



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ**

Десислава Здравкова Крушовлиева

**ПРОУЧВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА МЕЛАТОНИНОВИЯ
ДЕФИЦИТ ВЪРХУ НЯКОИ МЕХАНИЗМИ НА СТАРЕЕНЕ ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ПИНЕАЛЕКТОМИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация за присъждане на образователната и
научна степен “ДОКТОР”

Научен ръководител: проф. д-р Яна Димитрова Чекаларова – ИНБ-БАН

София, 2025



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

Десислава Здравкова Крушовлиева

ПРОУЧВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА МЕЛАТОНИНОВИЯ
ДЕФИЦИТ ВЪРХУ НЯКОИ МЕХАНИЗМИ НА СТАРЕЕНЕ ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ПИНЕАЛЕКТОМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация за присъждане на образователната и
научна степен “ДОКТОР”

Официални рецензенти:

проф. д-р Христо Гагов
доц. д-р Мария Лазарова

Научен ръководител:

проф. д-р Яна Димитрова Чекаларова – ИНБ-БАН
София, 2025

Дисертационната работа съдържа 153 стандартни машинописни страници и е онагледена с 42 фигури и 2 таблици. Библиографията обхваща 335 заглавия.

Изследванията по дисертационната работа са извършвани в Институт по невробиология – БАН. На заседание на Научния съвет на ИНБ-БАН бе разкрита процедура за защита с протокол № 36 / 18.06.2025 г.

Защитата на дисертационната работа ще се състои **.09.2025г. от 11.00 ч.** в залата на Институт по невробиология – БАН, ул. "Академик Г. Бончев", бл. 23, ет. 2, на открито заседание на научното жури, утвърдено от НС със Заповед на Директора на ИНБ-БАН № .

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Институт по невробиология на БАН, бл. 23, ет. 2.



СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА

Кирилица

- АТФ аденозинтрифосфат
- БА болест на Алцхаймер
- БАН Българската Академия на Науките
- БП болест на Париконсин
- ДНК Дезоксирибонуклеиновата киселина
- ДР Диабетната ретинопатия
- ЕТК Електронно-транспортна верига
- ИНБ Институт по Невробиология
- мтДНК Митохондриална дезоксирибонуклеиновата киселина
- Пин Пинеалектомия
- ПК префронталната кора
- ФК Фронтална кора
- ЦНС Централна нервна система
- Шам Шам-операция

A

AADC – Aromatic l-amino acid decarboxylase
 AANAT – Aralkylamine N-acetyltransferase
 AChE – Acetylcholinesterase
 ACTH – Adrenocorticotrophic hormone
 AFMK – N1-Acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine
 AIF – Apoptosis-inducing factor
 Akt – protein kinase B
 AMP – Activated protein kinase
 AMPK – Activated protein kinase
 APP – amyloid precursor protein
 ASMT – N-Acetylserotonin O-methyltransferase
 Atg-5 – Autophagy protein 5
 ATP – Adenosine triphosphate
 A β – amyloid- β

B

BACE1 – beta-site amyloid precursor protein (APP) cleaving enzyme-1
 BAD – BCL2 Associated Agonist Of Cell Death
 BaP – Benzo[a]pyrene
 BAX – BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
 BDNF – Brain-Derived Neurotrophic Factor
 BMAL1 / Bmal1 – Brain and muscle ARNT-like 1

C

CA1/CA2/CA3 – Cornu ammonis
CAT – Catalase
CASP – caspase
CASP3 – Caspase-3
CHOP – C/EBP Homologous Protein
CLOCK – Circadian locomotor output cycles kaput
ColIV – Collagen IV
CREB – cAMP-response element binding protein
CSF – Cerebrospinal fluid
CTL β – Carboxyl-terminal Fragments
Cry – Cryptochrome
CY3 – Cyanine3
CaMKII – Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
Cyt-C – Cytochrome c
cGMP – Cyclic guanosine monophosphate

D

DAB – Diaminobenzidine
DG – Dentate Gyrus
DI – Discrimination Index
DR Diabetic retinopathy

E

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA – Egtazic acid
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
EPM – Elevated Plus-Maze Test
ER – Endoplasmic reticulum
ERK1/2 – Extracellular signal-regulated kinases

F

FC – Frontal Cortex
FITC – Fluorescein Isothiocyanate
FO – Familiar Object
Fn – Fibronectin
FoxO-1 – Forkhead box protein O1

G

G6PD – Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency
GABA – Gamma-Aminobutyric Acid
GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP – Glial fibrillary acidic protein
GPCRs – G protein-coupled receptors
GPx – Glutathione peroxidase



GSH – Glutathione
 GSH-Px – Glutathione peroxidase
 GSK3 β – Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
 GSSG – Glutathione disulfide
 GrDG – Granular layer of the dentate gyrus

H

H₂O₂ – Hydrogen peroxide
 HDAC1 – Histone deacetylase 1
 Hes1 – Hairy and Enhancer of Split 1
 HIOMT – Hydroxyindole-O-methyltransferase
 HPMC – Hydroxypropyl Methylcellulose
 HO-1 – Heme Oxygenase-1
 HPA – Hypothalamic–pituitary–adrenal axis
 HRP – Horseradish Peroxidase
 HSP – Heat Shock Protein

I

I κ B – Inhibitor of NF κ B
 IFN- γ – Interferon gamma
 IGF-1 – Insulin-like growth factor 1
 IgD – Immunoglobulin D
 IgG1 – Immunoglobulin G1
 IgM – Immunoglobulin M
 IL-1 β – Interleukin 1 beta
 IL-2 – Interleukin 2
 IL-6 – Interleukin 6

L

LDT – Light-Dark Test
 LPS – Lipopolysaccharide
 LRP1 Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1
 LTP – Long-Term Potentiation

M

MAPK – Mitogen-activated protein kinase
 MDA – Malondialdehyde
 Mfn1 – Mitofusin 1
 MPT – Mitochondrial permeability transition
 mPTP – Mitochondrial permeability transition pores
 MT1 – Melatonin receptor 1
 MT2 – Melatonin receptor 2
 mTOR – Mechanistic Target of Rapamycin

N

NAFLD – Non-alcoholic fatty liver disease
Namt – Nicotinamide Phosphoribosyltransferase
NEP – neprilysin
NeuN – Neuronal nuclei
NF κ B – Nuclear factor kappa B
NK – Natural killer
NLRP3 – NOD-like receptor protein 3
NMDA – N-methyl-D-aspartate
NO – Novel Object
Notch1 – notch homolog protein 1
NSFT – Novelty-Suppressed Feeding Test
Nrf2 – Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NQO2 – Quinone reductase 2

O

3-OHM 3-hydroxymelatonin
OD – Optical Density
OF – Open Field
OPA1 OPA1 Mitochondrial Dynamin Like GTPase
ORT – Object Recognition Test

P

p53 – Protein p53
P90/420/540 – Postnatal day
PBS – Phosphate-buffered saline
p-CREB – Phosphorylated CREB
Per1 – Period Circadian Regulator 1
Per2 – Period Circadian Regulator 2
PFA – Paraformaldehyde
PGC-1 α – PPAR gamma coactivator 1-alpha
PGC-1 β – PPAR gamma coactivator 1-beta
PGC1 α – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1- α
PI3K – Phosphoinositide 3-kinases
PINK1 – PTEN Induced Kinase 1
PLC- γ – Phospholipase C gamma
PMSF – Serine protease inhibitor
PoDG – Polymorphic layer of the dentate gyrus
Py – Stratum pyramidale

R

Rad – Stratum radiatum
RAGE receptor for advanced glycation end products
RAM – Radial Arm Maze



RBD REM sleep behavior disorder
 RNS – Reactive nitrogen species
 ROR α RAR Related Orphan Receptor A
 ROS – Reactive oxygen species

S

SAMR1 – Senescence Accelerated Mouse Resistant 1
 SAMP8 – Senescence-accelerated mouse-prone 8
 SAP – % Spontaneous Alternation Percent
 SCN – Suprachiasmatic nucleus
 SEM – Standard error of the mean
 sGC Soluble guanylyl cyclase
 SIRT – Sirtuins
 SIRT1 – Sirtuin 1
 SIRT2 – Sirtuin 2
 SIRT3 – Sirtuin 3
 SLu – Stratum lucidum
 SLP – Sphingolipid
 SNAT Serotonin N-acetyltransferase
 SOCS1 – Suppressor of Cytokine Signaling 1
 SOD – Superoxide dismutase

T

TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances
 TNF- α – Tumor Necrosis Factor-alpha
 TPH – Tryptophan hydroxylase
 Tris-HCl – Tris hydrochloride
 TrkB – Tropomyosin receptor kinase B
 TTFL transcription-translation feedback loop
 TXNIP Thioredoxin-Interacting Protein

U

UTMD Utah Medical Products

V

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

W

Wnt/ β Wnt signaling pathways

Z

Zn²⁺ – Zinc
 ZT – Zeigebler time

I. УВОД

Стареенето представлява сложен и многопластов биологичен процес, характеризиращ се с постепенна загуба на клетъчни функции и повишена уязвимост към множество хронични заболявания. Един от ключовите фактори, участващ в синхронизирането на биологичните ритми на вътреклетъчните и физиологичните процеси с денонощния цикъл светло/тъмно, е мелатонинът – хормон, секретиран от епифизната жлеза. Той изпълнява критична роля не само в синхронизацията на циркадните ритми и контрола на съня, но и като мощен ендегенен антиоксидант и модулатор на имунната система. С напредването на възрастта хормоналната активност на мелатонина намалява, което допринася за множество от съпътстващите стареенето промени в организма и за повишена предразположеност към развитието на различни патологични състояния.

Използването на експерименталния модел на пинеалектомия – хирургично отстраняване на епифизата – предоставя уникална възможност за системно изследване на ефектите от мелатониновия дефицит върху различни биологични механизми, свързани със стареенето. Този модел позволява анализ на въздействието от липсата на мелатонин върху оксидативния стрес, клетъчната сигнализация, както и върху структурните и функционалните промени в различни тъкани.

Стареенето оказва значимо влияние върху всички органи и системи, включително и върху централната нервна система. С напредване на възрастта настъпват съществени промени в когнитивните функции – памет, внимание, учене и изпълнителни способности. Успоредно с това се наблюдава повишена емоционална уязвимост, проявяваща се чрез засилена тревожност, депресивни състояния и нарушена адаптация към стресови ситуации. Въпреки че тези промени често се възприемат като естествена част от процеса на стареене, механизмите, които ги предизвикват, все още не са напълно изяснени.

Настоящият дисертационен труд има за цел да предостави по-задълбочено разбиране за влиянието на мелатониновия дефицит в различни възрастови периоди върху емоционалните и когнитивни функции при плъхове, както и върху механизмите, обуславящи наблюдаваните промени. Придобитите знания биха имали транслационно значение за изясняване ролята на хормона в три възрастови етапа – младост, средна възраст и старост – и биха спомогнали за разработването на терапевтични подходи за



забавяне на процесите на стареене. Проучването включва поведенчески тестове за оценка на нивата на тревожност и когнитивните способности, включително работната памет, краткосрочното разпознаване и пространствената памет.

Паралелно се изследват биохимични и молекулярни маркери, свързани със стресовия отговор и невропластичността, с особен акцент върху оста хипоталамус-хипофиза-надбъбречна жлеза (НРА) и експресията на топлинните шокови протеини HSP70 и HSP90 в ключови мозъчни структури – фронталната кора и хипокампа. Допълнително се анализира ролята на сигналния път BDNF/ERK1/2/CREB в хипокампа, участващ в регулацията на синаптичната пластичност, ученето и паметта.

Резултатите от този труд показват, че мелатониновият дефицит води до изразени нарушения в емоционалните и когнитивните процеси, като степента и характерът на тези промени варират в зависимост от възрастта на плъховете. Идентифицирани са потенциални възрастово-специфични механизми, чрез които мелатониновият дефицит оказва влияние върху мозъчната функция. Това открива нови възможности за разработване на насочени терапевтични интервенции. Данните подчертават значението на ранната диагностика и терапевтична намеса при мелатонинов дисбаланс, както и предоставят нови перспективи за превенция на свързаните с възрастта емоционални и когнитивни нарушения.

II. ЦЕЛИ и ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да бъде изследвана ролята на мелатониновия дефицит в процеса на стареене, както и предполагаемите механизми, чрез които този хормон модулира скоростта и характера на възрастовите промени.

За постигане на тази комплексна цел бяха формулирани следните основни задачи:

1. Да се изследва преживяемостта на шам-оперирани плъхове и на такива с премахната епифиза, съответно на 3-, 14- и 18-месечна възраст, с цел да се изясни влиянието на мелатониновия дефицит върху продължителността на живота.
2. Да се извърши оценка на състоянието на тревожност при шам-оперирани и на такива с премахната епифиза плъхове в различни възрастови етапи.
3. Да се изясни ролята на плазмения кортикостерон и на топлинно-шоковите протеини HSP70 и HSP90 във фронтална кора и хипокамп за промените в емоционалния статус на животните при мелатонинов дефицит в различни възрастови периоди.
4. Да се проучи работната, краткосрочната пространствена и разпознавателната памет при полово зрели млади, на средна възраст и стари шам-оперирани плъхове и такива с мелатонинов дефицит.
5. Да се изследва ролята на BDNF/ERK1/2/CREB сигналния път в хипокампа, който медира ефектите на мелатониновата система върху когнитивните функции по време на стареене.



III. МАТЕРИАЛИ и МЕТОДИ

За изпълнение на поставените задачи бе предвидено използването на следните експериментални подходи, методи, апаратура и изследователски техники:

1. Експериментални животни.

Експериментите са осъществени върху мъжки плъхове от порода Wistar (Развъдна база към ИНБ, БАН), разпределени в три възрастови категории, в зависимост от периода на хирургическа манипулация:

- Млади половозрели (3 месечни);
- На средна възраст (14 месечни);
- Стари (18 месечни).

Експерименталните животни са отглеждани при стандартни условия: в плексигласови клетки, в групи по 3-4 животни, при температура $21 \pm 1^\circ\text{C}$, влажност 50-60%, изкуствен режим на осветление и свободен достъп до храна и вода, с изключение на времето за провеждане на експериментите. Плъховете от всяка възраст бяха разделяни в две подгрупи, в зависимост от хирургичната манипулация: 1) шам-оперирани, с прилагане на всички оперативни действия като при пинеалектомия, с изключение на последната стъпка свързана с отстраняване на епифизата и 2) плъхове с пинеалектомия.

Всички експериментални процедури бяха съобразени с изискванията за хуманно отношение към експерименталните животни, които са в съгласие с EC Directive 2010/63/EU и одобрени (No 176/2019) от Българската Агенция за Безопасност на Храните (БАБХ)

2. Експериментален модел на пинеалектомия

След анестезиране чрез интраперитонеално инжектиране на комбинация от кетамин (80 mg/kg) и ксилазин (20 mg/kg) и фиксиране на стереотаксичен апарат, хирургичната манипулация за отстраняване на епифизата бе осъществена съгласно методиката описана от Hoffman и Reiter (1965) и прилагана рутинно от екипа в ИНБ (Nenchovska et al., 2014; Tchekalarova et al. 2016A, 2020A, Б).

3. Експериментален дизайн

Експерименталните животни бяха разпределени в групи по 8-10 броя. Времето от вземането им от вивариума до настаняването им в клетки и началото на експериментите беше една седмица.

In vivo и *in vitro* експериментите бяха реализирани с използване на шест групи, разпределени въз основа на:

1. **Процедура на третиране** – sham-операция или пинеалектомия.
2. **Възраст на пинеалектомия** – 3 месеца, постнатален ден (P90), 14 месеца (P420) и 18 месеца (P540).

Групи:

1. **Контролна sham-оперирана група (P90)** – шам 3м.
2. **Експериментална група (P90)**, плъхове с пинеалектомия– пин 3м.
3. **Контролна група (P420)**, sham-оперирани плъхове – шам 14м.
4. **Експериментална група (P420)**, плъхове с пинеалектомия - пин 14м.
5. **Контролна група (P540)**, sham-оперирани плъхове – шам 18м.
6. **Експериментална група (P540)**, плъхове с пинеалектомия - пин 18 м.

Този дизайн позволява сравнение на ефектите от пинеалектомията върху различни възрастови групи и оценка на ролята на епифизата във физиологичните процеси при стареене.

За изпълнение на задачите, научно-изследователската работа беше организирана в три експериментални дизайна:

Експеримент №1 – проследяване на двигателна активност и продължителност на преживяемостта

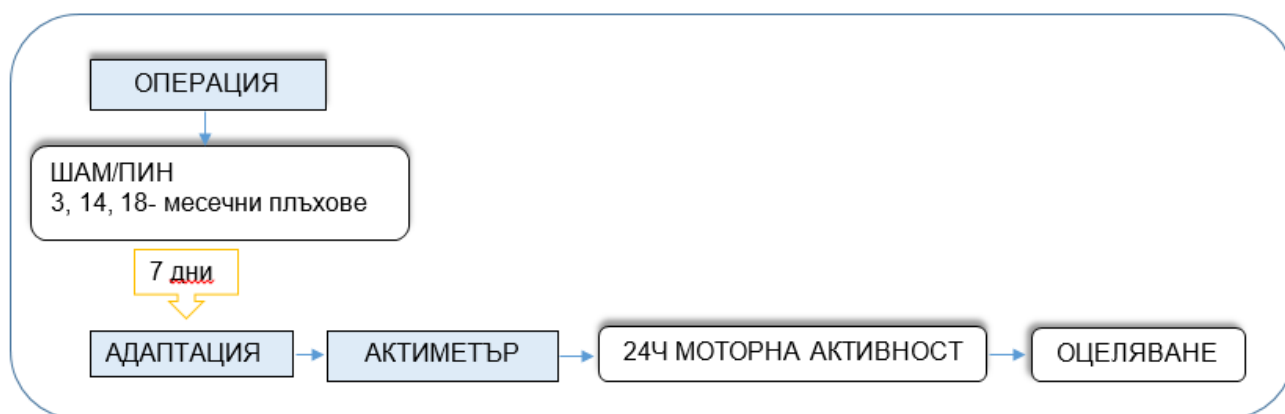
Експериментът включваше и оценка на поведенчески показатели, като основният параметър беше двигателната активност в рамките на 24 часа. Чрез този анализ се проследяваше евентуално понижаване на двигателната активност, което може да бъде



индикатор за физиологични промени, свързани с дефицита на мелатонин и нарушения в циркадните ритми (Фиг. 1).

В допълнение към изследване на двигателната активност бе осъществено проследяване на преживяемостта при 3-, 14- и 18-месечни шам-плъхове и такива с пинеалектомия.

Тези изследвания предоставиха ценна информация за ролята на епифизната жлеза в регулирането на жизнените процеси, както и за потенциалните последствия от нейното отстраняване върху двигателната активност и нейния циркадианен характер и продължителността на живота и на животните.

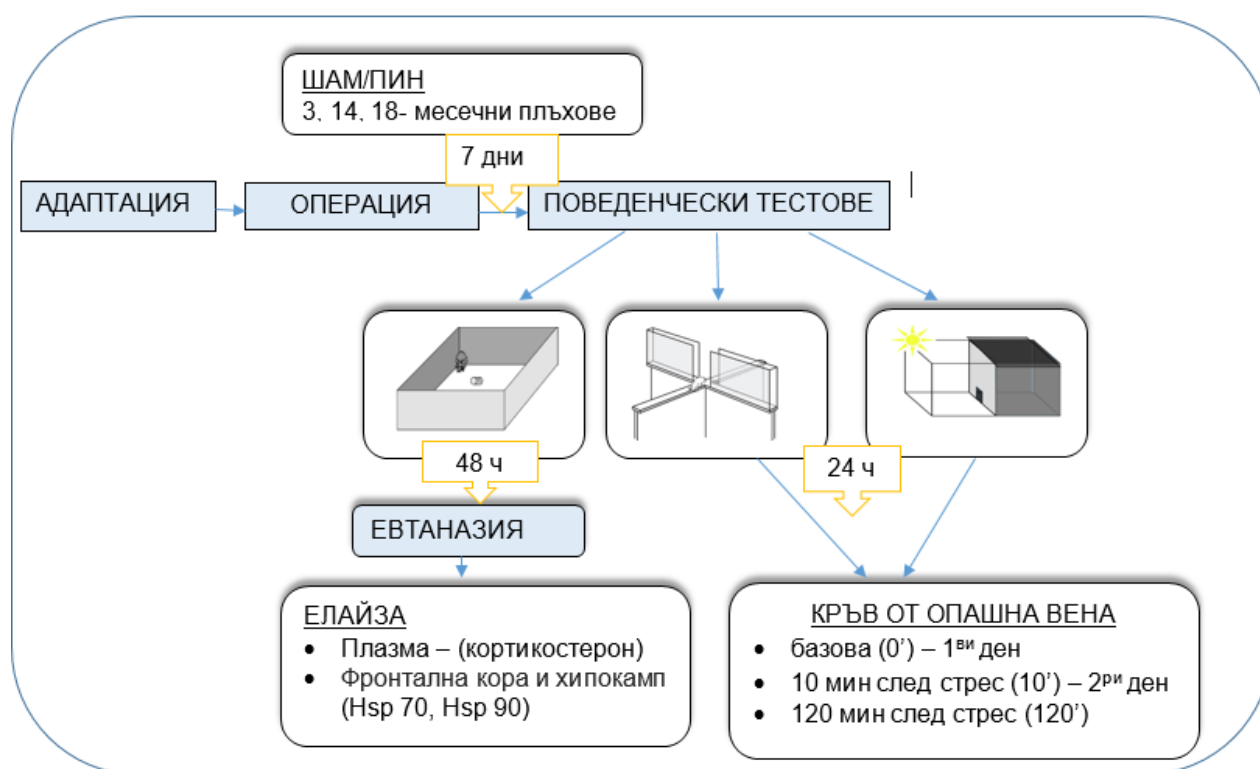


Фигура 1 Експериментален дизайн на Експеримент 1- двигателна активност и проследяване на продължителността на преживяемостта

Експеримент №2 – изследване на емоционалния статус и тревожност

След приключване на оперативните процедури, плъховете бяха оставени да се адаптират в продължение на една седмица за пълното им възстановяване. След този период те бяха разпределени в групи по 10 животни и подложени на серия от поведенчески тестове, насочени към оценка на емоционалния статус и нивата на тревожност. За осигуряване на задълбочени анализи, експерименталният дизайн включваше две отделни кохорти. Първата кохорта премина през теста за индуцирана от нови пространства хипофагия (Novelty-Suppressed Feeding Test, NSFT), след което беше евтаназирана за изолиране на хипокама и фронталната кора и анализ на топлинно-шоковите протеини Hsp70 и Hsp90. Въпросните мозъчни структури имат важна роля в когнитивните процеси и емоционалната регулация. Втората кохорта беше подложена на тестовите „Повдигнат

кръстосан лабиринт“ (Elevated Plus-Maze, EPM) и тест „Светло/Тъмно“ (Light-Dark Test, LDT), като след тези тестове бяха взети кръвни проби от опашна вена в три времеви интервала – в базово състояние 0 минути, 10 минути след стрес (излагане на принудително плуване в продължение на 5 минути) и 120 минути след стрес– с цел изследване на плазмени нива на кортикостерон, основен биомаркер на физиологичния стрес (Фиг. 2). Чрез комбинирането на поведенчески тестове и биохимични анализи, изследването имаше за цел да разкрие влиянието на мелатониновия дефицит върху емоционалното състояние на плъховете и да предостави ценни данни за механизмите, регулиращи тревожността и адаптацията към стресови фактори. За допълнително намаляване на стреса от манипулациите, животните бяха ежедневно хендлирани в продължение на една седмица преди започването на тестовете.



Фигура 2 Експериментален дизайн на Експеримент 2- изследване на емоционалния статус и тревожност

Експеримент №3 – изследване на когнитивни и паметови промени

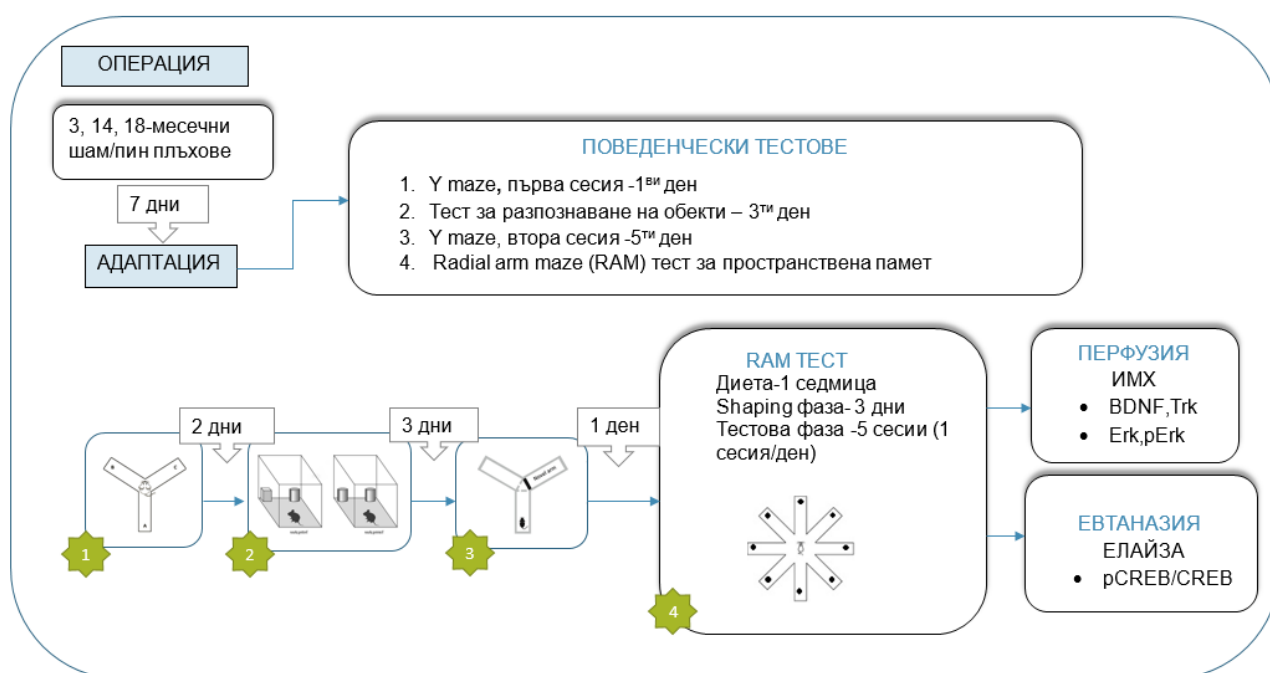
След извършване на оперативните процедури, животните бяха оставени да се адаптират в продължение на една седмица, след което бяха разпределени в групи от 8 плъха. Поведенческите тестове започнаха след този период на адаптация. След завършването на последния тест, животните бяха евтаназирани и мозъците им бяха използвани за



имунохистохимични и биохимични анализи, които включваха изследване на експресията на различни молекули и сигнални пътища във фронтална кора и хипокамп (Фиг. 3).

Животните преминаха през серия от поведенчески тестове, които бяха използвани за изследване на когнитивните им способности. В допълнение, те бяха ежедневно хендлрани в продължение на една седмица преди започването на тестовете.

След поведенческите тестове, всяка група беше разделена на две подгрупи за приготвяне на мозъчни хомогенати от хипокама и фронталната кора за изследване експресията на CREB и pCREB чрез ELISA и перфузия с цел имунохистохимично изследване ефектите на мелатониновия дефицит върху експресията на BDNF/TrkB и Erk и pErk сигнални маркери в хипокамп.



Фигура 3 Експериментален дизайн на Експеримент 3- изследване на когнитивни и паметови промени

4. Поведенчески тестове

Поведенческите тестове бяха провеждани върху предварително хендлрани плъхове с цел редуциране на стреса и адаптиране към манипулациите. За теста ЕРМ бе използвана видео проследяваща система със софтуер SMART PanLab (Harvard Apparatus, САЩ), чрез която параметрите се регистрираха автоматично и в реално време. За LDT и

когнитивните тестове, данни бяха събирани чрез видеозапис и впоследствие обработени и анализирани.

4.1. Изследване на двигателната активност

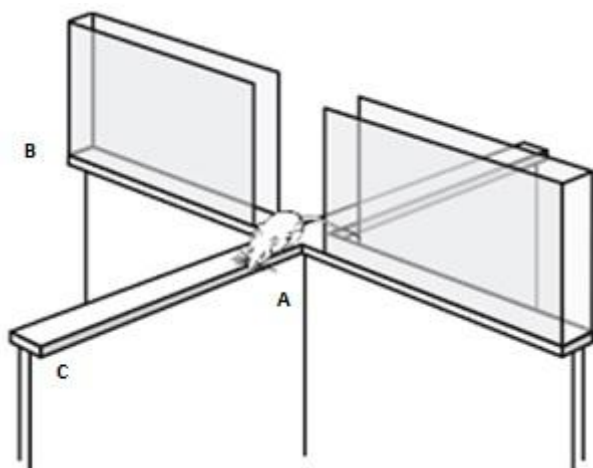
4.1.1. Регистриране и анализ на данни за двигателна активност на плъхове.

Двигателната (хоризонтална) активност, изследователско поведение (вертикална активност) и циркадните ритми на двигателната активност бяха регистрирани с помощта на актиметър /Уго Базиле, Италия/. Данни за поведението бяха събирани за период от 26 часа, като първите два часа не бяха отчитани с цел привикване към новата среда.

4.2. Тестове за изследване на тревожност

4.2.1. Повдигнат кръстосан лабиринт (*Elevated Plus-Maze, EPM*)

Теста се използва за оценка на поведението, свързано с тревожност при гризачи. Апаратът се състои от лабиринт с форма на „+“, издигнат над пода, с две противоположно разположени затворени рамена, две противоположно разположени отворени рамена и централна зона (Фиг. 4). По време на теста, гризчите свободно изследват лабиринта, като тяхното поведение се записва с помощта на видеокамера. Бяха отчитани следните параметри: общо изминато разстояние; общ брой влизания в рамената; изминато разстояние в отворените рамена и време, прекарано в отворените рамена. Предпочитанието към отворените рамена се тълкува като индикатор за намалено ниво на тревожност.





Фигура 4 Апарат “Повдигнат кръстосан лабиринт “

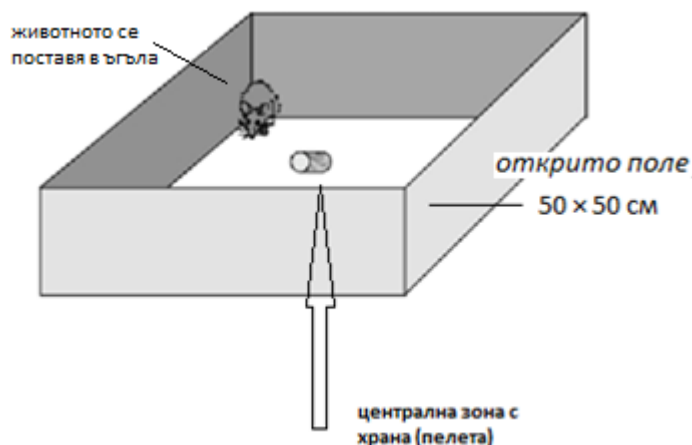
Централна зона (А); Две противоположно разположени затворени рамена (В); Две противоположно разположени отворени рамена (С).

4.2.2. Тест за индуцирана от нови пространства хипофагия (*Novelty-Suppressed Feeding Test, NSFT*)

Теста се основава на вродения страх на гризачите от нови пространства. Той добавя допълнителен компонент на мотивация, като поставя в конфликт стремежа на животните, лишени от храна, да се хранят, със страха им от нови открити пространства. Плъховете се лишават от храна 48 часа преди теста, като през този период имат свободен достъп до вода. Тридесет минути преди началото на теста те се преместват в слабо осветена стая за адаптация. Животното се поставя в един от ъглите на апарата, който представлява непрозрачна кутия с размери 50 × 50 см (Фиг. 5). Нивото на осветлението в помещението се поддържа на 16–20 Lux, а стените и подът на кутията се почистват с оцет или алкохол между тестовете. Три до четири подсладени гранули се поставят в центъра на откритото поле върху бял кръг от филтърна хартия. Отчита се латентността на вземането на гранулите, като максималната продължителност на теста е 15 минути. Веднага след като плъхът изяде една гранула или след изтичане на 15 минути, той се изважда от кутията и се поставя в собствената си клетка с три гранули. Отново се отчита латентността за изяждане на първата гранула.

Параметри за отчитане:

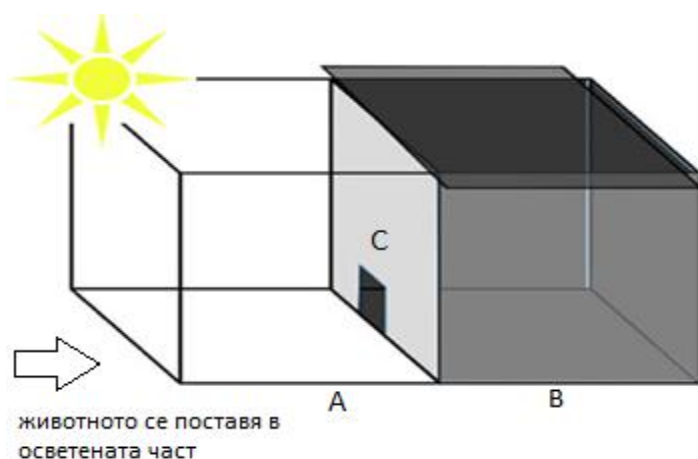
- Време до достигане на кръга / зоната с храна
- Латентност за подушване / допир до гранула
- Латентност за консумация
- Започване на хранене в собствената си клетка (Home Cage)



Фигура 5 Апарат „Открито поле“ за тест за индуцирана от нови пространства хипофагия

4.2.3. Тест Светло/Тъмно (*Light-Dark Test*)

Използва се за изследване на нивото на безпокойство при ноктурни гризачи, които имат предпочитание към престой в тъмни пространства. Апаратът за теста се състои от две свързани отделения — едното е осветено (аверсивната зона), а другото е тъмно. Между тях има отвор, който позволява на животното да преминава от едното в другото отделение (Фиг. 6). Преди теста гризачът се поставя в слабо осветена стая за 30 минути за адаптиране. В началото на теста животното се поставя в осветената част на апарата. Измерват се следните параметри: • Латенция за преминаване в тъмната зона. • Време, прекарано в светлата (аверсивна) зона. • Брой преминавания между светлата и тъмната зона.



Фигура 6 Апарат „Светло/тъмно“

Осветена (аверсивната зона) (A); Тъмна зона (B); Отвор между двете отделения (C).



4.3. Паметови тестове

4.3.1. Y-лабиринт (*Y-Maze*) за изследване на работна и краткосрочна пространствена памет

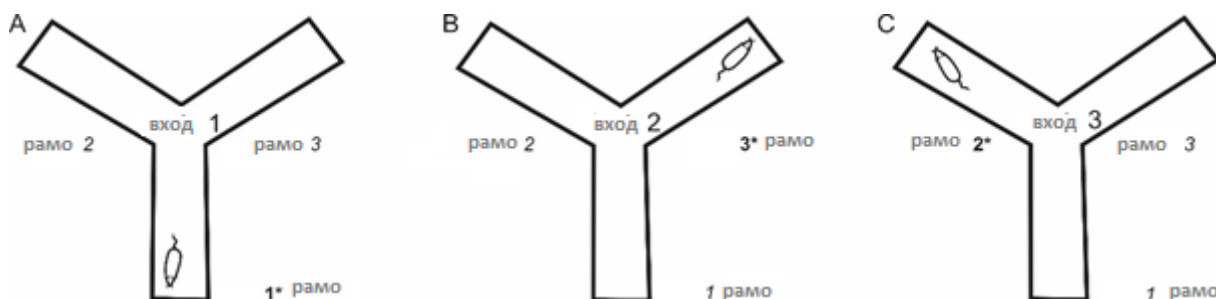
Y-лабиринтът е апарат с три еднакви рамена, разположени под ъгъл от 120° едно спрямо друго. Използва се за оценка на спонтанно променливо поведение (spontaneous alternation behavior, SAB) и пространствената памет при гризачи чрез два отделни поведенчески протокола, провеждани през интервал от минимум 5 дни.

Протокол 1 – спонтанно променливо поведение (*SAB*)

Плъхът се поставя в центъра на лабиринта и има свободен достъп до трите рамена (А, В и С) за 8 минути (Фиг. 7). Спонтанното променливо поведение се определя като последователно влизане в три различни рамена без повторение (напр. А → В → С). Измерван показател: Процент спонтанно редуване (SAB %).

$$SAB \% = \left(\frac{\text{Брой редувания}}{\text{Общ брой влизания} - 2} \right) \times 100$$

Повишеният SAB % показва по-добра работна памет, тъй като животното запомня кои рамена вече е посетило и избягва повторения. Валидни триади включват последователности от три различни рамена в произволен ред, напр.: А–В–С; В–С–А; С–А–В и др.



Фигура 7 Y-MAZE тест за изследване на работна памет.

Пример за спонтанно променливо поведение: Вход 1: животното влиза в рамо 1 (А); Вход 2: животното влиза в рамо 3 (В); Вход 3: животното влиза в рамо 2 (С). Тази последователност (А–В–С) представлява валидна триада и се брои като един правилен избор.

Протокол 2 -Тест за разпознаване на ново рамо (*Spatial Recognition Memory*)

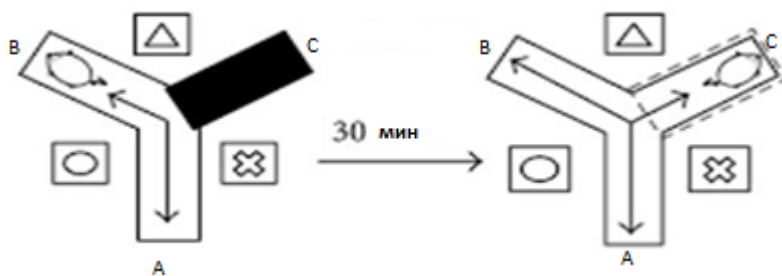
В началната фаза плъхът се поставя в началото на едно от рамената и има достъп само до две от трите рамена (А и В) за период от 10 минути (Фиг. 8). След 30-минутна пауза, започва тестовата фаза, при която се отваря и третото рамо (С) и животното има достъп до всички три рамена за 5 минути. Измервани параметри:

- **Време, прекарано в новото рамо (С)**
- **Брой влизания във всяко от рамената**

Тези показатели дават информация за краткосрочната пространствена памет и способността на животното да разпознава новата зона. Изчисляване на Индекс на предпочитание към новото рамо (Discrimination Index, DI):

$$DI = T_{\text{new}} (\text{време в новото рамо}) / T_{\text{new}} + T_{\text{fam}}$$

По-висок DI показва по-добра памет и по-голямо предпочитание към новата, непозната зона.



Фигура 8 Y-MAZE тест за изследване на краткосрочна пространствена памет.

Рамена със свободен достъп (А,В) и рамо с ограничен достъп в началната фаза (С).

4.3.2. Осем-раменен радиален лабиринт (*RAM*) – оценка на работна и пространствената памет

Поведенчески тест за оценка на пространствената и работната памет чрез принципа на позитивно подкрепление в осем-раменен радиален лабиринт (Radial Arm Maze, RAM)

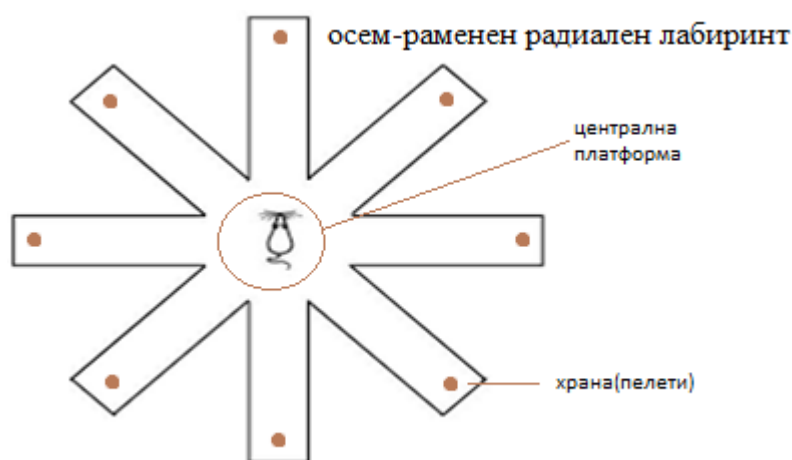


(Harvard Apparatus). Преди началото на експеримента, плъховете се подлагат на диета с продължителност минимум 5 дни, която се поддържа до края на тестването, с цел редукция на телесното тегло с 15–20% спрямо началното.

Претест (shaping): В продължение на 3 последователни дни животните се адаптират към апарата: **Ден 1** – поставят се три гранули във всяко от осемте рамена; **Ден 2** – две гранули във всяко рамо; **Ден 3** – една гранула във всяко рамо. Претестът приключва, когато животното изяде всички гранули или след изтичане на 15 минути.

Тестова фаза: Тестът се провежда в рамките на пет сесии (по една на ден). Плъховете се преместват в слабо осветена стая 30 минути преди началото на всяка сесия. В края на всяко рамо се поставя по една гранула. Животното се поставя в централната платформа на лабиринта, откъдето има свободен достъп до всички осем рамена (Фиг. 9).

Отчитани параметри: 1) **Грешки на работната памет** – повторно влизане в рамо, от което гранулата вече е била изядена и 2) **Общо време за консумиране на пелетите**. Тестът приключва при изяждане на всички гранули или след 10 минути.

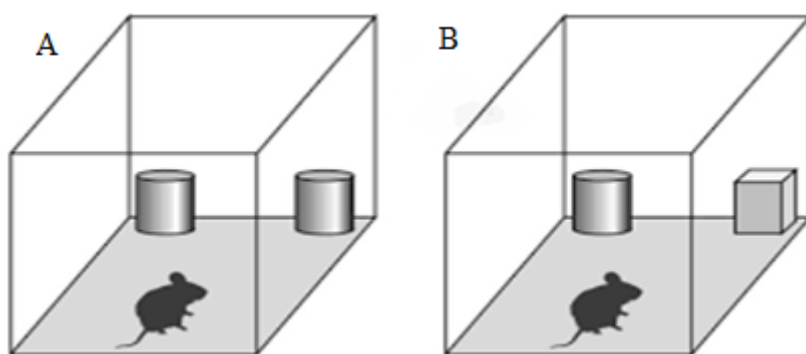


Фигура 9 Осем-раменен радиален лабиринт

4.3.3. Тест за разпознаване на обекти (*Object Recognition Test*)

Адаптация: Плъховете се поставят в кутия с размери 50 x 50 см (открито поле) без предмети за десет минути, един ден преди теста. Това позволява на животното да се адаптира към новата среда. На следващия ден, 30 минути преди теста, плъховете се преместват в слабо осветена стая. В същата кутия се поставят два еднакви предмета, в

два противоположни ъгъла и се оставят за пет минути с цел запознаване на животното с обектите. (Фиг. 10А). Шестдесет минути след първоначалното излагане на обектите, тестът се провежда за пет минути с два различни предмета: един от тях е познат (familiar), а вторият е нов (novel) (Фиг. 10В). Отчитат се: продължителност в секунди на душене на Familiar и Novel обект и се изчислява дискриминационен индекс: $DI = NO \times 100 / (NO + FO)$, където NO е времето, прекарано с новия обект (novel), FO е времето, прекарано с познатия обект (familiar). Тестът е предназначен да оценява когнитивните способности на животното, като проверява способността му да разпознава нови обекти и да предпочита новото спрямо познатото.



Фигура 10 Тест за разпознаване на обекти

Два еднакви предмета в противоположни ъгли на кутията (А) ; Два различни предмета в противоположни ъгли на кутия (В)

5. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) на мозъчни хомогенати

Чрез метода на ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) беше изследвана експресията на топлинно-шоковите протеини HSP70 и HSP90, както и на фосфорилираната и нефосфорилираната форма на CREB (cAMP-response element binding protein) в хипокампадни хомогенати.

След евтаназията на експерименталните животни, хипокампът и фронталната кора бяха бързо изолирани върху лед и съхранявани при -20°C до провеждането на анализа със съответните китове, съгласно инструкциите на производителя (Фиг. 11).

Хомогенатите бяха приготвени с помощта на хомогенизационен буфер (PBS с протеазни инхибитори), за да се предотврати разграждането на белтъците. За хомогенизиране се използваха 10 ml студен буфер на грам тъкан, съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM

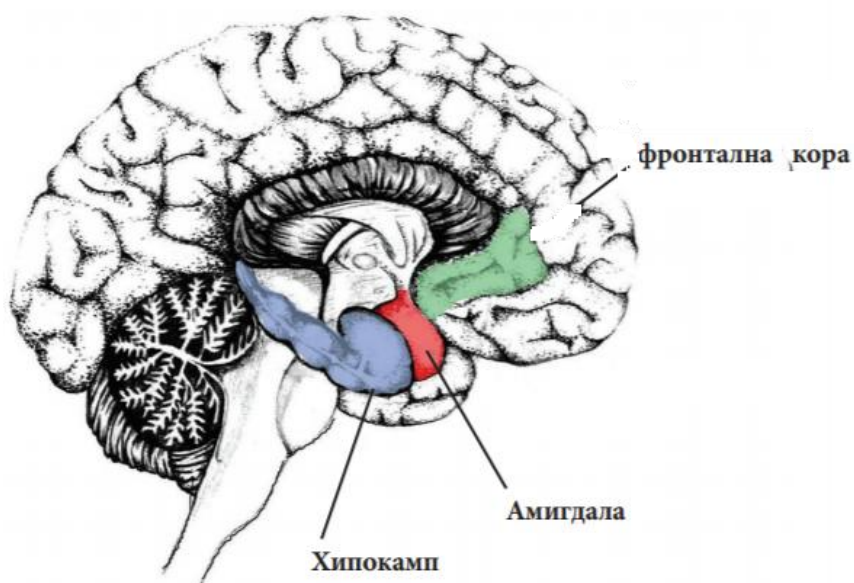


EGTA, 50 mM NaF, 1 mM EDTA и 1 mM PMSF. Тъканните проби се хомогенизираха до получаване на хомогенна суспензия, след което се центрофугираха при 4 °C на високи обороти за отстраняване на неразтворимите компоненти. Полученият супернатант беше използван за ELISA анализа или съхранен на –20 °C до употреба.

Преди провеждане на ELISA беше определена концентрацията на общия белтък във всяка проба чрез метода на Брадфорд, с цел нормализиране на резултатите. Използвани бяха следните ELISA китове:

- ELK Biotechnology ELK10133 - Rat HSP90 (Heat Shock Protein 90)
- ELK Biotechnology ELK7669 - Rat HSP-70 (HeatShock Protein 70)
- Elabscience E-EL-R0289- Rat CREB1 (Cyclic AMP Response Element Binding Protein1) Sunlong SL1344Ra - Rat Phospho cAMP response element binding protein (P-CREB)

Оптичната плътност (OD) беше измерена при дължина на вълната 450 nm с четец за микроплаки Тесан. Количеството на експресирания белтък във всяка проба беше изчислено чрез разделяне на измерената стойност на белтъчната концентрация, като резултатите бяха изразени в ng експресиран протеин на mg общ протеин (ng/mg).



Фигура 11 Анатомично разположение на хипокампа и фронталната кора в мозъка

6. Имунохистохимичен анализ на мозъчни структури

За провеждане на имунохистохимичен анализ, експерименталните животни бяха дълбоко анестезирани с уретан (1500 mg/kg, i.p.) и подложени на транскардиална перфузия с два последователни разтвора: първо с 0,05 М фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS), последван от 4% параформалдехид, разтворен в 0,1 М фосфатен буфер (PB), pH 7.36.

След перфузията, мозъците бяха внимателно изолирани и постфиксираны в същия фиксиращ разтвор за 24 часа при 4 °C. След това тъканите бяха промити с дестилирана вода, за да се отстранят остатъците от фиксатора.

След етапа на промиване, мозъчната тъкан беше дехидратирана през възходяща етанолова серия и парафинизирана. Получените парафинови блокове бяха нарязани на серийни срезове с дебелина 6 µm с помощта на микротом. Разрезите бяха монтирани върху хромирани, желатинизирани стъклени предметни стъкла.

Преди имунооцветяване, мозъчните срезове бяха депарафинизирани чрез третиране с ксилен и серия от понижаващи се концентрации на етанол за рехидратация на тъканите.

- Имунохистохимичен протокол за определяне на BDNF-TrkB експресия в определени мозъчни структури- грануларен gyrus dentatus (GrDG) и хипокампаалните полета cornu ammonis (CA3, CA2 и CA1) (Фиг. 12). След перфузиране с 4 % параформалдехид и PBS буфер, изолираните цели мозъци бяха подложени на фиксация, дехидратация и вграждане, за да запазят структурата си и да бъдат подходящи за имунохистохимичен анализ.

Процедура

1. **Фиксация:** Тъканите се фиксират в 4% PFA в PBS при 4°C за 24-48 часа, за да се запази клетъчната морфология.
2. **Дехидратация:** Пробите преминават през серия от етанолови разтвори (70%, 80%, 95%, 100%) за отстраняване на водата.
3. **Вграждане и нарязване:** Тъканите се вграждат в парафин и се нарязват на 5-10 µm срезове с микротом.
4. **Депарафинизация и рехидратация:** Срезове се потапят в ксилол за премахване на парафина, след което преминават през низходящи концентрации на етанол и дестилирана вода.

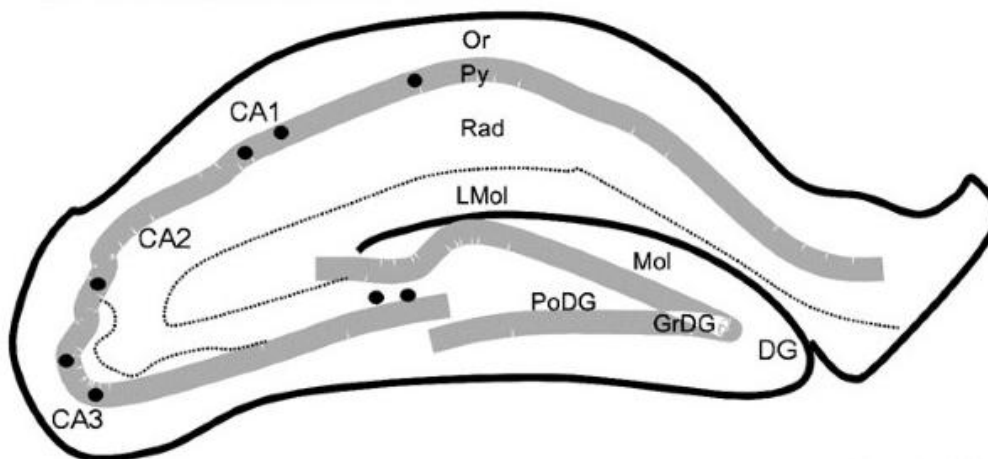
Имунохистохимичен протокол



5. **Блокиране на неспецифичните връзки:** Срезове се инкубират с 5% нормален серум (напр. миши серум) за 30 минути при стайна температура.
6. **Първични антитела:** Срезове се инкубират с първични антитела срещу BDNF и TrkB, разредени в PBS, за 1-2 часа при стайна температура или за една нощ при 4°C. След това се измиват три пъти с PBS.
7. **Вторични антитела:** Добавят се вторични антитела, свързани с HRP (ензим) или флуорофор (FITC, CY3), и се инкубират за 1 час при стайна температура. Излишните антитела се отстраняват с трикратно измиване с PBS.
8. **Визуализация:**
 - При HRP-свързани антитела се използва DAB (диаминобензидин), който оцветява целевите зони в кафяво.
 - При флуорофор-свързани антитела (FITC – зелено, CY3 – червено) срезове се наблюдават под флуоресцентен микроскоп.

Анализ

9. **Монтиране:** Срезове се фиксират върху микроскопски стъкла с подходящ монтажнен медиум.
 10. **Наблюдение и оценка:** Пробите се анализират под светлинен или флуоресцентен микроскоп за определяне на местоположението и интензивността за определяне на експресия на BDNF и TrkB.
- Анализ на разпределението на нефосфолирина и фосфолирана форма на Erk в GrDG и хипокампаалните полета cornu ammonis (CA3с, CA3в, CA3а и CA1) (Фиг. 12).



Фигура 12 Мозъчни структури

7. Статистическа обработка на данните

Получените резултати са представени като средноаритметични стойности и стандартните им грешки ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Експерименталните данни са обработени с параметричен (двуфакторен ANOVA, фактори: възраст /три нива/ и оперативна манипулация /шам или пинеалектомия/ и пост-хок Tukey's t-тест). При неравномерно разпределение на данните бе използван непараметричен Kruskal Wallis тест и при значимост пост-хок Mann-Whitney U тест чрез SigmaStat® 11.0. Статистически значимо различие се отчита при $p < 0.05$.



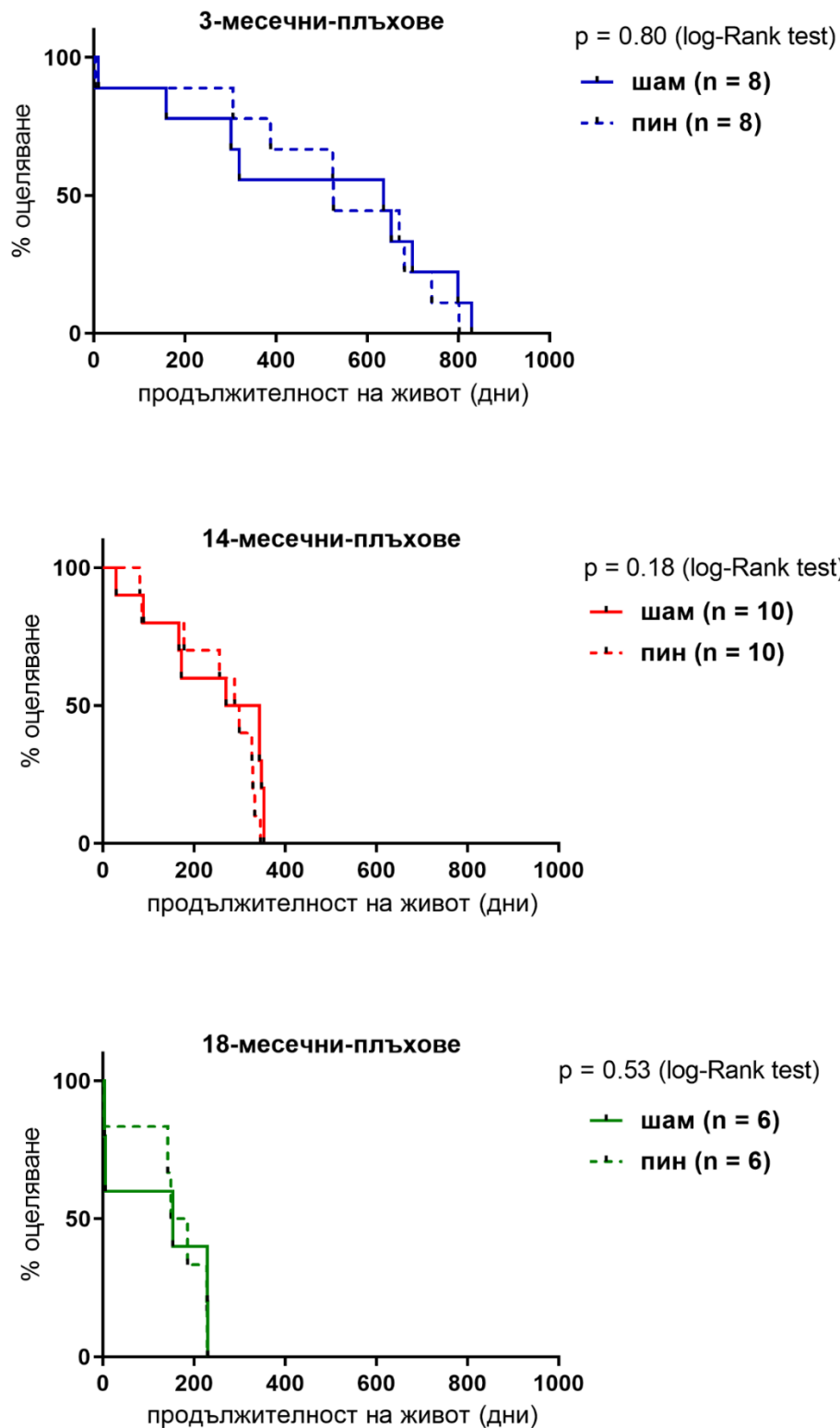
IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Ефекти на мелатониновия дефицит върху продължителността на живота на плъхове в различни възрастови периоди

В експеримент № 1 бяха използвани 48 плъха, разпределени в шест групи, по 8 плъха във всяка група (Фиг. 1). Целта на експеримента беше да се изследва ефектът на пинеалектомията върху продължителността на живот на плъхове на възраст половозрели млади, на средна възраст и стари. Резултатите показаха, че пинеалектомията не оказва значително влияние върху продължителността на живота в нито една от възрастовите групи.

По-конкретно, при младите половозрели плъхове (3-месечни), не се установи статистически значима разлика в продължителността на живота между групите на шам и пин ($p = 0,39$). Подобни резултати бяха получени и при плъховете на средна възраст (14-месечни), където разликата между групите също не беше значима ($p = 0,18$). За старите плъхове (18-месечни), разликата между групите беше още по-малка ($p = 0,2$).

При анализ на кривите на преживяемост (Kaplan-Meier) не беше установена разлика между групата на шам и пин групата в трите възрасти. Използвайки log-rank тест, не се откри статистически значима разлика ($p > 0,05$) за отделните възрасти (Фиг. 13А-С). Това показва, че пинеалектомията не оказва влияние върху преживяемостта и продължителността на живота на плъхове, независимо от възрастовия период.



Фигура 13 Ефект на пинелектомията върху продължителността на живота при 3-месечни плъхове (А), 14-месечни плъхове (В) и 18-месечни плъхове (С). Кривите на преживяемост (Kaplan-Meier) не се различават между шам и пин групата в трите възрастови периоди, $n = 8-10$ /група, $p > 0.05$ чрез log-rank тест.



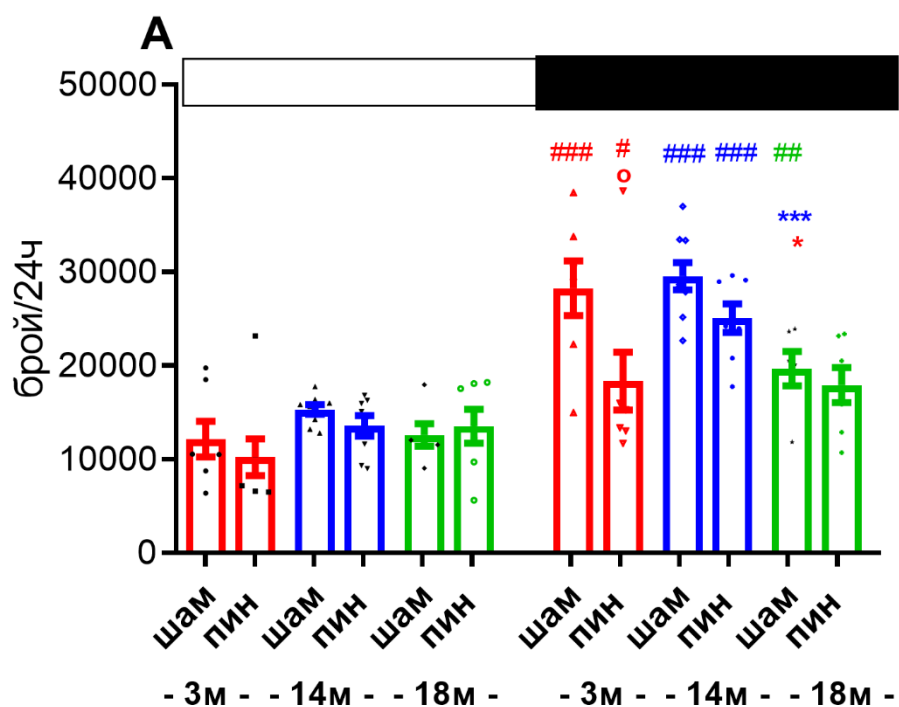
2. Ефекти на стареенето и мелатониновия дефицит върху двигателната активност и нейния циркадианен ритъм в различни възрастови периоди

Анализът на двигателната активност от трифакторната ANOVA показва, че всички възрастови групи бяха по-активни през тъмната фаза, отколкото през светлата ($p < 0.05$). Бе установен основен ефект на Възрастта за общ брой регистрирани движения [$F(2,71) = 4.92$, $p = 0.01$], ефект на Пинеалектомия [$F(2,71) = 3.82$, $p = 0.026$] и ефект на Фазата [$F(2,71) = 33.42$, $p < 0.001$] (Фиг. 14А, В). Премахването на епифизната жлеза (пинеалектомия) намали двигателната активност на младите плъхове по време на тъмната фаза. При старите шам и пин плъхове денонощните вариации на активността бяха нарушени ($p > 0.05$). Шам-оперираните 18-месечни плъхове имаха значително намалена локомоторна активност ($p = 0.035$ спрямо 3-месечните; $p = 0.001$ спрямо 14-месечните) и по-кратко изминато разстояние ($p = 0.012$ спрямо 14-месечните) през тъмната фаза (Фиг. 14 В). Пинеалектомията намали двигателната активност при младите половозрели плъхове в сравнение с контролната група ($p = 0.029$) по време на тъмната фаза.

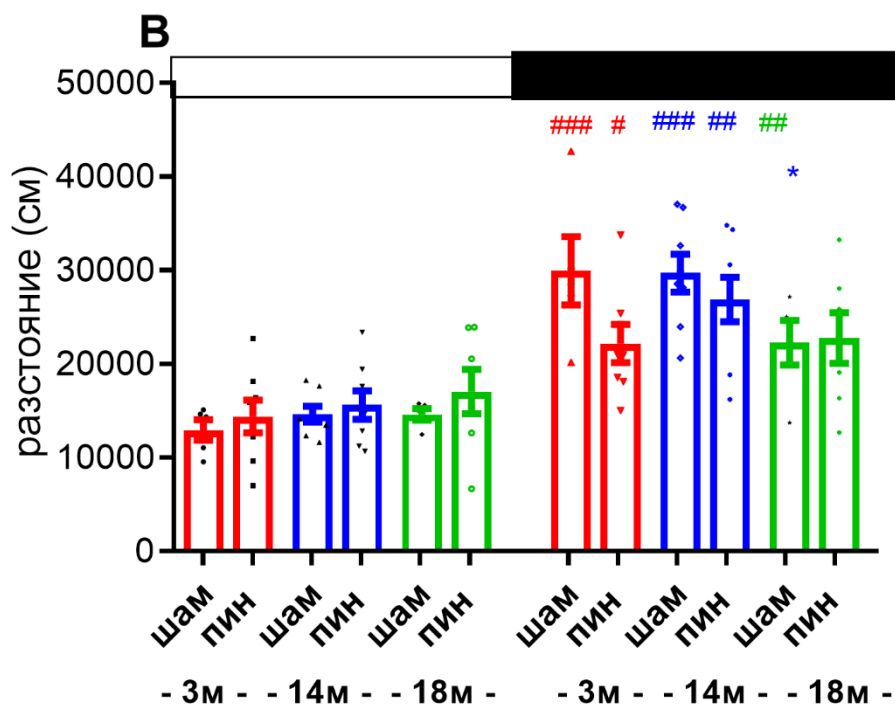
Двуфакторната ANOVA показва, че циркадният ритъм на активността при младите, на средна възраст и при старите шам плъхове не беше повлиян от пинеалектомията (Фиг. 15А–С). При 18-месечните плъхове с пинеалектомия обаче ритмичните осцилации на двигателната активност бяха нарушени ($p > 0.05$).

Анализът на циркадния ритъм с метода на Косинор (таблица 1) потвърди тези резултати. Двуфакторната ANOVA показва основен ефект на Възрастта за амплитудата [$F(2,46) = 8.624$, $p < 0.001$], както и ефект на Възрастта $\times$ Пинеалектомията [$F(4,46) = 2.562$, $p < 0.05$]. Плъховете на средна възраст с шам операция показаха значително по-висока акрофаза в сравнение с по-младите плъхове ($p = 0.004$).

Общ брой регистрирани движения

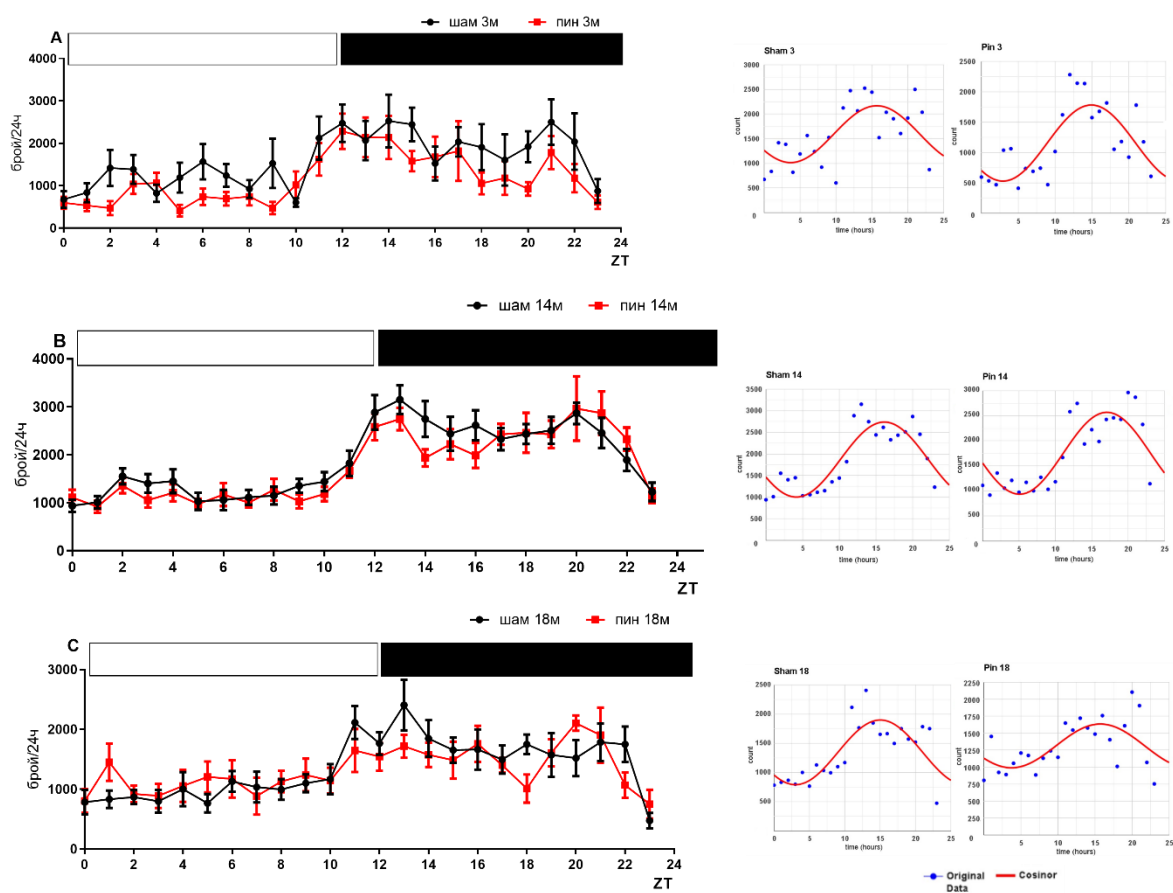


Общо изминато разстояние





Фигура 14 Денонощна ритмика на 24-часовата двигателна активност, регистрирана в актиметъра (общ брой регистрирани движения /А/ и общо изминато разстояние В) при плъхове, шам оперирани и с пинелектомия на възраст 3, 14 и 18 месеца. Двете фази (светла и тъмна) са показани с бели и черни правоъгълници над фигурите. Данни са представени като средна стойност $\pm$ SEM, $n = 8$. $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$ тъмна фаза в сравнение със светла фаза; $^{***}p = 0.001$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с шам 14-месечни плъхове; $^{*}p = 0.035$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с шам 3-месечни плъхове; $^{\circ}p = 0.029$, 3-месечни пин плъхове в сравнение с шам плъхове на същата възраст. (А) $^{*}p = 0.012$, 18-месечни шам в сравнение с 14-месечни шам плъхове. (В)



Фигура 15 Ефект на пинелектомията върху циркадният ритъм на хоризонталната активност, регистрирана с актиметър за 24 часа (брой) при плъхове на възраст 3- (А), 14- (В) и 18 месеца (С). Данните са представени като средна стойност $\pm$ SEM, $n = 8$. Двухфакторна ANOVA демонстрира ефект на времето за плъхове на възраст 3-, 14- и 18 месеца ($p < 0.001$). Post hoc тестът показва дневна променливост на двигателната активност при 3-месечни шам плъхове (zeigeber (ZT)10 vs. ZT14,ZT21 ($p < 0.05$) (А), при 14-месечни шам плъхове (ZT0 vs. ZT 12,13,14,1516,17; ZT1 vs. ZT12,13,16,20,21; ZT3 vs. ZT13; ZT4 vs. ZT13,20; ZT5 vs. ZT12,13,16,19,20; ZT6 vs. ZT12,13,14,15,16,18,19,20,21; ZT7 vs. ZT12,13,20; ZT8 vs. ZT12,13,16,20,21; ZT9 vs. ZT13,20; ZT10 vs. ZT13; ZT23 vs. ZT12,13,14,16,18,20 – $p < 0.05$), при 18-месечни пин плъхове (ZT5 vs. ZT19— $p < 0.05$), и при 18-месечни шам плъхове (ZT0-ZT4 vs. ZT11; ZT5 vs. ZT11,13; ZT8 vs. ZT13; ZT23 vs. ZT11,13,21— $p < 0.05$). Отдясно на фигурите са вмъкнати данни от Косинор анализа.

Групи	МЕЗОР-и	Амплитуда	Акрофаза (часове, десетична система)
шам 3 месечни	1684.85 ± 301.40	461.48 ± 85.94	15.39 ± 1.03
пин 3 месечни	1207.90 ± 232.21	640.72 ± 109.75	14.95 ± 0.63
шам 14 месечни	1792.69 ± 47.87	839.50 ± 88.54	16.15 ± 0.51**
пин 14 месечни	1666.84 ± 74.21	743.56 ± 78.00	16.46 ± 0.56
шам 18 месечни	1345.01 ± 32.50	681.60 ± 80.13	14.24 ± 1.34
пин 18 месечни	1311.87 ± 142.22	411.83 ± 55.11	15.93 ± 1.19

Таблица 1 Параметри на ритъма, базирани на Косинор анализ, за 24ч наблюдение на двигателната активност на групите Пин и Шам, подредени по възраст (3 -, 14 -, 18 месечни); n=8. **p=0.004 14-месечни шам спрямо 3-месечни плъхове на същата възраст.

3. Ефекти на стареенето и мелатониновия дефицит върху поведението на тревожност при плъхове в различни възрастови периоди

За отделните поведенчески тестове бяха използвани различни групи животни, събирани в продължение на две години. Този внимателен подход към подбор на изследваните групи осигури по-задълбочено разбиране на поведението им при различни условия. Използването на различни кохорти позволи отчитане на потенциалните вариации във фактори като възраст и влияние на околната среда, което гарантира по-надеждно тълкуване на експерименталните резултати.

Тест “Повдигнат кръстосан лабиринт” (EPM)

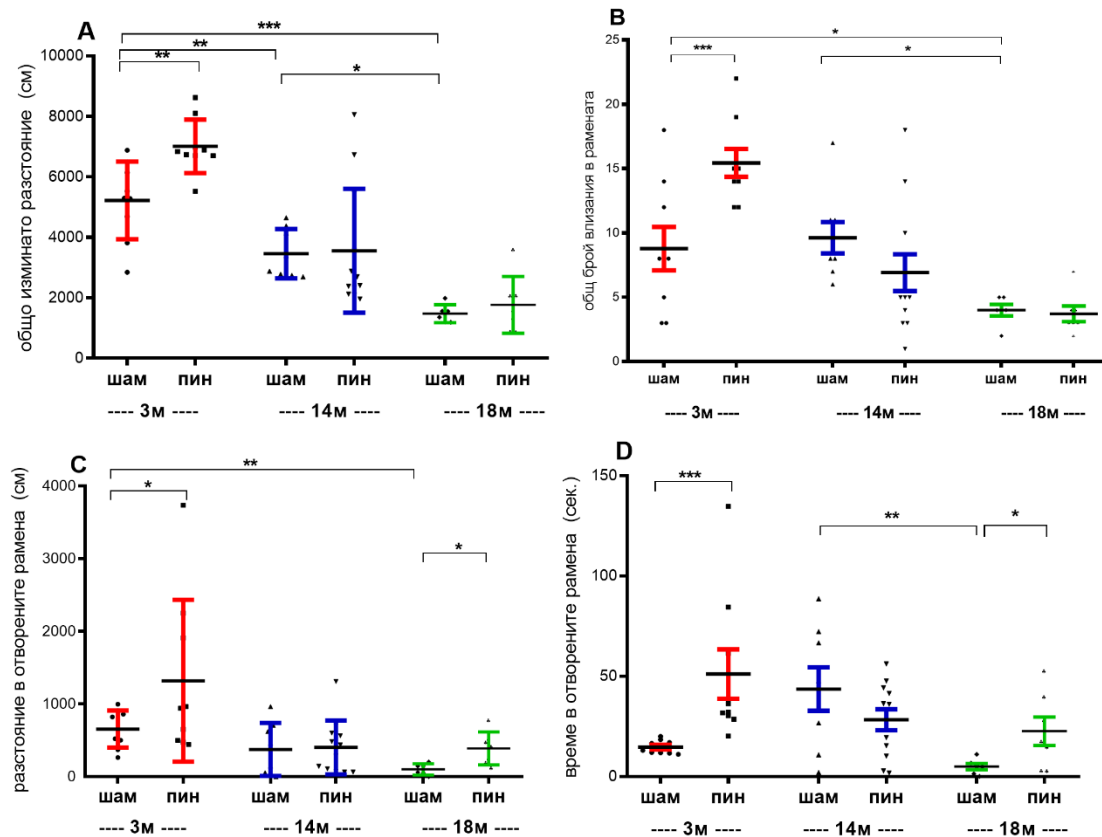
Основният ефект на Възрастта беше наблюдаван за следните показатели: общото разстояние [$F(2,50) = 46.817$, $p < 0.001$], общия брой влизания в рамената [$F(2,50) = 17.427$, $p < 0.001$], разстоянието в отворените рамена [$F(2,50) = 8.725$, $p < 0.001$] и времето, прекарано в отворените рамена [$F(2,50) = 4.011$, $p = 0.025$]. Наблюдава се зависимо от възрастта намаляване на двигателната активност в EPM теста ($p < 0.001$; $p = 0.008$ при 3-месечни шам плъхове в сравнение с 14- и 18-месечни шам плъхове



съответно; $p = 0.014$ при 14-месечни шам плъхове в сравнение с 18-месечни шам плъхове) (Фиг. 16А). Общият брой влизания в раменете на лабиринта също е значително намален при най-старите шам плъхове в сравнение с младите половозрели шам плъхове ($p = 0.045$) и шам плъховете на средна възраст ($p = 0.028$) (Фиг. 16В). Наред със зависимостта от възрастта намаляване на двигателната активност, старите шам оперирани плъхове показват значително по-кратко изминато разстояние ($p = 0.01$ в сравнение с 3-месечните шам плъхове) и по-кратко време на престой в аверсивните отворени рамене на лабиринта ($p = 0.009$ в сравнение с 14-месечните шам плъхове) (Фиг. 16С, D).

Основният ефект на Пинеалектомията беше установен за разстоянието в отворените рамена [$F(1,50) = 4.436$, $p = 0.041$] и времето, прекарано в отворените рамена [$F(1,50) = 4.112$, $p = 0.047$]. Взаимодействие между Възрастта и Пинеалектомията е установено при общия брой влизания в рамената [$F(2,50) = 7.280$, $p = 0.002$] и времето, прекарано в отворените рамена [$F(2,50) = 6.092$, $p = 0.005$]. Отстраняването на епифизната жлеза води до намаляване на нивата на тревожност при младите половозрели плъхове, които показват по-голямо изминато разстояние и прекарват повече време в отворените рамене на лабиринта в сравнение с шам-оперираните на същата възраст ($p = 0.013$; $p = 0.001$). Тримесечните пин плъхове демонстрират по-висока двигателна активност в теста в сравнение с шам-оперираните на същата възраст (общо изминато разстояние: $p = 0.005$; общ брой влизания в раменете: $p < 0.001$) (Фиг. 16А, В). Изненадващо, пинеалектомията също така намалява тревожността при най-възрастните плъхове в сравнение с шам-оперираните на същата възраст, като те показват увеличено изминато разстояние и повече време, прекарано в аверсивната зона ($p = 0.0126$; $p = 0.045$) (Фиг. 16С, D).

Повдигнат кръстосан лабиринт



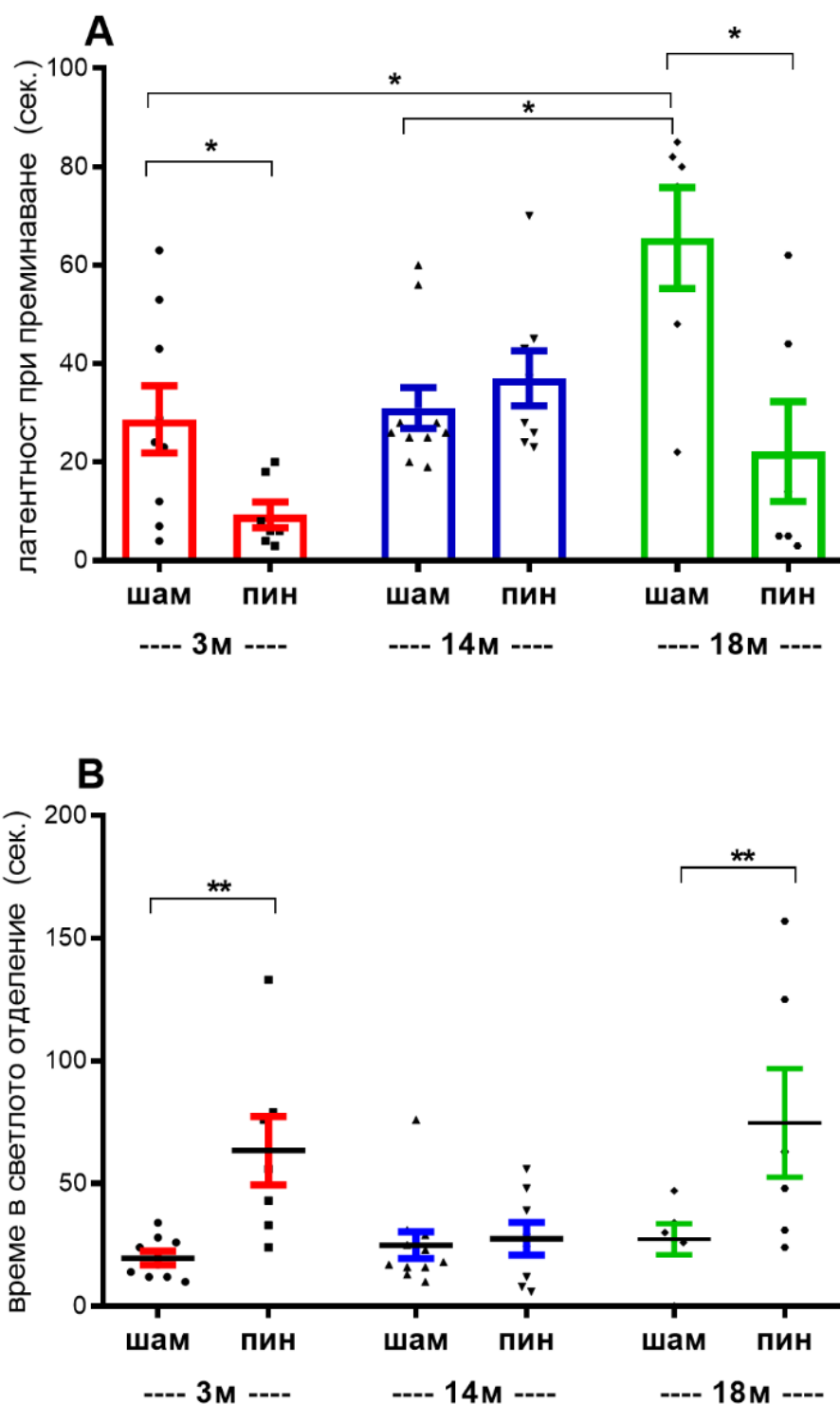
Фигура 16 Ефект на пинеалектомията върху двигателната активност и тревожността, отчитани чрез измерване на общото изминато разстояние (A), общия брой влизания в рамената (B), разстоянието в отворените рамена (C) и времето, прекарано в отворените рамена (D) по време на теста “Повдигнат кръстосан лабиринт” (EPM) при 3-, 14- и 18-месечни плъхове. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 3-месечни шам плъхове; * $p = 0.014$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 14-месечни шам плъхове; ** $p = 0.008$, 14-месечни шам плъхове в сравнение с 3-месечни шам плъхове; ** $p = 0.005$, 3-месечни пин плъхове в сравнение с шам-оперираните на същата възраст (A); * $p = 0.045$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 3-месечни шам плъхове; * $p = 0.028$, 14-месечни шам плъхове в сравнение с 3-месечни шам плъхове; *** $p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове в сравнение с шам-оперираните на същата възраст (B); ** $p = 0.01$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 3-месечни шам плъхове; * $p = 0.013$, 3-месечни пин плъхове в сравнение с шам-оперираните на същата възраст * $p = 0.0126$, 18-месечни пин плъхове в сравнение с шам-оперираните на същата възраст (C); ** $p = 0.009$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 14-месечни шам плъхове; *** $p = 0.001$, 3-месечни пин плъхове в сравнение с шам-оперираните на същата възраст ; * $p = 0.045$, 18-месечни пин плъхове в сравнение с шам-оперираните на същата възраст. (D)



Тест “светло-тъмно” (LDT)

Двуфакторна ANOVA показва основен ефект на Възрастта [$F(2,46) = 6.668$, $p = 0.003$]; [$F(2,46) = 3.242$, $p = 0.049$], ефект на Пинеалектомията [$F(1,46) = 12.107$, $p = 0.001$], [$F(1,46) = 14.754$, $p < 0.001$] и взаимодействие между Възраст и Пинеалектомия [$F(2,46) = 6.839$, $p = 0.003$], [$F(2,46) = 3.436$, $p = 0.042$] за латентността при преминаване от тъмно в светлото пространство и времето, прекарано в светлото отделение. Свързаното с възрастта повишаване на тревожните реакции беше потвърдено и в LDT, където възрастните шам плъхове, демонстрираха по-дълга латентност за придвижване към аверсивното светло отделение в сравнение с младите половозрели ($p = 0.017$) и плъховете на средна възраст ($p = 0.015$) (Фиг. 17А).

Намалена тревожност се наблюдаваше след отстраняване на епифизната жлеза при 3-месечните и 18-месечните плъхове, които показаха по-кратка латентност за преминаване в осветеното отделение ($p = 0.032$, спрямо 3-месечните шам плъхове; $p = 0.014$, спрямо 18-месечните шам плъхове) и прекараха повече време в осветеното отделение ($p = 0.003$ и $p = 0.004$, съответно) (Фиг. 17А, В).



Фигура 17 Ефект на пинеалектомията върху латентността при преминаване от тъмно в светло пространство (А) и времето, прекарано в светлото отделение (Б), измерено при теста „светло-тъмно“ (LDT), при 3-, 14- и 18-месечни плъхове. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SEM. * $p < 0.001$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 3-месечни шам плъхове; * $p < 0.001$, 18-месечни шам плъхове в



сравнение с 14-месечни шам плъхове; $*p = 0.041$, 3-месечни пин плъхове в сравнение с шам-оперираните на същата възраст; $*p < 0.001$, 18-месечни плъхове с пин в сравнение с шам-оперираните на същата възраст (A); $**p = 0.003$, 3-месечни пин плъхове в сравнение със съответстващите шам плъхове; $**p = 0.004$, 18-месечни пин плъхове в сравнение с шам-оперираните на същата възраст. (B)

Тест за индуцирана от нови пространства хипофагия (NSFT)

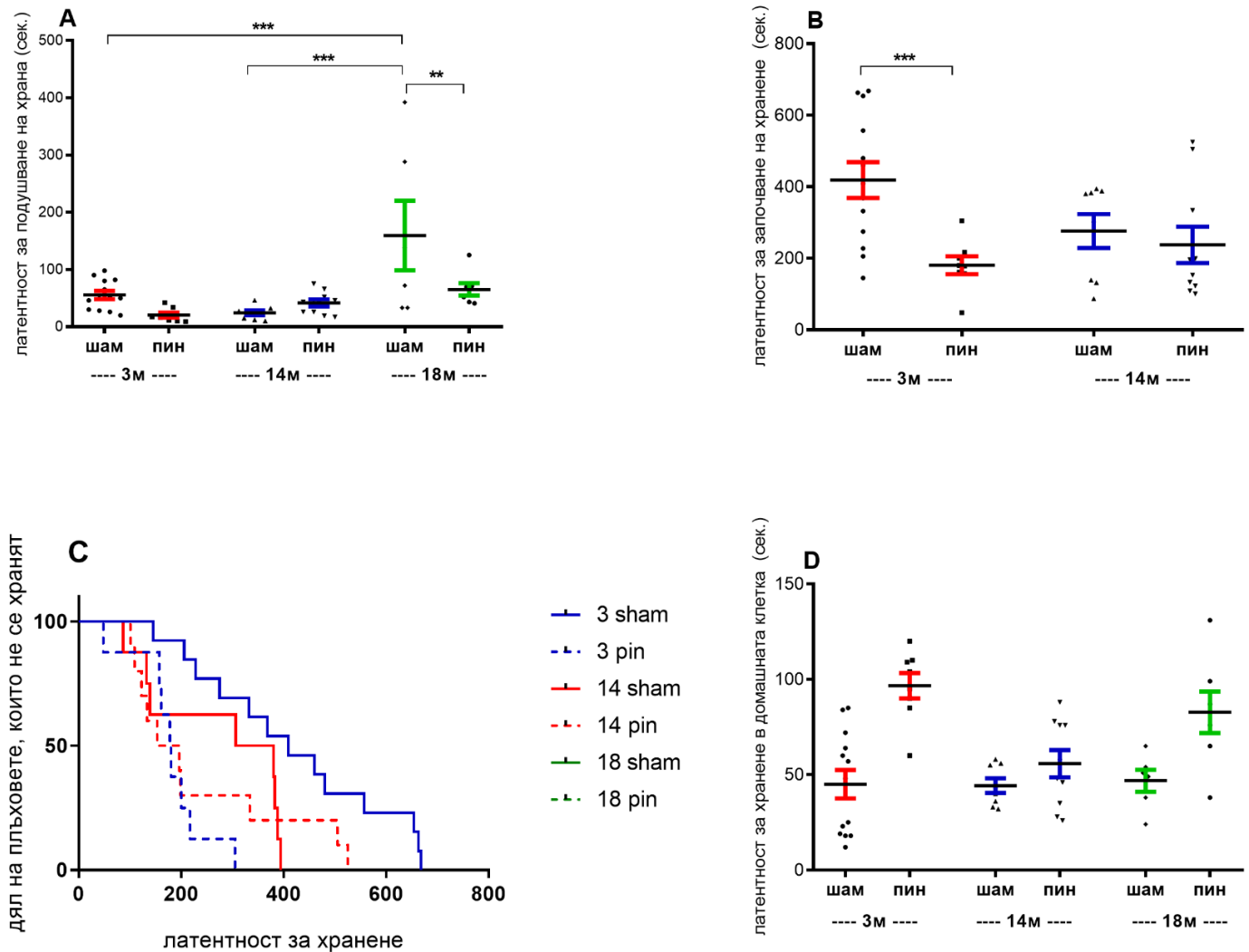
В теста за хипофагия (NSFT), тревожността беше оценена чрез три основни параметъра: 1) латентност за започване на душене на сладки гранули в нова, стресова среда; 2) латентност за започване на хранене (Фиг. 18A, B); 3) латентност за хранене в клетката за отглеждане – използвана като контролен показател, отразяващ поведението при липса на стрес, тъй като тази среда е позната и не предизвиква тревожност (Samuels and Hen, 2011).

В съответствие с резултатите от тестовете EPM и LDT, 18-месечните плъхове демонстрираха повишени нива на тревожност, изразени чрез значително увеличена латентност за започване на душене в сравнение с младите половозрели ($p < 0.001$) и плъховете на средна възраст ($p < 0.001$) (Фиг. 18A). Двухакторна ANOVA показва ефект на Възрастта [$F(2,56) = 10.673$, $p < 0.001$]; [$F(2,56) = 22.025$, $p < 0.001$], ефект на Пинеалектомията [$F(2,56) = 8.041$, $p = 0.007$], [$F(2,56) = 5.291$, $p = 0.026$] и взаимодействие „Възраст x Пинеалектомията“ [$F(2,56) = 4.239$, $p = 0.02$], [$F(2,56) = 4.410$, $p = 0.018$] съответно за латентността на започване на душене на гранулите и латентността на започване на хранене в открито пространство. Значителна разлика беше установена при използване на log-rank теста (Kaplan-Meier) ($p = 0.0048$).

Латентността за започване на хранене при 18-месечните плъхове не беше включена в статистическите анализи, тъй като нито едно от животните не започна да се храни в рамките на периода на отчитане в теста. Поради това беше използван метода на Kaplan-Meier, за да се илюстрира въздействието на възрастта и пинеалектомията върху дела на животните, които не са започнали да се хранят (Фиг. 18C).

Индуцираният от пинеалектомия дефицит на мелатонин доведе до значително намаляване на тревожността както при младите половозрели плъхове ($p < 0.001$; $p = 0.0048$, спрямо шам-оперираните на същата възраст) (Фиг. 18B, C), така и при възрастните животни ($p = 0.002$, спрямо шам-оперираните на същата възраст) (Фиг. 18A).

Тест за индуцирана от нови пространства хипофагия



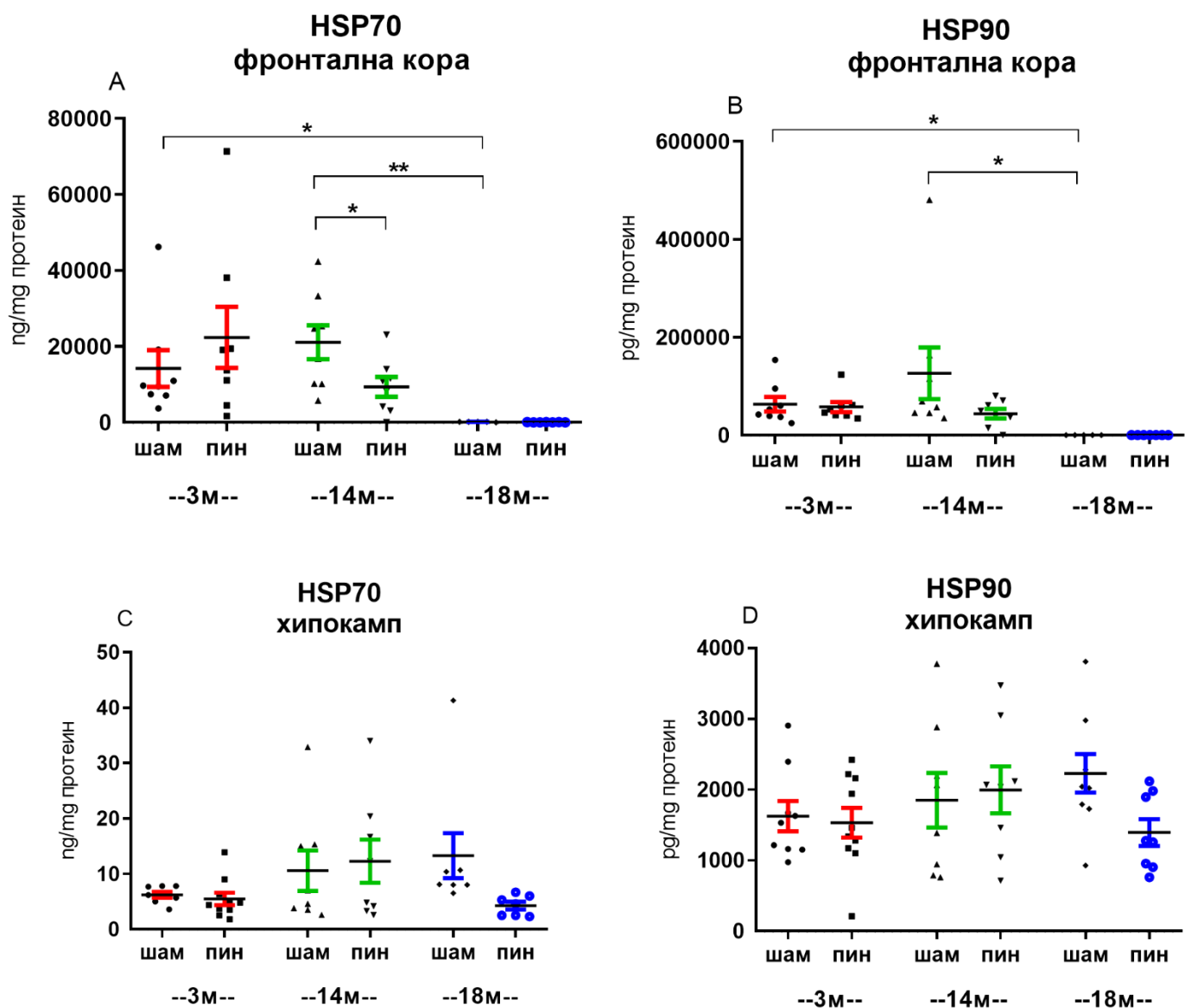
Фигура 18 Влиянието на пинеалектомията върху латентността за започване на подушване на храна (A), латентността за започване на хранене в нова среда (B), дял на плъховете, които не започват да се хранят по време на теста (C), латентността за започване на хранене в домашната клетка (D), измерена при теста за индуцирана от нови пространства хипофагия (NSFT), при 3, 14- и 18-месечни плъхове. Данните са изразени като средна стойност $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 3-месечни шам плъхове; *** $p < 0.001$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 14-месечни шам плъхове; ** $p = 0.002$, 18-месечни пин плъхове в сравнение със съответните шам плъхове (A); *** $p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове в сравнение със съответните шам плъхове (B)



4. Ефекти на стареенето и мелатониновия дефицит върху сигналните пътища, свързани с тревожното поведение при плъхове в различни възрастови периоди

Целта на анализа беше да се оцени въздействието на стареенето и мелатониновия дефицит върху експресията на Hsp70 и Hsp90 в ключови мозъчни области – фронтална кора и хипокамп – във връзка с наблюдаваните поведенчески промени при животните. Добре установено е, че топлинно-шоковите протеини изпълняват протективна роля, като участват в повторното нагъване и стабилизиране на увредени протеини при клетъчен стрес (Hess and Riegle, 1972).

Анализът на Крускал–Уолис показва значителен ефект на Възрастта [$F(2,44) = 8.988$, $p < 0.001$] и взаимодействие между Възрастта и Пинеалектомията [$F(2,44) = 4.862$, $p = 0.013$] за Hsp70. Основен ефект на Възрастта [$F(2,40) = 13.552$, $p < 0.001$] беше открит и за Hsp90 във фронтална кора. Анализът на възрастовите промени показва значимо, намаление на експресията на Hsp70 в зависимост от възрастта ($p = 0.033$, 18-месечни спрямо 3-месечни шам плъхове; $p = 0.01$, 18-месечни спрямо 14-месечни шам плъхове) и Hsp90 ($p = 0.05$ и $p = 0.039$, съответно) във фронталната кора (Фиг. 19А, В). Статистически значими различия в експресията на двата шаперонови пептида в различните възрастови етапи не бяха отчетени ($p > 0.05$) (Фиг. 19С, D). Пинелектомията доведе до понижение на експресията на Hsp70 във фронталната кора при плъхове на средна възраст. Нивата на Hsp70 при 14-месечните плъхове бяха значително намалени в сравнение със съответната шам група ($p = 0.019$) (Фиг. 19А). При Hsp90 се наблюдаваше сходна тенденция към намалена експресия, но без достигане на статистическа значимост ($p > 0.05$) (Фиг. 19В). Подобно на възрастовите етапи, пинеалектомията не е фактор оказващ въздействие върху нивата на шапероновите белтъци в хипокампа ($p > 0, 05$) (Фиг. 19С, D).



Фигура 19 Ефект на пинеалектомията върху експресията на топлинно-шоковите протеини Hsp70 (A) и Hsp90 (B) във фронтална кора (FC) (A, B) и хипокама (C, D) при плъхове на 3, 14 и 18 месеца. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SEM. * $p = 0.033$, 18-месечни шам (контролни) плъхове в сравнение с 3-месечни шам плъхове; ** $p = 0.01$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 14-месечни шам плъхове; * $p = 0.019$, 14-месечни пин плъхове в сравнение със съответстващите шам плъхове на същата възраст (A). * $p = 0.05$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 3-месечни шам плъхове; * $p = 0.039$, 18-месечни шам плъхове в сравнение с 14-месечни шам плъхове (B).



5. Ефекти на стареенето и мелатониновия дефицит върху оксидативния стрес и сигналните пътища, свързани с тревожното поведение при плъхове в различни възрастови периоди

Кръвни проби от опашна вена бяха събрани от всяка група преди стресовата процедура (0'), 10 минути след стреса (10') и 120 минути след стреса (120') за оценка на активността на оста НРА и ефективността на обратния механизъм, отговорен за поддържането на нормални нива на плазмения кортикостерон. Нивата на кортикостерон в плазмата бяха повишени при възрастните шам плъхове в сравнение с младите възрастни ($p < 0.05$) (Таблица 2). Не се наблюдаваха промени в активността на оста НРА при шам групите в различни възрасти, тъй като липсваше значителна разлика в нивата на кортикостерон в плазмата на 10' и 120' след стреса. Отстраняването на епифизната жлеза доведе до допълнително повишаване на плазмения кортикостерон при 18-месечните пин плъхове ($p < 0.05$ в сравнение със съответната шам група). С изключение на групата на 18-месечните пин плъхове, всички изследвани групи показаха значително повишение на кортикостерона в отговор на стреса ($p < 0.05$). Два часа по-късно хормоналните нива се върнаха към базовите стойности, което предполага, че инхибиторният обратен механизъм на оста НРА остава неповлиян от възрастта и дефицита на мелатонин.

	CORTICOSTERONE (ng/ml)		
Time	0'	10'	120'
Group			
Sham 3m	9.042 ± 0.126	15.44 ± 1.925*	5.118 ± 0.199 [#]
Pin 3m	8.860 ± 0.223	15.38 ± 1.520*	5.188 ± 0.163 [#]
Sham 14m	9.114 ± 0.348	16.05 ± 0.975*	5.281 ± 0.137 [#]
Pin 14m	8.781 ± 0.263	16.60 ± 1.731*	5.221 ± 0.137 [#]
Sham 18m	9.362 ± 0.239 ⁺	17.24 ± 1.364*	10.331 ± 0.124 [#]
Pin 18m	15.09 ± 1.78 ^o	17.38 ± 1.668	16.284 ± 0.128

Таблица 2 Влияние на пинеалектомията, предизвикана при 3-, 14- и 18-месечни плъхове, върху нивото на плазмения кортикостерон (ng/ml) в базово състояние (0'), 10 минути (10') и 120 минути след стресова процедура (принудително плуване в продължение на 5 минути). Данните са дадени като средна стойност ± SEM и са анализирани чрез трифакторна ANOVA, последвана от Bonferroni post hoc тест ($n=6-8$). * $p \leq 0.05$

в сравнение с 0' в рамките на същата група;⁺ $p \leq 0.05$ в сравнение с 3-месечните шам плъхове; [#] $p \leq 0.05$ в сравнение с 10'; [°] $p \leq 0.05$ в сравнение със съответните шам плъхове на същата възраст.

6. Ефекти на стареенето и мелатониновия дефицит върху когнитивните функции и паметта при плъхове в различни възрастови периоди

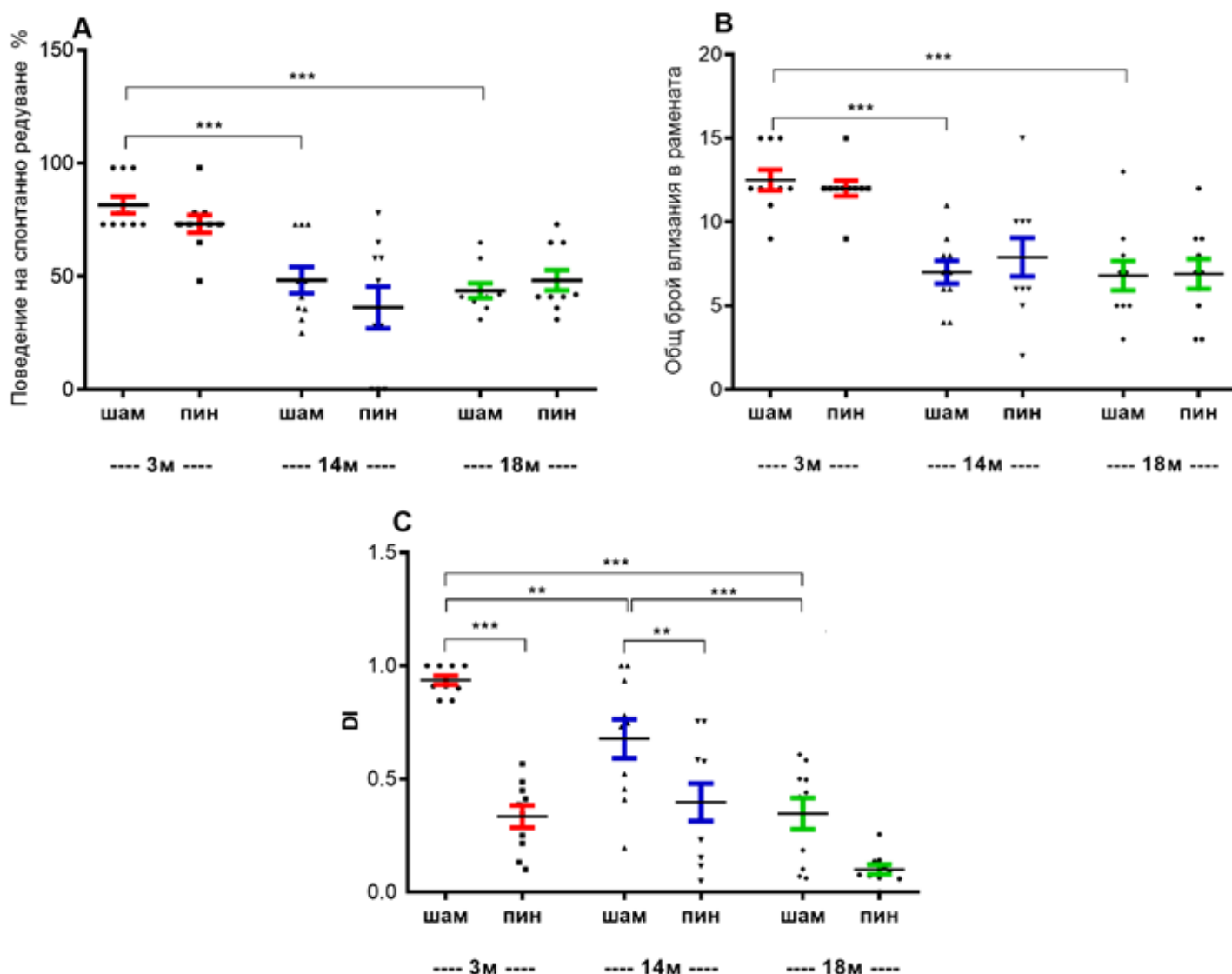
Тестът Y-лабиринт се използва широко за оценка на работната и краткосрочната пространствена памет при гризачи. Той изисква малко или никакво обучение и е използван за изследване на промени в паметта при възрастни животни (Prieur и Jadavji, 2019). Двухфакторна ANOVA показва основен ефект на Възрастта за SAB [$F(2,59) = 24.87$, $p < 0.001$] и общия брой на влизанията в рамената [$F(2,59) = 26.773$, $p < 0.001$]. В първия протокол на Y-лабиринт теста, животните на средна възраст и старите контролни плъхове показаха намалено SAB и общ брой на влизанията в рамената в сравнение с младите половозрели плъхове ($p < 0.001$, 3-месечни плъхове спрямо 14- и 18-месечни плъхове) (Фиг. 20А, В).

Дефицит на мелатонин, свързан с пинеалектомия, доведе до увреждане на работната, краткосрочната пространствена и разпознавателна памет, установено чрез Y-maze, RAM и ORT. Пинеалектомията не повлия SAB при трите възрастови групи: млади половозрели, на средна възраст и стари плъхове ($p > 0.05$, спрямо шам плъхове на същата възраст).

Във втория протокол на Y-лабиринт теста, бе наблюдавано намаляване на времето на изследване на новото рамо по време на тестовата фаза: ефект на Възрастта [$F(1,59) = 57.112$, $p < 0.001$]; ($p = 0.004$, 3- срещу 14-месечни контролни плъхове и $p < 0.001$, 3-месечни шам спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове, съответно; $p = 0.0007$, 14-месечни шам спрямо 18-месечни шам плъхове) (Фиг. 20С). Пинеалектомията увреди краткосрочната пространствена памет при младите половозрели плъхове и при тези на средна възраст плъхове, които показаха по-кратко време на изследване на новото рамо в сравнение с шам плъховете на същата възраст (Ефект на пинеалектомията: [$F(1,59) = 57.112$, $p < 0.001$]; ($p < 0.001$ и $p = 0.002$, съответно)).

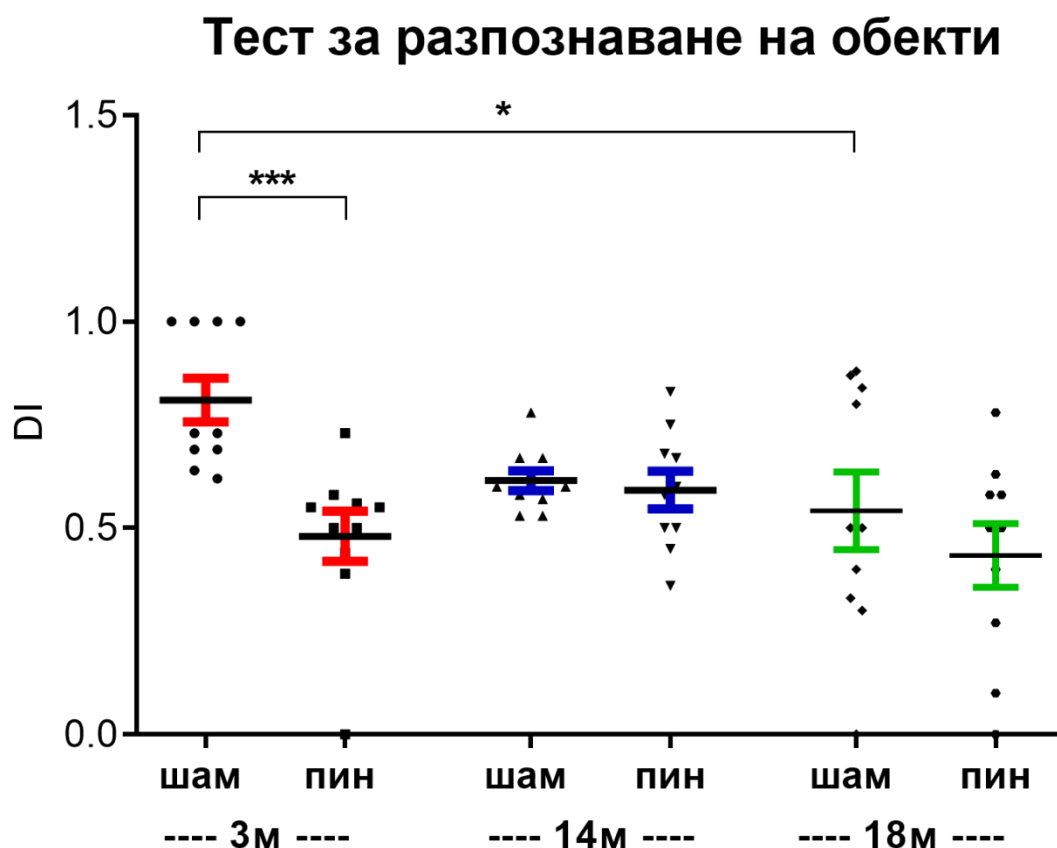


Y-лабиринт



Фигура 20 Ефект на стареенето и пинеалектомията върху работната памет и краткосрочната пространствена памет при 3-, 14- и 18-месечни плъхове, оценени с теста Y-лабиринт: (А) Поведение на спонтанно променливо поведение (SAB) в %; (В) Общия брой влизания във всички рамена; (С) Времето в новото рамо (DI). Данните са представени като средно ± SEM, n = 10. ***p < 0.001, 3-месечни плъхове спрямо 14-месечни и 18-месечни плъхове съответно (А, В); **p = 0.004, 3-месечни шам спрямо 14-месечни шам плъхове; ***p < 0.001, 3-месечни шам спрямо 18-месечни шам плъхове; ***p = 0.0007, 14-месечни плъхове спрямо 18-месечни плъхове; ***p < 0.001, 3-месечни пин (pin) плъхове спрямо шам група на същата възраст; **p = 0.002, 14-месечни пин плъхове спрямо шам група на същата възраст (С).

Краткосрочната разпознавателна памет беше оценена 60 минути след претеста с теста за разпознаване на обекти (ORT). Двухфакторният ANOVA показва основен ефект на Възрастта: [$F(2,59) = 3.318, p = 0.044$] и на Пинеалектомията: [$F(1,59) = 8.879, p = 0.004$]. Осемнадесетмесечните шам плъхове имаха по-нисък индекс на дискриминация (DI) в сравнение с тримесечните плъхове ($p = 0.012$). Пинеалектомията оказва негативен ефект върху краткосрочната разпознавателна памет при най-младите плъхове, които показаха намален DI в сравнение с техните възрастово съответстващи шам-контроли ($p < 0.001$) (Фиг. 21).



Фигура 21 Ефект на пинеалектомията върху краткосрочната разпознавателна памет при 3-, 14- и 18-месечни плъхове, измерена в теста за разпознаване на обекти (ORT). Индексът на дискриминация (DI) на времето в обследване на новия обект беше оценен в тест фазата. Данните са представени като средно $\pm$ SEM, $n = 10$. * $p = 0.012$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; *** $p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо шам плъхове на същата възраст.

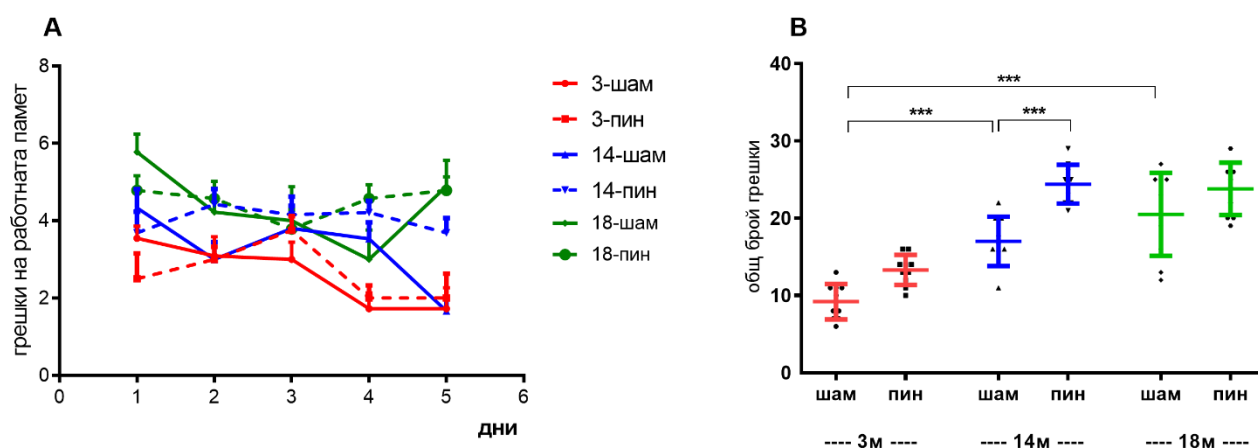
И младите половозрели шам плъхове, и тези на средна възраст плъхове, подложени на фиктивна операция, показаха способност за заучаване на задачата в теста RAM (Фиг. 22A). В най-младата група грешките на работната памет (WMEs) намаляха с времето (p



< 0.05) (Фиг. 22А). Двухфакторна ANOVA демонстрира основен ефект на Възрастта [$F(2,59) = 63.684$, $p < 0.001$] и на Пинеалектомията [$F(1,59) = 33.179$, $p < 0.001$] върху общия брой WMEs. Стареенето оказва негативен ефект върху работната пространствена памет, доказано чрез увеличен брой грешки (WMEs) при 14- и 18-месечните шам плъхове в сравнение с 3-месечните ($p < 0.001$) (Фиг. 22А, В).

Пинеалектомията влоши свързаното с възрастта намаление на пространствената памет при плъховете на средна възраст. Така 14-месечните плъхове, подложени на пинеалектомия, показаха значително по-висок общ брой WMEs в сравнение с контролните плъхове ($p < 0.001$) (Фиг. 22В).

В обобщение, резултатите от RAM теста показват, че докато стареенето само по себе си води до влошаване на пространствената работна памет, пинеалектомията допълнително изостря този дефицит при плъхове на средна възраст.



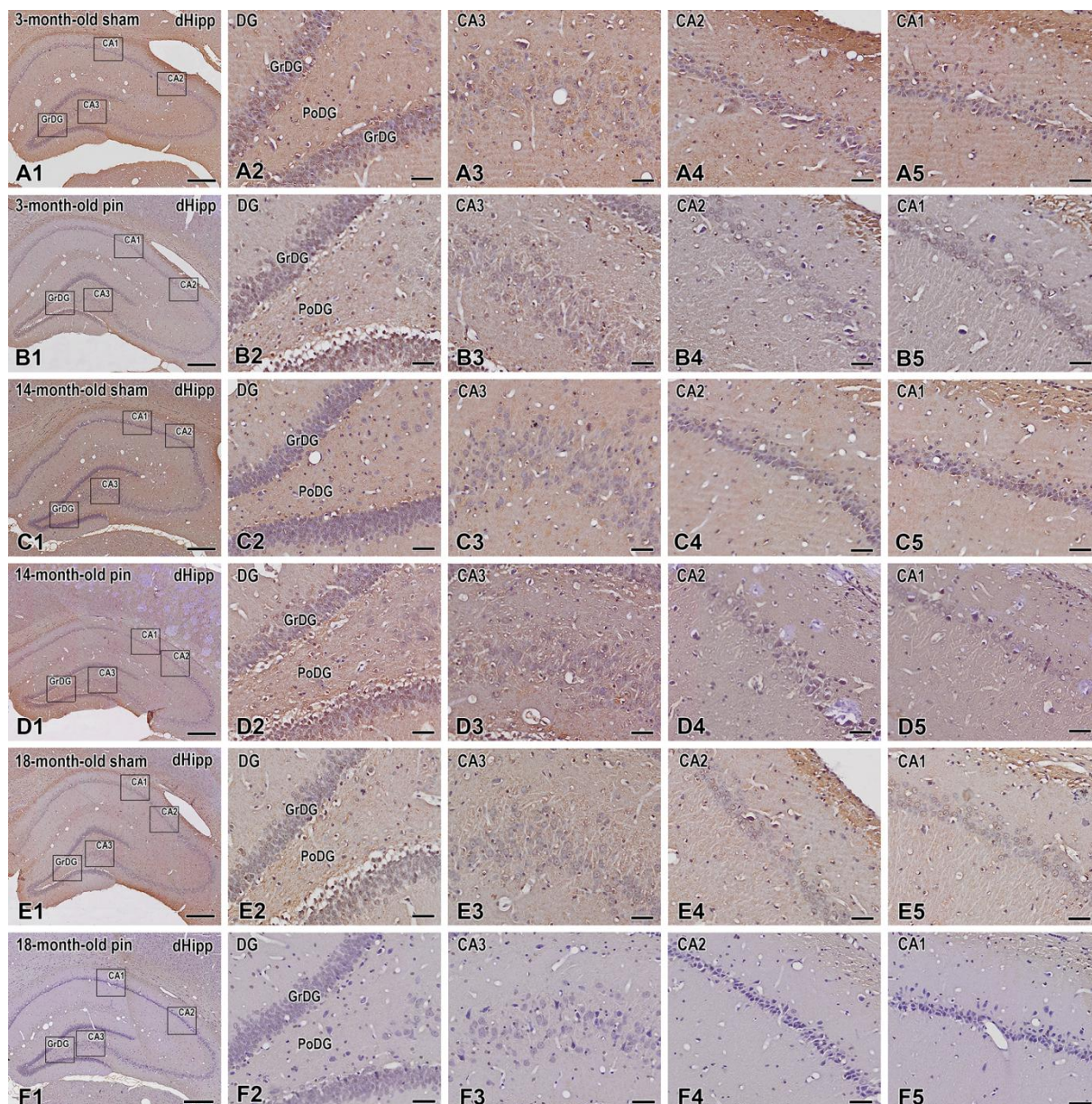
Фигура 22 Ефект на пинеалектомията върху пространствената хипокамп-зависима работна памет върху грешки на работната памет (WMEs) за всяка сесия (А) и общия брой WMEs (В) при 3-, 14- и 18-месечни плъхове, измерени в теста осем-раменен радиален лабиринт (RAM), $n = 10$. *** $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове; *** $p < 0.001$, 14-месечни пин плъхове спрямо съответната шам група на същата възраст (В).

7. Ефекти на стареенето и мелатониновия дефицит върху сигналните пътища, свързани с когнитивните функции и паметта при плъхове в различни възрастови периоди

По отношение на BDNF в дорзалния хипокамп бе наблюдавана редукция в експресията на белтъка със стареенето както следва: Ефект на Възрастта в GrDG [$F(1,41) = 6.220$, $p <$

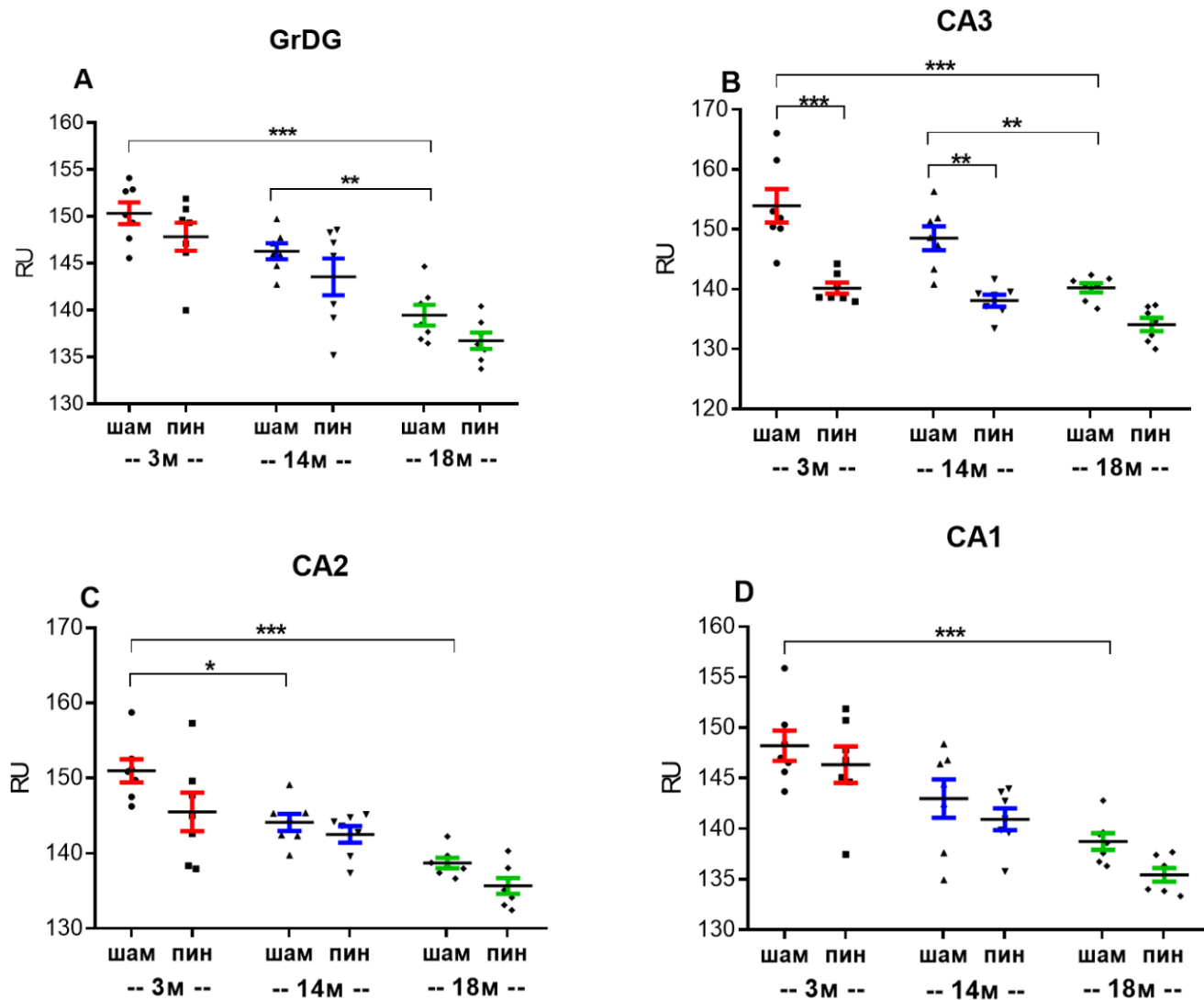
0.017]; ($p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $p = 0.01$, 14-месечни спрямо 18-месечни шам плъхове) (Фиг. 23; Фиг. 24А); в СА3 полето [$F(1,41) = 59.297$, $p < 0.001$]; ($p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $p = 0.002$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове) (Фиг. 23; Фиг. 24В), в СА2 полето [$F(1,41) = 7.856$, $p = 0.008$] ($p = 0.034$, $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове, съответно) (Фиг. 23; Фиг. 24С); в СА1 полето [$F(1,41) = 4.589$, $p = 0.039$] ($p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове) (Фиг. 23; Фиг. 24D).

Дефицитът на мелатонин, индуциран от пинеалектомия, намалява експресията на BDNF в СА3 полето на хипокампа при млади и на средна възраст плъхове. Ефект на Пинеалектомията: [$F(2,41) = 19.306$, $p < 0.001$] ($p < 0.001$, 3-месечни с пинеалектомия спрямо съответните шам плъхове на същата възраст; $p = 0.002$, 14-месечни с пинеалектомия спрямо тяхната шам група на същата възраст) (Фиг. 23; Фиг. 24В).



Фигура 23 Имуннохистохимична локализация на BDNF в дорзалния хипокамп на 3-, 14- и 18-месечни плъхове. Експресията на BDNF беше наблюдавана в хипокампалната формация, включително в **dentate gyrus**, гранулозния клетъчен слой (GrDG), както и в полетата на хипокампа **cornu ammonis** (CA3, CA2 и CA1). Изображения, показващи имунно оцветяване на BDNF при 3-месечни шам плъхове (A1-A5), 3-месечни пин плъхове (B1-B5), 14-месечни шам плъхове (C1-C5), 14-месечни пин плъхове (D1-D5), 18-месечни шам плъхове (E1-E5) и 18-месечни пин плъхове (F1-F5). По-високи увеличения на правоъгълниците от всички три възрастови групи са показани. Обърнете внимание, че имунният отговор към BDNF в полетата CA3 на хипокампа е силно намален при млади възрастни и средновъзрастни плъхове с премахнати епифизни жлези (B3, D3). Машаб: 500 μm (A1, B1, C1, D1, E1, F1), 50 μm (A2-A5; B2-B5; C2-C5; D2-D5; E2-E5; F2-F5).

BDNF

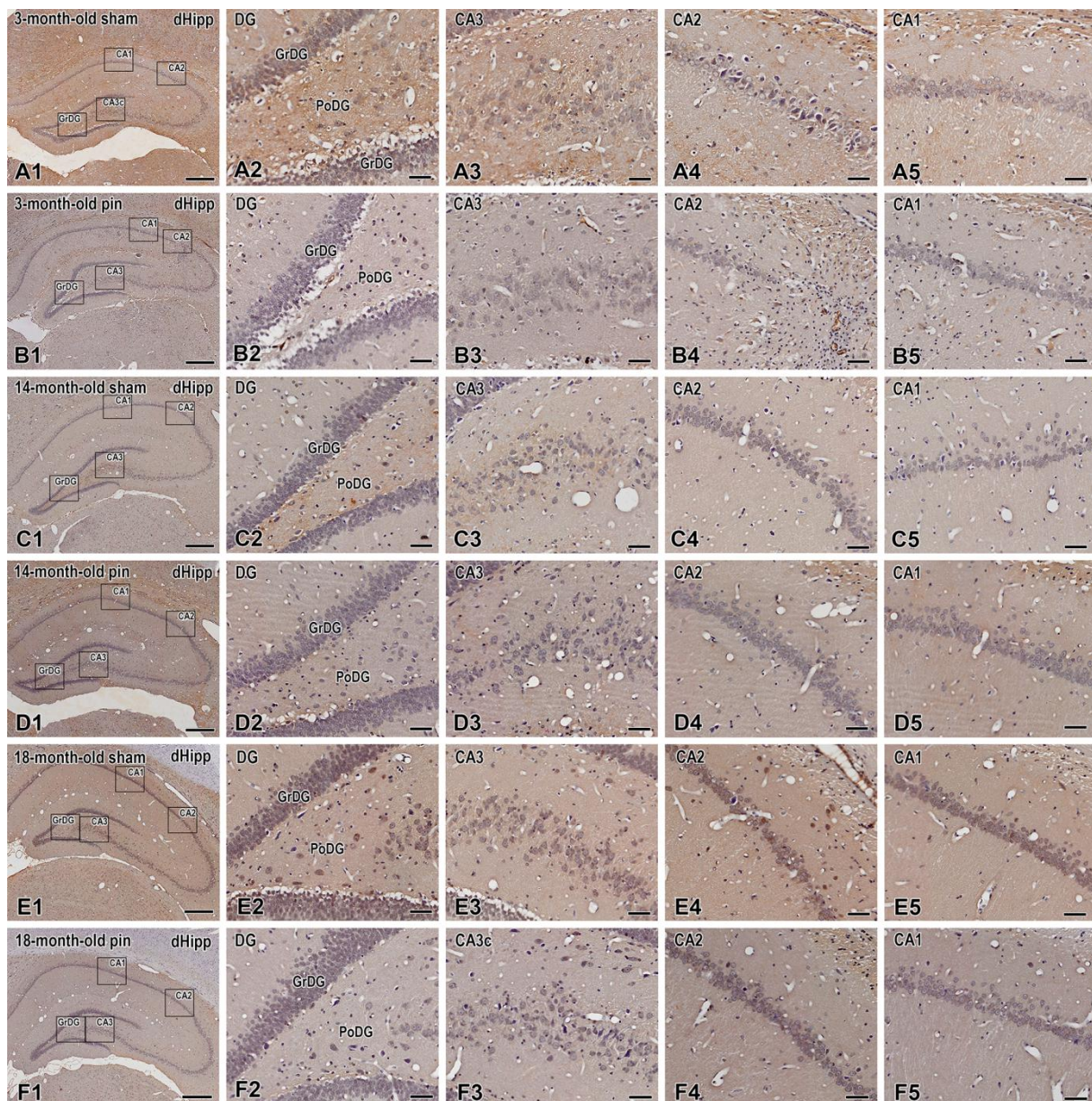


Фигура 24 Ефект на пинеалектомията върху имунната експресия на BDNF в дорзалния хипокамп, включително в грануларния клетъчен слой на Gyrus Dentatus (GrDG) и хипокампаалните полета на cornu ammonis (CA3, CA2 и CA1) при 3-, 14- и 18-месечни плъхове. Данните са представени като средно $\pm$ SEM, с $n = 5$ плъха на група. *** $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; ** $p = 0.01$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове (A); *** $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; ** $p = 0.002$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; *** $p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо шам плъхове на същата възраст; ** $p = 0.002$, 14-месечни пин плъхове спрямо шам плъхове на същата възраст (B); * $p = 0.034$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14-месечни шам плъхове съответно; *** $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове съответно (C); *** $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове (D).



Подобно на BDNF, се наблюдава тенденция към възрастово зависима регулация на рецептора TrkB във всички изследвани области на дорзалния хипокамп, както следва: Ефект на Възрастта в GrDG [$F(1,41) = 39.297$, $p < 0.001$] ($p < 0.001$, 3-месечни и 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове); в CA3 полето [$F(1,41) = 16.982$, $p < 0.001$] ($p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове); в CA2 полето [$F(1,41) = 4.604$, $p = 0.039$] ($p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове); в CA1 полето [$F(1,41) = 9.966$, $p = 0.003$] ($p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове; $p = 0.01$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове) (Фиг. 25; Фиг. 26A–D).

Премахването на епифизната жлеза допълнително намалява експресията на рецептора TrkB при 14-месечни плъхове, специфично в GrDG, ефект на Пинеалектомията: [$F(2,41) = 132.169$, $p < 0.001$] ($p < 0.001$, спрямо шам групата на същата възраст) (Фиг. 25; Фиг. 26A). Пинеалектомията при 3-месечните плъхове индуцира намалена експресия на BDNF в CA3 полето [$F(2,41) = 32.873$, $p < 0.001$] ($p = 0.002$, спрямо 3-месечни шам плъхове) (Фиг. 25; Фиг. 26B).

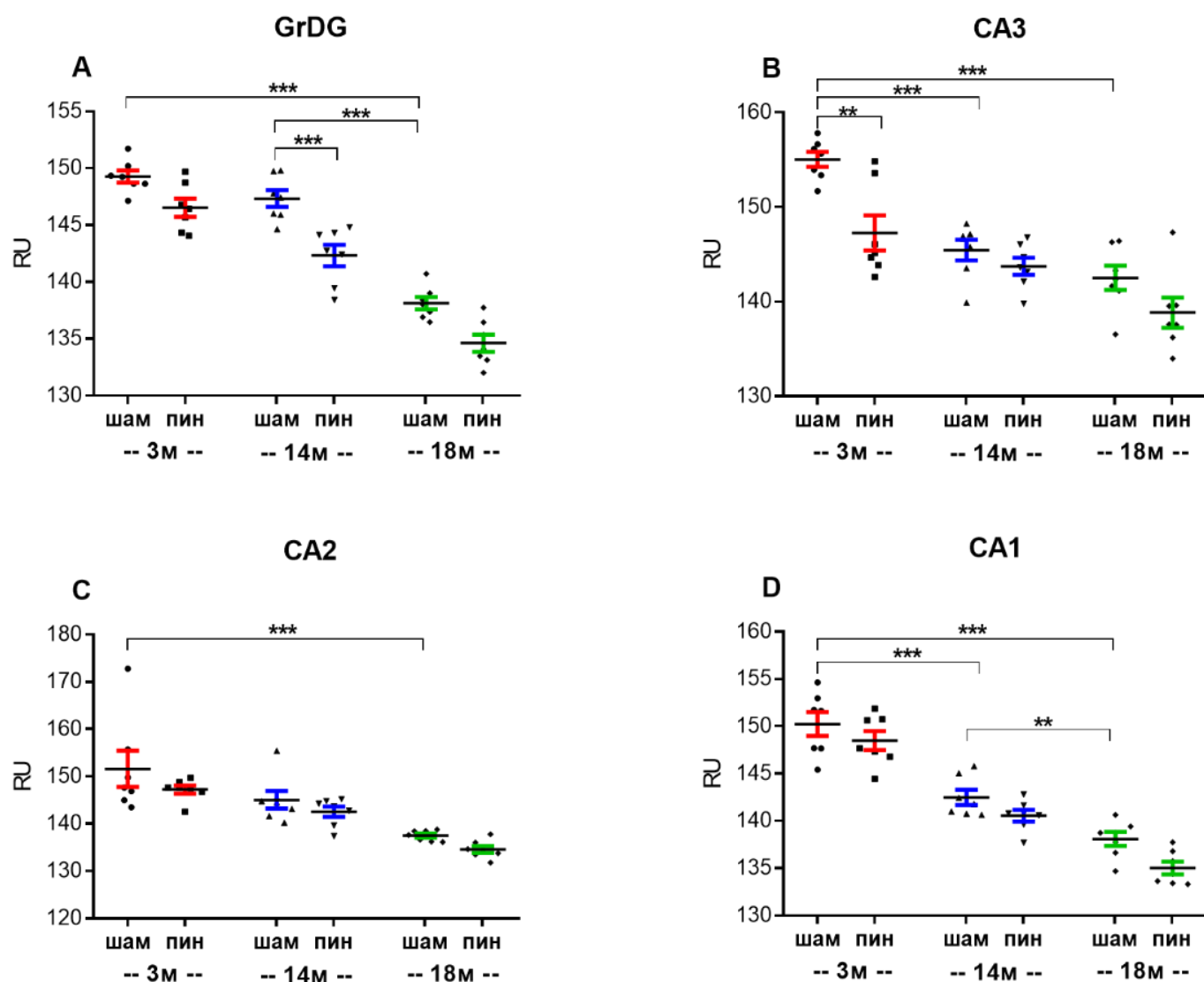


Фигура 25 Имуноекспресия на TrkB в дорзалния хипокамп, включително в грануларния клетъчен слой на Gyrus Dentatus (GrDG) и хипокампалните полета на cornu ammonis (CA3, CA2 и CA1) при 3-, 14- и 18-месечни плъхове.

Имунохистохимична локализация на TrkB в 3-месечни шам плъхове (A1-A5), 3-месечни пин плъхове (B1-B5), 14-месечни шам плъхове (C1-C5), 14-месечни пин плъхове (D1-D5), 18-месечни шам плъхове (E1-E5) и 18-месечни пин плъхове (F1-F5). По-високи увеличения на правоъгълниците във всички три възрастови групи са показани. Обърнете внимание на намалената имунореактивност за TrkB в региона CA3 при младите половозрели плъхове след пинеалектомия (B3). Машаб: 500 μm (A1, B1, C1, D1, E1, F1), 50 μm (A2-A5; B2-B5; C2-C5; D2-D5; E2-E5; F2-F5).



TrkB



Фигура 26 Ефект на пинеалектомията върху имунната експресия на TrkB в дорзалния хипокамп, включително в грануларния клетъчен слой на Gyrus Dentatus (GrDG) и хипокампапните полета на cornu ammonis (CA3, CA2 и CA1) при 3-, 14- и 18-месечни плъхове.

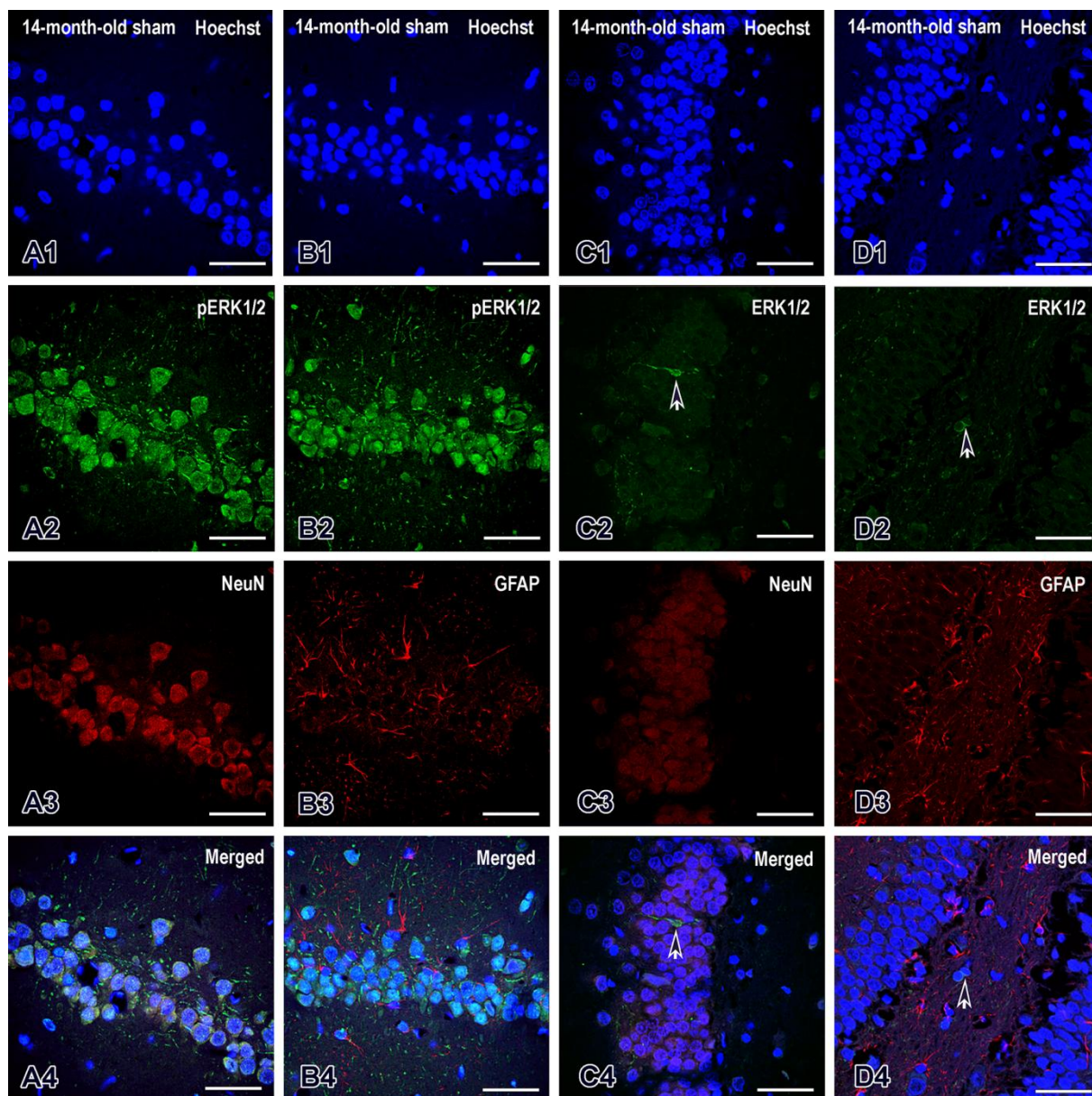
Данните са представени като средно ± SEM, n = 5 плъха на група. В DGgr: ***p < 0.001, 3- и 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; ***p < 0.001, 14-месечни пин плъхове спрямо шам плъхове на същата възраст (A); ***p < 0.001, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове; **p = 0.002, 3-месечни пин плъхове спрямо шам плъхове на същата възраст (B); ***p < 0.001, 3-месечни шам

плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове (C);*** $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове;** $p = 0.01$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове (D).

Представените на Фиг. 27 двойно имунофлуоресцентни изображения от CA1 полето на дорзалния хипокамп на плъхове на средна възраст, показват съвместно оцветяване за pERK1/2 и невронно-специфичен ядрен протеин (NeuN) (Фиг. 27A1–A4), както и за pERK1/2 и глиален фибрилярен киселинен протеин (GFAP) (Фиг. 27B1–B4). NeuN, който се експресира в ядрото и цитоплазмата на повечето невронни клетки в централната нервна система, е универсален маркер за постмитотичен невронален фенотип. От друга страна, GFAP служи като надежден маркер за глиални клетки, особено астроцити.

Установихме, че по-голямата част от зрелите NeuN-позитивни клетки също изразяват pERK1/2 (Фиг. 27A2–A4), докато GFAP-позитивните астроцити не показват съвместно маркиране с pERK1/2 (Фиг. 27B1–B4) в CA1 полето. Това предполага, че клетките, експресиращи pERK1/2, са предимно неврони.

В Gyrus Dentatus (DG) бе установено слабо интензивно сигнализиране на ERK1/2 (Фиг. 27C1–C4), като GFAP също не показва съвпадение с експресията на ERK1/2 (Фиг. 27D1–D4), което допълнително потвърждава отсъствието на активиране в астроцити.

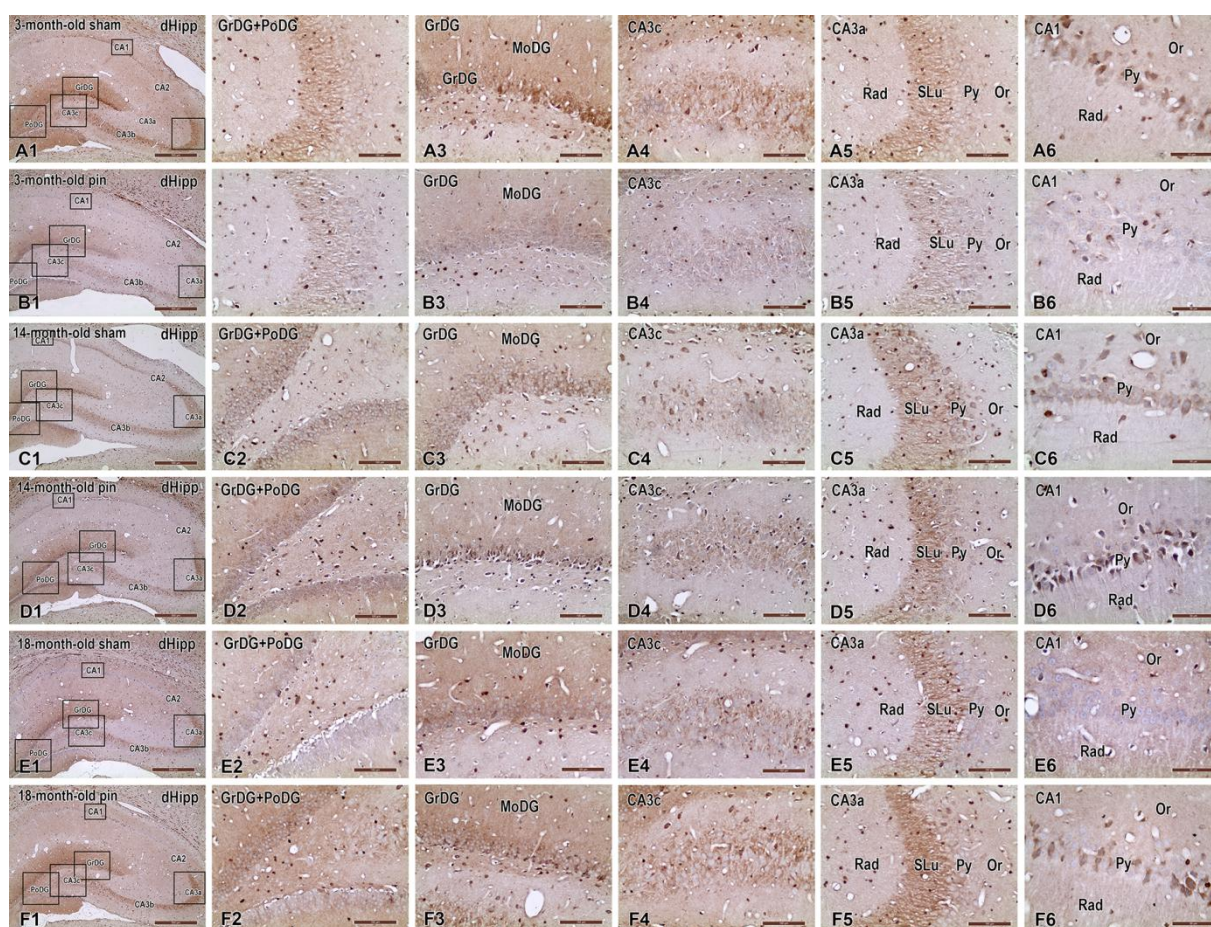


Фигура 27 Двойна имунофлуоресценция в CA1 полето на дорзалния хипокамп за pERK1/2 и NeuN (A1-A4), pERK1/2 и GFAP (B1-B4) при 14-месечни шам плъхове. Третата и четвъртата колони отразяват двойна имунофлуоресценция в същата възрастова и експериментална група животни в dentate gyrus между ERK1/2 и NeuN (C1-C4) и между ERK1/2 и GFAP (D1-D4). Машабни ленти = 50 μ m.

Докато общият ERK1/2 беше широко разпространен из хипокампалната формация, активираната му фосфолирирана форма (pERK1/2) се откриваше в специфични подрегиони на хипокампа, като моделът на експресията варираше между възрастовите групи и експерименталните условия. Подобно на експресията на BDNF и неговия рецептор, се наблюдаваше в зависимост от възрастта намаляване на експресията на

ERK1/2 в следните региони: ефект на Възрастта в GrDG [$F(1,83) = 4.011, p < 0.001$]; (3-месечни спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове); в пирамидален слой (Py) на CA3c полето [$F(1,83) = 1.658, p < 0.001$]; (3-месечни спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове); в stratum lucidum (SLu) [$F(1,83) = 1.857, p < 0.001$]; (14- спрямо 18-месечни шам плъхове); в stratum radiatum (Rad) [$F(1,83) = 5.709, p = 0.003$]; (14- спрямо 18-месечни шам плъхове) (Фиг. 28, Фиг. 29А, В, D).

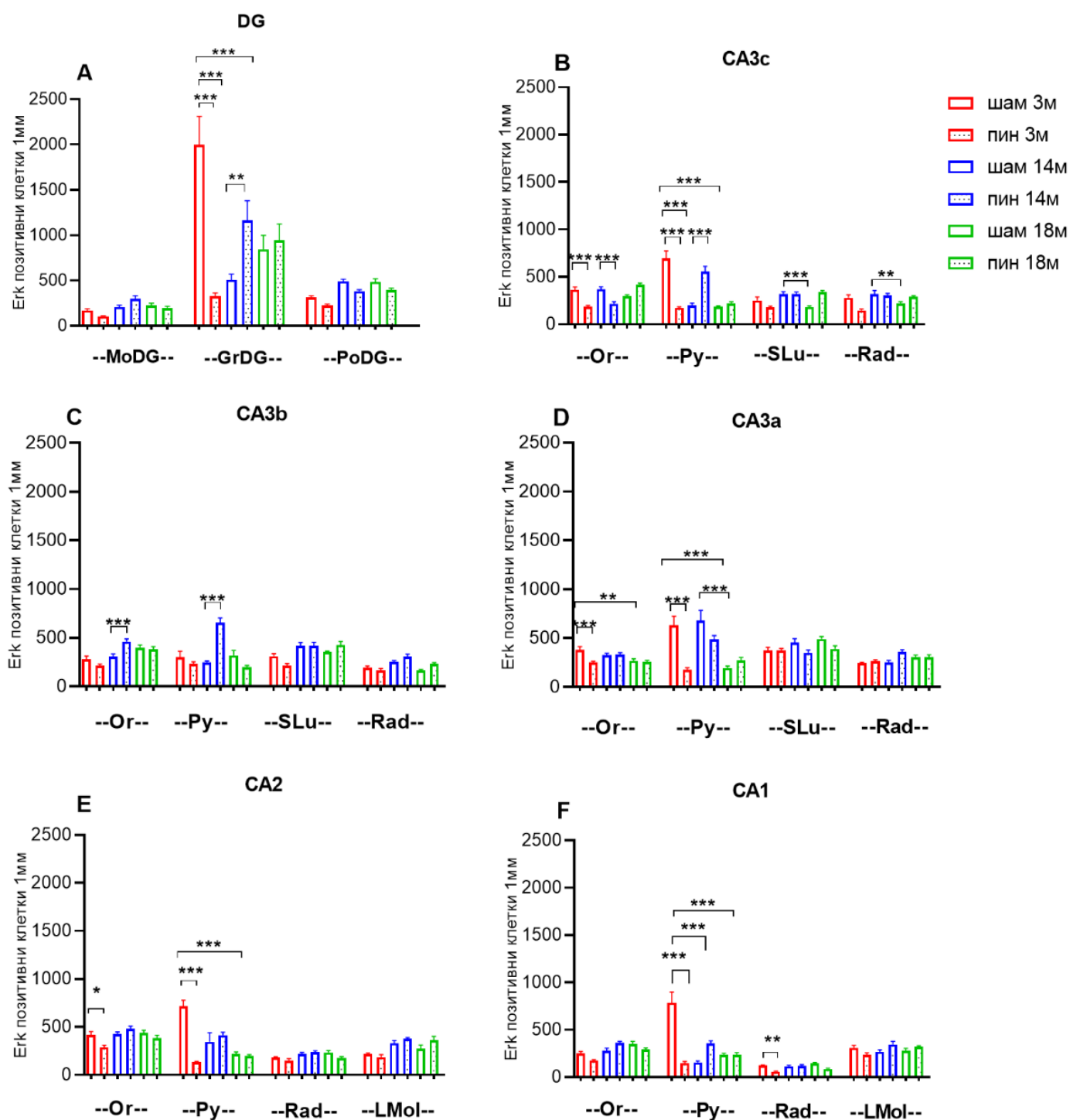
Дефицитът на мелатонин, предизвикан от пинеалектомия, причинява зависимости от възрастта и региона промени в експресията на ERK1/2 и фосфорилираната му форма pERK1/2 в DG и Corni ammonis.



Фигура 28 Имунохистохимична локализация на ERK1/2 в дорзалния хипокамп (dHipp) на 3-, 14- и 18-месечни плъхове. Фотографиите с ниско увеличение показват експресията на протеина ERK1/2 в **Gyrus Dentatus** (DG) и полетата CA1–CA3 на хипокампа при 3-месечни шам плъхове (A1) и 3-месечни пин плъхове (B1), 14-месечни шам плъхове (C1) и 14-месечни пин плъхове (D1), както и при 18-месечни шам плъхове (E1) и 18-месечни пин плъхове (F1). По-високото увеличение на маркираните правоъгълници от изображенията (A1–F1) илюстрира отчетливо намаляване на имунореактивността на ERK1/2 в грануларния слой на **Gyrus Dentatus** (GrDG) при 3-месечни пин плъхове (B2), както и в определени субполета, CA3c (B3) и CA1 (B5). Забелязва се повишена експресия на ERK1/2 в GrDG (D2) и в stratum



pyramidale (Py) на СА3с (D3) при 14-месечни пин плъхове. Това увеличение е ясно видимо при по-високо увеличение. Добре изразена е намалената експресия на ERK1/2 в СА2 Py (E4) и СА1 Py (E5) при 18-месечни шам плъхове. Мащаб: 500 μm (A1, B1, C1, D1, E1, F1); 50 μm (A2–A5, B2–B5, C2–C5, D2–D5, E2–E5, F2–F5).



Фигура 29 Ефект на пинеалектомията върху имунната експресия на Erk 1/2 в дорзалния хипокамп, включително в DG, CA3c, CA3b, CA3a, CA2 и CA1 региони.

Данните са представени като средно $\pm$ SEM, с $n = 5$ плъха на група. GrDG: *** $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове, *** $p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо 3-месечни шам плъхове, ** $p = 0.006$, 14-месечни пин плъхове спрямо 14-месечни шам плъхове (A); CA3c: *** $p < 0.001$, 3-



месечни пин плъхове спрямо 3-месечни шам плъхове, $***p < 0.001$, 14-месечни пин плъхове спрямо 14-месечни шам плъхове в stratum oriens (Or); $***p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове, $***p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо 3-месечни шам плъхове, $***p < 0.001$, 14-месечни пин плъхове спрямо 14-месечни шам плъхове в stratum pyramidale (Py); $***p < 0.001$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове в stratum lucidum (SLu); $**p = 0.003$, 14-месечни шам спрямо 18-месечни шам в stratum radiatum (Rad) (B).CA3b: $***p < 0.001$, 14-месечни пин плъхове спрямо 14-месечни шам плъхове в Or; $***p < 0.001$, 14-месечни пин плъхове спрямо 14-месечни шам плъхове в Py (C); $**p = 0.006$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове, $***p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо 3-месечни шам плъхове в Or; $***p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $***p < 0.001$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове, $***p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове срещу 3-месечни шам плъхове в Py (D); CA2: $*p = 0.044$, 3-месечни пин плъхове спрямо 3-месечни шам плъхове в Or; $***p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове, $***p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо 3-месечни шам плъхове в Py (E); $***p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове, $***p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо 3-месечни шам плъхове в Py; $**p = 0.007$, 3-месечни пин плъхове спрямо 3-месечни шам плъхове в Rad (F).

Подобно на наблюдаваните ефекти върху BDNF и неговия рецептор TrkB, пинеалектомията при 3-месечни плъхове води до значително понижение на експресията на ERK1/2 в GrDG ефект от Пинеалектомията: $[F(2,83) = 1.735]$, CA3c Py $[F(2,83) = 17.664]$, CA3a Or $[F(2,83) = 5.313]$ и CA3a Py $[F(2,83) = 16.311]$ ($p < 0.001$ спрямо контролните животни на същата възраст) (Фиг. 28; Фиг. 29A, B, D).

Обратно, при 14-месечни плъхове, мелатониновия дефицит предизвиква увеличение на експресията на ERK1/2 в GrDG $[F(2,83) = 1.735]$, CA3c Py $[F(2,83) = 17.664]$ и CA3b Py $[F(2,83) = 15.981]$ ($p < 0.001$ спрямо контролите на същата възраст) (Фиг. 28, 29; Фиг. 30A–C).

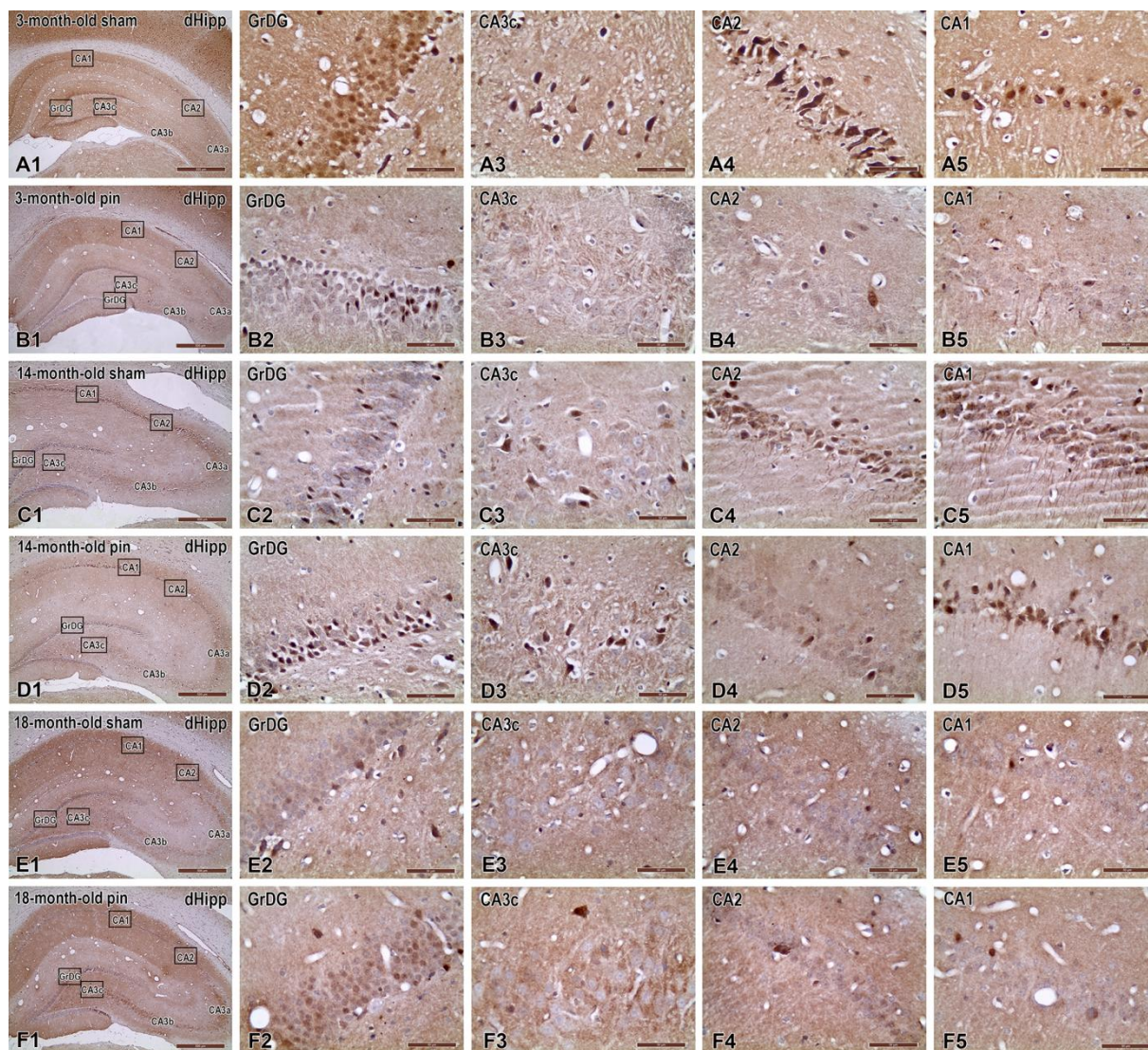
С напредването на възрастта се отчита редуцирана експресия на ERK1/2 в CA2 Py $[F(1,83) = 21.708]$ и CA1 Py $[F(1,83) = 12.725]$ (3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове) (Фиг. 28; Фиг. 29E, F). Пинеалектомията допълнително потиска експресията на ERK1/2 в CA2 при млади половозрели плъхове — в CA2 Or $[F(2,83) = 8.414, p = 0.044]$, CA2 Py $[F(2,83) = 10.222, p < 0.001]$ и CA1 Py $[F(2,83) = 13.112, p < 0.001]$, както и в stratum Radiatum $[F(2,83) = 6.481, p = 0.007]$ спрямо контролните плъхове.

Тенденция към понижена експресия на pERK1/2 с възрастта се наблюдава в GrDG $[F(1,89) = 17.396, p < 0.001]$, като статистически значими различия са отчетени шам плъхове между 3- и 14-месечни ($p = 0.017$) и между 3- и 18-месечни шам плъхове ($p <$

0.001); също и в PoDG [$F(1,89) = 17.369$, $p < 0.001$], CA3c [$F(1,89) = 162.622$, $p < 0.001$], CA3b [$F(1,89) = 4.214$, $p = 0.043$], CA3a [$F(1,89) = 182.108$, $p < 0.001$], CA2 [$F(1,89) = 531.322$, $p < 0.001$] и CA1 [$F(1,89) = 37.939$, $p < 0.001$] (Фиг. 30; Фиг. 31A–E).

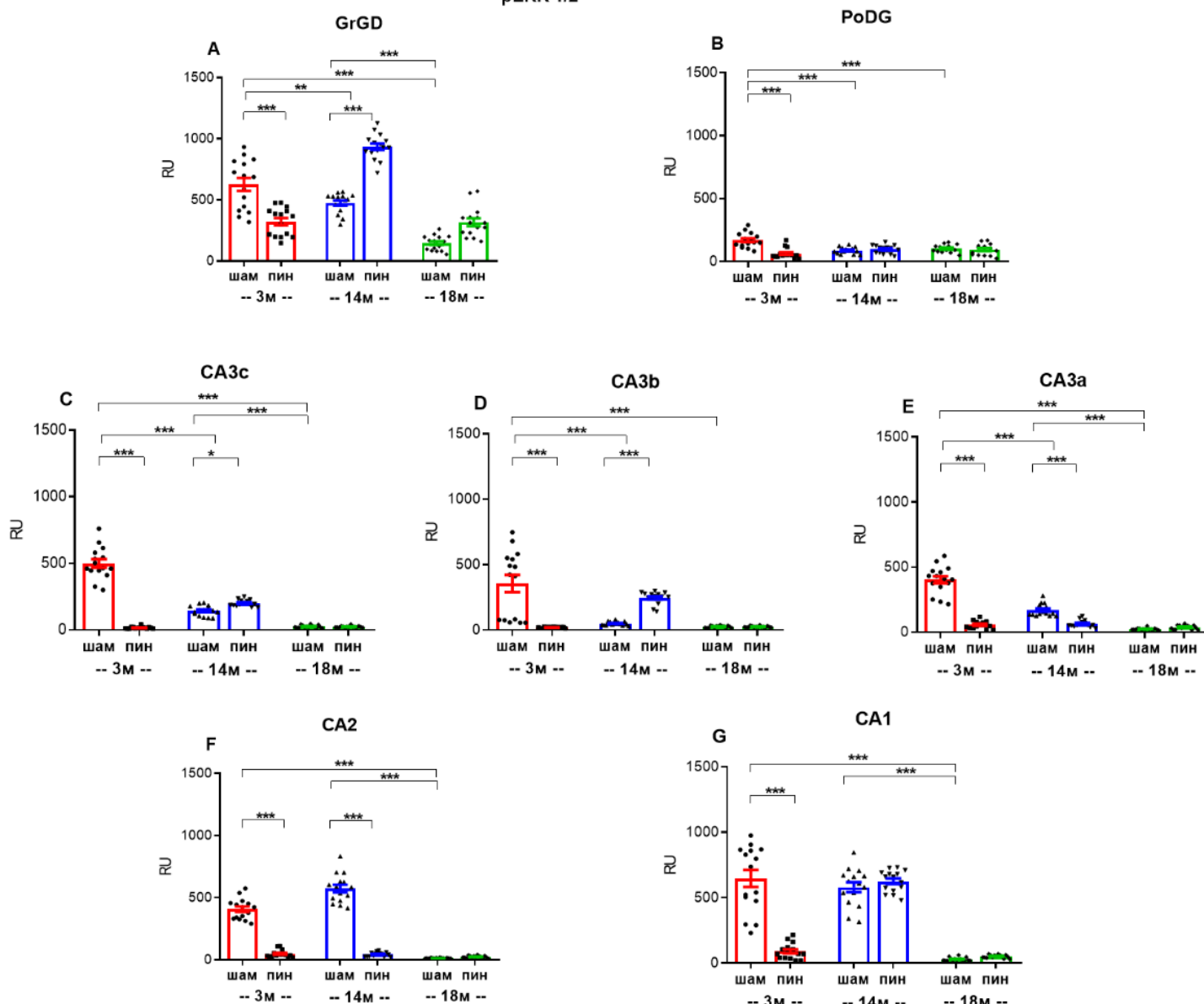
Пинеалектомията при млади половозрели плъхове също води до значително понижение в експресията на pERK1/2 в GrDG [$F(2,89) = 109.562$, $p < 0.001$], PoDG [$F(2,89) = 2.981$, $p = 0.056$], CA3c [$F(2,89) = 148.926$, $p < 0.001$], CA3b [$F(2,89) = 18.500$, $p < 0.001$], CA3a [$F(2,89) = 113.329$, $p < 0.001$], CA2 [$F(2,89) = 183.300$, $p < 0.001$] и CA1 [$F(2,89) = 151.233$, $p < 0.001$]. Наблюдават се и значими взаимодействия между Възрастта и Пинеалектомията за всички изброени региони ($p < 0.001$) (Фиг. 30; Фиг. 31F, G).

При животните на средна възраст пинеалектомията индуцира регион-специфични промени в pERK1/2. Мелатониновия дефицит в тази възрастова група води до намаление на експресията в CA3a и CA2 [$F(2,89) = 113.329$] и [$F(2,89) = 183.300$], съответно; ($p < 0.001$ спрямо контроли) (Фиг. 31E, F). В същото време, както и при ERK1/2, се наблюдава повишена експресия на pERK1/2 в GrDG [$F(2,89) = 109.562$, $p < 0.001$], CA3c [$F(2,89) = 148.926$, $p = 0.045$] и CA3b [$F(2,89) = 18.500$, $p < 0.001$] при същата възрастова група (Фиг. 31A–D).



Фигура 30 Имунохистохимична демонстрация на pERK1/2 в дорзалния хипокамп (dHipp) на 3-, 14- и 18-месечни плъхове. Снимки на хипокама при 3-месечни шам плъхове (A1) и 3-месечни пин плъхове (B1), 14-месечни шам плъхове (C1) и 14-месечни пин плъхове (D1), и 18-месечни шам плъхове (E1) и 18-месечни пин плъхове (F1). Снимки показват при по-високо увеличение намалената експресия на pERK1/2 в грануларния слой на gyrus dentatus (GrDG) и трите части на хипокампалната област CA (E2-E5) при 18-месечни шам плъхове. По-високото увеличение на правоъгълниците в (A1-F1) също показва намалена имунореактивност на pERK1/2 във всички области на хипокампалната формация при 3-месечни пин плъхове (B2-B5). Мащаб: 500 μm (A1, B1, C1, D1, E1, F1); 50 μm (A2-A5, B2-B5, C2-C5, D2-D5, E2-E5, F2-F5).

pERK 1/2

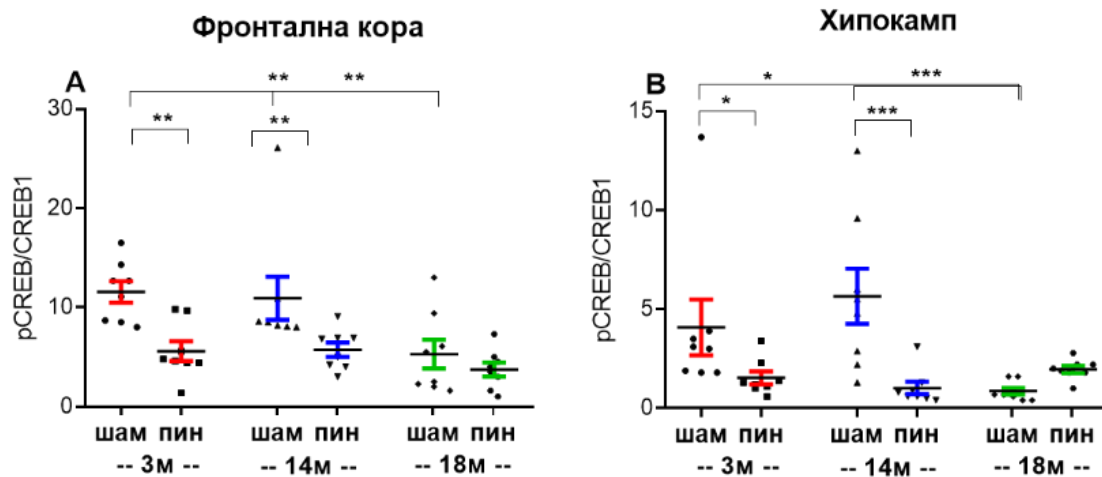


Фигура 31 Ефект на пинеалектомията върху имунната експресия на pErk 1/2 в дорзалния хипокамп, включително в GrDG, PoDG, CA3c, CA3b, CA3a, CA2 и CA1 региони. Данните са представени като средно $\pm$ SEM, $n = 5$ плъха на група. GrDG: $p = 0.017$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14-месечни шам плъхове; $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо шам групата на същата възраст; $***p < 0.001$, 14-месечни пин плъхове спрямо шам групата на същата възраст (A); $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове; $***p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо шам групата на същата възраст (B); $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове на същата възраст; $p < 0.001$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $***p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо шам групата на същата възраст; $*p = 0.045$, 14-месечни пин плъхове спрямо шам групата на същата възраст (C); $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове; $***p < 0.001$, 3- и 14-месечни пин плъхове спрямо шам групата на същата възраст (D); $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 14- и 18-месечни шам плъхове; $p < 0.001$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $***p < 0.001$, 3- и 14-месечни пин



плъхове спрямо шам групата на същата възраст (E); $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $p < 0.001$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо шам групата на същата възраст; $***p < 0.001$, 14-месечни пин плъхове спрямо шам групата на същата възраст (F); $p < 0.001$, 3-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $p < 0.001$, 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове; $***p < 0.001$, 3-месечни пин плъхове спрямо шам групата на същата възраст (G).

Съотношението $p\text{CREB}/\text{CREB}$ беше анализирано при млади половозрели (3 месеца), средновъзрастни (14 месеца) и стари (18 месеца) плъхове, подложени на шам операция или пинеалектомия. Бе установено статистически значимо възрастово понижение на това съотношението както във фронталната кора [$F(1,47) = 16.045$, $p < 0.001$], така и в хипокампа [$F(1,47) = 8.884$, $p = 0.005$]. По-конкретно, 3- и 14-месечните шам животни показаха по-високи стойности спрямо 18-месечните шам както във фронталната кора ($p = 0.004$ и $p = 0.008$), така и в хипокампа ($p = 0.018$ и $p < 0.001$), съответно (Фиг. 32А, В). Мелатониновият дефицит, предизвикан от пинеалектомия, води до възрастово зависимо понижение на съотношението $p\text{CREB}/\text{CREB}$ във фронталната кора и хипокампа. Допълнително, пинеалектомията при младите половозрели и средновъзрастните животни води до значително намаление на съотношението $p\text{CREB}/\text{CREB}$ във фронталната кора [$F(1,47) = 6.153$, $p = 0.005$], като разликите са статистически значими при 3- и 14-месечни плъхове в сравнение с шам групите на същата възраст ($p = 0.002$ и $p = 0.007$, съответно). Подобна тенденция се наблюдава и в хипокампа, където е установено значимо взаимодействие между Възрастта и Пинеалектомията [$F(2,47) = 6.006$, $p = 0.005$], с понижени стойности при 3- и 14-месечни животни с пинелектомия спрямо шам групите на същата възраст ($p = 0.036$ и $p < 0.001$). При старите плъхове (18 месеца) пинеалектомията не оказва значимо влияние върху съотношението $p\text{CREB}/\text{CREB}$ ($p > 0.05$).



Фигура 32 Ефект на пинеалектомията върху съотношението pCREB/CREB в 3-, 14- и 18-месечни плъхове, измерено във фронтална кора (A) и хипокампа (B). Данните са представени като средно $\pm$ SEM, n = 8. **p = 0.004 и **p = 0.008, 3- и 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове съответно; **p = 0.002 и **p = 0.007, 3- и 14-месечни пин плъхове спрямо шам групи на същата възраст, съответно (A); *p = 0.018 и ***p < 0.001, 3- и 14-месечни шам плъхове спрямо 18-месечни шам плъхове, съответно; *p = 0.036 и ***p < 0.001, 3- и 14-месечни пин плъхове спрямо шам групи на същата възраст, съответно (B).



V. ОБСЪЖДАНЕ

1. Ефекти на мелатониновия дефицит в различни възрастови периоди върху продължителността на живота

Предишните изследвания на екипа на Pierpaoli et al. (Pierpaoli, 1994b, 1991b; Pierpaoli and Bulian, 2005b, 2001) предоставят важни доказателства за ролята на епифизната жлеза в процесите на стареене, като сочат, че отстраняването ѝ в различни възрастови периоди оказва значително влияние върху продължителността на живота и скоростта на стареене. Авторите установяват, че мелатониновия дефицит, индуциран на половозрели млади мишки, е критичен за тяхното развитие и води до ускорено стареене и по-ранна смъртност, подчертавайки важността на жлезата в регулирането на жизнения цикъл през ранните етапи на зрелостта. От друга страна, отстраняването на епифизата на по-късна възраст (14 месеца), която отговаря на 50 годишна възраст при човек, има протективен ефект, удължавайки продължителността на живот, което предполага, че на този етап от развитието епифизата вече е изпълнила своята „програма за стареене“ свързана с регулиране на различни жизнени функции. Pierpaoli et al. установяват, че липсата на жлезата при възрастни мишки не води до съществени промени в маркерите на стареене (Pierpaoli and Bulian, 2005a).

Базирайки се на изследванията на Pierpaoli et al. (Pierpaoli, 1994b, 1991b; Pierpaoli and Bulian, 2005b, 2001) и хипотезата, че мелатониновият дефицит оказва различни ефекти върху процесите на стареене, в зависимост от възрастовия период, в който е индуциран, експерименталните изследвания в този дисертационен труд имаха за цел да потвърдят и разширят знанията за ролята на хормона мелатонин върху промените в двигателна активност, поведението на тревожност и когнитивни процеси, както и обуславящите ги механизми при плъхове в трите възрастови периода, за които тези автори установяват, че са ключови за промените свързани с възрастта. За разлика от Pierpaoli et al. (Pierpaoli and Bulian, 2005a), резултатите в експеримент №1 показаха, че дефицита на хормона мелатонин, индуциран чрез пинеалектомия, при млади половозрели, на средна възраст и стари плъхове не повлиява продължителността на живота на тези животни. Това несъответствие в получените резултати, свързано с използването на мишки или плъхове предполага, че са необходими допълнителни проучвания при различни породи и видове в бъдеще, за да бъде установено дали отстраняването на епифизата в началния период на

зрялост и в средна възраст са наистина критични възрастови етапи, в които хормона има влияние върху продължителността на живот.

Нашите резултати дават допълнителна насока за изследване на възможни различия в ефектите на мелатониновия дефицит и отстраняването на епифизата, като подчертават, че влиянието на епифизата върху стареенето и продължителността на живота може да бъде зависимо от вида и възрастовия етап на зрялост на животното.

2. Ефекти на стареенето и мелатониновия дефицит върху двигателната активност и нейния циркаден ритъм

Стареенето води до комплексни промени в моторната активност и циркадните ритми, които са тясно свързани с възрастово обусловени изменения в невроендокринната регулация, стресовата хомеостаза и невропластичността. Тези промени увеличават уязвимостта към поведенчески и физиологични нарушения и подчертават значението на циркадните ритми за поддържане на здравословното стареене.

Стареенето предизвиква промени в основните циркадни центрове на мозъка, като SCN на хипоталамуса, което регулира биологичните ритми. При възрастните животни се наблюдава намалена амплитуда и нарушения на циркадния ритъм сън-бодърстване и фрагментация на съня (Kondratova and Kondratov, 2012). Нашите резултати показват, че стареенето повлиява двигателната активност и неговия циркаден ритъм при плъховете, предизвиквайки намалена спонтанна моторна активност, особено през тъмната фаза, която е активна за плъховете като ноктюрни животни.

За елиминиране на ефекта на стрес към нова среда, тествахме двигателната активност с актиметър в рамките на 48 часа, от които първите 24 часа не бяха отчитани, което предполага добра адаптация. Разликите спрямо данните на Torras-García и сътр. (Torras-García et al., 2005) вероятно се дължат на това, че нашите контролни животни са претърпели шам-операция, която стресова манипулация вероятно също оказва ефект върху изследвания параметър.

Нарушаването на циркадния ритъм с възрастта се свързва с намален синтез на мелатонин от епифизата, който се осъществява само в тъмната фаза (Arendt and Skene, 2005). Като хормон, тази молекула координира функциите в организмите на клетъчно, органно и системно ниво спрямо режима светло/тъмно (Potter et al., 2016; Skene and Arendt, 2006). Циркадните колебания в производството на мелатонин са критични за поддържането на нормални биологични ритми, включително сън-бодърстване и двигателна активност.



Дефицитът на мелатонин при възрастните животни предизвиква нарушения в циркадната организация, включително разстройство в съня, намалена двигателна активност и повишената тревожност, както и по-голям риск от метаболитни и невродегенеративни заболявания (Pandi-Perumal et al., 2006a; Reiter et al., 2014).

От друга страна, мелатониновият дефицит подобно на стареенето оказва значително влияние върху двигателната активност и циркадните ритми при гризачите (Benloucif et al., 1997; McArthur et al., 1997). Нашите резултати показват, че пинеалектомията води до намалена моторна активност при младите половозрели плъхове, както и при старите животни. Тези открития са в съзвучие с редица проучвания, които подчертават ключовата роля на мелатонина за синхронизирането на поведенчески и физиологични функции с цикъла светло/тъмно (Priyadarshini et al., 2015; Tan et al., 2010), показвайки, че рано проявения мелатонинов дефицит предизвиква физиологични промени свързани с двигателната активност, които са характерни за нормалното стареене. От друга страна, намалената активност при старите плъхове с пинеалектомия е по-скоро свързано с възрастовия период характеризиращ се с този тип нарушение.

Интересен феномен, който установихме, е липсата на значителни ефекти върху циркадния ритъм и моторната активност при плъховете на средна възраст с пинеалектомия. Това може да се обясни с наличието на компенсаторни механизми, като синтеза на мелатонин в екстрапинеалните тъкани (например в мозъка, червата и кожата), които могат да поддържат определена базова паракринна и физиологична функция въпреки премахването на епифизната жлеза (Brzezinski et al., 1987; Huether, 1993; Tan et al., 2007, 1999). Подобни възрастово-зависими разлики в отговора към мелатониновия дефицит са отчетени и от Torras-Garcia и сътр. (Torras-Garcia et al., 2005), които отбелязват вариабилност в реакциите на пинеалектомията в зависимост от възрастта на животните.

В заключение, възрастта и мелатониновият дефицит имат съществени и комплексни ефекти върху двигателната активност и циркадните ритми. Докато стареенето само по себе си води до значително намаляване на двигателната активност, при пинеалектомия критичната роля на мелатонина и епифизната жлеза в регулацията на тези процеси се проявява най-вече при половозрели млади плъхове. Компенсаторните механизми чрез екстрапинеален синтез на мелатонин изглеждат ключови за поддържането на физиологичната хомеостаза при животни на средна възраст, докато при стари плъхове, липсата на хормоналната функция на мелатонина не оказва допълнително утежняващ

ефект върху двигателната активност, тъй-като неговия дефицит е нормално състояние на този възрастов етап.

3. Ефекти на стареенето и мелатониновия дефицит върху поведението на тревожност и опосредстващите го механизми

Резултатите ни показаха, че стареенето при плъхове води до съществени поведенчески и неврохимични промени свързани с нарастване на тревожността и повишени плазмени нива на кортикостерона, който е основен индикатор за активността на НРА оста и хомеостазата на стреса. Данните ни са в подкрепа на хипотезата, че с напредване на възрастта се увеличава уязвимостта към стресови фактори, които нарушават не само хормоналния баланс, но и поведенческите реакции (Lupien et al., 2009; McEwen, 2007).

В нашето изследване използвахме два показателя за активност в ЕРМ — брой влизания и дължина на траекторията, които се възприемат за адекватни за оценка на моторната активност (Boguszewski and Zagrodzka, 2002). Възрастовото увеличение на тревожността бе потвърдено и чрез допълнителни тестове за отчитане на поведение на тревожност. В настоящото проучване установихме, че възрастните плъхове проявяват засилени тревожни реакции, съпроводени с повишени плазмени нива на кортикостерон. Тези резултати са в потвърждение на предходни данни за повишена тревожност и хормонален дисбаланс при стари плъхове (Boguszewski and Zagrodzka, 2002; Meyza et al., 2011; Torras-Garcia et al., 2005), но контрастират с други изследвания (Sudakov et al., 2021). Например, Судаков и сътр. (Sudakov et al., 2021) предполагат, че емоционалните промени започват още при 5-месечни плъхове. Тъй-като тези автори също използват в изследванията си Wistar плъхове, различията в резултатите са по-скоро свързани с условията, при които са провеждани експериментите, включително периода на опита, прилагането и продължителността на хабикуиране преди опита, сезона и т.н. Нашите данни потвърждават, че активността на НРА оста е запазена при старите животни — подобно на наблюденията на (Sapolsky, 1992) и (Scaccianoce et al., 1990). Отчетените нарушения в експресията на Hsp 70 и Hsp 90 при 18-месечните шам плъхове, които се считат за маркери на стареенето, също може да се предположи, че имат участие в механизма опосредстващ емоционалната дисфункция при стареене (Heydari et al., 1994; Pahlavani et al., 1995). Нашите резултати са в съответствие с тези наблюдения, като потвърждаваме свързания с възрастта спад в тези протеини във фронтална кора (Heydari et al., 2000; Tchekalarova et al., 2022b), но не и в хипокампа.



Премахването на епифизната жлеза, основния източник на циркулиращ мелатонин, предизвиква парадоксално намаляване на тревожността при млади половозрели и стари плъхове, но не и при тези на средна възраст. Това подчертава възрастово-специфичен характер на ефектите на мелатонина. Намалената тревожност при млади половозрели и стари плъхове след пинеалектомия беше съпътствана от повишена импулсивност и хиперактивност, което може да е резултат от дезинхибирано поведение, свързано с нарушена невроендокринна регулация.

Трябва да имаме предвид, че като се говори за „мелатонинов дефицит“ свързан с отстраняване на епифизата се има предвид липса на мелатонин в кръвта и съответно ролята му на хормон, който координира и синхронизира функциите в клетките с цикъла светло/тъмно. На практика, синтезирания мелатонин от екстрапинеални източници на мелатонин – мозък, черва, кожа могат частично да компенсират липсата му вследствие пинеалектомия (Tan et al., 2007, 1999; Tricoire et al., 2002).

При плъховете на средна възраст с пинеалектомия не бяха отчетени промени в нивото на тревожност и активността на НРА оста, но бе установено понижено ниво на Hsp70 във фронтална кора. Това предполага наличието на компенсаторни механизми на клетъчно ниво, чрез които тези животни запазват емоционалната си стабилност.

Особено забележително е, че при старите плъхове пинеалектомията предизвиква значително намаляване на тревожността. Това се свързва с хипоактивност на НРА оста и съответно намален синтез на стресовия хормон кортикостерон, който е под контрола на гландотропния АСТН (Pierpaoli and Bulian, 2005b). Това хормонално нарушение обяснява и наблюдаваната намаленатревожност. Този феномен предполага, че промени в регулацията на НРА оста могат да бъдат основен механизъм, обуславящ поведението при мелатонинов дефицит при възрастни животни.

Въпреки че Pierpaoli и Bulian (2005) предполагат, че след 14 месеца епифизната жлеза вече не участва в регулирането на стареенето, нашите данни показват, че нейната роля продължава да е значима, особено по отношение на поведенческите прояви. За разлика от техните резултати при мишки, изследванията ни върху плъхове с мелатонинов дефицит показаха отчетлива промяна в тревожността, което подсказва, че пинеалектомията при плъхове може да има по-различна възрастова динамика. Възрастовите различия в ефектите от пинеалектомията подчертават важността на компенсаторните механизми, включително екстрапинеалния мелатонин, и налагат по-

нататъшни изследвания върху ролята им в стареенето и поддържането на циркадната хомеостаза.

4. Ефекти на стареенето и мелатониновия дефицит и опосредстващите ги механизми върху когнитивните функции и паметта на плъхове в различни възрастови периоди

Процесът на стареене се характеризира със спад в когнитивните функции и структурна деградация на невронните мрежи. Този процес засяга ключови мозъчни структури, като хипокампа – критична зона за процесите на формиране и консолидиране на паметта (Bettio et al., 2017). Хипокампът играе централна роля запространствената ориентация, която се нарушава значително при прогресията на невродегенеративни заболявания като БА. Възрастово-зависимият спад в паметта, зависещ от хипокампа, се наблюдава при различни животински видове, което подчертава биологичното и еволюционно значение на този феномен (Leal and Yassa, 2015). Разбирането на механизмите и факторите, които водят до когнитивен спад с напредване на възрастта – особено в контекста на паметта – е от съществено значение за разработване на ефективни стратегии за насърчаване на здравословно стареене. Проучвания при плъхове показват, че подобно на хората, гризачите също претърпяват когнитивни изменения с възрастта (Foster, 2012). В настоящото изследване използвахме серия от поведенчески тестове, за да оценим ефекта на стареене върху работната, краткосрочната пространствена памет и паметта за разпознаване в различни възрастови групи. Потвърдихме предишни резултати (Gerrard et al., 2008; Scali et al., 1997; Smith et al., 2018), които демонстрират намалена способност за заучаване при стари плъхове в рамките на 5-дневно обучение с теста RAM.

За оценка на работната памет и зависимата от хипокампа краткосрочна пространствена памет бяха използвани тестовите Y-maze и RAM, докато паметта за разпознаване беше оценена чрез теста за разпознаване на обекти. Фактори като оксидативен стрес, възпалителни процеси и промени в нивата на невротрансмитери, които са коморбидни на стареенето са предполага, че имат основен принос за когнитивния спад (Singh et al., 2022). В нашето проучване, установихме, че при плъхове на средна възраст се наблюдават значителни дефицити в паметта спрямо младите, което противоречи на предходни твърдения, според които подобни дефицити възникват едва в напреднала възраст (над 18 месеца при плъхове). Интересно е, че Stone и сътр. (Stone et al., 1997) също съобщават за намалени поведенчески отговори в Y-maze при 14-месечни Wistar плъхове, което е свързано с по-късни нарушения в паметта.



Ние установихме, че при 14-месечни плъхове има намален капацитет за изпълнение на задачи свързани с работната и краткосрочна пространствена памет, но не и при паметта за разпознаване. Оксидативният стрес, резултат от дисбаланс между производството на ROS и антиоксидантната защитна система на клетките, е тясно свързан с възрастовия когнитивен спад. Предишни наши изследвания показаха, че нивата на оксидативен стрес в хипокампа се увеличават с възрастта (Tchekalarova et al., 2022b), което може да наруши клетъчните процеси, включително транспорта на BDNF, ускорявайки по този начин невроналната дегенерация (Shekari and Fahnestock, 2019).

Сигналните молекули BDNF, ERK1/2 и CREB играят ключова роля за оцеляването и функционирането на невроните в хипокампа (Zheng et al., 2012). Те участват в процеси като невронален растеж, синаптична пластичност и невропротекция. Стареенето е свързано с намалена експресия и активност на тези молекули. Транспортът на BDNF до таргетни неврони е от решаващо значение за поддържането на хипокампалната функция. Намалените му нива могат да доведат до редуцирана активация на ERK1/2 и CREB, което допълнително уврежда когнитивните функции (Colucci-D'Amato et al., 2020; Schirò et al., 2022). При 18-месечни плъхове, поведенческите дефицити корелират със спад в експресията на BDNF, TrkB, ERK1/2 и pERK1/2 в определени региони на хипокампа. Подобни промени се наблюдават и при животните на средна възраст като редуцирана експресия на BDNF в CA2, TrkB в CA1 и CA3, както и pERK1/2 в GrDG, PoDG и CA3. Това предполага, че молекулните изменения започват по-рано, отколкото се е предполагало досега.

Понижена експресия на CREB в хипокампа с възрастта е наблюдавана и от други изследователи (Countryman and Gold, 2007; Morris and Gold, 2012). В настоящото изследване отчетохме редуцирано съотношение pCREB/CREB във фронтална кора на възрастни плъхове, в съответствие с резултатите на Bartolotti и сътр. (Bartolotti et al., 2016), които свързват намалената CREB-активност с БА, ПБ и други възрастово-обусловени когнитивни разстройства. Интересно е, че тези изменения не се дължат на редукция в броя на невроните или груби морфологични увреждания (Gallagher, 2003; Rasmussen et al., 1996), а по-скоро на фактори като нарушения в сигналните пътища, епигенетични и промени в клетъчната микросреда.

В заключение, бе установена корелация между промените в когнитивните функции и експресията на BDNF, TrkB, ERK1/2, pERK1/2 и съотношението pCREB/CREB в специфични региони на хипокампа в различни възрастови периоди, с което се подчертава

важната роля на тези сигнални пътища в процесите на паметта през различните етапи на стареене.

Нашите резултати показват, че пинеалектомията нарушава работната памет, краткосрочната памет за разпознаване и пространствената памет при млади плъхове и плъхове на средна възраст, но не оказва влияние върху старите плъхове, при които хормоналната функция на мелатонин е вече нарушена. Когнитивния дефицит вследствие пинеалектомия при 3- и 14-месечни плъхове беше свързан с понижена експресия на молекули, участващи в пластични промени в хипокампа, които играят ключова роля в обработката на паметта, включително BDNF/ERK1/2/CREB сигнален път. Тези резултати са в съответствие с нашите предишни съобщения (Tchekalarova et al., 2024, 2022a) и с изследванията на Pierpaoli и Bulian (Pierpaoli and Bulian, 2001), подкрепяйки важността на епифизната жлеза във физиологичните процеси и нейното потенциално участие в механизми, свързани със стареенето.

В съответствие с Pierpaoli (Pierpaoli, 1994a, 1991b; Pierpaoli and Bulian, 2001), нашите предишни и настоящи изследвания предполагат съществени функции на епифизната жлеза в нормалните физиологични процеси не само при младите, но и при плъхове на средна възраст. Установено е, че хормонът мелатонин стимулира експресията на BDNF/TrkB, която сигнална система потенцира неврогенезата чрез пътищата MAPK/ERK1/2, PI3K/Akt и PLC- γ (Chu et al., 2016; Ramírez-Rodríguez et al., 2012; Romero et al., 2023; Yu et al., 2017). Този механизъм лежи в основата на неврозащитните и когнитивни ефекти на мелатонина. Съществени ефекти на хормона върху неврогенезата са демонстрирани както в клетъчни култури (Leung et al., 2020), така и в животински модели (Ramírez-Rodríguez et al., 2009), докато дефицитът на мелатонин, свързан с пинеалектомия, намалява неврогенезата (Rennie et al., 2009). Допълнително, третирането с мелатонин възстановява неврогенезата и нарушената пространствена памет при стари мишки (Ramírez-Rodríguez et al., 2012; Yoo et al., 2012).

В настоящото изследване, старите плъхове с пинеалектомия не показват различия в когнитивните резултати в сравнение с контролите, което може да се обясни с вече намалената роля на мелатонина в стареенето (Martín Giménez et al., 2022). Сecon и сътр. (Secon et al., 2018) показват, че мелатонинът може да повлияе сигналния път, свързан с формирането на паметта чрез взаимодействието си с множество други молекулни пътища. Някои изследвания показват, че епифизата може да регулира паметта и ученето чрез съня и циркадианните ритми (De Butte et al., 2002; Zisapel, 2018). Това предполага,



че жлезата влияе на консолидацията на паметта по време на сън и регулирането на циркадианни ритми, които от своя страна могат да повлияят когнитивните процеси.

В нашите проучвания не сме отчитали дали прилагането мелатонин би компенсирало паметовите нарушения наблюдавани при мелатонинов дефицит при млади плъхове и такива на средна възраст, което е ограничение на настоящото изследване. Можем да спекулираме, че третирането с хормона може да има благоприятен ефект в тази парадигма, както е докладвано и в други изследвания (Sumsuzzman et al., 2021; Tzoneva et al., 2021). Нашите резултати са в съгласие с предишни съобщения, които показват, че пинеалектомията нарушава когнитивната функция при младите половозрели плъхове (Karakaş et al., 2011). В друг модел на дефицит на мелатонин при животни на същата възраст, изложени на постоянно осветление, нашият екип установява намалена експресия на BDNF в хипокампа (Tchekalarova et al., 2020). Мозъчния невротрофичен фактор е свързан с цикъла сън/бодърстване (Zhang et al., 2013). Един от механизмите, чрез които мелатонинът може да упражнява своите благоприятни ефекти върху когнитивната функция, се състои в неговото влияние върху съня и потенциалната му способност да модулира нивата на BDNF (Zhang et al., 2013). Чрез стимулиране на сън и увеличаване на експресията или активността на BDNF, мелатонинът може да подобри синаптичната пластичност и когнитивното представяне (Zakaria et al., 2016). Мелатонинът, чрез MT1 рецептора, може да активира вътреклетъчни каскади, включително пътя ERK (Shin et al., 2015). Този път води до фосфорилиране и активиране на CREB, което насърчава експресията на BDNF. Така, MT1-ERK-CREB-BDNF сигналният път е механизъм, чрез който мелатонинът посредничи в процесите на запаметяване.

Интересно е, че установихме, че плъхове на средна възраст с пинеалектомия имат увеличена експресия на ERK 1/2 и неговата фосфорилирана форма в някои региони на хипокампа, включително GrDG и полета CA3c и CA3b, в сравнение със съответните шам групи. Тези промени не съвпадат с дефицитите в паметта, наблюдавани при тази възрастова група, което предполага, че тези региони не са критични за когнитивните промени при тази възрастова група с мелатонинов дефицит. Може да се спекулира, че тези промени са резултат от адаптивен механизъм, който не се наблюдава при младите половозрели плъхове с пинеалектомия, но са необходими бъдещи изследвания, за да се докаже това предположение. Pierpaoli и Bulian (Pierpaoli and Bulian, 2005a) съобщават, че

пинеалектомията при 14-месечни мишки удължава техния живот и намалява експресията на някои кръвни маркери на стареенето, което предполага, че пинеалектомията в този възрастов период може да забави стареенето. Въпреки това, нашето изследване потвърди, че ролята на мелатонина като хормон в процеса на стареене е комплексна и продължава да влияе върху функциите, свързани с този физиологичен процес при плъхове на средна възраст.

5. Заключение

Настоящото изследване подчертава съществената роля на мелатонина и епифизната жлеза в регулацията на физиологичните процеси, свързани със стареенето. Резултатите показват, че дефицитът на мелатонин, предизвикан чрез пинеалектомия, води до свързани с възрастта поведенчески и физиологични промени. При младите и старите плъхове се наблюдават значителни ефекти – включително промени в двигателната активност, повишена тревожност и когнитивни дефицити. За разлика от тях, плъховете на средна възраст показват относителна устойчивост към мелатониновия дефицит, вероятно поради наличието на компенсаторни механизми, като екстрапинеалния синтез на мелатонин.

Проучването разкрива сложното взаимодействие между стареенето, мелатониновия дефицит и регулацията на тревожността. Подчертава се ключовата роля HPA оста и Hsp-протеините в адаптацията към стресови фактори. Старееето е свързано с повишени нива на тревожност и базален кортикостерон, докато пинеалектомията води до парадоксално намаляване на тревожността при млади и стари индивиди – вероятно чрез модулиране на инхибиторни механизми. Тези наблюдения подчертават необходимостта от възрастово-специфичен подход при изследване на поведенческите и ендокринните адаптационни механизми.

Освен това, данните в дисертационния труд насочват вниманието към участието на молекулярни пътища като BDNF/ERK/CREB, които са от ключово значение за невропластичността, паметта и ученето. Мелатонинът, чрез своето въздействие върху тези сигнални каскади, може да повлияе благоприятно наблюдаваните когнитивни дефицити при стареене. Макар настоящото изследване да не включва прилагане на екзогенен мелатонин, предишни проучвания показват, че той може да възстанови когнитивната функция и паметта при възрастови увреждания.



Нашите резултати също така показват, че пинеалектомията води до промени в стресовия отговор чрез нарушаване на НРА оста, което води до хормонални и поведенчески изменения, особено при възрастните животни.

Необходими са допълнителни изследвания за потвърждаване на механизмите, включително MT1-рецептор-зависимата активация на BDNF/ERK/CREB пътя, както и за по-задълбочено разбиране на компенсаторните процеси, участващи в поддържането на поведенческата и физиологичната хомеостаза при плъхове на средна възраст. Перспективата за използване на екзогенен мелатонин като терапевтична стратегия за подобряване на когнитивните функции и редуциране на тревожността при стареене представлява обещаваща посока за бъдещи изследвания.

6. Ограничения на изследването

Дефицитът на мелатонин, предизвикан чрез пинеалектомия, може да повлияе различни физиологични процеси не само чрез намаляване на BDNF посредством MT рецепторите (Secon et al., 2018), но и чрез други нерелевантни механизми (Amini et al., 2021). Пътят BDNF/ERK/CREB участва в паметовите процеси и може да бъде активиран и от други молекули или състояния (Kim et al., 2023; Pak et al., 2022; Smith et al., 2018; Yan et al., 2020). Въпреки че този път е универсален за когнитивната функция, мелатонинът го активира специфично чрез MT1-рецептор-зависим механизъм. Нашите данни показват, че този механизъм е възрастово зависим и особено важен при млади половозрели и плъхове на средна възраст. Необходими са допълнителни експерименти с антагонисти на MT1 рецепторите за потвърждаване на този механизъм и преодоляване на ограниченията на настоящото изследване.

VI. ИЗВОДИ

1. Премахването на епифизната жлеза и последващият дефицит на мелатонин не оказват съществено влияние върху продължителността на живота при различни възрастови групи. Това предполага, че мелатонинът няма решаващо значение за дълголетие при плъхове и че неговата роля в процеса на стареене е по-скоро функционална, отколкото свързана с продължителността на живота.
2. Мелатониновият дефицит води до понижена тревожност и импулсивен тип поведение при млади половозрели и стари животни, но не оказва влияние върху плъховете на средна възраст. Това подчертава ролята на мелатонина в модулирането на емоционалния отговор чрез възрастово зависими невробиологични механизми. При възрастни плъхове емоционалните нарушения след пинеалектомия се свързват с трайно повишени нива на кортикостерон.
3. Пинеалектомията води до понижена експресия на Hsp70 във фронтална кора, но не и в хипокамп при плъхове на средна възраст, което свидетелства за регионален и специфичен за възрастта клетъчният отговор към мелатонинов дефицит. Липсата на пряка корелация между нивата на Hsp70/Hsp90 и поведенческите промени предполага участието и на други фактори в регулацията на емоционалното поведение при мелатонинов дефицит в различни възрастови периоди.
4. Нарушенията в краткосрочната пространствена памет при млади и на средна възраст плъхове с мелатонинов дефицит се свързват с потисната експресия на BDNF/ERK1/2/CREB сигналния път в хипокампа. Това подчертава значението на мелатонина за поддържане на когнитивната функция и посочва възможен молекулярен механизъм за свързаните с възрастта когнитивни нарушения.
5. Отстраняването на епифизната жлеза ускорява стареенето при млади половозрели и при плъхове на средна възраст по отношение на маркерите, свързани с когнитивните функции, докато при старите животни не се наблюдава допълнителен ефект. Това подкрепя хипотезата за възрастово-зависимо намаляване на функционалната роля на мелатонина в процесите на стареене.



VII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Оригинални приноси

- 1.1. За пръв път бяха установени възрастово-зависими поведенчески ефекти на мелатонинов дефицит, проявяващи се като понижена тревожност при млади и стари половозрели плъхове, но не и при животни на средна възраст. Това разкрива, че има критични възрастови периоди за мелатониновата регулация на емоционалното поведение.
- 1.2. Установен бе регионално- и възрастово-специфичен модел на експресия на шапероновите белтъци Hsp70 и Hsp90 при мелатонинов дефицит, с изразена редукция само във фронталната кора при плъхове на средна възраст. Резултатите допринасят за ново разбиране на клетъчния стресов отговор при стареене и хормонален дефицит.
- 1.3. Идентифициран бе специфичен молекулен механизъм за когнитивно увреждане при мелатонинов дефицит, включващ намалена експресия на компоненти от сигналния път BDNF/ERK1/2/CREB в хипокампа. Това подкрепя ролята на мелатонина като регулатор на невропластичността и паметовите процеси.
- 1.4. Пинеалектомията ускорява стареенето при плъхове от всички възрасти, като най-силно засегнати са младите половозрели. При плъховете на средна възраст се активират компенсаторни механизми с вероятно извънепифизен произход, а при най-старите епифизата вече няма съществена физиологична роля.
- 1.5. Мелатониновият дефицит не оказва влияние върху продължителността на живота при различни възрастови групи плъхове, въпреки наблюдаваните поведенчески и молекулярни промени, което подчертава сложната и мултифакторна природа на стареенето.

2. Потвърждаващи приноси

- 2.1. Потвърдено бе ясно изразено понижение в спонтанната двигателна активност с напредване на възрастта, особено по време на активната (тъмна) фаза при ноктурните плъхове.
- 2.2. Потвърдено бе, че възрастните животни се характеризират с повишени нива на тревожност, което корелира с увеличени плазмени концентрации на кортикостерон — показател за хиперактивност на оста НРА и нарушена ефективност на механизма за обратна връзка.
- 2.3. Потвърдено бе значително влошаване на когнитивните функции, включително работната и пространствената памет с напредване на възрастта.
- 2.4. Потвърдено бе ускоряване на процесите на стареене при млади половозрели плъхове в резултат на мелатонинов дефицит, индуциран чрез пинеалектомия.



VIII. СПИСЪК НА НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, ЦИТИРАНИЯ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПРОЕКТИ:

1. Договор № КП-06-Н-41/4, 30.11. 2020 с ФНИ, по проект на тема: Проучване влиянието на мелатониновия дефицит върху някои механизми на стареене при експериментален модел
2. Договор № КП-06 ПН63/2 с ФНИ, по проект на тема: Неврофармакологични проучвания на новосинтезирани сулфанил хидразони и мелатонинови производни с холинестеразна инхибиторна активност при модели на болест на Алцхаймер и мелатонинов дефицит
3. Договор КП-06-Н61/12, по проект на тема: Проучване ролята на неврогенезата в модулаторното повлияване на консолидацията в хипокампа от норадренергичната медиация в норма и патология: нови терапевтични подходи
4. Договор РМС №455/27.06.2024 с МОН, по проект на тема: НП Образование с наука - "Физиология на животните и човека-от теорията до експеримента"
5. Договор КП-06-М63/1, 13.12.2023г. по проект на тема: Полово-зависими проучвания при модели с пренатални въздействия: терапевтични ефекти

ПУБЛИКАЦИИ:

1. Tchekalarova, J, Krushovlieva, D, Ivanova, P, Nenčovska, Z, Toteva, G, Atanasova, M. The role of melatonin deficiency induced by pinealectomy on motor activity and anxiety responses in young adult, middle-aged and old rats.. Behav Brain Funct, 20, Springer, 2024, DOI:<https://doi.org/10.1186/s12993-024-00229-y>, 3. SJR (Scopus):0.91, JCR-IF (Web of Science):5.1
2. Krushovlieva D., Georgiev S, Ivanova P., Nenčovska Z., Stoyanova T, Tchekalarova J. Age-dependent effect of melatonin deficit on behavioral responses: the impact of Hsp70 and Hsp90 in the frontal cortex. Acta Morphologica et Anthropologica, November 2022, 29 (3-4), Prof. Marin Drinov Publishing House, 2022, ISSN:ISSN 1311-8773 (print) ISSN 2535-0811 (online), DOI:10.7546/AMA.29.3-4.2022.08, 49-52

УЧАСТИЯ С УСТНИ ДОКЛАДИ В НАЦИОНАЛНИ, НАЦИОНАЛНИ С
МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ И МЕЖДУНАРОДНИ ФОРУМИ:

1. Трети интердисциплинарен докторантски форум 6-7 юни 22г. , гр. Кюстендил, Десислава Крушовлиева, Симеон Георгиев, Петя Иванова, Златина Петкова, Цвета Стоянова, Яна Чекаларова. „ Възраст-зависими промени в поведенческите реакции при модел на мелатонинов дефицит у плъхове“
Доклад
2. Национална научна конференция на Институт по невробиология 12-13.12.2024, Десислава Крушовлиева. „ Изследване на процеси на стареенето и ролята на мелатониновия дефицит върху механизми свързани с когнитивните промени“. Доклад
3. VIII national conference with international participation “Morphological Days” , june 10-12, 2022, Sofia, Bulgaria , Desislava Krushovlieva. “Age-dependent effect of melatonin deficit on behavioral responses: The Impact of Hsp70 and Hsp90 in the Frontal Cortex.”
Доклад
4. International Conference Of The Bulgarian Society Of Physiological Sciences, 30 October-1 November 2022, Stara Zagora Mineral Springs, Desislava Krushovlieva. “Study Of Age-Dependent Effect Of Melatonin Deficiency On Behavior: The Role Of Chaperone Proteins And Oxidative Stress.”
Доклад
5. Конференция с международно участие 4th Interdisciplinary PhD Forum with International Participation 16 – 19 May 2023 Sandanski, Bulgaria, “Spontaneously hypertensive rats versus Wistar Kyoto and Wistar rats: an assessment of the impact of anxiety and motor activity on cognitive performance.”
Доклад



БЛАГОДАРНОСТИ:

- *Искам да изразя своята най-дълбока и искрена благодарност към моя научен ръководител проф. д-р Яна Чекаларова за неоценимата ѝ подкрепа, търпение и всеотдайност, които прояви през целия процес на разработване на настоящата дисертация. Нейните задълбочени познания, професионализъм и ценни научни напътствия изиграха ключова роля както в изясняването на концептуалната рамка на изследването, така и в структурирането и прецизирането на съдържанието. С благодарност си спомням за нейната постоянна ангажираност и насърчаващото ѝ отношение, които ми помогнаха да преодолея редица трудности и съмнения по време на изследователския процес.*
- *Изказвам сърдечна благодарност и на проф. Димитринка Атанасова за любезното ѝ съдействие и ценното ѝ участие в извършването на имунохистохимичните изследвания, които бяха съществена част от емпиричната работа по дисертацията. Нейният професионален опит, методологическа прецизност и готовност за сътрудничество значително допринесоха за качеството и достоверността на получените резултати.*
- *Изказвам своята дълбока благодарност към целия екип от ИНБ-БАН, с който имах удоволствието да работя по експерименталната част на настоящата дисертация. Без вашата подкрепа, професионализъм и отдаденост този труд не би бил възможен. Благодаря на колегите, които активно участваха в планирането, провеждането и анализа на експериментите. Вашият опит, критично мислене и готовност за сътрудничество бяха от изключителна важност за постигането на резултатите. Не на последно място, благодаря и на всички технически сътрудници и помощен персонал, които се погрижиха за безпроблемното протичане на лабораторната работа. Работата с вас беше истинско удоволствие и вдъхновение.*

STUDYING THE EFFECT OF MELATONIN DEFICIENCY ON CERTAIN AGING MECHANISMS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PINEALECTOMY

/PhD Thesis/

DEISLAVA ZDRAVKIVA KRUSHOVLIEVA

Institute of neurobiology, Bulgarian Academy of Science

SUMMARY:

Aging is a complex and multifaceted biological process characterized by a gradual loss of cellular function and increased vulnerability to a variety of chronic diseases. One of the key factors involved in synchronizing the biological rhythms of intracellular and physiological processes with the light/dark cycle is **melatonin**, a hormone secreted by the pineal gland. Melatonin plays a critical role not only in regulating circadian rhythms and sleep but also functions as a powerful endogenous antioxidant and a modulator of the immune system. With advancing age, melatonin production declines, contributing to many age-related physiological changes and increasing the predisposition to various pathological conditions.

The use of an experimental model of **pinealectomy**—surgical removal of the pineal gland—offers a unique opportunity to systematically investigate the effects of melatonin deficiency on biological mechanisms associated with aging. This model allows for the analysis of melatonin deficiency's impact on oxidative stress, cell signaling, and the structural and functional integrity of various tissues.

Aging significantly affects all organs and systems, including the central nervous system. With age, notable changes occur in cognitive functions such as memory, attention, learning, and executive abilities. Simultaneously, emotional vulnerability increases, manifesting as heightened anxiety, depressive states, and impaired adaptation to stress. Although often regarded as a natural part of aging, the mechanisms underlying these changes are not yet fully understood.

This dissertation aims to provide deeper insight into the effects of melatonin deficiency at different ages on emotional and cognitive functions in rats, as well as the mechanisms underlying the observed changes. The findings are expected to have translational significance, clarifying the role of melatonin across three life stages—youth, middle age, and old age—and



contributing to the development of therapeutic strategies to delay the aging process. The study employs behavioral tests to assess anxiety and cognitive performance, including working memory, short-term recognition, and spatial memory.

Simultaneously, biochemical and molecular markers related to stress response and neuroplasticity are examined, with a specific focus on the **hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis** and the expression of heat shock proteins **HSP70** and **HSP90** in key brain regions such as the frontal cortex and hippocampus. Furthermore, the study analyzes the **BDNF/ERK1/2/CREB signaling pathway** in the hippocampus, which is involved in the regulation of synaptic plasticity, learning, and memory.

The results of the study demonstrate that melatonin deficiency causes significant disturbances in emotional and cognitive processes, with the degree and nature of these changes varying according to the age of the rats. Age-specific mechanisms through which melatonin deficiency affects brain function have been identified, opening new avenues for the development of targeted therapeutic interventions. These findings highlight the importance of early diagnosis and timely treatment of melatonin imbalance and offer new perspectives for preventing age-related emotional and cognitive disorders.