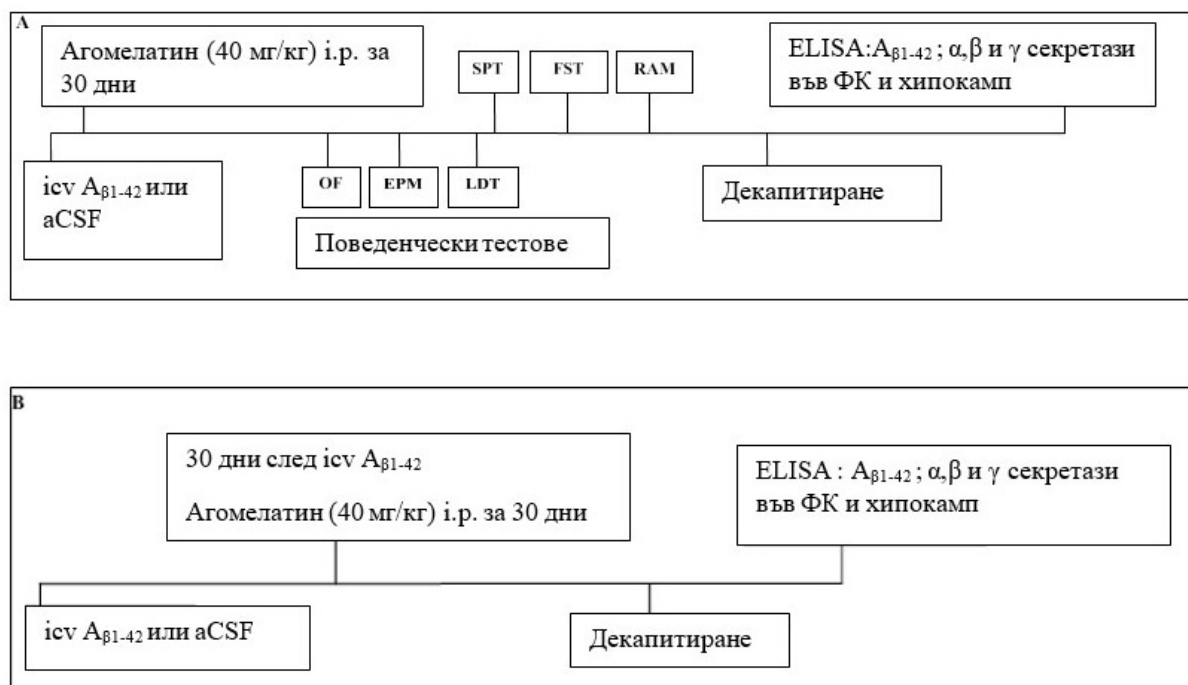
- плъхове, подложени на операция, инфузирани само с разтворител (sham-veh) (n= 8);
- плъхове, инфузирани с A β ₁₋₄₂ и без последващо третиране с Ago (A β -veh) (n= 10);
- плъхове, инфузирани с A β ₁₋₄₂, третирани с Ago (A β -Ago1) (n= 9).

Те са използвани за поведенчески тестове, хистологичен и биохимичен анализ.

В Експеримент 2 групите бяха аналогични, всяка от 6-8 на брой опитни животни: група sham-veh; A β -veh и A β -Ago2.

Мозъчните структури от Експеримент 1 използвахме за биохимичен и хистологичен анализ, а тези от Експеримент 2 бяха изследвани само биохимично.

Подробният дизайн на изследването е схематично представен на Фигура 2.



Фигура 2. Схематично изображение на експерименталния протокол за индуциране на сБА чрез *icv*- A β ₁₋₄₂ и последваща терапия с Ago.

3. Поведенчески тестове

Ефектът от хроничното третиране с Ago върху поведенческите промени и пространствената памет беше оценен с помощта на комплекс от тестове, които бяха извършени между 10:00 ч.и 12:00 ч., в отделна звукоизолирана стая, при изкуствена разсеяна светлина, където плъховете бяха настанявани поне 30 мин. преди всеки тест.

3.1. Тест „Открито поле“ (OF)

Тестът OF беше проведен в полистиренова отворена кутия (100/100/60 cm) за 5 минути. Плъха беше внимателно поставян в централната зона на кутията и бяха отчитани общото изминато разстояние (cm), вертикалната активност (брой изправяния на задни лапи) и времето, прекарано в центъра на кутията (сек).

3.2. Тест повдигнат кръстосан лабиринт (EPM)

Апаратът, изработен от черен дървен материал, има две отворени рамена (50/10 cm), перпендикулярни на две затворени рамена (50/10/50 cm) и централно открита площадка (10/10 cm). Всеки плъх беше поставен в центъра на лабиринта, насочен към едно от двете отворени рамена. Бяха измерени следните параметри: общо изминато разстояние (cm), брой влизания и време, прекарано в отворените рамена за 5 мин.

3.3. Тест „Светло-тъмно поле“ (LDT)

Тестът LDT беше изпълнен в сив полистиренов апарат, състоящ се от едно закрито (тъмно) (25 cm 25 cm 40 cm) и едно открито (светло) (25 /50 / 40 cm) отделение, свързани със 7-сантиметрова открита зона. Върху отвореното отделение беше монтирана крушка (80 lx). Всеки плъх беше поставян внимателно в тази откритата зона и бяха измервани следните параметри: общото време, прекарано в светлото отделение (сек), брой на преходите и латентен период за влизане в тъмната зона за 5 мин.

3.4. Тест за изследване на предпочитание към сладки разтвори (SPT)

Всяко експериментално животно беше поставяно в отделна клетка. Теста за привикване без измерване бе извършен в продължение на 5 дни с две идентични градуирани бутилки с обем 100 ml, пълни едната с чешмяна вода, а другата с 1% разтвор на захарин. Предпочитанията към сладкия разтвор бяха оценени чрез измерване на процентното съотношение на обема на сладкия разтвор спрямо общия обем на консумираната течност съответно по време на светлата и тъмната фаза.

3.5. Тест за принудително плуване

Тестът за принудително плуване (FST) беше извършван в пластмасов, прозрачен цилиндър (височина 60 cm, диаметър 45 cm) пълен с вода (23 °C), до 30 cm, за 5 минути, съгласно адаптиран протокол на Porsolt et al., (1979). Движението на плъха само за поддържане на главата над повърхността на водата беше отбелязано като време на неподвижност (сек) и записвано ръчно.

3.6. Изследване на пространствената памет чрез осем-раменен радиален лабиринт (RAM)

Преди теста всички плъхове бяха подложени на диета за намаляване на телесното тегло с до 15 % от изходното в продължение на поне една седмица. Тридневен предварителен тест за привикване беше извършен в лабиринта със сладки хранителни пелети, поставени по всички рамена. Плъховете, които не се научиха да изяждат повече от 70 % от пелетите в продължение на 15 минути, бяха изключени от проучването. Тестът се състоеше от една сесия на ден, провеждана в продължение на 5 последователни дни. В края на всяко рамо беше поставян сладък пелет. Тестваното животно беше поставяно в централната зона на апарата. За край на сесията се считаше, когато всички пелети биваха изядени, а при неизпълнение на критерия - след 10^{та} минута. Повторно влизане в рамо, от което хранителната пелета е била извадена и следователно е бил вече празен, се отбелязва като грешка на работната памет.

4. Биохимични показатели, измерени чрез ELISA.

4.1. Измерване на A β , TNF- α и IL-1 β чрез ELISA.

След декапитиране на животните хипокампа и фронталната кора бяха изолирани върху лед и съхранени при -20 °C до извършване на биохимичните тестове. Тъканните проби хомогенизирахме в 10 ml/g тъкан студен буфер, съдържащ 10 mM Tris HCl (pH 7,6), 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 1 mM EDTA и 1 mM PMSF.

Трите белтъчни маркера бяха анализирани с помощта на ELISA китове, закупени съответно: за A β от компанията AnaSpec; за TNF- α и IL-1 β от Invitrogen. Измерванията на TNF- α и IL-1 β извършихме след допълнително центрофугиране при 12 000g, 4°C, за 10min на тъканния хомогенат. Стойностите на изследваните маркери са измерени и представени в pg/ml.

След хомогенизацията концентрацията на протеини във всяка проба беше измерена чрез теста на Брадфорд. Амилоид β_{1-42} беше измерен с кит (AnaSpec, SensoLyte®, кат. № AS- 55,553).

След измерване концентрацията на амилоид в пробите, разделихме тази стойност на стойността на протеиновото съдържание, за да получим количеството β -амилоид, отнесено към 1 mg протеин. Количествата бяха представени като pg/mg протеин.

4.2. Western blot за измерване на tau протеин

Хомогенатите от хипокампа и фронтална кора бяха центрофугирани при 12 000 g, 4°C, за 10 min. Концентрацията на протеина в супернатантата беше определена по метода на Брадфорд. Еднакви количества (20 mg/ямка) от всяка проба бяха нанесени върху 10 % SDS полиакриламиден гел. Към всеки гел една от пробите служеше за стандарт (мозъчен хомогенат в концентрация 20 mg/ml). След електрофоретичното разделяне белтъците от гела бяха прехвърлени върху нитроцелуозна мембрана и блокирани с 3% говежди серумен албумин в TBS-0,05% Tween, за 3 ч. Мембраната беше инкубирана с първично заешко анти-tau (pSer356) фосфоспецифично антитяло (MBL International corporation) разрежено 1:1000, за 3 ч. при стайна температура или за една нощ при 4 °C. Следваше трикратно промиване с TBS-Tween и инкубиране допълнително във вторично биотинилирано анти-заешко IgG антитяло (Vector laboratories), разрежено 1:1000. След трикратното промиване в TBS-Tween мембраната беше инкубира в разтвор на авидин и биотин, след което беше калибрирана в PBS (pH 7,2), след това в разтвор на DAB-пероксидазен субстрат при стайна температура за 15 min. След появата на цветни ивици с подходяща плътност мембраната беше изплаквана в PBS и се изсушена на въздух. Бловете бяха сканирани и анализирани със софтуера ImageJ (V 1.51u). Резултатите бяха отчетени в относителни единици – AU (arbitrary units) и нормализирани за mg/протеин.

4.3. Измерване на α -секретаза, β -секретаза и γ -секретаза чрез ELISA

Съдържанието на β -секретаза и γ -секретаза беше анализирано съгласно процедурата, описана от производителя (Elabscience кат. № E-EL- R0102 и кат. № E-EL-R2489). Получените количества от всяка проба изразени в pg/ml, бяха разделени на измереното съдържание на протеини. Пробите за измерване на количеството α -секретаза бяха също изследвани чрез ELISA (BlueGene, кат. № E02A0727) и количеството α -секретаза беше изразено в pg/mg протеин.

5. Хистология

Плъховете бяха дълбоко анестезирани с уретан (1500 mg/kg, i.p.) (n= 5 на група) от Експеримент № 1 и транскардиално перфузирани първо с 0,05 М фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS), последван от 4% пара-формалдехид в 0,1 М фосфатен буфер (PB), pH 7,36. След перфузията изолираните мозъци бяха постфиксирани в същия фиксатор за една нощ при 4 °C. След това блоковете от мозъчна тъкан на плъхове бяха измити в чешмяна вода, а след това в дестилирана вода. След дехидратиране, бяха вградени в парафин, нарязани с микротом на 6 μ m дебелина и монтирани върху хромирани желатинизирани стъклени предметни стъкла. Мозъчните разрези бяха депарафинизирани с ксилен и етанол и оцветени с хематоксилин и еозин. Клетъчната плътност беше измерена чрез софтуер за цифрови изображения NIS Elements на Nikon, както беше описано по-рано (Tchekalarova et al., 2017), като количественият анализ на клетъчната плътност беше извършен с определяне на броя на оцветените клетки в избраната мозъчна структура.

6. Статистически анализ

Експерименталните данни бяха статистически обработени с помощта на SigmaStat® 11.0 и GraphPad Prism 7. Наличието на сигнификантната разлика между групите беше проверена чрез еднофакторен ANOVA, последван от post hoc тест на Bonferroni. За данните от теста за RAM беше използвана двуфакторен ANOVA. Ако данните не бяха нормално разпределени, беше използван ANOVA за непараметрични данни (Kruskal-Wallis за редици), последван от Mann-Whitney U тест. Резултатите бяха представени като средна стойност $\pm$ SEM. Статистически значимите разлики бяха приети при $p < 0,05$. При симетрично разпределени данни величината на установените разлики беше изразена като размер на ефекта (η^2 за ANOVA и Cohen's d за сравнения по двойки) при симетрично разпределени данни.

Резултати

1. Изследване ефектите на хронично третиране с агомелатонин върху върху емоционален и когнитивен дефицит при модел на БА

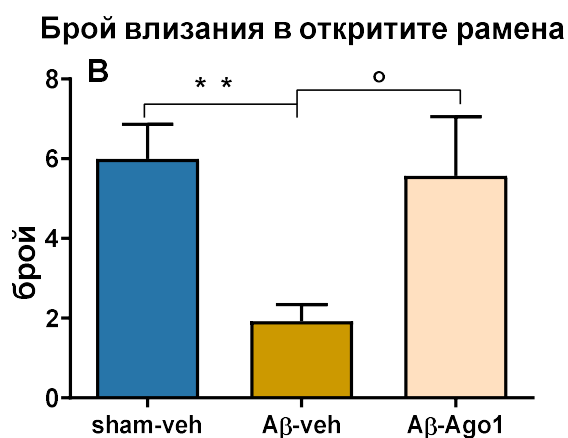
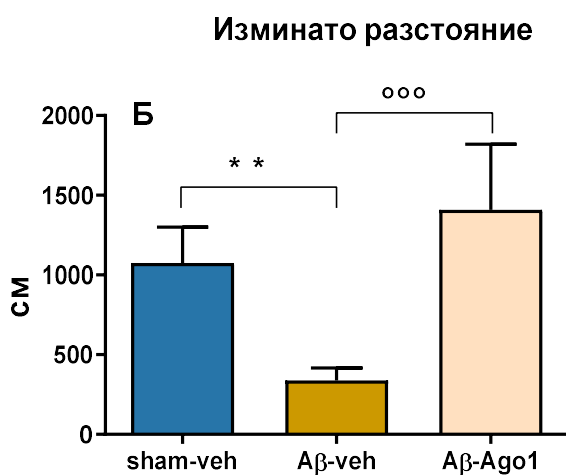
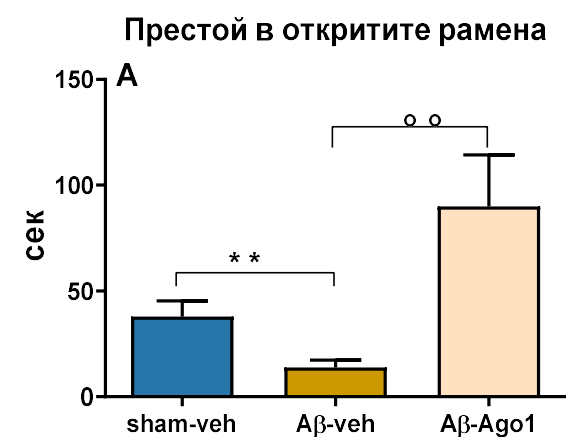
1.1. Изследване нивата на тревожност и двигателна активност

1.1.1. Тест с повдигнат кръстосан лабиринт – EPM (elevated plus maze)

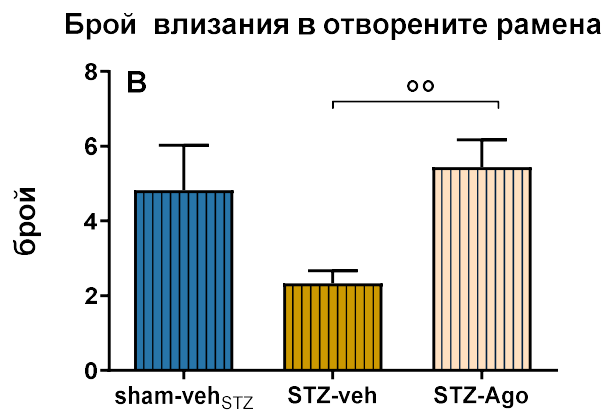
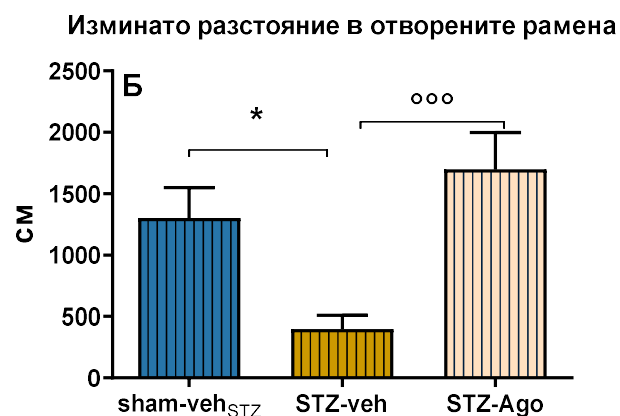
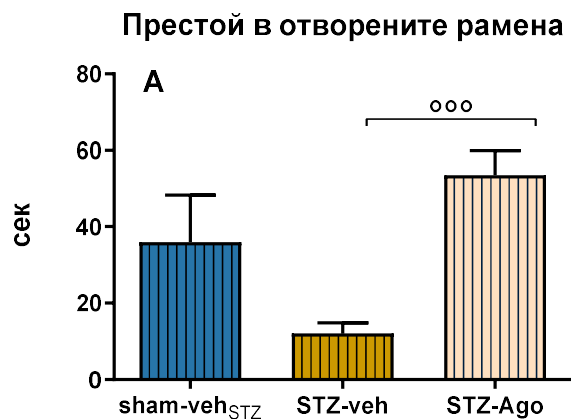
Намалената честота на влизане в отворените рамене, които са аверсивна зона за гризачите, времето на престой и общото изминато разстояние в тях, са приети като маркери за повишена тревожност.

Стрептозотоцинов модел: В сравнение с контролите, STZ-veh плъховете проявяват повишена тревожност и изминават по-кратко разстояние (Kruskal-Wallis test: $H = 12,7$, $p = 0,002$ $\eta^2_p = 0,53$), прекарват по-малко време (еднофакторен ANOVA: $F_{2,21} = 9,5$, $p = 0,002$, Cohen's $d = 0,9$ $\eta^2_p = 0,33$) и правят по-малък брой влизания (еднофакторен ANOVA: $F_{2,21} = 3,9$, $p = 0,039$, Cohen's $d = 0,9$ $\eta^2_p = 0,33$) в отворените рамена на лабиринта (фиг. 7). Хронично третиране с Ago значително подобрява промените в поведението индуцирани от STZ, като облекчава поведението на безпокойство, изразено чрез изминато разстояние ($p < 0,001$), време на престой ($p < 0,001$; $d = 2,1$) и брой влизания ($p = 0,003$; $d = 1,4$) в отворените рамена в сравнение с плъхове от групата STZ-veh.

Амилоиден модел: Интрацеребровентрикуларната инфузия на $A\beta_{1-42}$ предизвика повишено ниво на тревожност на опитните животни, което беше ясно отчетено по всички изброени показатели (Тест на Kruskal-Wallis: $H = 15,24$; Mann-Whitney: $U = 10$ $p = 0,0014$; $U = 4$, $p < 0,0005$). По отношение на общото изминато разстояние бяха отчетени статистически значими разлики (фиг. 8Б), както и при STZ-модел. Post hoc анализът показва, че групата на $A\beta$ -veh е със значително намален брой влизания и посещения в откритите рамена (фиг. 8А и В). Третирането с Ago облекчава предизвиканата от $icvA\beta_{1-42}$ повишена тревожност (брой влизания: $p = 0,03$; време: $p = 0,002$ в отворените рамена).



Фигура 3. Ефект на хроничното лечение с Ago, при STZ модел на БА, върху времето на престой (сек), изминатото разстояние (см) и броя посещения на отворените рамена на повдигнатия кръстосан лабиринт. Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$ *сравнение на STZ-veh с sham-veh; °сравнение на STZ-Ago със STZ-veh.



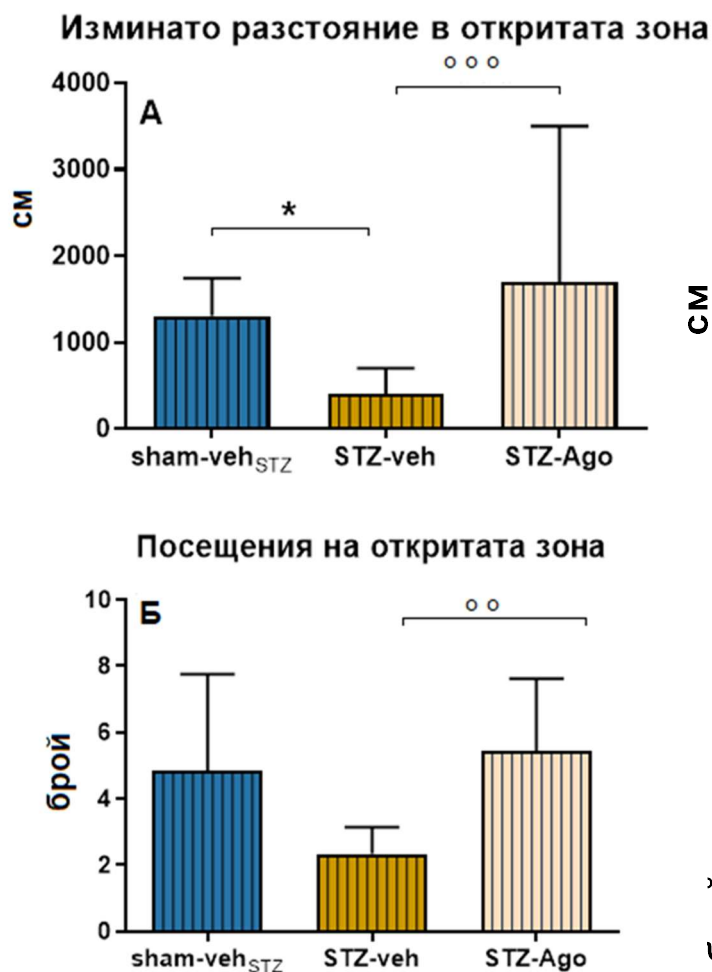
Фигура 4. Ефект от хронично третиране с Ago, при Aβ₁₋₄₁ модел на БА, върху времето на престой (сек) (A), изминатото разстояние (см) (Б) и броя влизания (В) в отворените рамена при теста EPM. Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$ *сравнение на Aβ-veh с sham-veh; °сравнение на Aβ-Ago с Aβ-veh.

1.1.2. Тест „Открито поле“ – OF (open field)

Счита се, че централната зона на апарата на теста OF се възприема като аверсивна зона от плъхове и други гризачи. По-продължителен период на проучване и по-дълготраен престой в централната зона, показват намалени нива на тревожност.

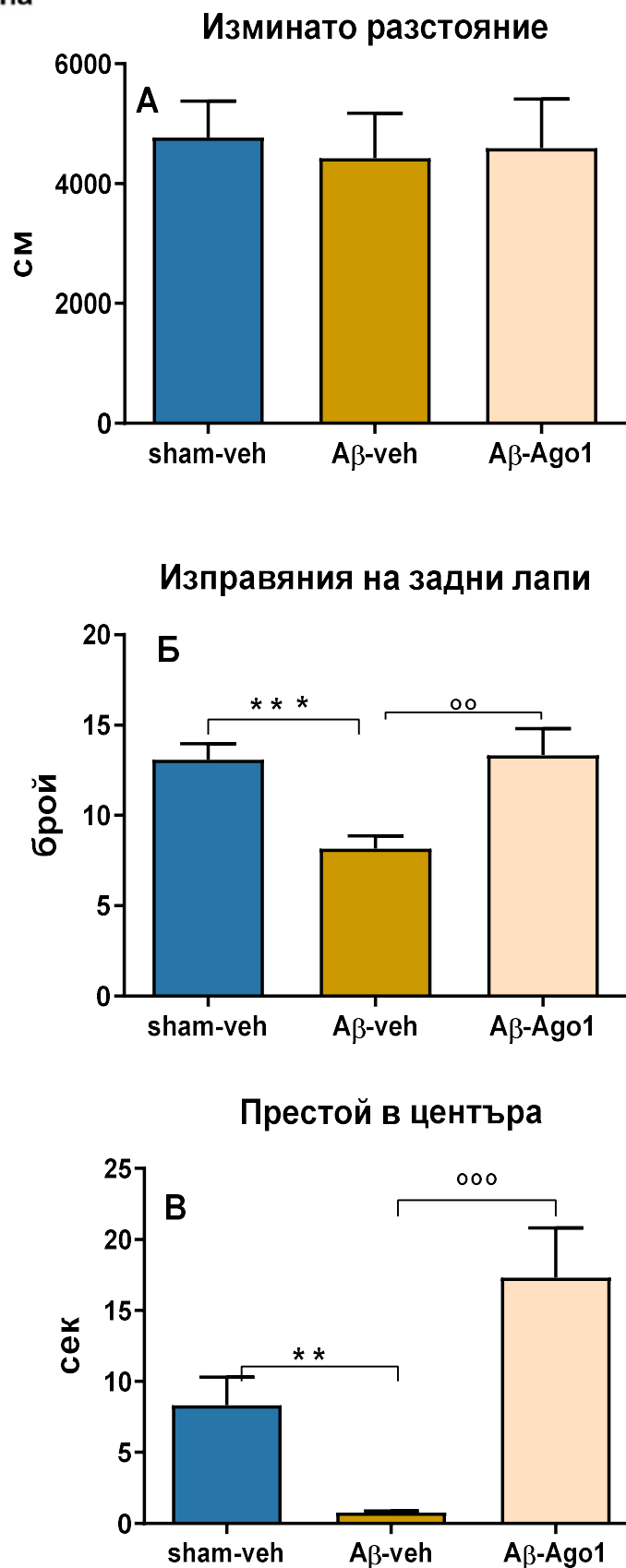
Стрептозотоцинов модел: Разстоянието, изминато от групата STZ-veh беше значимо по-малко от това при контролната група. Разстоянието, изминато от STZ-Ago надхвърли това, изминато от шам-оперираните животни (Фигура 5А). Групата животни с индуцирана БА, прекара най-кратко време в централната зона, в сравнение с контролите и третираните с агомелатин животни, което е показател, че нивата на тяхната тревожност са по-високи, възможно, поради интоксикацията със STZ. Отчетената разлика е статистически значима само между STZ-veh и STZ-Ago. (Фигура 9Б).

Амилоиден модел: Двигателната активност, изразена чрез общото изминато разстояние, не беше повлияна от icv инфузия на A β (Фигура 10А). Въпреки това бяха отчетени промени в проучвателната активност, като намаляване броя на изправяния на задни лапички ($F_{2, 31} = 9,284$; $p = 0,0007$), а също и в нивата на тревожност, увеличавайки времето на престой в централната част на апарата ($F_{2, 31} = 15,11$; $p < 0,0001$). Сравнението между групите показва, че A β -veh са имали по-ниска вертикална активност ($t = 4,346$, $df = 23$) в сравнение с групата с sham- veh (Фигура 6, Б) и по-кратко време, прекарано в аверсивната централна зона на апарата ($t = 3,806$, $df = 2$, $p = 0,001$) (фиг. 10В) в сравнение с шам-оперираните животни. Хроничното третиране с Ago възвърна до контролно ниво icvA β_{1-42} -индуцирания отслабен поведенчески отговор, свързан с броя на изправяния на задни лапички ($t = 3,479$, $df = 20$) и времето, прекарано в центъра, в сравнение с A β -veh групата ($t = 5,505$, $df = 19$, $p < 0,0001$).

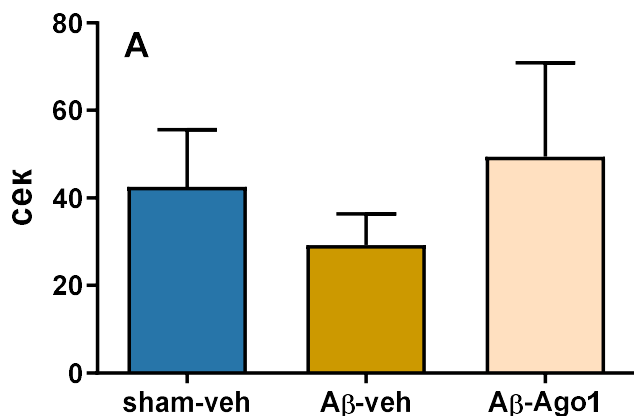


Фигура 5. (↑) Влияние на хроничното лечение с агомелатин (Ago), върху общото изминато разстояние (см) (А) и посещенията на откритата зона (Б) при теста OF. Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$. *сравнение на STZ-veh с sham-veh; ° сравнение на STZ-Ago със STZ-veh

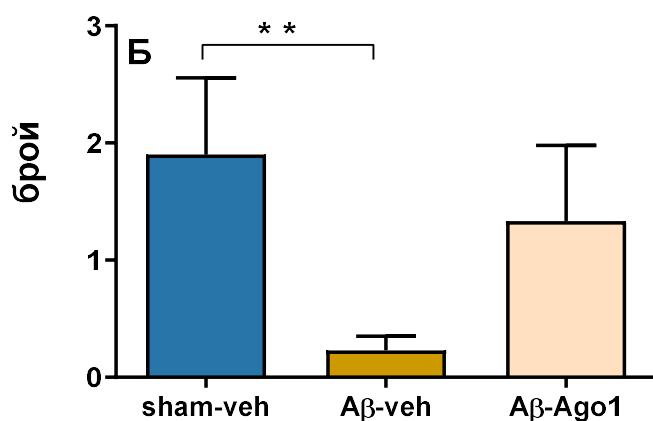
Фигура 6. (→) Влияние на хроничното третиране с Ago при Експеримент 1, върху общото изминато разстояние в см (А), изправяне на задни лапи (Б), престой в центъра (В) при теста в открито поле. Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$. *сравнение на Aβ-veh с sham-veh; ° сравнение на Aβ-Ago с Aβ-veh.



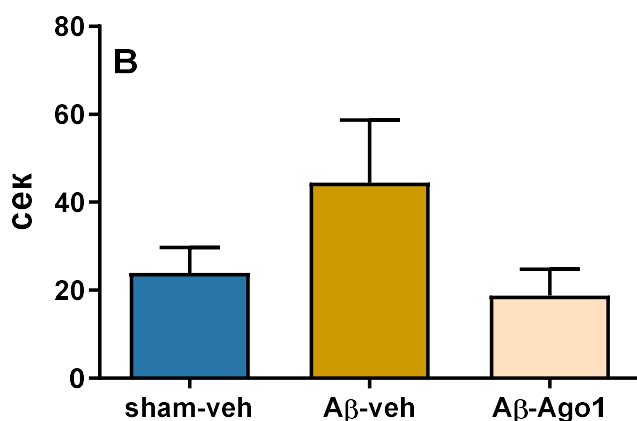
Време на престой в осветената част



Преходи към осветената част



Латентност към тъмното поле



1.1.3. Тест светло/тъмно поле-LDT (light-dark test)

Осветеното отделение и при този метод се счита за отбягвана зона и времето, прекарано там, броят на влизанията в тъмното отделение и времето за придвижване към него (тъмното) са три показателя, чрез които отчитаме нивото на тревожност у опитните животни. Методът беше приложен само при Амилоидния модел, при Експеримент 1, за да бъде изследван и друг аспект на тревожността, свързан с изследователския инстинкт при животните. Подобно на другите два теста OF и EPM, наблюдавахме повишаване на нивото на тревожност при плъховете от Aβ-veh групата, което беше индуцирано от ivcAβ₁₋₄₂.

Въпреки, че не беше достигната статистически значима разлика във времето, прекарано в светлото отделение ($H = 0.405$, $p = 0.817$) и латентността за придвижване към тъмното ($H = 4.448$, $p = 0.108$), се забелязва тенденция за промяна в стойностите на тези два показателя, а именно: по-кратък престой в аверсивната зона и увеличаване на времето, необходимо за придвижване към нея, при групата Aβ-veh в сравнение с групите sham-veh и Aβ-Ago. От резултатите, представени на **Грешка!** **Източникът на препратката не е намерен.** виждаме, че въпреки това, броят на преходите от светло към тъмно е показателно различен сред трите групи ($H = 5.863$, $p = 0.05$), като осезателно бе намален при групата Aβ-veh ($p = 0.01$).

Фигура 7. Влияние на хроничното третиране с Ago върху времето, прекарано в светлото отделение (сек) (A), броя на преходите (Б) и латентността за влизане в тъмното

отделение (B). Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$ $**p < 0,01$ *сравнение на A β -veh с sham-veh; ° сравнение на A β -Ago с A β -veh.

1.2. Изследване за наличие на коморбидна депресия, свързана с БА.

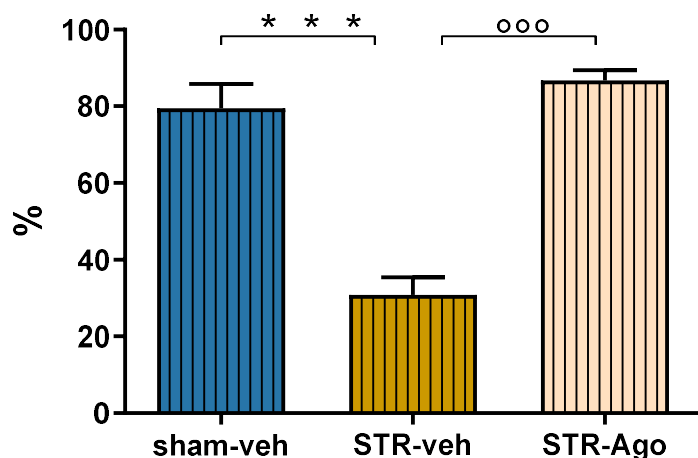
1.2.1. Тест за предпочитане на сладки разтвори.

Анхедонията, свързана с по-ниска склонност към консумация на подсладен разтвор в сравнение с питейна вода, беше приета като маркер за депресивно-подобно поведение. Предпочитанията към сладки разтвори бяха отрицателно повлияни от инфузията и на двата токсина, чрез които индуцирахме БА при двата опитни модела.

Стрептозотоцинов модел: Прилагането на STZ значимо намалява обема приет сладък разтвор спрямо общия обем приети течности. Третирането с мелатониновия аналог - Ago, след инфузия със STZ, води до статистически значимо повишаване на консумацията на сладък разтвор (еднофакторен ANOVA анализ: $F_{2, 22} = 40,3$, $p < 0,001$). Спрямо този показател можем да съдим, че е настъпило облекчаване на състоянието на анхедония, предизвикано от STZ (Фигура 8) ($t = 8,764$, $df = 14$, $p < 0,0001$).

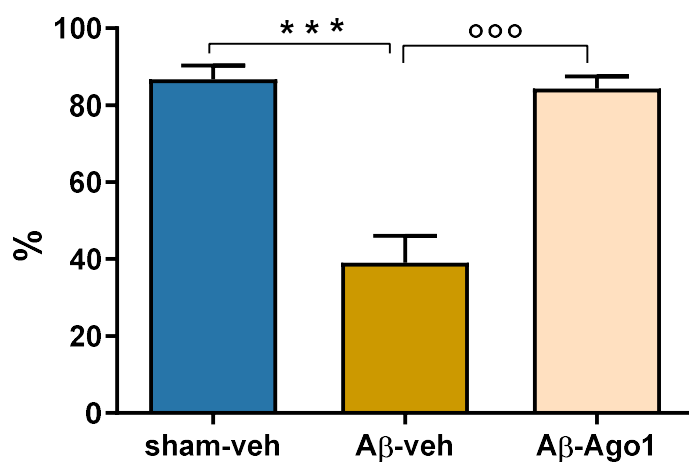
Амилоиден модел: След инфузия и на icvA β_{1-42} (еднофакторен ANOVA анализ: $F_{2,23} = 32,330$, $p < 0,0001$), предпочитанието за сладки разтвори беше значително понижено. Вижда се значимо намаляване на консумация на подсладен разтвор от A β -veh групата в сравнение с групата sham-veh ($p < 0.0001$). Агомелатинът успява да коригира депресивно-подобния отговор при A β -Ago групата ($p = 0,0001$), съответно в сравнение с A β -veh групата и да възвърне афинитета към сладък разтвор до контролни нива ($t = 6,439$, $df = 17$, $p < 0,0001$) (Фигура 9).

Тест за предпочитане на сладки разтвори



Фигура 8. Влияние на хроничното третиране с Ago, при icv-STZ модела на БА, върху предпочитанията към сладък разтвор (%). Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$. *сравнение на STR-veh с sham-veh; °сравнение на STR-Ago със STR-veh.

Тест за предпочитане на сладки разтвори



Фигура 9. Влияние на хроничното третиране с Ago, при icvAβ модела на БА, върху предпочитанията към сладки разтвори. (%). Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$. *сравнение на Aβ-veh с sham-veh; °сравнение на Aβ-Ago с Aβ-veh.

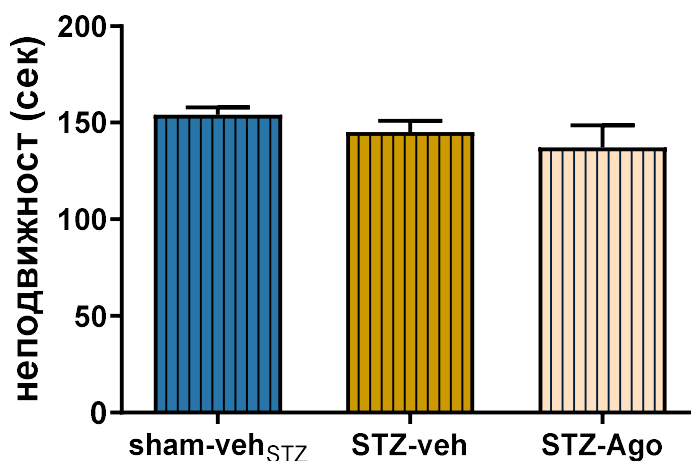
1.2.2. Тест за принудително плуване

Стрептозотоцинов модел: Повишената неподвижност във водата се счита за маркер на поведение, свързано с отчаяние при FST. Анализираният резултат от теста за принудително плуване с опитните животни от първия модел – индуциран със STZ не показват съществено различие в поведението на животните от трите групи (Mann Whitney тест, $P = 0,9703$). На

Фигура 10 ясно се вижда, че времето, прекарано в неподвижност е сходно при контролите, плъховете с индуцирана БА и при тези с приложено третиране с Ago.

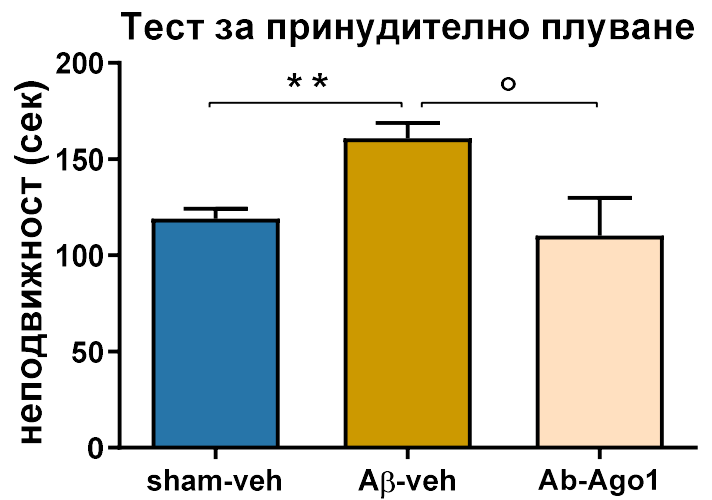
Амилоиден модел: Еднопосочен ANOVA анализ разкри (Фигура 11) значителна разлика във времето на неподвижност между групите sham-veh и A β - veh ($F_{2,23} = 5.831$, $p = 0.009$). Post hoc анализ потвърди, че то е значително увеличено при A β -veh групата в сравнение с sham-veh групата ($P = 0.016$). Приложеното третиране с Ago коригира депресивно подобното поведение, предизвикано от инфузията на icvA β_{1-42} .

Тест за принудително плуване



Фигура 10. Тестът за принудително плуване не отчете статистически значими разлики в поведението на плъховете от трите групи от STZ модела

Фигура 11. Плъховете $A\beta$ -veh показват депресивно-подобно поведение, престочвайки по-дълго време неподвижни при FST в сравнение с групата с sham-veh ($p=0,001$). Третирането с Ago оказва антидепресивен ефект и значимо съкращава времето на неподвижност (t -тест, $p=0,0121$).

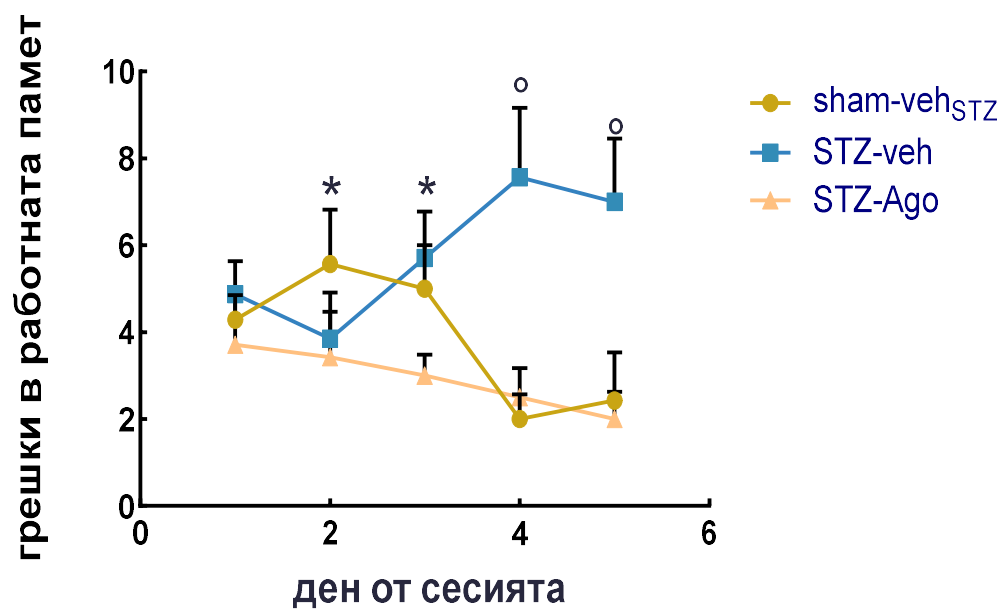


1.3. Тест за изследване на хипокамп-зависима пространствена памет – радиален осем-раменен лабиринт – RAM

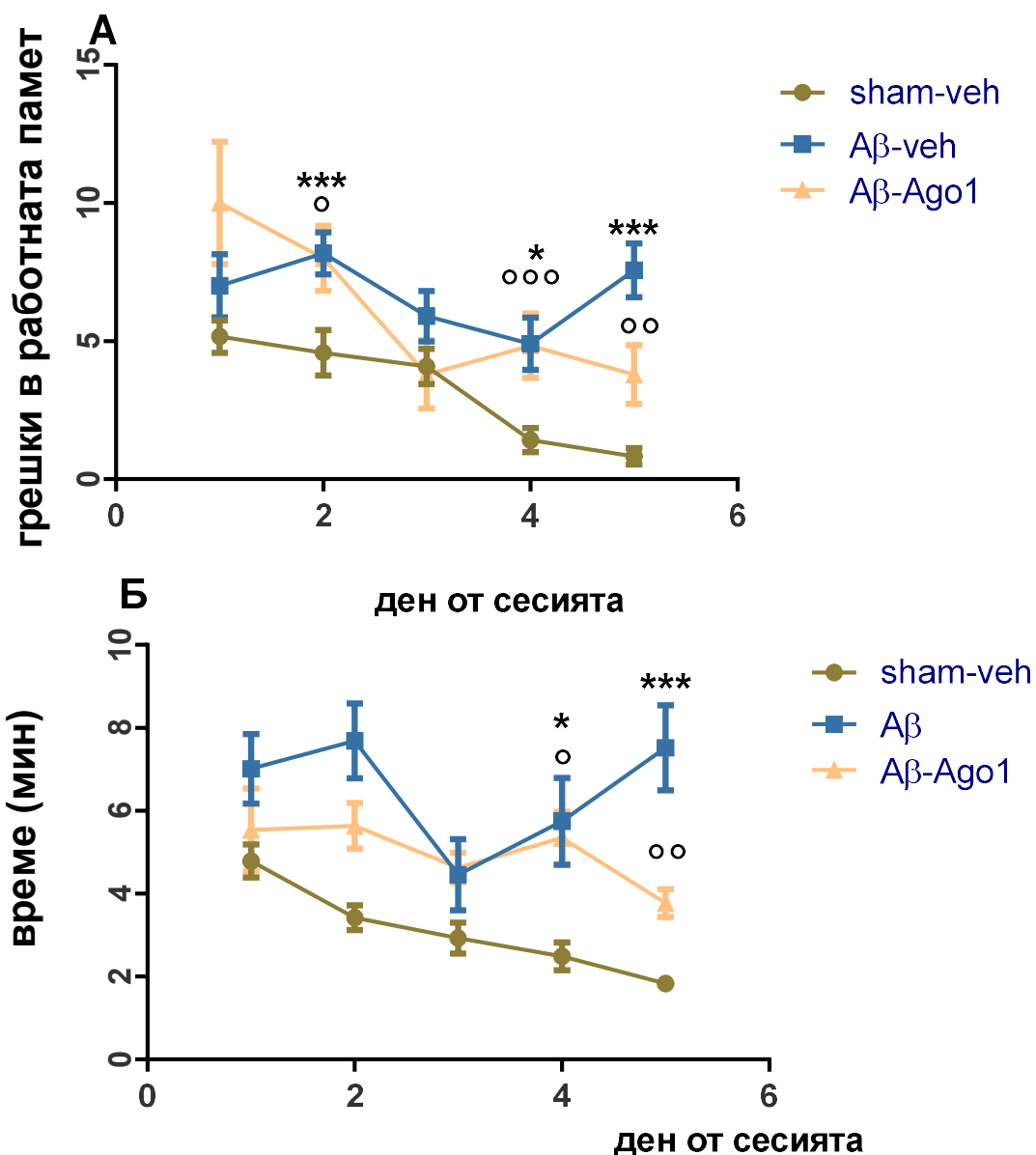
Липсата на тенденция за намаляване на броя на грешките на пространствената памет и времето за изпълнение на критериите на задачата във всяка следваща сесия, се считат за показатели на нарушения в хипокамп-зависимата пространствена памет. Шам- оперираните животни (и при двата опитни модела) показаха отчетливо как на всеки следващ ден от опита времето необходимо им за изпълнение на задачата намалява, като също така, допускаха все по-малък брой грешки.

Стрептозотоцинов модел: Двухфакторен ANOVA (фактори са време на изпълнение и брой грешки) анализ отчете, че честотата на грешките в работната памет е повлияна спрямо експерименталната група ($F_{2,104} = 10,9$, $p < 0,001$). Също така, отчетохме и зависимост между групата животни и необходимото време за изпълнение ($F_{8,104} = 2,6$, $p < 0,012$), която ни показва, че инфузията на STZicv значително е увредила пространствена памет. Post hoc тестът показва, че на STZ-veh групата ѝ е необходимо по-дълго време за изпълнение на задачата в сравнение с останалите две групи, респективно спрямо sham-veh (4-та и 5-та сесия: съответно: $p < 0,001$ и $p = 0,009$) и спрямо групата STZ-Ago (4-та и 5-та сесия: $p < 0,001$ и $p = 0,006$, съответно $\eta^2_p = 0,51$) (Фигура 12).

Амилоиден модел: При вторият опитен модел, предизвикан чрез инфузия на A β и при двете групи, третирани с токсина (A β -veh и A β -Ago), забелязахме нарушения в пространствена памет, но не установихме значима промяна в броя извършени грешки във времето на провеждане на теста (Ефект от третирането: $F_{2,162} = 26,863$, $p < 0,001$; Ден на сесията: $F_{4,162} = 5,022$, $p < 0,001$). Post hoc анализ потвърди, че A β -veh групата показва повече грешки на работната памет по време на втора ($P < 0,001$), четвърта ($P = 0,007$) и пета ($P < 0,001$) сесия в сравнение с групата на шам-оперираните животни (Фигура 13). Хроничното третирането с Ago не подобри пространствената памет в A β групата (втора сесия $p = 0,012$), четвърта ($p = 0,001$) и пета ($p = 0,006$) сесия в сравнение с групата sham-veh. Групата sham-veh показва тенденция да изпълнява задачата за памет за по-кратък период с всяка сесия, докато двете A β - групи (A β -veh и A β -Ago) не успяха да съкратят времето за изпълнение (Ефект от третирането: $F_{2,162} = 8,496$, $p < 0,001$; ден от сесията: $F_{4,162} = 10,420$, $p < 0,001$; взаимовръзка на третиране с Ago спрямо ден от сесията: $F_{8,162} = 8,953$, $p < 0,001$). Post hoc анализ показва, че A β -групите (A β -veh и A β -Ago1) са имали нужда от значително повече време на четвърти ($p = 0,023$ A β -veh в сравнение с групата на sham -veh; $p = 0,018$ A β -Ago) и пети ден от сесията ($p < 0,001$ A β -veh; $p = 0,016$ A β -Ago в сравнение с sham-veh групата).



Фигура 12. Ефект от хронично третиране с Аго върху грешките в работната памет при теста с радиален лабиринт. Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$. *сравнение на STZ-veh с sham-veh; °сравнение на STZ-Ago със STZ-veh.



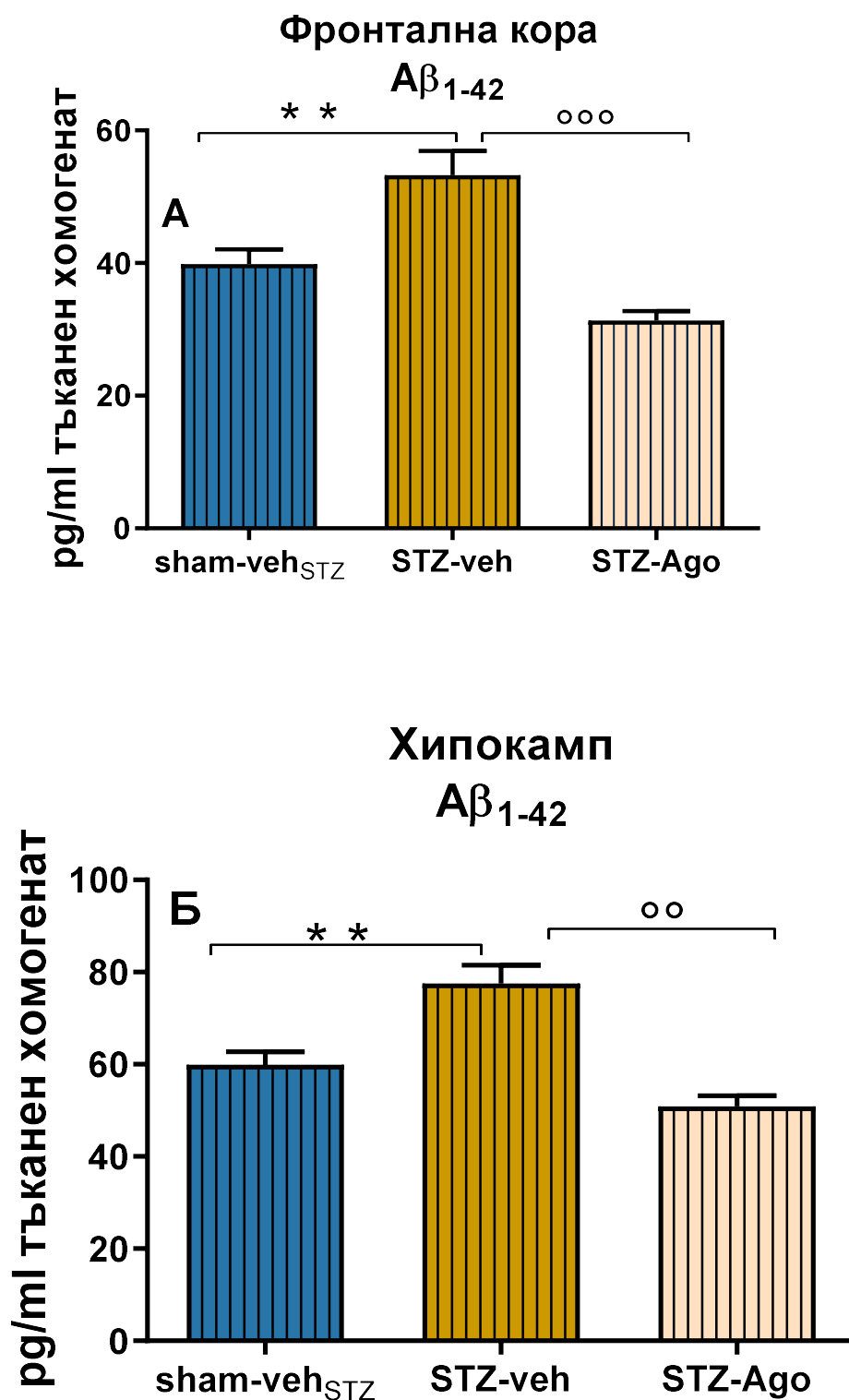
Фигура 13. Ефект от хронично третиране с Аго върху грешките на работната памет в теста с радиален лабиринт. Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$ $**p = 0,007$ 4-ти ден, $***p < 0,001$ 5-ти ден, Aβ-veh група в сравнение с sham-veh група (А); $*p = 0,023$ 4-ти ден Aβ-veh група в сравнение с групата sham-veh, $*p = 0,018$ 4-ия ден Aβ-Ago1 в сравнение с групата sham-veh, $***p < 0,001$ 5-ия ден Aβ-veh група в сравнение с групата sham-veh, $*p = 0,016$ 5-ия ден Aβ-Ago1 в сравнение с групата sham-veh (Б). (Смесен ANOVA); *сравнение на Aβ-veh с sham-veh; ° сравнение на Aβ-Ago1 с Aβ-veh

2. Влияние на третирането с агомелатин върху нивата на биохимични показатели

2.1. Ефекти на агомелатин върху нивата на $A\beta$ във фронтална кора /ФК/ и хипокамп.

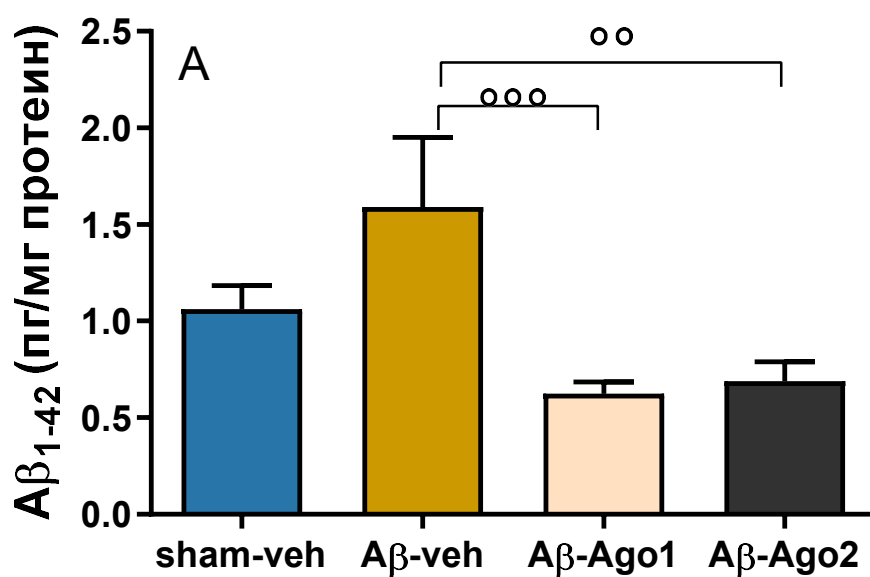
Стрептозотоцинов модел: Еднофакторен ANOVA анализ показва, че съдържанието на $A\beta_{1-42}$ във фронталната кора ($F_{2,20}=16,2, p<0,001, \eta_p^2=0,42$) и хипокамп е различно, спрямо опитната група ($F_{2,20}=15,9, p<0,001, \eta_p^2=0,575$), в тъканите изолирани от първи опитен модел. Статистическа обработка на данните показва, че групата STZ-veh се характеризира със завишени количества на $A\beta_{1-42}$ във фронтална кора и в хипокамп в сравнение с sham-veh групата ($p=0,05$). Третирането с Аго възстанови баланса на $A\beta_{1-42}$ обратно до контролните стойности и в двете мозъчни структури, което беше установено чрез резултатите, отчетени при групата STZ-Ago ($p<0,001$) (Фигура 14).

Амилоиден модел: Значителна разлика между групите по отношение на нивото на $A\beta_{1-42}$ беше демонстрирана, както във ФК (тест на Kruskal-Wallis: $H=13,524, p=0,004$), така и в хипокамп при животните от втория опитен модел (еднофакторен ANOVA анализ: $F_{3,28}=10,259, p<0,001$). В хипокампи, изолирани от $A\beta$ -veh групата отчетохме значително повишаване в количеството на $A\beta_{1-42}$, в сравнение с групата sham-veh ($p=0,0004$) (Фигура 15 Б). Статистическият анализ потвърди, че двата подхода на третиране (експерименти 1 и 2) са успешни за предотвратяване на натрупването на $A\beta_{1-42}$ в изследваните от нас мозъчни структури (ФК: $p=0,001$ $A\beta$ -Ago1 в сравнение с $A\beta$ -veh; $p=0,007$; $A\beta$ -Ago2 в сравнение с $A\beta$ -veh; хипокамп: $p=0,0033$ $A\beta$ -Ago1 в сравнение с $A\beta$ -veh; $p=0,0007$ $A\beta$ -Ago2 в сравнение с $A\beta$ -veh).

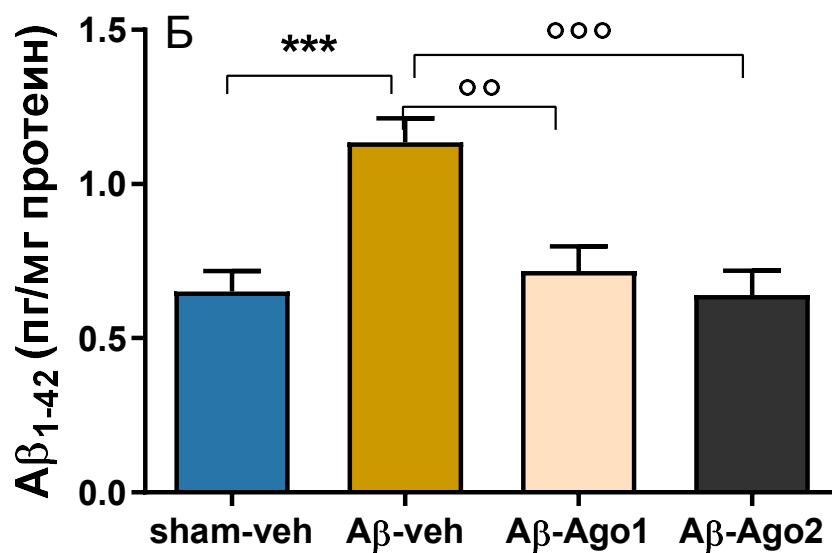


Фигура 14. Ефект на Ago върху нивата на $A\beta_{1-42}$, представени в pg/ml тъканен хомогенат, във ФК и хипокамп. *сравнение на STZ-veh с sham-veh; °сравнение на STZ-Ago със STZ-veh.

Фронтална кора $A\beta$



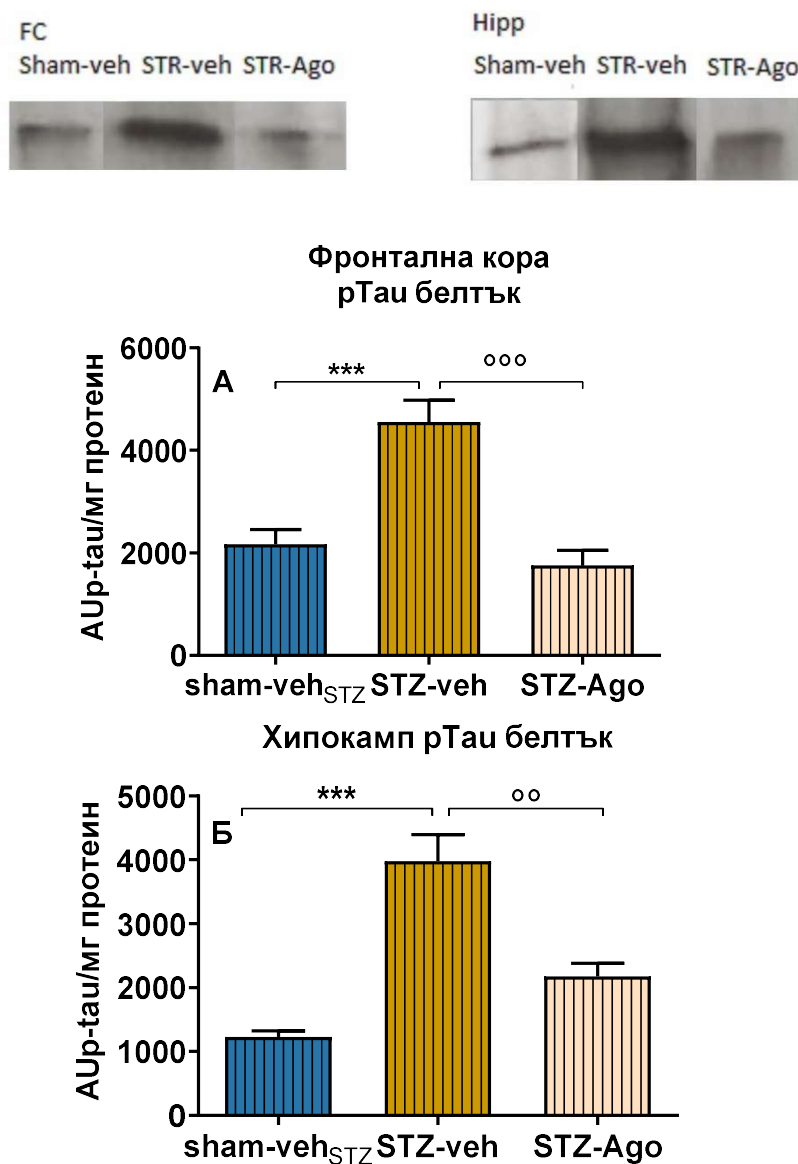
Хипокамп $A\beta$



Фигура 15. Ефект на Ago върху нивата на $A\beta_{1-42}$, представени в pg/mg тъканен хомогенат, във ФК и хипокамп. *сравнение на $A\beta$ -veh с sham-veh; ° сравнение на $A\beta$ -Ago1 и 2 с $A\beta$ -veh.

2.2. Ефекти на агомелатин върху нивата на тау-протеин във ФК и хипокамп.(Стрептозотоцинов модел)

Съдържанието на тау-протеин в мозъчната тъкан определихме по метода Western blot. Групата със сБА показва значително повишени стойности на маркера спрямо контролната, шам-оперирана група ($***p < 0.001$). Групата третирана с Ago редуцира нивата на тау достатъчно, във ФК и хипокамп спрямо STZ-veh групата ($p < 0.001$; $p < 0,01$)(Фигура 16). Ефектът на STZ беше еднакво забележим и в двете изследвани структури, а третирането с Ago намали отлаганията от хиперфосфорилиран тау-протеин малко по-осезаемо във ФК.

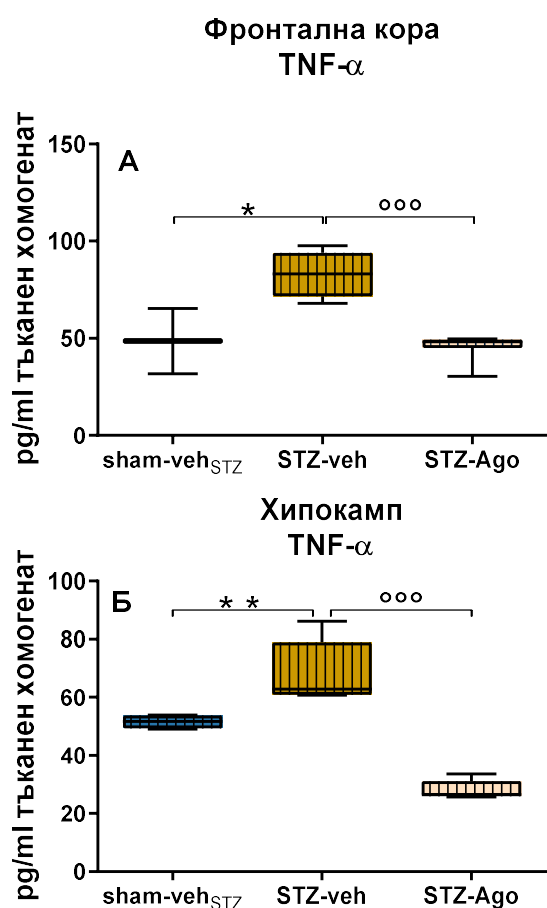


Фигура 16. Ефект на третирането с Ago върху съдържанието на тау-протеин във ФК и хипокамп. Нивата са значимо по високи в групата на STZ- veh в сравнение с sham-veh и STZ-Ago group ($p < 0.001$, $\eta^2_p = 0.68$ и $p < 0.001$, $\eta^2_p = 0.75$).

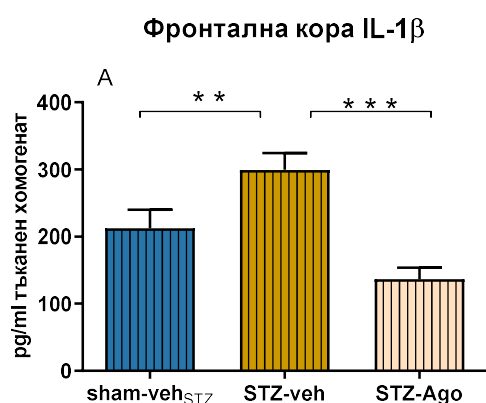
2.3. Ефекти на агомелатин върху сигнални маркери на възпалението: $TNF-\alpha$ и $IL-1\beta$, във ΦK и хипокамп. (STZ модел)

Спрямо стойностите на $TNF-\alpha$ тестът на Kruskal-Wallis демонстрира значителна разлика между групите, както в пробите от фронтална кора ($H= 7,5$, $p= 0,023$), така и в тези от хипокамп ($H= 13,6$, $p= 0,001$). Групата STZ-veh имаше повишено ниво на $TNF-\alpha$ и в двете посочени структури.

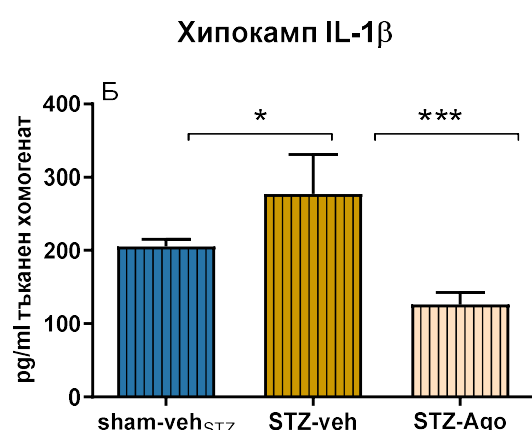
Измерените нива на проинфламаторния цитокин $IL-1\beta$, също бяха значително по-високи в групата STZ-veh в сравнение с контролната sham-veh_{STZ}, отново както във фронтална кора ($p= 0,02$), така също и в хипокамп ($p< 0,001$). Групата STZ-Ago се характеризираше със стойности на $TNF-\alpha$ и $IL-1\beta$, по-ниски от отчетените при групата sham-veh_{STZ}, в мозъчни хомогенати и от двете изследвани зони ($p< 0,001$) (Фигура 17, Фигура 18).



Фигура 17. Измерени стойности на $TNF-\alpha$ във ΦK и хипокамп. STZ-veh групата показва повишени нива на проинфламаторния маркер и в двете мозъчни структури, както спрямо контролите, така и спрямо третираните с Ago животни (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$); *сравнение на STZ-veh с sham-veh; ° сравнение на STZ-Ago със STZ-veh.



Фигура 18. Измерени стойности на IL-1 β във ФК и хипокамп. STZ-veh групата показва повишени нива на проинфламаторния маркер и в двете мозъчни структури, както спрямо контролите, така и спрямо третираните с Ago животни (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$); *сравнение на A β -veh с sham-veh; ° сравнение на A β -Ago с A β -veh.



2.4. Секретазни ензими (A β модел)

2.4.1. Алфа секретаза

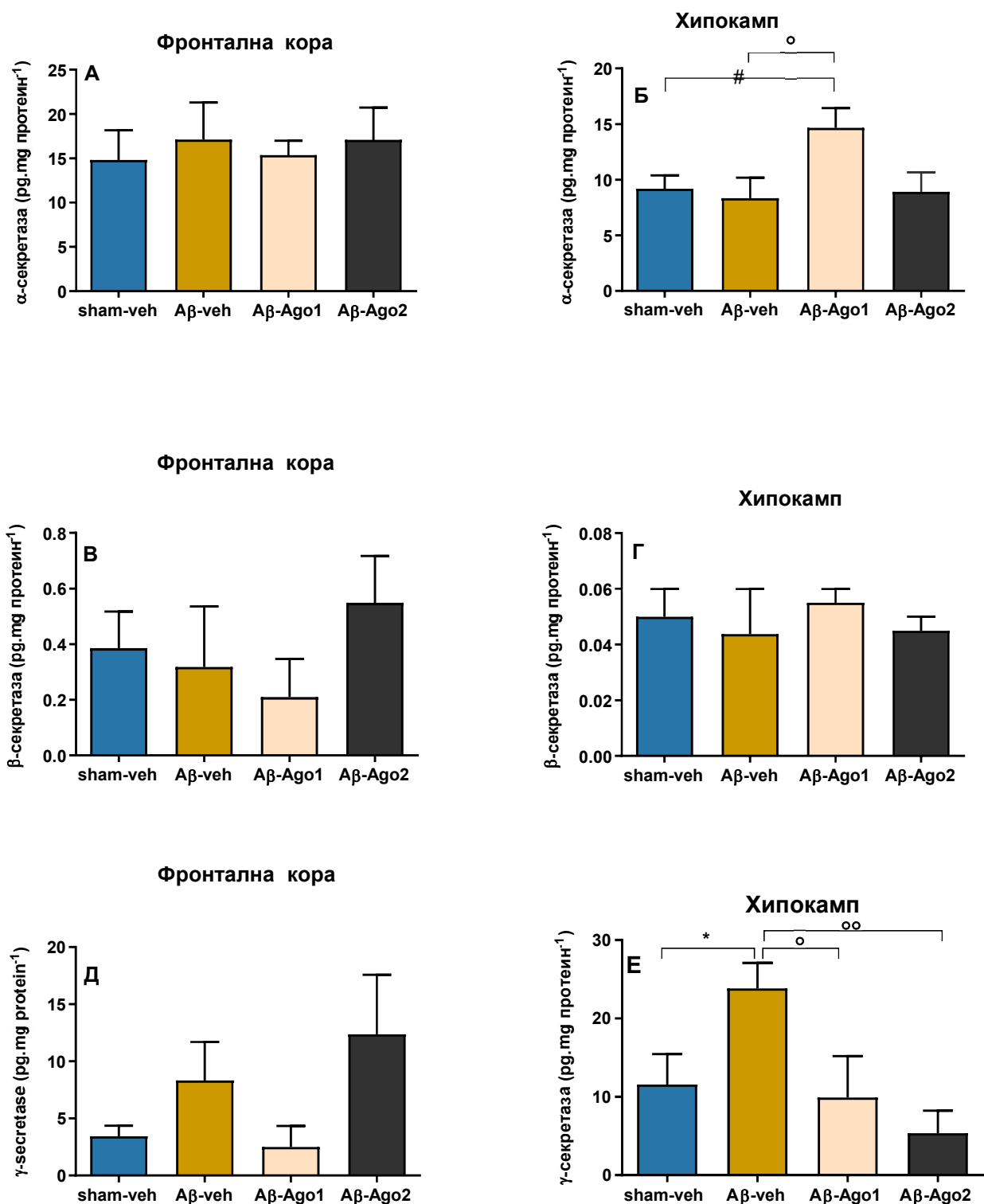
Концентрацията на α -секретазата не се повлиява от инжектирането на icvA β_{1-42} както във ФК (еднофакторен ANOVA: $F_{3,28} = 0,116$, $p = 0,95$), така и в хипокампа (тест на Kruskal-Wallis: $H = 6,07$, $p = 0,108$) (Фигура 19 А, Б). Въпреки това A β Ago1 предизвиква значително увеличаване на нивата на α -секретазата в хипокампа в сравнение с групата sham-veh ($p = 0,0213$) и A β -veh група ($p = 0,0324$) (Фигура 19 В и Г).

2.4.2. Бета секретаза

Инфузията на icvA β_{1-42} не повлиява концентрацията на β -секретазата както във ФК (тест на Kruskal-Wallis: $H = 3,477$, $p = 0,324$), така и в хипокампа (еднофакторен ANOVA: $F_{3,28} = 0,829$, $p < 0,505$).

2.4.3. Гама секретаза

Отчетената разлика между групите, по отношение на концентрацията на γ -секретазата във ФК не е значима (тест на Kruskal-Wallis: $H = 1,919$, $p = 0,589$). Концентрацията на същият ензим в хипокампа, обаче, е повлияна по-значително след интрацеребровентрикуларната инфузия на A β_{1-42} (еднофакторен ANOVA: $F_{3,28} = 4,469$, $p = 0,013$). Количеството на γ -секретазата е значително повишено в групата A β -veh в сравнение с групата sham-veh ($p = 0,032$), а в групите A β -Ago1 и A β -Ago2, то спада до това на контролите ($p = 0,041$ A β -Ago1 в сравнение с групата A β -veh) и ($p = 0,0024$ A β -Ago2 в сравнение с групата A β -veh).



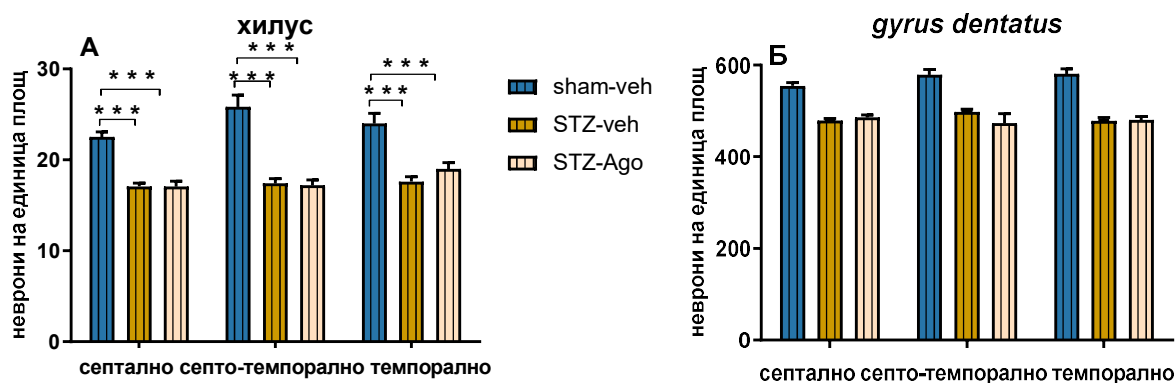
Фигура 19. Влияние на хроничното третиране с Ago върху концентрацията на α -секретаза (pg/mg тъкан) във ФК (А) и хипокампа (Б), върху концентрацията на β -секретаза (pg/mg тъкан) във ФК (В) и хипокампа (Г), върху концентрацията на γ -секретаза (pg/mg тъкан) във ФК (Д) и хипокампа (Е). * $p = 0,0213$ A β -Ago1 в сравнение с групата sham-veh, * $p = 0,0324$ A β -Ago1 в сравнение с групата A β -veh (Г); * $p = 0,032$ A β -veh група в сравнение с групата sham-veh, * $p = 0,041$ A β -Ago1 в сравнение с групата A β -veh, ** $P = 0,0024$ A β -Ago 2 в сравнение с групата A β -veh (Д, Е). *сравнение на A β -veh с sham-veh; ° сравнение на и 2 с A β -veh; # сравнение между A β -Ago1 и sham-veh.

3. Влияние на третирането с агомелатин върху невроналната загуба.

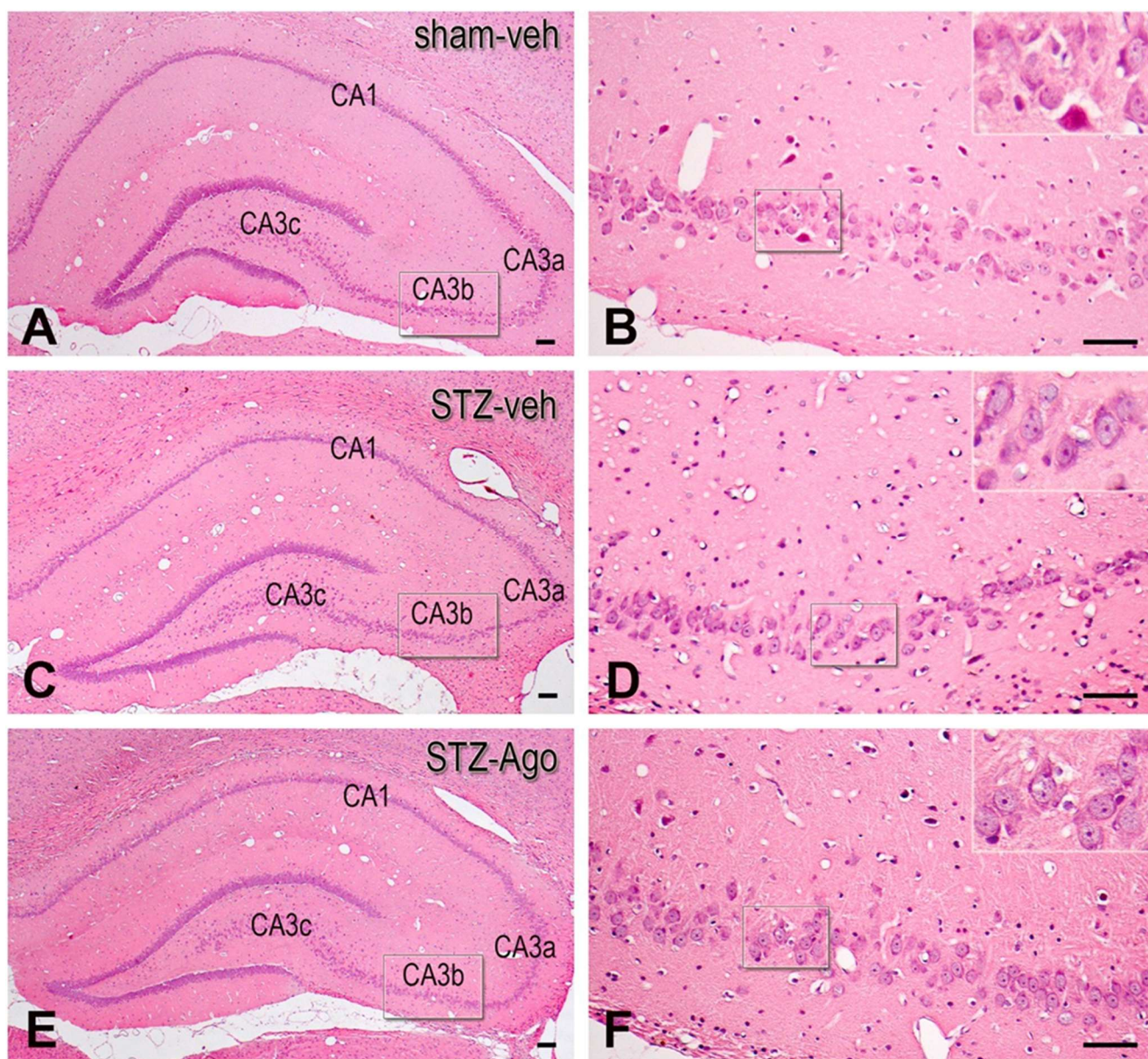
4.1. Морфологични ефекти на агомелатин върху различни мозъчни структури при STZ модел на БА

4.1.1. Промени, наблюдавани в невронни популации в дорзалния хипокамп

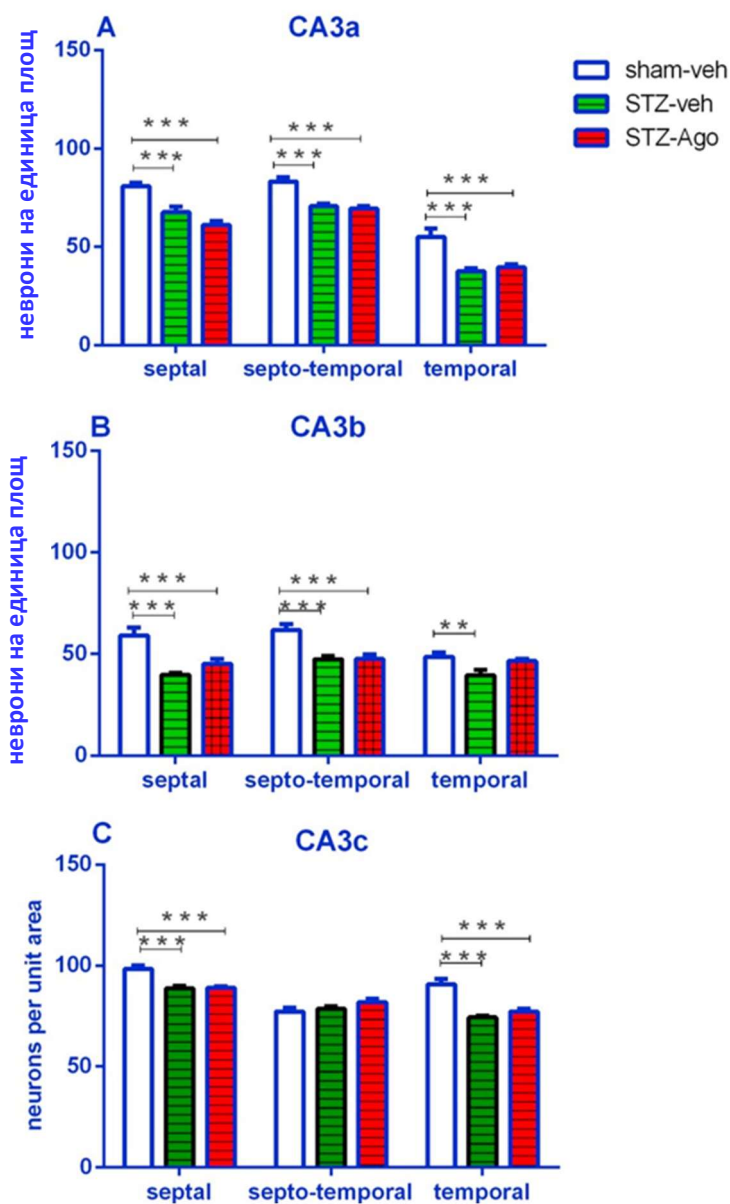
Степента на увреждане на клетките в дорзалния хипокамп се забелязва ясно на приложените фигури (Фигури 20-23). Средният брой клетки на единица площ не се различава между групите STZ-veh и STZ-Ago в полетата CA1 (септално, септотемпорално и темпорално), темпорално CA2, CA3a и CA3c (септално, септотемпорално и темпорално), CA3b (септално и септотемпорално), както и в хилуса на *gyrus dentatus* (септално, септотемпорално и темпорално) на дорзалния хипокамп (Фигура 21).



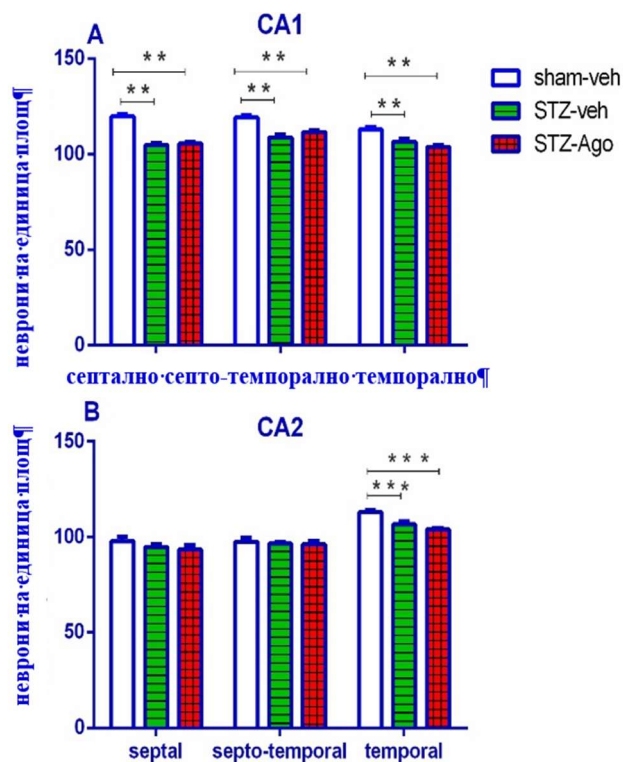
Фигура 20. Средният брой клетки на единица площ не показва статистически значими разлики между групите STZ-veh и STZ-Ago в хилуса на *gyrus dentatus* (септално, септотемпорално и темпорално) на дорзалния хипокамп, но в хилуса (септално и септотемпорално) се отчете ефекта на Аβ (септална, септо-темпорална и темпорална зона $**p < 0.01$ $***p < 0.001$).



Фигура 21. Морфологични ефекти на Ago върху хипокампалната невронна популация. (А) Преглед на хипокамп при плъхове, шам-оперирани и третиран с носител, показващ интензивно оцветени с Н&Е пирамидални неврони във всички хипокампални подполета. (В) По-голямо увеличение на полето CA3b. Вложките показват морфологията на невронната популация в съответната хипокампална област, показана в малките правоъгълници. (С) Микроскопска снимка на оцветен с Н&Е разрез от дорзалния хипокамп при STZ плъхове, третиран с носител. (D) Хипокампално поле CA3b при по-голямо увеличение (вложки). (Е) Хипокампална формация при STZ плъхове, третиран с Ago. Детайлите от заградените области в (F) разкриват частично възстановяване на пирамидалните неврони в подполето CA3b на хипокамп. Мащабни ленти=200 μ m в А, С, Е; 50 μ m в В, D, F във вложки с по-голямо увеличение.



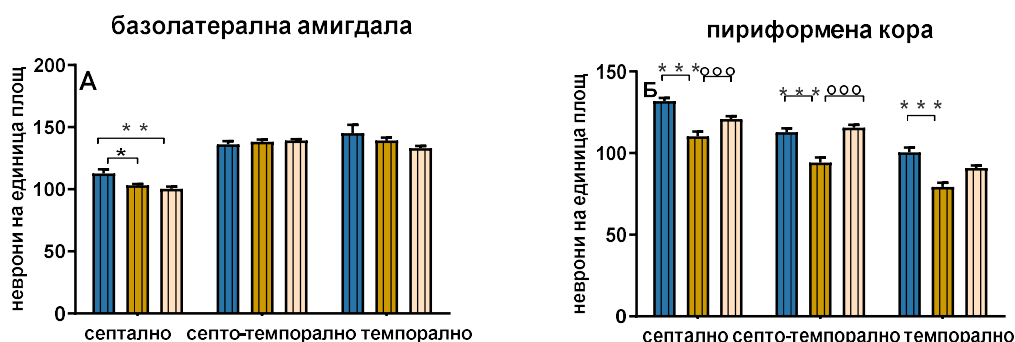
Фигура 22. Средният брой клетки на единица площ не се различава между групите STZ-veh и STZ-Ago в CA3a и CA3c (септално, септо-темпорално и темпорално), CA3b (септално и септо-темпорално).



Фигура 23. Средният брой клетки на единица площ не се различава между групите STZ-veh и STZ-Ago в полетата CA1 септално, септо-темпорално и темпорално (септална и септо-темпорална зона $**p < 0.01$), темпорално CA2 ($***p < 0.001$).

4.1.2. Промени, наблюдавани в невронни популации в базолатерално ядро на амигдала и пириформена кора

Степента на загуба на неврони на единица площ в септалната и септотемпоралната зона в базолатералното ядро на амигдалата (BL) и пириформена кора (Pir) е сходна в групите STZ-veh и STZ-Ago (фиг. 24 А, Б). Хроничното третиране с Аго оказва невропротективен ефект, най-изявено в темпоралното поле СА3b на хипокампа (Фигура 24Б) и септалната пириформена кора (Фигура 24 Б).

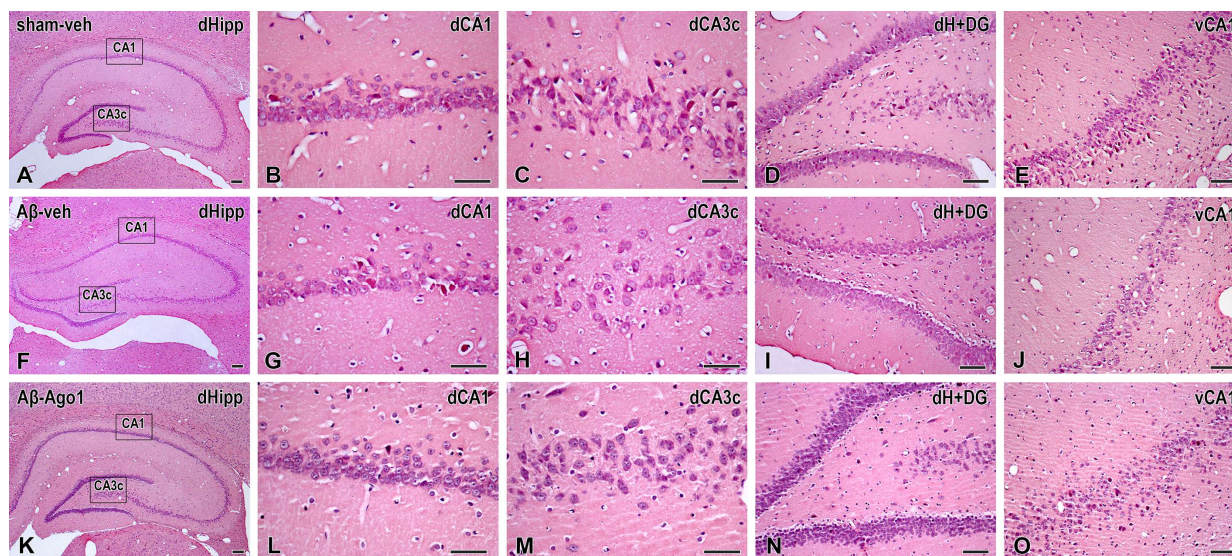


Фигура 24. Ефекти от третирането с Ago, в BL и Pir: броя на невроните на единица площ не е осезателно променен в септо-темпоралната и темпоралната част на BL, а в септалната Ago не успява да възстанови техния брой. И в трите изследвани зони от Pir се забелязва ясно токсичния ефект от Аβ, които в групите Аβ-Ago е съществено облекчен от действието на Аβ (септална и септотемпорална зона *** $p < 0.001$).

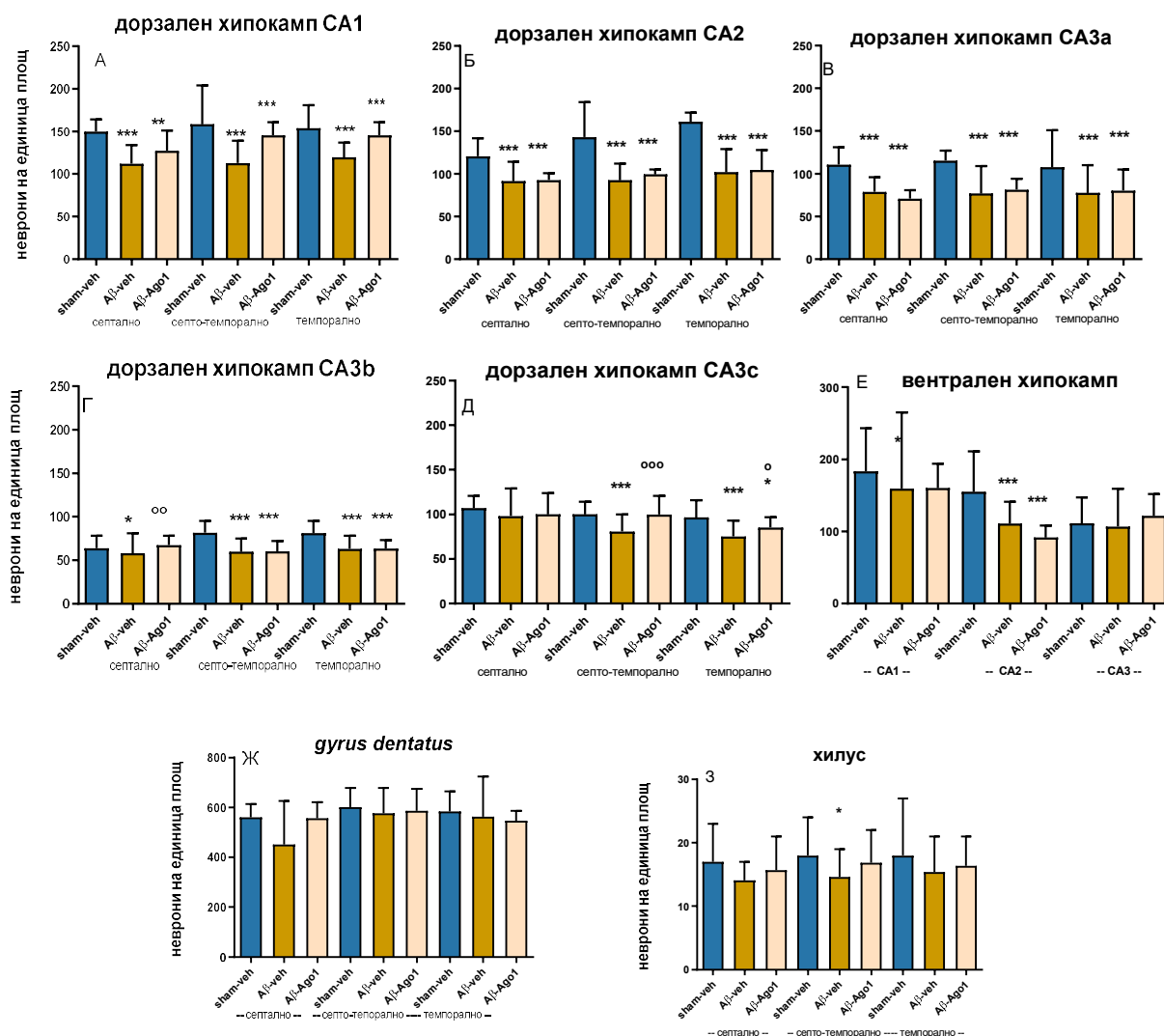
4.2. Морфологични ефекти на агомелатин върху различни мозъчни структури при амилоиден модел на БА

Клетъчната плътност в хипокампа е показана на фигура 25 (А-О). Значителна разлика между трите групи беше установена за клетъчната плътност в дорзалния и вентралния хипокамп (еднофакторен ANOVA: $p < 0,05$). Интрацеребровентрикуларната инфузия на $A\beta_{1-42}$ при плъхове, третирани с носител, предизвиква значителна загуба на клетки в голяма част от подполетата на дорзалния хипокамп (септални, септо-темпорални и темпорални). В CA1, CA2, CA3a и септо-темпорални и темпорални CA3b, както и в CA3c, както и подполетата CA1 (vCA1) и vCA2 на вентралния хипокамп броя на невроните на единица площ е също значително намален ($p = 0,047$ и $p < 0,001$, съответно в сравнение с групата на sham- veh). – Фигура 25 (А-Е)

Третирането с агомелатин, стартирано едновременно с icv инфузията на $A\beta_{1-42}$, оказва силен невропротективен ефект в септалното и темпорално CA1 подполе ($p < 0,001$, в сравнение с $A\beta$ -veh групата), докато този мелатонинов аналог има тенденция да облекчава предизвиканата от $A\beta_{1-42}$ клетъчна загуба в септалното CA1 и темпоралното CA3c подполе на хипокампа ($p = 0,006$ в сравнение с sham-veh групата и $p < 0,001$ в сравнение с групата $A\beta$ -veh, съответно) (Фигура 25, 30 А-Е). Въпреки това лекарството не е в състояние да облекчи предизвиканите от icv $A\beta_{1-42}$ невронални загуби в CA2, CA3a, септотемпоралното и темпоралното CA3b подполета на дорзалния хипокамп и vCA2 подполе ($p > 0,05$ в сравнение с sham-veh групата). Освен това, докато средният брой клетки на единица площ не се различава между трите групи в *girus dentatus*, септалния и темпоралния хилус (еднофакторен ANOVA: $p > 0,05$), значителна разлика е установена за септо-темпоралния хилус ($F_{2,43} = 4,292$, $p = 0,020$) (Фигура 26 Ж, З). Post hoc анализ показва намалена клетъчна плътност в хилуса на $A\beta$ -veh групата ($P = 0,016$ в сравнение с sham-veh групата) (Фигура 25 D, I). Третирането с Ago не повлиява индуцираното от $A\beta_{1-42}$ клетъчно увреждане в тази област.

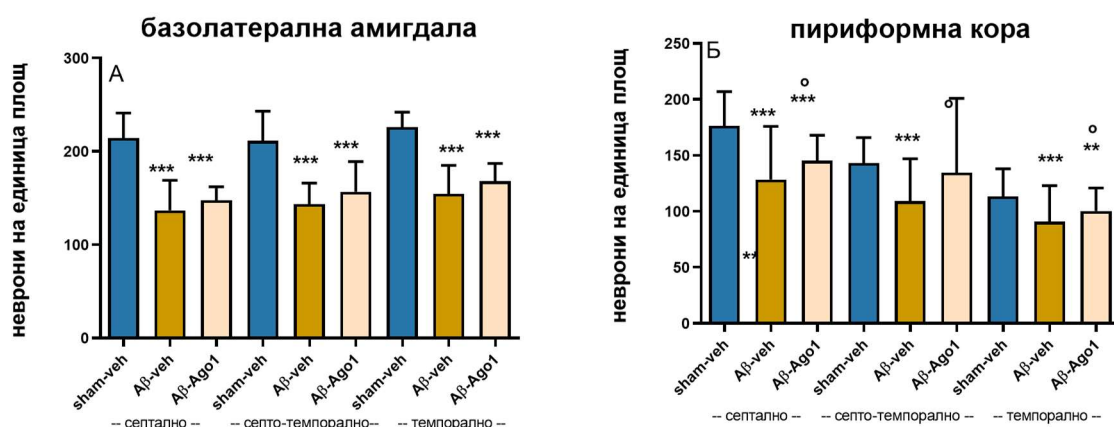


Фигура 25. Представителни коронални срези, оцветени с хематоксилин и еозин (H&E), на дорзалната (dHipp) и вентралната (vHipp) хипокампална формация при (A-E) плъхове: шам-оперирани, третирани с носител (sham-veh), (F-J) плъхове, третирани с Aβ1-42, третирани с носител (Aβ-veh) и (K-O) плъхове, с приложен Ago (Aβ-Ago1). Представителните микрофотографии във втората и третата колона са по-големи увеличения на заградените области на изображенията в първата колона от областите CA1 и CA3c на dHipp, съответно. Изображенията в четвъртата колона визуализират хилуса на DG с плътно опаковани гранулирани клетки. Микроскопските снимки в последната пета колона илюстрират пирамидалните неврони на вентралното подполе CA1 на вентралния хипокамп. При Aβ-veh плъховете (F-J) се наблюдава загуба на неврони в слоевете с пирамидални клетки dCA1 (G), dCA3 (H) и vCA1 (J) в сравнение с контролните sham-veh плъхове. (I) Гранулираните клетки в dHIPP също са увредени. (K). Малко увеличение на дорзалния хипокамп при Aβ-Ago1 плъхове. Детайлите от заградените в каре области в (K) разкриват частично възстановяване на пирамидалните неврони в подполетата dCA1 (L), dCA3c (M) и vCA1 (O) и хилуса на dHipp (N). Мащаб= 50 μm.

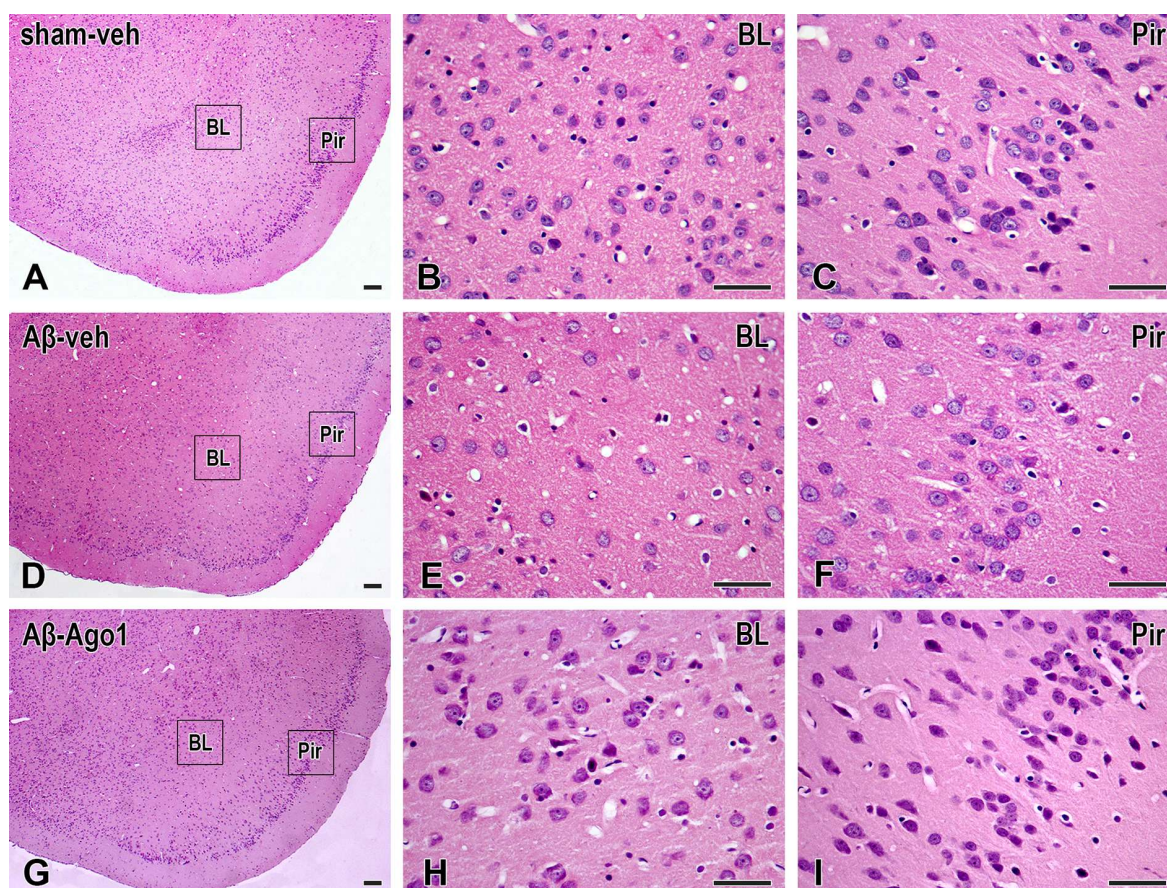


Фигура 26 Влияние на хроничното третиране с Ago върху септалното, септотемпоралното и вентралното подполе на CA1, CA2, CA3a, CA3b, CA3c на дорзалния хипокампус (А-Д) и подполетата на CA1, CA2 и CA3 на вентралния хипокампус (vCA1, vCA2 и vCA3) (Е), септалната, септо-темполалната и вентралната DG и хилуса на DG (Ж, З). Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M. *** $p < 0,001$ Aβ-veh в сравнение с групата sham-veh; * $p = 0,047$ Aβ-veh в сравнение с групата sham-veh; * $p = 0,03$; Aβ-Ago1 в сравнение с групата sham-veh; ** $p = 0,006$; Aβ-Ago1 в сравнение с групата sham-veh; *** $p < 0,001$ Aβ-Ago1 в сравнение с групата sham-veh; *** $p = 0,03$ Aβ-Ago1 в сравнение с групата Aβ-veh; *** $p < 0,001$ Aβ-Ago1 в сравнение с групата Aβ-veh; * $p = 0,016$ Aβ-veh в сравнение с групата sham-veh. (Тест на Kruskal-Wallis H).

Клетъчната плътност в BL и Pir е показана на Фигури 27 и 28. Тестът на Kruskal-Wallis показва значителна разлика в клетъчната плътност на единица площ между трите групи за септалните, септо-темпоралните и темпоралните участъци на BL и Pir ($H=34,059$ и $H=34,091$ съответно). Mann-Whitney U тестът показва, че icv инфузията на $A\beta_{1-42}$ е предизвикал значима клетъчна загуба в тези области на мозъка ($p < 0,001$). Увреждането не се е коригирало от третирането с Ago в BL, докато този аналог на мелатонина е предизвикал частична невропротекция в септалната ($p=0,037$ $A\beta$ -Ago1 в сравнение с $A\beta$ -veh и $p < 0,001$ $A\beta$ -Ago1 в сравнение с групата на sham-veh) и темпоралната Pir ($p=0,011$ $A\beta$ -Ago1 в сравнение с $A\beta$ -veh и $p < 0,01$ $A\beta$ -Ago1 в сравнение с групата на sham-veh) (фиг. 28 A-E).



Фигура 27. Ефект на хроничното третиране с Ago върху септално, септо-темпорално и вентрално BL и пириформената кора. Данните са представени като $\bar{x} \pm S.E.M.$ *** $p < 0,001$ $A\beta$ -veh и $A\beta$ -Ago1 в сравнение с групата на sham-veh; ** $p < 0,01$ $A\beta$ -Ago1 в сравнение с групата на sham-veh; ° $p = 0,011$ $A\beta$ -Ago1 в сравнение с групата на $A\beta$ -veh в Pir. (Тест на Kruskal-Wallis H).



Фигура 28. Морфологични ефекти на агомелатин върху пириформената кора (Pir) и базолатералната амигдала (BL) при плъхове. (A) Представителни срези, оцветени с H&E, на нивото на BL и Pir при контролни плъхове, третирани с носител (sham-veh). По-голямо увеличение на областите в карето на изображението в (A), показващи нормалната морфология и плътност на невронната популация в BL (B) и Pir (C) при плъхове, подложени на sham-veh. Малко (D) - и голямо (E, F) увеличение на BL и Pir при плъхове, третирани с A β ₁₋₄₂, третирани с носител (A β -veh). Видима загуба на неврони в BL (E) и Pir (F) в сравнение с контролната група sham-veh. (A) Изглед с малко увеличение на BL и Pir при групата A β -Ago1. (G) По-голямо увеличение на областите в карето на изображението в (G) показва защитния ефект на Ago върху оцеляването на невроните в Pir (I), докато в базолатералното ядро на амигдалата (H) ефектът не е толкова силен. Мащаб = 50 μ m.

Обсъждане

Настоящото проучване разкрива, че хроничното третиране с Ago повлиява положително патогенезата свързана с когнитивни нарушения и повишени тревожност и безпокойство, оказвайки невропротективен и противовъзпалителен ефект, при два плъши модела на сБА, индуцирани чрез icv инжектиране на STZ или $A\beta_{1-42}$.

Експерименталните модели, които могат точно да имитират патологията на развитие на сБА при хората, са важни за тестване на нови терапевтични подходи при лечението на сБА. Често използваните трансгенни миши модели на БА предоставят ценни сведения за молекулярните механизми, лежащи в основата на когнитивното увреждане, но поради манипулация на гените, свързани с β -амилоидния протеин, те наподобяват фамилната, но не и спорадичната форма на БА (Salkovic-Petrisic et al., 2013). Поради факта, че малък процент от всички случаи на БА са генетично унаследявани, трансгенните модели не са особено подходящи за изследване на сБА. В изследванията ни, подбрахме два от най-често използваните животински модели за индуциране на сБА, генерирани чрез icv инжектиране на STZ или $A\beta$, поради обстоятелството, че те са обстойно изследвани и валидирани от редица екипи, за да балансираме частично ограниченията, които всеки един от тях има, както и поради херетогенния характер на БА, с идеята да проверим дали Ago би повлиял сходна симптоматика, предизвикана от различни фактори.

Три месеца след въвеждане на STZ и в ранните етапи след въвеждане на $A\beta_{1-42}$ в мозъчните вентрикули, установихме значителни поведенчески промени, като тревожност, анхедония и когнитивни нарушения, повишени нива на $A\beta$, фосфорилиран тау протеин и провъзпалителни сигнални молекули ($TNF-\alpha$ и $IL-1\beta$) във фронталната кора и хипокампа, както и невронална загуба в дорзалния хипокамп, BL и Pir в контролната група третирана с разтворител.

Моделът icv STZ на плъхове е експериментално утвърден модел, който имитира поведенческите и биохимични промени на сБА, като предизвиква увреждане на инсулиновите сигнални пътища в мозъка и намален глюкозен метаболизъм в кората и хипокампа (Hoyer & Lannert, 2008; Talebi et al., 2025). Това води до холинергичен дефицит и когнитивна дисфункция (Salkovic-Petrisic et al., 2014). Knezovic et al., (2015) съобщават, че icv моделът на STZ при плъхове се характеризира с време- и доза-зависим дефицит на когнитивните функции и едновременно с това с образуване на плаки от $A\beta$ и вътреклетъчни отлагания от хиперфосфорилиран тау протеин. Резултатите от настоящия дисертационен труд потвърдиха предишни констатации (Firoozi et al., 2023; Hoyer & Lannert, 2008; Shingo et al., 2013), че три месеца след icv STZ инфузия на висока доза от 3 μg /структура е критичен времеви интервал за откриване и натрупване на $A\beta$ във фронталната кора и хипокампа.

Относно амилоидният модел, цитотоксичността на $A\beta_{1-42}$ при icv инжектиране е свързана със способността му да се самоагрегира във фибрилни олигомери и плаки (Vadukul et al., 2017). Патологичният ефект, който отчетохме, съвпада със съобщения на други екипи (Sharma et al., 2016), прилагали го в протофибриларна форма. Има данни, че

въвеждането на Аβ1-42 в мозъка повлиява негативно способността за обучение и води до дегенерацията на холинергичните неврони, което прави плъхове, третирани с Аβ подходящ животински модел за сБА (Nitta et al., 1994). Етиологията остава неясна, но STZ инжектиран *icv* предизвиква подобна на сБА патология, като променя глюкозияния метаболизъм, води до нарушена инсулинова сигнализация, синаптична дисфункция, хиперфосфорилиране на тау протеина, отлагане на Аβ и невронна апоптоза. Подобен е и патологичният ефект при *icv* инжектиране на Аβ (Puzzo et al., 2014). Така STZ и Аβ индуцираните експериментални модели са подходящи за изследване на основните молекулярни и патофизиологични механизми на сБА и тестване на нови терапевтични подходи (Shingo et al., 2013). И при двата модела извършвахме поведнските тестове най-рано 16 часа след приема на агомелатин, за да избегнем неговия остър ефект и да основем отчитанията си на породената от него невронална пластичност.

Тревожността и депресията са съпътстващи психологически симптоми на БА, които засягат около 90 % от пациентите (Bingley et al., 2025). Повечето експериментални проучвания са фокусирани върху поведенчески промени, свързани с когнитивните функции, и само в някои доклади се разглеждат промени, свързани с тревожността и депресията. Съобщава се, че трансгенни мишки (3xTg-AD), нетрансгенен модел (OXYS) на сБА (Rudnitskaya et al., 2015) както и *icv* STZ/Аβ мишки и плъхове Wistar имат повишени тревожно-подобни симптоми, отчетени чрез тестовете EPM и/или OF (Y. Chen et al., 2013; Gutierrez et al., 2014; Pinton et al., 2011; Sterniczuk et al., 2010). В настоящото проучване показахме, че третирането с Ago отслабва повишеното тревожно поведение при плъхове от двата модела на сБА. Неотдавна Rudnitskaya et al. (2015) съобщиха, че прилагането на мелатонин облекчава промените в нивото на тревожност на OXYS плъхове, тествани чрез EPM, като увеличава броя на влизанията и времето, прекарано в отворени пространства. Реакциите на страх са свързани с хиперактивност на амигдалата. Тя е част от лимбичната система и участва в разпознаването на заплахи, емоционалната памет и регулирането на стресовите реакции. (Forster et al., 2012). Ago не е в състояние да възстанови загубата на клетки, предизвикана от STZ и Аβ1-42, което предполага липса на връзка между анксиолитичния ефект на този мелатонинов аналог и невроналните увреждания в амигдалата.

Анксиолитичният и антидепресивният ефект на този атипичен антидепресант е установен както при животински модели на невродегенеративни разстройства, така и при хора (Kennedy, 2007; Martinotti et al., 2016; Ownby et al., 2006; Tchekalarova et al., 2016, 2017). Една от хипотезите за основния механизъм на коморбидната на БА депресия предполага ролята на променения Аβ метаболизъм (Mahgoub & Alexopoulos, 2016; Namekawa et al., 2013). В тази връзка Ishijima и съавтори (Ishijima et al., 2018) съобщават за положителна връзка между повишения плазмен кортизол и нарушения баланс в метаболизма на Аβ при пациенти с тежка форма на депресия. В наше проучване от 2016 г. съобщаваме, че същият протокол на лечение с Ago оказва антидепресивен ефект и възстановява нарушения механизъм на обратна връзка на кортикостероновата секреция при дексаметазонав супресионен тест на пинеалектомизирани плъхове (Tchekalarova et al., 2016). Хиперактивираната НРА ос се счита за важен маркер на тежка депресия. Ограничение на настоящото проучване е, че не бе анализиран ефекта на третиране с Ago

върху промените нивата на кортикостерон в норма и вследствие на стрес, което отразява степента на активиране на НРА оста, за да проверим хипотезата за положителна връзка между променения метаболизъм на А β и нарушената хормонална секреция. Този въпрос заслужава бъдещо проучване.

Мозъкът се характеризира с изключително интензивен метаболизъм. Въпреки че представлява само около 2% от телесното тегло, той консумира приблизително 20% от общата енергия на тялото в покой. Поради това е силно зависим от концентрациите на кислород и глюкоза, но антиоксидантния му капацитет е сравнително нисък, което го прави уязвим към различни вътрешни и външни фактори, които могат да променят баланса на метаболитите в него (Lei et al., 2024). Честотата и предразположението към характерната за БА патогенеза се наблюдава при стареене на организма и предразположеност към възпалителни процеси в мозъка, патологично активирана микроглия и астроцити, както и нарушения в целостта на BBB вследствие увреждания на мозъчния ендотел (W. Cai et al., 2017). Установихме, че хроничното третиране с Ago намалява натрупването на А β , както и нивата на провъзпалителните сигнални молекули, TNF α и IL-1 β във фронталната кора и хипокампа на плъховете при стрептозотоциновия модел. Доколкото ни е известно, това е първото проучване, което съобщава за ефекта на този аналог на мелатонина, използван клинично като антидепресант, върху невропатологичните последици, наподобяващи симптомите на БА (Yang et al., 2021).

В научната литература многократно са били доказвани противовъзпалителните свойства на мелатонина, чийто структурен аналог е агомелатина (Cardinali et al., 2002; Roy et al., 2022). Доказано е, че STZ предизвиква невронална смърт и повишава нивата на провъзпалителните цитокини (IL-6 и TNF- α) (Gerzson et al., 2020). Невровъзпалението се счита за решаващ етап в развитието на невродегенеративния процес на БА (Buckwalter and Wyss-Coray, 2004). При стрептозотоциновият модел то се открива седмица след инжектирането на ниска доза STZ (Nazem et al., 2015; Solmaz et al., 2015) съобщават, че TNF- α се увеличава в мозъка на плъхове две седмици след icv STZ (Sabbagh et al., 2013). Ние доказахме, че TNF- α и IL- β са увеличени три месеца след icv STZ и, че хроничното третиране с Ago потиска тези възпалителни сигнални молекули. Неотдавна установихме, че третирането с Ago предизвиква силен противовъзпалителен отговор както в периферията (плазмен IL-1 β), така и в мозъка (отслабване на глиозата) при експериментален модел на епилептогенеза (Tchekalarova et al., 2018). Накратко, при проучване ефекта на Ago върху патологията на стрептозотоциновия модел, установихме подобяване на пространствената памет, редуциране нивата на TNF- α и IL-1 β , намалена невронална загуба и потискане на акумулирането на А β в хипокампа.

При амилоидния модел анксиолитичният ефект на Ago е демонстриран с коригиране на предизвиканото намаляване на времето, прекарано в аверсивните зони, както в теста OF, така и в теста EPM, както и с намаляване на броя на преходите в теста LDT. Антидепресивното действие на Ago беше потвърдено при SPT и FST с намаляване на модел-обусловената анхедония и поведенческа реакция на “отчаяние”. Депресивно-подобното поведение в А β -veh групата беше свързано и с намалена локомоторна активност, която беше показана в OF (общо разстояние) и EPM (брой влизания в

затворени и отворени рамена) и тази необичайна поведенческа реакция също беше смекчена от Ago. Въпреки че увеличеното време на неподвижност на A β -veh групата във FST може да бъде свързано с намалената им двигателна активност, установена при други два от поведенческите тестове - OF и EPM - липсата на предпочитание към сладки разтвори ни дава основание да съдим, че това е автентична депресивна реакция. Тези резултати са в съответствие с получените при icvSTZ модел на сБА и поредно доказателство, че приложеният протокол на третиране с Ago в ранния етап на прогресиране на патологията, може да облекчи тревожността (престой и брой влизания в отворените рамена) в EPM и депресивно-подобното поведение (намалена двигателна активност и анхедония в теста за предпочитане на сладки разтвори). Резултатите показаха, че Ago оказва благоприятен ефект върху съпътстващите поведенчески увреждания и предизвиква невропротекция, специфична за съответната област. И двата подхода на третиране (прилагане на Ago в ранния или в късния стадий на БА) успешно отслабват индуцираното от icvA β 1-42 натрупване на този токсичен пептид във ФК и хипокамп главно чрез намаляване на концентрацията на γ -секретазата. Натрупването на извънклетъчен A β пептид е предпоставка за клетъчни увреждания в избрани структури, свързани с различни поведенчески функции, включително афективни реакции и когнитивни способности. Установихме клетъчна загуба в определени мозъчни структури при A β -veh групата, свързани с тревожността и депресията, като вентралния хипокамп и BL. Изненадващо, третирането с Ago не успя да предотврати тези морфологични промени, което предполага, че проявения анксиолитичен и антидепресивен ефект се осъществява посредством други механизми. Нашите резултати потвърждават наблюденията на предишни проучвания, които показват клетъчна загуба в хипокамп, хилус, BL и Pir като следствие от icv третиране с A β 1-42 (He et al., 2013). Подобно на получените резултати със STZ и при амилоидния модел Ago показва слаба и структуро-специфична невропротекция. Докато при стрептозотоциновия модел третирането с Ago повлия положително уврежданията в пространствената памет (Ilieva et al., 2019), при амилоидния модел този ефект не беше така ясно отчетен при RAM теста. Въпреки че в повечето изследвани мозъчни структури установихме сходен брой неврони на единица площ в STZ-veh/A β -veh групите, можем да предположим, че положителния ефект на Ago върху пространствената памет и познавателните способности се дължи на повлияни от него явления на синаптично ремоделиране (De Berardis, Fornaro, Serroni, Campanella, Rapini, Olivieri, Srinivasan, Iasevoli, Tomasetti, De Bartolomeis, Valchera, Perna, Mazza, Nicola, et al., 2015). Въпреки това Ago демонстрира невропротекция в подполето CA1 на дорзалния хипокамп, както и в Pir, двата региона, които са в непосредствена близост и са свързани с когнитивната функция (Squire, 2009). И при амилоидния модел, въпреки отчетения невропротективен ефект, благоприятния ефект на лекарството не беше остатъчен за да подобри зависимата от хипокампа пространствената памет.

При амилоидния модел изследвахме влиянието на два отделни подхода за лечение, свързани с третирането с Ago: по време на ранния и на късния стадий на прогресия на БА. Установихме, че въпреки че и двата метода на третиране - A β Ago1 и A β Ago2 - успяват да предотвратят извънклетъчното натрупване на A β във фронтална кора и хипокамп, съществува разлика по отношение на ефекта върху концентрацията на

α -секретазата. Нейното съдържание беше установено повишено при третиране с $A\beta$ -Ago1, но не и с $A\beta$ -Ago2 в хипокампа, докато и двете условия на третиране са в състояние значително да намалят нивата на $A\beta$ и значително да намалят съдържанието на γ -секретазата в тази мозъчна област. Прилагането на Ago в ранния и късния стадий на БА не оказва влияние върху концентрацията на β -секретазата, но същевременно успя да смекчи индуцираното от $icvA\beta$ 1-42 повишение в нивата на γ -секретазата в хипокампа. Тези резултати предполагат, че и двата механизма могат да допринесат за благоприятните ефекти на Ago при БА, но прилагането му в по-ранни етапи е възможно по-благоприятно. Известно е, че хипокампът е уязвим и увреден при пациенти с БА, тъй като той отговаря за краткотрайната памет, която значително се уврежда. Дългосрочната памет, базирана основно във фронталната кора, не е сериозно засегната по време на ранните етапи на прогресията и много по-слабо през късните (King, 2007). Докато γ -секретазата регулира образуването на $A\beta$ 1-40 и $A\beta$ 1-42 в резултат на разцепването на APP, α -секретазата не участва в амилоидогенния път и продуктите от APP, след нейното разцепване: APP α s или sAPP благоприятстват невропластичността и невропротекцията (Siegel et al., 2017). Тази констатация е любопитна и изисква допълнителни изследвания за изясняване на точния механизъм, чрез който Ago повлиява върху метаболизма на $A\beta$.

Въпреки отчетените положителни ефекти на Ago в поведенческите и биохимичните тестове при двата модела, той не оказва силна невропротекция в уязвимите за поведенчески промени мозъчни области. Вече беше споменато предположението, че той подобряването на когнитивните способности се постига вероятно чрез коригиране на синаптичната комуникация, без да е предизвикана неврогенеза. В предходни изследвания съобщихме, че Ago предотвратява загуба на неврони в дорзалния хипокамп (CA1, CA2, CA3 поле) и хилуса на gyrus dentatus, където обаче не повлиява спада в пространствената памет при каинатен модел на епилепсия при плъхове (Tchekalarova et al., 2017). Тези резултати предполагат липса на положителна връзка между пространствената памет и невропротекцията в хипокампа, която може да е в основата на ефективността на Ago при двата модела на БА. Благоприятният ефект на Ago върху нарушенията на паметта, отразени при стрептозотоциновия модел логично е свързан с благоприятния му ефект върху когнитивните функции. Подобно на мелатонина, Ago се характеризира с предполагаема хронобионтна активност (Tchekalarova et al., 2015). Ограничението на настоящото проучване е, че не беше изследван ефекта на Ago и върху контролна група, третирана само с Ago, за да потвърдим, че той няма хетерогенен ефект и да можем да направим съпоставки между sham-veh и sham-Ago групи. Липсата на неблагоприятни ефекти или усложнения, произтичащи от третирането с Ago са доказани в предишни проучвания, извършени от екипа ни (Tchekalarova et al., 2016). Още през 2011 г. в проучване на (Morley-Fletcher et al., 2011) е доказано, че Ago въздейства върху механизми, които са в основата на тревожните/депресивните разстройства, които сме анализирали и в настоящия дисертационен труд. Хроничното лечение с Ago и при двата модела проведохме следобед, когато се предполага, че хронобиотичната активност на този медикамент, свързана с дейността на MT рецепторите, ще бъде най-висока. Предполага се, че мелатониновите MT1 и MT2 рецептори имат различна роля в БА, зависеща спрямо

засегнатия мозъчен регион. Така, докато броят им е намален в кората на главния мозък и епифизната жлеза (Y. Li et al., 2020), MT1 рецепторите са увеличени, а MT2 рецепторите не са експресирани в хипокампа (Klosen, 2024). Наблюдаваната рецепторна пластичност при БА може да е свързана с промени в нивата на мелатонин, тъй като е доказано, че хормонът регулира плътността на MT рецепторите (Feng et al., 2023). Отчетената невропатологична тежест корелира с увреждане на хипокамп-зависимата пространствена памет, измерена при RAM теста, което е в съответствие и с предишни експериментални (Knezovic et al., 2015; Rudnitskaya et al., 2015) и клинични данни за когнитивна регресия от лека когнитивна увреда до прогресивна загуба на паметта при БА (Sabbagh et al., 2013).

В заключение, можем да обобщим, че хроничното третиране с Ago оказва благоприятно въздействие върху коморбидните поведенчески нарушения при проучените от нас модели на сБА и коригира положително нивата на свързаните с нея неврологични маркери. Лечението с Ago, започнало както по време на ранен, така и на по-късен етап от прогресията на БА, оказва благоприятен ефект върху емоционалните смущения и влошаването на паметта, като повлиява положително метаболизма на A β , чрез потискане на концентрацията на γ -секретаза, намалява отлаганията от тау протеин, редуцира нивата на провъзпалителни сигнални молекули във фронтална кора и в хипокамп и не на последно място успява да коригира последствията от невронална загуба в част от анализирания мозъчни структури. Необходими са бъдещи експериментални и клинични проучвания, за да се установи дали благоприятния потенциал на този антидепресант при сБА, индуцирана в опитни животни е транслируем при хора и би намерил приложение в клиничната практика.

Изводи

1. Стрептозотоциновият модел се характеризира с повишена експресия на маркерите А β и тау-протеин във фронтална кора и хипокамп три месеца след инфузията на токсина.
2. Агомелатинът облекчава повишената експресия на А β и намалява нивата на невровъзпалителните маркери и тау протеин във фронтална кора и хипокамп при стрептозотоциновия модел.
3. Хроничното ретиране с Аго подобрява пространствената памет при стрептозотоциновия модел и намалява чувството на тревожност.
4. Плъшият модел на БА, индуциран чрез А β ₁₋₄₂ се верифицира два месеца след инфузията на амилоидния протеин в двете изследвани мозъчни структури.
5. Третирането с Аго по време на ранния етап от прогресията на БА, индуциран чрез icvA β ₁₋₄₂, облекчава нарушенията в емоционалния статус и намалява анхедонията.
6. Третирането с Аго в ранен етап на прогресията при А β модел на БА оказва протективен ефект селективно в СА1 полето на дорзалния хипокамп.
7. Двата подхода на третиране с Аго, по време на ранния, така и на късния етап от прогресията на БА, повлияват положително метаболизма на А β чрез редукция повишените нива на γ -секретазата в хипокампа и увеличаване тези на α - секретазата във фронтална кора и хипокамп.

Справка за приносите на дисертационния труд

1. Приноси с оригинален характер:

1. При два плъши модела, с различни схеми на прилагане, беше установено, че третирането с Аго облекчава когнитивните нарушения и повишената тревожност характерни за БА. Този ефект корелира с понижаване нивата на А β в хипокампа и отчетената невропротекция е най-силно изразена в СА1 полето на тази структура.
2. Благоприятните ефекти на Аго при стрептозотоциновия модел на БА опосредстват редуцирането на проинфламаторните маркери във фронтална кора и хипокамп.
3. За пръв път са установени промени в количествата на секретазни ензими в хипокампа под влияние на агомелатин при амилоидния модел на БА.

2. Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдена е характерната за icvSTZ и А β ₁₋₄₂ инфузия невронална загуба в определени мозъчни структури (хипокамп, базолатерална амигдала и пириформена кора).
2. Двата плъши модела, icvSTZ и А β ₁₋₄₂, се характеризират с повишена експресия на А β .
3. Стрептозотоциновият модел показва повишени нива на провъзпалителни цитокини (IL-1 β и TNF- α) и тау протеин във фронтална кора и хипокамп.

Приложения

1. Списък с научни публикации

1. Ilieva K, Tchekalarova J, Atanasova D, Kortenska L, Atanasova M. Antidepressant agomelatine attenuates behavioral deficits and concomitant pathology observed in streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in male rats. *Horm Behav.* 2019;107. ISSN0018506X, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.11.007>
2. Ilieva K, Atanasova M, Atanasova D, Kortenska L, Tchekalarova J. Chronic agomelatine treatment alleviates icvA β -induced anxiety and depressive-like behavior through affecting A β metabolism in the hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav.* 2021;239. DOI/10.1016/j.physbeh.2021.113525
3. Ilieva K, Tchekalarova J, Atanasova M, Petrova, L. Beneficial influence of agomelatine treatment on behavioral impairments in A β -induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Biomedical and Clinical Research* 2020; 13(2), 116-121. (ISSN 1313-6917) <http://jbcr.mu-pleven.bg/pdf/vol13no2/4.pdf>

2. Списък на участия в научни форуми и конференции

1. Ilieva K, Tchekalarova J, Kortenska L, Mitreva R, Atanasova M, Chronic agomelatine treatment attenuate beta-amyloid accumulation, memory impairment and anhedonia in a ratmodel of sporadic Alzheimer's disease. AAT-AD/PD Focus meeting, Turin, Italy, 15-18 March 2018
2. Илиева К, Чекаларова Я, Атанасова Д, Кортенска Л, Атанасова М, Повлияване на Алцхаймер-свързана патология в плъши, стрептозоточин индуцирани модели, третирани с агомелатин. Постер, XIII Научна конференция по Медицинска биология, Варна, 13-15.09.2019г.
3. Илиева К, Атанасова М, Чекаларова Я. Агомелатинът провокира поведенчески промени в два плъши модела на Алцхаймер. Постер, Научна конференция, посветена на 100 години от рождението на професор Леон Митрани. 16 декември, 2021 г. Институт по Невробиология, БАН
4. Ilieva K, Atanasova M, Chekalarova J. Agomelatine affects the A β metabolism by adjusting the content of secretase enzymes in icv-A β induced rat model of Alzheimer's disease. XIV Научна конференция по Медицинска биология, Варна, 02-04.06.2023г.

3. Реализирани проекти по темата на дисертационния труд

1. №7/2017 „Ефекти на селективния мелатонинергичен препарат агомелатин върху развитието на депресивен тип поведение при модел на Болестта на Алцхаймер (AD) у мъжки Wistar плъхове.“ МУ-Плевен
2. №14/2018 „Ефекти на селективния мелатонинергичен препарат агомелатин върху депресивеното поведение при два животински модела на Болестта на Алцхаймер“. МУ-Плевен