

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

AGNĖ BRAZAITYTĖ

Neurobiologijos studijų programa

Magistro baigiamasis darbas

WISTAR ŽIURKIŲ ATMINTIES SUTRIKDYMAS SKOPOLAMINU

Darbo vadovė: Prof. Valentina Vengeliienė

(parašas)

Darbo konsultantė: Dokt. Ieva Pocevičiūtė

(parašas)

Studentė: Agnė Brazaitytė

(parašas)

Vilnius, 2022

TURINYS

IVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	5
1.1. Laboratorinių gyvūnų modelių reikšmė	5
1.2. Grauzikų demencijos modeliai	5
1.3. Cholinerginės sistemos reikšmė	7
1.4. Skopolamino cheminė struktūra ir biocheminės charakteristikos	8
1.5. Skopolamino sukelti elgsenos pokyčiai	10
1.6. Grauzikų su atmintimi susijusio elgesio tyrimai	11
1.7. Su amžiumi susiję gyvūnų elgsenos pokyčiai	15
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	17
2.1. Laboratoriniai gyvūnai	17
2.2. Naudojama įranga	17
2.3. Naudojamos medžiagos	17
2.4. Atminties sutrikdymas skopolaminu	18
2.5. Su amžiumi susiję žiurkių atminties pokyčiai	18
2.6. Atviro lauko testas (angl. the open field test)	19
2.7. Naujo objekto atpažinimo testas (angl. novel object recognition test)	19
2.8. T formos labirinto testas (angl. T - maze test)	20
2.9. Žiurkių patelių lytinio ciklo nustatymas	22
2.10. Duomenų statistinė analizė	22
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	23
3.1. Atminties sutrikdymas skopolaminu	23
3.1.1. Atviro lauko testo rezultatai	23
3.1.2. Naujo objekto atpažinimo testo rezultatai	28
3.2. Su amžiumi susiję žiurkių patelių atminties pokyčiai	30
3.2.1. T formos labirinto testo rezultatai	30
3.2.2. Naujo objekto atpažinimo testo rezultatai	31
3.2.3. Atviro lauko testo rezultatai	31
3.3. Su amžiumi susiję žiurkių patinų atminties pokyčiai	34
3.3.1. T formos labirinto testo rezultatai	34
3.3.2. Naujo objekto atpažinimo testo rezultatai	35

3.3.3. Atviro lauko testo rezultatai	37
3.4. Žiurkių patelių lytinio ciklo nustatymas	39
IŠVADOS	40
SANTRAUKA	41
SANTRAUKA ANGLŲ KALBA	42
LITERATŪROS SĄRAŠAS	43

IVADAS

Gyvūnų modeliai suteikia neįkainojamų žinių apie žmogaus ligų patofiziologiją ir reikšmingai prisideda prie žmogaus sveikatos gerovės (Robinson *et al.*, 2019). Neurodegeneracinių ligų gyvūnų modeliai yra vertingi siekiant suprasti demencijos patofiziologiją. Demencija apibrėžiama kaip daugiau nei vienos pažinimo srities kognityvinis sutrikimas, kuriai būdingas intelektinių gebėjimų praradimas, trukdantis įprastai socialinei veiklai ir asmens santykiams, tačiau nėra sąmonės užtemimo ir motorinio įsitraukimo (Neha *et al.*, 2014). Viena iš labiausiai paplitusių ligų, kuriai yra būdinga demencija, yra Alzheimerio liga, ir tikimybė susirgti demencija didėja žmogui senstant (Arvanitakis *et al.*, 2019). Manoma, kad 2050 metais vyresnių nei 65 metų amžiaus žmonių skaičius pasieks 2 milijardus (Grande *et al.*, 2020). Sparčiai vykstantis visuomenės senėjimas padidina su amžiumi susijusių sveikatos sutrikimų našą, todėl ypač aktualu ieškoti veiksmingų prevencinių ir terapinių priemonių šiai problemai spręsti (Hou *et al.*, 2019).

Dėl demencijos paplitimo ir prastos ligos prognozės mokslinių tyrimų prioritetu išlieka demencijos gyvūnų modelių kūrimas ir vystymas. Šiuo metu yra sukurta įvairių demencijos ir kognityvinės funkcijos gyvūnų modelių, kurie vienas nuo kito skiriasi patofiziologija. Skiriami šie pagrindiniai modeliai: spontaninis arba senėjimo sukeltas modelis, cheminėmis medžiagomis sukelti atminties sutrikimai, transgeninis modelis, daug riebalų turinčios dietos sukelta demencija, hipoksijos sukelti atminties sutrikimai ir kiti (Neha *et al.*, 2014). Tarp cheminėmis medžiagomis sukeltų demencijos modelių farmakologinis skopolamino amnezijos modelis dažnai naudojamas sumodeliuoti su Alzheimerio liga susijusius pažinimo ir atminties sutrikimus (Haider *et al.*, 2016). Skopolaminas yra muskarininių acetilcholino (ACh) receptorių antagonistas (mAChR), sukeliantis cholinerginę blokadą. Yra žinoma, jog cholinerginė sistema atlieka svarbų vaidmenį mokymosi ir atminties procesuose, o šios sistemos sutrikimai siejami su atminties praradimu ir koreliuoja su Alzheimerio ligos sunkumo stadija (Alikatte *et al.*, 2012).

Darbo tikslas: Įdiegti farmakologinį Wistar žiurkių atminties sutrikdymo modelį.

Darbo uždaviniai:

1. Sukelti atminties sutrikdymą Wistar žiurkėms panaudojant skopolamino injekcijas ir ištirti kokią įtaką sukeltas atminties sutrikdymas turi gyvūnų elgsenai.
2. Nustatyti su amžiumi susijusius sveikų Wistar žiurkių atminties sutrikimus ir poveikį elgsenai bei palyginti su skopolamino sukeltais atminties pokyčiais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Laboratorinių gyvūnų modelių reikšmė

Laboratorinių gyvūnų modeliai atlieka itin svarbų vaidmenį biomediciniuose tyimuose tiriant elgseną bei fiziologinius ir patofiziologinius mechanizmus ir procesus. Gyvūnų modeliai vystomi ir vėliau naudojami elgesio neurobiologiniuose tyimuose dažniausiai dėl dviejų priežasčių: 1) siekiant pagilinti žinias apie mechanizmus, atsakingus už įprastą ir neįprastą elgseną; 2) sukaupiant žinias perkelti iš ikiklinikinių gyvūnų tyimų lygmens į klinikinių tyimų lygį (van der Staay *et al.*, 2009). Žinių pagilinimui apie elgsenos pokyčius atliekamos farmakologinės moduliacijos, nervinio audinio destrukcija arba naudojami laboratoriniai gyvūnai, turintys natūraliai įgimtus trūkumus. Įgytų žinių perkėlimas į klinikinius tyimus gali įvykti identifikavus potencialių vaistinių medžiagų veikimo mechanizmus bei įvertinus šių junginių neuroapsauginį (smegenis apsaugantį), degeneraciją stabdantį, psichinę sveikatą stiprinantį ar pažinimą gerinantį efektyvumą, atsižvelgiant į su gydymu susijusias rizikas tokias kaip saugumas, toksiškumas, teratologija (anomalijų atsiradimas) (van der Staay *et al.*, 2009). Idealiu atveju patikimas (angl. valid) gyvūnų modelis turėtų atitikti šiuos kriterijus: 1) sutapti su žmogaus ligos svarbiais anatomiciais, biocheminiais, neuropatologiniais arba elgsenos ypatumais (angl. face validity); 2) reaguoti į gydymą arba nuspėti gydymo veiksmingumą žmonėms (angl. predictive validity); 3) atkurti etiologinius procesus, sukeliančius žmonių ligas, ir atkartoti ligos nulemtus nervų sistemos ir elgsenos pokyčius (angl. construct or etiological validity) (Nestler *et al.*, 2010). Nei vienas iš šiuo metu prieinamų gyvūnų modelių negali atitikti visų anksčiau išvardintų kriterijų, o tik tam tikrus aspektus. Plačiausiai naudojami modeliai yra paremti genetinėmis manipuliacijomis, gydymu cheminėmis medžiagomis bei įvairių socialinių ar aplinkos veiksnių, sukeliančių stresą, pritaikymu (Czéh *et al.*, 2021). Graužikai yra plačiausiai naudojami laboratoriniai gyvūnai eksperimentiniuose tyimuose ir sudaro beveik 80 proc. visų eksperimentinių gyvūnų (Ghasemi *et al.*, 2021). Žiurkės yra plačiai naudojamas gyvūnų modelis šiuose tyimuose: toksikologijos, nutukimo, socialinio streso, osteoporozės, diabeto bei neurobiologijos (Ghasemi *et al.*, 2021). Wistar ir Sprague-Dawley žiurkės yra dažniausiai moksliniuose tyimuose naudojamos nelinijinės (angl. outbred) žiurkės. (Ghasemi *et al.*, 2021). Apibendrinant galima teigti, jog laboratorinių gyvūnų modeliai yra itin svarbūs siekiant įgyti žinių apie patofiziologinius mechanizmus, lemiančius elgsenos pasikeitimą, ir ieškant potencialių gydymo strategijų, kurių efektyvumas toliau vertinamas klinikiniuose tyimuose.

1.2. Graužikų demencijos modeliai

Kognityvinės funkcijos susilpnėjimas - bendras bruožas įvairiems neurologiniams ir psichiniams sutrikimams, tokiems kaip Alzheimerio liga, epilepsija, šizofrenija ir depresija (Bhatt *et al.*, 2014). Demencija apibūdinama kaip intelektinių gebėjimų praradimas dėl neuronų pažeidimo ar

jų žūties dėl kurių sutrinka kognityviniai procesai tokie kaip atmintis, samprotavimas ir mokymasis (Bhatt *et al.*, 2014; Haider *et al.*, 2016). Kognityvinės funkcijos sutrikimai gali būti: 1) įgimti; 2) nulemti aplinkos veiksnių tokių kaip galvos smegenų pažeidimai, psichikos ligos ir toksinės medžiagos; 3) pasireikšti dėl fiziologinių veiksnių – streso, uždegimo bei neurologinių sutrikimų (Haider *et al.*, 2016). Siekiant apibendrinti su įvairiais sutrikimais susijusius pažinimo pokyčius ir kurti terapines gydymo strategijas mokslininkai naudoja ikiklinikinius demencijos modelius (Haider *et al.*, 2016).

Dažniausiai naudojami gyvūnų demencijos modeliai yra sukurti taikant farmakologines intervencijas, nukreiptas į įvairius receptorių lygius (Haider *et al.*, 2016). Eksperimentiškai įrodyta, jog tarp visų farmakologiškai sukeltų demencijos modelių skopolamino sukeltas amnezijos modelis (angl. scopolamine-induced amnesic model) dažnai naudojamas sumodeliuoti su Alzheimerio liga susijusius kognityvinės funkcijos ir atminties sutrikimus (Haider *et al.*, 2016). Farmakologiniams modeliams taipogi priskiriamas kortikosterono streso modelis (angl. corticosterone-induced stressed model), kurį kai kurie tyrėjai naudoja kaip neuroendokrininį arba emocinį demencijos modelį (Darcet *et al.*, 2014). Darcet ir kiti (2014) nustatė, jog 4 savaitių trukmės kortikosterono skyrimas 8-10 savaitių amžiaus C57BL/6J pelėms sukėlė epizodinės, asociatyvinės ir vizualinės-erdvinės atminties sutrikimus. (Woodson *et al.*, 2003) ištyrė, kad stresą sukeliantis veiksnys - plėšrūną (katę) imituojantys vaizdiniai, garsiniai ir uosliniai elementai Sprague-Dawley žiurkėms sutrikdė nuo hipokampo priklausomą darbinę erdvinę atmintį bei buvo nustatyta reikšminga koreliacija tarp padidėjusio kortikosterono lygio ir atminties sutrikdymo. Mokslininkai taip pat yra išvystę atminties sutrikdymo modelį, kurį sukelia triukšmas (Haider *et al.*, 2016). (Azman *et al.*, 2015) nustatė, kad po 14 dienų kasdien Sprague-Dawley žiurkėms pateikiamo 4 valandų trukmės 100 dB triukšmo, jų kognityviniai gebėjimai suprastėjo. Kitas demencijos modelis - sunkiųjų metalų sukelta demencija (Neha *et al.*, 2014). Nustatyta, kad metalai: geležis, varis, chromas, kobaltas, aliuminis ir cinkas gali padidinti reaktyvių deguonies formų (angl. reactive oxygen species, ROS) susidarymą ir lemti demencijos išsivystymą (Neha *et al.*, 2014). Aliuminio sukeltas neurotoksiškumo modelis, nulemiantis kognityvinės funkcijos sutrikimus, yra plačiai naudojamas tarp tyrėjų (Jayanthi *et al.*, 2013). Aliuminis, perėjęs kraujo-smegenų barjerą kaupiasi hipokampo piramidiniuose neuronuose ir kaktinėje smegenų žievėje (angl. frontal cortex) (Neha *et al.*, 2014; Haider *et al.*, 2016). Aliuminis sutrikdo vizualinę atmintį, dėmesį ir susikaupimą (Haider *et al.*, 2016). Be jau anksčiau paminėtų farmakologinių bei aplinkos poveikio sukeltų graužikų demencijos modelių dar yra išskiriami spontaniniai arba fiziologiniai modeliai, kuriems priskiriamas natūralus senėjimo modelis (Haider *et al.*, 2016). Senstantys gyvūnai naudojami dėl su amžiumi susijusio kognityvinio sutrikimo ir elgsenos pokyčių (Neha *et al.*, 2014). Šie kognityvinės funkcijos pakitimai siejami su struktūriniais neuronų, sinapsių ir nervinių skaidulų pokyčiais, taip pat dėl neuromediatorių kiekio pasikeitimo, oksidacinės

pažaidos galvos smegenyse (Haider *et al.*, 2016). Apibendrinant galima teigti, kad šiuo metu yra išvystyta įvairių gyvūnų modelių, kurie atspindi demenciją ir kitus pažinimo sutrikimus. Spontaninis, su amžiumi susijęs gyvūnų modelis yra neinvazyvus, natūralus ir be jokių neurocheminių manipuliacijų (Neha *et al.*, 2014). Skopolaminas eksperimentiniams tikslams dažnai naudojamas kaip standartinis vaistas siekiant sutrikdyti atmintį ir šiam modeliui nereikalingos chirurginės procedūros (Neha *et al.*, 2014).

1.3. Cholinerginės sistemos reikšmė

Cholinerginės sinapsės aptinkamos žmogaus centrinėje nervų sistemoje (Hampel *et al.*, 2018). Šių sinapsių didelis tankis gumbure, dryžuotame kūne (angl. striatum), limbinėje sistemoje bei naujojoje smegenų žievėje (angl. neocortex) byloja, jog cholinerginė sistema yra kritiškai svarbi atminčiai, mokymuisi, dėmesiui bei kitoms aukštesnėms galvos smegenų funkcijoms. Cholinerginė sistema atlieka pagrindinį vaidmenį moksliniuose tyrimuose, kuriuose tiriamas įprastas pažinimas ir su amžiumi susijęs kognityvinės funkcijos susilpnėjimas įskaitant demencijas pvz. Alzheimerio ligą (Hampel *et al.*, 2018).

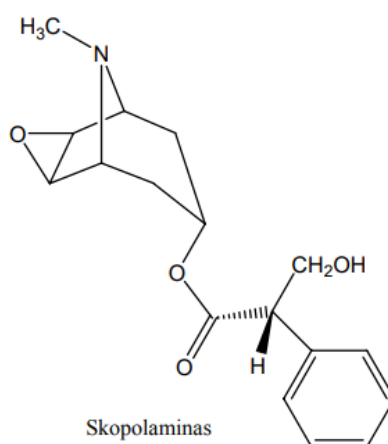
ACh yra pagrindinis neurotransmiteris galvos smegenyse, kuris pasižymi aktyvumu visoje galvos smegenų žievėje, pamato branduoliuose ir priekiniame smegenų pamate (Hampel *et al.*, 2018). Nustatyta, jog ACh dalyvauja daugelyje svarbių funkcijų įskaitant: 1) cheminį signalo perdavimą nervo-raumens jungtyje; 2) autonominę funkciją periferinėje nervų sistemoje; 3) tarpininkavimą dėmesio, mokymosi ir atminties procesuose (Bertrand *et al.*, 2020). ACh sintezei reikalingi substratai – cholinai ir acetilkofermentas A (acetyl-CoA) bei fermentas cholino acetiltransferazė (Bertrand *et al.*, 2020). Neuromediatoriaus ACh perteklius sinapsiniame plyšyje hidrolizuojamas fermento acetilcholinesterazės (AChE) iki cholino ir acetato, kurie grąžinami perdirbimui naudojant įsisavinimo (angl. uptake) mechanizmą (Hampel *et al.*, 2018; Bertrand *et al.*, 2020). ACh sukelia poveikį jungdamasis prie membranoje esančių dviejų receptorių tipų: 1) su G baltymu susijusių mAChR, kurių aptinkama centrinėje ir periferinėje nervų sistemose; 2) su ligandu susijusių (jonotropinių) nAChR, kurių randama centrinėje ir periferinėje nervų sistemose, neuronuose iš parasimpatinių ganglijų, nervo- – raumens jungtyje (Bertrand *et al.*, 2020).

Egzistuoja cholinerginė hipotezė, paaiškinanti ACh vaidmenį mokymosi ir atminties procesuose (Klinkenberg *et al.*, 2010). Ši hipotezė susideda iš trijų svarbių mokslinių atradimų: 1) smegenų žievėje atrasta, jog yra sumažėjęs presinapsinio cholinerginio žymens - fermento cholino acetiltransferazės kiekis; 2) nustatyta, jog Meynerto pamato branduolys (lot. nucleus basalis Meynert), esantis priekiniame smegenų pamate, yra smegenų žievės cholinerginės inervacijos šaltinis, ir pvz., sergant Alzheimerio liga, pasireiškia šios srities neurodegeneraciniai procesai; 3) cholinerginiai antagonistai sutrikdo atmintį, o agonistai pasižymi priešingu poveikiu (Hampel *et al.*,

2018). Cholinerginė Alzheimerio ligos hipotezė paremta laipsnišku limbinės sistemos ir naujosios smegenų žievės cholinerginės inervacijos praradimu (Hampel *et al.*, 2018). Manoma, kad neurofibrilinė degeneracija priekinių smegenų pamate yra pagrindinė priekinių smegenų cholinerginių neuronų disfunkcijos ir mirties priežastis, kuri sukelia presinapsinės cholinerginės inervacijos praradimą (Hampel *et al.*, 2018). Dėl cholinerginių neuronų disfunkcijos ar žūties suprastėja kognityviniai gebėjimai (Bhuvanendran *et al.*, 2018). Taip pat eksperimentiškai patvirtinta, kad AChE aktyvumas yra reikšmingai padidėjęs Alzheimerio liga sergančių pacientų galvos smegenų žievėje, hipokampe bei migdoliniame kūne (Manral *et al.*, 2016). Remiantis cholinergine hipoteze viena iš Alzheimerio ligos gydymo strategijų galėtų būti – panaudoti junginius, kurie blokuotų fermentus, skaidančius ACh (Hampel *et al.*, 2018). Tokiems junginiams priskiriami cholinesterazės arba acetilcholinesterazės inhibitoriai, kurie slopina ACh skilimą ir išlaiko jo aktyvumą cholinerginėse sinapsėse. Šiuo metu prieinami, JAV maisto ir vaistų administracijos (angl. Food and Drug Administration) patvirtinti cholinesterazės inhibitoriai yra donepezilas, rivastigminas ir galantaminas (Hampel *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2019). Vis dėlto, acetilcholinesterazės inhibitoriai turi trūkumų – pasireiškia nepageidaujamas cholinerginis poveikis (pykinimas, vėmimas, diarėja, anoreksija, pilvo skausmai), hepatotoksiškumas (Manral *et al.*, 2016; Colovic *et al.*, 2013). Taipogi šie vaistiniai preparatai tik palengvina kai kuriuos simptomus ir turi ribotas galimybes užkirsti kelią tolimesniam ligos progresavimui (Hou *et al.*, 2019). Apibendrinant galima teigti, jog cholinerginė sistema yra itin reikšminga kognityvinėms funkcijoms (mokymuisi, atminčiai) ir šios sistemos pažeidimai prisideda prie demencijos, įskaitant Alzheimerio ligą, išsivystymo.

1.4. Skopolamino cheminė struktūra ir biocheminės charakteristikos

Skopolaminas (hioscinas, angl. devil's breath) priskiriamas tropano alkaloidų klasei, kurių struktūrinis elementas yra 8-metil-8-azabicyklo[3.2.1]oktanas (tropanas) (1 pav.). Skopolaminas natūraliai gaunamas kaip antrinis bulvinių (*Solanaceae*) šeimos augalų metabolitas arba cheminės sintezės metu (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019).



1 pav. Skopolamino bendroji struktūrinė formulė

Skopolaminas geba pereiti kraujo-smegenų barjerą (Jahanshahi *et al.*, 2020). Šis junginys plačiai naudojamas kaip anticholinerginis vaistinis preparatas, kurio veikimo mechanizmas – konkurentiškas, neselektyvus jungimasis prie mAChR, neleidžiant prie receptoriaus jungtis neurotransiteriui ACh (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). Dėl pernelyg didelio ACh išsiskyrimo yra pažeidžiamas hipokampus ir priklausomai nuo skopolamino dozės sutrinka mokymasis ir atmintis (Neha *et al.*, 2014). Taipogi nustatyta, kad didelės skopolamino koncentracijos gali blokuoti ir nikotininius acetilcholino receptorių (nAChR) (Klinkenberg *et al.*, 2010). Metabotropiniai mAChR priskiriami prie su G baltymu susijusių receptorių (angl. G-protein-coupled receptors, GPCPs) šeimos poklasio ir turi penkis subtipus (M1-M5) (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). M1, M3 bei M5 subtipai yra susijungę su moduliuojančiu Gq receptoriumi ir generuoja citozolinio kalcio praėjimą per fosfolipazės C signalizacijos kelią (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). M2 ir M4 subtipai jungiasi su Gi baltymu ir slopina adenilil ciklazę (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). M1 subtipo receptorių randama centrinėje nervų sistemoje, ganglijuose ir jie dalyvauja atminties bei mokymosi procesuose (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). M1 subtipo receptoriai yra labiausiai paplitę tarp visų mAChR receptorių subtipų ir aptinkami galvos smegenyse, įskaitant dryžuotąjį kūną (Xiang *et al.*, 2012). M1 subtipo receptoriai taip pat svarbūs motorinėms funkcijoms bei jų kontrolei, miego ir budrumo ciklo reguliacijai (Xiang *et al.*, 2012). M2 subtipo receptoriai aptinkami širdyje, M3 receptoriai dalyvauja lygiųjų raumenų susitraukime (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). M4 receptorių aptikta priekinėse smegenyse, hipokampe bei dryžuotame kūne ir manoma, kad jie dalyvauja skausmo procesuose (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). M5 receptorių fiziologinis poveikis dar nėra tiksliai išaiškintas, tačiau manoma, kad šie receptoriai dalyvauja galvos smegenų kraujotakoje ir sukelia kraujagyslių susitraukimą ir išsiplėtimą bei azoto oksido sintazės aktyvaciją (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). Skopolaminas neteikia pirmenybės jokiai mAChR receptorių subtipui, jis neselektyviai blokuoja ACh prisijungimą prie šių receptorių ir tokiu būdu paveikia fiziologines funkcijas (Klinkenberg *et al.*, 2010).

Skopolaminas dėl neselektyvaus jungimosi prie skirtingų mAChR subtipų sukelia centrinį ir periferinį poveikį (Klinkenberg *et al.*, 2010). Manoma, kad centrinį skopolamino poveikį lemia M1 ir greičiausiai M5 subtipai dėl jų specifinio pasiskirstymo galvos smegenyse (Klinkenberg *et al.*, 2010). Skopolaminas taip pat sukelia ir periferinį poveikį: plečia akių vyzdžius, sutrikdo lęšiuko akomodaciją, sumažina seilių išsiskyrimą ir spėjama, kad tai sukelia M3 subtipo receptorių blokada (Klinkenberg *et al.*, 2010). Šis junginys taipogi sukelia spazmolitinį, vietinį anestezinį poveikį bei nuo dozės priklausomą psichoaktyvų poveikį bei haliucinacijas (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). Skopolaminas anksčiau naudotas medicinoje: transderminiu būdu buvo skiriamas supimo ligai (angl.

motion sickness) gydyti (Kohnen-Johannsen *et al.*, 2019). Apibendrinant galima teigti, jog skopolaminas yra anticholinerginis vaistinis preparatas, kuris neselektyviai jungiasi prie skirtingų mAChR subtipų ir sukelia centrinį bei periferinį poveikį.

1.5. Skopolamino sukelti elgsenos pokyčiai

Skopolaminas, dėl centrinės cholinerginės sistemos veiklos blokavimo, sukelia dėmesio išlaikymo, informacijos apdorojimo, naujų žinių įgijimo grįžtamus sutrikimus tiek graužikams, tiek žmonėms (Alikatte *et al.*, 2012). Dėl šios priežasties skopolamino farmakologinis modelis plačiai naudojamas studijuoti su demencija susijusias ligas (Tang, 2019). Skopolaminas sutrikdo ilgalaikę potenciaciją (angl. long term potentiation, LTP), todėl naudojamas Alzheimerio ligos gyvūnų modeliuose (Alikatte *et al.*, 2012). Šis mAChR antagonistas taip pat turi įtakos darbinei atminčiai, kuri svarbi atliekant kompleksines, kognityvines užduotis (Tang, 2019). Neurobiologiniai tyrimai rodo, kad skopolaminas gali sutrikdyti trumpalaikę atmintį bei gebėjimą mokytis (Tang, 2019). Skopolaminu paveiktos žiurkės pasižymi sutrikusiais erdviniais mokymosi gebėjimais (Chen *et al.*, 2014).

Manoma, kad skopolamino sukeltas atminties sutrikdymas yra susijęs su oksidacine pažeida bei AChE aktyvumo pokyčiais (Hosseini *et al.*, 2015). Tyrėjai Hosseini ir kt. (2015) analizavo sėjamosios juodgrūdės (lot. *Nigella sativa L.*) ekstrakto poveikį atminčiai ir mokymuisi panaudojant skopolamino modelį bei vertino galvos smegenų audinių oksidacinę pažeidą ir AChE aktyvumą. Wistar žiurkių patinai atsitiktinai buvo suskirstyti į keturias grupes. Pirmai grupei buvo atliktos intraperitoninės (i.p.) fiziologinio tirpalo injekcijos viso testo metu; antrai grupei – fiziologinio tirpalo injekcijos buvo atliekamos kasdien 2 savaites ir 30 minučių prieš kiekvieną Morris vandens labirinto testo eksperimentą papildomai skirtos 2 mg/kg kūno masės skopolamino injekcijos (i.p.); trečiai ir ketvirtai grupėms kasdien 2 savaites buvo leidžiamos injekcijos (i.p.) atitinkamai 200 mg/kg bei 400 mg/kg sėjamosios juodgrūdės ekstrakto ir galiausiai atliktos 2 mg/kg skopolamino injekcijos (i.p.) 30 minučių iki Morris vandens labirinto testo eksperimentų. Elgsenos testo metu vertinta po kiek laiko, nuo gyvūno patalpinimo į vandens labirintą momento, žiurkė pasiekia platformą ir kokį atstumą nuplaukė labirinte. Po atliktų elgsenos testų gyvūnų galvos smegenys buvo pašalintos ir žievės audiniuose nustatytas AChE aktyvumas, lipidų peroksidazės žymens malondialdehido kiekis. Gauti elgsenos testų rezultatai parodė, jog antros grupės laikas, kada pasiekta platforma, buvo statistiškai reikšmingai ilgesnis, o nuplauktas atstumas didesnis nei kontrolinės grupės. Taip pat nustatyta, jog antros grupės AChE aktyvumas ir malondialdehido kiekis žievėje lyginant su kontroline grupe buvo statistiškai reikšmingai didesnis. Rezultatai patvirtino, jog skopolaminas sukelia erdvinės atminties sutrikimus, padidina AChE aktyvumą ir sukelia oksidacinę pažeidą (Hosseini *et al.*, 2015).

mAChR antagonistų sisteminis skyrimas, pvz., skopolamino 0,5-10 mg/kg kūno masės intraperitoninės injekcijos, žiurkėms padidino lokomotorinį aktyvumą (Chintoh, 2003). Viena iš teorijų, kaip skopolaminas sukelia hiperaktyvumą, galėtų būti dėl smegenų kamienui priklausančio dorsalinės tilto dalies cholinerginės sistemos (angl. mesopontine cholinergic system) slopinimo sutrikdymo. Taip pat yra nustatyta, jog sisteminės skopolamino 1-10 mg/kg kūno masės intraperitoninės injekcijos padidina dopamino išlaisvinimą dryžuotame kūne ir tomis pačios dozėmis sukelia lokomotorinio aktyvumo padidėjimą (Chintoh, 2003). Kitame tyrime nustatyta žiurkių hipokampo, dryžuotojo kūno bei kaktinės smegenų žievės (angl. frontal cortex) cholinerginio aktyvumo teigiama koreliacija su 0,4 mg/kg kūno masės skopolamino injekcijų po oda sukeltu hiperaktyvumu (Day *et al.*, 1991; Klinkenberg *et al.*, 2010). Skopolamino nulemti gyvūnų lokomotorinio aktyvumo pokyčiai taip pat priklauso nuo įvairių eksperimentinių veiksnių: naudojamų laboratorinių gyvūnų nelijininio kamieno (klono) ar linijos, elgsenos testo, vaistinių medžiagų koncentracijos ir kt. (Klinkenberg *et al.*, 2010). Apibendrinant galima teigti, jog skopolaminas sukelia šiuos elgsenos pokyčius: grįžtamą kognityvinės funkcijos sutrikimą bei padidina lokomotorinį aktyvumą.

1.6. Graužikų su atmintimi susijusio elgesio tyrimai

Šiomis dienomis naudojama didelė graužikų elgsenos testų įvairovė siekiant įvertinti gyvūnų sensorines ir motorines funkcijas, socialines sąveikas, su nerimu ir depresija susijusius elgesio bruožus, priklausomybes nuo įvairių medžiagų ir pažintines funkcijas tokias kaip mokymasis ir atmintis (Hånell *et al.*, 2014). Elgsenos testų rezultatų interpretavimui svarbu remtis žiniomis apie natūralią graužikų elgseną ir jų gebėjimus ir įvertinti etologinį (gyvūnų elgesio) testo pagrįstumą (Belovicova *et al.*, 2017).

Vienas iš dažniausiai naudojamų elgsenos testų – atviro lauko testas (angl. open field test), kuris paremtas spontanine graužikų elgsena t.y. naujos aplinkos atvirame lauke tyrinėjimu. Nors atviro lauko testas kartais įvardijamas kaip standartizuotas testas, tačiau kai kurie parametrai skiriasi: arenos dydis ir forma, apšvietimo lygis, gyvūno susipažinimas su arena (vienkartinis ar pakartotinis), testo trukmė (1-30 min.), testavimo dienos laikas, motyvacija (maisto ir/ar vandens stokojantys gyvūnai), gyvūnų laikymo sąlygos iki testo pradžios (individualiai ar socialinėmis grupėmis), gyvūnų lytis ir kt. Šio testo pradžios metu gyvūnai patalpinami į arenos centro zoną, dažniausiai 5 minutėms, ir vertinamas horizontalus judėjimas, vertikalaus aktyvumo dažnis bei savęs švarinimosi veiksmas (angl. grooming) (Belovicova *et al.*, 2017). Tyrėjai Haider ir kt. (2016) siekiant nustatyti gyvūnų lokomotorinį aktyvumą ir tiriamąjį elgesį pasirinko atviro lauko testą. Tyrime buvo panaudota kvadrato formos arena (76 cm × 76 cm) su nepermatomomis 42 cm aukščio sienomis, o arenos grindys buvo padalintos į 25 lygius langelius. Elgsenos testo pradžios metu gyvūnas buvo perkeltas į

centrinį atviro lauko langelį, eksperimentas tęsėsi 5 minutes. Aktyvumas buvo nustatytas apskaičiavus latencijos periodą ir suskaičiuojant langelių skaičių, kuriuos žiurkė visomis keturiomis galūnėmis perėjo (Haider *et al.*, 2016).

Gyvūno nerimo įvertinimui naudojamas elgsenos testas – pakeltas pliuso formos labirintas (angl. elevated plus maze, EPM) (Belovicova *et al.*, 2017). Graužikai įprastai vengia atvirų ir stipriai apšviestų vietų, bet tuo pačiu yra linkę tyrinėti naujas vietas, todėl vertinamas šių priešingų dirgiklių santykis. Skačiuojami įėjimai į atviras ir uždaras rankoves, centro zoną bei bendras laikas, praleistas šiose zonose. Kuo atvirose rankovėse praleistas laikas ilgesnis tuo gyvūnas pasižymi žemesniu nerimo lygiu (Belovicova *et al.*, 2017).

Jau seniai buvo pastebėta, kad žiurkės yra linkusios labiau tyrinėti naują objektą nei iš anksčiau pažįstamą objektą (Wooden *et al.*, 2021). Ši tendencija nulėmė, kad buvo sukurtas naujo objekto atpažinimo testas (angl. novel object recognition task, NOR). Šis testas yra dažnai naudojamas graužikams įvertinti atpažinimo atmintį pažįstamiems objektams, pamatuojuant teikiamą bei pirmenybę naujam objektui (Wooden *et al.*, 2021). Naujo objekto atpažinimo testui atlikti nereikia pastiprinimo ar bausmės siekiant motyvuoti gyvūno elgseną ir ilgų mokymų prieš eksperimentų pradžią. Šis testas paremtas natūraliu graužiko polinkiu tyrinėti aplinką, artintis ir domėtis objektais, kurie yra naujoviški. Naujo objekto atpažinimo testas plačiai naudojamas tirti atmintį, sinapsinį plastiškumą, galvos smegenų ligos sukeltą funkcijos sutrikimą arba atsigavimą po ligos, streso poveikį, senėjimo procesus (Wooden *et al.*, 2021). Testo metu gyvūnas pirmiausia susipažįsta su dviem identiškais objektais, kurie greitai taps pažįstamais objektais (A1+A2) ir grąžinami atgal į narvelį retencijos arba sulaikymo periodui. Antrosios fazės metu gyvūnui pateikiami vienas jau pažįstamas ir kitas naujas objektai (A+B). Naujas objektas nuo pažįstamo objekto gali skirtis forma, dydžiu, spalva ir kitais požymiais. Laikas, kurį gyvūnas praleido tyrinėdamas naująjį objektą palyginamas su laiku, kurį gyvūnas praleido tyrinėdamas pažįstamą objektą antrosios fazės metu. Jeigu gyvūnas daugiau laiko praleidžia prie naujojo objekto yra prieinama prie išvados, kad gyvūnas atskyrė objektus pagal požymius, kurie būdingi jau pažįstamam objektui ir kurie buvo aptikti naujame objekte. Vienas iš šio testo trūkumų – nėra tikslaus teste naudojamų objektų standartizavimo. Funkcinės objektų savybės gali turėti didelės įtakos pradiniam graužiko susidomėjimui ir jį gali paveikti priklausomai nuo to, ar objektas yra pritvirtintas ar gali būti pajudintas iš vietos. Objektai taip pat gali būti per dideli ar kitais būdais sukelti graužikui sunkumų natūraliai parodyti susidomėjimą (Wooden *et al.*, 2021).

Vienas labiausiai išvystytų elgsenos testų, skirtų erdvinės darbinės atminties įvertinimui yra spontaninio kaitaliojimo T formos labirinto testas (angl. spontaneous alternation T-maze) (d’Isa *et al.*, 2021). T formos labirintą sudaro pradžios rankovė bei dvi šoninės (kairė ir dešinė) rankovės. Šis

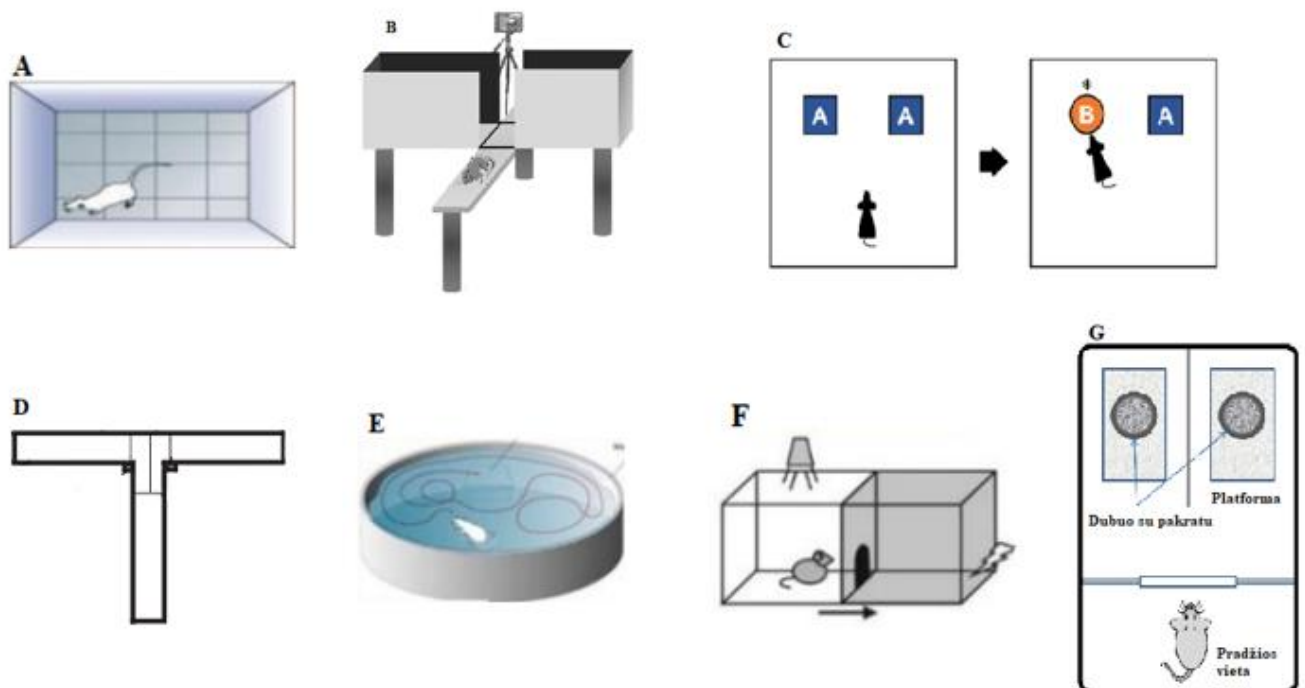
elgsenos testas paremtas natūraliu graužikų polinkiu pirmenybę teikti naujos rankovės tyrinėjimui ir tai skatina juos rinktis dar neištirtą tikslią rankovę pakartotinių bandinių metu. Pirmojo bandinio metu gyvūnas pasirenka vieną iš šoninių rankovių, o antrojo bandinio metu, kai atidarytos abi rankovės, gyvūnas pirmenybę teikia prieš tai dar netyrinėtai rankovei. Trečio bandinio metu, jeigu toks būtų atliktas, kai jau abi rankovės aplankytos, sveikas gyvūnas rinksis tą rankovę, kurios aukštesnis naujumo laipsnis (d'Isa *et al.*, 2021).

Morris vandens labirinto testas (angl. the Morris water maze) yra populiari užduotis siekiant iširti žiurkių erdvinę navigaciją bei atmintį. Hipokampus atlieka reikšmingą vaidmenį erdvinėje navigacijoje ir atminties procesuose (Bye *et al.*, 2019). Morris vandens labirinto testas yra nesudėtinga užduotis, kuriai atlikti yra panaudojamas neskaidraus vandens pripildytas baseinas su jame panirusia platforma. Siekiant išvengti vandens gyvūnas turi surasti paslėptą platformą. Manoma, jog mokymasis gali padėti gyvūnui, panaudojant erdvinę atmintį, nustatyti paslėptos platformos lokaciją. Vienas iš labiausiai priimtinių paaiškinimų, kaip gyvūnas išsprendžia užduotį – užuominų, esančių už labirinto ribų naudojimas. Šiomis aplinkos užuominomis gali būti vizualiai matomi objektai kambaryje tokie kaip durys, langai ir pan., o lokacijos vieta išmokstama nustatant ryšį tarp tolumoje esančios užuominos bei platformos vietos. Baseino uždengimas uždanga neleidžia sėkmingai mokytis vandens labirinto užduoties ir panaudoti erdvinius prisiminimus po mokymosi (Bye *et al.*, 2019).

Pasyvaus vengimo testas (angl. passive avoidance test) – baimės testas, skirtas įvertinti gyvūno atmintį, kuri paremta asociacija tarp nepageidaujamo stimulo ir specifinio aplinkos konteksto (Haider *et al.*, 2016). Tai operantinio sąlygojimo užduotis, kurios metu gyvūnas išmoksta išvengti nepageidaujamo stimulo. Eksperimento metu žiurkė gali laisvai tyrinėti šviesų ir tamsų kambario skyrius (angl. compartment), kurie tarpusavyje sujungti, o nepageidaujamas stimulus – lengvas pėdų šokas pateikiamas vienoje iš skyriaus pusių. Testo metu gyvūnas išmoksta susieti tam tikras kambario skyriaus ypatybes su pėdų šoku. Laikas, kada gyvūnas įeina į skyrių, kuris susietas su nepageidajamu stimulu pvz. šoku yra naudojamas kaip indikatorius mokymosi ir atminties įvertinimui. Žiurkė, kuri išmoko užduotį vengs skyriaus, kuris asocijuojasi su nepageidajamu stimulu ir pasižymės ilgesne laiko trukme, kada pirmą kartą į jį įeis (Haider *et al.*, 2016).

Dėmesio perkėlimo užduotis (angl. attentional set shift task, ASST) – elgsenos testas, skirtas įvertinti prefrontalinės smegenų žievės funkciją (Popik *et al.*, 2015). Šis testas buvo sukurtas matuoti žiurkių dėmesį ir kognityvinį lankstumą. Tyrimais nustatyta, kad prefrontalinės žievės pažeidimai sukelia kognityvinį nelankstumą arba sutrikusį gebėjimą perkelti dėmesį (Heisler *et al.*, 2015). Testo metu dėmesys laikomas susiformavusiu, kai gyvūnas išmoksta, jog tam tikros taisyklės gali būti pritaikomos kompleksiniam stimului siekiant atskirti reikšmingas užuominas nuo nereikšmingų pvz.

dėmesio perkėlimo užduoties metu gyvūnas išmoksta atkreipti dėmesį ir reaguoti į reikšmingą užuominą (pakratą) ir nekreipti dėmesio į nereikšmingą užuominą (kvapą) ir tokiu būdu suporuoti maisto atlygį su reikšminga užuomina. Vėliau ši sąsaja sustiprinama atliekant kitas užduotis, kuriose keičiasi reikšmingos užuominos pakrato tipas ir nereikšmingos užuominos kvapas, bet ryšys tarp maisto atlygio ir pakrato išlieka. Ši sustiprinta taisyklė suformuoja pažinimą. Du dėmesio perkėlimo užduoties etapai matuoja kognityvinį lankstumą: pasikeitimo perkėlimas ir papildomų dimensijų perkėlimas. Pasikeitimo perkėlimo metu prieš tai buvęs neigiamas stimulus su viena dimensija tampa teigiamu ir gyvūnas turi ignoruoti teigiamą stimulą iš ankstesnio etapo pvz. jeigu ankstesniame etape kartono pakratas buvo teigiamas stimulus, o popieriaus pakratas buvo neigiamas stimulus tuomet pasikeitimo perkėlimo metu bus atvirkščiai. Ši užduotis sukelia iššūkių gyvūno lankstumui, nes jis turi išlaikyti dėmesį, kad pakratas yra reikšminga užuomina ir tuo pačiu metu keisti išmoktą reikšmingos užuominos ir maisto atlygio poros taisyklę dimensijoje. Tuo metu papildomų dimensijų perkėlimo metu nereikšminga užuomina (šiuo atveju kvapas) tampa reikšminga užuomina. Pasikartojantis gyvūno atsakas, kurį parodo besitęsiantis pasirinkimas pagal anksčiau išmoktą taisyklę bet kuriuo etapu atspindi kognityvinio lankstumo trūkumą (Heisler *et al.*, 2015). Apibendrinant galima teigti, jog naudojami įvairūs graužikų elgsenos testai (2 pav.) siekiant įvertinti: lokomotorinį aktyvumą, su nerimu susijusius pokyčius, atpažinimo atmintį, erdvinę atmintį bei navigaciją, baimės sukeltą pasikeitusią elgseną, gebėjimus perkelti dėmesį ir kognityvinį lankstumą.



2 pav. Skirtingi graužikų elgsenos testai: A - atviro lauko testas (Haider *et al.*, 2016), B - pakeltas pluso formos labirintas (Sweis *et al.*, 2016), C - naujo objekto atpažinimo užduotis (Kim

et al., 2019), D - T formos labirintas (Deacon *et al.* 2006), E - Morris vandens labirintas (Haider *et al.*, 2016), F - pasyvaus vengimo testas (Haider *et al.*, 2016), G - dėmesio perkėlimo užduotis (Tanaka *et al.*, 2011).

1.7. Su amžiumi susiję gyvūnų elgsenos pokyčiai

Laboratorinės žiurkės (lot. *rattus norvegicus*) gyvenimo trukmė siekia apie 2-3,5 metus (vidurkis 3 metai). Žiurkės lytiškai subręsta būdamos 6 savaičių amžiaus, o socialinė branda įvyksta tarp 5-6 mėnesių (Sengupta, 2013). Yra žinoma, jog žiurkių elgsena keičiasi priklausomai nuo gyvūno amžiaus (Sudakov *et al.*, 2021). Tyrėjai Sotoudeh ir kt. (2020) atliko tyrimą, kurio metu siekė išanalizuoti su amžiumi susijusius morfologinius pokyčius šiose galvos smegenų struktūrose: migdoliniame kūne (angl. amygdala) bei vidinėje prefrontalinėje smegenų žievėje (angl. medial prefrontal cortex, mPFC) bei įvertinti su nerimu susijusio elgesio pokyčius tarp jaunų ir vyresnio amžiaus žiurkių patinų panaudojant pakeltą pliuso formos labirintą. Eksperimente buvo palyginti jauni 2-3 mėnesių amžiaus Wistar žiurkių patinai su senais 18-20 mėnesių amžiaus patiniais. Gyvūno nerimui įvertinti buvo skaičiuojama procentinė vertė viso laiko, praleisto atvirose rankovėse, bei su atviromis rankovėmis susiję įėjimai. Po atlikto elgsenos testo gyvūnų galvos smegenys buvo pašalintos bei buvo vertinti stereologiniai parametrai, dendritų kompleksiskumas, erdvinis neuronų pasiskirstymas vidinėje prefrontalinėje smegenų žievėje ir migdoliniame kūne. Pakelto pliuso formos labirinto testo rezultatai parodė, jog senų patinų procentinės įėjimų į atvirą rankovę bei laiko, praleisto atvirose rankovėse, reikšmės lyginant su jaunais patiniais reikšmingai sumažėjo. Šie rezultatai parodo, jog senų žiurkių nerimo lygis yra padidėjęs. Taip pat tyrėjai nustatė, jog su amžiumi didėja migdolinio kūno tūris ir jo bendras neuronų skaičius. Taipogi buvo ištirta, kad vidinėje prefrontalinėje smegenų žievėje neuronų dydis buvo padidėjęs, o bendras dendritų ilgis ir jų kompleksiskumas su amžiumi reikšmingai sumažėjo šioje smegenų struktūroje, o migdoliniame kūne padidėjo. Šio tyrimo išvadoje mokslininkai teigia, kad su amžiumi padidėjęs nerimo lygis galėtų būti siejamas su struktūriniais dendritų ir neuronų morfologiniais pokyčiais, jų erdvinio pasiskirstymu migdoliniame kūne bei vidinėje prefrontalinėje smegenų žievėje (Sotoudeh *et al.*, 2020).

Sudakov ir kt. (2021) tyrė su amžiumi susijusius jaunų (2 mėnesių amžiaus) ir suaugusių (5 mėnesių amžiaus) Wistar žiurkių elgsenos pokyčius. Tyrimo metu buvo atliekami šie elgsenos testai: atviro lauko testas bei pakelto pliuso formos labirinto testas bei vertintas gyvūnų motorinis aktyvumas ir nerimas. Gauti rezultatai parodė, jog suaugusių Wistar patinų ir patelių motorinis aktyvumas ir noras tyrinėti aplinką lyginant su jaunais patiniais sumažėjo. Taip pat buvo nustatyta, kad su amžiumi susiję suaugusių žiurkių elgsenos pokyčiai priklauso nuo individualių gyvūno savybių (Sudakov *et al.*, 2021).

Mokslininkai Buechel ir kt. (2014) atliko tyrimą siekdami sužinoti, ar vyresnio amžiaus gyvūnai į ūminį psichosocialinį stresorių reaguoja skirtingai nei jauno amžiaus gyvūnai. Eksperimente buvo panaudoti 3 mėnesių ir 21 mėnesių amžiaus Fischer 344 žiurkių patinai. Elgsenos pokyčiai vertinti atliekant vandens labirinto testą. Erdvinės vandens labirinto užduoties metu buvo naudojamos erdvinės užuominos, esančios už baseino ribų. Eksperimentui atlikti naudotas 4 dienų protokolai. 1-3 dienomis buvo atliekami 3 bandiniai per dieną, kai platforma yra šiek tiek žemiau vandens paviršiaus. Gyvūnai testą pradėdavo vis kitoje vietoje, jiems buvo skirta 1 minutė surasti platformą, 1 minutė stovėti ant platformos ir 2 minučių trukmės pertrauka tarp kito bandinio. Šių testų metu buvo vertintas laikas, kada pasiekta platforma bei nuplauktas atstumas. Gauti rezultatai parodė, jog vyresnės žiurkės buvo statistiškai reikšmingai lėtesnės ir platformą pasiekė vėliau nei jaunos žiurkės 1-ąją ir 2-ąją dienomis, tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų 3-ąją dieną nenustatyta. Taip pat vyresnės žiurkės nuplaukė mažesnę atstumą 1-ąją dieną ir statistiškai patikimai skyrėsi nuo jaunų žiurkių, o 3-ąją mokymosi dieną skirtumų tarp grupių nebuvo. 4-ąją testo dieną platforma buvo pašalinta iš vandens labirinto, o gyvūnui skirtas vienas 60 sekundžių trukmės bandinys. Testo metu skaičiuota, kiek kartų gyvūnas kirto teritoriją, kurioje prieš tai buvo platforma ir nuplauktą atstumą tiksliniame kvadrante. Psichosocialiniam stresui sukelti pusė žiurkių iš kiekvienos tiriamosios grupės buvo suvyniotos į nailonu dengtą drobę (angl. nylon coated canvas rat Snuggles® (Harvard apparatus)) likus 3 valandoms iki eksperimento pradžios. Gauti tyrėjų rezultatai atskleidė, kad 3 valandų trukmės psichosocialinis stresas reikšmingai sumažino jaunų patinų kartų, kada kirto buvusią platformos vietą, skaičių ir nuplauktą atstumą tiksliniame kvadrante. Tuo tarpu vyresnio amžiaus patinai išliko nejautrūs psichosocialiniam stresui ir reikšmingų pokyčių nenustatyta. Mokslininkai apibendrinami rezultatus teigė, kad vyresnio amžiaus patinai nereaguoja į naujai atsirandantį ūminį psichosocialinį stresą, kas gali turėti neigiamos įtakos ilgalaikiam prisitaikymui prie streso bei vyresnis amžius veikia kaip stresorius, užstoja naujai atsiradusių stresorių įtaką (Buechel *et al.*, 2014). Apibendrinant galima teigti, jog didėjant amžiui pastebimi šie elgsenos pokyčiai: padidėja nerimo lygis, sumažėja motorinis aktyvumas ir noras tyrinėti aplinką, gyvūnai tampa mažiau jautrūs stresą sukeliantiems aplinkos veiksniams.

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Laboratoriniai gyvūnai

Pirmame eksperimentiniame tyrime „Atminties sutrikdymas skopolaminu“ naudoti 24 Wistar klono žiurkių patinai (RccHan:WIST, Envigo, Olandija). Antrame tyrime „Su amžiumi susiję žiurkių atminties pokyčiai“ naudoti 14 Wistar klono žiurkių patinų (RccHan:WIST, Envigo, Olandija), 9 Wistar klono žiurkių patinai (išveisti Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro vivariume naudojant RccHan:WIST žiurkių poras) bei 27 Wistar klono žiurkių patelės (išveistos Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro vivariume naudojant RccHan:WIST žiurkių poras). Bandomieji gyvūnai laikyti jų sveikatos ir gerovės reikalavimus atitinkančiuose laikymo narvuose socialinėmis grupėmis po keturis. Bandomiesiems gyvūnams užtikrintas 12 valandų trukmės šviesos ir tamsos ciklas (dirbtinis reguliuojamas apšvietimas, įsijungia 7:00 ryte, išsijungia 19:00 vakare). Gyvūnų laikymo patalpoje palaikoma pastovi kambario temperatūra (22 ± 1 °C). Standartinis laboratorinis žiurkių kietas granuliuotas pašaras ir geriamasis vanduo tiekta iki soties („ad libitum“) per visą eksperimentinį laikotarpį. Visas eksperimentines procedūras patvirtino Lietuvos Respublikos valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba, ir jos buvo atliekamos vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos. Leidimo Nr. G2-177, išdavimo data: 2021-04-14.

2.2. Naudojama įranga

- Atviro lauko arena;
- T formos labirintas;
- Šviesos intensyvumo matuoklis;
- Skirtingos objektų poros (vazelės, aliejaus butelys, grafinas, prieskoninė ir kt.);
- Vaizdo kamera (IP kamera bullet, Hikvision, Kinija);
- Laboratorinės svarstyklės;
- Mikroskopas.

2.3. Naudojamos medžiagos

- 0,9% natrio chloridas (Fresenius Kabi, Lenkija);

- Skopolamino hidrobromido milteliai (Sigma–Aldrich, Vokietija);
- 30% etanolis (C₂H₅OH).

2.4. Atminties sutrikdymas skopolaminu

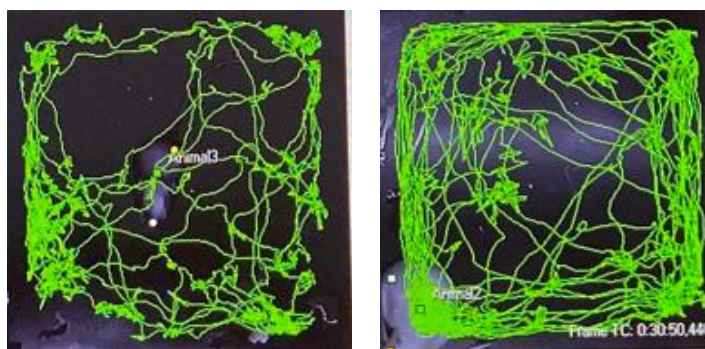
Šio eksperimentinio tyrimo metu bandomieji gyvūnai suskirstyti į tris grupes: 3 mėnesių amžiaus patinėlių kontrolinę grupę (n=8), 3 mėnesių amžiaus patinėlių, kuriems atminties sutrikdymas indukuotas panaudojant 1 mg/kg skopolamino koncentraciją grupę (n=8) ir 3 mėnesių amžiaus patinėlių, kuriems atminties sutrikdymas indukuotas panaudojant 2 mg/kg skopolamino koncentraciją grupę (n=8). Šio tyrimo trukmė – penkios savaitės. Pirmąją savaitę atlikti baziniai (Basal) visų tiriamųjų žiurkių grupių elgsenos matavimai. Kitas tris savaites (S1, S2 ir S3) kiekvieną dieną (1 kartą per dieną, iš viso 21 dieną) be pertraukų atliekamos injekcijos po pilvaplėve: kontrolinė fiziologinio tirpalo (0,9% natrio chlorido, Fresenius Kabi, Lenkija), 1 mg/kg kūno masės skopolamino ir 2 mg/kg kūno masės skopolamino injekcijos. Atminties sutrikdymą sukeliančios medžiagos skopolamino (1 mg/kg ir 2 mg/kg koncentracijos) injekcijos ruoštos naujai kiekvieną dieną, skopolamino hidrobromido miltelius (Sigma–Aldrich, Vokietija) ištirpinant fiziologiniame tirpale (0,9% natrio chlorido, Fresenius Kabi, Lenkija). Kiekvieną savaitę, atitinkamai po 7, 14 ir 21 injekcijų atlikti gyvūnų elgsenos testai. Jeigu tą pačią dieną kaip ir injekcijos numatyti elgsenos testai, tuomet skopolamino injekcijos bandomiesiems gyvūnams leidžiamos likus 30 minučių iki testo pradžios. Penktąją savaitę (Po) žiurkių elgsenos pakartotinai analizuojamas praėjus vienai savaitei po injekcijų nutraukimo.

2.5. Su amžiumi susiję žiurkių atminties pokyčiai

Šis eksperimentinis tyrimas buvo suskirstytas į dvi dalis. Pirmoje tyrimo dalyje siekiant įvertinti sveikų žiurkių patelių su amžiumi susijusius atminties pokyčius jos buvo suskirstytos į tris tiriamąsias grupes: jaunos arba kontrolinė grupė, kuriai priskirtos 70-150 dienų amžiaus patelės, atitinkančios žmogaus gyvenimo 18-25 metus (angl. emerging adulthood); vidutinio amžiaus grupė, kurią sudarė 150-300 dienų amžiaus patelės, atitinkančios žmogaus 25-40 gyvenimo metus (angl. young adulthood) ir vyresnio amžiaus patelių grupė, kuriai priklausė 300-600 dienų amžiaus patelės, atitinkančios 40-65 žmogaus gyvenimo metus (angl. middle adulthood) (Ghasemi *et al.*, 2021). Kontrolinę patelių grupę sudarė 3 mėnesių amžiaus (n=10) ir 5 mėnesių amžiaus (n=9) patelės. Vidutinio amžiaus grupę sudarė tos pačios 5 mėnesių amžiaus patelės, kurioms elgsenos testai buvo pakartoti sulaukus 9-10 mėnesių amžiaus. Trečiai grupei (n=8) elgsenos testai buvo atlikti joms esant vidutinio (12 mėnesių) amžiaus ir pakartoti sulaukus vyresnio amžiaus (16-17 mėnesių). Antroje tyrimo dalyje buvo siekiama ištirti, ar pasireiškia sveikų patinėlių su amžiumi susiję atminties pokyčiai, šiam tikslui pasiekti bandomieji gyvūnai buvo suskirstyti į dvi grupes: jauni arba kontrolinė grupė, kurių amžius 3 mėnesiai (n=9) ir vidutinio amžiaus patinai, kurių amžius 8 mėnesiai (n=14).

2.6. Atviro lauko testas (angl. the open field test)

Šio elgsenos testo eksperimentai atlikti kvadrato formos arenoje su nepermatomomis sienomis, kurios matmenys $50\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 50\text{ cm}$. Reikiamas šviesos intensyvumas arenoje nustatytas šviesos matuokliu: pirmajame tyrime „Atminties sutrikdymas skopolaminu“ ir antrojo tyrimo „Su amžiumi susiję žiurkių atminties pokyčiai“ pirmoje dalyje arenos centre intensyvumas siekė 50 liuksų. Antrojo tyrimo „Su amžiumi susiję žiurkių atminties pokyčiai“ pirmos dalies pakartojime bei antroje dalyje buvo atliktos testo korekcijos siekiant optimizuoti sąlygas (t.y., padidinti aversiją centro zonai) ir arenos centre šviesos intensyvumas padidintas iki 80 liuksų, šonuose – 50-60 liuksų. Dieną prieš atviro lauko testo pradžią gyvūnams atliekamas 30 minučių trukmės pripratimas prie patalpos, kurioje numatytas eksperimentas. Jeigu gyvūnams anksčiau buvo atlikta kambario habituacija, tuomet šis žingsnis yra neprivalomas ir gali būti praleistas. Žiurkės prieš atviro lauko testo pradžią nėra pratinamos prie arenos. Šis elgsenos testas filmuojamas vaizdo kamera (IP kamera bullet, Hikvision, Kinija) eksperimento dalyviams išėjus iš patalpos. Eksperimento trukmė 30 minučių, kurio metu registruota: (1) gyvūno laikas – kiek laiko gyvūnas praleidžia labiau apšviestame arenos centre, kiek kartų atlieka savęs švarinimosi (angl. grooming) veiksmus, kurių trukmė ilgesnė nei 5 sekundės ir testo pabaigoje skaičiuojamas gyvūno išmatų skaičius; (2) lokomotorinis aktyvumas – nubėgtas atstumas (cm) arenoje viso testo metu ir (3) smalsumas bei gyvūno noras tirti naują aplinką – atsistojimai ant dviejų galinių kojų (angl. rearings). Nubėgtas atstumas ir laikas, praleistas arenos centre, analizuoti pasitelkiant Viewer (Biobserve GmbH, Vokietija) programą. Atviro lauko testo arena ir Viewer programa atlikta nubėgto atstumo analizė pavaizduota 3 pav.

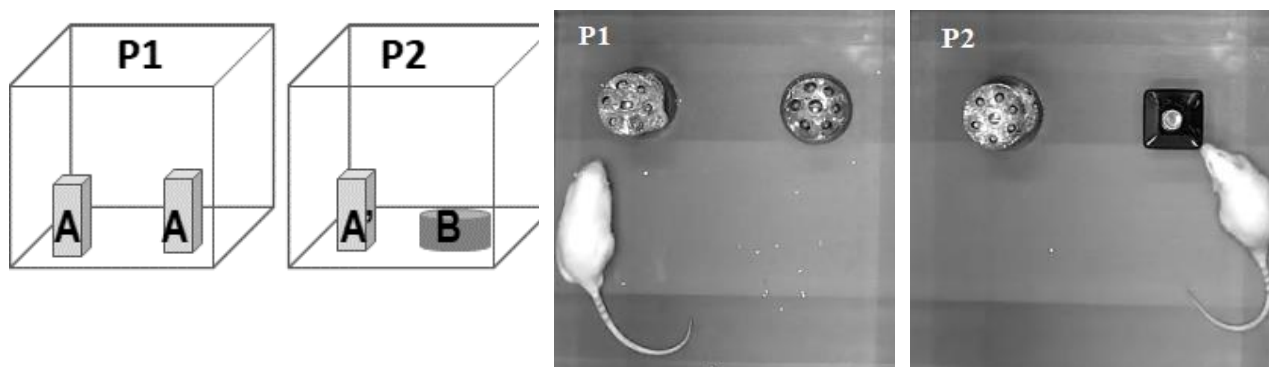


3 pav. Nubėgtas atstumas (cm) apskaičiuotas Viewer programa pagal žiurkės bėgimo trajektoriją, pažymėtą žalia spalva.

2.7. Naujo objekto atpažinimo testas (angl. novel object recognition test)

Naujo objekto atpažinimo testo eksperimentai atlikti atviro lauko arenoje, kurios matmenys $50\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 50\text{ cm}$. Šviesos intensyvumas buvo tolygiai pasiskirstęs arenos centre ir kampuose bei siekė 50 liuksų. Naujo objekto atpažinimo testo metu naudoti du identiški ir vienas naujas objektas. Reikalavimai objektams: vienodai įdomūs gyvūnams (panaši tyrinėjimo trukmė ir priėjimų skaičius)

bei pasižymi panašiomis savybėmis pvz. jeigu ant dviejų identiškų objektų žiurkė gali užlipti tuomet ant naujo objekto gyvūnas taip pat turi gebėti užlipti. Skirtingų objektų porų įdomumas patikrintas prieš kiekvieną eksperimentą su sveikomis žiurkėmis, nedalyvaujančiomis elgsenos teste. Prieš naujo objekto atpažinimo testo pradžią gyvūnai turi būti pripratinti prie kambario, kuriame bus atliekamas eksperimentas: pirmąją dieną atliekama 30 minučių trukmės žiurkių habituacija naujoje patalpoje. Jeigu bandomieji gyvūnai anksčiau yra buvę kambaryje, kuriame numatytas elgsenos testas, tuomet šis žingsnis nėra privalomas ir gali būti praleistas. Taip pat gyvūnai turi būti pripratinti prie atviro lauko arenos, kurioje bus atliekamas testas: antrąją dieną visos narvelio žiurkės kartu įdedamos į areną 15 minučių trukmės habituacijai. Trečiąją dieną pradedamas naujo objekto atpažinimo testas, kuris sudarytas iš 2 dalių – pirmos dalies metu (P1), žiurkė yra įdedama į atviro lauko areną su 2 identiškais nepažįstamais objektais (A), padėtais prie vienos arenos sienelės priešingų kampų (žiūrėti 4 pav.). P1 trukmė – 3 minutės. Antros dalies metu (P2) ta pati žiurkė yra grąžinama į atviro lauko areną su toje pačioje vietoje padėtu jau pažįstamu objektu (A') ir nauju nepažįstamu objektu (B). P2 trukmė – 3 minutės. Tarp P1 ir P2 testų žiurkė grąžinama į narvelį 15 minučių. Objektų tyrinėjimas (uostymas, laižymas, lietimasis) filmuojamas vaizdo kamera (IP kamera bullet, Hikvision, Kinija) eksperimento dalyviams išėjus iš kambario ir yra analizuojami priėjimo prie A' ir B objektų kartai ir tyrinėjimo trukmė. Naujo (B) objekto atpažinimas yra santykinė laiko dalis, praleista tyrinėjant šį objektą P2 metu (t.y. $B/(A'+B) \times 100$). Žiurkės elgsenos vertinimo kriterijai: pirmos dalies metu (P1) gyvūnas prie kiekvieno objekto turėtų prieiti bent po vieną kartą, o tyrinėjimo trukmės laikas turėtų būti ne trumpesnis nei 1 s. Jeigu žiurkė neatitinka šių kriterijų, jos rezultatai toliau neanalizuojami.

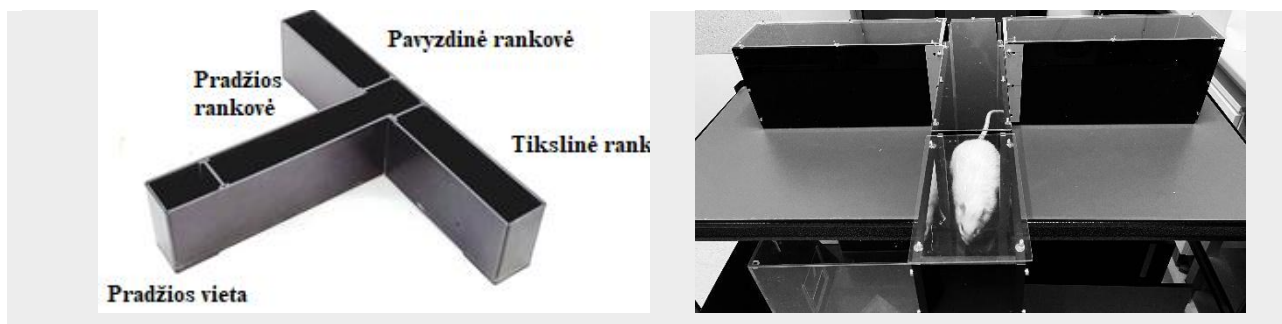


4 pav. Naujo objekto atpažinimo testo pirmos dalies metu (P1) žiurkė susipažįsta su 2 identiškais nepažįstamais objektais (A), o po 15 minučių, antros dalies (P2) metu vienas A objektas pakeičiamas nauju (B) objektu.

2.8. T formos labirinto testas (angl. T - maze test)

Eksperimentai atlikti šiam testui pritaikytame T formos labirinte, kuris sudarytas iš šių dalių: 1) laukimo arba pradžios vietos; 2) pradžios arba centro rankovės; 3) tikslinės ir pavyzdinės rankovės; 4) slankiojančių durelių, atskiriančių laukimo vietą nuo pradžios rankovės bei pradžios rankovę nuo

tikslinės ir pavyzdinės rankovių (žiūrėti 5 pav.). Prieš pradedant testą žiurkės yra supažindinamos su T formos labirintu: 2 dienas iki elgsenos testo pradžios kiekvieną dieną gyvūnai po 3 minutes paleidžiami individualiai tyrinėti labirintą, neturintį slankiojančių durelių. Šviesos intensyvumas tolygiai paskirstytas pradžios vietoje, centro, tikslinėje ir pavyzdinėje rankovėse bei siekė ~30 liuksų. T formos labirinto testas sudarytas iš dviejų dalių – pavyzdinio ir pasirinkimo bandymų. Pavyzdinio bandymo metu žiurkė patalpinama į pradžios vietą, kuri nuo centro rankovės atskirta slankiojančiomis durelėmis. Praėjus 20 sekundžių nuo žiurkės įdėjimo akimirkos, slankiojančios durelės yra pakeliamos ir gyvūnas gali patekti centro rankovę. Šio bandymo metu tikslinė rankovė visą laiką yra uždaryta, todėl gyvūnas per 2 minutes turi pasiekti pavyzdinę rankovę. Gyvūnui pilnai įėjus į šią rankovę, užveriamos slankiojančios durelės ir 20 sekundžių žiurkė tyrinėja šią rankovę be galimybės sugrįžti į pradžios rankovę. Praėjus šiam laikui, gyvūnas perkeliamas atgal į pradžios vietą, kuri atskirta nuo pradžios rankovės durelėmis. Po 60 sekundžių nuo įdėjimo į laukimo vietą momento prasideda antroji testo dalis – pasirinkimo bandymas. Jo metu visos labirinto slankiojančios durelės yra pakeltos ir gyvūnas per 2 minutes gali pasirinkti, kokią rankovę (tikslinę ar pavyzdinę) tyrinėti. Vos tik žiurkė pilnai įeina į rankovę, įskaitant ir jos uodegos galiuką, bandymas baigtas. Jeigu per numatytą laiką gyvūnas nepasirenka rankovės tuomet bandymas neužskaitytas. Iš viso testas kartojamas bent 5 kartus, tarp testų grąžinant žiurkę į narvelį ne trumpesniam nei 10 minučių laikotarpiui. Testų pakartojimų metu tikslinė ir pavyzdinė rankovės yra keičiamos vietomis tam, kad ta pati rankovė pavyzdinio bandymo metu nebūtų atidaryta daugiau nei 2 kartus iš eilės. Rezultatų interpretavimas: gyvūno pasirinkimas laikomas teisingu jeigu pasirinkimo bandymo metu jis įėjo į tikslinę rankovę, o klaidingu jeigu gyvūnas pasirenka pavyzdinę rankovę, kurią jau buvo tyrinėjęs pavyzdinio bandymo metu. Skaičiuojama teisingų pasirinkimų santykinė dalis procentais: 100% reiškia, kad žiurkė visada rinkosi anksčiau dar netyrinėtą, tikslinę rankovę.



5 pav. T-labirintas susideda iš 4 skyrių su slankiojančiomis durelėmis: pradžios vietos, pradžios, pavyzdinės ir tikslinės rankovių. Pirmos testo dalies metu žiurkė gali patekti tik į pavyzdinę rankovę. Antros dalies metu žiurkei yra atviros abi rankovės (pavyzdinė ir tikslinė).

2.9. Žiurkių patelių lytinio ciklo nustatymas

Siekiant nustatyti tyrimo metu „Su amžiumi susiję žiurkių atminties pokyčiai“ tirtų skirtingų amžiaus grupių žiurkių patelių lytinį ciklą, po elgsenos testų buvo atlikta lyties organų išskyrų tepinėlių mikroskopija. Procedūriniame kambaryje žiurkių patelių makšties sekretas atsargiai surinktas panaudojant plastikinę pipetės antgalį, kuris buvo pripildytas 10 μ l dejonizuotu vandeniu. Surinkta tiriamoji medžiaga užlašinta ant mikroskopinio stiklelio ir vertinama šviesos mikroskopu.

2.10. Duomenų statistinė analizė

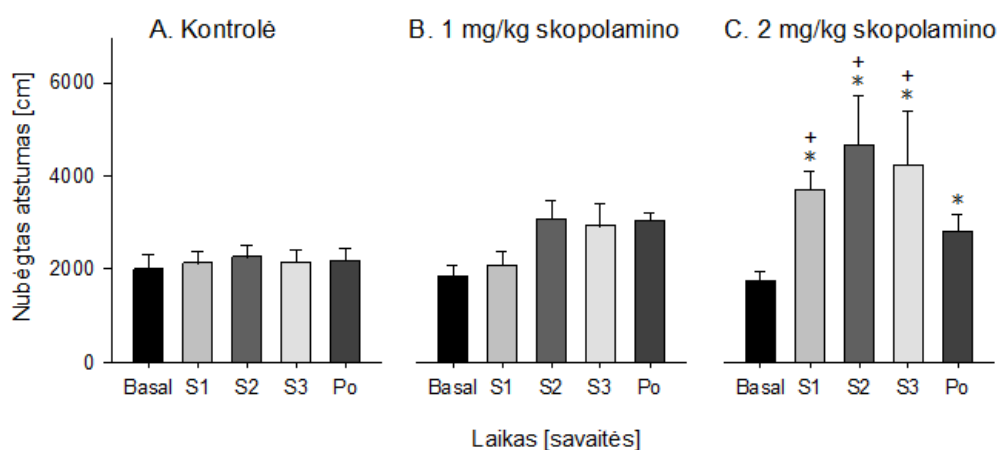
Statistinė duomenų analizė buvo atlikta panaudojant SigmaPlot 14.5 kompiuterinę programą. Pirmame eksperimentiniame tyrime „Atminties sutrikdymas skopolaminu“ atviro lauko bei naujo objekto atpažinimo elgsenos testų duomenų analizei pasirinkta ANOVA su pakartotiniais matavimais (angl. Two-way Repeated measures ANOVA, faktoriai buvo savaitė ir skopolamino dozė). Antrojo eksperimentinio tyrimo „Su amžiumi susiję žiurkių atminties pokyčiai“ atviro lauko, naujo objekto atpažinimo bei T formos labirinto elgsenos testai analizuoti naudojant blokuotų duomenų dispersinę analizę (angl. One-way ANOVA, faktorius – amžiaus grupė). Jeigu buvo nustatyta reikšmingų skirtumų tuomet atliktas Post Hoc Stjudento Njumano-Keulso (SNK) testas. Jei nebuvo patvirtintas normalusis duomenų pasiskirstymas, tada buvo daromas neparametrinis Kruskal-Wallis testas. Pasirinktas reikšmingumo lygis – $p < 0,05$. Visi duomenys pateikti vidutinė vertė $\pm$ standartinė vidurkio paklaida (angl. standard error of mean).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Atminties sutrikdymas skopolaminu

3.1.1. Atviro lauko testo rezultatai

Jaunų Wistar klonų žiurkių patinėlių tiriamųjų grupių – kontrolinės, 1 mg/kg kūno masės skopolamino ir 2 mg/kg kūno masės skopolamino lokomotorinis aktyvumas nustatytas Viewer programa suskaičiavus gyvūno nubėgtą atstumą per 30 minučių trukmės eksperimentą. Elgsenos testas kartotas kiekvieną savaitę, 5 savaites iš eilės, o gauti nubėgto atstumo rezultatai pateikti 6 pav.

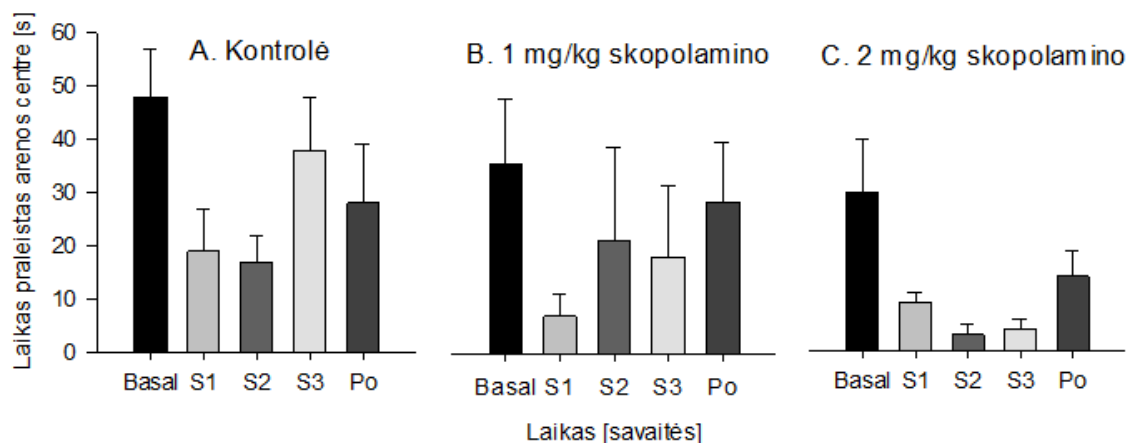


6 pav. Suminis nubėgtas atstumas (cm) atviro lauko arenoje bazinių matavimų metu (Basal), po vienos (S1), dviejų (S2) ir trijų (S3) savaitių kasdieninių fiziologinio tirpalo (A – kontrolė (n=8)) arba skopolamino (B – 1 mg/kg (n=8) ir C – 2 mg/kg (n=8)) injekcijų ir savaitei praėjus po injekcijų nutraukimo (Po). Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistškai patikimą skirtumą nuo bazinio tos pačios grupės testo, + nurodo statistškai patikimą skirtumą nuo kontrolinės grupės tos pačios savaitės testo. Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

Kontrolinės grupės nubėgtas atstumas atviro lauko arenoje pirmąją savaitę prieš skopolamino injekcijas ir, kitomis savaitėmis, kai atitinkamai buvo suleistos fiziologinio tirpalo 7, 14 ir 21 injekcijos ir praėjus vienai savaitei po injekcijų nutraukimo kito nežymiai (Basal-Po, 6A pav.). Grupės, gydytos 1 mg/kg skopolaminu, nubėgtas atstumas po 14 ir 21 (S2-S3, 6B pav.) skopolamino injekcijų, lyginant su bazine savaite, šiek tiek padidėjo, tačiau skirtumai nebuvo statistškai patikimi. 2 mg/kg skopolamino gydytos grupės nubėgtas atstumas padidėjo statistškai reikšmingai [lyginama faktorių sąveika savaitė $\times$ skopolamino dozė: $F(8;119)=3,1$; $p < 0,01$], lyginant su bazine tos pačios grupės savaite ir kontrolinės grupės ta pačia savaite jau po 7 injekcijų (S1, 6C pav. savaitę). Didžiausias šios grupės nubėgtas atstumas buvo S2 savaitę. Praėjus savaitei po injekcijų nutraukimo (Po, 6C pav.) 2 mg/kg skopolamino grupės lokomotorinis aktyvumas sumažėjo, bet bazinės savaitės lygio nepasiekė. Gauti rezultatai parodė, jog muskarininių acetilcholino receptorių antagonistas

skopolaminas aktyvuoja bazalinius ganglijus, todėl padidėja gyvūnų lokomotorinis aktyvumas (Xiang *et al.*, 2012). Skopolaminu paveiktų žiurkių hiperaktyvumas priskiriamas stereotipinei skopolamino sukeltai elgsenai (Mueller *et al.*, 1990). Mueller ir kt. (1990) atliktame eksperimente Wistar žiurkių patinų tiriamosioms grupės buvo atliktos vienkartinės 0,5 mg/kg ir 2,0 mg/kg injekcijos po oda (s.c.) ir iškart po injekcijų analizuota gyvūnų elgsena atviro lauko arenoje. Tuo tarpu šiame eksperimente skopolamino intraperitoninės (i.p.) injekcijos buvo leidžiamos iki eksperimento pradžios likus 30 min. Tiek Mueller ir kt. (1990) tyrime, tiek šiame tyrime buvo pastebėta, jog lokomotorinio aktyvumo padidėjimas tiesiogiai priklauso nuo skopolamino koncentracijos. Nors Mueller ir kt. (1990) atviro lauko testo trukmė buvo 60 min., o šio testo trukmė - 30 min., tačiau abiejuose testuose identifikuota, jog su laiku žiurkės lokomotorinis aktyvumas mažėja.

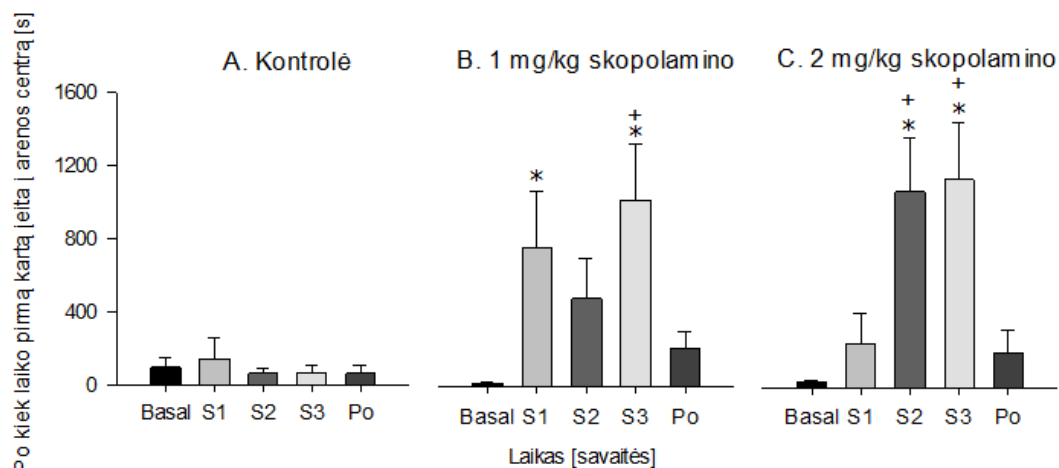
Atviro lauko testo metu taip pat buvo vertintas žiurkės laikas – kiek laiko gyvūnas praleidžia labiau apšviestame arenos centre. Gauti tiriamųjų grupių rezultatai pateikti 7 pav.



7 pav. Laikas, praleistas arenos centre (s) bazinių matavimų metu (Basal), po vienos (S1), dviejų (S2) ir trijų (S3) savaitių kasdieninių fiziologinio tirpalo (A - kontrolė (n=8)) arba skopolamino (B - 1 mg/kg (n=8) ir C - 2 mg/kg (n=8)) injekcijų ir savaitei praėjus po injekcijų nutraukimo (Po). Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M.

Visų trijų tiriamųjų grupių ilgiausias laikas praleistas arenos centre buvo pirmąją savaitę (Basal, 7A pav.; Basal, 7B pav.; Basal, 7C pav.). Nors 2 mg/kg skopolamino žiurkių grupės laikas praleistas arenos centre po 7, 14 ir 21 injekcijų (S1-S3, 7C pav.) lyginant su tos pačios grupės bazine savaitė (Basal, 7C pav.) buvo sumažėjęs, tačiau statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta ($p=0,67$).

Kitas gyvūno laikumo įvertinantis parametras – po kiek laiko (s) nuo atviro lauko testo pradžios gyvūnas pirmą kartą įėjo į arenos centro zoną. Analizės rezultatai pateikti 8 pav.



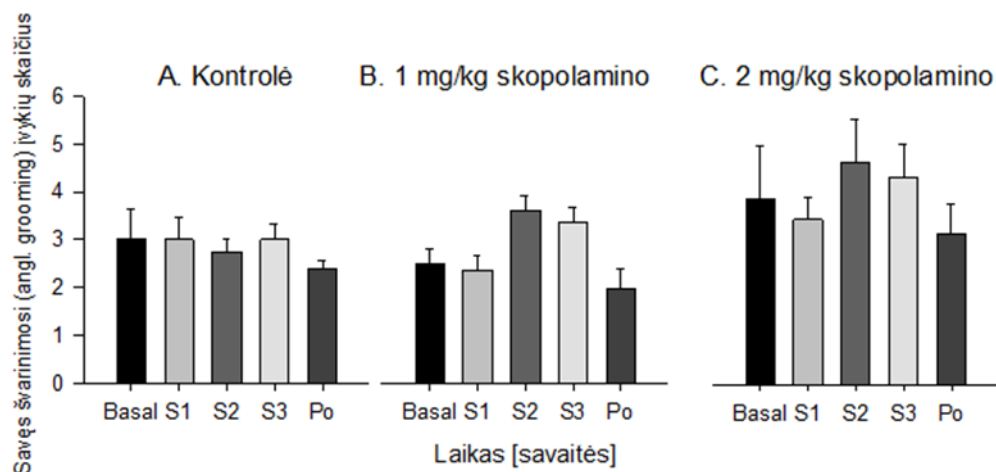
8 pav. Po kiek laiko pirmą kartą įeina į arenos centrą (s) bazinių matavimų metu (Basal), po vienos (S1), dviejų (S2) ir trijų (S3) savaitių kasdieninių fiziologinio tirpalo (A - kontrolė (n=8)) arba skopolamino (B - 1 mg/kg (n=8) ir C - 2 mg/kg (n=8)) injekcijų ir savaitei praėjus po injekcijų nutraukimo (Po). Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistiškai patikimą skirtumą nuo bazinio tos pačios grupės testo, + nurodo statistiškai patikimą skirtumą nuo kontrolinės grupės tos pačios savaitės testo. Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

Kontrolinės grupės patinėliai viso testo metu (Basal-Po, 8A pav.) į atviro lauko arenos centro zoną pirmą sykį nuo testo pradžios įėjo per trumpą laiką. 1 mg/kg skopolamino grupės laikas, kada pirmą kartą įeina į centro zoną, po 7 injekcijų (S1, 8B pav.) ir po 21 injekcijos (S3, 8B pav.) statistiškai reikšmingai padidėjo lyginant su tos pačios grupės bazine savaite (Basal, 8B pav.) ir taip pat 2 mg/kg skopolamino grupės laikas, kada pirmą kartą įeina į centro zoną, po 14 injekcijų (S2, 8C pav.) ir po 21 injekcijos (S3, 8C pav.) statistiškai reikšmingai pailgėjo lyginant su tos pačios grupės bazine savaite (Basal, 8C pav.) [lyginama faktorių sąveika savaitė $\times$ skopolamino dozė: $F(8;119)=3,8$; $p < 0,001$]. Praėjus savaitei po 1 mg/kg (Po, 8B pav.) ir 2 mg/kg (Po, 8C pav.) skopolamino injekcijų nutraukimo laikas, kada pirmą kartą įeina į centrą, sutrumpėjo.

Gauti rezultatai kelia abejonių, ar pailgėjęs laikas, kada žiurkė pirmą kartą įėjo į centrą, bei laiko, praleisto arenos centre, sumažėjimas yra susijęs su gyvūno baikštumu. Tokios elgsenos priežastis siejama su skopolamino sukeltais stereotipiniais elgesio pokyčiais, kurių metu sumažėja kelionių į centro zoną skaičius ir padidėja kelionių aplink visą arenos parametą skaičius (Mueller *et al.*, 1990). Mueller ir kt. (1990) eksperimente buvo nustatyta, kad po vienkartinės 0,5 mg/kg ir 2,0 mg/kg skopolamino injekcijų (s.c.) priklausomai nuo dozės Wistar žiurkių kelionių į centro zoną lyginant su kontroline grupe reikšmingai sumažėjo, o kelionių aplink areną padidėjo. Skopolamino sukelta stereotipinė elgsena paaiškinama cholinerginės sistemos poveikiu baziniams ganglijams ir dryžuotajam kūnui (Xiang *et al.*, 2012). Šis stereotipinis poveikis panašus į psichostimulantų pvz.

amfetamino sukeliamus elgsenos pokyčius, kurie nulemti dopaminerginių neuronų, esančių uodeguotame branduolyje (angl. caudate), stimuliavimo (angl. (Mueller *et al.*, 1990).

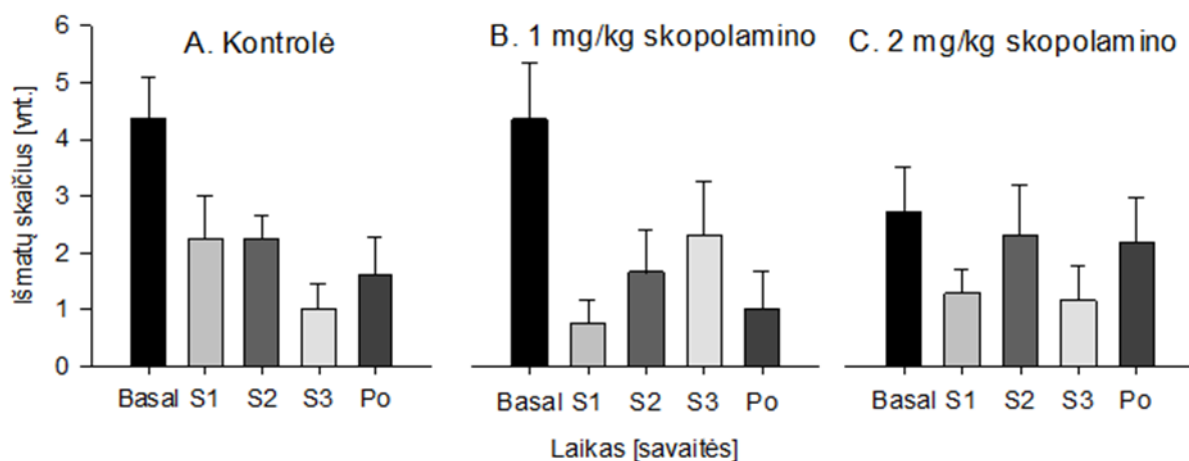
Taip pat gyvūno baikštumo įvertinimui buvo skaičiuojami gyvūno savęs švarinimosi įvykių (angl. grooming) skaičius, kurių trukmė ne ilgesnė nei 5 sekundės (9 pav.).



9 pav. Savęs švarinimosi įvykių skaičius bazinių matavimų metu (Basal), po vienos (S1), dviejų (S2) ir trijų (S3) savaičių kasdieninių fiziologinio tirpalo (A - kontrolė (n=8)) arba skopolamino (B - 1 mg/kg (n=8) ir C - 2 mg/kg (n=8)) injekcijų ir savaitei praėjus po injekcijų nutraukimo (Po). Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M.

Savęs švarinimosi įvykių skaičius tarp kontrolės, 1 mg/kg kūno masės skopolamino bei 2 mg/kg kūno masės skopolamino grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Statistiškai patikimų skirtumų tarp tos pačios grupės bazinės savaitės matavimų taip pat nenustatyta ($p=0,62$).

Pasibaigus atviro lauko testo eksperimentui, buvo skaičiuojamas arenoje esančių išmatų skaičius, gauti duomenys pateikti 10 pav.

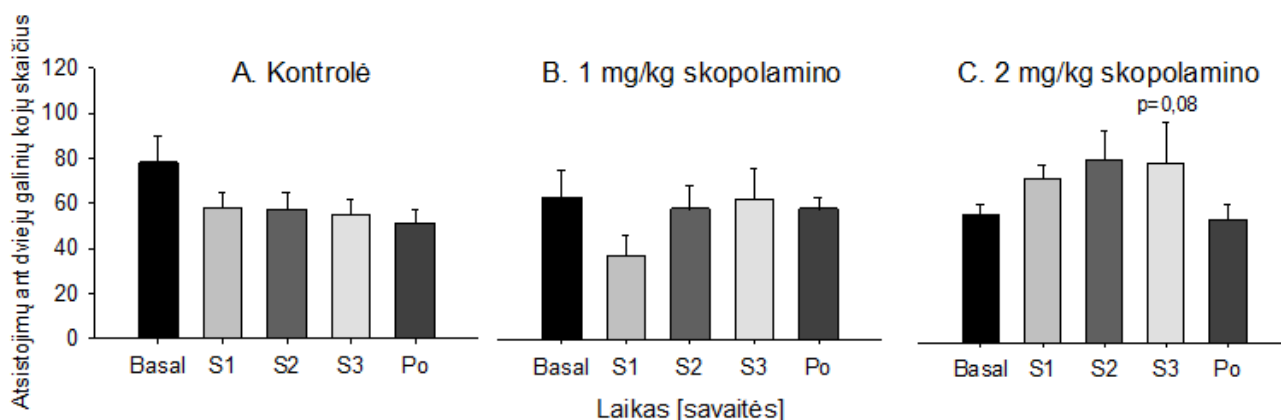


10 pav. Išmatų skaičius (vnt.) arenoje po eksperimento bazinių matavimų metu (Basal), po vienos (S1), dviejų (S2) ir trijų (S3) savaitių kasdieninių fiziologinio tirpalo (A - kontrolė (n=8)) arba skopolamino (B - 1 mg/kg (n=8) ir C - 2 mg/kg (n=8)) injekcijų ir savaitei praėjus po injekcijų nutraukimo (Po). Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M.

Didžiausias išmatų skaičius kiekvienoje tiriamojoje grupėje (kontrolinėje, 1 mg/kg skopolamino ir 2 mg/kg skopolamino) suskaičiuotas pirmąją bazinę testo savaitę (Basal, 10A pav.; Basal, 10B pav.; Basal, 10C pav.) kitomis savaitėmis išmatų skaičius grupėje keitėsi nežymiai, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių nustatyta nebuvo ($p=0,15$).

Savęs švarinimo įvykių ir išmatų rezultatai patvirtina, kad skopolaminu paveiktų žiurkių vėlesnis įėjimas į centro zoną vargu ar buvo sąlygotas padidėjusiu baikštumo lygiu.

Gyvūno smalsumas bei noras tyrinėti naują aplinką buvo vertinamas viso eksperimento metu, skaičiuojant žiurkės atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičių (angl. rearing). Gauti rezultatai pateikti 11 pav.

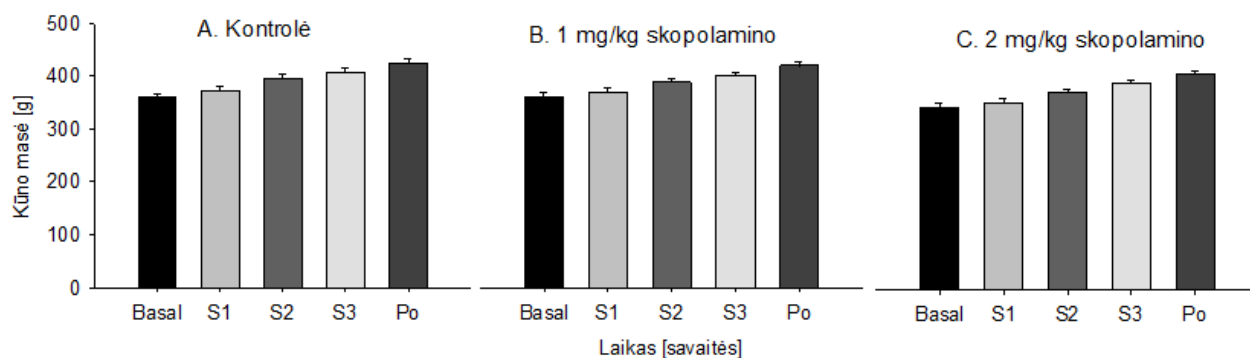


11 pav. Atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičius bazinių matavimų metu (Basal), po vienos (S1), dviejų (S2) ir trijų (S3) savaitių kasdieninių fiziologinio tirpalo (A - kontrolė (n=8)) arba skopolamino (B - 1 mg/kg (n=8) ir C - 2 mg/kg (n=8)) injekcijų ir savaitei praėjus po injekcijų nutraukimo (Po). Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M.

Kontrolinės grupės atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičius bazinę savaitę (Basal, 11A pav.) buvo didžiausias, o kitomis savaitėmis (S1-Po, 11A pav.) keitėsi nežymiai. 1 mg/kg skopolamino grupės patinėlių atsistojimų ant galinių kojų skaičius visu tiriamuoju laikotarpiu išliko panašus (Basal-Po, 11B pav.). 2 mg/kg skopolamino grupės patinėlių atsistojimų ant dviejų galinių kojų didžiausias skaičius nustatytas po 14 ir 21 injekcijų (S2-S3, 11C pav.), tačiau statistiškai patikimai nuo bazinio tos pačios grupės testo pagal pasirinktą reikšmingumo lygį $p<0,05$ nesiskyrė, apskaičiuota S3 savaitės p reikšmė – 0,08. Praėjus savaitei po injekcijų nutraukimo 2 mg/kg skopolamino grupės (Po, 11C pav.) atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičius sumažėjo. Padidėjęs

žiurkių atsistojimo ant dviejų galinių kojų skaičius siejamas su skopolamino sukeltais elgsenos pokyčiais. Hughes ir kt. (2004) nustatė, jog vienkartinės 1.0 mg/kg bei 2.0 mg/kg kūno masės skopolamino intraperitoninės injekcijos Wistar žiurkėms, lyginant su kontrole (izotoninio natrio chlorido tirpalo injekcija), elgsenos testo metu statistiškai reikšmingai padidina atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičių ir taip pat buvo nustatytas atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičiaus koreliacija su žiurkių kūno svoriu. Šio eksperimento metu, kai kiekvieną dieną buvo atliekamos pakartotinės skopolamino injekcijos, nebuvo nustatyti statistiškai reikšmingi atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičiaus skirtumai. Viena iš galimų tokios elgsenos hipotezių - eksperimentai kiekvieną savaitę (iš viso 5 savaites) buvo kartojami pažįstamame kambaryje, toje pačioje atviro lauko arenoje. Hughes ir kt. (2004) teigia, jog nefarmakologiniai veiksniai tokie kaip gyvūno lytis ir eksperimento kambarys gali turėti įtakos vaisto, šiuo atveju skopolamino, sukeliama poveikiui.

Papildomai šio testo metu buvo vertintas tiriamųjų žiurkių grupių (kontrolinės, 1 mg/kg bei 2 mg/kg skopolamino) kūno masės pokytis kiekvieną savaitę. Rezultatai pateikti 12 pav.

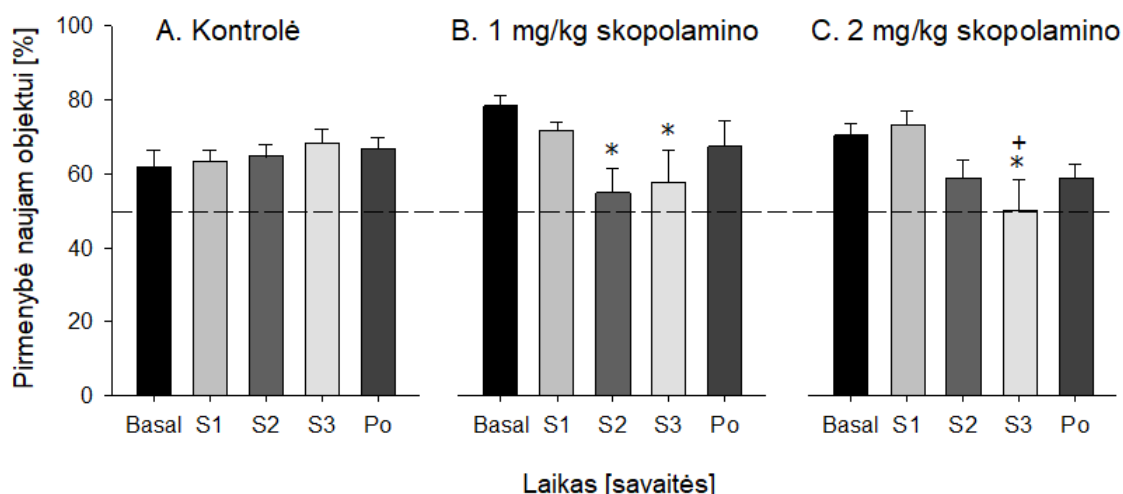


12 pav. Kūno masė (g) bazinių matavimų metu (Basal), po vienos (S1), dviejų (S2) ir trijų (S3) savaitių kasdieninių fiziologinio tirpalo (A - kontrolė (n=8)) arba skopolamino (B - 1 mg/kg (n=8) ir C - 2 mg/kg (n=8)) injekcijų ir savaitei praėjus po injekcijų nutraukimo (Po). Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M.

Visų tiriamųjų žiurkių patinėlių grupių kūno masė kiekvieną savaitę didėjo, bet statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta ($p=0,33$). Kontrolinės, 1 mg/kg ir 2 mg/kg kūno masės skopolamino grupių didžiausia kūno masė nustatyta 5-ąją savaitę (Po, 12A pav.; Po, 12B pav.; Po, 12C pav.).

3.1.2. Naujo objekto atpažinimo testo rezultatai

Naujo objekto atpažinimo testo metu 5 savaites iš eilės kiekvieną savaitę analizuoti tiriamųjų grupių kontrolinės, 1 mg/kg skopolamino ir 2 mg/kg skopolamino gebėjimai atpažinti naują objektą, gauti rezultatai pateikti 13 pav.



13 pav. Pirmenybė naujam objektui (%) bazinių matavimų metu (Basal), po vienos (S1), dviejų (S2) ir trijų (S3) savaičių kasdieninių fiziologinio tirpalo (A - kontrolė (n=8)) arba skopolamino (B - 1 mg/kg (n=8) ir C - 2 mg/kg (n=8)) injekcijų ir savaitei praėjus po injekcijų nutraukimo (Po). Pirmenybė naujam objektui (%) apskaičiuota pagal laiką, praleistą tyrinėjant naują objektą P2 testo metu (50% pirmenybė reikštų, kad žiurkės vienodai laiko praleidžia tyrinėdamos jau pažįstamą ir naują objektus). Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistiškai patikimą skirtumą nuo bazinio tos pačios grupės testo, + nurodo statistiškai patikimą skirtumą nuo kontrolinės grupės tos pačios savaitės testo. Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

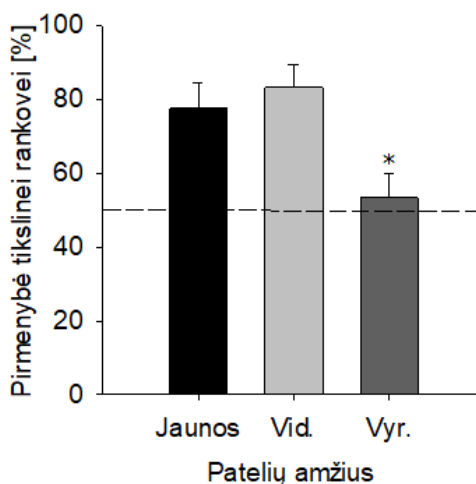
Nustatyta, kad žiurkės paveikus skopolaminu, naujam objektui statistiškai reikšmingai nebėra teikiama pirmenybė [lyginama faktorių sąveika savaitė $\times$ skopolamino dozė: $F(8;119)=2,1$, $p < 0,05$]. Vienos savaitės kasdieninių 1 mg/kg kūno masės bei 2 mg/kg kūno masės skopolamino injekcijų neužteko trumpalaikės atminties sutrikdymui (S1, 13B pav. ir S1, 13C pav.), ji sutriko tik po dviejų savaičių (S2, 13B pav. ir S2, 13C pav.). Trečią savaitę (S3, 13B pav. ir S3, 13C pav.) pasireiškė skopolamino sukeltos nepageidaujamos reakcijos: net trys žiurkės iš 2 mg/kg skopolamino grupės ir viena žiurkė iš 1 mg/kg skopolamino grupės nebetyrinėjo objektų. Šis sutrikimas buvo grįžtamas – nutraukus skopolamino injekcijas (Po, 13B pav. ir Po, 13C pav.), atmintis atsistatė, nepageidujamų reakcijų neliko. Bertaina-Anglade ir kt. (2006) taip pat ištyrė, jog intraperitoninės (i.p.), vienkartinės 0,3 mg/kg bei 1 mg/kg skopolamino injekcijos likus 30 minučių iki naujo objekto atpažinimo testo pradžios sutrikdo Sprague-Dawley žiurkių atmintį ir sumažina naujo objekto atpažinimo indeksą. (Aykaç *et al.*, 2019) nustatė, kad 1 mg/kg skopolamino kasdieninės i.p. injekcijos, kurios Wistar žiurkėms buvo leidžiamos 14 dienų, statistiškai reikšmingai sutrikdė trumpalaikę atmintį naujo objekto atpažinimo testo metu. Skirtingi tyrėjų pateikti rezultatai galėjo būti nulemti įvairių eksperimentinių veiksnių - pasirinktos gyvūnų linijos ar nelinijinio kamieno, lyties, amžiaus, elgsenos testo subtilybių, tiriamosios vaistinės medžiagos koncentracijos bei jos skyrimo būdo.

Po šių eksperimentų buvo patikrinta koreliacija, ar 2 mg/kg kūno masės skopolamino sukeltas tiriamosios žiurkių grupės lokomotorinio aktyvumo padidėjimas (registruotas atviro lauko arenoje) neturi įtakos pirmenybei naujam objektui. 2 mg/kg skopolamino žiurkių grupės didžiausias nubėgtas atstumas buvo nustatytas 2 bei 3 savaitėmis (S2-S3, 6C pav.), todėl koreliacijai patikrinti buvo pasirinktos šios savaitės. Pearsono koreliacijos koeficientas tarp nubėgto atstumo ir pirmenybės naujam objektui 2 savaitę (S2) suskaičiuotas $R=0,42$, $p=0,30$, o 3 savaitę (S3) – $R= -0,19$, $p=0,66$. Gauti rezultatai rodo, jog 2 mg/kg skopolamino grupės lokomotorinio aktyvumo padidėjimas įtakos naujo objekto atpažinimui neturėjo.

3.2. Su amžiumi susiję žiurkių patelių atminties pokyčiai

3.2.1. T formos labirinto testo rezultatai

Siekiant nustatyti žiurkių patelių su amžiumi susijusius erdvinės darbinės atminties pokyčius buvo atliktas T formos labirinto testas. Šio eksperimento metu buvo įvertinta trijų žiurkių grupių: jaunų (kontrolinės), vidutinio amžiaus bei vyresnio amžiaus žiurkių patelių pirmenybė naujai tikslinei rankovei (14 pav.). Iš viso testas kartotas bent 5 kartus, kad būtų patikimai suskaičiuotas santykis tarp teisingų ir neteisingų pasirinkimų.



14 pav. Jaunų ($n=8$), vidutinio amžiaus (vid. ($n=6$)) ir vyresnio amžiaus (vyr. ($n=6$)) patelių grupių pirmenybė tikslinei (naujai) rankovei (%). Pirmenybė (%) apskaičiuota pagal žiurkės teisingus įėjimus į tikslinę, anksčiau netyrinėtą rankovę bandymo testo metu. Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistškai patikimą skirtumą nuo kitų grupių.

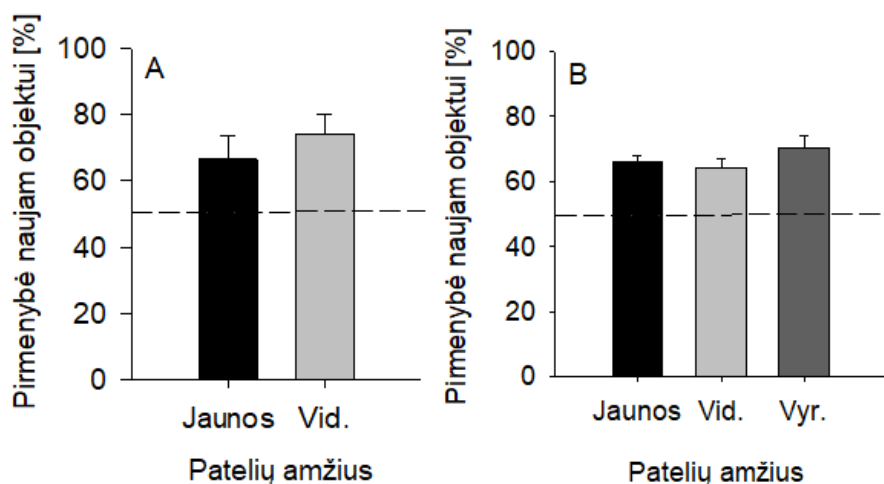
Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

Jaunų arba kontrolinės (3 mėnesių amžiaus) ir vidutinio amžiaus (9 mėnesių) žiurkių patelių grupių pirmenybė naujai rankovei buvo panaši, o vyresnio amžiaus patelių (17 mėnesių amžiaus) lyginant su kitomis grupės buvo mažiausia. Nustatyti statistškai patikimi skirtumai tarp analizuotų grupių [faktorius amžiaus grupė: $F(2;19)=5,1$, $p<0,05$]. Gauti rezultatai parodo, jog didėjant gyvūno

amžiui pasireiškia erdvinės atminties pokyčiai dėl kurių pirmenybė naujai, tikslinei rankovei sumažėja.

3.2.2. Naujo objekto atpažinimo testo rezultatai

Naujo objekto atpažinimo testo metu buvo vertinti žiurkių patelių su amžiumi susiję trumpalaikės epizodinės atminties pokyčiai. Pirmojo eksperimento (15A pav.) metu analizuotos dvi skirtingos amžiaus grupės: kontrolinė grupė arba jaunos patelės bei vidutinio amžiaus patelės, antrajame eksperimente (15B pav.) tirtos trys amžiaus grupės: kontrolinė grupė arba jaunos, vidutinio amžiaus bei vyresnio amžiaus patelės ir skaičiuojama pirmenybė naujam objektui (%) P2 testo metu.



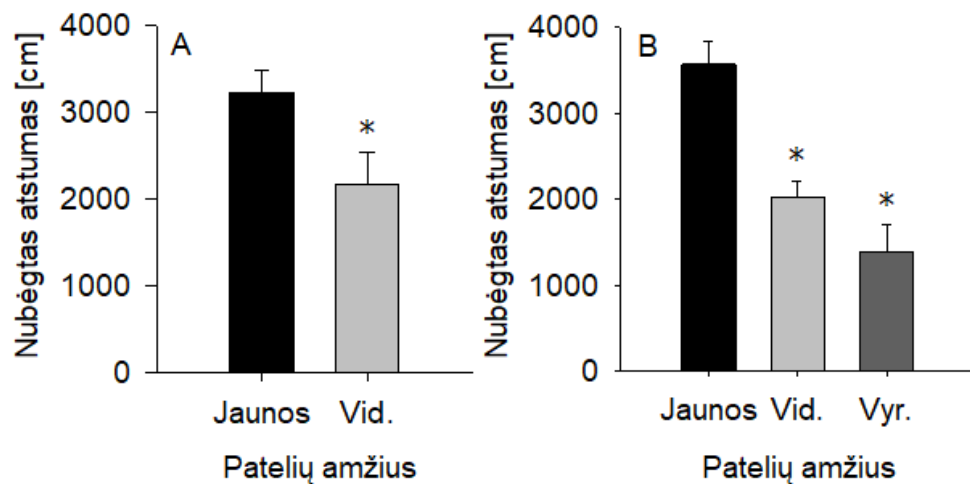
15 pav. A – pirmenybė naujam objektui (%) tarp jaunų (n=8) ir vidutinio (vid. (n=8)) amžiaus patelių grupių. B – pirmenybė naujam objektui (%) tarp jaunų (n=10), vidutinio (vid. (n=9)) ir vyresnio (vyr. (n=7)) amžiaus patelių grupių. Pirmenybė naujam objektui (%) apskaičiuota pagal laiką, praleistą tyrinėjant naują objektą P2 testo metu. Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis ± S.E.M.

Gauti pirmojo (15A pav.) ir antrojo (15B pav.) eksperimentų rezultatai parodė, jog didėjant žiurkės amžiui, pirmenybė naujam objektui statistiškai reikšmingai nepasikeitė. Pirmojo eksperimento kontrolinės grupės (5 mėnesių amžiaus) žiurkių patelių pirmenybė naujam objektui buvo šiek tiek mažesnė už vidutinio amžiaus patelių (12 mėnesių amžiaus) grupę. Antrojo eksperimento kontrolinės grupės (3 mėnesių amžiaus), vidutinio amžiaus (10 mėnesių) ir vyresnio amžiaus (17 mėnesių amžiaus) patelių grupių pirmenybė naujam objektui išliko panaši ir skirtumų tarp grupių nenustatyta.

3.2.3. Atviro lauko testo rezultatai

Skirtingo amžiaus žiurkių patelių lokomotorinis aktyvumas įvertintas suskaičiavus gyvūno nubėgtą atstumą atviro lauko arenoje per visą elgsenos testo trukmės laiką. Pirmojo eksperimento metu (16A pav.), kai atviro lauko arenos centre šviesos intensyvumas siekė 50 liuksų, analizuotos dvi

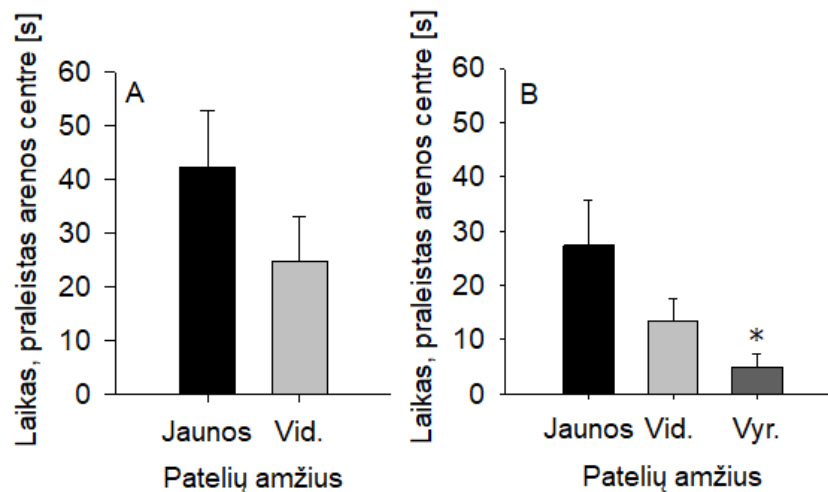
žiurkių patelių grupės: jaunos arba kontrolė ir vidutinio amžiaus patelės. Antrojo eksperimento metu (16B pav.), kai atviro lauko arenos centre šviesos intensyvumas buvo 80 liuksų, tirtos jaunos arba kontrolė, vidutinio amžiaus bei vyresnio amžiaus patelių grupės.



16 pav. A – jaunų (n=9) ir vidutinio (vid. (n=8)) amžiaus žiurkių patelių grupių nubėgtas atstumas (cm), kai arenos centro šviesos intensyvumas 50 liuksų. B – jaunų (n=10), vidutinio (vid. (n=9)) bei vyresnio (vyr. (n=8)) amžiaus žiurkių patelių nubėgtas atstumas (cm), kai arenos centro šviesos intensyvumas 80 liuksų. Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistškai patikimą skirtumą nuo kitų grupių. Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

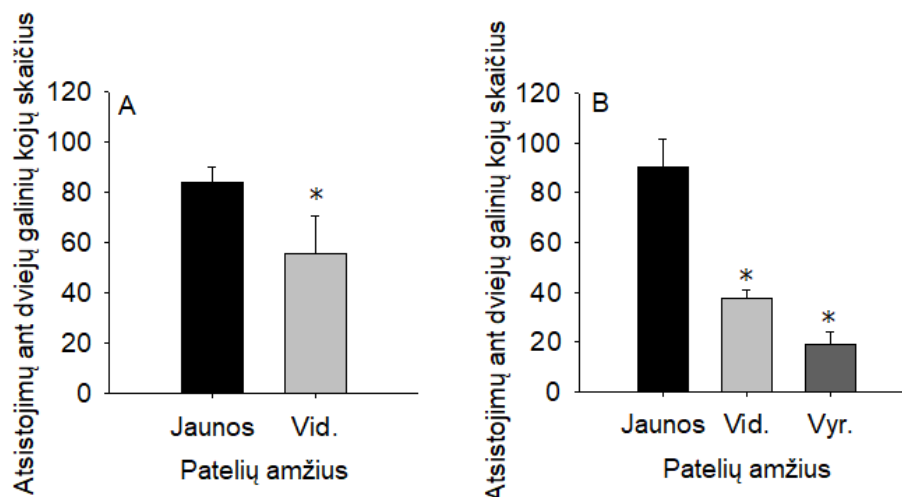
Pirmojo (16A pav.) eksperimento kontrolinės (5 mėnesių amžiaus) ir antrojo eksperimento (16B pav.) kontrolinės (3 mėnesių amžiaus) grupių nubėgtas atstumas lyginant su kitomis to paties testo amžiaus grupėmis buvo didžiausias. Abiejų eksperimentų metu pastebėta, kad didėjant gyvūno amžiui, lokomotorinis aktyvumas mažėja. Pirmojo eksperimento metu nustatytas statistškai patikimas nubėgto atstumo sumažėjimas lyginant kontrolinę jaunų patelių grupę su vidutinio amžiaus (12 mėnesių amžiaus) patelėmis [faktorius amžiaus grupė: $F(1;16)=5,5$; $p<0,05$]. Antrojo eksperimento metu taip pat palyginus su kontroline grupe statistškai reikšmingai sumažėjo vidutinio (9 mėnesių) amžiaus ir vyresnio amžiaus (16 mėnesių amžiaus) patelių lokomotorinis aktyvumas [faktorius amžiaus grupė: $F(2;26)= 18,9$; $p<0,001$].

Skirtingų žiurkių patelių amžiaus grupių baikštumas abiejų (A ir B) eksperimentų metu analizuotas skaičiuojant kiek laiko gyvūnas praleido arenos centre, kiek kartų atliko savęs švarinimosi (angl. grooming) veiksmus, kurių trukmė ilgesnė nei 5 sekundės, ir suskaičiuojant išmatų skaičių atviro lauko arenoje pasibaigus elgsenos testui. Pirmojo (A) ir antrojo (B) eksperimentų metu statistškai patikimų skirtumų tarp skirtingų amžiaus grupių nebuvo nustatyta šiems baikštumo parametrams: savęs švarinimosi veiksmams bei išmatų skaičiui po elgsenos testo. Baikštumo parametro – laiko, praleisto arenos centre, rezultatai pavaizduoti 17A pav. ir 17B pav.



17 pav. A – jaunų (n=9) ir vidutinio (vid. (n=8)) amžiaus patelių grupių laikas, praleistas arenos centre (s), kai šviesos intensyvumas 50 liuksų, B – jaunų (n=10), vidutinio (vid. (n=9)) ir vyresnio (vyr. (n=8)) amžiaus žiurkių patelių laikas, praleistas arenos centre (s), kai šviesos intensyvumas 80 liuksų. Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistiškai patikimą skirtumą nuo kitų grupių. Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

Pirmojo eksperimento (17A pav.) metu, kai šviesos intensyvumas arenos centre siekė 50 liuksų, nenustatyta statistiškai patikimo skirtumo tarp kontrolinės (5 mėnesių) ir vidutinio amžiaus patelių (12 mėnesių amžiaus) laiko, praleisto arenos centre. Antrojo eksperimento (17B pav.) metu, kai šviesos intensyvumas arenos centre buvo padidintas iki 80 liuksų, gauti rezultatai parodė, jog didėjant gyvūno amžiui, laikas, praleistas atviro lauko arenos centre, sumažėja. Antrojo eksperimento metu nustatytas statistiškai reikšmingas laiko, praleisto arenos centre, sumažėjimas lyginant kontrolinę jaunų (3 mėnesių amžiaus) patelių grupę su vyresnio amžiaus žiurkių patelių (16 mėnesių amžiaus) grupe [faktorius amžiaus grupė: $H(2)=7,36$, $p<0,05$]. Su amžiumi susijęs gyvūnų smalsumas ir noras tyrinėti naują aplinką buvo vertinamas skaičiuojant žiurkės atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičių (angl. rearings), Gauti rezultatai pateikti 18A pav. ir 18B pav.



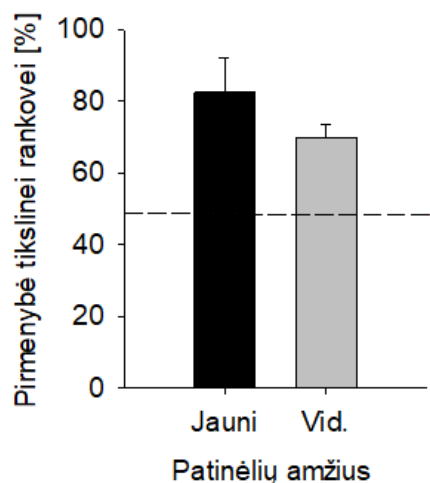
18 pav. A – jaunų (n=9) ir vidutinio (vid. (n=8)) amžiaus žiurkių patelių atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičius, kai arenos centro šviesos intensyvumas 50 liuksų; B – jaunų (n=10), vidutinio (vid. (n=9)) ir vyresnio (vyr. (n=8)) amžiaus patelių atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičius, kai arenos centro šviesos intensyvumas 80 liuksų. Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistiškai patikimą skirtumą nuo kitų grupių. Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

Abiejų eksperimentų metu, kurie skyrėsi centro šviesos intensyvumu, didžiausiu atsistojimų ant galinių kojų skaičiumi pasižymėjo kontrolinės (jaunos) žiurkių patelių grupės. Nustatyta, kad žiurkių patelių atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičiaus sumažėjimas tiesiogiai priklauso nuo gyvūnų amžiaus. Rezultatai parodo, jog didėjant žiurkių amžiui susidomėjimas nauja aplinka mažėja. Pirmojo eksperimento metu nustatyti statistiškai patikimi skirtumai tarp grupių [faktorius amžiaus grupė: $H(1)=4,7$, $p<0,05$], antrojo eksperimento metu taip pat gauti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp analizuotų grupių [faktorius amžiaus grupė: $H(2)=18,85$, $p<0,001$].

3.3. Su amžiumi susiję žiurkių patinų atminties pokyčiai

3.3.1. T formos labirinto testo rezultatai

T formos labirinto testo metu buvo vertinta dviejų tiriamųjų grupių: jaunų 3 mėnesių amžiaus patinėlių grupės (kontrolės) bei 8 mėnesių vidutinio amžiaus patinų grupės pirmenybė bandymo testo metu naujai, anksčiau neištirtai tikslinei rankovei (19 pav.).



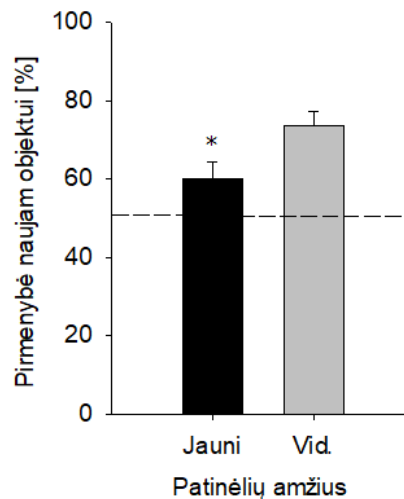
19 pav. Jaunų ($n=8$) ir vidutinio (vid. ($n=8$)) amžiaus patinų pirmenybė tikslinei (naujai) rankovei (%). Pirmenybė (%) apskaičiuota pagal žiurkės teisingus jėjimus į tikslinę, anksčiau netyrinėtą rankovę bandymo testo metu. Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M.

Kontrolinė jaunų (3 mėnesių amžiaus) patinėlių grupė lyginant su vidutinio amžiaus (8 mėn.) grupe pasižymėjo didesne pirmenybe naujai tikslinei rankovei. Statistiškai patikimų skirtumų tarp grupių nenustatyta ($p=0,16$).

Su amžiumi susijusių žiurkių patelių ir patinų darbinės erdvinės atminties pokyčiai buvo ištirti atliekant T formos labirinto testą. Eksperimentuose su patelėmis nustatyta, kad vyresnio amžiaus žiurkių grupė, atitinkanti žmogaus 40-65 gyvenimo metus, lyginant su jaunų (kontrolinių) žiurkių grupe, kurių amžius atitiko žmogaus 18-25 gyvenimo metus, teikė mažesnę pirmenybę naujai rankovei. Skirtumų tarp jaunų patelių grupės ir vidutinio amžiaus, atitinkančios žmogaus 25-40 gyvenimo metus, patelių grupės nebuvo nustatyta. Gali būti, jog šį testą žiurkėms vyresniame amžiuje atlikti yra sudėtinga, nes gyvūnai, didžiąją gyvenimo dalį praleidę nelaisvėje narvuose, neįgyja sugebėjimų orientuotis erdvėje. Eksperimentuose su patiniais nebuvo nustatyta reikšmingų skirtumų tarp jaunų patinų, atitinkančių žmogaus 18-25 gyvenimo metus, ir vidutinio amžiaus patinų, kurie atitinka žmogaus 25-40 gyvenimo metus. Tyrėjai Weinstock ir kiti (2011) taip pat analizavo su amžiumi susijusius erdvinės atminties pokyčius, panaudojant Morris vandens labirinto testą, ir nustatė, kad 16 mėnesių Wistar žiurkių patinai lyginant su 3 mėnesių amžiaus patiniais vėliau pasiekdavo paslėptą platformą dėl suprastėjusios erdvinės atminties.

3.3.2. Naujo objekto atpažinimo testo rezultatai

Naujo objekto atpažinimo testo metu buvo analizuoti dviejų patinų grupių: jaunų 3 mėnesių amžiaus (kontrolės) bei vidutinio 8 mėnesių amžiaus pirmenybė naujam objektui (%), rezultatai pateikti 20 pav.



20 pav. Jaunų ($n=9$) ir vidutinio (vid. ($n=8$)) amžiaus patinų pirmenybė naujam objektui (%).

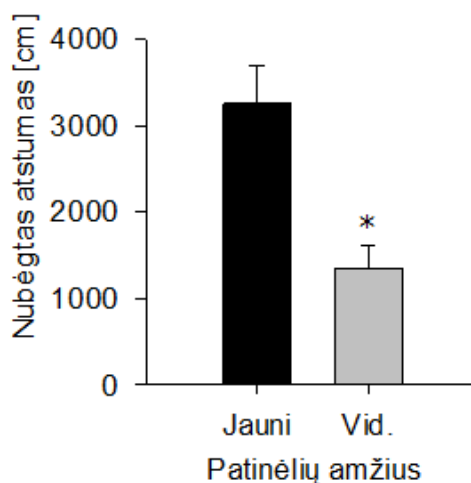
Pirmenybė naujam objektui (%) apskaičiuota pagal laiką, praleistą tyrinėjant naują objektą P2 bandymo metu. Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistiškai patikimą skirtumą nuo kitų grupių. Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

Šio elgsenos testo rezultatai parodė, jog vidutinio (8 mėnesių) amžiaus patinėlių pirmenybė naujam objektui lyginant su kontroline jaunų (3 mėnesių) patinėlių grupe yra statistiškai reikšmingai didesnė [faktorius amžiaus grupė: $F(1,16)=5,1$; $p<0,05$]. Jaunų patinėlių teikiama pirmenybė naujam objektui galėjo būti mažesnė, nes jie yra labiau aktyvūs ir judrūs už vidutinio amžiaus patinus, jų priėjimų prie pažįstamo ir naujo objektų skaičius bei tyrinėjimo trukmė buvo ilgesnė už vidutinio amžiaus žiurkes. Dėl šios priežasties gauti rezultatai nėra interpretuojami kaip jaunų patinų atminties sutrikdymas. Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, jog su amžiumi susijusių trumpalaikės epizodinės atminties sutrikimų tarp tirtų patinų grupių nenustatyta.

Su amžiumi susijusių žiurkių patelių ir patinų trumpalaikės epizodinės atminties pokyčiai buvo ištirti atliekant naujo objekto atpažinimo testą. Eksperimentai su patelėmis parodė, jog didėjant gyvūno amžiui pirmenybė naujam objektui P2 testo metu išliko reikšmingai nepakitusi, statistinių skirtumų tarp grupių nebuvo nustatyta. Panašius rezultatus aprašė Aktoprak ir kt. (2013), kurie tyrė 10 mėnesių amžiaus ir 28 mėnesių amžiaus Fisher 344XBrown Norway (F344XBN) žiurkių patinų elgsenos pokyčius. Šie tyrėjai nustatė, kad gyvūnai nepriklausomai nuo amžiaus teikė pirmenybę naujam objektui (Aktoprak *et al.*, 2013). Eksperimentų su patiniais rezultatai atskleidė, kad kontrolinės grupės pirmenybė naujam objektui buvo mažesnė už vidutinio amžiaus grupę. Manoma, kad taip galėjo nutikti todėl, kad jauni patinai, lyginant su vidutinio amžiaus, yra labiau aktyvūs ir pasižymi ilgesne pažįstamo ir naujo objektų tyrinėjimo trukme P2 testo metu.

3.3.3. Atviro lauko testo rezultatai

Atviro lauko testo metu buvo vertinti su amžiumi susiję žiurkių patinų lokomotorinio aktyvumo, baikštumo bei noro tyrinėti naują aplinką, pokyčiai. Analizei pasirinktos dvi skirtingo amžiaus žiurkių patinų grupės: jaunų 3 mėnesių amžiaus (kontrolė) ir vidutinio amžiaus (8 mėnesių). Lokomotorinio aktyvumo – nubėgto atstumo arenoje viso testo metu rezultatai pateikti 21 pav.



21 pav. Jaunų (n=9) ir vidutinio (vid. (n=8)) amžiaus patinų nubėgtas atstumas (cm).

Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistškai patikimą skirtumą nuo kitų grupių. Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

Nustatyta, kad didėjant gyvūno amžiui lokomotorinis aktyvumas mažėja: vidutinio amžiaus žiurkių patinų grupės nubėgtas atstumas lyginant su kontrolinės grupės jaunais patiniais yra statistškai reikšmingai mažesnis [faktorius amžiaus grupė: $F(1;16) = 12,8$, $p < 0,05$].

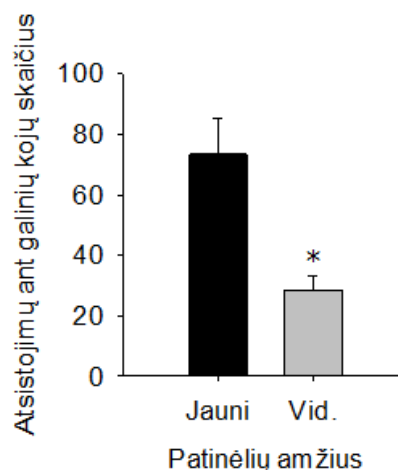
Su amžiumi susijusių žiurkių patelių ir patinų lokomotorinio aktyvumo pokyčiai buvo ištirti atliekant atviro lauko testą. Eksperimentai su patiniais ir patelėmis parodė, kad priklausomai nuo gyvūno amžiaus lokomotorinis aktyvumas sumažėjo. Mokslininkai Altun ir kt. (2007) taipogi eksperimentiškai patvirtino, jog didėjant žiurkių amžiui gyvūno lokomotorinis aktyvumas laipsniškai sumažėjo.

Atlikus skirtingų žiurkių amžiaus grupių (kontrolės – jaunų bei vidutinio amžiaus) baikštumo vertinimą: kiek laiko žiurkė praleido labiau apšviestoje arenos centro zonoje, kiek atliko savęs švarinimosi veiksmų (angl. grooming), užtrukusių ilgiau nei 5 sekundes, bei koks buvo išmatų skaičius po eksperimento, statistškai reikšmingų skirtumų tarp šių dviejų grupių nustatyta nebuvo.

Su amžiumi susijęs žiurkių patelių ir patinų baikštumas buvo ištirtas atliekant atviro lauko testą. Antrasis eksperimentas su patelėmis, kai šviesos intensyvumas arenos centre siekė 80 liuksų, parodė, jog didėjant amžiui žiurkių baikštumas padidėjo ir laikas, praleistas arenos centre, sumažėjo. Tyrėjai

Boguszewski ir kt. (2002) atlikę atviro lauko testą su jaunais 4 mėnesių amžiaus ir senyvo 24 mėnesių amžiaus Wistar žiurkių patiniais taipogi nustatė, jog laikas praleistas arenos centre su amžiumi sumažėjo ir tai parodė nerimo padidėjimą senyvo amžiaus patinų grupėje. Tuo tarpu eksperimentai su patiniais neparodė su amžiumi susijusio baikštumo padidėjimo ir taip galėjo būti todėl, kad gyvūnai dar buvo per jauni.

Su amžiumi susijęs gyvūno noras tyrinėti naują aplinką buvo atliktas suskaičiavus atsistojimus ant dviejų galinių kojų (angl. rearings), rezultatai pateikti 22 pav.



22 pav. Jaunų ($n=9$) ir vidutinio (vid. ($n=8$)) amžiaus patinų atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičius. Rezultatai pateikti vidutinėmis reikšmėmis $\pm$ S.E.M. * Nurodo statistškai patikimą skirtumą nuo kitų grupių. Pasirinktas reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

Jaunų žiurkių patinėlių (3 mėnesių amžiaus) atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičius buvo statistškai reikšmingai didesnis [faktorius amžiaus grupė: $H(1)=6,75$, $p<0,05$] lyginant su vidutinio amžiaus (8 mėnesių) patiniais. Gauti rezultatai patvirtinta, jog didėjant gyvūno amžiui noras tyrinėti naują aplinką (šiuo atveju atviro lauko arena) sumažėja.

Su amžiumi susijusio žiurkių patelių ir patinų noro tyrinėti naują aplinką pokyčiai buvo ištirti atliekant atviro lauko testą. Eksperimentai su patelėmis ir patiniais parodė, jog priklausomai nuo amžiaus gyvūnų noras tyrinėti naują aplinką laipsniškai sumažėjo. Tyrėjai Altun ir kt. (2007) teigia, jog su amžiumi susijęs atsistojimų ant dviejų galinių kojų sumažėjimas gali būti dėl senėjimo sukulto raumenų jėgos praradimo užpakalinėse galūnėse bei skeleto raumenų masės praradimo. Taipogi vidutinio amžiaus gyvūnų atsistojimų ant dviejų galinių kojų skaičius galėjo sumažėti dėl besitęsiančio kūno svorio augimo, kuris yra judrumą apribojantis veiksnys (Altun *et al.*, 2007).

3.4. Žiurkių patelių lytinio ciklo nustatymas

Po atliktų atviro lauko, naujo objekto atpažinimo bei T formos labirinto elgsenos testų buvo vertinamas šiuose testuose dalyvavusių skirtingo amžiaus žiurkių patelių lytinis ciklas tam, kad įsitikinti, jog patelių elgsenos rezultatams jis įtakos neturėjo.

Žiurkių patelių lytinis ciklas trunka 4-5 dienas ir yra sudarytas iš keturių fazių: priešrujo (proestrus), rujos (estrus), poovuliacinio etapo (metestrus) ir porujo (diestrus) (Hubscher *et al.*, 2005). Analizei buvo pasirinktos elgsenos testuose anksčiau tirtos jaunos 3 mėnesių amžiaus patelės (n=10), vidutinio 11 mėnesių amžiaus patelės (n=6) bei senos 18 mėnesių amžiaus patelės (n=5). Lyties organų išskyrų mikroskopija parodė, jog iš 10 jaunų patelių 5 patelėms lytinio ciklo fazė buvo priešrujis (proestrus), 1 patelei ruja (estrus), 2 patelėms poovuliacinis etapas (metestrus), 2 patelėms porujis (diestrus); iš 6 vidutinio amžiaus patelių 2 patelėms nustatytas priešrujis (proestrus), 3 patelėms ruja (estrus) ir 1 patelei porujis (diestrus); iš 5 senų žiurkių patelių 3 patelėms – priešrujis (proestrus), 1 patelei – ruja (estrus) ir 1 patelei – poovuliacinis etapas (metestrus). Apibendrinus rezultatus galima teigti, jog tarp skirtingų žiurkių patelių amžiaus grupių lytinio ciklo sinchronizacija nebuvo nustatyta, todėl įtakos elgsenos eksperimentams neturėjo.

IŠVADOS

1. Farmakologinis skopolamino sukeltas demencijos modelis išvystytas panaudojant 1 mg/kg ir 2 mg/kg kūno masės skopolamino intraperitonines injekcijas, kurios Wistar žiurkių patinams buvo leidžiamos kiekvieną dieną tris savaites. Skopolaminas, leidžiamas kas dieną 2 savaites, grįžtamai sutrikdė Wistar žiurkėms trumpalaikę darbinę atmintį ir tai buvo įrodyta naujo objekto atpažinimo testo metu. Grįžtamas skopolamino efektas parodo, kad šis modelis neatspindi negrįžtamo Alzheimerio tipo atminties sutrikimo.

Taip pat 2 mg/kg skopolamino dozė sukėlė ilgalaikį Wistar žiurkių ekstrapiramidinės motorinės sistemos aktyvumo padidėjimą, kuris pademonstruotas atviro lauko elgsenos testu. Skopolamino modelis yra tinkamas sutrikdyti žiurkių trumpalaikę atmintį, tačiau didesnės dozės gali sukelti nepageidautinų ekstrapiramidinių efektų ir neturėtų būti naudojamos.

2. Su amžiumi susijęs aktyvumo pokytis yra atvirkštinis skopolamino sukeltam modeliui – gyvūnų lokomotorinis aktyvumas bei noras tyrinėti naują aplinką negrįžtamai sumažėja, o baikštumas padidėja. Senėjimo metu sutriko tik darbinė erdvinė atmintis, todėl skopolamino gyvūnų modelis neatspindi su amžiumi atsirandančių žiurkių elgsenos ir atminties pokyčių.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Agnė Brazaitytė

Magistro baigiamasis darbas

WISTAR ŽIURKIŲ ATMINTIES SUTRIKDYMAS SKOPOLAMINU

SANTRAUKA

Demencija - daugiau nei vienos pažinimo srities kognityvinis sutrikimas, kuriam būdingas intelektinių gebėjimų praradimas, sutrikdantis įprastą socialinę veiklą. Viena iš labiausiai paplitusių ligų, kuriai būdinga demencija, yra Alzheimerio liga. Dėl demencijos paplitimo ir prastos ligos prognozės, mokslinių tyrimų prioritetu išlieka demencijos gyvūnų modelių kūrimas ir vystymas. Farmakologinis skopolamino amnezijos modelis dažnai naudojamas sumodeliuoti pažinimo ir atminties sutrikimus. Šio darbo tikslas buvo įdiegti farmakologinį Wistar žiurkių atminties sutrikdymo modelį. Darbo uždaviniai - sukelti atminties sutrikdymą Wistar žiurkėms panaudojant skopolamino injekcijas ir ištirti, kokią įtaką sukeltas atminties sutrikdymas turi gyvūnų elgsenai; nustatyti su amžiumi susijusius sveikų Wistar žiurkių atminties sutrikimus ir poveikį elgsenai bei palyginti su skopolamino sukeltais atminties pokyčiais.

Atminties sutrikdymo skopolaminu tyrimo metu 3 mėnesių amžiaus Wistar žiurkių patinams kasdien (1 kartą/dieną) 3 savaites be pertraukų buvo atliekamos 1 mg/kg ir 2 mg/kg skopolamino injekcijos po pilvaplėve ir atminties sutrikdymas vertintas kiekvieną savaitę atliekant atviro lauko bei naujo objekto atpažinimo testus. Siekiant nustatyti, ar skopolaminas sukėlė grįžtamą atminties sutrikdymą, tie patys elgsenos testai pakartoti praėjus savaitei po injekcijų nutraukimo. Su amžiumi susiję atminties pokyčiai nustatyti sveikoms Wistar žiurkių patelėms ir patinams. Žiurkių patelės buvo suskirstytos į tris grupes: jauno (3-5 mėn.), vidutinio (9-12 mėn.) ir vyresnio (16-17 mėn.) amžiaus, o patinai į dvi grupes: jauno (3 mėn.) ir vidutinio (8 mėn.) amžiaus bei atlikti atviro lauko, naujo objekto atpažinimo ir T formos labirinto testai. Kasdieninės 1 mg/kg ir 2 mg/kg skopolamino injekcijos grįžtamai sutrikdė trumpalaikę atmintį ir naujo objekto atpažinimą bei padidino lokomotorinį aktyvumą. Su amžiumi susijusių trumpalaikės atminties pokyčių nenustatyta, tačiau pasireiškė darbinės erdvinės atminties pokyčiai. Taip pat didėjant amžiui pastebėtas lokomotorinio aktyvumo sumažėjimas. Farmakologinis skopolamino modelis neatspindi su amžiumi atsirandančių žiurkių elgsenos ir atminties pokyčių.

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTER

Agnė Brazaitytė

Master thesis

SCOPOLAMINE-INDUCED MEMORY IMPAIRMENT IN WISTAR RATS

SUMMARY

Dementia is defined as cognitive impairment in more than one cognitive area characterized by loss of intellectual ability to interfere with usual social activities. One of the most common brain diseases that causes dementia is Alzheimer's disease and the chance of getting dementia from Alzheimer's disease increases with age. High research priority to develop animal model of dementia is due to disease prevalence and poor prognosis of the disease. Pharmacological scopolamine-induced amnesic model is frequently used to model cognitive dysfunctions and memory disturbances. The aim of the research was to implement a pharmacological model of memory impairment in Wistar rats. Goals of the thesis: to induce memory impairment in Wistar rats using scopolamine injections and to investigate the impact of memory impairment on animal behavior; to determine age-related memory impairment and behavioral changes in healthy Wistar rats and to compare to scopolamine induced memory impairment.

Scopolamine-induced memory impairment in 3-month-old Wistar male rats was induced by administration of 1 mg/kg and 2 mg/kg intraperitoneal injections of scopolamine every day (1 time/day) for 3 weeks. Memory dysfunction was evaluated using an open field test and novel object recognition test. In order to determine whether scopolamine induced reversible memory impairment the same behavioral tests were repeated 1 week after discontinuation of scopolamine injections. Age-related memory impairment was analyzed in healthy female and male Wistar rats. Female Wistar rats were divided into three groups: young (3-5 months), middle-aged (9-12 months) and older (16-17 months) while male Wistar rats were divided into two groups: young (3 months) and middle-aged (8 months). Open field, novel object recognition and T-maze behavioral tests were performed for these groups. It was determined that administration of 1 mg/kg and 2 mg/kg scopolamine injections everyday reversibly impaired short-term memory and novel object recognition. Additionally, scopolamine injections increased locomotor activity. Short-term memory was not impaired in aged rats, however changes in working spatial memory were observed. Also, age-related decrease of locomotor activity was noticed. Pharmacological scopolamine model does not reflect age-related behavioral and memory changes.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Aktoprak, I., Dinc, P., Gunay, G., & Adams, M. M. (2013). Novel object recognition is not affected by age despite age-related brain changes. *World Journal of Neuroscience*, 03(04), 269–274. <https://doi.org/10.4236/wjns.2013.34036>.

Alikatte K.L., Akondi B.R., Yerragunta V.G., Veerareddy P.R., Palle S. (2012) ‘Antiamnesic activity of Syzygium cumini against scopolamine induced spatial memory impairments in rats’, *Brain and Development*, 34(10), pp. 844–851. doi:10.1016/j.braindev.2012.02.008.

Altun, M., Bergman E., Edström E., Johnson H., Ulfhake B. (2007) ‘Behavioral impairments of the aging rat’, *Physiology & Behavior*, 92(5), pp. 911–923. doi:10.1016/j.physbeh.2007.06.017.

Arvanitakis, Z. and Bennett, D.A. (2019) ‘What Is Dementia?’, *JAMA*, 322(17), p. 1728. doi:10.1001/jama.2019.11653.

Aykac, A., Ozbeyli, D., Uncu, M., Ertaş, B., Kılınç, O., Şen, A., Orun, O., & Sener, G. (2019). Evaluation of the protective effect of Myrtus communis in scopolamine-induced Alzheimer model through cholinergic receptors. *Gene*, 689, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.007>.

Azman, K., Othman, Z., Zakaria, R., AbdAziz, C., & Al-Rahbi, B. (2015). Tualang honey improves memory performance and decreases depressive-like behavior in rats exposed to loud noise stress. *Noise and Health*, 17(75), 83. <https://doi.org/10.4103/1463-1741.153388>.

Belovicova, K., Bogi E., Csatosova K., Dubovicky M. (2017) ‘Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats’, *Interdisciplinary Toxicology*, 10(1), pp. 40–43. doi:10.1515/intox-2017-0006.

Bertaina-Anglade V., Enjuanes E., Morillon D., Drieu la Rochelle C.. (2006) ‘The object recognition task in rats and mice: A simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity’, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54(2), pp. 99–105. doi:10.1016/j.vascn.2006.04.001.

Bertrand D. and Wallace T.L. (2020) ‘A Review of the Cholinergic System and Therapeutic Approaches to Treat Brain Disorders’, *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, pp. 1–28. doi:10.1007/7854_2020_141.

Bhatt, P.C., Yadav R.S., Pandey P., Srivastava P., Puri A. (2014) ‘Scopolamine induced behavioral and biochemical modifications and protective effect of Celastrus paniculatus and Angelica glauca in rats’, *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 4(3), p. 158. doi:10.4103/2231-0738.132675.

Bhuvanendran S., Kumari Y., Othman I., Shaikh M.F. (2018) ‘Amelioration of Cognitive Deficit by Embelin in a Scopolamine-Induced Alzheimer’s Disease-Like Condition in a Rat Model’, *Frontiers in Pharmacology*, 9, p. 665. doi:10.3389/fphar.2018.00665.

Boguszewski, P. and Zagrodzka, J. (2002) ‘Emotional changes related to age in rats—a behavioral analysis’, *Behavioural Brain Research*, 133(2), pp. 323–332. doi:10.1016/S0166-4328(02)00018-9.

Buechel, H.M., Popovic J., Staggs K., Anderson K.L., Thibault O., Blalock E.M. (2014) ‘Aged rats are hypo-responsive to acute restraint: implications for psychosocial stress in aging’, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6. doi:10.3389/fnagi.2014.00013.

- Bye, C.M., Hong N.S., Moore K., Deibel S.H., McDonald R.J. (2019) 'The effects of pool shape manipulations on rat spatial memory acquired in the Morris water maze', *Learning & Behavior*, 47(1), pp. 29–37. doi:10.3758/s13420-018-0319-0.
- Chen, C., Li X., Zhang S., Tu Y., Wang Y., Sun H. (2014) '7,8-Dihydroxyflavone Ameliorates Scopolamine-Induced Alzheimer-Like Pathologic Dysfunction', *Rejuvenation Research*, 17(3), pp. 249–254. doi:10.1089/rej.2013.1519.
- Chintoh, A. (2003) 'Role of cholinergic receptors in locomotion induced by scopolamine and oxotremorine-M', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76(1), pp. 53–61. doi:10.1016/S0091-3057(03)00196-5.
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>.
- Czéh, B. and Simon, M. (2021) 'Benefits of animal models to understand the pathophysiology of depressive disorders', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 106, p. 110049. doi:10.1016/j.pnpbp.2020.110049.
- Darcet, F., Mendez-David I., Tritschler L., Gardier A.M., Guilloux J.P., David D.J. (2014) 'Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression', *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8. doi:10.3389/fnbeh.2014.00136.
- Day, J., Damsma, G. and Fibiger, H.C. (1991) 'Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: An in vivo microdialysis study', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 38(4), pp. 723–729. doi:10.1016/0091-3057(91)90233-R.
- Deacon, R. M. J., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*, 1(1), 7–12. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.2>.
- Ghasemi, A., Jeddi, S. and Kashfi, K. (2021) 'The laboratory rat: age and body weight matter', *EXCLI Journal*; 20:Doc1431; ISSN 1611-2156 [Preprint]. doi:10.17179/EXCLI2021-4072.
- Grande, G., Qiu, C. and Fratiglioni, L. (2020) 'Prevention of dementia in an ageing world: Evidence and biological rationale', *Ageing Research Reviews*, 64, p. 101045. doi:10.1016/j.arr.2020.101045.
- Hånell, A. and Marklund, N. (2014) 'Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research', *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8. doi:10.3389/fnbeh.2014.00252.
- Haider, S., Tabassum, S. and Perveen, T. (2016) 'Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: A comparative study', *Brain Research Bulletin*, 127, pp. 234–247. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.10.002.
- Hampel, H., Mesulam M.M., Cuellar A.C., Farlow M.R., Giacobini E., Grossberg G.T., Khachaturian A.S., Vergallo A., Cavado E., Snyder P.J., Khachaturian Z.S. (2018) 'The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease', *Brain*, 141(7), pp. 1917–1933. doi:10.1093/brain/awy132.
- Heisler, J.M., Morales J., Donegan J.J., Jett J.D., Redus L., O'Connor J.C. (2015) 'The Attentional Set Shifting Task: A Measure of Cognitive Flexibility in Mice', *Journal of Visualized Experiments*, (96), p. 51944. doi:10.3791/51944.

- Hosseini, M., Mohammadpour T., Karami R., Rajaei Z., Sadeghnia H.R., Soukhtanloo M. (2015) 'Effects of the hydro-alcoholic extract of *Nigella sativa* on scopolamine-induced spatial memory impairment in rats and its possible mechanism', *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 21(6), pp. 438–444. doi:10.1007/s11655-014-1742-5.
- Hou, Y., Dan X., Babbar M., Wei Y., Hasselbalch S.G., Croteau D.L., Bohr V.A. (2019) 'Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease', *Nature Reviews Neurology*, 15(10), pp. 565–581. doi:10.1038/s41582-019-0244-7.
- Hubscher, C., Brooks, D. and Johnson, J. (2005) 'A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle', *Biotechnic & Histochemistry*, 80(2), pp. 79–87. doi:10.1080/10520290500138422.
- Hughes, R.N., Desmond, C.S. and Fisher, L.C.E. (2004) 'Room novelty, sex, scopolamine and their interactions as determinants of general activity and rearing, and light–dark preferences in rats', *Behavioural Processes*, 67(2), pp. 173–181. doi:10.1016/j.beproc.2004.03.021.
- d'Isa, R., Comi, G. and Leocani, L. (2021) 'Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze', *Scientific Reports*, 11(1), p. 21177. doi:10.1038/s41598-021-00402-7.
- Jahanshahi, M., Nikmahzar, E. and Sayyahi, A. (2020) 'Vitamin E therapy prevents the accumulation of congophilic amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease', *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(1). doi:10.22038/ijbms.2019.38165.9067.
- Jayanthi M., Thirunavukkarasu S.V., Raja S., Venkataraman S. (2013) 'Effect of Manasamitra Vatakam Against Aluminium Induced Learning and Memory Impairment of Apoptosis in Rat's Hippocampus and Cortex', *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 04(04). doi:10.4172/2157-7609.1000154.
- Kim, D.-H., Jang, Y.-S., Jeon, W. K., & Han, J.-S. (2019). Assessment of Cognitive Phenotyping in Inbred, Genetically Modified Mice, and Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Experimental Neurobiology*, 28(2), 146–157. <https://doi.org/10.5607/en.2019.28.2.146>.
- Klinkenberg, I. and Blokland, A. (2010) 'The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(8), pp. 1307–1350. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.04.001.
- Kohnen-Johannsen, K. L. and Kayser, O. (2019) 'Tropane Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production', *Molecules*, 24(4), p. 796. doi:10.3390/molecules24040796.
- Lietuvos Respublikos Seimas, 2012. Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo (2012-10-31, Nr. B1-866). Prieiga per internetą: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.437081/asr>
- Lietuvos Respublikos Seimas, 1997. Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymas (1997-11-06, Nr. VIII-500). Prieiga per internetą: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.46424/asr>
- Manral, A. , Meena P., Saini V., Siraj F., Shalini S., Tiwari M. (2016) 'DADS Analogues Ameliorated the Cognitive Impairments of Alzheimer-Like Rat Model Induced by Scopolamine', *Neurotoxicity Research*, 30(3), pp. 407–426. doi:10.1007/s12640-016-9625-5.

- Mueller, K. and Peel, J.L. (1990) 'Scopolamine produces locomotor stereotypy in an open field but apomorphine does not', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 36(3), pp. 613–617. doi:10.1016/0091-3057(90)90264-I.
- Neha, Sodhi R.K., Jaggi A.S., Singh N. (2014) 'Animal models of dementia and cognitive dysfunction', *Life Sciences*, 109(2), pp. 73–86. doi:10.1016/j.lfs.2014.05.017.
- Nestler, E.J. and Hyman, S.E. (2010) 'Animal models of neuropsychiatric disorders', *Nature Neuroscience*, 13(10), pp. 1161–1169. doi:10.1038/nn.2647.
- Popik, P. and Nikiforuk, A. (2015) 'Attentional Set-Shifting Paradigm in the Rat', *Current Protocols in Neuroscience*, 72(1). doi:10.1002/0471142301.ns0951s72.
- Robinson, N.B., Krieger K., Khan F.M., Huffman W., Chang M., Naik A., Yongle R., Hameed I., Krieger K., Girardi L.N., Gaudino M. (2019) 'The current state of animal models in research: A review', *International Journal of Surgery*, 72, pp. 9–13. doi:10.1016/j.ijssu.2019.10.015.
- Sengupta, P. (2013) 'The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's', *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), p. 7.
- Sotoudeh, N., Namavar M.R., Zarifkar A., Heidarzadegan A.R. (2020) 'Age-dependent changes in the medial prefrontal cortex and medial amygdala structure, and elevated plus-maze performance in the healthy male Wistar rats', *IBRO Reports*, 9, pp. 183–194. doi:10.1016/j.ibror.2020.08.002.
- van der Staay, F.J., Arndt, S.S. and Nordquist, R.E. (2009) 'Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders', *Behavioral and Brain Functions*, 5(1), p. 11. doi:10.1186/1744-9081-5-11.
- Sudakov, S.K., Alekseeva E.V., Nazarova G.A., Bashkatova V.G. (2021) 'Age-Related Individual Behavioural Characteristics of Adult Wistar Rats', *Animals*, 11(8), p. 2282. doi:10.3390/ani11082282.
- Sweis, B. M., Bachour, S. P., Brekke, J. A., Gewirtz, J. C., Sadeghi-Bazargani, H., Hevesi, M., & Divani, A. A. (2016). A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behavioural Brain Research*, 296, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.015>.
- Tanaka, S., Young, J. W., Gresack, J. E., Geyer, M. A., & Risbrough, V. B. (2011). Factor analysis of attentional set-shifting performance in young and aged mice. *Behavioral and Brain Functions*, 7(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-7-33>.
- Tang, K.S. (2019) 'The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of Alzheimer's biomarkers', *Life Sciences*, 233, p. 116695. doi:10.1016/j.lfs.2019.116695.
- Weinstock, M., Luques, L., Poltyrev, T., Bejar, C., & Shoham, S. (2011). Ladostigil prevents age-related glial activation and spatial memory deficits in rats. *Neurobiology of Aging*, 32(6), 1069–1078. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.06.004>
- Wooden, J.I., Spinetta M.J., Nguyen T., O'Leary C.I., Leasure J.L. (2021) 'A Sensitive Homecage-Based Novel Object Recognition Task for Rodents', *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15, p. 680042. doi:10.3389/fnbeh.2021.680042.

Woodson, J. C., Macintosh, D., Fleshner, M., & Diamond, D. M. (2003). Emotion-Induced Amnesia in Rats: Working Memory-Specific Impairment, Corticosterone-Memory Correlation, and Fear Versus Arousal Effects on Memory. *Learning & Memory*, 10(5), 326–336. <https://doi.org/10.1101/lm.62903>.

Xiang, Z., Thompson A.D., Jones C.K., Lindsley C.W., Conn P.J. (2012) ‘Roles of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtype in the Regulation of Basal Ganglia Function and Implications for the Treatment of Parkinson’s Disease’, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 340(3), pp. 595–603. doi:10.1124/jpet.111.187856.