



საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის
სახელობის ქართული უნივერსიტეტი

ბელნაწერის უფლებით

ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სკოლა (ფაკულტეტი)

მეხსიერების ნერვული მექანიზმები

ლალი ყრუაშვილი

მეხსიერების და სეპტოჰიპოკამპური სისტემის
ურთიერთკავშირის შესწავლა

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარმოდგენილი ნაშრომის

სადისერტაციო მაცნე

05 მეცნიერება/საბუნებისმეტყველო მეცნიერებანი

0504 ბიოლოგია/სიცოცხლის შემსწავლელი მეცნიერებანი

თბილისი

2015

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 წერგული მექანიზმების მიმართულეზაზე.

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: **თემურ ნაწიეშვილი**

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
აკადემიკოსი

ოფიციალური ოპონენტები: **1. შზია ჟგანია**

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,

პროფესორი

2. თამარ დომიანიძე

ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი

დისერტაციის დაცვა შედგება 2015 წლის „10“ ივლისს, 15⁰⁰ 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^ა, აკადემიკოს ილია ვეკუას სახელობის აუდიტორია.

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

სადისერტაციო მაცნე დაიგზავნა 201__ წლის „____“ _____

სადისერტაციო საბჭოს მდივანი,

ფიზიკა-მატემატიკის აკადემიური დოქტორი

პროფესორი გიორგი მაქაცარია

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა. ექსპერიმენტული და კლინიკური მონაცემების თანახმად, მეხსიერება არაერთგვაროვანი ფენომენია და ხშირ შემთხვევაში, მისი ცალკეული სახის მექანიზმები ნერვული სისტემის სხვადასხვა უბანში არის ლოკალიზებული. ადამიანის მეხსიერების სისტემების ნეიროფსიქოლოგიური კვლევის შედეგების მიხედვით, ტვინის სხვადასხვა უბნის დაზიანება კოგნიტიურ ფუნქციებს განსხვავებულად არღვევს. სპეციფიკური კოგნიტიური ეფექტები, რომლებიც ტვინის შემოსაზღვრულ უბნებს უკავშირდება, ვირთაგვებშიც იქნა გამოვლენილი. სამეცნიერო ლიტერატურის ანალიზი წარმოაჩენს სეპტოჰიპოკამპური სისტემისა და მეხსიერების ურთიერთკავშირის არსებობას, თუმცა, სეპტოჰიპოკამპური სხვადასხვაერგული პროექციების როლი დასწავლისა და მეხსიერების პროცესებსა და ჰიპოკამპში მიმდინარე ბიოქიმიურ პროცესებში, შემდგომ შესწავლას მოითხოვს. სეპტოჰიპოკამპური პროექციების სელექციური დაზიანებით გამოწვეული დასწავლისა და მეხსიერების დეფიციტის კვლევა, ჰიპოკამპში მიმდინარე ნეიროქიმიური პროცესების თანადროულად, ხელს შეუწყობს როგორც იმ მექანიზმების გამოვლენას, რომლის საშუალებითაც სეპტოჰიპოკამპური სისტემა მოდულაციურ გავლენას ახდენს მეხსიერების პროცესებზე, ასევე მეხსიერების დარღვევათა კორექციის სტრატეგიის განსაზღვრას.

კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები. წარმოდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა მეხსიერებისა და დასწავლის პროცესებში მედიალური სეპტუმის ქოლინერგული და არაქოლინერგული პროექციების მნიშვნელობის კვლევა, ამ პროექციების მიმართ მეხსიერების სენსიტიური ფორმების განსაზღვრა და მიღებული შედეგების საფუძველზე მეხსიერების დეფიციტის კორექციის გზების გამოვლენა.

ამოცანები:

- ღია ველში ცხოველთა აქტიურობის (კვლევითი ქცევა, ჰაბიტუაცია, ამოცნობის მეხსიერება) შესწავლა მედიალური

სეპტუმის დაზიანების (ელექტროლიზური, ნეიროტოქსინით, სელექტიური ACh) მქონე და საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში.

- მეხსიერების დეკლარატიული და არადეკლარატიული ფორმების შესწავლა მედიალური სეპტუმის დაზიანების (ელექტროლიზური, ნეიროტოქსინით, სელექტიური ACh) მქონე და საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში.
- ჰიპოკამპში აცეტილქოლინის აქტიურობის იმუნოჰისტოქიმიური შესწავლა მედიალური სეპტუმის ნეირო- და იმუნოტოქსინით დაზიანების მქონე და ინტაქტურ ვირთაგვებში.
- მემანტინის სხვადასხვა დოზით ზემოქმედების ეფექტები ღია ველში ცხოველთა აქტიურობასა და ამოცნობის მეხსიერებაზე.
- სივრცითი ამოცანის დასწავლის კანონზომიერებანი მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური დაზიანების მქონე და საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვებში მემანტინით და პლაცებოს ზემოქმედების ფონზე.
- თავის ტვინის *in vivo* გამდინარე მიკროდიალიზის მეთოდით ჰიპოკამპის უჯრედგარე სივრცეში ნეიროტრანსმიტერების (გლუტამატი, GABA) დონის განსაზღვრა სივრცითი ამოცანის დასწავლის პროცესში მემანტინით და პლაცებოს ზემოქმედების ფონზე.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და პრაქტიკული მნიშვნელობა

სადისერტაციო ნაშრომში მიღებული შედეგები გააფართოვებს ცოდნას მეხსიერების ფუნდამენტური მექანიზმების შესახებ და ხელს შეუწყობს მეხსიერების გაუმჯობესების ახალი სტრატეგიების განსაზღვრას. კვლევის შედეგების ექსტრაპოლირება შესაძლებელია ადამიანებზე, რაც მნიშვნელოვანია სეპტოჰიპოკამპური სისტემის როლის დადგენაში მეხსიერების დარღვევებში, ალცჰეიმერის დაავადების ჩათვლით. მედიალური სეპტუმის დაზიანების მქონე ვირთაგვებში მეხსიერებისა და დასწავლის პროცესების დარღვევათა ქოლინერგული და არაქოლინერგული მექანიზმების განსაზღვრა, ხელს შეუწყობს, როგორც ცხოველებზე ადამიანის მეხსიერების დარღვევათა ვალიდური მოდელის შექმნას, ასევე მედიცინისა და

ფარმაკოლოგიური დარგის სპეციალისტებს, მეხსიერების დარღვევათა კორექციის მიზნით, ახალი სამკურნალო პრეპარატების შექმნაში.

პუბლიკაციები. დისერტაციის მასალებზე გამოქვეყნებულია 4 ნაშრომი (იხ. გვ. 12), ასევე ნაშრომში მოყვანილი ძირითადი შედეგები მოხსენებულ იქნა 9 სხვადასხვა საერთაშორისო სამეცნიერო ფორუმზე და სასწავლო პროგრამით გათვალისწინებულ 2 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 138 გვერდს, და მოიცავს 20 სურათს, 4 ცხრილს და 216 დასახელების ციტირებული ლიტერატურის სიას.

ნაშრომის ძირითადი შინაარსი

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა

აღნიშნულ თავში მოცემულია მეხსიერების სხვადასხვა ფორმის დახასიათება და მათი კვლევის ისტორია, დეკლარატიული და არადეკლარატიული მეხსიერების ანატომიური სუბსტრატი. ჰიპოკამპის აგებულება, მისი კავშირები და მნიშვნელობა მეხსიერების პროცესებში, ასევე აცეტილქოლინის როლი დასწავლისა და მეხსიერების პროცესებში

თავი II. ექსპერიმენტის მეთოდისა

წარმოდგენილია ექსპერიმენტებში გამოყენებული ცხოველების მოვლის პროტოკოლი. ნეიროქირურგიული ოპერაციები, რომელიც ჩატარებულ იქნა ვირთაგვებზე მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური, იმუნოტოქსინით (192-IgG საპორინი) და ნეიროტოქსინით (იბოტენის მჟავა) ქოლინერგული და არაქოლინერგული ნეირონების შერჩევითი დაზიანების მიზნით. აღწერილია ჰისტოქიმიური და იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდები რომლებიც მედიალური სეპტუმის დაზიანების ვერიფიკაციისა და ამ დაზიანების შედეგად ჰიპოკამპში ნეიროტრანსმიტერთა აქტიურობის ცვლილებების შეფასების მიზნით გამოიყენებოდა. ქცევით ექსპერიმენტებში გამოყენებული ქცევითი ტესტები და ტესტირების პირობები, ასევე მონაცემთა სტატისტიკური დამუშავების მეთოდები აღწერილია შესაბამის ფაქტობრივ მასალასთან.

თავი 3. მიღებული შედეგები

3.1. ჰიპოკამპში ნეიროტრანსმიტერების აქტიურობის კვლევა მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური, ნეირო- და იმუნოტოქსინით დაზიანების მქონე, ინტაქტურ და ცრუოპერირებულ ვირთაგვებში.

ჰისტოლოგიური კვლევებით გამოვლინდა რომ ჩვენს ექსპერიმენტებში ელექტროლიზური დაზიანების შედეგად MS-ში ნეირონთა რაოდენობა მცირდება საშუალოდ 69 %-ით (50 %-88 %). მედიალურ სეპტუმში ნეიროტოქსინის მიკროინექცია კი განპირობებს ნეირონთა მნიშვნელოვანი რაოდენობის დაღუპვას კონტროლთან შედარებით: მნიშვნელოვანი განსხვავება გამოვლინდა ჯგუფებს შორის ($t = 4.10$; $p = 0.015$; $df = 4$).

იმუნოტოქსინ 192 IgG-საპორინის მიკროინექციის პირობებში გამოვლინდა AChE-მგრძნობიარე ნეირონების რაოდენობის სარწმუნო შემცირება მედიალური სეპტუმში საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებთან შედარებით ($t=2.63$, $P=0.047$, $df=5$). მიღებულმა შედეგებმა ასევე გამოავლინა, რომ 192 IgG-საპორინის ინექცია მედიალური სეპტუმში იწვევს გაცილებით

მეტი AChE-მგრძობიარე ნეირონების სარწმუნო შემცირებას ჰიპოკამპში საკონტროლო ჯგუფის (CA1 - $t=4.64$, $P=0.01$, $df=4$; CA3 - $t=4.08$, $P=0.01$, $df=4$) და მედიალური სეპტუმის იბოტენის მჟავით დაზიანების მქონე (CA1 - $t=3.22$, $P=0.048$, $df=3$; CA3 - $t=2.33$, $P=0.08$, $df=4$) ცხოველებთან შედარებით. საინტერესოა ის ფაქტი რომ იბოტენის მჟავით დაზიანების შემთხვევაში ქოლინერგული პროექციები ჰიპოკამპში უპირატესად შენარჩუნებულია.

3.2. კვლევითი ქცევისა და ამოცნობის მეხსიერების შეფასება მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური, ნეირო- და იმუნოტოქსიკური დაზიანების მქონე ვირთაგვებში

ჩატარებულ ექსპერიმენტში ერთმანეთთან შედარებულ იქნა მედიალური სეპტუმის სამი ტიპის დაზიანება: ელექტროლიზური დაზიანება, რომელიც მოიცავს როგორც იქ არსებული უჯრედების, ისე გამავალი ბოჭკოების დაზიანებას, იბოტენის მჟავით დაზიანება, რომელიც ძირითადად არაქოლინერგულ უჯრედებს აზიანებს და ჰიპოკამპის ქოლინერგულ პროექციებს ძირითადად ინაქტურს ტოვებს და საპორინით დაზიანება, რომელიც შერჩევითად აზიანებს ქოლინერგულ ნეირონებს.

ჩატარებული ექსპერიმენტებით გამოვლინდა, რომ როგორც საკონტროლო, ისე მედიალური სეპტუმის სხვადასხვა დაზიანების მქონე ცხოველები რეაგირებენ ობიექტის სიახლეზე. ყველა ჯგუფის ცხოველი მეტ დროს ატარებს ახალ ობიექტთან ვიდრე ნაცნობ ობიექტებთან. მიღებული შედეგები საშუალებას გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ ობიექტის სიახლის დეტექციის მექანიზმებში მედიალური სეპტუმი არ მონაწილეობს.

საინტერესოა აღინიშნოს, რომ საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში გამოვლინდა გაზრდილი კვლევითი ქცევა ნაცნობი ობიექტის ახალ ადგილას წარდგენის დროს, მაშინ როცა მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური დაზიანების მქონე ცხოველებში აღნიშნულ ფაქტს ადგილი არ ჰქონია. წარმოდგენილი შედეგები აჩვენებს, რომ მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური დაზიანება აუარესებს სივრცით ამოცნობის მეხსიერებას და რომ მედიალური სეპტუმი უფრო მეტად პასუხისმგებელია სივრცითი ცვლილების დეტექციაზე, ვიდრე გარემოში ობიექტის ცვლილებაზე.

3.3. მედიალური სეპტუმის ნეირონების სელექტიური და არასელექტიური დაზიანების ეფექტები დასწავლის სტრატეგიის არჩევაზე მორისის წყლის აუზის ამოცანის ხილულბაქნიან ვერსიაში

მეხსიერების დეკლარატიული და არადეკლარატიული ფორმები ფასდებოდა მორისის ავზში ადგილისა და სიგნალის დასწავლის ამოცანებით, მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური, იმუნო- და ნეიროტოქსინით დაზიანების მქონე და ცრუოპერირებულ ცხოველებზე. ჩატარებული ექსპერტიმენტების საფუძველზე გამოვლინდა, რომ მორისის ავზში ადგილის დასწავლის დეფიციტი აღინიშნება მედიალური სეპტუმის, როგორც ელექტროლიზური, ასევე იბოტენის მჟავით დაზიანების პირობებში. ამ ამოცანით უხილავი ბაქნის პირობებში ტესტირებისას ამ ჯგუფის ცხოველების ბაქნის პოვნის ლატენტური დრო სარწმუნოდ აღემატება საკონტროლო და ქოლინერგული ნეირონების სელექტიურად დაზიანების მქონე ჯგუფის ცხოველების იგივე მაჩვენებლებს ($P < 0,05$). ეს ფაქტი მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური და ნეიროტოქსინით დაზიანების მქონე ცხოველებში ადგილის დასწავლის სტრატეგიის გამოყენების დეფიციტზე მიანიშნებს. იგივე დასკვნის საფუძველს გვამძლევს ამ ამოცანის ორივე სატესტო სინჯში განხორციელებული პასუხების ანალიზი. ამოცანის შესრულებისას კოგნიტიურ რუკაზე დამოკიდებულება ამ ჯგუფებში უფრო მყარია, ვიდრე ელექტროლიზური და ნეიროტოქსინით დაზიანების მქონე ცხოველებში.

მიღებული შედეგები საფუძველს გვამძლევს, რომ ჰიპოკამპთან ერთად, მედიალური სეპტუმი იმ ფუნქციური სისტემის შემადგენლობაში განვიხილოთ, რომელიც სივრცითი მეხსიერების კოგნიტიური ფორმების რეალიზაციაში მონაწილეობს. რამდენადაც, მედიალური სეპტუმის ქოლინერგული ნეირონების სელექტიური დაზიანების ეფექტები ცრუოპერირებულ ცხოველებზე მიღებული შედეგების მსგავსია, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ სივრცითი მეხსიერების პროცესებში სეპტოჰიპოკამპური სისტემის მონაწილეობა, მხოლოდ მისი ქოლინერგული პროექციებით არ განისაზღვრება. რამდენადაც მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური და ნეიროტოქსინით

დაზიანებისას ქოლინერგულთან ერთად GABA-ერგული და სხვა ერგული სისტემებიც ზიანდება შესაძლოა ვივარაუდოთ, რომ მეხსიერების დეფიციტი სწორედ ამ სისტემების დაზიანებას უკავშირდება.

3.4. NMDA რეცეპტორის არაკონკურენტული ანტაგონისტის მემანტინის ეფექტები მეხსიერებისა და დასწავლის სხვადასხვა ფორმაზე ვირთაგვებში

წარმოდგენილ ნაშრომში მემანტინის (2,5 მგ/კგ ან 5 მგ/კგ) ზემოქმედების ეფექტები შეისწავლებოდა ექსპერიმენტების სამ სერიაში: 1. ღია ველში კვლევით ქცევასა და ამოცნობის მეხსიერებაზე; 2. სივრცით მეხსიერებაზე მედიალური სეპტუმის ელექტროლიზური დაზიანების მქონე და საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვებში; 3. ჰიპოკამპის უჯრედგარეთ სივრცეში გლუტამატის და GABA-ის დონის ცვლილებაზე სივრცითი მორიგეობის ამოცანის შესრულებისას.

აღნიშნული ჯგუფების ღია ველში ტესტირებამ აჩვენა რომ მემანტინის 2,5 მგ/კგ დოზა არ მოქმედებს ცხოველების უნარზე მოახდინონ ობიექტის სიახლის დეტექცია. ამ ჯგუფის ცხოველები, ისევე როგორც საკონტროლო ჯგუფის ცხოველები რეაგირებენ ობიექტის სიახლეზე და ნაცნობ ობიექტებთან შედარებით მეტ დროს ატარებენ ახალ ობიექტთან. ამ მაჩვენებლის მიხედვით აღნიშნულ ჯგუფებს შორის არ არის სარწმუნო განსხვავება ($P>0,05$). საპირისპირო შედეგია მიღებული ვირთაგვებში, რომლებშიც გამოიყენებოდა მემანტინი 5 მგ/კგ დოზით: ისინი არ ამჟღავნებენ ობიექტის სიახლის დეტექციის უნარს.

მიღებული შედეგების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ: მემანტინით ზემოქმედება იწვევს კვლევითი აქტიურობის დოზაზე დამოკიდებულ დაქვეითებას; მემანტინის 2,5 მგ/კგ დოზა არ იწვევს სივრცითი და ობიექტთა სიახლის დეტექციის უნარის დაქვეითებას; მემანტინის 5მგ/კგ დოზა არღვევს როგორც ამოცნობის მეხსიერების ორივე სახეს, ასევე ზოგადად ლოკომოტორულ აქტიურობას.

მემანტინის ეფექტების შეფასება სივრცით მეხსიერებაზე მედიალური სეპტუმის სხვადასხვა დაზიანების მქონე ცხოველებში ხდებოდა ჯვრისმაგვარ ლაბირინთში, ჩვენი კვლევებით გამოვლინდა, რომ ზრდასრულ ვირთაგვებში მემანტინის

თერაპიული დოზის რელევანტური დოზით მწვავე შეყვანა აუარესებს მეხსიერებას ცრუოპერირებულ ცხოველებში და არ აუმჯობესებს სივრცით მეხსიერებას მედიალური სეპტუმის დაზიანების მქონე ვირთაგვებში.

შესწავლილია აგრეთვე გამდინარე მიკროდიალიზის მეტოდით მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედების ეფექტები ჰიპოკამპში გლუტამატისა და გამა-ამინო-ერბომჟავას (GABA) გამოთავისუფლებაზე სპონტანური მორიგეობის ამოცანაში ტესტირებამდე, ტესტირებისას და ტესტირების შემდეგ.

ამას გარდა, შესწავლილია მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედების ეფექტები გლუტამატისა და GABA-ის გამოთავისუფლებაზე KCl-ით სტიმულაციის პირობებში. ჩვენს ექსპერიმენტებში მამრ ვირთაგვებში მემანტინის თერაპიული დოზის რელევანტური დოზის გამოყენებით შესწავლებოდა, იწვევს თუ არა NMDA რეცეპტორის ანტაგონისტის ზემოქმედება დასწავლის პროცესის გაუარესებას ინტაქტურ ცხოველებში.

მიღებული შედეგებით გამოვლინდა, რომ ზრდასრულ ვირთაგვებში მემანტინის ზემოქმედება იწვევს ლოკომოტორული აქტიურობის (კვლევიითი ქცევის) დაქვეითებას ($p < 0,05$), მაგრამ არ ახდენს გავლენას სივრცით მუშა მეხსიერებაზე, რომელიც ფასდებოდა ჯვრისმაგვარ ლაბირინთში სპონტანური მორიგეობის ამოცანაში.

მემანტინის და საკონტროლო ჯგუფებში ქცევითი ტესტირებისას აღებული დიალიზატის 10 წუთიან სინჯებში ტესტის შესრულებისას გლუტამატის გამოთავისუფლება მომატებულია (ფონურ მაჩვენებელთან შედარებით ცვლილება %-ში), თუმცა ფონური მაჩვენებლებისგან სარწმუნოდ არ განსხვავდება ($p > 0,05$). ქცევითი ტესტირების დროს ჰიპოკამპური GABA-ის დონე არცერთ ჯგუფში არ იცვლება ($p > 0,05$).

ტვინიდან მიკროდიალიზით მიღებული გლუტამატის და GABA-ს ნიმუშების სინაპსური წარმოშობის დასადასტურებლად ვიყენებდით KCl-ით სტიმულაციის მეთოდს. გამოვლინდა KCl-ით სტიმულაციით ჰიპოკამპში გლუტამატის და GABA-ის გამოთავისუფლების ზრდა მემანტინის ჯგუფის ცხოველებში, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით.

ამრიგად, ექსპერიმენტში მიღებული შედეგების თანახმად, ზრდასრულ ვირთაგვებში მემანტინის ქრონიკული ზემოქმედებით ჰიპოკამპის გლუტამატურგული ნეიროტრანსმისიის ცვლილება არ მოქმედებს სპონტანური მორიგეობის ამოცანაში სივრცით მუშა მესხიერებაზე.

დასკვნები:

1. სეპტოჰიპოკამპური პროექციების არასელექტიური დაზიანებით გამოწვეული მესხიერების დეფიციტი მოიცავს ჰიპოკამპზე დამოკიდებულ კოგნიტიურ ფუნქციებს.
2. მედიალური სეპტუმი მონაწილეობს სივრცითი ამოცნობის მესხიერების პროცესებში, ხოლო ობიექტის ამოცნობის მესხიერება სეპტოჰიპოკამპური სისტემის ჩართულობის გარეშე რეალიზდება. ობიექტებისა და სივრცითი ამოცნობის მესხიერებას განსხვავებული ნერვული სუბსტრაქტი ემსახურება.
3. მედიალური სეპტუმი მონაწილეობს სივრცითი მესხიერების დეკლარატიულ (ადგილის დასწავლა) ფორმებში და არ მონაწილეობს პროცედურული (ერთეულ სიგნალზე ორიენტაცია) მესხიერების ფორმებში.
4. მედიალური სეპტუმის მონაწილეობა დეკლარატიული მესხიერებისა და სივრცითი ამოცნობის დასწავლის პროცესებში, ასევე ამოცნობით მესხიერებასა და არაასოციაციური დასწავლის პროცესებში არ განისაზღვრება მხოლოდ სეპტოჰიპოკამპური ქოლინერგული პროექციებით.
5. ქოლინერგული ან არაქოლინერგული სეპტოჰიპოკამპური საპროექციო ნეირონების სელექტიური დაზიანება არ არის საკმარისი სივრცითი ამოცნობის მესხიერების დეფიციტის გამოსავლენად.
6. გამოვლინდა სეპტოჰიპოკამპური პროექციების ქოლინერგულ და არაქოლინერგულ შემადგენელს შორის ფუნქციათა დისოციაცია დეკლარატიული მესხიერების პროცესებში და ამ პროცესებში მედიალური სეპტუმის არაქოლინერგული ნეირონების ჩართულობა.
7. NMDA რეცეპტორის ანტაგონისტით - მემანტინით სხვადასხვა დოზით ერთჯერადი ზემოქმედება იწვევს ღია ველში

ცხოველთა აქტიურობის (კვლევითი ქცევის) დოზაზე დამოკიდებულ დაქვეითებას.

8. მემანტინის თერაპიული დოზის რელევანტური დოზით ერთჯერადი ზემოქმედება აუარესებს სივრცით მახსიერებას ინტაქტურ ცხოველებში და არ იწვევს სივრცითი მახსიერების დეფიციტის კორექციას მედიალური სეპტუმის დაზიანების მქონე ვირთაგვებში.
9. მემანტინის თერაპიული დოზის რელევანტური დოზით ქრონიკული ზემოქმედება იწვევს გლუტამატერგული და GABA-ერგული ტრანსმისიის ცვლილებებს.
10. ლაბორატორიულ ექსპერიმენტებში მემანტინის ზემოქმედება ნეიროპროტექტორულზე დაბალი დოზით იწვევს გვერდით ეფექტებს, მახსიერების დარღვევის ჩათვლით; მემანტინის თერაპიული ეფექტები ალცჰეიმერის დაავადების მქონე პაციენტებში შესაძლოა არაგლუტამატერგულ ტრანსმისიაზე ზემოქმედებას უკავშირდება.

სტატიები:

1. Dashniani M., Burjanadze M., Beselia G., Chkhikvishvili N., **Kruashvili L**, „Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on spatial memory in medial septal lesioned rats“. Georg. Med. News. 2011, no 12 (201) 2011. 54-60;
2. Dashniani M., Burjanadze M., Naneishvili T., **Kruashvili L** ., Sepashvili M., „Effects of cronic memantine treatment on hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing“ Georg. Med. News. no 1 (202) 68-75, საქართველო 2012;
3. Dashniani M., **Kruashvili L** ., Rusadze X., Mataradze S., Beselia G., „Effects of immunotoxic and electrolytic lesions of medial septal area on spatial short-term memory in rats“ Georg. Med. News. N2 (239) Georgia, 2015;
4. Dashniani M., Burjanadze M., Naneishvili T., Chkhikvishvili N., Beselia G., **Kruashvili L** ., Phochckidze N., Chighladze M.,

„Exploratory behavior and recognition memory in medial septal electrolytic, neuro- and immunotoxic lesioned rats“ Czech Republic, No. 5/2015, vol 64. Jurnal Physiological Research (in print)

თეზისები:

1. **2012** - Dashniani M., Burjanadze M., Beselia G., Chkhikvishvili N., **Kruashvili L.**, Naneishvili T. "The clinically tested NMDA receptor antagonist memantine does not improve spatial memory in medial septal electrolytic lesioned rats". 8th FENC Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain.
2. **2012** - Naneishvili T. Dashniani M., Burjanadze M., Beselia G., Chkhikvishvili N., **Kruashvili L.**, Sefhashvili M., Mikeladze D. "Memantine treatment increase KCl-stimulated glutamate release in the rat hippocampus but does not affect working memory". 8th FENC Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain
3. **2012** - **Kruashvili L.**, ISTC II International Scientific Seminar: "Neuroplasticity: Nervous Substrate for Health and Diseases. New Approaches to Research" ." Exploratory Behavior and Recognition Memory in Medial Septal Lesioned Rats" Tbilisi, Georgia
4. **2013** - **Kruashvili L.**, The 37th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2013) "Effects of medial septal electrolytic and immunotoxic lesions on place and response learning of rats in the Morris water maze" Birmingham UK
5. **2013** - **Kruashvili L.**, Third National Congress "Learning strategy selection in the water maze in medial septal electrolytic and selective cholinergic neurons lesioned rats" Tbilisi, Georgia
6. **2013** - **Kruashvili L.**, Tbilisi 1st International Conferense "Merging neuroscience and medicine: implications for brain disorders "Spatial memory following electrolytic and selective cholinergic lesion of MS" Tbilisi, Georgia
7. **2014** - **Kruashvili L.**, Baku world forum of young scientists "Effects of medial septum selective cholinergic lesions on special memory" Baku, Azerbaijan.
8. **2014** - **ყრუაშვილი ლ.**, XII ეროვნული სამეცნიერო კონფერენცია „ფიზიოლოგიისა და ბიომედიცინის აქტუალური პრობლემები

„მიკროდიალიზის მეთოდით ჰიპოკამპის უჯრეთგარე სივრცეში გლუტამატის და GABA-ის გამოთავისუფლების დონის განსაზღვრა სივრცით მორიგეობის ამოცანის შესრულებისას ვირთაგვებში“ ქუთაისი, საქართველო.

9. 2014 - **Kruashvili L.**, ISTC III International Scientific Seminar: “Neuroplasticity: Nervous Substrate for Health and Diseases. New Approaches to Research “Hippocampas glutamate and GABA levels during working memory task in memantine/saline rats” Tbilisi, Georgia.



საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის
სახელობის ქართული უნივერსიტეტი

On the Manuscript Rights

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

Neuronal mechanisms of memory

Lali Kruashvili

**Septohipocampal projection and memory
interaction**

Abstract

of thesis on academic degree of Doctor of Biology

0.5 Sciences/Natural Sciences

Branch – 0504 Biology/Life Sciences

Tbilisi

2015

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

PHd

Defense of the thesis will be held on “__” 2015, at 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 2015.

Secretary of Dissertation Council,
Doctor in Physics and Mathematics,

Short Description of the Work

The Subject Actuality.

Extensive data from a number of different experimental approaches suggest that the septohippocampal system is important for normal memory function. Lesions of the fimbria-fornix, or electrolytic or neurotoxic lesions of the MS, impair hippocampal-dependent learning and memory. These studies have been interpreted as supporting the hypothesis that hippocampal ACh is necessary for normal memory function. However, these lesions necessarily result in loss of both cholinergic and noncholinergic septohippocampal projections. Findings from experiments using the immunotoxin 192 IgG-saporin to produce selective lesions of cholinergic septohippocampal neurons often fail to cause any impairment in spatial learning in the water maze, spatial working memory. Thus, deficits observed after septal or fimbria-fornix lesions cannot be accounted for solely by the loss of hippocampal ACh. The involvement of noncholinergic septohippocampal projections in memory remains unspecified. Because loss of cholinergic neurons does not seem to be a sufficient basis to explain memory impairment in MS lesioned rats, other neurobiological substrates of memory impairment must be identified. Understanding how these other mechanisms might be necessary for memory may lead to new therapies for memory improvement.

It is possible that septal lesion impairs memory by down- or upregulating glutamatergic levels in the hippocampus. Evidence indicates that NMDA antagonists have potential for powerful protective activity against neurodegeneration involving glutamate excitotoxicity, under diverse experimental conditions. In turn, glutamate antagonists should be investigated for their potential neuroprotective actions in experimental study.

Principal Goals and Tasks of the Research.

The objective of the research was to investigate in laboratory experiments mechanism by which cholinergic and noncholinergic septohippocampal projections can modulate memory and learning process and the aspects of memory for which they may be necessary. Different forms of memory and development of learning process were studied and the immunocytochemical determination of neurotransmitters activity in the hippocampus were carried out in medial septal electrolytic, neuro- and immunotoxin lesioned rats.

The objectives:

- Study of open field activity (exploratory behavior, motivational-emotional state, habituation) of medial septal lesioned (electrolytic, neurotoxin, selective ACh) and intact rats.
- Study of different forms of memory and learning in medial septal lesioned (electrolytic, neurotoxin, selective ACh) and intact rats.
- Immunocytochemical determination of neurotransmitter (acetylcholine) activity will be carried out in hippocampus in medial septal lesioned (neurotoxin, selective ACh) and intact rats.
- Study of effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on exploratory activity and recognition memory.
- Study of effects of the NMDA receptor antagonist memantine on spatial memory in medial septal lesioned rats.
- Study of effects of chronic memantine treatment on hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing

Scientific Novelty of the Work and Practical Importance of the Work

Investigation changes in hippocampal chemistry in association of learning process and memory deficit after lesion of septal projections to the hippocampus may lead implications for understanding of the mechanisms by which cholinergic and noncholinergic septohippocampal projection can modulate memory and the mechanisms by which memantine manifest protective activity against neurodegeneration and may also lead to new strategies for memory improvement, as well as to a better understanding of the fundamental neurobiology of memory.

Publication. Materials of thesis published 4 papers (see. page. 24), also main result of this work were presented at nine international scientific forums and two 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 136 pages, including 20 figures, 4 tables and references from 216 names.

3. Results

3.1. Hippocampal neurotransmitter activity in medial septal electrolytic, neuro- and immunotoxic lesioned rats

Histological studies showed, that electrolytic lesions destroyed on average 69% (range - 50%–88%) of the intact MS. Neurotoxic lesion destroyed most of the medial septal neurons and sham lesion left the medial septum intact: there was significant difference among these groups ($t = 4.10$; $p = 0.015$; $df = 4$). Examination of the AChE stained sections showed that after injections of 192 IgG saporin into the MS, animals exhibited significantly less AChE staining in MS ($t=2.63$, $P=0.047$, $df=5$) as compared to sections obtained from control animals. 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 ibotenic acid lesioned (CA1 - $t=3.22$, $P=0.048$, $df=3$; CA3 - $t=2.33$, $P=0.08$, $df=4$); and control (CA1 - $t=4.64$, $P=0.01$, $df=4$; CA3 - $t=4.08$, $P=0.01$, $df=4$) animals.

3.2. Exploratory behavior and recognition memory in medial septal electrolytic, neuro- and immunotoxic lesioned rats

This experiment compares three types of medial septal (MS) lesions: electrolytic lesions that destroy cells and fibers of passage, ibotenic lesions that destroy GABAergic cells and largely spare

cholinergic projections to the hippocampus, and saporin infusions that only eliminate cholinergic neurons.

The results of present study indicate that control rats as well as all MS lesioned rats clearly react to the object novelty by exploring the new object more than familiar ones. These findings point to that the object novelty detection may be due to a mechanism that is not dependent on the MS.

It is interesting to note, that while the control rats showed the increase in exploration when a familiar object was moved to an unfamiliar location, the rats with electrolytic lesions of MS did not demonstrate such enhanced exploration. The present results reveal that electrolytic lesions of the MS disrupt spatial recognition memory and that the MS is more specialized for detecting spatial changes than changes in objects in the environment.

3.3. Effects of selective and nonselective Lesions of Medial Septal neurons on Learning Strategy Selection in a Visible Platform Version of the Water Maze

The data obtained in morris water maze demonstrate that in conditions of visible platform testing, differences in the platform reaching latency between the control and MS lesioned animals were not found, but when testing was performed in conditions of submerged platform, the latency of the platform finding in the neurotoxic and electrolytic MS-lesioned rats was significantly increased. This fact certifies for obvious deficit of the place learning performance strategy in the MS-lesioned rats. The present results of the escape latencies for 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 data obtained in the control and MS lesioned animals in competition trials demonstrate that decreased place-bias in ibotenic acid and electrolytic MS-lesioned rats compared to the control rats was significant. The MS electrolytic and ibotenic acid lesioned rats acquired the visible platform version of the water maze task but failed to learn the platform location in space. When the visible platform was moved to a new location they often swam directly to it. Lesions of the cholinergic SH neurons did not impair

performance on the same task. The immunotoxic MS lesioned rats, as well as control, acquired the platform location in space.

These findings suggest that the MS is essential for accurate spatial learning and suggest its role in processing information about the spatial environment, but deficits observed after septal electrolytic lesions cannot be accounted solely to the loss of hippocampal ACh.

3.4. Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on different forms of memory and learning process in rats

Effects of memantine (2,5 mg/kg or 5 mg/kg) were evaluated in three different experimental series:

- 1. on exploratory behavior and recognition memory in open field,*
- 2. on spatial memory in medial septal lesioned rats,*
- 3. on hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing*

The data obtained in the open field demonstrate that the 2,5 mg/kg memantine and saline treated rats clearly reacted to the modification of the configuration by exploring the displaced object more than nondisplaced ones. There were no significant differences among these groups ($P > 0,05$). However, the 5 mg/kg memantine group failed to show significant discrimination between the displaced and nondisplaced objects. The 2,5mg/kg memantine treatment did not affect the detection of a novel object placed in familiar location. The saline as well as 2,5 mg/kg memantine treated rats reacted to the object novelty by exploring the new object more than familiar ones. There were no significant differences among these groups ($P > 0,05$). In contrast, the 5 mg/kg memantine rats failed to show significant discrimination between the novel and familiar objects. The main results of our experiments are as follows: The memantine treatment produced a dose-related suppression of total ambulations. There was no significant impairment in detecting spatial and object novelty in the 2,5 mg/kg memantine treated rats. However, the 5 mg/kg intraperitoneal dose of memantine disrupts both recognition memory and locomotor behaviors.

The effects of acute administration of memantine on spatial memory and learning process was studied in a four-arm plus-shaped maze. We administered memantine to adult MS electrolytic lesioned and sham-lesioned rats, using doses 2.5 or 5 mg/kg. Sham-lesioned rats

trained in the place task learned more rapidly than did MS electrolytic lesioned rats. The sham-lesioned rats reached the criterion of 9/10 correct in means of 28.6 trials and MS electrolytic lesioned rats in means of 64 trials in the place version of the maze ($P < 0.01$). This fact certifies for obvious deficit of the place learning performance strategy in the MS-lesioned rats. Our findings suggest that the MS is essential for accurate spatial learning and suggest its role in processing information about the spatial environment. Our evaluation of memantine reveals that in adult rats, acute administration of memantine at doses which is therapeutic relevance for its use in AD patients disrupts memory in sham-lesioned rats and did not improve spatial memory in MS electrolytic lesioned rats.

The following investigation was conducted to determine the effects of chronic memantine treatment on hippocampal Glu and GABA release prior to, during, and after spontaneous alternation test. Also, we have investigated the effects of chronic treatment with memantine on basal and KCl-stimulated release of GLU and GABA in the hippocampus. Memantine-treated rats, relative to saline 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. The results indicate that memantine treatment produced decreased locomotor (exploratory) activity ($p < 0,05$) but did not affect spatial working memory in adult rats assessed in spontaneous alternation task ($p > 0,05$). Glu release during the 10 min samples taken at the time of the behavioral testing of memantine or saline treated 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. Hippocampal GABA levels did not change during behavioral testing of memantine or saline treated animals ($p > 0,05$). We found increase in KCl-stimulated glutamate and GABA release in the hippocampus of memantine treated rat compared to the saline treated rat. This difference in KCl response between memantine treated and control rat was statistically significant ($p < 0,01$). Notably, glutamate and GABA levels returned to baseline after the KCl stimulation speaking against any sustained damage because of the stimulation. Our evaluation of memantine reveals that changes in KCl-stimulated glutamate and GABA release after chronic memantine

treatment did not affect working memory in adult rats assessed in spontaneous alternation task.

Conclusions:

1. Medial septum is substantial for spatial, but not for object recognition memory - the object recognition memory can be supported outside the septohippocampal system;
2. Medial septum is involved in organization of the spatial map-driven behavior and this structure, along with the hippocampus, should be viewed as a constituent of the functional system responsible for the cognitive types of declarative memory;
3. The deficits observed after septal lesions cannot be accounted for solely by the loss of hippocampal ACh.
4. The selective loss of septohippocampal cholinergic or noncholinergic projections does not disrupt the function of the hippocampus to a sufficient extent to impair spatial recognition memory;
5. There is dissociation between the two major components (cholinergic and noncholinergic) of the septohippocampal pathway in exploratory behavior assessed in the open field - the memory exhibited by decrements in exploration of repeated object presentations is affected by either electrolytic or ibotenic lesions, but not saporin and this behavior relies on non-cholinergic MS cells;
6. The memantine treatment produced a dose-related suppression of total ambulations;
7. In adult rats, acute administration of memantine at doses which is therapeutic relevance for its use in AD patients disrupts memory in sham-lesioned rats and did not improve spatial memory in medial septal electrolytic lesioned rats;
8. Changes in KCl-stimulated glutamate and GABA release after chronic memantine treatment did not affect working memory in adult rats assessed in spontaneous alternation task.
9. Memantine at doses lower than are required for neuroprotection against excitotoxic injury disrupt memory. This raises the possibility that the beneficial effects seen in AD patients may be attributable to the interaction of memantine with non-glutamatergic transmitter systems.

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

Articles:

1. Dashniani M., Burjanadze M., Beselia G., Chkhikvishvili N., **Kruashvili L.** „Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on spatial memory in medial septal lesioned rats“. Georg. Med. News. 2011, no 12 (201) 2011. 54-60;
2. Dashniani M., Burjanadze M., Naneishvili T., **Kruashvili L.** , Sepashvili M., „Effects of chronic memantine treatment on hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing“ Georg. Med. News. no 1 (202) 68-75, Georgia, 2012;
3. Dashniani M., **Kruashvili L.** , Rusadze X., Mataradze S., Beselia G., „Effects of immunotoxic and electrolytic lesions of medial septal area on spatial short-term memory in rats“ Georg. Med. News. N2 (239) Georgia, 2015;
4. Dashniani M., Burjanadze M., Naneishvili T., Chkhikvishvili N., Beselia G., **Kruashvili L.** , Phochkidze N., Chighladze M., „Exploratory behavior and recognition memory in medial septal electrolytic, neuro- and immunotoxic lesioned rats“ Czech Republic, No. 5/2015, vol 64. Jurnal Physiological Research (in print)

Abstracts:

1. **2012** - Dashniani M., Burjanadze M., Beselia G., Chkhikvishvili N., **Kruashvili L.**, Naneishvili T. "The clinically tested NMDA receptor antagonist memantine does not improve spatial memory in medial septal electrolytic lesioned rats". 8th FENC Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain.
2. **2012** - Naneishvili T. Dashniani M., Burjanadze M., Beselia G., Chkhikvishvili N., **Kruashvili L.**, Sepashvili M., Mikeladze D. "Memantine treatment increase KCl-stimulated glutamate release in the rat hippocampus but does not affect working memory". 8th FENC Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain

3. **2012 - Kruashvili L.**, ISTC II International Scientific Seminar: "Neuroplasticity: Nervous Substrate for Health and Diseases. New Approaches to Research" ." Exploratory Behavior and Recognition Memory in Medial Septal Lesioned Rats" Tbilisi, Georgia
4. **2013 - Kruashvili L.**, The 37th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2013) "Effects of medial septal electrolytic and immunotoxic lesions on place and response learning of rats in the Morris water maze" Birmingham UK
5. **2013 - Kruashvili L.**, Third National Congress "Learning strategy selection in the water maze in medial septal electrolytic and selective cholinergic neurons lesioned rats" Tbilisi, Georgia
6. **2013 - Kruashvili L.**, Tbilisi 1st International Conference "Merging neuroscience and medicine: implications for brain disorders "Spatial memory following electrolytic and selective cholinergic lesion of MS" Tbilisi, Georgia
7. **2014 - Kruashvili L.**, Baku world forum of young scientists "Effects of medial septum selective cholinergic lesions on spatial memory" Baku, Azerbaijan.
8. **2014 - Kruashvili L.**, "Actual Problems of Physiology and Biomedicine", XII National scientific conference. „Effects of chronic memantine treatment on hippocampal extracellular glutamate and GABA levels during spatial alternation testing“ Kutaisi, Georgia.
9. **2014 - Kruashvili L.**, ISTC III International Scientific Seminar: "Neuroplasticity: Nervous Substrate for Health and Diseases. New Approaches to Research "Hippocampal glutamate and GABA levels during working memory task in memantine/saline rats" Tbilisi, Georgia.

