



საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის
სახელობის ქართული უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

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

საგანმანათლებლო პროგრამა– მეხსიერების ნერვული მექანიზმები

სოფიო მატარაძე

**სეპტოკვიპოკამპური პროექციების მნიშვნელობა ჰიპოკამპის
გლუტამატერგულ ტრანსმისიასა და მეხსიერების პროცესებში**

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) მესსიერების ნერვული მექანიზმების მიმართულეზაზე.

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: თემურ ნანეიშვილი

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
აკადემიკოსი

ოფიციალური ოპონენტები: 1. მზია ჟვანია

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი

2. თამარ დომიანიძე

ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი

დისერტაციის დაცვა შედგება 2017 წლის „6___“ _თებერვალი_ ___14___ 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, _ილია ვეკუას სახ___ აუდიტორია.

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

სადისერტაციო მაცნე დაიგზავნა 2017 წლის „6___“ ___იანვარი_

სადისერტაციო საბჭოს მდივანი,

ტექნიკურ მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი

თემურ კვიციანიძე

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა

ალცჰეიმერის დაავადება არის ნეიროდეგენერატიული დაავადება, რომლის დროს მეხსიერების დარღვევები და დემენციის სიმპტომები რამდენიმე წლის განმავლობაში თანდათანობით ღრმავდება. დაავადების განვითარების გვიან სტადიაზე პაციენტები კარგავენ საუბრის, გარემოსთან ურთიერთობის უნარს. თანამედროვე სამკურნალო საშუალებები ვერ უზრუნველყოფენ დაავადების პროგრესირების შეჩერებას, თუმცა, მათ შეუძლიათ სიმპტომების განვითარების შენელება და ცხოვრების ხარისხის გაუმჯობესება. დღეისთვის, მთელი მსოფლიოს ძალისხმევა მიმართულია დაავადების განვითარების პრევენციის ან მისი შემდგომი პროგრესირების შეფერხების უფრო ეფექტური სამკურნალო საშუალებების გამოსავლენად.

MS-ის დაზიანების შედეგად დასწავლის დეფიციტის მქონე ცხოველებს მიიჩნევენ ალცჰეიმერის დაავადების ცხოველურ მოდელად და შესაბამისად, მათი გამოყენება შესაძლებელია ალცჰეიმერის დაავადების პათოგენეზში ჩართული ნეიროტრანსმიტერული სისტემების გამოვლენისა და ალცჰეიმერის დაავადების დროს, კოგნიტიური ფუნქციების გაუმჯობესების მიზნით, მედიკამენტების იდენტიფიცირებისთვის. მულტიდისციპლინურმა კვლევებმა, ქცევით და მოლეკულურ დონეზე, შეუძლია ბიძგი მისცეს ახლებურ ხედვას ჰიპოკამპში სეპტალური შესავლის ფუნქციის შესახებ, რაც საშუალებას მოგვცემს დავადებით კაუზალური კავშირები სეპტოჰიპოკამპური პროექციების აქტიურობას, ჰიპოკამპის ქსელებსა და მეხსიერებისა და დასწავლის პროცესებს შორის.

კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა მედიალური სეპტუმის ქოლინერგული და GABA-ერგული პროექციების მნიშვნელობის შესწავლა მეხსიერებისა და დასწავლის პროცესებში. სეპტოჰიპოკამპური ქოლინერგული და GABA-ერგული პროექციების მამოძღვრებელი როლი ჰიპოკამპში გლუტამატერგულ ტრანსმისიასა და მეხსიერების პროცესებში შესწავლებოდა მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური და იმუნოტოქსინებით ქოლინერგული და/ან GABA-ერგული ნეირონების სელექტიური დაზიანების ეფექტების შედარების საფუძველზე.

ამოცანები:

- სივრცითი მეხსიერების და დასწავლის პროცესის შესწავლა კვებით მოტივაციაზე დაფუძნებული ორმაგი გადაწყვეტის ჯვრისმაგვარი ლაბირინთის პირობებში მედიალური სეპტუმის (ელექტროლიზური ან იმუნოტოქსინებით) დაზიანების მქონე და ცრუოპერირებულ ვირთაგვებში.
- სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების შესწავლა სივრცითი მორიგეობის ამოცანაში მედიალური სეპტუმის (ელექტროლიზური ან იმუნოტოქსინებით) დაზიანების მქონე და ცრუოპერირებულ ვირთაგვებში.
- ჰიპოკამპში ქცევითად და ქიმიურად სტიმულირებული უჯრედგარეთა გლუტამატის გამოთავისუფლების შეფასება *in vivo* გამდინარე მიკროდიალიზის მეთოდით მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური დაზიანების მქონე და ცრუოპერირებულ ვირთაგვებში.
- სივრცითი ხანგრძლივი მეხსიერების და დასწავლის პროცესის შესწავლა მორისის წყლის აუზის პირობებში იმუნოტოქსინებით მედიალური სეპტუმის დაზიანების მქონე და ცრუოპერირებულ ვირთაგვებში.
- იმუნოციტოქიმიური მეთოდით ჰიპოკამპში გლუტამატერგული NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორების ექსპრესიის განსაზღვრა იმუნოტოქსინებით მედიალური სეპტუმის დაზიანების მქონე და ცრუოპერირებულ ვირთაგვებში.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და პრაქტიკული მნიშვნელობა

მიღებული შედეგებით პირველად არის გამოვლენილი ჰიპოკამპში KCl-ით სტიმულირებული გლუტამატის გამოთავისუფლების შემცირება მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური დაზიანების პირობებში; ამ ცხოველებში სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების დეფიციტი შესაძლებელია უკავშირდებოდეს ჰიპოკამპში გლუტამატის გამოთავისუფლების შემცირებას.

პირველად არის გამოვლენილი ჰიპოკამპში გლუტამატერგული NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორების ექსპრესიის შემცირება მედიალური სეპტუმის GABA-ერგული, და არა ქოლინერგული ნეირონების იმუნოოტოქსინით დაზიანების პირობებში.

გამოვლენილია კორელაცია ჰიპოკამპდამოკიდებული სივრცითი მეხსიერების დეფიციტსა და ჰიპოკამპში გლუტამატერგული NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორების ექსპრესიის შემცირებას შორის. მედიალური სეპტუმის დაზიანებით გამოწვეული სივრცითი მეხსიერების დეფიციტი შესაძლებელია, ნაწილობრივ მაინც, უკავშირდებოდეს სეპტოჰიპოკამპური GABA-ერგული პროექციების დაზიანების შედეგად გლუტამატერგული NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორების ექსპრესიის შემცირებას.

გამოვლენილია სეპტოჰიპოკამპური პროექციების ორ მთავარ კომპონენტს (ქოლინერგული და GABA-ერგული) შორის ფუნქციონალური დისოციაცია ჰიპოკამპში გლუტამატერგული ტრანსმისიისა და ჰიპოკამდამოკიდებული სივრცითი მეხსიერების მოდულაციის პროცესებში.

აღნიშნული პრობლემის ქცევით და მოლეკულურ დონეზე კვლევა შესაძლებელია წარმატებული იყოს სეპტოჰიპოკამპურ სისტემის აქტიურობას, ჰიპოკამპის ნერვული ქსელების ფუნქციასა და მეხსიერებისა და დასწავლის პროცესებს შორის მიზეზშედეგობრივი კავშირების უკეთ შეცნობისათვის, ასევე, შესაძლებელია განამტკიცოს ამ მოდელის გამოყენების მიზანშეწონილობა ახალი სამკურნალო სტრატეგიების განსაზღვრისა და ანტიდემენციური წამლების პრეკლინიკური ტესტირებისთვის.

პუბლიკაციები

დისერტაციის მასალებზე გამოქვეყნებულია 3 ნაშრომი (იხ. გვ. 10) ასევე ნაშრომში მოყვანილი ძირითადი შედეგები მოხსენებულ იქნა 5 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 144 გვერდს, და მოიცავს 18 სურათს, სამ ცხრილს და 270 დასახელების ციტირებული ლიტერატურის სიას.

ნაშრომის ძირითადი შინაარსი

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა

აღნიშნულ თავში მოცემულია: სეპტოჰიპოკამპური სისტემის ანატომიური ორგანიზაცია, ცნობები გლუტამატისა და გლუტამატერგული რეცეპტორების შესახებ, ჰიპოკამპის ფიზიოლოგიისა და მეხსიერებისა და სინაპსური პლასტიკურობის მექანიზმების შესახებ და ალცჰეიმერის დაავადების თანმდევი ქცევითი და კოგნიტიური ფუნქციების დარღვევების შესახებ.

თავი II. ექსპერიმენტის მეთოდოლოგია

აღნიშნულ თავში აღწერილია ექსპერიმენტებში გამოყენებული ნეიროქირურგიული ოპერაციები, ჰისტოქიმიური და იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდები, რომლებიც გამოიყენებოდა დაზიანების ეფექტურობის შესაფასებლად. ექსპერიმენტების სხვადასხვა სერიაში ქცევითი ამოცანებით ტესტირების პირობები და პროცედურა კონკრეტული ამოცანის შესაბამისად იცვლებოდა. ცალკეულ ექსპერიმენტთან დაკავშირებული მასალა და ქცევითი ექსპერიმენტების მეთოდოლოგია აღწერილია შესაბამის ქვეთავებში. გლუტამატის გამოთავისუფლების შეფასებისთვის გამოყენებული *in vivo* მიკროდიალიზის მეთოდი, ასევე რეცეპტორთა ექსპრესიის შეფასებისთვის ვესტერნ ბლოტის მეთოდი ასევე, აღწერილია შესაბამის ქვეთავებში.

თავი 3. მიღებული შედეგები

3.1. იმუნოტოქსინებით MS-ის ქოლინერგული და GABA-ერგული ნეირონების და ელექტროლიზური დაზიანების ეფექტების ჰისტოლოგიური და იმუნოჰისტოლოგიური შეფასება

წარმოდგენილ ნაშრომის ექსპერიმენტების ყველა სერიაში მედიალური სეპტუმის დაზიანება ტარდებოდა ქვევითი ამოცანებით ტესტირებამდე. ქვევითი ექსპერიმენტების დასრულების შემდეგ, მედიალური სეპტუმის დაზიანების ეფექტები ფასდებოდა ჰისტოლოგიური და იმუნოჰისტოლოგიური მეთოდებით. ექსპერიმენტების სხვადასხვა სერიაში გამოიყენებოდა სამი ტიპის დაზიანება. ელექტროლიზური დაზიანება, რომელიც მედიალური სეპტუმის ნეირონების დაზიანების თანადროულად აზიანებს დაზიანების უბანში გამავალ ნერვულ ბოჭკოებს და მედიალურ სეპტუმის ქოლინერგული ან GABA-ერგული ნეირონების იმუნოტოქსინებით (192 IgG saporin, GAT1-SAP) სელექტიური დაზიანება.

წარმოდგენილ ნაშრომში ჰისტოლოგიური და იმუნოჰისტოლოგიური კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ქვევითი ექსპერიმენტების დასრულების შემდეგ საკონტროლო და ექსპერიმენტული ცხოველების MS-ის ელექტროლიზური დაზიანების ლოკალიზაციისა და ფართობის განსაზღვრა, ასევე იმუნოტოქსინების (GAT1-SAP და 192 IgG saporin) მიკროინექციის შედეგად ქოლინ აცეტილტრანსფერაზა (ChAT) - მგრძნობიარე და GABA-ერგული პარვალბუმინ (PV) მგრძნობიარე ნეირონების შეღებვის ინტენსიობის ცვლილებების შეფასება MS-ში. MS-ის ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების ხარისხი, ასევე ფასდებოდა ჰიპოკამპის ანათლეზე აცეტილქოლინესტერაზა მგრძნობიარე (Acetylcholinesterase - AChE) უჯრედების შემცირებით (ჰიპოკამპის AChE გამოიყენება MS-ის ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების მოცულობის შეფასებისათვის).

ჰისტოლოგიურ ექსპერიმენტებში მონაწილე ჯგუფებს ქმნიდნენ ცხოველები, რომელთაც ჩაუტარდათ შემდეგი პროცედურები: MS-ის ელექტროლიზური დაზიანება, MS-ის ქოლინერგული ნეირონების დაზიანება 192 IgG-saporin-ის მიკროინექციით და MS-ის GABA-ერგული ნეირონების დაზიანება GAT1-SAP-ით, ასევე MS-ში mouse saporin-ის მიკროინექცია (საკონტროლო ჯგუფი).

ელექტროლიზური დაზიანება ხორციელდებოდა სტერეოტაქსული მეთოდით ჩანერგილი კონსტანტანის ელექტროდებით მუდმივი დენის (1 მა., 30 წმ) გატარების საშუალებით. ცრუპერიზებულ ცხოველებს უტარდებოდათ იდენტური პროცედურა ელექტროდებში დენის გატარების გარეშე. MS-ის ქოლინერგული და GABA-ერგული ნეირონების სელექტიური იმუნოდაზიანებისთვის გამოიყენებოდა იმუნოტოქსინების - GAT1-SAP და 192 IgG-saporin-ის (Advanced Targetting System, San Diego, USA), ხოლო იმუნოდაზიანების საკონტროლო ჯგუფისათვის mouse saporin-ის (არ იწვევს ნეირონების დაღუპვას) მიკროინექცია. MS-ში იმუნოტოქსინების მიკროინექციები ხორციელდებოდა სტერეოტაქსული მეთოდის გამოყენებით. GAT1-SAP-ის (325ng/μl) ინექცია ტარდებოდა 15 გრადუსიანი დახრის კუთხით, შემდეგი კოორდინატებით: AP - 0.4; ML - 1.7; DV - 6.4 (0.5 μl; 0.05 μl/min). 192 IgG-saporin-ის (1 μg/μl) ინექცია ხორციელდებოდა ბილატერალურად ორ დონეზე: AP - 0.45; ML - 0.25; DV - 7.8 (0.3 μl; 0.05 μl/min) და DV - 6.2 (0.2 μl; 0.05 μl/min). მიკროინექციის შემდეგ, იმუნოტოქსინის დიფუზიის მიზნით, თითოეულ დონეზე საინექციო ნემსი ყოვნდებოდა 9 და 6 წუთით, შესაბამისად. მიკროინექციისთვის გამოიყენებოდა 1მკლ-იანი ჰამილტონის შპრიცი და მიკროსაინექციო ტუმბო (CMA 402 Syringe Pump, Sweden).

ელექტროლიზური დაზიანების შემთხვევაში თავის ტვინის შესასწავლი სტრუქტურების ციტოარქიტექტონიკური საზღვრების იდენტიფიკაციისათვის, გამოიყენებოდა ნისლის მეთოდი, რისთვისაც ანათლები კრეზილ-ვიოლეტით, სტანდარტული მეთოდიკის მიხედვით იღებოდა. საკონტროლო და იმუნოტოქსინებით დაზიანების მქონე თითოეული ჯგუფიდან შემთხვევითი შერჩევით ხდებოდა ნიმუშების აღება იმუნოშეღებისათვის. ფიქსირებული ანათალი იღებოდა AChE-ის, ChAT და PV-ის პირველადი ანტისხეულებით, სპეციფიკური, კურდღლის მეორადი ანტისხეულებით (Rabbit specific secondary antibody/HRP) და ABC შეღებვის სისტემით. შეღებილი პრეპარატების შესწავლა ხდებოდა ფლოუორესცენტული ოპტიკური მიკროსკოპით - Leica MM AF.

იმუნოჰისტოქიმიურმა კვლევამ აჩვენა, რომ MS-ში 192 IgG saporin-ის მიკროინექცია სარწმუნოდ ამცირებს ქოლინერგული ChAT-მგრძნობიარე ნეირონების შეღებვის ინტენსიობას კონტროლთან შედარებით ($P < 0.001$), მაშინ როცა MS-ის GABA-ერგული PV-მგრძნობიარე ნეირონების შემცირება კონტროლთან შედარებით არასარწმუნოა ($P > 0,05$). MS-ში GAT1-SAP-ის

მიკროინექცია იწვევს MS-ის GABA-ერგული PV-მგრძობიარე ნეირონების სარწმუნო შემცირებას ($P < 0.001$), ხოლო ქოლინერგული ChAT-მგრძობიარე ნეირონების რაოდენობა კონტროლთან შედარებით მცირდება 26%-ით ($P < 0.05$).

იმუნოჰისტოქიმიურ კვლევებში MS-ის იმუნოტოქსინებით დაზიანება, ასევე ფასდებოდა ჰიპოკამპის CA1 და CA3 ველებში AChE-მგრძობიარე ნეირონების შეღებვის ინტენსიობის შეფასებით. მიღებული შედეგებით გამოვლინდა, რომ MS-ში 192 IgG-saporin-ის ინექცია იწვევს გაცილებით მეტი AChE-მგრძობიარე ნეირონების შემცირებას ჰიპოკამპში საკონტროლო ჯგუფის (CA1 - $P < 0.01$, CA3 - $P < 0.01$) და MS-ში GAT1-SAP-ის ინექციის მქონე ცხოველებთან შედარებით (CA1 - $P < 0.01$, CA3 - $P < 0.01$).

3.2. მედიალური სეპტუმის დაზიანების ეფექტები დასწავლის სტრატეგიის არჩევაზე ჯვრისმაგვარ ლაბორინტში

წარმოდგენილ ნაშრომში მედიალური სეპტუმის (MS) ელექტროლიზური ($n = 8$), ასევე ქოლინერგული ან GABA-ერგული ნეირონების იმუნოტოქსინებით - GAT1-SAP ($n = 8$) ან 192 IgG saporin ($n = 8$) სელექტიური დაზიანების მქონე და საკონტროლო ($n = 8$) ჯგუფის ცხოველებში, შეისწავლებოდა სეპტოჰიპოკამპური პროექციების მნიშვნელობა ადგილის ან პასუხის დასწავლის სტრატეგიის არჩევაზე კვებით მოტივაციაზე დაფუძნებულ, ორმაგი გადაწყვეტის ჯვრისმაგვარ ლაბორინტში. ამ ამოცანაში ცხოველს საკვების მიღება შეეძლო მუდმივად ერთიდაიგივე მკლავში მოთავსებული საკვებურიდან. ტრენინგების დროს ასევე არ იცვლებოდა სასტარტო მკლავი. ამ პროცედურის გამოყენებით ცხოველს შეეძლო დაესწავლა საკვებურის ადგილმდებარეობა გარემოში არსებული ორიენტირების გამოყენების (ადგილის დასწავლა) ან მოძრაობათა თანმიმდევრობის დასწავლის (პასუხის დასწავლა) საფუძველზე. გამოყენებული სტრატეგია ფასდებოდა სატესტო სინჯებში, რომლებშიც სასტარტო ადგილი იცვლებოდა მოპირდაპირე მკლავით.

ქვევით ექსპერიმენტებში გამოვლინდა, რომ საექსპერიმენტო ცხოველები სწრაფად სწავლობდნენ სამიზნე მკლავში შესვლას. თუ პირველი 10 სინჯის განმავლობაში სწორი პასუხების რაოდენობა შეადგენდა 50%-ს, მომდევნო 10 სინჯში სწორი პასუხების რაოდენობა 87-92%-ს, ხოლო შემდგომ სინჯებში სტაბილურად 95%-ის შეადგენდა. ამ ამოცანის დასწავლის კრიტერიუმს წარმოადგენდა 10 მომდევნო სინჯიდან 9 სწორი პასუხის განხორციელება. კრიტერიუმამდე დასწავლისათვის საჭირო სინჯების რაოდენობა საშუალოდ შეადგენდა 20.8 ± 1.15 . MS-ის დაზიანების მქონე და საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებს შორის არ განსხვავდება. საკონტროლო ჯგუფის ცხოველები დასწავლის კრიტერიუმს აღწევენ საშუალოდ 20 სინჯში, MS-ის ელექტროლიზური დაზიანების მქონე ცხოველები საშუალოდ - 20,9 სინჯში, MS-ის იმუნოტოქსინებით ქოლინერგული და GABA-ერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ცხოველები საშუალოდ 19,6 და 22,5 სინჯში შესაბამისად. ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა ($DF_{(3,35)} = 0.209$, $P = 0.889$). ეს შედეგები მიანიშნებს, რომ ამ ჯგუფის ცხოველებში მოტივაცია, პერცეპციული და მოტორული უნარები, რასაც შეიძლება გავლენა მოეხდინა ამოცანის შესრულებაზე, არ განსხვავდება. ჩვენს მიერ ჩატარებულ ქვევით ექსპერიმენტში ცხოველს საკვების მოძიება შეეძლო ორი განსხვავებული სტრატეგიით - ადგილის ან პასუხის დასწავლის სტრატეგიით. ადგილის დასწავლა მოითხოვს ჰიპოკამპის ჩართულობას, ხოლო პასუხის დასწავლაში სტრიატუმი მონაწილეობს. ჩვენს ექსპერიმენტში გამოვლინდა, რომ სატესტო სინჯებში საკონტროლო და 192 IgG საპორინით დაზიანების მქონე ცხოველები ჯვრისმაგვარ ლაბორინტში ეფექტურად იყენებენ ადგილის დასწავლის სტრატეგიას. მეორეს მხრივ, MS-ის ელექტროლიზური და GAT1-SAP-ით დაზიანების მქონე ცხოველები სატესტო სინჯებში უპირატესად პასუხის დასწავლის სტრატეგიას იყენებენ. კერძოდ საკონტროლო ჯგუფის ცხოველები 50 სინჯიდან 34 (68%) სინჯში, ხოლო 192 IgG saporin-ით დაზიანების მქონე ცხოველები 40 სინჯიდან 26 (65%) სინჯში იყენებენ ადგილის დასწავლის სტრატეგიას, მაშინ როდესაც MS-ის ელექტროლიზური დაზიანების მქონე ცხოველები 40 სინჯიდან მხოლოდ 16 (32%) სინჯში იყენებენ ამ სტრატეგიას. GAT1-SAP საპორინით დაზიანების მქონე ცხოველები 40 სინჯიდან 25 (62.5%) სინჯში იყენებენ პასუხის დასწავლის სტრატეგიას (სურ. 8). საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებთან შედარებით ადგილის დასწავლის სტრატეგიის გამოყენება სარწმუნოდ შემცირებულია MS-ის ელექტროლიზური და GAT1-SAP-ით დაზიანების მქონე ცხოველებში ($t_{(3)} = 3,8$, $P < 0.001$; $t_{(3)} = 1,99$, $P < 0.02$, შესაბამისად).

აღსანიშნავია, რომ ცხოველები, რომლებიც სატესტო სინჯებში უპირატესად პასუხის დასწავლის სტრატეგიას იყენებენ, დასწავლის კრიტერიუმს გაცილებით გვიან აღწევენ ვიდრე ის ცხოველები, რომლებიც ადგილის დასწავლის სტრატეგიას იყენებენ მიუხედავად MS-ზე სხვადასხვა ტიპის ზემოქმედებისა.

3.3. მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური და იმუნოტოქსინებით დაზიანების ეფექტები სივრცით ხანმოკლე მეხსიერებაზე.

წარმოდგენილ ექსპერიმენტებში შეისწავლებოდა სეპტოჰიპოკამპური პროექციების მნიშვნელობა სივრცითი მუშა მეხსიერების პროცესებში. ექსპერიმენტები ჩატარებულია ზრდასრულ 34 მამრ ვირთაგვაზე, რომლებიც დაყოფილი იყვნენ 4 ჯგუფად: საკონტროლო (Contr. n=8); MS-ის ელექტროლიზური (EL, n=8), ასევე იმუნოტოქსინებით - 192 IgG saporin-ით (SAP, n=8) და GAT1-SAP-ით (GAT, n=10) დაზიანების მქონე. ჰიპოკამპოდამოკიდებული სივრცითი მუშა მეხსიერების შესაფასებლად გამოიყენებოდა სპონტანური მორიგეობის ამოცანა. ეს ამოცანა ეფუძნება სპონტანურად აღმოცენებულ კვლევით ქცევას. მიიჩნევა, რომ ამ ამოცანაში ცხოველი წარმატებით განახორციელებს ლაბირინთის მკლავებში სპონტანური მორიგეობას თუ მას ახსოვს წინა ვიზიტის ადგილი. ჩვენს ექსპერიმენტებში ამ ტესტის გამოყენება განაპირობა რამდენიმე ფაქტორებმა. იგი არ საჭიროებს დაჯილდოებას, რაც გამორიცხავს ჯგუფებს შორის მოტივაციის დონის განსხვავებით გამოწვეულ სირთულეებს მონაცემთა ინტერპრეტაციის დროს. გარდა ამისა, ამოცანა ნაკლებად სტრესულია, და შესაბამისად ტესტირების დროს სტრესზე პასუხი ნაკლებად ინტერფერირებს იმ ინტერპრეტაციაზე, რომელიც მეხსიერებისა და დასწავლის შესაძლო განსხვავებებს ეხება.

სპონტანური მორიგეობის ტესტის შესრულებისას აღირიცხებოდა მკლავებში შესვლათა რაოდენობა და თანმიმდევრობა მორიგეობის დონის განსაზღვრისათვის. სტატისტიკური დამუშავებით (One-Way ANOVA) გამოვლინდა ჯგუფის სარწმუნო ეფექტი ($F_{3,31}=6,783$, $P = 0.001$). Post hoc (Tukey Test) ანალიზით არასარწმუნო განსხვავება გამოვლინდა საკონტროლო და ელექტროლიზური დაზიანების მქონე ($P = 0.381$), ასევე საკონტროლო და შესაბამისად, GAT ($P = 0.759$) ან SAP ($P = 0.072$) ჯგუფებს შორის. სარწმუნო განსხვავება გამოვლინდა ელექტროლიზური და ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ($P = 0.001$) და GABA-ერგული და ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ჯგუფებს შორის ($P = 0.007$).

სხვადასხვა ჯგუფებში სპონტანური მორიგეობის პროცენტული მაჩვენებლების სტატისტიკური დამუშავებით (One-way ANOVA) გამოვლინდა ჯგუფის სარწმუნო ეფექტი ($F_{3,31}=5,332$, $P = 0.005$). Post hoc (Tukey Test) ანალიზით გამოვლინდა სარწმუნო განსხვავება საკონტროლო და ელექტროლიზური დაზიანების მქონე ($P = 0.006$) ვირთაგვებს შორის, ხოლო საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებსა და GAT ($P = 0.968$), ან SAP ($P = 0.834$) ჯგუფის ვირთაგვებს შორის განსხვავება არასარწმუნოა.

ამრიგად, მიღებული შედეგების თანახმად, MS-ის ელექტროლიზური დაზიანება იწვევს სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების დეფიციტს; სეპტოჰიპოკამპური ქოლინერგული ან GABA-ერგული ნეირონების სელექტიური დაზიანების პირობებში სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების დეფიციტი არ ვლინდება.

3.4. მედიალური სეპტუმის დაზიანების ეფექტები სივრცით ხანმოკლე მეხსიერებასა და ჰიპოკამპში სტიმულირებული გლუტამატისა და GABA-ს გამოთავისუფლებაზე

წარმოდგენილ კვლევაში საკონტროლო და MS-ის ელექტროლიზური დაზიანების მქონე ვირთაგვებში სპონტანური მორიგეობის ამოცანით ფასდებოდა სივრცითი მუშა მეხსიერება და ჰიპოკამპში გლუტამატისა და GABA-ს დონის ცვლილებები ამ ტესტის შესრულებისას. ასევე შეისწავლებოდა MS-ის დაზიანების ეფექტები ჰიპოკამპში KCl-ით სტიმულირებული გლუტამატისა და GABA-ს გამოთავისუფლებაზე.

მიკროდიალიზის მიმმართველი კანულის (CMA/11; CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden) ჩანერგვა ხდებოდა სტერეოტაქსული აპარატით მარცხენა ჰიპოკამპში შემდეგი კოორდინატებით: AP -(- 4.8), ML - 4.5, და DV - 3.2 Paxinos and Watson-ის (Paxinos, Watson, 1998) სტერეოტაქსული ატლასის შესაბამისად. ლაბირინთში ტესტირებამდე, მიკროდიალიზის ზონდი თავსდებოდა ჰიპოკამპში ჩანერგილ კანულაში და ცხოველი თავსდებოდა კამერაში (45სმ, 35 სმ, 35 სმ). ზონდი

დაკავშირებული იყო, პლასტიკური მილით ერთ მილილიტრიან შპრიცთან, რომელიც ჩამაგრებული იყო მიკროსაინექციო ტუმბოში. ხელოვნური ცერებროსპინალური სითხის პერფუზია მიმდინარეობდა 2.0 მკლ/წთ-ში სიჩქარით. ზონდის ჩანერგვიდან 120 წუთის შემდეგ (სტაბილიზაციის პერიოდი) დიალიზის სინჯებს ვიღებდით ყოველ 10 წუთში 40 წუთის განმავლობაში გლუტამატისა და GABA-ს ფონური დონის განსაზღვრისთვის თავისუფლად მოძრავ ცხოველში. ოთხი ფონური სინჯის აღების შემდეგ, ცხოველს ვათავსებდით ლაბორინთის ცენტრში. 20 წუთიანი ტესტირების შემდეგ, ცხოველს ვაბრუნებდით, უკან კამერაში და შემდგომი 40 წუთის განმავლობაში ვაგროვებდით სინჯებს გლუტამატისა და GABA-ს ტესტის შემდგომი დონის განსაზღვრისათვის. ნეირონების დეპოლარიზაციისათვის საპერფუზიო ხსნარის გადართვა ხდებოდა ნორმალური ცერებროსპინალური ხსნარიდან, მაღალი კონცენტრაციის KCl-ის შემცველ ცერებროსპინალურ სითხეზე (25 მმოლ/ლ). გლუტამატისა და GABA-ის შემცველობა განისაზღვრებოდა მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიის მეთოდით.

როგორც მოსალოდნელი იყო ქცევით ექსპერიმენტებში გამოვლინდა, რომ MS-ის ელექტროლიზური დაზიანება იწვევს სპონტანური მორიგეობის მნიშვნელოვან გაუარესებას ცხოველთა რაოდენობა, რომლებიც მონაწილეობდნენ ქცევით ექსპერიმენტებში მიკროდიალიზატის სინჯების აღებით, იყო შემდეგი: საკონტროლო - ($n = 6$); MS-ის დაზიანებით - ($n = 7$). ჯვრისმაგვარ ლაბორინთში სპონტანური მორიგეობის შესრულებისას ორივე ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპის უჯრადგარეთა არედან აღებული დიალიზატის 10 წუთიან სინჯებში აღინიშნა გლუტამატის დონის მატება, თუმცა ფონური მაჩვენებლებისგან სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა ($p > 0.05$). მიუხედავად იმისა, რომ ქცევითი ამოცანით ტესტირებისას გლუტამატის დონის ცვლილებები არ იყო სარწმუნო არც ერთ ჯგუფში, დაზიანების მქონე ჯგუფში გლუტამატის დონის ცვლილებები ნაკლებად იყო გამოხატული საკონტროლო ჯგუფის ცხოველეთან შედარებით.

ქცევითი ტესტირების დროს ჰიპოკამპური GABA-ს დონის ცვლილებები არცერთ ჯგუფში არ გამოვლინდა ($p > 0.05$). ეს მონაცემები არ გამორიცხავს GABA-ერგული ტრანსმისიის ცვლილებების არსებობას სპონტანური მორიგეობის შესრულებისას. შესაძლოა, მიკროდიალიზის სინჯების აღების დროითი და სივრცითი მახასიათებლებით შეუძლებელია GABA-ს სწრაფად წარმავალი ცვლილებების დეტექცია ან შესაძლოა, GABA-ს სხვადასხვა წყარო (სეპტოჰიპოკამპური შესავალი vs. ლოკალური ინტერნეირონები) საწინააღმდეგო მიმართულებით იცვლება, რაც განაპირობებს ეფექტის არ არსებობას.

ტვინიდან მიკროდიალიზით მიღებული გლუტამატის და GABA-ს ნიმუშები ყოველთვის არ იძლევა საშუალებას ვიმსჯელოთ მათ სინაპსურ წარმოშობაზე. ამის გამო, მიკროდიალიზით შეგროვებული გლუტამატის და GABA-ის წარმოქმნის წყარო დღემდე დავის საგანია – ნეირონულია თუ ასტროგლიური, სინაპსურია თუ ექსტრასინაპსური. ფონური მაჩვენებლების აღებისას მიკროდიალიზატში გლუტამატი ძირითადად არასინაპსური წარმოშობისაა. გამოვლენელია ასტროციტული გლუტამატის რამდენიმე წყარო, მათ შორის გლიოტრანსმისიით. თუმცა, ქიმიური, ელექტროლიზური ან ქცევით სტიმულაციის პირობებში მნიშვნელოვანი ნაწილი გამოთავისუფლებული გლუტამატისა შეიძლება იყოს ნეიროტრანსმისიით განპირობებული.

წარმოდგენილ ნაშრომში შევისწავლიდით MS-ის ელექტროლიზური დაზიანების ეფექტებს ჰიპოკამპში ფონურ და KCl-ით სტიმულაციის პირობებში გლუტამატის და GABA-ის გამოთავისუფლებაზე თავისუფლად მოძრავ ცხოველებში. ვინაიდან, ნეიროტრანსმიტერთა გამოთავისუფლების აბსოლუტური პიკი მნიშვნელოვნად ვარიებს ცალკეულ ცხოველთა შორის, რაც მნიშვნელოვნად ართულებს ჯგუფებს შორის მონაცემთა შედარებას, KCl-ით სტიმულაციის პირობებში მიღებულ თითოეულ მონაცემს ვადარებდით ინდივიდუალურ ფონურ მაჩვენებელს. ცხოველები, რომლებშიც KCl-ით სტიმულაციის საპასუხოდ ნეიროტრანსმიტერთა დონე ფონთან შედარებით 25%-ით გაიზარდა, განისაზღვრა როგორც მოპასუხეები, ხოლო ცხოველები, სადაც ზრდა ნაკლები იყო, განისაზღვრა როგორც არამოპასუხეები. ამ კრიტერიუმის მიხედვით, საკონტროლო ჯგუფის ცხოველები იყვნენ მოპასუხეები, ხოლო დაზიანების მქონე ჯგუფიდან მხოლოდ ერთ ცხოველში იქნა გამოვლენილი გლუტამატის დონის ზრდა სტიმულაციის საპასუხოდ. KCl-ით სტიმულაციის საპასუხოდ GABA-ის გამოთავისუფლების მატება არ გამოვლინდა არც ერთ ჯგუფში. ჰისტოლოგიურმა კვლევამ დაადასტურა, რომ მიკროდიალიზის ზონდი ეხებოდა ჰიპოკამპს, შესაბამისად მიღებული შედეგები არ შეიძლება განპირობებული იყოს ტვინში მათი გასხვავებული მდებარეობით.

ამრიგად, KCl-ით სტიმულაციის საპასუხოდ გლუტამატის დონის მომატებით პასუხობს საკონტროლო ჯგუფის ცხოველების უმეტესობა, ხოლო დაზიანების მქონე ჯგუფიდან მხოლოდ 1

ცხოველი. KCL-ით სტიმულაციაზე პასუხის სხვაობა ამ ორ ჯგუფს შორის სტატისტიკურად სარწმუნოა ($p < 0,01$). აღსანიშნავია, რომ გლუტამატის დონის დაბრუნება ფონურ მონაცემებამდე აჩვენებს, რომ KCl-ით სტიმულაციას არ აქვს რაიმე ხანგრძლივი დამაზიანებელი ეფექტი.

3.5. მედიალური სეპტუმის ქოლინერგული და GABA-ერგული ნეირონების იმუნოტოქსინებით სელექტიური დაზიანების ეფექტები სივრცით მეხსიერებასა და ჰიპოკამპში გლუტამატერგული NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორის ექსპრესიაზე

წარმოდგენილ კვლევაში შეისწავლეს შიდა სეპტოჰიპოკამპური ქოლინერგული და GABA პროექციების სელექტიური იმუნოდაზიანების ეფექტები სივრცით მეხსიერებასა და ჰიპოკამპში GluN2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორების ექსპრესიაზე. ექსპერიმენტები ჩატარებულია 36 მამრ ვირთაგვაზე, რომლებიც დაყოფილი იყვნენ 3 ჯგუფად: საკონტროლო - [Control (C), $n=12$], MS-ის ქოლინერგული ნეირონების 192 IgG-saporin-ით დაზიანების მქონე (MS-SAP, $n=12$) და MS-ის GABA-ერგული ნეირონების GAT1-SAP-ით დაზიანების მქონე (MS-GAT, $n=12$). სხვადასხვა ჯგუფის ყველა ცხოველი მონაწილეობდა ქცევით ექსპერიმენტებში, ხოლო ქცევითი ექსპერიმენტების დასრულების შემდეგ ყოველი ჯგუფიდან ცხოველების ნახევარი ($n=6$) გამოიყენებოდა იმუნოჰისტოქიმიურ, ხოლო მეორე ნახევარი ($n=6$) ვესტერნბლოტის მეთოდით რეცეპტორთა ექსპრესიის კვლევაში.

სივრცითი მეხსიერება ფასდებოდა თავდაცვით მოტივაციაზე დაფუძნებული სივრცითი ამოცანით მორისის წყლის აუზის ერთდღიანი პროტოკოლის გამოყენებით. 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. სასტარტო ადგილი იცვლებოდა შემთხვევითი თანმიმდევრობით. ბაქანი მოთავსებული იყო ერთერთ სექტორში წყლის ზედაპირიდან ჩადირული 2 სმ-ით. ამ სინჯების დასრულებიდან 24 სთ-ის შემდეგ - ცხოველს ეძლეოდა სატესტო სინჯი, რომელიც აფასებდა ხანგრძლივ სივრცით მეხსიერებას. ქცევითი ექსპერიმენტების დასრულების და დეკაპიტაციის შემდეგ ხდებოდა ჰიპოკამპის ამოღება და მშრალ ყინულში დაუყონებლივი გაყინვა, შემდგომში იმუნობლოტინგის მეთოდით რეცეპტორთა ექსპრესიის შესაფასებლად.

სხვადასხვა ჯგუფის ცხოველების ბაქნის პოვნის ლატენტური დროის სტატისტიკური ანალიზით (Two Way ANOVA) გამოვლინდა ჯგუფის არასარწმუნო ეფექტი ($F_{2,71}=0.802$, $P = 0.453$), თუმცა გამოვლინდა ბლოკის სარწმუნო ეფექტი ($F_{1,71}=29.739$, $P < 0.001$). ამასთან, სტატისტიკურად სარწმუნო ურთიერთკავშირი ჯგუფისა და ბლოკის ეფექტებს შორის არ გამოვლინდა ($F_{2,71}=1.315$, $P = 0.275$). post hoc ანალიზის საშუალებით ბაქნის პოვნის ლატენტურ დროთა განსხვავება პირველ და მეორე ბლოკს შორის გამოვლინდა, როგორც საკონტროლო ($P < 0.001$), ასევე ქოლინერგული ($P = 0.008$) და GABA-ერგული ($P = 0.027$) ნეირონების დაზიანების მქონე ჯგუფებში. მიღებული შედეგების მიხედვით დასწავლის პროცესის მიმდინარეობა საკონტროლო და დაზიანების მქონე ცხოველებში არ განსხვავდება. სივრცითი ხანგრძლივი მეხსიერების შესაფასებლად ტრენირებიდან 24 საათის შემდეგ ცხოველებს ეძლეოდათ სატესტო სინჯი, რომლის დროს ბაქანი ამოღებული იყო აუზიდან. უხილავი ბაქნის ადგილმდებარეობის სივრცითი ხანგრძლივი მეხსიერება ფასდებოდა ოპოზიციურის მიმართ სატესტო სექტორის უპირატესობით. სატესტო სინჯებში მიღებული შედეგების ჯგუფებს შორის განსხვავება ფასდებოდა ANOVA-ს საშუალებით. გამოვლინდა ჯგუფის არასარწმუნო ეფექტი ($F_{2,71}=0.787$, $P = 0.459$), სექტორის სარწმუნო ეფექტი ($F_{1,71}=46.620$, $P < 0.001$) და ასევე სარწმუნო ურთიერთქმედება ჯგუფისა და სექტორის ფაქტორებს შორის ($F_{2,71}=8.087$, $P < 0.001$).

GABA-ერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ცხოველებში post hoc (Holm-Sidak method) ანალიზით გამოვლინდა, რომ სატესტო და ოპოზიციურ სექტორებში გატარებულ დროთა განსხვავება არ არის სარწმუნო ($P=0.396$), ხოლო საკონტროლო და ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ცხოველებში განსხვავება სარწმუნოა ($P < 0.001$). ეს ფაქტი მიანიშნებს მედიალური სეპტუმის GABA-ერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ცხოველებში სივრცითი ხანგრძლივი მეხსიერების დეფიციტზე.

საკონტროლო და ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ჯგუფის ცხოველები სარწმუნოდ მეტ დროს ატარებდნენ სექტორში, სადაც ტრენირების დროს ბაქანი იყო განთავსებული, ვიდრე ალბათობით (15 s) იყო მოსალოდნელი (Contr -21.36 ± 2.18 , $t=2.907$, $P = 0.014$; SAP -21.782 ± 1.703 , $t=3.982$, $P = 0.002$). ამის საპირისპიროდ GABA-ერგული ნეირონების დაზიანების

მქონე ცხოველები არ ავლენდნენ სატესტო სექტორის მიმართ უპირატესობას და არ ატარებდნენ სატესტო სექტორში უფრო მეტ დროს ვიდრე ალბათობით (15 s) იყო მოსალოდნელი (16.0±1.289, t=0.776, P = 0.454).

როგორც აღვნიშნეთ, ქცევითი ექსპერიმენტების დასრულების შემდეგ სხვადასხვა ჯგუფის ცხოველებში იმუნობლოტინგის მეთოდით შეისწავლებოდა ჰიპოკამპში NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორის ექსპრესია. მონაცემთა სტატისტიკური ანალიზით გამოვლინდა ჯგუფის ეფექტი. post hoc (Tukey's test) ანალიზით საკონტროლო და ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ჯგუფებს შორის განსხვავება ამ მაჩვენებლის მიხედვით არ გამოვლინდა (P > 0.05). თუმცა, სარწმუნო განსხვავება გამოვლინდა საკონტროლო და GABA-ერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ცხოველებს შორის (P < 0.01).

ამრიგად, GABA-ერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ცხოველებში, სივრცითი მეხსიერების დეფიციტის თანადროულად, გამოვლინდა ჰიპოკამპში გლუტამატერგული NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორის ექსპრესიის მნიშვნელოვანი შემცირება.

დასკვნები

1. MS-ის GABA-ერგული ნეირონები მონაწილეობენ სივრცითი გარემოს შესახებ ინფორმაციის დამუშავებაში: MS-ის GABA-ერგული ნეირონების სელექტიური დაზიანება ამცირებს ადგილის დასწავლის სტრატეგიის გამოყენებას ორმაგი გადაწყვეტის ჯვრისმაგვარ ლაბირინთში.
2. MS-ის ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების მქონე ცხოველები ეფექტურად იყენებენ როგორც სივრცის ისე ადგილის დასწავლის სტრატეგიას.
3. სექტოჰიპოკამპური პროექციების ორ მთავარ კომპონენტს (ქოლინერგული და GABA-ერგული) შორის გამოვლინდა ფუნქციათა დისოციაცია ჰიპოკამპდამოკიდებულ სივრცით მეხსიერებაში, რომელიც ფასდებოდა ორმაგი გადაწყვეტის ჯვრისმაგვარ ლაბირინთში.
4. MS-ის ელექტროლიზური დაზიანება იწვევს სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების დეფიციტს; სექტოჰიპოკამპური ქოლინერგული ან GABA-ერგული ნეირონების სელექტიური დაზიანების პირობებში სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების დეფიციტი არ ვლინდება.
5. MS-ის ელექტროლიზური დაზიანება იწვევს KCl-ით სტიმულირებული გლუტამატის გამოთავისუფლების შემცირებას ჰიპოკამპში, რაც შესაძლოა ხელს უწყობს დაზიანების მქონე ცხოველებში სივრცითი მეხსიერების დეფიციტის განვითარებას.
6. იმუნოტოქსინით MS-ის GABA-ერგული ნეირონების დაზიანება იწვევს სივრცითი ხანგრძლივი მეხსიერების დეფიციტს, ხოლო ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების პირობებში მეხსიერების დეფიციტი არ ვლინდება.
7. ჰიპოკამპში გლუტამატერგული NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორების ექსპრესია მცირდება იმუნოტოქსინით MS-ის GABA-ერგული ნეირონების დაზიანებით, ხოლო ქოლინერგული ნეირონების დაზიანების პირობებში ამ რეცეპტორების ექსპრესიის დონე არ იცვლება.
8. იმუნოტოქსინებით MS-ის GABA-ერგული ნეირონების დაზიანებით გამოწვეული გლუტამატერგული NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორების ექსპრესიის შემცირება კორელაციაშია სივრცითი მეხსიერების დეფიციტთან.
9. დაზიანებით გამოწვეული სივრცითი მეხსიერების დეფიციტი შეიძლება განპირობებული იყოს იმუნოტოქსინებით MS-ის GABA-ერგული ნეირონების დაზიანების შედეგად გლუტამატერგული NR2B სუბერთეულის შემცველი NMDA რეცეპტორების ექსპრესიის შემცირებით.

სტატიები:

- **Mataradze S.**, Naneisvili T., Sepashvili M., Mikeladze D., Dashniani M. Effects of medial septal lesion on hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing. Georgian Medical News – in press, 2016
- Temur Naneishvili, **Sopio Mataradze**, Manana Dashniani, Nino Chkhikvishvili, Nino Pochkhidze. Effects of medial septal lesions on learning strategy selection in plus-shaped maze. Bulletin of the Georgian National Academy of Science, vol. 10, no. 3, 111-118, 2016

- Dashniani M., Kruashvili L., Rusadze Kh., **Mataradze S.**, Beselia G. Effects of immunotoxic and electrolytic lesions of medial septal area on spatial short-term memory in rats. Georgian Medical News, no.1, (239) 98-103, 2015

თეზისები:

- **S. Mataradze**, T. Naneishvili, M. Demurishvili, Kh. Rusadze, M. Burjanadze, T. Kherkheulidze. Study of selective and conjoint immunolesions of septohippocampal projections on spatial memory function. 7th International Regional ISBS Neuroscience and Biological Psychiatry Conference „ Stress and Behavior”, Miami Beach, FL, USA, 22-24 June, 2016
- G. Beselia, M. Dashniani, M. Burjanadze, L. Kruashvili, **S. Mataradze**. Effect of chronic memantine treatment on hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing. 7th International Regional ISBS Neuroscience and Biological Psychiatry Conference „ Stress and Behavior”, Miami Beach, FL, USA, 22-24 June, 2016
- ხ. რუსაძე, **ს. მატარაძე**, გ. ბესელია. სებტოჰიპოკამპური პროექციებით სივრცითი ხანმოკლე მეხსიერების და ჰიპოკამპში NMDA რეცეპტორების ექსპრესიის მოდულაცია. საქართველოს მეცნიერებათა აკადემია, ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენცია. თბილისი, 18-19 მაისი, 2015
- **S. Mataradze**, T. Naneishvili, M. Demurishvili, M. Chigladze, Kh. Rusadze. Study of selective immunolesions of medial septal cholinergic and GABA-ergic neurons on hippocampal dependent memory and learning process. 9th FENS forum of neuroscience, Milan, Italy, 5-9 Juli, 2014
- ლ. ყრუაშვილი, **ს. მატარაძე**, გ. ბესელია, მ. სეფაშვილი, მ. დაშნიანი, მ. ბურჯანაძე. მიკროდიალიზის მეთოდით ჰიპოკამპის უჯრედგარე სივრცეში გლუტამატის და გაემ-ის გამოთავისუფლების დონის განსაზღვრა სივრცითი მორიგეობის ამოცანის შესრულებისას ვირთაგვებში. XII სამეცნიერო კონფერენცია - „ფიზიოლოგიისა და ბიომედიცინის აქტუალური პრობლემები”. ქუთაისი, 25-27 სექტემბერი, 2014
- 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

Sopio Mataradze

**Importance of septohippocampal projections in hippocampal
glutamatergic transmission and memory function**

Abstract

of thesis on academic degree of Doctor of 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: **Temur Naneishvili**
Doctor of Biological Sciences,
Academician

Official Opponents:

1. Mzia Zhvania
Doctor of Biological Sciences, Professor
2. Tamar Domianidze
Acad. Doctor of Biological Sciences

Defense of the thesis will be held on “_6_” february 2017 , at 14 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., II Housing, Assembly hall.
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 6 January, 2017 .

The Secretary of the
Acad Doctor of Technical Sciences,
Teimuraz Kiviladze

Short Description of the Work

The Subject Actuality.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease, where memory impairments and dementia symptoms gradually worsen over a number of years. In its late-stages Alzheimer's, individuals lose the ability to carry on a conversation and respond to their environment. The current treatments cannot stop Alzheimer's from progressing, they can temporarily slow the worsening of dementia symptoms. Today, there is a worldwide effort under way to find better ways to treat the disease, delay its onset, and prevent it from developing. The animals with medial septal (MS) lesions and resultant learning impairments were offered as models of AD and can help understand neurotransmitter systems involved in the AD pathology and identify cognition-enhancing drugs that might be useful in AD. However, the role of medial septal neuronal populations in hippocampal network function is still under debate.

The multidisciplinary studies at behavioral and molecular level may provoke a fundamental rethink of the functions of septal inputs to the hippocampus and reveal how septal cholinergic and GABAergic neurons mediate hippocampal functions, therefore presenting an opportunity to establish causal connections between the activities of the septohippocampal projections, hippocampal network function, learning and memory.

Principal Goals and Tasks of the Research

The purpose of research is to obtain information for understanding the role of the medial septal cholinergic and GABAergic projections in memory and learning process. The idea that cholinergic and GABAergic SH projections can modulate memory was tested by comparing effects of electrolytic and selective immunotoxic lesions of cholinergic or GABA-ergic MS neurons on hippocampal glutamatergic transmission and different form of memory and learning process.

The objectives:

- Study of spatial memory and learning process (assessed in the appetitive dual-solution plus-maze task) in electrolytic and immunotoxic MS lesioned and sham-operated rats;
- Study of spatial short term memory (assessed in spatial alternation paradigm) in electrolytic or immunotoxic MS lesioned and sham-operated rats;
- Study of behaviorally and KCl stimulated hippocampal glutamate and GABA release in electrolytic MS lesioned and sham-operated rats.
- Study of long term spatial memory (assessed in Morris water maze) in immunotoxic MS lesioned and sham-operated rats.
- Immunocytochemical determination of expression level of glutamatergic NR2B subunit-containing NMDA- hippocampal receptors in immunotoxic MS lesioned and sham-operated rats.

Scientific Novelty of the Work and Practical Importance of the Work

These findings are the first to show decreased KCl-stimulated hippocampal glutamate release by electrolytic lesion of the MS; decreased glutamate release (upon stimulation) may contribute to short-term spatial memory impairment in these animals.

It is the first time to found that expression of glutamatergic NR2B subunit-containing NMDA receptors in the hippocampus is reduced by immunotoxic lesions of medial septal GABAergic, but not cholinergic neurons; There is correlation between hippocampal dependent spatial memory impairment and the reduction of glutamatergic NR2B subunit-containing NMDA receptors expression in the hippocampus induced by medial septal lesions. Lesion-induced spatial memory impairment may be attributed, at least in part, to the reduction of hippocampal NR2B subunit-containing NMDA receptors expression caused by the lesion of GABAergic medial septal neurons.

There is dissociation between the two major components (cholinergic and GABAergic) of the septohippocampal pathway in modulation of hippocampal glutamatergic transmission and hippocampal dependent spatial memory function.

The combination of behavioral and molecular approaches might be important step for the better understanding of the causal connections between the SH system, hippocampal network function, learning and memory. It may also lead to new strategies in development effective therapeutics for disease

intervention and to reinforce the importance of this model for the preclinical investigation of new antidementic drugs.

Publication. Materials of thesis published 3 papers (see. P. 20), also main result of this work were presented at 5 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 reserch, 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 144 pages, including 18 figures, 3 tables and references from 270 names.

3. Results

3.1. Histological and immunohistological verification of electrolytic and selective immunotoxic lesions of cholinergic and GABA-ergic MS neurons

In the present study in all experiments lesion surgeries took place prior to behavioral testing. The rats were allowed to recover from the surgery for two weeks before starting the behavioral experiments. The interval between lesion surgeries and behavioral testing was enough to allow for the toxin to fully destroy MS neurons. At the end of behavioral testing a random sample of rats from control and MS lesioned groups were killed and their brains collected in order to verify lesion effects. This experiment compares three types of MS lesions: electrolytic lesions that destroy cells and fibers of passage, GAT1-SAP lesions that predominantly affect the septal GABAergic neurons, and immunotoxin – 192 IgG saporin infusions that eliminate cholinergic neurons.

Surgery. For electrolytic lesions a stainless steel electrode (0.15 mm in diameter), insulated except at the tip, was inserted in the; A 1.0 mA anodal current was passed through the electrode twice for 30 s. Sham operations were performed by inserting the electrode at the same coordinates except that the depth was only 0.5 mm and electrolytic lesion was not produced. Injection of GAT1-SAP (0.5 μ l; 0.05 μ l/min) for selective immunolesions of GABAergic neurons or mouse saporin (this product serves as a control for the immunotoxin) for control surgeries (Advanced Targetting System, San Diego, USA) were performed from the side by a 15 degree angle. Injection of 192 IgG-saporin to produce selective lesion of MS cholinergic neurons were performed bilaterally at two depths on each side: (0.3 μ l; 0.05 μ l/min) and (0.2 μ l; 0.05 μ l/min). After injection the needle was left in place for an additional 9 min and 6 min, respectively, to allow the toxin to diffuse from the injection site. All injections were made with a 1- μ l Hamilton syringe with a microinjection pump (CMA 402 Syringe Pump, Sweden).

After termination of the behavioral experiments, in order to examine localization and volume of the electrolytic lesion in the brain, the Nissl-stained slices of the brain were studied under the light microscope. The immunotoxic (GAT1-SAP or 192 IgG-saporin) lesions of MS were verified by observing decreased Acetylcholintransferase (ChAT) and parvalbumine (PV) staining of the MS. The 20 μ thick coronal sections using freezing microtome were stained with ChAT and PV primary antibody and ABC Staining System.. Totally 6-10 sections of MS level within experimental and control animals were selected and were used to assess the effect of MS lesion on ChAT and PV-stained neurons. The immunotoxic (GAT1-SAP or 192 IgG-saporin) lesions of MS were also verified by observing decreased AChE staining of the hippocampus. The sections were analyzed with a microscope Leica MM AF.

Overall, in our experiments electrolytic lesions destroyed on average 75% of the intact MS. Intraseptal GAT1-SAP reduced the number of PV-ir neurons, representing GABAergic septohippocampal neurons by 73%. Counts of ChAT-ir neurons made in the same rats used to assess PV-ir neurons demonstrated a mild reduction following GAT1-SAP. The reduction of cholinergic neurons represented a loss of only 23%. On the contrary intraseptal 192 IgG saporin reduced the number of ChAT-ir neurons and

spared most of PV-ir neurons representing GABAergic septohippocampal neurons. The results showed that after injections of 192 IgG saporin into the MS, animals exhibited significantly less AChE staining in hippocampus as compared to sections obtained from control (CA1 - $t=4.64$, $P=0.01$, $df=4$; CA3 - $t=4.08$, $P=0.01$, $df=4$) animals

3.2. Effects of medial septal lesions on learning strategy selection in plus-shaped maze

In the present study electrolytic and immunotoxic lesions of MS were used to investigate the importance of SH projections in place or response learning strategy selection in plus-shaped maze. In current study rats were trained in the dual-solution plus-maze task. In this task, rats are trained to retrieve food from a consistently baited arm, starting always from the same start box. Using this procedure, they may learn to find food in a particular place in space (place strategy) or to make a particular body turn (response strategy). But the strategy they use can be resolved by submitting them to a probe test from the opposite arm.

A total of 36 male outbred albino rats were used in the present study. The animals were randomly assigned to control ($n = 10$), electrolytic ($n = 10$), selective cholinergic ($n = 8$) or GABA-ergic ($n = 8$) MS-lesioned groups. Selective immunotoxic lesions of cholinergic and GABA-ergic MS neurons was performed by immunotoxins - 192 IgG-saporin and GAT1-SAP, respectively.

The rats learned to approach the correct arm quite rapidly. Accuracy improved from 50% during the first 10 trials to 87-92% in the second 10 trials, and then reached and stayed at $\approx 95\%$ throughout the rest of training. The mean number of trials taken before beginning a run of 9 of 10 correct choices was 20.8 ± 1.15 . As shown no differences in speed of learning were found between control and MS lesioned groups. The control rats reached the criterion of 9/10 correct in means of 20 trials, MS electrolytic lesioned rats in means of 20,9 trials and MS cholinergic and GABAergic immunotoxic lesioned rats in means of 19,6 and 22,5 trials, respectively. There is not a statistically significant difference between groups ($DF_{(3,35)} = 0.209$, $P = 0.889$). The present results of the training trials demonstrate that there were no obvious differences between the groups in perception, motivation, or motor abilities that could differentially influence acquisition of task.

The task used in the current study can be solved by using two different effective strategies, place and response, that have been mapped onto the hippocampus and striatum, respectively. Using a multiple memory systems approach, findings from our experiments showed that control and 192 IgG saporin treated rats trained on an appetitive dual-solution plus-maze task use spatial or place strategies effectively. On the other hand, MS electrolytic and GAT1- SAP treated rats tend to use response strategies. Specifically, an overview of the data from prob trials for each group show that the control rats in 34 (68%) trials out of 50 prob trial and 192 IgG-saporin treated rats in 26 (65%) trials out of 40 prob trial used place strategy, while MS electrolytic lesioned ones used this strategy in 16 (32%) trials only. GAT1-SAP treated rats in 25 (62.5%) trials out of 40 prob trial used response strategy. Decreased place-bias in MS electrolytic lesioned and GAT1-SAP treated rats compared to the control rats was significant ($t_a = 3,8$ $P < 0.001$; $t_a = 1,99$, $P < 0.02$, respectively).

Comparing results observed across immuno- and electrolytic lesion techniques in current study demonstrates a dissociation between the two major components (cholinergic and GABAergic) of the SH pathway in spatial memory assessed in the plus-maze task. The control and 192 IgG-saporin treated rats exhibited their effective use of a place learning strategy rather than the MS electrolytic and GAT1- SAP treated rats exhibiting a response strategy in prob trials. These results suggest that the MS is essential for spatial learning and suggest its role in processing information about the spatial environment, but deficits observed after septal electrolytic lesions cannot be accounted to the loss of MS cholinergic neurons and suggest a role for GABAergic MS neurons in spatial memory.

3.3. Effects of immunotoxic and electrolytic lesions of medial septal area on spatial short-term memory in rats

In the present study electrolytic and immunotoxic lesions of MS were used to investigate the importance of SH projections in spatial working memory. Spatial alternation (SA) is assumed to be a hippocampal-dependent measure of spatial working memory. The underlying assumption is that in order to alternate successfully between locations, the rat must remember its visits to previous places. This task was selected for several reasons. SA testing requires no reward and therefore no food or water motivation,

avoiding potential complications of design based on different motivation levels across groups. Similarly, because the task involves relatively low stress, differences in stress responses to training are less likely to interfere with interpretations regarding the bases for possible differences in learning and memory, in contrast to tasks such as the swim task.

The number of animals in each group was as follows: MS electrolytic ($n = 8$), MS immunotoxic (192 IgG saporin, $n = 8$ and GAT1-SAP, $n = 8$) lesioned. Since there were no significant differences ($P > 0.05$) between sham-operated (4 rats) and vehicle-injected rats (4 rats) these groups were combined into a single one, as of now designated as control ($n = 8$).

The behavioral experiments showed that electrolytic lesion of MS significantly impaired SA performance. Specifically, the percent alternation scores of MS lesioned rats were significantly lower than control rats ($P < 0.05$). However, the groups did not differ in the number of arms entered during the testing session. According to the data obtained it could be suggested that the MS is necessary for normal short-term spatial memory function. However, electrolytic lesions are non-specific. Damage as the result of the MS electrolytic lesions technique compromises cholinergic and noncholinergic neurons, afferents fibers, efferent fibers, and fibers of passage.

Interestingly, the findings showed that 192 IgG saporin treated rats, relative to control rats, had a significantly lower level in the number of arms entered during the testing session. However, the groups did not differ in the level of alternation behavior. These findings indicate that septohippocampal cholinergic projections are not necessary for spatial short-term memory and that deficits observed after septal electrolytic lesions cannot be accounted solely to the loss of hippocampal ACh. The present study demonstrates that GAT1-SAP lesions appeared to largely spare cholinergic projections to the hippocampus and primarily affect the septal GABA neurons. The behavioral testing of GAT1-SAP lesioned rats showed that the percent alternation scores and the number of arms that the rat entered in the maze were not significantly different from control rats. The results of present study indicate that spatial short-term memory is affected only by electrolytic lesions but not 192 IgG saporin or GAT1-SAP lesions. It may be suggested that the effects of electrolytic lesions can be caused by the lesion of the fibers of passage, but it is impossible to exclude, that it is related to the combined lesions of the cholinergic and GABAergic septohippocampal projection neurons.

3.4. Effects of medial septal lesion on spatial short term memory and hippocampal extracellular glutamate and GABA release

The present study investigated spatial working memory assessed in SA task and hippocampal glutamate and GABA release prior to, during, and after SA test in sham-operated and electrolytic MS lesioned rats. Also, we have investigated the effects of MS lesion on KCl-stimulated release of glutamate and GABA in the hippocampus.

Microdialysis guide cannulae (CMA/11; CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden) was lowered into the left hippocampus. Animals were handled daily (5 min/day) for 5 d prior to behavioral testing. Prior to maze testing, the microdialysis probe (CMA/11) was inserted into the hippocampal guide cannula, and the animal was placed into the holding cage located in the testing room. The probe was connected by plastic tubing to a 1-mL syringe placed in a microinfusion pump (CMA 402; CMA Microdialysis) and perfused continuously at a rate of 2. $\mu\text{L}/\text{min}$ with artificial CSF (CMA Microdialysis). After 120 min of stabilization, dialysis samples (sample volume 20 μL) were collected every 10 min for a period of 40 min in the holding cage to determine basal levels of glutamate and GABA in awake rats. During this initial baseline phase, the animal was free to move about the holding cage. After four baseline samples were collected, the rat was gently picked up and placed on the center of the maze. Upon completion of 20 min of maze testing, rats were transferred back to the holding cage, and postbaseline levels of Glu and GABA were collected for an additional 40 min. Similar to the prebaseline period, during the postbaseline period, the animal was free to move about the holding cage. Then the perfusion fluid was switched from normal CSF to high KCl-CSF containing 25mmol/L KCl to depolarize the neurons. Three subsequent samples (30 min) were collected to capture the stimulated glutamate release. This was followed by the collection of four baseline samples (40 min). The content of glutamate and GABA were determined by high pressure liquid chromatography (HPLC)

Behavioral study showed that electrolytic lesion of MS significantly impaired SA performance. Specifically, the percent alternation scores of MS lesioned rats were significantly lower than control rats ($P <$

0.05). The number of animals that yielded acceptable microdialysis samples was as follows: control (n = 6), MS electrolytic lesioned (n = 7). Glutamate release during the 10 min samples taken at the time of the behavioral testing of control and MS lesioned animals increased (expressed as percent increase above baseline values) during behavioral testing but were not significantly different ($p > 0,05$) from those seen immediately before and after testing. Although both groups of animals had an insignificant rise in their respective hippocampal glutamate efflux during the spontaneous alternation the rise of MS lesioned animals was blunted when compared with control animals.

Hippocampal GABA levels did not change during behavioral testing in both groups ($p > 0,05$). This finding, however, does not imply that hippocampal GABAergic transmission is not crucial in the evaluation of SA. Rather, it may be that the spatiotemporal characteristics of microdialysis sampling are unable to detect rapid transient changes in GABA efflux or that different sources of GABA (e.g. septohippocampal inputs vs. local interneurons) are changing in opposite directions, resulting in no net effect.

GABA and glutamate sampled from the brain by microdialysis do not always fulfill the classic criteria for exocytotic release. In this regard the origin (neuronal vs. astroglial, synaptic vs. extrasynaptic) of glutamate and GABA collected by microdialysis is still a matter of debate. During basal conditions glutamate in microdialysates is mainly derived from non-synaptic sources. Indeed recently several sources of astrocytic glutamate release have been described, including glutamate derived from gliotransmission. However during conditions of (chemical, electrical or behavioral) stimulation a significant part of glutamate might be derived from neurotransmission. To separate neurotransmitter glutamate from metabolic one, we used KCl stimulation.

In the present study, we have investigated the effects of electrolytic MS lesions on KCl-stimulated release of glutamate and GABA in the hippocampus of freely moving rats. Because the absolute peak neurotransmitters levels varied greatly between individual animals, which may have obscured significant group differences, we analyzed the data by comparing the response to KCl stimulation with individual baseline levels. Rat showing a 25% increase or greater from baseline in response to KCl stimulation were classified as responders, while those showing a smaller change were classified as non-responders. Table 1 illustrates number of animals in each group with a 25% increase in glutamate and GABA release from baseline after KCl stimulation. Using this criterion, most of control animals showed increase in KCl-stimulated glutamate release. By contrast, only one MS lesioned rat showed increase in glutamate release in response to KCl stimulation. Most of control and MS lesioned rats were non-responders in GABA release in response to KCl stimulation. Histology verified that the probe was in contact with the hippocampus in all rat, and that the difference between responders and non-responders cannot be attributed to the probe location.

We found a selective decrease in KCl-stimulated glutamate release in the hippocampus of MS lesioned rats compared to the control animals. Therefore, it appears that decreased glutamate release (upon stimulation) in the MS lesioned rats may contribute to learning impairment in these animals. Several factors may contribute to the effect of intraseptal lesions. Electrolytic lesions of the MS damage GABAergic and cholinergic projections from the MS to the hippocampus. Therefore, may be suggested that by destroying GABAergic septohippocampal projection cells, electrolytic lesion of the MS would reduce disinhibition of hippocampal pyramidal cells, as GABAergic septohippocampal neurons project primarily to the hippocampal GABAergic interneurons. Cholinergic septohippocampal projection cells project to hippocampal pyramidal cells and can directly modulate hippocampal glutamate release.

In conclusion, we propose that SA testing coupled with *in vivo* microdialysis sampling represents a suitable approach to revealing the neurochemical correlates of hippocampal-dependent memory function, and thus could be a useful tool for better understanding of the neurochemical basis of cognitive decline associated with various disorders and neurodegenerative diseases.

3.5. The effects of immunotoxic lesions of cholinergic and GABA-ergic MS neurons on spatial memory and expression level of hippocampal NR2B subunit containing NMDA receptors

In the present study, we investigated the effects of selective immunolesions of cholinergic and GABA-ergic MS neurons on spatial memory assessed in Morris water maze and expression level of hippocampal NR2B subunit containing NMDA receptors.

There were 12 rats in each of 3 independent groups: (1) sham operated - Control (C), (2) 192 IgG-saporin MS lesioned (MS-SAP) and (3) GAT1-SAP MS lesioned (MS-GAT). All animals were included in behavioral testing. At the end of the behavioral experiments half of rats from each group were used in the immunohistochemical (n=6) and half in immunoblotting (n=6) studies.

Long-term spatial memory was assessed using a Morris water maze. We used a one-day training protocol with eight training trials. Briefly, the test was divided into the training phase (day 1) and the retrieval phase 24 h later. Escape platform (10 cm in diameter) was located 2 cm beneath the surface on training day. On day 1, rats received eight trials, one from each of four equidistantly located start locations (N, S, E, W) in a randomized sequence. Probe tests, during which the platform was removed from the pool, were performed 24 h after training. The rats were placed in the pool from a novel drop point (between the N and E compass points) and allowed to swim for 60 s. Tracking the animal movements in water-maze, also collection of other numeric data (escape latency, the time spent in different quadrants during the probe test) was made with an aid of video tracking system designed in our laboratory

The Two Way ANOVA for the escape latency showed no significant effect of group ($F_{2,71}=0.802$, $P = 0.453$) but showed significant effect of block ($F_{1,71} = 29.739$, $P < 0.001$). There is not a statistically significant interaction between group and block ($F_{2,71} = 1.315$, $P = 0.275$). The results of post hoc analysis of differences for escape latency between block 1 and block 2 showed significant difference in control ($P < 0.001$) and in SAP ($P = 0.008$) and GAT lesioned ($P = 0.027$) groups.

24 hours after training, a probe test (60s) with the platform removed was performed to assess long-term spatial memory. Long-term spatial memory of the location of the hidden platform is indicated by preference for S_{test} over S_{opp} . ANOVA was used to examine between-group differences on probe-test performance indices. The Two Way ANOVA showed no significant effect of group ($F_{2,71}=0.787$, $P = 0.459$) but showed significant effect of sector ($F_{1,71}=46.620$, $P < 0.001$) and interaction between group and sector ($F_{2,71}=8.087$, $P < 0.001$). The results of post hoc analysis of differences for time spent in S_{test} and S_{opp} showed no significant difference in GAT lesion ($P=0.396$) group and a significant difference between sectors of control and SAP treated groups ($P<0.001$). During the probe test, trained control and SAP treated rats spent significantly longer than chance (15 s, dotted lines) in the test sector (S_{test}) where the hidden platform was located (Contr -21.36 ± 2.18 , $t=2.907$, $P = 0.014$; SAP -21.782 ± 1.703 , $t=3.982$, $P = 0.002$). In contrast, in the test sector GAT treated rats spent no longer than chance (16.0 ± 1.289 , $t=0.776$, $P = 0.454$).

The results of our behavioral experiments showed that all rats exhibited a decreased latency to find the hidden platform across the eight training trials. These findings suggest that selective lesions of different subsets of septohippocampal projections did not affect learning process in a one-day Morris water maze task. The hippocampal dependent spatial long term memory of the location of the hidden platform (assessed 24 hours after training) is affected by immunotoxic lesions of medial septal GABAergic, suggest a role of MS GABAergic neurons in processing information about the spatial environment.

At the end of behavioral testing a random sample of rats from control and MS lesioned groups were killed and their brains collected in order to perform immunoblotting experiments to determine expression level of NR2B subunit containing NMDA receptors in the hippocampus. Statistical analysis showed significant effect of group and post hoc (Tukey's test) analysis showed no significant difference between control and SAP treated rats ($P > 0.05$) and significant difference between control and GAT treated rats ($P < 0.01$). The present experiments indicate that the expression level of NR2B subunit of NMDA receptor in the hippocampus was decreased significantly in the GAT1-SAP treated group compared with the control and 192 IgG saporin treated groups.

Conclusions:

1. Selective lesions of GABAergic MS neurons reduces the expression of a place response to solve the dual-solution plus-maze task successfully and suggest a role of MS GABAergic neurons in processing information about the spatial environment;
2. MS cholinergic lesioned rats use spatial or place strategies effectively
3. There is dissociation between the two major components (cholinergic and GABAergic) of the septohippocampal pathway in hippocampal dependent spatial memory assessed in an appetitive dual-solution plus-maze task.

4. Spatial short-term memory is affected only by electrolytic lesions of the MS. The selective loss of septohippocampal cholinergic or GABAergic projections does not disrupt the function of the hippocampus to a sufficient extent to impair spatial short term memory;
5. KCl-stimulated hippocampal glutamate release is decreased by electrolytic lesion of the MS; decreased glutamate release (upon stimulation) may contribute to spatial memory impairment in these animals.
6. The hippocampal dependent spatial long term memory (assessed in Morris water maze) is affected by immunotoxic lesions of medial septal GABAergic, but not cholinergic neurons;
7. Expression of glutamatergic NR2B subunit containing NMDA receptors in the hippocampus are reduced by immunotoxic lesions of medial septal GABAergic, but not cholinergic neurons;
8. There is correlation between spatial memory impairment assessed in water maze and the reduction of glutamatergic NR2B subunit containing NMDA receptors expression in the hippocampus induced by the lesion of GABAergic medial septal neurons.
9. Lesion-induced spatial memory impairment may be attributed, at least in part, to the reduction of hippocampal glutamatergic NR2B subunit containing NMDA receptors expression caused by the lesion of GABAergic medial septal neurons;

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

Articles:

- **Mataradze S.**, Naneisvili T., Sepashvili M., Mikeladze D., Dashniani M. Effects of medial septal lesion on hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing. Georgian Medical News – in press, 2016
- Temur Naneishvili, **Sopio Mataradze**, Manana Dashniani, Nino Chkhikvishvili, Nino Pochkhidze. Effects of medial septal lesions on learning strategy selection in plus-shaped maze. Bulletin of the Georgian National Academy of Science, vol. 10, no. 3, 111-118, 2016
- Dashniani M., Kruashvili L., Rusadze Kh., **Mataradze S.**, Beselia G. Effects of immunotoxic and electrolytic lesions of medial septal area on spatial short-term memory in rats. Georgian Medical News, no.1, (239) 98-103, 201

Abstracts:

- **S. Mataradze**, T. Naneishvili, M. Demurishvili, Kh. Rusadze, M. Burjanadze, T. Kherkheulidze. Study of selective and conjoint immunolesions of septohippocampal projections on spatial memory function. 7th International Regional ISBS Neuroscience and Biological Psychiatry Conference „Stress and Behavior”, Miami Beach, FL, USA, 22-24 June, 2016
- G. Beselia, M. Dashniani, M. Burjanadze, L. Kruashvili, **S. Mataradze**. Effect of chronic memantine treatment on hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing. 7th International Regional ISBS Neuroscience and Biological Psychiatry Conference „Stress and Behavior”, Miami Beach, FL, USA, 22-24 June, 2016
- Rusadze Kh., **Mataradze S.**, Beselia G., Modulation of spatial memory and expression of hippocampal NMDA receptors by septohippocampal projections. Georgian National Academy of Science, Conference of young scientists. Tbilisi, Georgia, 18-19 May, 2015
- **S. Mataradze**, T. Naneishvili, M. Demurishvili, M. Chigladze, Kh. Rusadze. Study of selective immunolesions of medial septal cholinergic and GABA-ergic neurons on hippocampal dependent memory and learning process. 9th FENS forum of neuroscience, Milan, Italy, 5-9 Juli, 2014
- Kruashvili L., **Mataradze S.**, Beselia G., Dashniani M., Sepashvili M., Burjanadze M. A study of hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing. „Actual Problems of Physiology and Biomedicine”, XII National scientific conference. Kutaisi, Georgia, 25-27 September, 2014
- 2015-2016 – 3 Colloquium.