



საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის  
სახელობის ქართული უნივერსიტეტი

## *ხელნაწერის უფლებით*

**ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო  
მეცნიერებათა სკოლა (ფაკულტეტი)**

**საგანმანათლებლო პროგრამა– მეხსიერების ნერვული  
მექანიზმები**

## **მარიამ ჭილაძე**

**ოკადაიკის მეშვეობით გამოწვეულ ალცჰეიმერის  
დაავადების ცხოველურ მოდელში მეხსიერების  
სხვადასხვა ფორმისა და ჰიპოკამპში  
ნეიროტრანსმიტერთა აქტიურობის კვლევა  
ვირთაგვებში**

ბიოლოგია/სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა დოქტორის  
აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი ნაშრომის

## **სადისერტაციო მაცნე**

05 მეცნიერება/საბუნებისმეტყველო მეცნიერებანი

0504 ბიოლოგია/სიცოცხლის შემსწავლელი მეცნიერებანი

თბილისი

2016

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია ივანე ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრში და საქართველოს საპარტიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სკოლის (ფაკულტეტი) მეხსიერების წერგული მექანიზმების მიმართულეზაზე.

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: **მანანა დაშნიანი**

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი

ოფიციალური ოპონენტები: **1. შზია ჟვანია**

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი

**2. თამარ დომიანიძე**

ბიოლოგიის დოქტორი

დისერტაციის დაცვა შედგება 2016 წლის 29 ივნისს 15 საათზე, საქართველოს საპარტიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სკოლის (ფაკულტეტის) სადისერტაციო კომისიის სხდომაზე.

მისამართი: 0162, თბილისი, ილია ჭავჭავაძის №53<sup>ბ</sup>, II კორპუსი, აკად. ივეკუას სახელობის აუდიტორია.

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება საქართველოს საპარტიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის სამეცნიერო ბიბლიოთეკაში

სადისერტაციო მაცნე დაიგზავნა 2016 წლის „\_\_\_\_\_“ \_\_\_\_\_

**სადისერტაციო საბჭოს მდივანი,**

**ფიზიკა-მათემატიკის დოქტორი**

**პროფესორი გიორგი მაქაცარია**

## ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

**თემის აქტუალობა.** ალცჰეიმერის დაავადება (AD) წარმოადგენს ნეიროდეგენერაციულ დარღვევას, რომელიც ხასიათდება კოგნიტიური და ქცევითი ფუნქციების გაუარესებით. მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის პროგნოზით, უახლოეს მომავალში AD-მ შესაძლოა გადააჭარბოს ისეთ გავრცელებულ დაავადებებს, როგორცაა შეძენილი იმუნოდეფიციტის სინდრომი ან კარდიოვასკულური დარღვევები, რაც მძიმე შედეგების მომტანი იქნება მილიონობით დაავადებულთათვის, მათი ოჯახებისა და ჯანმრთელობის დაცვის ორგანიზაციებისათვის. მეხსიერების და დასწავლის პროცესების ცვლილებებთან კავშირში ჰიპოკამპში ქოლინერგული ნეიროტრანსმიტერული სისტემების მარკერების კვლევა, აგრეთვე, ჰიპოკამპის მორფოლოგიის შესწავლა ვირთავებში OA-ს შეყვანის პირობებში, ნათელ სურათს შექმნის OA-ს ნეიროტოქსიკურობის და ანტიდემენციური წამლების პრეკლინიკური კვლევისათვის აღნიშნული მოდელის ვალიდურობის შესახებ, რაც ხელს შეუწყობს დაავადებათა სამკურნალო ეფექტური თერაპიული საშუალებების ახალი სტრატეგიების განსაზღვრას; მიღებული შედეგები სრულყოფილ სურათს შექმნის მეხსიერებასთან დაკავშირებული სხვადასხვა რეგულატორული მექანიზმების შესახებ და მნიშვნელოვან წვლილს შეიტანს მეხსიერების ნეირობიოლოგიის ფუნდამენტური მექანიზმების უკეთ შეცნობაში.

**კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები.** წარმოდგენილი ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა ჰიპოკამპსა და თავის ტვინის პარაკუქებში OA-ის მიკროინექციის ეფექტების კვლევა მეხსიერების სხვადასხვა ფორმასა და დასწავლის პროცესებზე ჰიპოკამპში ნეიროტრანსმიტერულ აქტიურობასა და სტრუქტურულ ცვლილებებთან კორელაციაში, ასევე ანტიდემენციური წამლით – მემანტინით ამ ცვლილებათა პრევენციის შესაძლებლობის შეფასება. მეხსიერების სხვადასხვა ფორმა (დეკლარატიული, არადეკლარატიული) და დასწავლის პროცესები (ასოციაციური, არასოციაციური), აგრეთვე, ჰიპოკამპის სტრუქტურული ცვლილებები (უჯრედების დაღუპვის ხარისხი) და ჰიპოკამპში ქოლინერგული (AChE) აქტიურობა

შეისწავლებოდა ქცევით, ჰისტოლოგიურ და იმუნოჰისტოლოგიურ ექსპერიმენტებში.

**ამოცანები:**

- ღია ველში კვლევითი ქცევის, ჰაბიტუაციის და ამოცნობის მეხსიერების შესწავლა ვირთაგვების თავის ტვინის პარაკუჭებში ან ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავას ბილატერალური მიკროინექციის პირობებში და საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში.
- სივრცითი მეხსიერების შეფასება ვირთაგვების თავის ტვინის პარაკუჭებში ან ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავას ბილატერალური მიკროინექციის პირობებში და საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში.
- ჰიპოკამპში უჯრედების რაოდენობრივი შეფასება ვირთაგვების თავის ტვინის პარაკუჭებში ან ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავას ბილატერალური მიკროინექციის პირობებში და საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში.
- ჰიპოკამპსა და მედიალურ სეპტუმში ნეიროტრანსმიტერების აქტიურობის შესწავლა ტვინის პარაკუჭებში ოკადაიკის მჟავას ბილატერალური მიკროინექციის პირობებში და საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში.
- მემანტინის ნეიროპროტექტორული პოტენციალის შესწავლა ოკადაიკის მჟავით გამოწვეულ ნეიროპათოლოგიურ ცვლილებებზე ჰიპოკამპსა და მედიალურ სეპტუმში
- ოკადაიკის მჟავით გამოწვეულ მეხსიერების დეფიციტზე მემანტინის პრევენციული პოტენციის შესწავლა.

**ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და პრაქტიკული მნიშვნელობა**

სადისერტაციო ნაშრომში მიღებული შედეგები გააფართოვებს ცოდნას მეხსიერებისა და დასწავლის პროცესების და მათი დარღვევების, ასევე OA-ით ინდუცირებული ტოქსიკური ეფექტების მარეგულირებელი მექანიზმების შესახებ. მეხსიერების დეფიციტთან ასოცირებული ნეიროტრანსმიტერული სისტემების მარკერების, აგრეთვე ჰიპოკამპში სტრუქტურული ცვლილებების კვლევა, ხელს შეუწყობს დაავადებათა სამკურნალო ეფექტური თერაპიული საშუალებების ახალი სტრატეგიების განსაზღვრას და

ასევე, მნიშვნელოვან წვლილს შეიტანს მეხსიერების ნეირობიოლოგიის ფუნდამენტური მექანიზმების უკეთ შეცნობაში.

**პუბლიკაციები.** დისერტაციის მასალებზე გამოქვეყნებულია 3 ნაშრომი (იხ. გვ. 15) ასევე ნაშრომში მოყვანილი ძირითადი შედეგები მოხსენებულ იქნა 2 სამეცნიერო კონფერენციაზე და სასწავლო პროგრამით გათვალისწინებულ 3 კოლოკვიუმზე.

**ნაშრომის სტრუქტურა.** დისერტაციის სტრუქტურა შესაბამისობაშია კვლევაში დასმულ ამოცანებსა და მიზნებთან. იგი შედგება შემდეგი ძირითადი ნაწილებისგან:

- შესავალი - ნაშრომის ზოგადი დახასიათება, მიღებული შედეგების აქტუალობა, სამეცნიერო და პრაქტიკული მნიშვნელობა.
- ნაშრომის ძირითადი შინაარსის სამი თავი - ლიტერატურის მიმოხილვა, ექსპერიმენტის მეთოდოლოგია, მიღებული შედეგები.
- მიღებული შედეგების საერთო განხილვა.
- დასკვნები.
- ლიტერატურის სია.

დისერტაციის სრული მოცულობა შეადგენს 141 გვერდს, და მოიცავს 21 სურათს, 1 ცხრილს და 275 დასახელების ციტირებული ლიტერატურის სიას.

### **ნაშრომის ძირითადი შინაარსი თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა**

აღნიშნულ თავში მოცემულია ალცჰეიმერის დაავადების დახასიათება, ჰიპოთეზები ამ დაავადების გამომწვევი მიზეზების შესახებ, აღწერილია AD-ს თანმდევი ქცევითი და კოგნიტიური ფუნქციების დარღვევები და დღეისათვის ცნობილი AD-ის სამკურნალო სამიზნეები. ლიტერატურის მიმოხილვის ბოლოს აღწერილია AD-ის ცხოველური მოდელები, რომლებსაც იყენებენ AD-ის პათოგენეზის კვლევისათვის და ახალი სამკურნალო საშუალებების განსაზღვრისათვის.

### **თავი II. ექსპერიმენტის მეთოდოლოგია**

წარმოდგენილია ექსპერიმენტებში გამოყენებული ცხოველების მოვლის პროტოკოლი. ნეიროქირურგიული ოპერაციები, რომელიც

ჩატარებულ იქნა ვირთაგვებზე ტვინის პარკუჭებსა და ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავას ან ხელოვნური ცერებროსპინალური სითხის ინექციის მიზნით. აღწერილია ჰისტოქიმიური და იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდები, რომლებიც აფასებენ ოკადაიკის მჟავას ინექციით გამოწვეულ ნეირონების დაკარგვას და ნეიროტრანსმიტერების აქტიურობის ცვლილებას ჰიპოკამპსა და მედიალურ სეპტუმში. მეხსიერების სხვადასხვა ფორმის შეფასების მიზნით გამოყენებული ქცევითი ტესტები და ტესტირების პირობები, ანტიდემენციური პრეპარატის - მემანტინის ექსპერიმენტულ ცხოველებში შეყვანის დიზაინი, ასევე მონაცემთა სტატისტიკური დამუშავების მეთოდები შესაბამის ფაქტობრივ მასალასთან არის აღწერილი.

## **თავი 3. მიღებული შედეგები**

### **3.1. ტვინის პარკუჭებსა და ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავას მიკროინექციის ეფექტები მეხსიერებასა და ჰიპოკამპის სტრუქტურაზე**

#### **3.1.1. ჰიპოკამპში ნეიროდეგენერაციული პროცესების კვლევა ტვინის პარკუჭებსა და ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავის მიკროინექციის მქონე და საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში**

ჰიპოკამპის ტვინის ანათლების ჰისტოლოგიური კვლევა ტარდებოდა ცხოველთა 4 ჯგუფში: 1. OA(ICV) (OA-ს მიკროინექცია პარკუჭებში), 2. Control(ICV) (aCSF მიკროინექცია პარკუჭებში), 3. OA(hipp) (OA-ს მიკროინექცია ჰიპოკამპში). 4. Control(hipp) (aCSF მიკროინექცია ჰიპოკამპში). ჰისტოლოგიურ კვლევებში Control(ICV) და Control(hipp) ჯგუფებში მიღებულ შედეგებს შორის სარწმუნო განსხვავების არარსებობის გამო, ეს ორი ჯგუფი გაერთიანებულია ერთ - საკონტროლო ჯგუფში.

საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით OA(ICV) ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპის ანათლების ნისლის მეთოდით შეღებვით გამოვლინდა პირამიდული უჯრედების სარწმუნო შემცირება CA1 და CA3 ველებში ( $p<0.001$ ;  $p<0.01$ , შესაბამისად). ასევე სარწმუნო განსხვავება გამოვლინდა OA(hipp) ჯგუფის CA1 და CA3 ველში

( $p < 0.001$ ;  $p < 0.01$ , შესაბამისად). გამოვლინდა, რომ პირამიდული უჯრედების რაოდენობა ჰიპოკამპის ორივე ველში OA(ICV) ჯგუფში სარწმუნოდ მეტია OA(Hipp) ჯგუფთან შედარებით (CA1 -  $p < 0.01$ ; CA3 -  $p < 0.05$ ).

ამრიგად, გამოვლინდა, რომ ოკადაიკის მჟავას ინექცია ტვინის პარაკუჭებში ან დორსალურ იწვევს ჰიპოკამპის CA1 და CA3 ველში პირამიდული უჯრედების სარწმუნო შემცირებას, თუმცა ოკადაიკის მჟავას ჰიპოკამპში ინექცია, ტვინის პარაკუჭებში ინექციასთან შედარებით, ნეირონების უფრო ინტენსიურ დაღუპვას იწვევს.

### **3.1.2. ტვინის პარაკუჭებსა და ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავას მიკროინექციის ეფექტები ამოცნობის მეხსიერებაზე.**

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა, ტვინის პარაკუჭებსა და ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავის მიკროინექციის მქონე ვირთაგვებში და ასევე, საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში, შეგვეფასებინა სივრცითი და არასივრცითი ინფორმაციის გამოყენების უნარი, ასევე დროში განვითარებული კვლევითი აქტიურობის ჰაბიტუაცია. აღნიშნული პროცესების შესაფასებლად ვიყენებდით ღია ველის არაასოციაციურ ამოცანას, რომელიც არ მოითხოვს ჯილდოთი განმტკიცებას. ღია ველში პირველ და მესამე სესიას შორის კვადრატების გადაკვეთათა რაოდენობის შემცირება მიიჩნეოდა, როგორც გარემოს მიმართ ჰაბიტუაცია. ობიექტების მიმართ ჰაბიტუაცია ფასდებოდა პირველ და მესამე სესიას შორის ობიექტთან გატარებული დროის შემცირებით. ვირთაგვას პასუხი სივრცით სიახლეზე (მეოთხე სესიაში) და ობიექტის ფიზიკური მახასიათებლის სიახლეზე (მეხუთე სესიაში) ფასდებოდა, დისკრიმინაციური ინდექსის (DIs) გამოანგარიშების საფუძველზე.

საკონტროლო ჯგუფის ცხოველების პირველ და მესამე სესიაში ლოკომოტორული აქტიურობის მაჩვენებლების სტატისტიკური ანალიზით გამოვლინდა სესიებს შორის სარწმუნო განსხვავება ( $P=0.019$ ), თუმცა იგივე მაჩვენებლების სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა OA(hipp) და OA(ICV) ჯგუფის ცხოველებში ( $P=0.085$ ,  $P=0.475$ , შესაბამისად). საკონტროლო ჯგუფის ცხოველების პირველ და მესამე სესიაში ობიექტების კვლევის მაჩვენებლებს შორის გამოვლინდა სარწმუნო განსხვავება ( $P=0.019$ ), ხოლო OA(hipp) და OA(ICV) ჯგუფის ცხოველებში

პირველ და მესამე სესიაში კვლევითი ქცევის მაჩვენებლების განსხვავება არ გამოვლინდა ( $P=0.985$ ,  $P=0.766$ , შესაბამისად). ადგილის სიახლის დისკრიმინაციული ინდექსის მიხედვით, მნიშვნელოვანი განსხვავება გამოვლინდა საკონტროლო და OA-Hipp ჯგუფებს შორის ( $P<0.001$ ), ხოლო საკონტროლო და OA-ICV ჯგუფებს შორის განსხვავება არასარწმუნოა ( $P>0.711$ ). ობიექტის სიახლის დისკრიმინაციული ინდექსის მიხედვით, მნიშვნელოვანი განსხვავება გამოვლინდა საკონტროლო და OA(hipp) ჯგუფებს შორის ( $P=0.038$ ), ხოლო საკონტროლო და OA(ICV) ჯგუფებს შორის განსხვავება არასარწმუნოა ( $P=0.976$ ).

ამრიგად, ოკადაიკის მჟავას მიკროინექცია ტვინის პარაკუქებში ან დორსალურ ჰიპოკამპში იწვევს გარემოსა და ობიექტების მიმართ ჰაბიტუაციის პროცესის გაუარესებას ღია ველში. ოკადაიკის მჟავას მიკროინექცია ჰიპოკამპში აუარესებს სივრცითი ან ობიექტების სიახლის დეტექციის უნარს, ანუ ამოცნობის მეხსიერებას ვირთაგვებში, ხოლო ოკადაიკის მჟავას ტვინის პარაკუქებში მიკროინექცია ამოცნობის მეხსიერების გაუარესებას არ იწვევს.

### **3.1.3. ტვინის პარაკუქებსა და ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავის მიკროინექციის ეფექტები სივრცით მეხსიერებაზე**

კვლევაში ფასდებოდა ვირთაგვებში OA-ს პარაკუქებსა და ჰიპოკამპში ორმხრივი მიკროინექციის ეფექტები სივრცით მეხსიერებაზე, თავდაცვით მოტივაციაზე დაფუძნებულ სივრცით ამოცანაში, წყლის აუზის უხილავბაქნიან ვერსიაში, რომელიც აფასებს ხანმოკლე და ხანგრძლივ სივრცით მეხსიერებას და დასწავლის პროცესს. ამოცანა მოიცავდა ორ ეტაპს: პირველ დღეს ეძლეოდათ 8 სინჯი (ტრენირების ანუ დასწავლის პერიოდი), რომლის მონაცემები გაერთიანებულია 2 ბლოკში: 1 - 4 სინჯი შეადგენს I ბლოკს, ხოლო 5 - 8 სინჯი II ბლოკს. ამ სინჯების დასრულებიდან 30 წთ-ში ეძლეოდა პირველი სატესტო სინჯი, რომელიც აფასებდა ხანმოკლე სივრცით მეხსიერებას, ხოლო მეორე დღეს (24 სთ-ის შემდეგ) - მეორე სატესტო სინჯი, რომელიც აფასებდა ხანგრძლივ სივრცით მეხსიერებას.

სტატისტიკურმა ანალიზმა აჩვენა პირველ და მეორე ბლოკებს შორის ბაქნის პოვნის ლატენტურ დროებს შორის სარწმუნო განსხვავება საკონტროლო ( $P = 0.003$ ), OA(ICV) ( $P =$



0.021) და OA(Hipp) ( $P = 0.004$ ) ჯგუფებში. რაც აჩვენებს, რომ ტვინის პარაკუჭებსა და ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავის მიკროინექცია არ იწვევს დასწავლის პროცესის გაუარესებას მორისის წყლის აუზის უხილავბაქნიან ვერსიაში.

სივრცითი ხანმოკლე და ხანგრძლივი მეხსიერება უხილავი ბაქნის ადგილმდებარეობის შესახებ სატესტო სინჯში ფასდებოდა ცხოველის მიერ, იმ სექტორის მიმართ უპირატესობის მინიჭებით, ანუ მეტ დროს ატარებს სექტორში, რომელშიც უხილავი ბაქანი მდებარეობდა ( $S_{test}$ ), საპირისპირო სექტორთან შედარებით ( $S_{opp}$ ). სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების შეფასებით გამოვლინდა, რომ ყველა ჯგუფის ცხოველები სარწმუნოდ მეტ დროს ატარებენ სატესტო სექტორში ოპოზიტურთან შედარებით [საკონტროლო -  $P < 0.001$ ; OA(ICV) -  $P < 0.001$  და OA(hipp) -  $P < 0.001$ ; სურ. 10], ხოლო სივრცითი ხანგრძლივი მეხსიერების შეფასებით გამოვლინდა სატესტო და ოპოზიტურ სექტორში გატარებულ დროთა არასარწმუნო განსხვავება OAicv ( $P = 0.485$ ) და OAhipp ( $P = 0.358$ ) ჯგუფებში და სარწმუნო განსხვავება საკონტროლო ჯგუფში ( $P < 0.001$ ).

ამრიგად, გამოვლინდა, რომ ტვინის პარაკუჭებსა და ჰიპოკამპში ოკადაიკის მჟავის მიკროინექცია არ იწვევს ხანმოკლე სივრცითი მეხსიერების გაუარესებას, მორისის წყლის აუზის უხილავბაქნიან ვერსიაში, თუმცა სარწმუნოდ აუარესებს სივრცით ხანგრძლივ მეხსიერებას.

### **3.2. მემანტინის ნეიროპროტექტორული ეფექტები ოკადაიკის მჟავით გამოწვეულ მეხსიერების დარღვევასა და ჰიპოკამპში სტრუქტურულ და მოლეკულურ ცვლილებებზე**

**3.2.1. მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედების ეფექტები ოკადაიკის მჟავით გამოწვეულ ნეიროტრანსმიტერების აქტიურობის ცვლილებაზე ჰიპოკამპსა და მედიალურ სეპტუმში და ჰიპოკამპში ნეირონების დაღუპვაზე**

ჰიპოკამპსა და MS-ში ოკადაიკით გამოწვეულ პათოლოგიურ ცვლილებებზე მემანტინის შესაძლო ნეიროპროტექტორული თვისებები ფასდებოდა ცხოველების 4 ჯგუფში: Contr(S) - თავის ტვინის პარაკუჭებში aCSF და ინტრაპერიტონიალურად ფიზიოლოგიური ხსნარის ინექცია; Contr(M) - პარაკუჭებში aCSF, ხოლო ინტრაპერიტონიალურად მემანტინის ინექცია; OA(S) - პარაკუჭებში OA-ს, ინტრაპერიტონიალურად ფიზიოლოგიური ხსნარის ინექცია; OA(M) - პარაკუჭებში OA-ს და ინტრაპერიტონიალურად მემანტინის ინექცია.

ჰისტოქიმიური კვლევით გამოვლინდა პირამიდული უჯრედების სარწმუნო შემცირება OA(S) ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპის CA1 და CA3 ველებში ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.01$ , შესაბამისად) Contr(S) ჯგუფის ცხოველებთან შედარებით, ამასთან პირამიდული უჯრედების რაოდენობა ჰიპოკამპის ორივე ველში OA(M) ჯგუფში სარწმუნოდ მეტია OA(S) ჯგუფთან შედარებით (ორივე შემთხვევაში  $p < 0.01$ ). იმუნოჰისტოქიმიური კვლევით გამოვლინდა AChE-მგრძნობიარე ნეირონების რაოდენობის სარწმუნო შემცირება ჰიპოკამპში OA(S) ჯგუფში Contr(S) (CA1 -  $P < 0.01$ ; CA3 -  $P < 0.01$ ) და OA(M) (CA1 -  $P < 0.05$ ; CA3 -  $P < 0.05$ ) ჯგუფთან შედარებით.

იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით MS-ის ანათლებზე ChAT და PV მგრძნობიარე უჯრედების რაოდენობის სტატისტიკურმა ანალიზმა OA(S) ჯგუფში გამოავლინა ChAT და PV მგრძნობიარე GABAერგული უჯრედების სარწმუნო შემცირება Contr(S) ჯგუფის ცხოველებთან შედარებით (ChAT-ისთვის  $P = 0.01$ ; PV-სთვის  $P = 0.01$ ); OA(M) და OA(S) ჯგუფებს შორის ამ მაჩვენებლების მიხედვით სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა (ChAT-ისთვის  $P < 0.01$ ; PV-სთვის  $P < 0.05$ ).

ამრიგად, ოკადაიკის მჟავის მიკროინექცია ტვინის პარაკუჭებში იწვევს ჰიპოკამპის CA1 და CA3 ველში პირამიდული უჯრედების და AChE-მგრძნობიარე ნეირონების, ასევე MS-ში ChAT და PV მგრძნობიარე GABAერგული უჯრედების სარწმუნო შემცირებას. აღსანიშნავია, რომ მემანტინით ქრონიკული ზემოქმედება სარწმუნოდ ამცირებს ჰიპოკამპსა და MS-ში OA-ს მიკროინექციით გამოწვეულ ნეიროპათოლოგიურ ცვლილებებს.

**3.2.2. მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედების ეფექტები ოკადაიკის მჟავით გამოწვეულ სივრცით ხანმოკლე მეხსიერების დეფიციტზე**  
ექსპერიმენტების ამ სერიაში შეისწავლებოდა ვირთაგვებში OA-ს ინტრავენტრიკულური შეყვანის ეფექტები სივრცით ხანმოკლე მეხსიერებაზე და მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედების ეფექტები ოკადაიკის მჟავით გამოწვეულ სივრცით ხანმოკლე მეხსიერების დეფიციტზე. სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერება ფასდებოდა სპონტანური მორიგეობის ამოცანაში. 15 წუთის განმავლობაში აღირიცხებოდა მკლავებში შესვლათა რაოდენობა და თანმიმდევრობა მორიგეობის დონის განსაზღვრისათვის.

სხვადასხვა ჯგუფში მკლავებში შესვლის რაოდენობრივმა ანალიზმა გამოავლინა სარწმუნო განსხვავება Contr(S) და Contr(M) ჯგუფის ცხოველებს შორის ( $P = 0,035$ ), ასევე, OA(S) და OA(M) ჯგუფებს შორის ( $P = 0,034$ ). სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა Contr(S) და OA(S) ან OA(M) ჯგუფებს შორის ( $P = 0,415$ ;  $p = 0,6$ , შესაბამისად). სხვადასხვა ჯგუფში სპონტანური მორიგეობის პროცენტული მაჩვენებლების სტატისტიკური დამუშავებით გამოვლინდა სარწმუნო განსხვავება Contr(S) და OA(S) ჯგუფებს შორის ( $P < 0,001$ ), მაგრამ არ გამოვლინდა სარწმუნო განსხვავება Contr(S) და Contr(M) ჯგუფებს შორის ( $P = 0,467$ ) და Contr(S) და OA(M) ჯგუფებს შორის ( $P = 0,891$ .) მემანტინის ზემოქმედებით გამოვლინდა სპონტანური მორიგეობის მაჩვენებლის გაუმჯობესება; განსხვავება OA(S) და OA(M) ჯგუფებს შორის სარწმუნოა ( $P = 0,002$ ).

ამრიგად, მიღებული შედეგებით გამოვლინდა, რომ OA-ს მიკროინექცია პარაკუჭებში იწვევს სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების გაუარესებას, ხოლო მემანტინით ქრონიკული ზემოქმედება აუმჯობესებს OA-ს მიკროინექციით გამოწვეულ სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების (რომელიც ფასდებოდა სპონტანური მორიგეობის ტესტით) დეფიციტს.

**3.2.3. მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედების ეფექტები ოკადაიკის მჟავით გამოწვეულ სივრცითი ხანგრძლივი მეხსიერების დეფიციტზე**

ექსპერიმენტების ამ სერიაში შეისწავლებოდა ვირთაგვებში OA-ს ინტრავენტრიკულური ინექციის ეფექტები დასწავლის

სტრატეგიის არჩევაზე მორისის წყლის აუზის ამოცანის ხილულბაქნიან ვერსიაში და მემანტინის უნარი მოახდინოს მეხსიერების შესაძლო დეფიციტის პრევენცია. მორისის აუზის ამ ვერსიაში სატესტო სინჯებში არჩეული სტრატეგიით შესაძლებელია განისაზღვროს რა ტიპის ინფორმაციის (ადგილის თუ ერთეული სიგნალის) დასწავლა განხორციელდა ტრენინგების პროცესში.

Contr(S), Contr(M) და OA(M) ჯგუფის ცხოველები OA(S) ცხოველებზე ადრე სწავლობენ უსიამოვნო გარემოდან განრიდებას და ხილულ ბაქანზე ასვლას, რაც OA(S) ჯგუფის ცხოველებში დასწავლის პროცესის გაუარესებაზე მიანიშნებს. ამ ამოცანის ხილულბაქნიან ვერსიაში ბაქნის პოვნის ლატენტური დროის სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა OA(S) და Contr(S) ( $P = 0,508$ ) და ასევე, Contr(S) და Contr(M) ( $P = 0,710$ ) ჯგუფებს შორის. ამავე დროს, უხილავი ბაქნის პირობებში ბაქნის პოვნის ლატენტური დრო სარწმუნოდ განსხვავდება OA(S) და Contr(S) ჯგუფებს შორის ( $P = 0,014$ ), აგრეთვე OA(S) და OA(M) ჯგუფებს შორის ( $P = 0,007$ ), ხოლო არასარწმუნო განსხვავება გამოვლინდა Contr(S) და OA(M) ჯგუფებს შორის ( $P = 0,998$ ). მიღებული შედეგები აჩვენებს, რომ ოკადაიკის მჟავის მიკროინექცია იწვევს ადგილის დასწავლის სტრატეგიის გამოყენების დეფიციტს, ხოლო მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედებით შესაძლებელია ამ დეფიციტის პრევენცია.

სხვადასხვა ჯგუფის ცხოველთა უმრავლესობა პირველ სატესტო სინჯს ადგილის დასწავლის სტრატეგიით, ანუ კოგნიტიური რუკის საფუძველზე ახორციელებდნენ. ჯგუფებს შორის I სატესტო სინჯში მიღებულ შედეგებს შორის განსხვავება სარწმუნო არ არის ( $P > 0,05$ ). თუმცა, Contr(S) და OA(S) ჯგუფის ცხოველების მიერ ორივე სატესტო სინჯში განხორციელებული პასუხების შედარების საფუძველზე სარწმუნო განსხვავება გამოვლინდა ( $t_a = 1,96$ ;  $P < 0,05$ ), ხოლო OA(S) და OA(M) ჯგუფის ცხოველებს შორის განსხვავება არასარწმუნოა ( $t_a = 1,14$ ;  $P > 0,1$ ). OA(S) ჯგუფის ცხოველები პირველ სატესტო სინჯში წარუმატებელი სტრატეგიის (ადგილის დასწავლა) გამოყენების შემდეგ, ადვილად გადადიან სხვა სტრატეგიის (სიგნალზე ორიენტაცია) გამოყენებაზე. სხვა ჯგუფის ცხოველები კი, მეორე

სინჯშიც ტრენირების დროს დასწავლილ სტრატეგიას (ადგილის დასწავლა) იყენებენ, რაც მიანიშნებს, რომ ამოცანის შესრულებისას კოგნიტიურ რუკაზე დამოკიდებულება ამ ჯგუფებში უფრო მყარია.

ამრიგად, ოკადაიკის მჟავას ტვინის პარაკუჭებში მიკროინექცია იწვევს ადგილის დასწავლის დეფიციტს, ხოლო მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედებით შესაძლებელია ამ დეფიციტის პრევენცია. ამასთან, გამოვლინდა, რომ მემანტინს აქვს როგორც მეხსიერების დეფიციტის, ასევე, ჰიპოკამპსა და მედიალურ სეპტუმში განვითარებული ნეიროპათოლოგიური პროცესების პრევენციის პოტენცია; ჩვენს ექსპერიმენტებში გამოვლინდა კორელაცია ამ ორ პროცესს შორის.

### **დასკვნები:**

1. OA-ს ტვინის პარაკუჭებში ან ჰიპოკამპში ბილატერალური მიკროინექცია ამცირებს პირამიდული ნეირონების რაოდენობას ჰიპოკამპის CA1 და CA3 ველებში; CA1 ველში აღნიშნული შემცირება უფრო მნიშვნელოვანია;
2. OA-ს ტვინის პარაკუჭებში ბილატერალური მიკროინექციის პირობებში ჰიპოკამპის ნეირონთა რაოდენობრივი შემცირება ნაკლებია, ვიდრე OA-ს ჰიპოკამპში მიკროინექციისას;
3. OA-ს ტვინის პარაკუჭებში ბილატერალური მიკროინექცია იწვევს ჰიპოკამპის სხვადასხვა ველში AChE-მგრძნობიარე ნეირონების, ხოლო მედიალურ სეპტუმში ChAT და GABA-ერგული პარვალბუმინმგრძნობიარე ნეირონების სარწმუნო შემცირებას;
4. OA-ს ჰიპოკამპში ბილატერალური მიკროინექცია იწვევს ამოცნობის მეხსიერების დარღვევას; OA-ს ტვინის პარაკუჭებში მიკროინექცია არ მოქმედებს ამოცნობის მეხსიერებაზე;
5. გამოვლინდა კორელაცია OA-ს ინექციით განპირობებულ ამოცნობის მეხსიერების დარღვევასა და ჰიპოკამპის ნეირონების დაკარგვის ინტენსივობას შორის; OA-ით გამოწვეული ამოცნობის მეხსიერების დეფიციტი, ნაწილობრივ მაინც, შესაძლოა უკავშირდებოდეს ნეიროტოქსინის გავლენით ჰიპოკამპის ნეირონების დაკარგვას;
6. OA-ს მიკროინექცია (პარაკუჭებში ან ჰიპოკამპში) არ აუარესებს დასწავლის პროცესს და ხანმოკლე სივრცით მეხსიერებას, თუმცა

იწვევს ხანგრძლივი სივრცითი მეხსიერების დეფიციტს წყლის აუზის ამოცანაში.

7. OA-ს ტვინის პარაკუჭებში ბილატერალური მიკროინექციის მქონე ვირთაგვები წარმატებით ასრულებენ წყლის აუზის ამოცანას ხილულბაქნიან ვერსიაში, თუმცა ვერ სწავლობენ ბაქნის ადგილმდებარეობას სივრცეში, რაც მიანიშნებს ჰიპოკამპდამოკიდებული სივრცითი მეხსიერების დარღვევასა და OA-ს სელექტიურ ნეიროტოქსიკურობაზე;
8. ჰიპოკამპდამოკიდებული სივრცითი მეხსიერების დარღვევა OA-ს ტვინის პარაკუჭებში ბილატერალური მიკროინექციის პირობებში შესაძლოა უკავშირდებოდეს სეპტოჰიპოკამპური ქოლინერგული და GABAერგული პროექციების დაზიანებას; მეხსიერების დარღვევის მექანიზმად სეპტოჰიპოკამპური დისფუნქცია შეიძლება განვიხილოთ;
9. OA-ს ტვინის პარაკუჭებში ბილატერალური მიკროინექცია იწვევს სივრცითი მორიგეობის დარღვევას; ეს დარღვევა შესაძლოა მოიცავდეს როგორც ხანმოკლე მეხსიერებას, ასევე არამნიშვნელო პროცესებს, როგორცაა ყურადღება და შესაძლოა გამოწვეული იყოს ჰიპოკამპში ქოლინერგული დისფუნქციით;
10. მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედება სარწმუნოდ აუმჯობესებს OA-ს ტვინის პარაკუჭებში ბილატერალური მიკროინექციით გამოწვეული სივრცითი მეხსიერების დეფიციტს და ჰიპოკამპსა და მედიალურ სეპტუმში განვითარებულ ნეიროპათოლოგიურ ცვლილებებს;
11. მემანტინის პრევენციული ეფექტი აჩვენებს OA-ით გამოწვეულ ტოქსიკურობაში NMDA რეცეპტორების ჩართულობას.

ამრიგად, OA-ს ტვინის პარაკუჭებში ან ჰიპოკამპში ბილატერალური მიკროინექცია იწვევს სივრცითი მეხსიერების დეფიციტს და ჰიპოკამპის ნეირონების დაკარგვას, ამ მოდელში პირველად არის ნაჩვენები მედიალური სეპტუმის ქოლინერგული და GABAერგული ნეირონების რაოდენობის შემცირება. ასეთი ცვლილებები აღწერილია ალცჰეიმერის დაავადების მქონე პაციენტებში და შესაბამისად, ადასტურებს ამ მოდელის ეფექტურობას თერაპიული საშუალებების ახალი სტრატეგიების განსაზღვრისათვის. მიღებული შედეგები მნიშვნელოვანია

მეხსიერებასთან დაკავშირებული სხვადასხვა რეგულატორული მექანიზმების უკეთ შეცნობაში.

#### სტატიები:

1. Naneishvili T., **Chighladze M.**, Dashniani M., Burjanadze M., Chkhikvishvili N., Beselia G., Kruashvili L., Pochkhidze N., „Recognition Memory Impairment and Neuronal Degeneration Induced by Intracerebroventricular or Intrahippocampal Administration of Okadaic Acid“, Bulletin of the Georgian national Academy of Science, 2015, vol.9, no.3, (155-161) ;
2. **Chighladze M.**, Dashniani M., Beselia G., Kruashvili L., Naneishvili T. „Spatial Memory Impairment and Hippocampal Cell Loss Induced by Okadaic Acid“ Georg. Med. News. 2016, no 1 (250) 83-87;
3. Dashniani M., **Chighladze M.**, Burjanadze M., Beselia G., Kruashvili L., “Memantine Attenuates The Okadaic Acid Induced Short-Term Spatial memory Impairment And Hippocampal Cell Loss in Rats” Georg. Med. News. 2016, no 3 (252) 59-63;

#### თეზისები:

1. **2015 - ჭილაძე მ.**, ბიოლოგიისა და მედიცინის აქტუალური საკითხები „ამოცნობის მეხსიერებისა და არასოციაციური დასწავლის პროცესების კვლევა ოკადაიკის მჟავას ტვინის პარაკუჭებსა და ჰიპოკამპში შეყვანის პირობებში“ თელავი, საქართველო.
2. **2016 - ჭილაძე მ.**, ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენცია „ოკადაიკის მჟავით გამოწვეული სივრცითი მეხსიერების დეფიციტი და ჰიპოკამპის უჯრედების დაღუპვა“ ბაკურიანი, საქართველო.
3. **2015-2016** - საგანმანათლებლო პროგრამით გათვალისწინებული 3 კოლოქვიუმი.

**St. Andrew the First-Called Georgian University Of the  
Patriarchate of Georgia**

On the Manuscript Rights

**School (Department) of Informatics, Mathematics and  
Natural Sciences**

**Educational Program - Neuronal mechanisms of memory**

**Mariam Chighladze**

**Study of Different forms of Memory and  
Neurotransmitter Activity in Hippocampus in  
Okadaic Acid Induced Rat Model of Alzheimer's  
Disease**

**Abstract**

of thesis on academic degree of Doctor of Biology/Life  
Sciences

05 Sciences/Natural Sciences  
Branch – 0504 Biology/Life Sciences

Tbilisi

**2016**



This scientific paper has been performed in the Ivane Beritashvili Center of Experimental Biomedicine and School (Department) of Informatics, Mathematics and Natural Sciences of the St. Andrew the First-called Scientific University at the Georgian Patriarchate. On doctoral Program: Neuronal mechanisms of memory

Scientific Supervisor: Manana Dashniani  
Doctor of Biological Sciences

Official Opponents: 1. Mzia Zhvania

Doctor of Biological Sciences

2. Tamar Domianidze

PhD

Defense of the thesis will be held on 29 June 2016, at 15 o'clock at the St. Andrew the First-called Scientific University at the Georgian Patriarchate School (Department) of Informatics, Mathematics and Natural Sciences at the School's (Department's) Dissertation committee meeting.

Address: 0162, Tbilisi #53a Ilia Chavchavadze Ave., Block II, Ilia Vekua auditory.

Dissertation text is available at the St. Andrew the First-called Scientific University's Library at the Georgian Patriarchate.

The abstract of the thesis is sent on 2016.

The Secretary of the  
Dissertation Council,

PhD, Professor Giorgi Maqacaria

## Short Description of the Work

### The Subject Actuality.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that causes progressive cognitive and behavior deterioration in the elderly over age 65. Individuals suffering from this disease suffer memory loss, and histological examination of the brains of such individuals has revealed neuronal neurodegeneration and the presence of neurofibrillary tangles within neurons and extracellular deposits of  $\beta$ -amyloid. It is clear that successful AD treatments will need to rescue cognitive as well as structural and molecular dysfunctions. Increasing evidence suggests the cognitive syndromes found in AD patients are preceded by changes in synaptic efficacy. Investigation of hippocampal morphology and markers of neurotransmission systems in the hippocampus in association of learning process and memory deficit of Okadaic Acid (OA) treated rats will give a more complete picture for understanding the various regulatory mechanisms and neurotoxicity of OA,

### Principal Goals and Tasks of the Reserch.

The purpose of research was to investigate neurotoxic consequences at the behavioral, structural and molecular level induced by (ICV) injection of okadaic acid and the potential of antidementic drug - memantine prevent these effects.

Different forms of memory (declarative, nondeclarative) and development of learning process (associative, nonassociative) was studied and morphological and immunohistochemical experiments was performed; specifically, were clarified the hippocampal morphology (cell loss) and neurotransmitter activity in the hippocampus and in medial septal nucleus in OA injected rats and treated with memantine.

The potential of memantine to prevent OA induced memory impairment and neuropathological changes was assessed.

#### *The objectives :*

- Study of open field activity (exploratory behavior, habituation, recognition memory) in bilateral ICV or intrahippocampal OA injected and control rats

- Study of spatial memory function in bilateral ICV or intrahippocampal OA injected and control rats
- Study of hippocampal morphology (cell loss) in bilateral ICV or intrahippocampal OA injected and control rats
- Study of the neurotransmitter activity in the hippocampus and medial septum in bilateral ICV OA injected and control rats.
- Study of the neuroprotective potential of memantine on OA-induced changes in neurotransmitter activity and cell loss in the hippocampus and medial septum in bilateral ICV OA injected and control rats.
- Study of the potential of antidementic drug - memantine to prevent OA induced memory impairment

**Scientific Novelty of the Work and Practical Importance of the Work**

Investigation of hippocampal morphology and markers of neurotransmission systems in the hippocampus in association of learning process and memory deficit of OA treated rats may lead implications for understanding the various regulatory mechanisms and neurotoxicity of OA, also for the better understanding of the fundamental neurobiology of memory. It may also lead to new strategies in development effective therapeutics for disease intervention.

**Publication.** Materials of thesis published 3 papers (see. P. 27), also main result of this work were presented at 2 scientific conference and three colloquiums.

**Structure and Extent of the Work.** The thesis consists of:

- An introduction - the subject actuality, principal goals and tasks of the research, scientific novelty of the work and practical importance of the work
- 3 chapters - review of literature, research methods, results.
- Discussion
- Conclusions
- A list of references

The thesis contains 141 pages, including 21 figures, 1 tables and references from 275 names.

## **3. Results**

### **3.1. Recognition Memory Impairment and Neuronal Degeneration Induced by Intracerebroventricular or Intrahippocampal Administration of Okadaic Acid**

#### **3.1.1. Neuronal degeneration induced by intracerebroventricular or intrahippocampal administration of Okadaic Acid**

In the present study, we evaluated and compared effect of intracerebroventricular (ICV) and intrahippocampal bilateral microinjection of okadaic acid (OA) hippocampal pyramidal cell loss in rats. Histological study was performed in following groups: Control(ICV) - rats injected ICV with aCSF; Control(hipp) - rats injected intrahippocampally with aCSF; OA(ICV) - rats injected ICV with OA; OA(hipp) - rats injected intrahippocampally with OA. Nissl staining of hippocampal sections showed that the number of pyramidal cells in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus in the control group is significantly higher than that in the OA(hipp) ( $p<0.001$ ;  $p<0.01$ , respectively) and OA(ICV) groups ( $p<0.001$ ;  $p<0.01$ , respectively). In both regions the number of pyramidal cells in OA(ICV) group is significantly higher than that in the OA(hipp) (CA1 -  $p<0.01$ ; CA3 -  $p<0.05$ ).

Thus, intracerebroventricular and intrahippocampal bilateral microinjection of OA causes pyramidal cells loss in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus, though intrahippocampal microinjection of OA causes more intensive loss of pyramidal neurons than intracerebroventricular microinjection.

#### **3.1.2. Recognition memory impairment induced by intracerebroventricular or intrahippocampal administration of Okadaic Acid**

In the present study, we evaluated and compared effect of intracerebroventricular (ICV) and intrahippocampal bilateral microinjection of okadaic acid (OA) on recognition memory function assessed in open field paradigm. Locomotor activity was assessed by counting the number of grid crossed by each animal while moving in the

open field and the amount of time spent by each animal for the object exploration was recorded. The decrease in the number of crossings between Session 1 and Session 3 was taken to be a measure of habituation to the environment and the decrease in the time spent for exploring four objects between Session 1 and Session 3 was taken to be a measure of habituation to the objects. The rats' responses to the spatial change and object novelty were evaluated as discrimination indexes (DIs and ) that takes into account individual differences in the total amount of exploration.

Statistical analysis for the locomotor activity showed significant difference ( $P=0.019$ ) between Sessions 1 and 3 in control group ( $P=0.019$ ) and no significant difference in OA(ICV) and OA(hipp) ( $P=0.085$ ,  $P=0.475$ , respectively) and for the object exploration showed significant difference ( $P=0.019$ ) between Sessions 1 and 3 in control group ( $P=0.019$ ) and no significant difference in OA treated groups [(OA(ICV) -  $P=0.985$ , OA(hipp) -  $P=0.766$ )]. Statistical analysis for the displacement discrimination index showed a significant difference between the control and OAhipp groups ( $P<0.001$ ) and no significant difference between the control and OAicv groups ( $P=0.711$ ), and for the object novelty discrimination index revealed significant difference between the control and OA(hipp) groups ( $P=0.038$ ) and no significant difference between the control and OA(ICV) groups ( $P=0.976$ ).

Thus, the results of behavioral study indicate that bilateral microinjection of OA into the dorsal hippocampus induced impairment in recognition memory. Control rats as well as OA(ICV) treated rats clearly reacted to the modification of the configuration by exploring the displaced (or novel) object more than nondisplaced (or familiar) ones. These results indicate that ICV microinjection of OA did not affect recognition memory.

### **3.1.3. Spatial memory impairment induced by intracerebroventricular or intrahippocampal administration of Okadaic Acid**

In the present study, we evaluated and compared effect of ICV and intrahippocampal bilateral microinjection of OA on spatial memory function. Long-term and Short-term spatial memory was assessed using a Morris water maze. On day 1, rats received eight trials (1-4 trials - block

1; 5-8 trials - block 2) and differences for escape latency between block 1 and block 2 was taken to be a measure of learning process. Statistical analysis of differences for escape latency between block 1 and block 2 showed significant difference in control ( $P = 0.003$ ), in OA(ICV) ( $P = 0.021$ ) and OA(hipp) ( $P = 0.004$ ) treated groups. These results showed that ICV or intrahippocampal bilateral microinjection of OA did not affect learning process.

30s after training, a probe test with the platform removed was performed to assess short-term spatial memory, and 24 hours after training, to assess long-term spatial memory. Long-term and short-term spatial memory of the location of the hidden platform is indicated by preference for test sector ( $S_{\text{test}}$ ) (were located the hidden platform in training day) and opposite sectors ( $S_{\text{opp}}$ ). Spatial short-term memory assessment revealed that all of the animals spend significantly more time in the test sector, compared with opposed [control -  $P < 0.001$ ; OA(ICV) -  $P < 0.001$  and OA(hipp) -  $P < 0.001$ ], but spatial long-term memory assessment revealed no significant differences for time spent in  $S_{\text{test}}$  and  $S_{\text{opp}}$  in OA(ICV) ( $P = 0.485$ ) and OA(hipp) ( $P = 0.358$ ) treated groups and significant difference in control rats ( $P < 0.001$ ).

Thus, the results of behavioral experiments showed that ICV or intrahippocampal bilateral microinjection of OA did not affect learning process and short-term spatial memory but induced impairment in spatial long-term memory assessed in probe test performance 24 h after training. OA-induced spatial memory impairment may be attributed to the hippocampal cell death.

### **3.2. Neuroprotective effect of memantine on okadaic acid induced memory impairment and structural and molecular changes in the hippocampus**

#### **3.2.1. Effects of Chronic Administration of Memantine on Okadaic Acid Induced Changes in Neurotransmitter Activity in hippocampus and medial septal nucleus and on hippocampal cell loss**

The possible neuroprotective potential of memantine on OA-induced pathological changes in the hippocampus and MS was evaluated

in 4 groups: control rats injected i.p. with saline [Contr(S)] or memantine [Contr(M)] and **OA injected rats** treated i.p. with saline [OA(S)] or memantine [OA(M)]. Memantine (5 mg/kg, i.p.) or saline were given daily for 13 days starting from the day of OA injection.

Nissl staining of hippocampal sections showed that the number of pyramidal cells in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus in the control group is significantly higher than that in the OA injected rats ( $p<0.001$ ;  $p<0.01$ , respectively) and that the number of pyramidal cells in the both hippocampal regions is significantly higher in memantine treated OA injected rats than that in the saline treated OA injected rats ( $P<0.01$ ). The results of Immunohistochemical studies showed a significant reduced AChE staining in hippocampus in OA(S) group as compared to sections obtained from Contr(S) (CA1 -  $P<0.01$ ; CA3 -  $P<0.01$ ) and OA(M) (CA1 -  $P<0.05$ ; CA3 -  $P<0.05$ ) groups. Immunohistochemical studies showed that ICV injection of OA significantly reduced ChAT and PV-sensitive GABAergic neurons in the MS as compared to control rats (for ChAT -  $P<0.01$ ; for PV-  $P<0.01$ ); the results showed that there is significant difference between OA(M) and OA(S) groups (for ChAT -  $P<0.01$ ; for PV-  $P<0.05$ )

Thus, the results showed that ICV microinjection of OA decreased the number of AChE sensitive neurons in different regions of the hippocampus and decreased the number of ChAT and parvalbumin sensitive GABAergic neurons in medial septal nucleus; chronic administration of memantine effectively attenuated OA induced neuropathological changes in the hippocampus and MS.

### **3.2.2. Effects of Chronic Administration of Memantine on Okadaic Acid Induced Spatial Short-term Memory impairment**

In the present study, intracerebroventricular (ICV) injection of OA in rats was used as a memory impairment animal model. The possible beneficial effect of memantine on the OA-induced spatial short-term memory impairment was assessed using a four-arm plus-shaped maze. The number and sequence of arms entered were recorded to determine alternation scores.

Statistical analysis showed a significant difference between the saline and memantine treated control ( $P =0,035$ ) and between the saline and memantine treated OA injected rats ( $P =0,034$ ). The difference

between the saline treated control and saline or memantine treated OA injected rats were not significant ( $P = 0.415$ ;  $p = 0,6$ , respectively).

ICV injection of OA significantly impaired performance of spontaneous alternation. Statistical analysis showed a significant difference between the saline treated control and the saline treated OA injected rats ( $P < 0,001$ ), but there was no significant difference between the saline and memantine treated control ( $P = 0,467$ ) and between saline treated control and memantine treated OA injected ( $P = 0,891$ ) rats. Memantine treatment causes improvement of spontaneous alternation performance; the difference between saline and memantine treated OA injected rats is significant ( $P = 0,002$ ).

Thus, ICV injection of OA impaired spatial short-term memory and chronic administration of memantine effectively attenuated OA induced spatial short-term memory impairment assessed in spontaneous alternation task.

### **3.2.3. Effects of Chronic Administration of Memantine on Okadaic Acid Induced Spatial long-term Memory impairment**

The effects of intracerebroventricular administration of okadaic acid and the possible beneficial effect of memantine were studied in the water maze task taxing different strategy of spatial memory function. The choice of strategy on the competition tests could reflect a bias of one type of information (i.e., cue or place) acquired during training. Rats of Contr(S), Contr(M) and OA(M) groups rapidly learned to escape to the visible platform and reached the 6 s asymptote on day 2. Rats of OA(S) group were significantly impaired on the first 4 days and improved in their ability to escape to the platform at slower rate. Thus, the learning was slower in the OA(S) group.

Statistical analysis for differences in the platform reaching latency showed no significant difference between groups ( $P > 0,05$ ) in visible platform trials and significant difference between OA(S) and Contr(S) ( $P = 0,508$ ), also between Contr(S) and Contr(M) ( $P = 0,710$ ) groups in visible platform trials. In hidden platform trials differences in the platform reaching latency significant between OA(S) and Contr(S) groups ( $P = 0,014$ ), also between OA(S) and OA(M) groups ( $P = 0,007$ ), but no significant difference between Contr(S) and OA(M) groups ( $P = 0,998$ ). This fact certifies for obvious deficit of the place learning



performace strategy in rats of OA(S) group and chronic administration of memantine may prevent this deficit.

On the first competition trial, a greater number of rats used a place strategy. There was no difference in strategy between groups ( $P>0,05$ ). On the both trials there was significant difference between Contr(S) and OA(S) groups ( $t_{d=1,96}$ ;  $P<0,05$ ) and no significant difference between OA(S) and OA(M) groups ( $t_{d=1,14}$ ;  $P>0,1$ ).

The rats of OA(S) group, in contrast of Contr(S) rat group, in the test trials, following unsuccessful strategy (place learning) usage, readily switch to other strategy and successfully perform the test trials, using single visual cues. Considering this finding it could be suggested that the memory trace, which builds up during the task learning, is more durable in the animals of other groups against the OA treated ones. The rats of Contr(S) and OA(M) groups, had significantly more accurate searches on hidden platform days, providing an additional evidence of their effective use of a place learning strategy rather than the rats of OA(S) group exhibiting a cue or cue/place strategy in competition trials.

Thus, intracerebroventricular administration of okadaic acid caused deficit in spatial learning. OA-induced spatial learning impairment may be attributed to the neuropathological changes in the hippocampus and MS. The administration of memantine effectively attenuated OA induced deficit and prevented neuropathological changes in the hippocampus and MS. There is correlation between memory impairment and the extend of neuropathological changes in the hippocampus and MS induced by OA treatment

### **Conclusions:**

1. ICV or hippocampal bilateral microinjection of OA decreased the number of pyramidal neurons in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus which is most pronounced in CA1 region;
2. the hippocampal cell loss is lower in the ICV OA injected rats then in hippocampal injected ones;
3. ICV microinjection of OA decreased the number of AChE sensitive neurons in different regions of the hippocampus and decreased the number of ChAT and GABAergic parvalbumin sensitive neurons in medial septal nucleus;

4. microinjection of OA into the hippocampus induced impairment in recognition memory; in contrast ICV microinjection of OA did not affect recognition memory;
5. there is correlation between recognition memory impairment and the extend of hippocampal cell loss induced by OA treatment. OA-induced recognition memory impairment may be attributed, at least in part, to the hippocampal cell death caused by the drug;
6. OA treatment (hipocampal or ICV injection) did not affect learning process and short-term spatial memory but induced impairment in spatial long-term memory assessed in the water maze;
7. ICV OA injected rats acquired the visible platform version of the water maze task but failed to learn the platform location in space indicating hippocampal-dependent spatial memory impairment and selective neurotoxicity of OA
8. ICV injection of OA may impair the hippocampus-dependent spatial memory through damaging the septohippocampal cholinergic and GABAergic projections; septohippocampal dysfunction may be at least part of the underlying mechanisms.
9. ICV microinjection of OA induced impairment of spatial alternation behavior. This impairment reflect a disruption of either short-term memory or non-mnemonic process such as attention and may be due to a cholinergic dysfunction of the hippocampus;
10. chronic administration of memantine significantly attenuated OA (ICV) induced spatial memory impairment and the OA-induced neuropathological changes in the hippocampus and in the medial septal nucleus;
11. the preventive effect of memantine revealed the involvement of NMDA receptors in OA (ICV) induced toxicity.

In conclusion, bilateral ICV and hippocampal injection of OA induced spatial memory deficit and caused hippocampal cell loss in this model and demonstrated, for the first time to our knowledge, decreased the number of cholinergic and GABAergic medial septal neurons. These changes have been observed in patients with Alzheimer's disease, and therefore reinforce the importance of this model for the investigation targets of new therapeutic strategies. It may also lead to new strategies in

development effective therapeutics for disease intervention, also as well as to a better understanding of the fundamental neurobiology of memory.

**The list of papers published by the author on the theme of dissertation:**

**Articles:**

1. Naneishvili T., **Chighladze M.**, Dashniani M., Burjanadze M., Chkhikvishvili N., Beselia G., Kruashvili L., Pochkhidze N., „Recognition Memory Impairment and Neuronal Degeneration Induced by Intracerebroventricular or Intrahippocampal Administration of Okadaic Acid“, Bulletin of the Georgian national Academy of Science, 2015, vol.9, no.3, (155-161) ;
2. **Chighladze M.**, Dashniani M., Beselia G., Kruashvili L., Naneishvili T. „Spatial Memory Impairment and Hippocampal Cell Loss Induced by Okadaic Acid“ Georg. Med. News. 2016, no 1 (250) 83-87;
3. Dashniani M., **Chighladze M.**, Burjanadze M., Beselia G., Kruashvili L., “Memantine Attenuates The Okadaic Acid Induced Short-Term Spatial memory Impairment And Hippocampal Cell Loss in Rats” Georg. Med. News. 2016, no 3 (252) 59-63;

**Abstracts:**

1. 2015- **Chighladze M.**, Actual problems of biology and medicine „Recognition Memory Impairment and Neuronal Degeneration Induced by Intracerebroventricular or Intrahippocampal Administration of Okadaic Acid“ Telavi, Georgia.
2. 2016 – **Chighladze M.**, Conference of Young Scientists , „Spatial Memory Impairment and Hippocampal Cell Loss Induced by Okadaic Acid “ Bakuriani, Georgia.
3. 2015-2016 – 3 Colloquium.