



**Uniwersytet  
Gdański**

**Wydział Biologii**  
Uniwersytetu Gdańskiego

*mgr Joanna Dunacka*

Wpływ różnic w aktywności lokomotorycznej  
i reaktywności stresowej u szczurów na  
rozwój zaburzeń kognitywnych i depresyjnych  
oraz efektywność terapii z użyciem  
insulinopodobnego czynnika wzrostu-1  
w streptozotocynowym modelu choroby  
Alzheimera

The impact of differences in locomotor activity and  
stress reactivity in rats on the development of cognitive  
and depressive-like disorders and the effectiveness of  
therapy using insulin-like growth factor-1 in  
a streptozotocin model of Alzheimer's disease

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: dr hab. Danuta Lewandowska, prof. UG  
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka

GDAŃSK 2026

Pragnę serdecznie podziękować  
Pani Promotor **dr hab. Danucie Lewandowskiej, prof. UG**  
za okazaną cierpliwość, wszechstronną pomoc, cenne wskazówki,  
jak również za cały poświęcony czas.

Dziękuję również współautorom moich artykułów naukowych:  
**dr hab. Irenie Majkutewicz, dr Beacie Grembeckiej i mgr Grzegorzowi Świątkowi**  
za wspólną pracę.

Pragnę również podziękować moim przyjaciołom  
**dr Ewelinie Kurowskiej-Rucińskiej i dr Janowi Rucińskiemu**  
za wsparcie merytoryczne i życzliwość w czasie przygotowywania rozprawy.

Chciałam również podziękować za cenne wskazówki merytoryczne i techniczne  
**dr Witoldowi Żakowskiemu, mgr Oliwii Harackiewicz i mgr Aleksandrze Kubiak.**

## Spis treści

Spis najważniejszych skrótów.....	7
Streszczenie w języku polskim .....	8
Abstract in English.....	12
Forma rozprawy .....	16
1. Wstęp.....	17
1.1. Choroba Alzheimerera (AD).....	17
1.2. Zmiany behawioralne obserwowane w przebiegu choroby Alzheimerera (AD).....	18
1.3. Depresja jako choroba o podłożu zapalnym i stresowym .....	20
1.4. Zmiany histologiczne obserwowane w mózgu w przebiegu choroby Alzheimerera (AD) .....	24
1.5. Zmiany transmisji neuroprzekazników obserwowane w przebiegu choroby Alzheimerera (AD) .....	26
1.6. Zaburzenia sygnalizacji insulinowej w przebiegu choroby Alzheimerera .....	26
1.7. Neurozapalenie i zapalenie w przebiegu choroby Alzheimerera (AD) .....	28
1.8. Stres oksydacyjny w przebiegu choroby Alzheimerera (AD) .....	32
1.9. Inne przyczyny rozwoju choroby Alzheimerera (AD) .....	33
1.10. Modele zwierzęce choroby Alzheimerera (AD).....	36
1.11. Charakterystyka streptozotocyny-związku indukującego model sporadycznej postaci choroby Alzheimerera (sAD) .....	37
1.12. Charakterystyka behawioralna zwierząt a osobnicza wrażliwość na stres .....	39
1.13. Insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1) i rodzina białek IGF .....	42
1.14. Rola insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oraz jego wpływ na behavior.....	46
1.15. Cele i hipotezy pracy .....	49
2. Metodyka wyników nieopublikowanych.....	50
2.1. Zwierzęta.....	50
2.2. Test nowości .....	53
2.3. Test preferencji spożycia sacharozy (SPT) .....	53
2.4. Test uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM).....	54
2.5. Test labiryntu wodnego Morrisa (MWM).....	54
2.6. Rozdział zwierząt do poszczególnych grup eksperymentalnych .....	55
2.7. Indukcja modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimerera (sAD) oraz podanie związku terapeutycznego (IGF-1) .....	56
2.8. Pobór krwi przez punkcję serca .....	57
2.9. Oznaczenie stężenia interleukiny-6 (IL-6) oraz interleukiny-10 (IL-10) w osoczu .....	58
2.10. Oznaczenie stężenia kortykosteronu (KORT) w osoczu .....	58
2.11. Uśmiercenie zwierząt oraz pobranie tkanek i narządów .....	59
2.12. Określenie liczby aktywowanych komórek mikrogleju (CD68 <sup>+</sup> ) i złogów $\beta$ -amyloidu w mózgu .....	59
2.13. Analiza statystyczna .....	60
3. Wyniki.....	61
3.1. Wyniki opublikowane .....	61

3.1.1. Publikacja 1 .....	61
3.1.2. Publikacja 2 .....	91
3.1.3. Publikacja 3 .....	122
3.2. Wyniki nieopublikowane .....	154
3.2.1. Test preferencji sacharozy (SPT).....	154
3.2.1.1. Poziom anhedonii zmierzony w teście preferencji sacharozy (SPT) .....	154
3.2.2. Poziom lęku zmierzony w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM).....	155
3.2.2.1. Czas spędzony w ramionach otwartych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) .....	156
3.2.2.2. Czas spędzony w centrum uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) .....	158
3.2.2.3. Czas spędzony w ramionach zamkniętych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) .....	160
3.2.2.4. Liczba wejść do ramion otwartych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM).....	163
3.2.2.5. Liczba wejść do centrum uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM).....	164
3.2.2.6. Liczba wejść do ramion zamkniętych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) .....	165
3.2.2.7. Liczba mikcji i defekacji podczas badania poziomu lęku w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM).....	167
3.2.3. Poziom zaburzeń pamięci przestrzennej w teście labiryntu wodnego Morrisa (MWM) .....	169
3.2.3.1. Nabywanie referencyjnej pamięci przestrzennej (dni 1-3 MWM).....	169
3.2.3.1.1. Latencja dopłynięcia do platformy podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej (dni 1-3 MWM).....	169
3.2.3.1.2. Procent czasu spędzony w kwadrancie krytycznym podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej (dni 1-3 MWM).....	171
3.2.3.1.3. Przepłynięty całkowity dystans podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej (dni 1-3 MWM).....	173
3.2.3.2. Odtwarzanie referencyjnej pamięci przestrzennej-próba z usuniętą platformą (probe test, dzień 4 MWM) .....	175
3.2.3.2.1. Latencja dopłynięcia do miejsca, w którym powinna znajdować się platforma podczas odtwarzania referencyjnej pamięci przestrzennej-próba z usuniętą platformą (probe test, dzień 4 MWM) .....	175
3.2.3.2.2. Procent czasu spędzony w kwadrancie krytycznym podczas odtwarzania referencyjnej pamięci przestrzennej-próba z usuniętą platformą (probe test, 4 dzień MWM) .....	177
3.2.3.2.3. Całkowity dystans przepłynięty podczas odtwarzania referencyjnej pamięci przestrzennej-próba z usuniętą platformą (probe test, dzień 4 MWM) .....	178
3.2.3.3. Nabywanie roboczej pamięci przestrzennej (dni 5-8 MWM) .....	180
3.2.3.3.1. Latencja dopłynięcia do platformy podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej (dni 5-8 MWM).....	181
3.2.3.3.2. Procent czasu spędzony w kwadrancie krytycznym podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej .....	185
3.2.3.3.3. Całkowity dystans przepłynięty podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej .....	189
3.2.4. Poziom ośrodkowego zapalenia-liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68 <sup>+</sup> ) w różnych strukturach mózgu .....	193
3.2.4.1. Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68 <sup>+</sup> ) w hipokampie.....	193
3.2.4.2. Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68 <sup>+</sup> ) w jądrze połącącym (NAc) .....	196
3.2.4.3. Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68 <sup>+</sup> ) w korze przedczołowej (PFC).....	197
3.2.4.4. Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68 <sup>+</sup> ) w ciele modzelowatym (CC).....	197

3.2.4.5.Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68 <sup>+</sup> ) w jądrze przyśrodkowo-grzbietowym podwzgórza (DMH).....	198
3.2.5.Liczba złogów $\beta$ -amyloidu w ośrodkowym układzie nerwowym .....	198
3.2.5.1.Liczba złogów $\beta$ -amyloidu w hipokampie .....	198
3.2.5.2.Liczba złogów $\beta$ -amyloidu w jądrze półleżącym (NAc) .....	201
3.2.5.3.Liczba złogów $\beta$ -amyloidu w korze przedczołowej (PFC) .....	202
3.2.6.Aktywność obwodowego układu odpornościowego we wczesnej oraz późnej fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera .....	202
3.2.6.1.Bezwzględna liczba leukocytów i limfocytów we krwi.....	202
3.2.6.2.Bezwzględna liczba monocytów i granulocytów we krwi .....	205
3.2.6.3.Procentowy udział limfocytów, monocytów i granulocytów we krwi.....	207
3.2.6.4.Stężenie pro-zapalnej interleukiny-6 (IL-6) oraz przeciwzapalnej interleukiny-10 (IL-10) w osoczu .....	208
3.2.7.Poziom aktywacji osi podwzgórzowo-przysadko-nadnerczowej (HPA)-stężenie kortykosteronu w osoczu.....	210
3.2.8.Parametry hematologiczne.....	211
3.2.9.Wskaźniki masy śledziony i grasicy .....	215
4. Dyskusja .....	216
4.1. Zmiany behawioralne związane z zaburzeniami pamięci przestrzennej oraz zaburzeniami lękowymi/depresyjnymi w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) .....	216
4.2. Zmiany behawioralne związane z zaburzeniami pamięci przestrzennej oraz zaburzeniami lękowymi/depresyjnymi po zastosowaniu terapii z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) .....	220
4.3. Zmiany związane z odkładaniem złogów $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) i poziomem neurozapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) .....	223
4.4. Zmiany związane z odkładaniem złogów $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) i poziomem neurozapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) po zastosowaniu terapii z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) .....	224
4.5. Zmiany obwodowe związane z markerami zapalenia i wskaźnikami hematologicznymi w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) .....	230
4.6. Zmiany obwodowe związane z markerami zapalenia i wskaźnikami hematologicznymi po zastosowaniu terapii z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) .....	231
5. Podsumowanie i wnioski .....	237
6. Ograniczenia badań .....	240
7. Piśmiennictwo .....	241
8. Oświadczenia współautorów .....	256
8.1. Oświadczenia do Publikacji 1 .....	256
8.2. Oświadczenia do Publikacji 2 .....	260
8.3. Oświadczenia do Publikacji 3 .....	265

## Spis najważniejszych skrótów

<b>Ach</b> -acetylocholina	<b>IL-1/IL-1<math>\beta</math></b> -interleukina-1/-1 $\beta$
<b>AChe</b> -esteraza acetylocholinowa	<b>IL-6</b> -interleukina-6
<b>ACTH</b> -hormon adrenokortykotropowy	<b>IL-8</b> -interleukina-8
<b>AD</b> -choroba Alzheimera	<b>IL-10</b> -interleukina-10
<b>ALS</b> -kwasolabilna podjednostka	<b>IR</b> -receptor dla insuliny
<b>APP</b> -białko prekursorowe amyloidu	<b>IRA/IRB</b> -podjednostki A ora B receptora dla insuliny
<b>ATP</b> -adenozynotrifosforan	<b>KORT</b> -kortykosteron
<b>BBB</b> -bariera krew-mózg	<b>LEU</b> -leukocyty
<b>BDNF</b> -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego	<b>LIM</b> -limfocyty
<b>BrdU</b> -bromodeoksyurydyna-marker nowopowstałych neuronów	<b>LR</b> -osobniki niskoaktywne ruchowo
<b>BSA</b> -albumina surowicy bydłowej	<b>LDP</b> -długotrwałe osłabienie synaptyczne
<b>BWF</b> -bardzo wczesna faza choroby Alzheimera	<b>LTP</b> -długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
<b><math>\beta</math>A-<math>\beta</math></b> -amyloid	<b>M1</b> -aktywowany mikroglej pro-zapalny
<b>CA1/CA2/CA3</b> -pierwszy/drugi/trzeci fragment hipokampa	<b>M2</b> -aktywowany mikroglej przeciwzapalny
<b>CC</b> -ciało modzelowate	<b>MCH</b> -średnia masa hemoglobiny
<b>CD68<sup>+</sup></b> -marker komórek aktywowanego mikrogleju	<b>MCHC</b> -średnie stężenie hemoglobiny
<b>ChAT</b> -acetylotransferaza cholinowa	<b>MCV</b> -średnia objętość krwinki
<b>DG</b> -zakręt zębaty hipokampa	<b>MON</b> -monocyty
<b>DMH</b> -jądro przysiodkowo-grzbietowe podwzgórza	<b>MPV</b> -średnia objętość płytki krwi
<b>EPM</b> -uniesiony labirynt krzyżowy	<b>MWM</b> -labirynt wodny Morrisa
<b>fAD</b> -rodzinna postać choroby Alzheimera	<b>NAcC</b> -rdzeń jądra półleżącego
<b>GLUT (1-4)</b> -transportery glukozy (1-4)	<b>NAcS</b> -część brzeźna jądra półleżącego
<b>GRA</b> -granulocyty	<b>NFT</b> -spłątki neurofibrylarne
<b>HCT</b> -hematokryt	<b>NK</b> -komórki NK
<b>HGB</b> -zawartość hemoglobiny w czerwonej krwi	<b>OF</b> -test jasno oświetlonego otwartego pola
<b>HPA</b> -oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa	<b>OUN</b> -ośrodkowy układ nerwowy
<b>HR</b> -osobniki wysokoaktywne ruchowo	<b>PBS</b> -buforowany roztwór soli
<b>ICV</b> -podanie związku do komór bocznych mózgu	<b>PCT</b> -płytkokryt
<b>IDE</b> -enzym degradujący insulinę	<b>PFC</b> -kora przedczołowa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> -interferon- $\gamma$	<b>PLT</b> -płytki krwi
<b>IGF-1</b> -insulinopodobny czynnik wzrostu-1	<b>PW</b> -późna faza choroby Alzheimera
<b>IGF-2</b> -insulinopodobny czynnik wzrostu-2	<b>RBC</b> -czerwone krwinki
<b>IGF-1R</b> -receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu-1	<b>RDW</b> -rozkład objętości czerwonych krwinek
<b>IGF-2R</b> -receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu-2	<b>ROS</b> -reaktywne formy tlenu
<b>IGFBP (1-10)</b> -białka wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (1-10)	<b>sAD</b> -sporadyczna postać choroby Alzheimera
	<b>SAL</b> -fizjologiczny roztwór soli
	<b>SPT</b> -test preferencji spożycia sacharozy
	<b>STZ</b> -streptozotocyna
	<b>Tc</b> -limfocyty T cytotoksyczne
	<b>Th</b> -limfocyty T pomocnicze
	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> -czynnik martwicy nowotwory- $\alpha$
	<b>WF</b> -wczesna faza choroby Alzheimera
	<b>VEH</b> -bufor cytrynianowy

## Streszczenie w języku polskim

Choroba Alzheimera (AD) jest postępującym zaburzeniem neurodegeneracyjnym występującym w dwóch postaciach: rodzinnej (fAD) oraz sporadycznej (sAD). Postać fAD wywoływana jest przez mutacje w genach sprzyjających odkładaniu się  $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) w mózgu i diagnozowana jest tylko u 5% pacjentów z AD. Postać sAD dotyczy aż 95% wszystkich osób cierpiących na AD, a przyczyny występowania tej formy choroby są zróżnicowane i obejmują: kaskadę ( $\beta$ A), neurozapalenie, stres oksydacyjny, zaburzenia funkcjonowania szlaków insulinowych i dróg cholinergicznyc. W przebiegu AD obserwowane są liczne zmiany behawioralne tj. zaburzenia kognitywne, lękowe oraz depresyjne, które są następstwem akumulacji w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) dwóch patologicznych form białek: blaszek starczych (zbudowanych z  $\beta$ A) oraz splątków neurofibrylarnych (zbudowanych z hiperfosforylowanego białka tau). Zwierzęcym modelem sAD jest podanie streptozotocyny (STZ) do komór bocznych mózgu (ICV). W tym modelu choroby obserwuje się spadek metabolizmu glukozy, a to przyczynia się do rozwinięcia: insulinooporności, spadku liczby neuronów i zakłócenia procesu neurogenezy, zaburzenia funkcjonowania szlaków cholinergicznyc, obecności złogów  $\beta$ A, deficytów pamięci przestrzennej oraz wystąpienia zaburzeń depresyjnych/lękowych. Jedną z substancji przywracających fizjologiczne działanie szlaków insulinowych jest insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1). Neurotrofina ta poprzez regulację metabolizmu glukozy korzystnie wpływa na: neuroprotekcję, neurogenezę, neuroregenerację, wspieranie gleju, neuroplastyczność a także działa jako środek przeciwlękowy.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki są oparte na 3 artykułach naukowych (Dunacka i wsp., 2024; 2025a; 2025b) oraz części wyników nieopublikowanych. Eksperymenty przeprowadzone przeze mnie skupiały się na zbadaniu czy osobnicze różnice w reaktywności stresowej u szczurów mają wpływ na rozwój zaburzeń towarzyszących sAD (zaburzenia kognitywne/neuropsychiatryczne, aktywacja mikrogleju/akumulacja  $\beta$ A i obwodowe zapalenie) oraz na efektywność terapii z użyciem neurotrofiny IGF-1 podanej dokomorowo.

Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem samców szczurów Wistar Han niezróżnicowanych i zróżnicowanych pod względem poziomu aktywności lokomotorycznej/reaktywności stresowej (test nowości w warunkach bazalnych) na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) vs. niskoaktywne ruchowo (LR) (ogólna liczba N=72; w tym szczurów HR N=35; w tym szczurów LR N=35). W warunkach bazalnych (przed implantacją

kaniul i iniekcjami) określono poziom pamięci przestrzennej (test labiryntu wodnego Morrisa - MWM), zaburzeń lękowych (test uniesionego labiryntu krzyżowego - EPM i test jasno oświetlonego otwartego pola - OF) oraz poziom anhedonii - podstawowego wskaźnika zaburzeń depresyjnych (test preferencji sacharozy - SPT) u tych osobników. Następnie zaindukowano u zwierząt model sAD poprzez iniekcje ICV-STZ (3 mg/kg) lub wraz z indukcją choroby szczurom podawano także neurotrofinę ICV-IGF-1 (2 µg). Grupy kontrolne szczurów stworzono poprzez dokomorowe podanie buforu cytrynianowego (ICV-VEH, rozpuszczalnik STZ) oraz przez iniekcje fizjologicznego roztworu soli (ICV-SAL, rozpuszczalnik IGF-1). Na 3 etapach (bardzo wczesny etap od 7 dnia sAD, wczesny etap od 45 dnia sAD, późny etap od 90 dnia sAD) progresji sAD ponownie zmierzono poziom pamięci przestrzennej (test MWM), zaburzeń lękowych (testy EPM, OF) i depresyjnych (test SPT). We wczesnej i późnej fazie sAD szczurom pobrano krew przez punkcję serca w celu określenia poziomu obwodowych markerów zapalenia (liczba oraz odsetek różnych populacji leukocytów - licznik hematologiczny/cytometria przepływowa; stężenie interleukiny-6 (IL-6) oraz interleukiny-10 (IL-10) - ELISA; stężenie kortykosteronu (KORT) - metoda radioimmunologiczna - RIA) jak również parametrów hematologicznych związanych z układem czerwonerwinkowym i płytkowkrwinkowym (licznik hematologiczny). Pod koniec późnej fazy sAD, po uśmierceniu zwierząt, pobrano mózg, śledzionę oraz grasicę. W różnych regionach OUN za pomocą metody immunohistochemicznej (IHC) oznaczono liczbę aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) a także liczbę złogów βA. Śledzionę oraz grasicę zważono w celu wyznaczenia wskaźników masy.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że u zwierząt z modelem sAD szczury o charakterystyce behawioralnej HR rozwinęły silniejsze zaburzenia przestrzennej pamięci referencyjnej (48-50, 92, 94-95 dzień sAD) zmierzone w teście MWM oraz silniejsze zaburzenia lękowe (45-46, 90 dzień sAD) określone na podstawie pomiarów w labiryncie EPM oraz w teście OF w porównaniu ze szczurami LR. Natomiast różnice w poziomie anhedonii pomiędzy osobnikami HR i LR z modelem sAD zmierzone w teście SPT nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej na żadnym z badanych etapów choroby. Ośrodkowe podanie IGF-1 u szczurów z modelem sAD zredukowało deficyty referencyjnej i roboczej pamięci przestrzennej (7-14, 45, 48-52, 90, 94-97 dzień sAD), zaburzenia lękowe (15, 53, 98 dzień sAD) oraz depresyjne (52, 97 dzień sAD). Co więcej, iniekcje ICV-IGF-1 u zwierząt z modelem sAD o charakterystyce behawioralnej HR zredukowały silniej zaburzenia pamięci przestrzennej w porównaniu ze szczurami LR (test MWM, 16-19, 54-55, 103-106 dzień sAD). U osobników

LR podanie tej neurotrofiny silniej wpłynęło na redukcję zaburzeń lękowych (test EPM, 53 i 98 dzień sAD) i depresyjnych (test SPT, 14 i 52 dzień sAD) w porównaniu ze szczurami HR.

Deficytom pamięci oraz zaburzeniom lękowym u osobników z grupy STZ HR towarzyszyła (99 dzień sAD) wyższa liczba oligomerów  $\beta$ A w hipokampie (regiony: CA1-CA3, DG) oraz w części brzeżnej jądra półleżącego (NAcS) w porównaniu z grupą STZ LR. Z kolei podanie ICV-IGF-1 w grupie szczurów STZ IGF-1 skutkowało niższą liczbą złogów  $\beta$ A w regionie CA1 hipokampa, niższą liczbą aktywowanych komórek mikrogleju w części CA2 hipokampa (98 dzień sAD) w porównaniu ze zwierzętami STZ SAL. Poprawa pamięci przestrzennej u osobników STZ IGF-1 HR była związana z redukcją liczby aktywowanych komórek mikrogleju (dzień 107 sAD) w regionach CA2, CA3 i DG hipokampa, a także z obniżeniem liczby oligomerów  $\beta$ A (dzień 107 sAD) w obszarach CA3 i DG hipokampa w porównaniu ze szczurami z grupy STZ IGF-1 LR. Natomiast redukcja zaburzeń neuropsychiatrycznych u zwierząt STZ IGF-1 LR powiązana była z obniżeniem liczby (dzień 107 sAD) złogów  $\beta$ A w NAcS.

Ponadto zauważyliśmy, że w modelu sAD u zwierząt STZ HR dochodzi do silniejszej supresji obwodowego układu odpornościowego, przejawiającą się jako niższa liczba komórek NK, monocytów i granulocytów we krwi w porównaniu ze zwierzętami STZ LR (54 dzień sAD). Podanie dokomorowe neurotrofiny IGF-1 szczurom z modelem sAD spowodowało redukcję obwodowego zapalenia (99 dzień sAD) tj. niższa bezwzględna liczba leukocytów, limfocytów (w tym limfocyty T, Th), monocytów, granulocytów, niższe stężenie interleukiny-6 (IL-6) w osoczu w zestawieniu ze szczurami STZ SAL. Ponadto iniekcje dokomorowe IGF-1 u osobników STZ IGF-1 spowodowały obniżenie w osoczu stężenia obwodowego wskaźnika reakcji stresowej - kortykosteronu (99 dzień sAD) w porównaniu do grupy STZ SAL. Analizując wpływ różnic osobniczych we wrażliwości na stres (HR vs. LR) zauważyliśmy, że iniekcje ICV-IGF-1 u szczurów STZ IGF-1 LR silniej redukują obwodowy stan zapalny (niższa bezwzględna liczba leukocytów i limfocytów, niższe stężenie IL-6 w osoczu) w stosunku do grupy STZ IGF-1 HR.

Podsumowując: (1) W streptozotocynowym modelu sAD u szczurów wysokoaktywnych ruchowo (HR) i o większej wrażliwości na stres dochodzi do silniejszych deficytów pamięci oraz zaburzeń lękowych, w porównaniu z osobnikami niskoaktywnymi ruchowo (LR). Zmiany te u osobników HR są związane ze zwiększonym odkładaniem złogów  $\beta$ A w hipokampie i NAcS w porównaniu ze szczurami LR; (2) indukcja sAD u szczurów, połączona z jednoczesną dokomorową iniekcją IGF-1 zmniejsza deficyty pamięci przestrzennej oraz zaburzenia depresyjne/lękowe, towarzyszące progresji sAD. Ten pozytywny efekt

neurotrofyny IGF-1 powiązany jest z redukcją liczby złogów  $\beta$ A w obszarze CA1 hipokampa, niższym poziomem neurozapalenia, mierzonego liczbą komórek CD68<sup>+</sup> w rejonie CA2 hipokampa oraz z obwodowym efektem przeciwzapalnym; (3) ośrodkowe podanie IGF-1 szczurom z modelem sAD i zróżnicowanym pod względem wrażliwości na stres (HR vs. LR) zmniejsza deficyty pamięci oraz zaburzenia lękowe/depresyjne w sposób zależny od charakterystyki behawioralnej osobnika. U zwierząt HR obserwuje się silniejsze zmniejszenie deficytów pamięci przestrzennej, powiązane z redukcją liczby złogów  $\beta$ A oraz liczby komórek CD68<sup>+</sup> w hipokampie. Natomiast u osobników LR z modelem sAD iniekcje ICV-IGF-1 wywierają silniejszy efekt antydepresyjny i anksjolityczny, w porównaniu ze szczurami z wysoką aktywnością behawioralną i większą wrażliwością na stres (HR). Przywrócenie zaburzonej sygnalizacji insulinowej we wczesnym stadium sporadycznej postaci choroby Alzheimera, poprzez ośrodkowe podanie neurotrofyny IGF-1, stanowić może nowe podejście w leczeniu tej choroby i związanych z nią zaburzeń neuropsychiatrycznych. Należy jednak pamiętać, że efekt terapeutyczny IGF-1 zależy od osobniczych różnic w reaktywności behawioralnej i stresowej.

## Abstract in English

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that occurs in two forms: familial (fAD) and sporadic (sAD). The fAD form is caused by mutations in genes that promote the accumulation of  $\beta$ -amyloid ( $\beta$ A) in the brain and is diagnosed in only 5% of AD patients. The sAD form affects as many as 95% of all people with AD, and causes of this form of the disease are varied and include:  $\beta$ -amyloid ( $\beta$ A) cascade, neuroinflammation, oxidative stress, dysfunction of insulin and cholinergic pathways. In the course of AD numerous behavioral changes are observed, i.e. cognitive, anxiety and depressive disorders, which are the result of accumulation of two pathological forms of proteins in the central nervous system (CNS): senile plaques (composed of  $\beta$ A) and neurofibrillary tangles (composed of hyperphosphorylated tau protein). The animal model of sAD is application of streptozotocin (STZ) into the lateral ventricles of the brain (ICV). In this model of sAD a decrease in glucose metabolism is observed, which contributes to the development of insulin resistance, a decrease in the number of neurons and disruption of the neurogenesis process, disturbances in the functioning of cholinergic pathways, the presence of  $\beta$ A deposits, spatial memory deficits and depressive/anxiety-like disorders. One of the substances that restores the physiological function of insulin pathways is insulin-like growth factor-1 (IGF-1). IGF-1 by regulating glucose metabolism affects: neuroprotection, neurogenesis, neuroregeneration, glial support, neuroplasticity and acts as an anxiolytic agent.

The results presented in the doctoral dissertation are based on three scientific articles (Dunacka et al., 2024; 2025a; 2025b) and unpublished data. My experiments focused on investigating whether the influence of individual differences in stress reactivity in Wistar Han rats has an impact on the development of disorders associated with sAD (cognitive/neuropsychiatric disorders, neuroinflammation/accumulation of  $\beta$ A and peripheral inflammation) and on the effectiveness of therapy using IGF-1 administered into the lateral ventricles of the brain.

The experiments were conducted using male Wistar Han rats (total N=72, HR rats N=35, LR rats N=35) undifferentiated and differentiated (novelty test at baseline conditions) in terms of locomotor activity level/stress reactivity into high-responders (HR) vs. low-responders individuals (LR). At baseline conditions (before cannula implantation and injections), the level of spatial memory (Morris water maze test - MWM), anxiety-like symptoms (the elevated plus maze test - EPM and open field test - OF) and the level of anhedonia - a basic indicator of depressive disorders (the sucrose preference test - SPT) were determined in these rats.

Subsequently, a sAD model was induced by administering ICV-STZ injections (3 mg/kg), or an injections of ICV-IGF-1 neurotrophin (2 µg) were also co-administered with the induction of the sAD model. Control groups of animals were created by intracerebroventricular administration of citrate buffer (ICV-VEH, STZ solvent) and by injections of physiological saline solution (ICV-SAL, IGF-1 solvent). At three stages (very early phase from 7th day of sAD, early phase from 45th day of sAD, late phase from 90th day of sAD) of sAD progression the spatial memory (the MWM test), anxiety-like disorders (the EPM, OF tests) and depressive-like disorders (the SPT test) were measured again. In the early and late phases of sAD, blood of rats was collected by cardiac puncture in order to determine the levels of peripheral markers of inflammation (number and percentage of different leukocyte populations - haematological counter/flow cytometry; concentration of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) - ELISA; corticosterone (CORT) concentration - radioimmunoassay - RIA) as well as haematological parameters related to the red blood cell and platelet systems (haematological counter). At the end of the late phase of sAD, after sacrifice of the animals, the brain, spleen and thymus were collected. In various regions of the CNS, the number of activated microglia cells (CD68<sup>+</sup>) and the number of βA deposits were determined using immunohistochemistry (IHC). The spleen and thymus were weighed to determine the relative weight index of these organs.

The obtained results allowed us to conclude that the HR individuals with the sAD model developed more severe spatial reference memory impairments (48-50, 92, 94-95 day sAD) measured in the MWM test and stronger anxiety-like disorders (45-46, 90 day sAD) determined on the basis of measurements in the EPM maze and in the OF test compared to LR rats. However, the level of anhedonia measured in the SPT test did not reach a statistically significant level between HR and LR animals with the sAD model at any of the sAD stages. In turn, the central administration of IGF-1 in rats with the sAD model reduced deficits of the reference and working spatial memory (7-14, 45, 48-52, 90, 94-97 day sAD), anxiety-like disorders (15, 53, 98 day sAD) and depressive-like disorders (52, 97 day sAD). ICV injections of IGF-1 in HR animals with the sAD model reduced spatial memory disorders more strongly (MWM test, 16-19, 54-55, 103-106 day sAD) compared to LR rats. In turn, ICV-IGF-1 applications in LR individuals with sAD model reduced stronger anxiety-like disorders (EPM test, 53 and 98 day sAD) and depressive-like disorders (SPT test, 14 and 52 day sAD) than in HR animals.

Memory deficits and anxiety-like disorders in individuals from the STZ HR group were accompanied (99 days sAD) by a higher number of βA oligomers in the hippocampus (regions: CA1-CA3, DG) and in the shell of the nucleus accumbens (NAcS) compared to the STZ LR

animals. In turn, ICV-IGF-1 administration in the STZ IGF-1 group of rats resulted in a lower number of  $\beta$ A deposits in the CA1 region of the hippocampus and a lower number of activated microglial cells in the CA2 part of the hippocampus (98 days sAD) compared to STZ SAL animals. The improvement of spatial memory in STZ IGF-1 HR individuals was associated with a reduction of the number of activated microglial cells (107 sAD days) in the CA2, CA3 and DG regions of the hippocampus, as well as with a reduction of the number of  $\beta$ A oligomers (107 day sAD) in the CA3 and DG parts of the hippocampus compared to STZ IGF-1 LR rats. In contrast, the reduction of neuropsychiatric disorders in STZ IGF-1 LR animals was associated with a decrease in the number (day 107 sAD) of  $\beta$ A deposits in the NAcS.

Furthermore, in the STZ HR group, suppression of the peripheral immune system, understood as a lower number of NK cells, monocytes and granulocytes in the blood (54 day sAD) was observed in compare to the STZ LR animals. Intracerebroventricular administration of IGF-1 neurotrophin to rats with the sAD model resulted in a reduction of peripheral inflammation (99 days sAD), i.e. a lower absolute number of leukocytes, lymphocytes (including T and Th lymphocytes), monocytes, granulocytes, and lower plasma interleukin-6 (IL-6) concentration compared to STZ SAL animals. In addition, intracerebroventricular administration of IGF-1 in STZ IGF-1 individuals resulted in a reduction of plasma concentrations of the peripheral stress response indicator - corticosterone (day 99 of sAD) compared to STZ SAL animals. Analyzing the effect of individual differences in stress sensitivity (HR vs. LR), we noticed that ICV-IGF-1 injections in STZ IGF-1 LR rats reduce peripheral inflammation more strongly (lower absolute number of leukocytes and lymphocytes, lower plasma IL-6 concentration) compared to the STZ IGF-1 HR group.

In summary: (1) in the streptozotocin model of sAD in high-responder rats (HR) with greater sensitivity to stress, there are more severe memory deficits and anxiety-like symptoms compared to low-responder rats (LR). These changes are associated with increased  $\beta$ A deposition in the hippocampus and NAcS in HR animals compared to LR rats; (2) induction of sAD in rats, combined with simultaneous intracerebroventricular IGF-1 injections, reduces spatial memory deficits and depressive/anxiety-like symptoms accompanying sAD progression. This positive effect of IGF-1 neurotrophin is associated with a reduction of the number of  $\beta$ A deposits in the CA1 region of the hippocampus, lower levels of neuroinflammation, measured by the number of CD68<sup>+</sup> cells in the CA2 region of the hippocampus, and a peripheral anti-inflammatory effect; (3) central administration of IGF-1 to rats with sAD and varying stress sensitivity (HR vs. LR) reduces memory deficits and anxiety/depressive-like symptoms in a manner dependent on the behavioral characteristics of

the individual. In HR animals, a stronger reduction of spatial memory deficits is observed, associated with a reduction in the number of  $\beta$ A deposits and CD68<sup>+</sup> cells in the hippocampus. In contrast, in LR individuals with the sAD model, IGF-1 injections have a stronger antidepressant and anxiolytic effect compared to rats with high behavioral activity and greater sensitivity to stress (HR). Restoring impaired insulin signaling in the early stages of sporadic Alzheimer's disease through central administration of the neurotrophin IGF-1 may represent a new approach to the treatment of this disease and related neuropsychiatric disorders. However, it should be remembered that the therapeutic effect of IGF-1 depends on individual differences in behavioral and stress reactivity.

## Forma rozprawy

Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki są oparte na 3 oryginalnych artykułach naukowych oraz części wyników nieopublikowanych.

### Oryginalne artykuły naukowe:

1. Dunacka J., Świątek G., Wrona D. High behavioral reactivity to novelty as a susceptibility factor for memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation as a rat model of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Science*, 2024, 25, 11562. <https://doi.org/10.3390/ijms252111562>. **IF=4.9; MNiSW=140 pkt.**
2. Dunacka J., Grembecka B., Majkutewicz I., Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 treatment enhances working and reference memory by reducing neuroinflammation and amyloid beta deposition in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*, 2025, 18, 527. <https://doi.org/10.3390/ph18040527>. **IF=4.8; MNiSW=100 pkt.**
3. Dunacka J., Grembecka B., Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 induced anxiolytic and antidepressant effects in a rat model of sporadic Alzheimer's disease are associated with the peripheral suppression of inflammation. *Cells*, 2025b, 14, 1189. <https://doi.org/10.3390/cells14151189>. **IF=5.2; MNiSW=140 pkt.**

### Wyniki nieopublikowane:

1. Przedstawione wyniki koncentrują się na zbadaniu czy różnice osobnicze we wrażliwości na stres, mierzone poziomem aktywności lokomotorycznej (HR vs. LR) znajdują odzwierciedlenie w zróżnicowaniu efektywności terapii z użyciem IGF-1 deficytów pamięci oraz zaburzeń depresyjnych/lękowych w modelu SAD.

Wyżej wymienione prace nie zostały użyte w innych postępowaniach o uzyskanie stopnia naukowego.

## 1. Wstęp

### 1.1. Choroba Alzheimerera (AD)

Choroba Alzheimerera (Alzheimer's disease, AD) to postępujące, nieodwracalne zaburzenie neurodegeneracyjne, które po raz pierwszy zostało opisane w 1907r. przez niemieckiego psychiatrę Aloiza Alzheimerera (Rao i wsp., 2014; Tellechea i wsp., 2018), a wprowadzone do nomenklatury medycznej w 1910r. przez innego niemieckiego lekarza Emila Kraepelina (Armstrong, 2013). Choroba ta występuje w dwóch formach: rodzinnej (familial Alzheimer's disease, fAD) oraz sporadycznej (sporadic Alzheimer's disease, sAD). Ta pierwsza postać diagnozowana jest znacznie rzadziej bo tylko u około 5% chorych, natomiast druga forma stanowi aż 95% przypadków zachorowań (Bolos i wsp., 2017). Postać fAD dziedziczona jest w sposób autosomalny dominujący i stwierdzana jest u osób młodych, tj. przed 65 rokiem życia. Przyczyną wystąpienia tej formy choroby są mutacje w genach: *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* (Blennow i wsp., 2006; Rao i wsp., 2014). Gen *PSEN1* zlokalizowany jest w locus 14q24.3, gen *PSEN2* położony jest na chromosomie 1 w miejscu 1q31-q42, a z kolei występowanie genu *APP* to lokalizacja 21q21 w DNA (Rao i wsp., 2014). Gen *APP* koduje białko prekursorowe amyloidu (APP) czyli transmembranową proteinę, której funkcje w warunkach fizjologicznych nie są w pełni poznane. Sugeruje się, że białko APP bierze udział w różnicowaniu i proliferacji komórek progenitorowych mózgu, jest inhibitorem proteaz serynowych oraz uczestniczy w procesach koagulacji (Marszałek, 2016). W genie *APP* wykryto 29 mutacji i stanowiły one mniej niż 5% przyczyn rozwinięcia postaci fAD. Przyczyniły się one do wystąpienia wewnątrzmożgowych krwotoków, uszkodzenia istoty białej, powstania amyloidowej angiopatii i obecności blaszek amyloidowych. Mutacje te występują w pobliżu miejsc rozpoznawanych przez sekretazy, więc zaburzając funkcje sekretaz przyczyniają się do powstawania  $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A). Opisano 166 mutacji w genie *PSEN1* i stanowiły one 18-50% przyczyn powodujących wystąpienie rodzinnej formy choroby, a w genie *PSEN2* takich zmian wykryto 13 i odpowiednio przyczyniły się one do mniej niż 5% przyczyn rozwinięcia formy fAD (Kowalska, 2009). Geny *PSEN1* oraz *PSEN2* kodują odpowiednio białka preseniliny: 1 i 2, które są częścią enzymu gamma sekretazy, odpowiedzialnej za cięcie  $\beta$ A (Pizzo i wsp., 2020; Yang i wsp., 2023). Przyczyny występowania formy sAD nie są do końca poznane, ale podejrzewa się wiele czynników, które bezpośrednio lub pośrednio przyczyniają się do rozwinięcia tej choroby. Do ważniejszych przyczyn należą: zaburzenia funkcjonowania dróg cholinergicznnych i szlaków insulinowych

w mózgu, kaskada  $\beta$ -amyloidu, stres oksydacyjny, neurozapalenie, ale również zaburzenia funkcjonowania układu limfatycznego, chroniczny stres, urazy głowy, zakłócenia snu, kontakt z aluminium, niedożywienie, a także zakażenie wirusem opryszczki pospolitej (Armstrong, 2013; Bhushan i wsp., 2018; Chen i Zhong, 2014; Hampel i wsp., 2018; Holmes, 2013; Mravec i wsp., 2018; Peng i wsp., 2016; Rabinovivi, 2019; Salkovic-Petrisic i Hoyer, 2007; Bai i wsp., 2022). Co więcej w 1993r. zostały opublikowane dane, które potwierdziły, że w przypadku formy sporadycznej, wystąpienie allelu epsilon 4 w genie *APOE*, powoduje zwiększone ryzyko rozwoju postaci sAD piętnastokrotnie u homozygot i trzykrotnie u heterozygot (Blennow i wsp., 2006). Gen ten położony jest w locus 19q13 (Rao i wsp., 2014). Warto dodać, że postać sAD jest stwierdzana u osób starszych tj. w wieku powyżej 65 lat (Jahn, 2013).

## **1.2.Zmiany behawioralne obserwowane w przebiegu choroby Alzheimerera (AD)**

W przebiegu AD, niezależnie czy jest to postać fAD lub sAD obserwowane są zaburzenia behawioralne, kognitywne oraz występowanie szeregu zmian fizjologicznych, które diagnozowane są wiele lat później niż rozpoczęcie procesów prowadzących do ich powstania (Rao i wsp., 2014). Forma sAD jest główną przyczyną demencji u starszych członków społeczeństwa (Mravec i wsp., 2018). Prognozuje się, że na to zaburzenie w 2050r. będzie cierpieć 115 milionów ludzi na całym świecie, w tym milion w Polsce (Raport RPO, 2016). Jednym z głównych objawów obserwowanych w przebiegu tej choroby są zaburzenia pamięci (Rao i wsp., 2014). U takich osób obserwuje się amnezję, zaburzenia uczenia się i zapamiętywania. Przyczyną takiego stanu jest neurodegeneracja neuronów uwalniających acetylocholinę (Ach).  $\beta$ A wykazuje silną zdolność łączenia się z podjednostką  $\alpha 7$  receptora dla Ach, co zaburza funkcjonowanie takiego receptora oraz przyczynia się do hamowania uwalnianie Ach. Ponadto wiadomo, że splątki neurofibrylarne kumulują się w 3. i 5. warstwie kory asocjacyjnej i tym samym w znaczny sposób zaburzają funkcjonowanie szlaków cholinergicznnych (Grossberg, 2017). U pacjentów z AD pogorszeniu ulega działanie pamięci roboczej, czego przyczyną jest uszkodzenie neuronów płata czołowego. Osłabia to zdolność rozwiązywania problemów, planowania, wykonywania codziennych czynności, zaburza ukierunkowanie na cel i modyfikację zachowania. U pacjentów z AD występują także napady padaczkowe częściej niż w populacji osób zdrowych. Sądzi się, że przyczyną takiego stanu są podwyższone poziomy  $\beta$ A. W mózgu w ramach reakcji kompensacyjnej białko to (mającej na celu złagodzenie pobudzenia w ośrodkowym układzie nerwowym - OUN) hamuje aktywność

w obszarach sieci neuronalnych w płatach skroniowych, a więc przyczynia się do dysfunkcji poznawczych. Do deficytów pamięci u osób chorujących na AD przyczyniają się również zaburzenia snu, które przekładają się na zakłócenia konsolidacji śladu pamięciowego. U osób z AD upośledzona jest także pamięć zapachowa. Chorzy charakteryzują się hiposmią oraz upośledzonym węchem. Spowodowane jest to tworzeniem się płytek starczych w korze śródwęchowej (Jahn, 2013). Pacjenci z AD charakteryzują się także fałszywą pamięcią na poziomie przedmiotowym, kontekstowym i autobiograficznym. Osoby z AD przypominają sobie tzw. fałszywe wspomnienia na temat przedmiotów, mają trudności z zapamiętaniem kluczowych słów, nieprawidłowo przydzielają przedmiot do typowego dla niego pomieszczenia, deklarują wykonanie czynności, która faktycznie nie została przez nich wykonana, konfabulują, a także opowiadają o wspomnieniach i doświadczeniach które nie miały miejsca. Przyczyną tej fałszywej pamięci może być obecność ładunku emocjonalnego i jego błędnie powiązanie, skłonność pacjentów z AD do zapamiętywania wspomnień emocjonalnych oraz wyzwolenie fałszywego wspomnienia przez przywołanie innego zdarzenia (Haj i wsp., 2020).

Jednym z objawów behawioralnych pojawiających się w przebiegu AD jest również depresja. Jak podają dane dotyka ona około 38% pacjentów z AD. Z jednej strony depresja może być objawem prodormalnym czyli zwiastującym wystąpienie AD, a z drugiej strony może być spowodowana zmianami jakie występują u pacjentów dotkniętych tym zaburzeniem neurodegeneracyjnym. O przyczynę rozwoju depresji podejrzewanych jest wiele czynników np. chroniczny kontakt ze stresorami, podwyższone stężenie cytokin pro-zapalnych, genetyczna podatność, zaburzenia szczelności bariery krew-mózg (BBB) oraz zmiany w strukturze mózgu. Warto dodać, że nie leczone zaburzenie depresyjne wzmacnia o 30% wystąpienie demencji. Pacjenci z AD pojawiającym się na wczesnym etapie życia, charakteryzują się wyższym ryzykiem rozwinięcia depresji, z kolei u chorych na AD rozpoczynającym się w późnym wieku depresja jest bardziej uporczywa. O związku depresji jako objawu poprzedzającego AD świadczą dane uzyskane między innymi z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Wykryto 7 genów zwiększających ryzyko wystąpienia depresji, które były skorelowane z obecnością splotków neurofibrylarnych lub płytek starczych. Ponadto w niektórych badaniach wykryto, że u osób z depresją  $\beta$ A znajduje się w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz stwierdza się u nich zwiększone ryzyko zachorowania na demencję. Zmiany te nie są obserwowane jednak we wszystkich analizach, dlatego należy uznać fakt, że depresja jest też konsekwencją AD. Depresję i AD łączy zatem wiele cech. Osoby predysponowane do AD na poziomie genetycznym, mają wyższe ryzyko wystąpienia depresji po 50 roku życia.

Wykryto pojedynczy poliformizm w genie *TMEM106B* obserwowany w tych dwóch zaburzeniach. Ponadto obecność  $\beta$ A i zwiększonego stężenia białka tau w mózgu lub płynie mózgowo-rdzeniowym wiązała się z większym ryzykiem rozwoju depresji, apatii i pogorszeniem jakości snu. Czynniki środowiskowe takie jak nieprawidłowa dieta, styl życia i niska aktywność fizyczna również wspierają wystąpienie tych dwóch jednostek chorobowych. W obu tych zaburzeniach obserwowana jest także zmniejszona objętość hipokampa, atrofia płątów skroniowych i zakrętu obręczy. Zaburzenia te łączy także deregulacja osi podwzgórzowo-przysadko-nadnerczowej (HPA), która manifestuje się podwyższonym stężeniem kortyzolu (Huang i wsp., 2024).

W AD występują także inne zaburzenia zachowania. Według danych z różnych badań u pacjentów stwierdza się pojawienie: agresji (11-68%), lęku (12-70%), drażliwości (18-23%), zmienionego behawioru ruchowego (0,8-70%), euforii (0,5-20%), omamów (9-59%), halucynacji (6-41%), apatii (19-88%) oraz zaburzeń apetytu (11-64%) (Zhao i wsp., 2016; Passeri i wsp., 2022).

### **1.3. Depresja jako choroba o podłożu zapalnym i stresowym**

W przypadku patogenezy depresji warto zwrócić uwagę na wzajemne powiązania pomiędzy układem nerwowym, układem odpornościowym i układem endokrynnym oraz różnymi komponentami danego układu.

Depresja uznawana jest między innymi jako zaburzenie o podłożu zapalnym, które występuje w wyniku aktywacji układu odpornościowego, manifestujące się jako zwiększona produkcja/stężenie cytokin pro-zapalnych. U osób cierpiących na to zaburzenie charakterystyczne są zwiększone stężenia: interleukiny-6 (IL-6), interleukiny-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i czynnika martwicy nowotworu- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Slavich i Irwin, 2014, Ciu i wsp., 2024). Ponadto w tej grupie ludzi obserwuje się niższe stężenia przeciwzapalnych cytokin: interleukiny-10 (IL-10) oraz transformującego czynnika wzrostu- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Slavich i Irwin, 2014; Steffen i wsp., 2024). W OUN za produkcję cytokin odpowiada aktywowany mikroglej. Zauważono, że komórki te u osób z depresją produkują nadmiernie takie cytokiny pro-zapalne jak: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF. Aktywowany mikroglej wpływa na astrocyty, prowadząc do zmian ich funkcjonowania w taki sposób, że te dwa typy komórek glijowych zaczynają produkować dodatkowo chemokiny. Przyciągając w konsekwencji do OUN komórki układu odpornościowego (Steffen i wsp., 2024). Zauważono także, że zmiany w aktywności mikrogleju w takich regionach mózgu jak ciało migdałowate, hipokamp oraz kora

przedczołowa przyczyniają się do powstania depresji (Wang i wsp., 2022). Ponadto mikroglej wspiera aktywację wewnątrzkomórkowego kompleksu białkowego inflamasomu NLRP3, będącego ważnym elementem odpowiedzi pro-zapalnej w warunkach stresowych, co przyczynia się do zwiększonego stężenia związków pro-zapalnych np. IL-1 $\beta$  w surowicy krwi u osób z depresją, a zablokowanie tego kompleksu przyczynia się do redukcji zaburzeń depresyjnych (Wang i wsp., 2022).

Co więcej neurony i mikroglej wzajemnie na siebie oddziałują. Przykładowo aktywowany mikroglej w warunkach stresowych hamuje proces neurogenezy, a wybrane chemokiny produkowane przez neurony np. CX3CL1 prowadzą do zwiększenia pro-zapalnej odpowiedzi mikrogleju, tym samym skutkując zwiększoną syntezą pro-zapalnych związków (Wang i wsp., 2022).

U osobników cierpiących na depresję zaobserwowano również zmieniony obraz białokrwinkowy. Osoby z tym zaburzeniem charakteryzowały się zwiększoną bezwzględną liczbą białych krwinek, a także podwyższoną liczbą monocytów, granulocytów, limfocytów T cytotoksycznych (TCD8<sup>+</sup>), T pomocniczych (TCD4<sup>+</sup>), komórek NK (CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>), a niższą liczbą limfocytów T regulatorowych we krwi (Slavich i Irwin, 2014; Foley i wsp., 2022; Steffen i wsp., 2024).

Jak wspominałam w kontekście depresji głównie zwraca się uwagę na podwyższone stężenia takich pro-zapalnych mediatorów jak: IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ . IL-6 w OUN oddziałuje na metabolizm neuroprzekaźników np. serotoniny, sprzyjając ich zmniejszonej syntezie, a właśnie niższe stężenia tych związków charakterystyczne są dla depresji. W przypadku serotoniny, IL-6 aktywuje enzym 2,3-dioksygenazy indolaminy (IDO), który sprawia, że tryptofan będący prekursorem serotoniny, nie bierze udziału w tworzeniu tego neuroprzekaźnika, a jest rozkładany do kynureiny (Roohi i wsp., 2021). Kynureina natomiast w OUN metabolizowana jest do kwasu chinolinowego, który jest neurotoksyczny (Cui i wsp., 2024). Cytokina ta natomiast na obwodzie pobudza produkcję białek ostrej fazy np. CRP lub chemokin przyciągających monocyty. Ponadto wspiera wzrost liczby neutrofilów, różnicowanie limfocytów T oraz B wspierając tym samym reakcję zapalną i jej specyficzny charakter. Z drugiej strony może też hamować syntezę innych pro-zapalnych związków. Warto dodać, że w czasie ostrego stresu IL-6 wzmacnia produkcję kortyzolu (Del Giudice i Gangestad, 2018). Jak podają dane, wysokie stężenie IL-6 w surowicy krwi skorelowane jest ze zmniejszoną objętością regionów CA1, CA3, CA4, DG hipokampa w prawej półkuli mózgowej, a także ze zmniejszoną ogólną objętością hipokampa u osób cierpiących na depresję (Ting i wsp., 2020). Kolejną cytokiną biorącą udział w patogenezie depresji jest IL-1 $\beta$ . Substancja ta obniża długotrwałe

wzmocnienie synaptyczne (LTP), wpływając niekorzystnie na plastyczność synaptyczną. Ponadto gdy jest syntetyzowana w zwiększony sposób prowadzi do zaburzeń pamięci przestrzennej (Hewett i wsp., 2012). IL-1 stymuluje również neurony podwzgórza do produkcji kortykoliberyny (CRH), przyczyniając się do wzmacniania reakcji stresowej ustroju (Wrona, 2006). Ponadto prowadzi do ekspresji śródbłonkowej cząsteczki adhezyjnej, która w kooperacji z integryną białych krwinek wspiera przedostawanie się leukocytów z naczyń krwionośnych do innych tkanek organizmu (Slavich i Irwin, 2014). TNF- $\alpha$  w OUN podobnie jak IL-6 przyczynia się do aktywacji enzymuIDO, zmniejszając w ten sposób dostępność serotoniny. Jest też cytokiną która wspiera aktywację osi HPA, a więc w konsekwencji zwiększa wydzielanie kortyzolu w organizmie. Ponadto zauważono, że indukuje proces apoptozy komórek (Berthold-Losleben i Himmerich, 2008). TNF- $\alpha$  między innymi wspiera także syntezę e-selektyny śródbłonka, która wiąże się z cząsteczką adhezyjną granulocytów obojętnochłonnych sprawiając, że białe komórki krwi migrują do uszkodzonej tkanki (Slavich i Irwin, 2014).

Depresja jest też chorobą o podłożu stresowym. Jednym z ważnych mechanizmów oddziaływania układu nerwowego, hormonalnego i odpornościowego w warunkach stresowych jest aktywacja osi HPA. Aktywacja tej osi prowadzi do wydzielenia kortyzolu lub innego hormonu steroidowego o właściwościach przeciwzapalnych, co w warunkach fizjologicznych przyczynia się do zahamowania niewielkiego stanu zapalnego (Slavich i Irwin, 2014). Ponadto fizjologiczne dawki tych hormonów niezbędne są do funkcjonowania układu odpornościowego oraz promowania produkcji cytokin przez limfocyty pomocnicze Th2, a nie komórki Th1 (Wrona, 2006). Dla osób cierpiących na depresje charakterystyczne są zwiększone stężenia cytokin produkowanych właśnie przez limfocyty Th1 tj. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  we krwi i w płynie mózgowo-rdzeniowym (Steffen i wsp., 2024). Gdy oś HPA jest aktywowana w sposób długotrwały dochodzi do oporności białych krwinek na glikokortykoidy, co przyczynia się do wzrostu reakcji pro-zapalnej ustroju (Slavich i Irwin, 2014), a nadmierna aktywacja osi HPA jest charakterystyczna dla osób z depresją (Cui i wsp., 2024). Stres jest związany z zapaleniem, a sytuacje stresowe w okresie dzieciństwa (np. niski status ekonomiczny) przyczyniły się do wyższego stężenia IL-6, białka ostrej fazy CRP oraz pro-zapalnego transkryptomu leukocytów w okresie dorosłości (Slavich i Irwin, 2014). Ponadto stres psychologiczny aktywuje rekrutację limfocytów T do mózgu (Steffen i wsp., 2024).

Kortykoidy swoje działanie wykazują przez związanie z dwoma typami receptorów: MR czyli receptorami dla mineralokortykoidów oraz GR czyli receptorami dla glikokortykoidów. Przy czym w stanach depresyjnych to zaburzenia funkcjonowania, jak

również ekspresji receptorów GR, zwłaszcza w podwzgórzu, hipokampie i korze przedczołowej związane są z podwyższoną aktywnością osi HPA (Shishkina i Dygalo, 2017). Zaburzone funkcjonowanie receptorów GR przyczynia się do upośledzenia działania glikokortykoidów jako mediatorów wspierających ujemne sprzężenie osi HPA, a tym samym w ustroju syntetyzowane jest więcej tych steroidów, a komórki organizmu stają się na nie odporne (Anacker i wsp., 2011). Zauważono, że zmianom tym towarzyszy upośledzenie neurogenezy w hipokampie (Anacker i wsp., 2011).

W wyniku działania stresu dochodzi także do aktywacji współczulnego układu nerwowego. Mediatorami tego układu są noradrenalina (NE) oraz adrenalina (A). W OUN głównym neuroprzekaźnikiem tego układu jest NE, a jej zasadniczym miejscem syntezy jest jądro sinawe (LC). Struktura ta wysyła swoje projekcje do wielu regionów mózgu, przez co neuroprzekaźnik ten oddziałuje na wiele procesów zachodzących w OUN (Sugama i Kakinuma, 2021). NE działa przez receptory związane z białkiem G:  $\alpha 1-2$  oraz  $\beta 1-3$ , które obecne są między innymi na mikrogleju. Mediator ten potrafi zarówno aktywować jak hamować mikroglej, wspierając zatem pro- jak i przeciwzapalną odpowiedź ustroju (Sugama i Kakinuma, 2020). Jednakże uważa się, że działanie NE jest głównie pro-zapalne w kontekście sytuacji stresowej (Tong i wsp., 2023). NE zwiększa transkrypcję genową pro-zapalnego szlaku jądrowego czynnika transkrypcyjnego- $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), a antagoniści jej receptora obniżają lub zapobiegają wzrostowi stężeń markerów stresu w tym IL- $1\beta$  i IL-6 (Tong i wsp., 2023). Szlak NF- $\kappa B$  zaangażowany jest w zahamowanie procesu neurogenezy oraz bierze udział w indukcji zaburzeń depresyjnych w warunkach stresowych, a w czasie trwania depresji zaobserwowano podwyższoną aktywność neuronów noradrenergicznych oraz wyższe stężenia NE w płynie mózgowo-rdzeniowym (Koo i wsp., 2010; Xie i wsp., 2024). Z kolei za obwodowe wydzielenie NE jak A odpowiedzialny jest rdzeń nadnerczy unerwiony przez neurony układu współczulnego, który produkuje te hormony w odpowiedzi na warunki stresowe (Kvetnansky i wsp., 2013). Zarówno NE jak i A wzmacniają aktywność komórek układu odpornościowego tj. proliferację komórek, produkcję cytokin i przeciwciał oraz migrację, przy czym NE hamuje cytotoksyczność komórek NK, a sama aktywacja układu współczulnego upośledza odporność komórkową (Wrona, 2006). Zatem neuroprzekaźniki te wpływają na rozwój pro-zapalnej odpowiedzi ustroju oraz upośledzają mechanizmy obronne układu odpornościowego.

W komunikacji pomiędzy tymi układami niezwykle ważna jest także rola nerwu błędnego czyli nerwu czaszkowego zbudowanego z włókien czuciowych (80%) oraz ruchowych (20%), który unerwia wiele tkanek i narządów ustroju. Nerw ten bierze udział w odruchu zapalnym, modulującym reakcję organizmu w odpowiedzi na aktywację układu

odpornościowego poprzez działanie Ach uwalnianej z jego zakończeń, która łączy się z receptorem  $\alpha 7$  nAChRs na leukocytach np. limfocytach regulatorowych i hamuje odpowiedź zapalną (Ma i wsp., 2025). Dokładniej mechanizm ten nazywany jest cholinergicznym szlakiem przeciwzapalnym (CAP), w którym obwodowe związki pro-zapalne aktywują OUN poprzez aferentne włókna nerwu, co prowadzi do uwolnienia przez nerw błędny Ach, która łączy się z receptorem  $\alpha 7$  nAChRs hamuje syntezę TNF- $\alpha$  przez komórki układu odpornościowego (Liu i wsp., 2020). Zjawisko to wydaje się więc ważne w kontekście zachowań depresyjnych, gdyż zaburzenie to uznawane jest również jako choroba o podłożu zapalnym. Stymulacja nerwu błędnego u szczurów z modelem chronicznego nieprzewidywalnego stresu zredukowała zaburzenia depresyjne i było to rozumiane jako np. wyższe spożycie sacharozy w teście preferencji sacharozy (SPT) oraz krótszy czas bezruchu w teście wymuszonego pływania. Z kolei u zwierząt pozbawionych receptora  $\alpha 7$ nAChR $^{-/-}$  nie zauważono różnic istotnych statystycznie w działaniu stymulacji nerwu błędnego na redukcje wspomnianych parametrów związanych z zaburzeniami depresyjnymi. W doświadczeniu tym chroniczny stres spowodował aktywację mikrogleju oraz ekspresję IL-1 $\beta$  w podwzgórzu, a stymulacja nerwu błędnego redukowała tę aktywację oraz ekspresję cytokiny. U zwierząt pozbawionych receptora dla Ach również zaobserwowano aktywację tych komórek glejowych oraz zwiększoną ekspresję pro-zapalnej IL-1 $\beta$ . Dodatkowe oznaczenia wykazały, że przeciwzapalne oraz antydepresyjne działanie stymulacji nerwu błędnego realizowane jest przez podwzgórzowy szlak  $\alpha 7$ nAChR/JAK2/STAT3/NF- $\kappa$ B (Chen i wsp., 2023).

Podsumowując, depresja jest zaburzeniem o podłożu stresowym jak i zapalnym, któremu towarzyszy szereg zmian fizjologicznych. Biorąc pod uwagę fakt, że zarówno stres jak i zapalenie przyczyniają się do rozwoju sAD należy rozważyć czy osobnicza charakterystyka behawioralna sprzyja rozwinięciu którejś z tych odpowiedzi ustroju lub przyczynia się do większej skuteczności zaproponowanego leczenia w przebiegu tego neurodegeneracyjnego zaburzenia.

#### **1.4.Zmiany histologiczne obserwowane w mózgu w przebiegu choroby Alzheimera (AD)**

W mózgach osób cierpiących na AD stwierdzono obecność dwóch patologicznych białek: zewnątrzkomórkowych blaszek starczych (senile plaques) zbudowanych z  $\beta$ A oraz wewnątrzkomórkowych splotków neurofibrilarnych (neurofibrillary tangles, NFTs), które złożone są z hiperfosforylowanego białka tau (Salkovic-Petrisic i Hoyer, 2007; Rao i wsp., 2014; Bolos i wsp., 2017). Jedną z proponowanych przyczyn powstania sAD jest hipoteza

kaskady  $\beta$ A. Głównym jej założeniem jest to, że nadmierna akumulacja tego białka, w różnych strukturach mózgu jest przyczyną pojawiających się patologii (Barage i Sonawane, 2015), przy czym te zmiany pojawiają się początkowo w korze entorynalnej (śródwęchowej) oraz w hipokampie, a wraz z rozwojem choroby stwierdza się je w korze skroniowej, ciemieniowej i czołowej (Jahn, 2013). Zmieniony metabolizm dla tego białka powodujący redukcję jego usuwania przez  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -sekreazy skutkuje nadmierną agregacją form hydrofobowych amyloidu:  $\beta$ A40 oraz  $\beta$ A42 (Bordon, 2017; Breijyeh i Karaman, 2020). Zapoczątkowuje to odpowiedź zapalną, która jest przyczynkiem do obumierania neuronów, redukcji synaps i rozpowszechnienia stresu oksydacyjnego (Barage i Sonawane, 2015). Złogi  $\beta$ A zbudowane są z łańcuchów o różnej liczbie aminokwasów. Najbardziej rozpowszechnione (90%) są płytki zbudowane z  $\beta$ A o długości 40 aminokwasów, jednak na początku rozwoju choroby dominuje 42 aminokwasowy  $\beta$ A i to właśnie on agreguje się znacznie szybciej niż jego krótsza forma. Warto dodać, że forma  $\beta$ A42 jest bardziej neurotoksyczna (Yu i Wu, 2021).  $\beta$ A oraz hiperfosforylowane białko tau wchodzi między sobą w interakcje. W zwierzęcych modelach AD wykazano, że nadekspresja  $\beta$ A zwiększa poziom białka tau w płynie mózgowo-rdzeniowym, a z kolei białko tau ułatwia agregację  $\beta$ A. Jednakże tylko 0,02% synaps charakteryzuje się jednoczesną obecnością tych dwóch patologicznych agregatów (Roda i wsp., 2022). Z drugiej strony istnieją także dowody odrzucające hipotezę kaskady  $\beta$ A. Odkładanie  $\beta$ A nie zawsze przyczyniło się do utraty synaps lub utrata synaps miała miejsce w rejonach mózgu w których nie odłożył się  $\beta$ A (Morris i wsp., 2014).

Białko tau w warunkach fizjologicznych połączone jest z cytoszkieletem komórki nerwowej głównie w rejonach aksonów, a więc odpowiedzialne jest za wspieranie stabilnej struktury neuronu, jego wzrost oraz przekaźnictwo międzysynaptyczne. W tym stanie jest białkiem dobrze rozpuszczalnym i o wysokiej ekspresji. Białko tau w komórce podlega wielu procesom np. fosforylacji, glikacji, ubikwitynacji i utlenieniu. W warunkach chorobotwórczych procesy jakim podlega białko tau ulegają zaburzeniu. W przypadku AD dochodzi do potranslacyjnej hiperfosforylacji, co powoduje niestabilność mikrotubul neuronów, a także zaburzenia transportu mediatorów w OUN. Tak zmienione funkcjonalnie białko tau charakteryzuje się zdolnością agregacji, rozsiewania i rozprzestrzeniania podobnie jak priony. Na początku zmienione białko tau pojawia się w korze entorynalnej i hipokampie, a następnie w innych częściach OUN. Obecnie nie są znane dokładne mechanizmy prowadzące do rozprzestrzeniania się nieprawidłowej formy tau w mózgu, ale podejrzewa się, że wydzielona do przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez neuron nieprawidłowa forma tau, może być zabsorbowana przez inną komórkę (Chen i Yu, 2023). Obecność hiperfosforylowanej formy

białka tau odpowiedzialna jest za wystąpienie takich patologii jak: śmierć neuronów, zaburzenie funkcjonowania synaps i plastyczności synaptycznej, rozwój neurozapalenia, fragmentację mitochondriów oraz wystąpienie zaburzeń kognitywnych (Wu i wsp., 2021; Dong i wps., 2022).

### **1.5. Zmiany transmisji neuroprzekazników obserwowane w przebiegu choroby Alzheimerera (AD)**

W przebiegu AD neurodegeneracji ulegają drogi cholinergiczne. Głównym mediatorem tych szlaków jest Ach, działająca w OUN lub na obwodzie poprzez nikotynowe oraz metabotropowe receptory. Reakcja syntezy tego związku zachodzi w cytoplazmie neuronów z cholicy i acetylo-koenzymu A przy udziale enzymu acetylotransferazy cholinowej (ChAT) (Breijyeh i Karaman, 2020). W OUN Ach odpowiedzialna jest za regulację plastyczności synaptycznej, pamięci i ogólnie pojętej aktywności kory mózgowej, promocję LTP oraz modulację aktywności neuronów. Substancja ta moduluje także aktywność autonomicznego układu nerwowego, poprzez wpływ na podwzgórze, co przyczynia się do oddziaływania na takie procesy jak termoregulacja, wzorzec snu i pobór pokarmu (Picciotto i wsp., 2012).

$\beta$ A powstający w przebiegu AD powoduje osłabienie syntezy Ach oraz redukcję jej wychwytu zwrotnego, ponadto w przebiegu tego zaburzenia stwierdzono redukcję liczby receptorów dla tego związku. Co więcej w mózgach osób z AD stwierdzono obniżenie liczby neuronów cholinergicznych oraz ich synaps (Breijyeh i Karaman, 2020). Ponadto zwiększona liczba płytek starczych związana jest ze zmniejszoną aktywnością enzymu syntetyzującego acetylocholinę. Z drugiej strony podkreślane jest też, że zaburzenia cholinergiczne sprzyjają odkładaniu  $\beta$ A, jak również patologii powodowanych przez białko tau, co w konsekwencji doprowadza do zaburzeń kognitywnych (Hampel i wsp. 2018). Za zaburzenia obserwowane w przebiegu AD odpowiedzialne są zmiany w drogach cholinergicznych głównie w takich strukturach jak jądro podstawne Meynerta oraz neuronach mających projekcję do hipokampa, ciała migdałowatego jak również kory mózgowej (Bekdash, 2021).

### **1.6. Zaburzenia sygnalizacji insulinowej w przebiegu choroby Alzheimerera**

Kolejną nieprawidłowością pojawiającą się u osób cierpiących na AD jest insulinooporność w mózgu oraz na obwodzie (Dineley i wsp., 2014). Z tego powodu choroba ta nazywana jest już cukrzycą trzeciego typu (Lewitt i Boyd, 2019). Insulina swoje działanie

wykazuje poprzez związanie z receptorem insulinowym (IR). Receptor ten jest heterotetramerem zbudowanym z dwóch podjednostek  $\alpha$  oraz dwóch podjednostek  $\beta$  połączonych wiązaniem dwusiarczkowym. W organizmie człowieka stwierdzono obecność jego dwóch izoform: IRA oraz IRB (Pomytkin i wsp., 2018). Pierwsza postać receptora spotykana jest w dojrzałym układzie nerwowym, natomiast druga w tkance tłuszczowej, wątrobie oraz w mięśniach szkieletowych (Sędzikowska i Szablewski, 2021). Insulina w OUN pełni wiele ważnych funkcji. Zaangażowana jest między innymi w procesy pamięciowe, funkcje kognitywne, działa neuroprotekcynie, wspomaga plastyczność synaptyczną, metabolizm glukozy i balans energetyczny (Salkovic-Petrisic i Hoyer, 2007; Pomytkin i wsp., 2018), a receptory dla niej wykazują ekspresję w licznych strukturach mózgu np. w opuszcze węchowej, hipokampie, podwzgórz, wzgórz oraz w korze nowej (Werner i LeRoith, 2014; Sędzikowska i Szablewski, 2021). Sygnalizacja insulinowa w mózgu realizowana jest przez działanie insuliny, insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), insulinopodobnego czynnika wzrostu-2 (IGF-2) oraz receptorów dla tych związków. Działanie insuliny w OUN obejmuje dwa szlaki sygnalizacji: kinazy fosfoinozytowej 3/kinazy białkowej B (PI3-K/AKT) oraz kinazy aktywowanej mitogenami (MAPK). Ten pierwszy szlak zaangażowany jest w procesy związane z metabolizmem i syntezą białek oraz lipidów, a ten drugi szlak w regulację wzrostu komórkowego, przeżycie oraz ekspresję genową. Warto dodać, że insulina pozytywnie działa w OUN wywiera poprzez stymulację ekspresji transportera glukozy typu 4 (GLUT 4), manifestując swoje działanie przez translokację tego receptora z cytozolu do błony komórkowej. Usprawnia to wychwyt i wykorzystanie glukozy przez neurony, a także w stanach zwiększonego zapotrzebowania (np. uczenie się) usprawnia transport insuliny. Co więcej sprawny metabolizm insuliny w OUN wpływa na obwodowe tkanki. Sygnalizacja tego hormonu reguluje poprzez wpływ na podwzgórze metabolizm w takich narządach jak np. wątroba i tkanka tłuszczowa (Sędzikowska i Szablewski, 2021).

Obecność receptorów dla insuliny w hipokampie, korze czołowej oraz śródwęchowej sugeruje niezwykle ważną rolę tego związku w procesach związanych z uczeniem lub pamięcią, ponadto wpływając na remodelowanie synaps, związek ten wpływa na plastyczność synaptyczną, a także znana jest jego pozytywna rola w procesie neurogenezy. Insulina wpływa również na komórki glejowe poprzez modulowanie ich odpowiedzi immunologicznej (Sędzikowska i Szablewski, 2021).

Niestety w przebiegu AD obecność  $\beta$ A powoduje redukcję liczby insulinowych receptorów oraz osłabia zdolność wiązania insuliny do nich (Dineley i wsp., 2014; Berlanga-Acosta i wsp., 2020), a sama obniżona sygnalizacja insulinowa wpływa na zwiększoną

akumulację  $\beta$ A (Sędzikowska i Szablewski, 2021). IDE czyli enzym degradujący insulinę jest również peptydazą odpowiedzialną za degradację  $\beta$ A. W stanie insulinooporności mózgu, enzym ten głównie zajmuje się degradacją insuliny, powodując w ten sposób zwiększoną akumulację  $\beta$ A (Michailidis i wsp., 2022). Ponadto w przebiegu AD stwierdzono, że obecność hiperfosforylowanego białka tau jest 3 razy większa niż w zdrowym mózgu, a właśnie w takich neuronach insulina gromadzi się w postaci oligomerów, co wiąże się z insulinoopornością tkanki i obniżeniem liczby receptorów IR (Sędzikowska i Szablewski, 2021). Na poziomie komórkowym wydzielanie i działanie insuliny obniża aktywność kinazy syntazy glikogenu-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), a właśnie ta kinaza wspiera fosforylację białka tau, a zatem w przebiegu AD stan insulinooporności mózgu będzie wspierał hiperfosforylację białka tau (Michailidis i wsp., 2022). Ponadto rozwój neurozapalenia spowodowany ośrodkową reakcją odpornościową lub obwodowym napływem cytokin pro-zapalnych przez uszkodzoną BBB jest przyczynkiem do rozwoju insulinooporności mózgu. Cytokiny pro-zapalne np. IL-6, IL-1 i TNF- $\alpha$  zaburzają sygnalizację insulinową w mózgu, co w konsekwencji doprowadza do hipometabolizmu neuronów. Ponadto zwiększona produkcja mediatorów neurozapalenia z jednej strony jest konsekwencją pojawienia się patologicznych złogów w mózgu, a z drugiej strony związki te promują powstawanie tych nieprawidłowych białek. Co więcej w przebiegu AD obecność stresu oksydacyjnego i zaburzenia pracy mitochondriów związane są z obniżoną ekspresją PGC-1 $\alpha$ , czyli regulatora biosyntezy i metabolizmu mitochondriów. Jednocześnie nadekspresja PGC-1 $\alpha$  jest czynnikiem wspierającym sygnalizację insulinową. Zatem stres oksydacyjny jest kolejnym czynnikiem powodującym zaburzenie sygnalizacji insulinowej w czasie AD (Berlanga-Acosta i wsp., 2020).

### **1.7. Neurozapalenie i zapalenie w przebiegu choroby Alzheimera (AD)**

Odpowiednikiem obwodowego układu odpornościowego w OUN są komórki mikrogleju, których gęstość w mózгах jest specyficzna dla struktury, a u ludzi waha się w przedziale 5-20% liczby wszystkich komórek danego regionu mózgu (Smith i wsp., 2012). W 1856r. niemiecki patolog Rudolf Virchow zdefiniował glej jako komórki inne niż neurony, a w 1919r. hiszpański lekarz Pio del Rio-Hortega wyróżnił różne populacje komórek glejowych: astrocyty, mikroglej oraz oligodendrocyty (Wolf i wsp., 2017). Mikroglej w OUN zachowuje się jak obwodowe komórki mające zdolność fagocytozy (makrofagi), przez co może usuwać neurony oraz nieużywane synapsy pomiędzy nimi. Niezbędny jest więc w fizjologicznym rozwoju OUN oraz w późniejszym czasie, gdzie poprzez usuwanie zbędnych

elementów dróg nerwowych i troficzne wspieranie neuronów reguluje przesyłanie sygnałów, a także redukuje zbędne szlaki sygnalizacyjne (Wolf i wsp., 2017). W warunkach homeostazy komórki mikrogleju stale badają lokalne środowisko poprzez poruszanie wypustkami, które są silnie rozgałęzione, a ciało komórki mikrogleju w tym stanie spoczynkowym (resting state) jest małe i okrągłe (Smith i wsp., 2012; Wolf i wsp., 2017). W warunkach fizjologicznych komórki mikrogleju dzięki purinergicznemu receptorowi P2RY12 mogą odpowiadać na wysiew adenylozotryfosforanu (ATP) przez neurony, co będzie wspierało komunikacje pomiędzy tymi dwoma rodzajami komórek OUN, a w konsekwencji doprowadzi do synchronizacji neuronów danego szlaku komórkowego. Mikroglej wpływa też na procesy zapamiętywania oraz nauki, poprzez wspieranie wstępnej fazy LTP przez ustawianie znaczników synaptycznych (synaptic tags) lub poprzez hamowanie przekazywania synaptycznego (LTP) (Miao i wsp., 2023).

W momencie gdy homeostaza zostaje zaburzona dochodzi do zmian morfologicznych tych komórek, które z budowy rozgałęzionej stają się komórkami amebowatymi (Wolf i wsp., 2017). Przykładami takich sytuacji, które prowadzą do zmian morfologii mikrogleju są: infekcja, udar, uraz, zapalenie i niedotlenienie (Smith i wsp., 2012). Gdy dochodzi do klasycznej aktywacji tych komórek produkują one związki powodujące neurozapalenie oraz są neurotoksyczne, a nazywane są komórkami typu M1, natomiast gdy aktywacja zachodzi w sposób alternatywny, mikroglej ten określany jest typem M2 i produkuje substancje przeciwzapalne oraz promujące regenerację tkanki. Warto jednak dodać, że aktywacja mikrogleju może występować jednocześnie z różnymi fenotypami pośrednimi i jest to proces niezwykle dynamiczny (Wolf i wsp., 2017; Miao i wsp., 2023). Wykryto między innymi, że w pobliżu blaszek starczych zbudowanych z  $\beta$ A pojawia się mikroglej typu DAM (disease-associated microglia). Ponadto komórki mikrogleju charakteryzują się dużą heterogenicznością w zależności od struktury mózgu i wieku osobnika np. są zróżnicowane poprzez posiadanie różnej liczby receptorów dla neuromediatorów takich jak dopamina, serotonina, endotelina, nikotyna, substancja P oraz białek klasy MCH-II, co przyczynia się do różnej odpowiedzi odpornościowej (Wolf i wsp., 2017). Gdy w OUN rozwinię się patologiczny proces, mikroglej uruchamia silną fagocytarną odpowiedź, prezentuje antygeny, jak również syntetyzuje prozapalne związki. Przykładami takich pro-zapalnych substancji są IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , tlenek azotu (NO), eikozanoidy, histamina, glutaminian i kwas chinolowy (Smith i wsp., 2012).

U zwierząt zauważono różnice w morfologii mikrogleju pomiędzy płciami oraz gatunkami. U samców gryzoni stwierdzono większą gęstość tych komórek, większy rozmiar ciała i mniejsze rozgałęzienia w stosunku do samic. Z kolei w warunkach *in vitro* mikroglej zwierząt proliferuje bardziej niż ludzki, a w przebiegu choroby Alzheimera taka proliferacja

była obecna w mysich modelach, jednak nie zauważono tego procesu u ludzi chorujących na to zaburzenie. Komórki pochodzące od różnych gatunków inaczej reagują na substancje, przykładowo NO u myszy silniej promował rozwój neurozapalenia niż u ludzi (Wolf i wsp., 2017).

U przebiegu AD dowiedziono, że pro-zapalny, mało ruchliwy typ mikrogleju pojawia się w pobliżu blaszek starcznych, a więc jest mało skuteczny w zwalczaniu tych patologicznych złogów. Taki typ mikrogleju przyciąga między innymi chemoatrakcyjne środowisko np. białko chemotaktyczne monocytów-1 (MCP-1), interleukina-8 (IL-8), białko zapalne makrofagów-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ). Ponadto same blaszki starcze powodują wydzielanie cytokin i innych substancji pro-zapalnych (Wolf i wsp., 2017). Co więcej aktywowany mikroglej w tej chorobie produkuje cytokiny pro-zapalne. Badania *post mortem* dowiodły produkcję cytokin pro-zapalnych (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) w uszkodzonej tkance nerwowej (Smith i wsp., 2012). Ponadto zmiany nawet w jednym nukleotydzie danego genu mogą prowadzić do ryzyka wystąpienia AD, a do takich genów zaliczamy też geny związane z funkcją mikrogleju np. *APOE*, *TREM 2* i *CD33* (Miao i wsp., 2023).

W czasie rozwoju AD stwierdzono, że polaryzacja mikrogleju kieruje się w stronę typu M1. Zaangażowane w ten proces jest wiele szlaków sygnalizacji komórkowej. Przykładowe z nich to NF- $\kappa$ B oraz szlak Toll podobny (TLRs). W czasie aktywacji szlaku NF- $\kappa$ B ufosforylowana kinaza IKK pozwala podjednostkom NF- $\kappa$ B p50/p60 przedostać się do jądra komórkowego, gdzie będzie promowana transkrypcja białek genów odpowiadających za rozwój neurozapalenia. Z kolei receptor TLR4 należący do szlaku TLRs posiada zdolność wiązania lipopolisacharydu (LPS), a połączenie to prowadzi do aktywacji odpowiedzi pro-zapalnej. Dochodzi między innymi do autofosforylacji kinazy IL-1 (IRAK), która w reakcji kaskadowej aktywuje białka IRAK1 oraz IRAK4, oddziałujące z receptorem TRAF6, które z kolei aktywują kompleks kinazy TAK1, a właśnie taki zespół kinaz może wpływać na aktywację innego szlaku np. wcześniej wspomnianego NF- $\kappa$ B (Miao i wsp., 2023).

Patologiczne zmiany występujące w AD mogą być niwelowane poprzez aktywację szlaków komórkowych związanych z promocją polaryzacji mikrogleju w typ M2. Jednym z takich szlaków jest wysoce zakonserwowany szlak sygnałowy Notch. W warunkach fizjologicznych szlak ten obejmuje receptory NOTCH 1-4 oraz ligandy DSL (delta-serrate-lag), gdzie aktywacja takiego receptora prowadzi do proliferacji i różnicowania komórek posiadających ten receptor. W AD aktywacja tego szlaku, poprzez wpływ na polaryzację mikrogleju wspiera redukcję neurozapalenia oraz usuwanie złogów zbudowanych z  $\beta$ A. Kolejnym przykładowym szlakiem może być szlak receptorów aktywowanych przez

proliferatory peroksydomów- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ). W warunkach fizjologicznych szlak ten może promować syntezę wydzielania cytokin zarówno pro- jak i przeciwzapalnych, ale w przebiegu AD promuje on polaryzację mikrogleju w typ M2, łagodzi neurozapalenie i zakłóca działanie szlaków pro-zapalnych (np. NF- $\kappa$ B) poprzez hamowanie translokacji jądrowej. Kolejnym szlakiem wspierającym redukcję objawów AD jest droga sygnalizacyjna kinazy fosfoinozytydu-3 kinazy białkowej B (Pi3K/AKT), która odgrywa znaczącą rolę w polaryzacji mikrogleju. Szlak ten działa poprzez aktywację białka G, aktywację receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej i kinazy Pi3K. Niska aktywność tego szlaku związana jest z polaryzacją mikrogleju w typ M1, jednak wzmocnione przesyłanie informacji tej drogi promuje polaryzację w mikroglej typu M2. Innym szlakiem pomocnym w polaryzacji mikrogleju w typ M2 jest szlak aktywowanej kinazy białkowej (AMPK), który może również wspierać biogenezę i funkcję mitochondriów poprzez aktywację sirtuiny-1, która z kolei aktywuje białko wspierające funkcję mitochondriów czyli PGC-1- $\alpha$  (Miao i wsp., 2023).

W przebiegu AD obserwowane jest także obwodowe zapalenie. Analiza krwi pacjentów z AD pozwoliła stwierdzić, że w przebiegu tej choroby wzrasta liczba monocytów (niezależnie od płci lub wieku badanej osoby) lub liczba neutrofilów, a z kolei liczba bazofili oraz limfocytów była niska. Uzyskane wyniki świadczą o rozwinięciu stanu zapalnego w organizmie wraz z pogorszeniem odporności w przypadku zakażenia (Shad i wsp., 2013). Monocyty w przebiegu AD mogą przekraczać BBB i poprzez proces fagocytozy przyczyniają się do redukcji złogów  $\beta$ A, choć ich obecność w tkankach (jako makrofagi/mikroglej) wiąże się z rozwojem zapalenia i produkcją cytokin pro-zapalnych (Feng i wsp., 2011). Z kolei dowiedziono, że modelach zwierzęcych AD neutrofile przyciągane są do śródbłonna naczyń krwionośnych mózgu, przez co następuje blokada przepływu krwi, co w konsekwencji zaburza funkcje kognitywne u zwierząt. Ponadto granulocyty obojętnochłonne migrują do miejsc lokalizacji złogów  $\beta$ A. Te komórki odpornościowe ponadto produkują tzw. „neutrofilowe pułapki zewnątrzkomórkowe” (NET), które z jednej strony hamują rozprzestrzenianie patogenów, a z drugiej wspierają wystąpienie stanu zapalnego i uszkodzenie tkanki (Xu i wsp., 2025). Zauważono także, że w przebiegu AD wzrasta stosunek neutrofilów do limfocytów (NLR) czyli wskaźnika pomiędzy aktywnością wrodzonej i nabytej odpowiedzi układu odpornościowego oraz będącego markerem obwodowej reakcji zapalnej. W kontekście neurozapalenia powstającego w przebiegu AD zwraca się uwagę na rolę limfocytów pomocniczych (Th, CD4<sup>+</sup>) zwłaszcza subpopulacji Th1 i Th17 oraz limfocytów cytotoksycznych (Tc, CD8<sup>+</sup>). Limfocyty Th1 zaangażowane są w promocję zapalenia poprzez wydzielanie interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ), a z kolei limfocyty Th17 wydzielają interleukinę-17

(IL-17), której synteza związana jest z wystąpieniem zaburzeń kognitywnych (Aprile i wsp., 2025).

Z kolei w streptozotocynowym modelu sAD u szczurów stwierdzono, że w przebiegu tego neurodegeneracyjnego zaburzenia wzrasta liczba oraz odsetek neutrofilii, a także produkcja przeciwzapalnej cytokiny IL-10 przez komórki śledziony u szczurów starych (22 miesiące) w pierwszym miesiącu sAD (Wrona i wsp., 2022).

### **1.8. Stres oksydacyjny w przebiegu choroby Alzheimera (AD)**

W przebiegu choroby Alzheimera stwierdzono pojawienie się stresu oksydacyjnego. W mitochondriach, czyli w strukturach komórkowych odpowiedzialnych za produkcję ATP w wyniku oddychania komórkowego, stwierdzono obniżoną produkcję enzymu oksydazy cytochromowej, co skutkuje zwiększoną syntezą wolnych rodników tlenowych (ROS). Ponadto obecność złożeń  $\beta$ A zaburza aktywność enzymatyczną, a także funkcjonowanie mitochondriów, co także zwiększa produkcję ROS. Co więcej mikroglej i astrocyty osób cierpiących na AD/zwierząt z modelem tej choroby produkują chemokiny, cytokiny i wolne rodniki tlenowe, które przyczyniają się do śmierci neuronów (Chen i Zhong, 2014). Badacze stwierdzają także, że neurony to komórki bardzo podatne na uszkodzenia spowodowane stresem oksydacyjnym z tego względu, że zawierają niewielkie ilości glutationu (działającego jako antyoksydant), a bogate są w dużą zawartość wielonasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), które powodują uszkodzenia tkanki na poziomie molekularnym (np. peroksydacja lipidów prowadząca do powstania wolnych rodników). Jednak jeden z utlenionych kwasów wielonasyconych, mianowicie kwas dokozaheksaenowy (DHA) i produkty peroksydacji lipidów jak kwasy omega 3 i 6 redukują poziom  $\beta$ A. Warto także dodać, że z drugiej strony stres oksydacyjny w przebiegu AD może być wywołany przez obecność  $\beta$ A, hiperfosforylowanego białka tau, akumulacje metali, zapalenie oraz zaburzenia pracy mitochondriów. Ponadto w hodowlach komórkowych i modelach zwierzęcych AD zaobserwowano akumulację  $\beta$ A w mitochondriach neuronów powodującą uszkodzenie funkcjonowania tej struktury, a więc osłabiony metabolizm energetyczny oraz produkcję związków promujących stres oksydacyjny jak nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) (Lauer i wsp., 2022). Wraz z wiekiem zmniejsza się też liczba mitochondriów, która może wpływać na interakcję z białkiem APP, powodując akumulację  $\beta$ A. Co więcej zaburzenia funkcji mitochondriów są spowodowane interakcją metal (miedź, cynk, żelazo) -  $\beta$ A, która zmienia polaryzację błony tego organellum komórkowego (Ionescu-Tucker i Cotman, 2021).

## 1.9. Inne przyczyny rozwoju choroby Alzheimera (AD)

Jedną z możliwych przyczyn rozwoju sAD są zaburzenia pracy układu limfatycznego. Układ limfatyczny jest ośrodkowym odpowiednikiem układu limfatycznego, który za pomocą kanałów okołonaczyniowych utworzonych przez astrocyty, odpowiedzialny jest za usuwanie metabolitów oraz rozprowadzenie substancji w OUN. Działanie tego systemu odbywa się w czasie fizjologicznego snu, dlatego zaburzenia tego procesu przyczyniają się do rozwoju zaburzeń na poziomie neuronalnym (Jessen i wsp., 2015). To właśnie we śnie, gdy układ limfatyczny jest aktywny, wzrasta objętość płynu mózgowo-rdzeniowego dostarczanego do różnych regionów mózgu (Hablitz i Nedergaard, 2021). W badaniach z udziałem zarówno ludzi jak i zwierząt wykazano, że pozbawienie snu przyczynia się do zwiększonej akumulacji  $\beta$ A, a więc ważne w kontekście zapobiegania sAD jest utrzymanie prawidłowego funkcjonowania tego układu. Mediatorem układu limfatycznego jest płyn mózgowo-rdzeniowy (CSF), a wraz z wiekiem obserwuje się obniżoną produkcję tego płynu, co wpływa niekorzystnie na funkcjonowanie systemu i może być przyczynkiem rozwoju AD (Silva i wsp., 2021). Doprecyzowując układ limfatyczny pozwala na ruch CSF z przestrzeni podpajęczynówkowej wzdłuż okolic okołotętnicznych, gdzie może mieszać się z płynem śródmiąższowym (ISF), zanim ten drugi dostanie się do obwodowego układu limfatycznego poprzez ewakuację przestrzeniami okołozylnymi (Hablitz i Nedergaard, 2021).

Kanały okołonaczyniowe zbudowane są z wodnych kanałów akwaporyn (AQP). Obecnie opisano 11 podtypów tych kanałów od AQP0 do AQP10. W kontekście zaburzeń związanych z AD wydaje się, że kluczowym kanałem jest AQP4, przez który może być transportowana woda, a jego ekspresję stwierdzono na astrocytach, ependymocytach, ale nie na neuronach (Thipani-Madhu i wsp., 2024). Jako selektywny kanał wodny, AQP4 przyczynia się do utrzymania jonowej oraz osmotycznej homeostazy, wpływając tym samym na dyfuzję wody w mózgu. Badania wskazują, że lokalizacja tej akwaporyny to końcowe fragmenty astrocytu, co umożliwia skuteczną komunikację z ISF, a tym samym zapewnieniem odpowiedniej motoryki do przepływu limfatycznego (Silva i wsp., 2021).

Ponadto stwierdzono, że w przebiegu starzenia ekspresja tej akwaporyny AQP4 w mózgu obniża się, co upośledza funkcjonowanie układu limfatycznego, a już u pacjentów z AD odpowiednia ekspresja tego białka była skorelowana z niższym poziomem akumulacji  $\beta$ A w regionach okołonaczyniowych (Thipani-Madhu i wsp., 2024). U myszy zmodyfikowanych genetycznie z wyłączonym genem dla AQP4, klirens usuwania złogów  $\beta$ A był niższy o 50% w stosunku do zwierząt kontrolnych z aktywnym genem, a u zwierząt

(APP/PS1) z modelem choroby AD negatywne konsekwencje choroby przybrały na sile i manifestowały się między innymi pogorszeniem deficytów poznawczych oraz zwiększoną akumulacją amyloidu. Co więcej u osobników z delecją tego kanału stwierdzono akumulację białka tau, a więc drugiego patologicznego białka obserwowanego w mózgach zwierząt/pacjentów z AD (Silva i wsp., 2021).

Kolejną możliwą przyczyną rozwoju sAD są zaburzenia snu. Badania pokazują, że obecność  $\beta$ A w płynie śródmiąższowym mózgu wzrasta w okresie czuwania, a spada podczas snu, z drugiej strony sama obecność  $\beta$ A może przyczyniać się do bezsenności lub fragmentacji snu, a w konsekwencji powodować zaburzenia pamięci. U zwierząt z modelem zaburzeń snu stwierdzono zwiększoną akumulację  $\beta$ A/blaszek starczych w korze przedczołowej i hipokampie, zwiększony poziom hiperfosforylowanego białka tau, zaburzenia uczenia się w teście labiryntu wodnego Morrisa (MWM) i aktywację komórek mikrogleju. Warto dodać, że zarówno przewlekłe, a także i krótkotrwałe zaburzenia snu przyczyniły się do akumulacji patologicznych złogów charakterystycznych dla AD. Deprywacja snu powoduje także zwiększoną ekspresję IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NO i syntazy tlenku azotu, a z kolei te związki promujące neurozapalenie pozytywnie skorelowane są z akumulacją nierozpuszczalnej formy  $\beta$ A. Co więcej zaburzenia snu negatywnie wpływają na mikrobiotę jelitową upośledzając jej funkcje i promując stan zapalny, a przekazywane sygnały ze zmienionej enterycznej gałęzi układu autonomicznego mogą być czynnikiem rozwoju zaburzeń sAD np. objawów związanych z lękiem (Han i wsp., 2024). Badania pokazują też, że zawartość  $\beta$ A w płynie śródmiąższowym waha się w rytmie dobowym. W czasie snu wolnofalowego (NREM) stężenie takie jest niższe niż podczas czuwania lub w fazie snu paradoksalnego (REM). Zakłócenie więc fazy NREM snu wydaje się bardziej negatywne w kontekście utworzenia złogów  $\beta$ A (Grossberg, 2017). Zaburzenia snu występują u około 14-69% pacjentów z AD (Zhao i wsp., 2016). Zmiany te wydają się więc jedną z ważnych kwestii dotyczących patologii sporadycznej postaci AD, a także warto zwrócić uwagę na wzajemne powiązania pomiędzy higieną snu a funkcjonowaniem układu limfatycznego.

Wśród następnych przyczyn prowadzących do rozwoju sAD wymieniane są także: urazy głowy, kontakt z aluminium oraz niewłaściwą dietą (Armstrong, 2013). Warto dodać, że podwyższone stężenie osoczowego  $\beta$ A 1-40 i 1-42 związane jest z zakażeniem takimi bakteriami jak *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, a w hipokampie i płacie skroniowym pacjentów z AD znaleziono podwyższony poziom bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS). Inne bakterie np. *Enterobacteria species* i grzyby mogą produkować peptydy/włókna amyloidowe, odkładające się między innymi w mózgu.

Czynnikami ryzyka rozwoju sAD jest kontakt z takimi wirusami jak wirus ospy wietrznej, cytomegalowirus i wirus opryszczki typu 1. Dysbioza jelitowa może wpływać także na plastyczność synaptyczną poprzez oddziaływanie na receptory takich związków jak N-metylo-D-asparaginian (NMDA), serotonina oraz neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) (Pluta i wsp., 2020). Bakteria *Porphyromonas gingivalis* która jest obecna w płytce nazębnej posiada właściwości zaburzające fagocytozę. Może to doprowadzić do lokalnego zapalenia w jamie ustnej, podczas którego komórki układu odpornościowego np. limfocyty T powodują uwalnianie pro-zapalnych cytokin np. IL-1, TNF- $\alpha$ , angażując w tę reakcję zapalną coraz więcej elementów układu odpornościowego np. neutrofile, makrofagi, co może przerodzić się w ogólnoustrojowe zaburzenie poprzez uwolnienie czynników pro-zapalnych do krwiobiegu. W mózgach pacjentów z AD znaleziono LPS (składnik błony bakterii gram-ujemnych) w większych ilościach niż w mózgach osób z grupy kontrolnej, przy czym był on zlokalizowany w pobliżu blaszek starczych i dookoła naczyń krwionośnych w mózgu. Badania na zwierzętach wykazały, że obwodowe podanie LPS aktywuje komórki mikrogleju, co wspiera pro-zapalną reakcję, w tym produkcję związków pro-zapalnych, a w kontekście AD formowanie splotków neurofibrylarnych oraz wzrost poziomu  $\beta$ A (Liccardo i wsp., 2020). Podsumowując, zakażenie bakteryjne może doprowadzić do zmiany stopnia zapalenia z lokalnego na ogólnoustrojowe, a ono może być przyczynkiem do rozwoju sAD.

U osób niedożywionych z jednej strony zwrócono uwagę, że niedobór białkowo-kaloryczny (z uwzględnieniem niedoborów magnezu i wapnia) może być przyczyną powstania splotków neurofibrylarnych, a z drugiej strony trzeba zwrócić uwagę na to czy stan psychiczny pacjenta z AD nie jest pierwotną przyczyną obserwowanego niedożywienia. Jednak jak pokazują badania u ludzi z mutacją w genie *APP*, to osoby cierpiące już na AD mają większe niedobory witaminy B12 niż osoby zdrowe, przy czym nie jest to efekt niedożywienia, a takie braki związków odżywczych mogą prowadzić do zmniejszonej produkcji neuroprzekaźników (Armstrong, 2013). Ponadto subkliniczne niedobory witaminy B12 stwierdzono u 15% 60-latków, jak również u 35% 80-latków. Warto także dodać, że witamina B12 wykazuje działanie antyoksydacyjne, więc jej niedobory mogą prowadzić do rozwoju stresu oksydacyjnego. Wspominana tutaj kobalamina swoje dobroczynne właściwości realizuje między innymi przez stymulację produkcji czynników wzrostu, cytokin i jest także kofaktorem syntazy metioniny, która przekształca homocysteinę (szkodliwą w zbyt wysokim stężeniu) w metioninę (Lauer i wsp., 2022).

Ponadto w mózgach osób z AD (*post mortem*) stwierdzono podwyższoną zawartość cholesterolu związaną z płytkami starczymi, a podwyższone stężenie w osoczu tego związku

w ciągu życia jest ryzykiem rozwoju AD. Cholesterol promuje agregację  $\beta$ A oraz jego właściwości toksyczne, między innymi poprzez stymulację  $\alpha$ ,  $\beta$ -sekretaz. Uważa się też, że nadmierne stężenie homocysteiny związane jest z ryzykiem rozwoju AD. U pacjentów z AD stwierdzono podwyższone stężenie tego aminokwasu w płynie mózgowo-rdzeniowym. Homocysteina swoje negatywne działanie manifestuje poprzez uszkodzenia neuronów i BBB, wzmacnia agregację i toksyczność  $\beta$ A oraz generuje stres oksydacyjny (Lauer i wsp., 2022).

Związek rozwoju sAD po kontakcie z aluminium pozostaje jeszcze niejednoznaczną kwestią. Istnieją dowody naukowe, że mózgi pacjentów z AD zawierały więcej aluminium jednak nie zawsze zmiana osiągnęła poziom istotności statystycznej. Jednakże, kontakt z tym związkiem powodowałby wiązanie go do DNA, zaburzając tym samym formowanie cytoszkieletu komórki, a w końcu powstanie splątków neurofibrylarnych (Armstrong, 2013).

### **1.10. Modele zwierzęce choroby Alzheimera (AD)**

Obecnie istnieje wiele modeli zwierzęcych odzwierciedlających zmiany, które powstają w przebiegu AD. Można podzielić je na spontaniczne, genetyczne oraz interwencyjne. Spontaniczne modele zwierzęce, to takie, gdy u zwierzęcia samoistnie rozwiną się symptomy/cechy charakterystyczne przypominające objawy AD np. u pawianów stwierdzono wystąpienie splątków neurofibrylarnych, a u makaków pojawienie się złogów  $\beta$ A. Jednak ze względu na wiele czynników jak długi czas życia zwierzęcia i niski potencjał reprodukcyjny ich wykorzystanie jest ograniczone lub stosuje się dodatkowe manipulacje przyspieszające rozwój choroby np. iniekcje  $\beta$ A. Modele genetyczne natomiast odzwierciedlają mutacje DNA jakie spotyka się u osób cierpiących na fAD. U szczurów oraz myszy wprowadza się zmutowane ludzkie geny związane z fAD, z tego względu że u gryzoni nie stwierdzono samoistnie rozwijającej się tej choroby. Pierwszy model tego typu został wyindukowany u myszy (PDAPP model) przez zespół Games'a, a efekty tej pracy opublikowano w 1995r. Zwierzęta te charakteryzowały się mutacją w miejscu cięcia  $\gamma$ -sekretazy białka A $\beta$ PP, a objawy jakie u nich stwierdzono to obecność złogów amyloidowych w 6-9. miesiącu życia oraz zaburzenia pamięci przestrzennej. Przykładowymi innymi modelami genetycznym są myszy TgCRND8, APP/PS1, 3x-TgAD oraz szczury Tg478/Tg1116 jak i PSAPP (Tg478/Tg1116/Tg11587) (Chen i Zhang, 2022).

Dla przykładu zwierzęta 3x-TgAD są jednym z częściej wykorzystywanych mysich modeli fAD. U zwierząt tych dokonano zmiany w DNA, polegającej na wprowadzeniu genów odpowiadających za patologiczne zmiany fAD obserwowane u ludzi, a wykorzystano do tego

konkretnie dwa niezależne geny *APP<sup>Sw</sup>* oraz *tau<sup>P301L</sup>*. U zwierząt tych w 6. miesiącu życia, stwierdzono dłuższą latencję znalezienia platformy oraz zmniejszony odsetek przebywania w kwadrancie krytycznym w teście labiryntu wodnego Morrisa, a zatem zaobserwowano nieprawidłowości w funkcjonowaniu pamięci przestrzennej. W teście otwartego pola u tych gryzoni w 3. miesiącu życia stwierdzono krótszy pokonany dystans w wewnętrznych polach testu w porównaniu do zwierząt dzikiego typu, a w 6. miesiącu życia obniżony całkowity pokonany dystans oraz ogólnie obniżoną aktywność ruchową w płaszczyźnie wertykalnej i horyzontalnej. Z kolei w mózgu w 11-15 miesiącu życia tych osobników stwierdzono obniżoną liczbę neuronów w korze mózgowej i hipokampie oraz zredukowaną gęstość tych komórek. Co więcej, u takich zwierząt obecność  $\beta$ A została stwierdzona w korze już w 3. miesiącu życia, a w hipokampie w 6. miesiącu życia. Ponadto u myszy z tym modelem stwierdzono inne klasyczne objawy fAD jak pojawienie się splotków neurofibrylarnych w mózgu, obniżoną gęstość synaps, zwiększoną aktywność mikrogleju oraz astrocytów (Tian i wsp., 2023).

Z kolei szczury Tg478/Tg1116 to zwierzęta które charakteryzują się nadmiernym odkładaniem  $\beta$ A w mózgu, jednak dopiero w wieku ok. 17-18 miesięcy dochodzi u nich do wytworzenia płytek starczych, zbudowanych z tego białka. Z tego względu do już dwóch istniejących mutacji genetycznych jakie obecne są w organizmie tych zwierząt wprowadzono trzecią mutację: ludzkiego genu preniliny. Tak zmodyfikowane szczury, określane mianem PSAPP (Tg478/Tg1116/Tg11587), posiadały rozproszone blaszki amyloidu w różnych częściach mózgowia jak hipokamp, podwzgórze, wzgórze, kora mózgowa i opuszka węchowa w 9. miesiącu życia (Do Carmo i Cuello, 2013).

Modele interwencyjne opierają się na wprowadzeniu jakiegoś czynnika, który w organizmie zwierzęcym doprowadza do powstania objawów charakterystycznych dla AD. Przykładami takich modeli jest podawanie diety bogatej w cholesterol, podawanie akroleiny lub mikroiniekcje streptozotocyny do komór bocznych mózgu (Zhang i wsp., 2020).

### **1.11. Charakterystyka streptozotocyny-związku indukującego model sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD)**

Streptozotocyna (STZ) to antybiotyk produkowany przez bakterie glebowe *Streptomyces achromogenes*, o strukturalnym podobieństwie do glukozy (Grieb, 2016; Kamat i wsp., 2016). Efekty swojego działania wywiera w tkankach, zawierających receptor dla glukozy typu 2 (GLUT2), jednak inne receptory z tej rodziny czyli GLUT1, GLUT3 i GLUT4

nie transportują tego związku (Kamat i wsp., 2016). Transporter GLUT2 można spotkać w wielu miejscach ustroju, dlatego STZ może uszkadzać działanie wielu tkanek i narządów np. trzustki, mózgu, wątroby oraz nerek. Warto dodać, że BBB nie zawiera tego transportera, dlatego STZ nie ma bezpośredniego uszkadzającego wpływu na mózgowie, a jedynie może wywierać swoje działanie, gdy zostanie bezpośrednio podana do OUN. Negatywne działanie tej substancji wykorzystywane jest do modelowania u zwierząt takich chorób jak cukrzyca 1 i 2 typu oraz sAD. Podanie jej dożylnie lub dootrzewnowo w dawce 40-60 mg/kg lub większej stanowi model cukrzycy typu 1, natomiast dawka 35 mg/kg bądź mniejsza pozwala uzyskać model cukrzycy typu 2 (Grieb, 2016). Z kolei mikroiniekcja STZ w dawce diabetogennej (3 mg/kg) do komór bocznych mózgu (ICV), jest metabolicznym odzwierciedleniem zmian zachodzących w przebiegu choroby Alzheimera (Grieb, 2016; Kamat i wsp., 2016). W OUN po podaniu tego związku, zaobserwowano między innymi obniżenie liczby neuronów i zaburzenie neurogenezy w hipokampie, zaburzenia działania szlaków cholinergicznym manifestujące się obniżeniem aktywności ChAT syntetyzującej Ach oraz zwiększeniem aktywności enzymu rozkładającego ją czyli esterazy acetylocholinowej (AChE), obecnością złogów  $\beta$ A oraz pojawieniem się stresu oksydacyjnego, obniżonym metabolizmem glukozy, a także insulinoopornością mózgu (Salkovic-Petrisic i Hoyer, 2007; Salkovic-Petrisic i wsp., 2011, 2013; Sun i wsp., 2015; Zhang i wsp., 2019).

Po podaniu STZ do komór bocznych mózgu (ICV-STZ) zauważono, podobnie jak w przebiegu sAD u ludzi, pojawienie się patologicznych form  $\beta$ A. Nasze badania wykazały, że  $\beta$ A pojawia się w hipokampie (obszary: CA1, CA2, CA3, DG) i korze mózgowej (czołowa, ciemieniowa, skroniowa) także 6,5 miesiąca po ośrodkowej iniekcji STZ (Majkutewicz i wsp., 2024). Inni badacze stwierdzili obecność złogów  $\beta$ A w naczyniach włosowatych opon mózgowych 3-ce miesiące po podaniu ICV-STZ, a także w hipokampie, podwzgórzu, wzgórzu oraz przylegających oponach mózgowych 6 oraz 9 miesięcy po indukcji modelu sAD (Salkovic-Petrisic i wsp., 2006; 2011). Knezovic i wsp., (2015) wykazali, że akumulacja wewnątrzkomórkowego  $\beta$ A (1-42) pojawia się 3 miesiące po iniekcjach ICV-STZ, a obecność rozproszonego  $\beta$ A (1-42) z dodatnim tworzeniem blaszek starczych 6 miesięcy po podaniu STZ w hipokampie i korze nowej. Ponadto Pierzynowska i wsp., (2019) znaleźli złogi  $\beta$ A w korze ciemieniowo-skroniowej już po miesiącu od podaniu ICV-STZ. Co więcej za pomocą metody western-blot kolejny zespół badawczy wykrył także obecność  $\beta$ A w hipokampie już nawet 30 dni po iniekcji STZ (Andrade i wsp., 2023), a jeszcze inni naukowcy stwierdzili, że u myszy po ośrodkowym podaniu STZ gęstość optyczna  $\beta$ A 2 tygodnie po podaniu tej neurotoksyny była wyższa o 78% w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Ravelli i wsp., 2017).

Podanie STZ wywołuje też zmiany behawioralne. U zwierząt z modelem sAD stwierdzono wystąpienie lęku, który przejawiał się zmniejszonym czasem przebywania w bardziej stresowych wewnętrznych kwadratach otwartego pola, krótszym pokonanym dystansem i zmniejszoną liczbą przekroczonych krawędzi kwadratów podczas wykonywania tego testu w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (Pierzynowska i wsp., 2019). Ponadto w przebiegu tej choroby wystąpiła hiperaktywność lokomotoryczna mierzona w aktometrze i w teście otwartego pola (Pierzynowska i wsp., 2019). Stwierdzono także zaburzone funkcjonowanie pamięci przestrzennej zarówno referencyjnej jak i roboczej. W teście MWM zwierzęta z modelem sAD charakteryzowały się dłuższą latencją znalezienia platformy, wydłużonym przepłyniętym całkowitym dystansem oraz krótszym czasem spędzonym w kwadrancie krytycznym basenu w porównaniu do grupy kontrolnej (Majkutewicz, 2016; Pierzynowska i wsp., 2019).

#### **1.12. Charakterystyka behawioralna zwierząt a osobnicza wrażliwość na stres**

Jedną z kluczowych kwestii na którą trzeba zwrócić uwagę podczas szukania przyczyn i skutecznego leczenia sAD jest charakterystyka behawioralna osobników. U szczurów skutecznym i wielokrotnie stosowanym modelem podziału jest aktywność ruchowa w nowym środowisku (novelty test), która pozwala podzielić osobniki na: HR (high responders) - czyli zwierzęta wysokoaktywne ruchowo, którym przypisuje się wyższą wrażliwość na stres oraz LR (low responders) - zwierzęta niskoaktywne ruchowo w nowym środowisku, którym przypisuje się niższą wrażliwość na stres (Piazza i wsp., 1991a; 1993; 1996). Warto wspomnieć, że osobniki HR wykazują się wyższą aktywnością ruchową, w nowym środowisku, w 2h teście, która widoczna jest nawet w 16-tym miesiącu życia gryzonia (Dellu i wsp., 1996). Zatem koncept zwrócenia uwagi na aktywność behawioralną wydaje się ważną kwestią, a taki podział zwierząt, pozwolił zbadać wiele różnic pomiędzy tymi populacjami zwierząt.

Wykryto między innymi, że zwierzęta HR i LR różnią się aktywnością enzymu  $Na^+/K^+$ -ATP-azy, odpowiedzialnej za przenoszenie jonów w poprzek błony komórkowej oraz wychwyt i uwalnianie neuroprzekazników. U zwierząt HR aktywność tej pompy była wyższa niż u zwierząt LR. Badacze sugerują, że zróżnicowanie to jest wrodzone i może być podłożem odmiennych zachowań behawioralnych pomiędzy tymi osobnikami (Alves i wsp., 2005).

W teście jasnego/ciemnego pomieszczenia to osobniki HR szybciej i częściej wchodziły do oświetlonej przestrzeni, ponadto wykazują się większą aktywnością lokomotoryczną w tym teście niż zwierzęta LR (Dellu i wsp., 1996; Kabbaj i wsp., 2000). W kontekście sytuacji

stresowej wykazano, że osobniki HR są zwierzętami bardziej stresowrażliwymi. U tych szczurów stwierdzono wyższe stężenie hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) i kortykosteronu (KORT) czyli sztandarowych hormonów stresowych, niż u osobników LR, a tym samym mają bardziej aktywną oś HPA (Cools i Gingras, 1998). Warto dodać, że w warunkach bazalnych (nie stresowych) osobniki HR mają również wyższe stężenie ACTH, ale niższe KORT (Cools i Gingras, 1998) niż zwierzęta LR. W badaniach wykazano, że po 2 godzinnym przebywaniu w nowym środowisku stężenie KORT w osoczu u osobników LR wynosiło około 50 ng/ml (było mniej więcej takie samo jako bazowe stężenie), a u szczurów HR stężenie to wynosiło nawet 200 ng/ml (Piazza i wsp., 1991a; Dellu i wsp., 1996). Ponadto stres u osobników HR aktywuje ciało migdałowate, a hamuje impulsy z hipokampa, gdzie u LR zaobserwowano odwrotną reakcję (Cools i Gingras, 1998). W warunkach krótkotrwałego stresu, którym było 10 minutowe uciśnięcie ogona, u osobników HR, aktywność projekcji dopaminergicznych do jądra półleżącego była podwyższona nawet 2h po tym zdarzeniu, a u osobników LR wróciła do bazalnej koncentracji już po 1h (Dellu i wsp., 1996). Ogólnie KORT powoduje większy wzrost aktywności neuronów dopaminergicznych w OUN u osobników HR niż u szczurów LR (Piazza i wsp., 1996). Inne badania, dotyczące oceny mechanizmów radzenia sobie ze stresem, którym w tym wypadku był szok elektryczny (4 mA) serwowany przez sondę elektryczną, wykazały w teście obronnego zakopywania, że zwierzęta HR wykazały proaktywny styl radzenia sobie ze stresem - zakopywanie sondy, a LR charakteryzował reaktywny styl radzenia - bezruch. Badacze zauważyli, że u osobników HR w tej sytuacji, doszło do mocniejszej aktywacji neuronalnej w serotoninericznym grzbietowym jądrze szwu, zwłaszcza w części grzbietowo-ogonowej (cDRD), a właśnie ta struktura przesyła impulsy do przegrody środkowej, hipokampa oraz ciała migdałowatego, wyciągnięto więc wniosek, że różnica w transmisji serotoninericznej jest przyczyną odmiennych sposobów radzenia sobie ze stresem (Cohen i wsp., 2017). W teście Porsolta, wykonywanym w sposób chroniczny, wykazano, że u osobników HR dochodziło do większego obniżenia aktywności ruchowej i większego spadku masy ciała niż u LR. Ponadto, w mózgach zwierząt HR, po takim stresie, zauważono gęściej zlokalizowane, w zakręcie zębatym hipokampa, komórki wykazujące ekspresję kaspazy 3 (proteaza zaangażowana w szlak apoptozy mitochondrialnej) niż u osobników LR. Potwierdza więc to, że osobniki HR są zwierzętami bardziej wrażliwymi na warunki stresowe (Lehner i wsp., 2015). Porażka socjalna ma także wpływ na późniejsze zachowania u omawianych podtypów zwierząt (HR vs. LR). U osobników HR po takiej porażce zaobserwowano wydłużony czas immobilizacji w teście wymuszonego pływania oraz obniżoną masę ciała. Na poziomie neuronalnym zaobserwowano,

że u zwierząt HR a nie u LR zmniejsza się stosunek receptorów MR dla hormonów steroidowych w hipokampie. Ponadto w czasie dochodzenia do równowagi po porażce socjalnej, u szczurów HR stwierdzono wyższe stężenie kortykosteronu niż u osobników LR. Wydaje się więc, że zmiany dotyczące receptorów dla hormonów stresowych w OUN korelują z opóźnioną inaktywacją zahamowania reakcji na stres (Calvo i wsp., 2011). W teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) to zwierzęta HR spędzały więcej czasu w ramionach otwartych oraz centrum labiryntu (Kabbaj i wsp., 2000) niż zwierzęta LR. Chroniczne, podskórne podawanie KORT, spowodowało skrócenie czasu spędzanego w centralnych polach testu otwartego pola i liczbę wejść do nich u zwierząt HR w porównaniu do zwierząt o takiej samej charakterystyce behawioralnej, ale nie otrzymującej tego hormonu. U zwierząt LR nie zaobserwowano takich zmian. Dodatkowo u zwierząt HR rozwinięcie lękowych zachowań było powiązane z spadkiem ekspresji dla podjednostki  $\alpha 2$  receptora kwasu gamma-aminomasłowego (GABA-A), regulującej zachowania lękowe oraz depresyjne, w korze przedczołowej oraz wzrostem jej w jądrach podstawno-bocznych ciała migdałowatego. Zatem to zwierzęta HR są bardziej podatne na prołękowe właściwości działania KORT, a różnice pomiędzy tymi populacjami szczurów wynikają prawdopodobnie z różnic w funkcjonowaniu układu GABA-ergicznego i powiązań przez ten układ z osią stresową (oś HPA) (Skórzewska i wsp., 2014). Ponadto osobniki HR są bardziej wrażliwe na wzmacniające działanie KORT rozumiane np. jako szybsze (przy niższych dawkach) wykształcenie samopodawania substancji (Piazza i wsp., 1993). Po krótkotrwałym stresie (30 minutowe uciśnięcie ogona) stwierdzono większą zawartość/uwalnianie NE w hipokampie zwierząt HR w porównaniu do osobników LR (Rosario i Abercrombie, 1999). Zwierzęta HR posiadają wyższy wskaźnik masy nadnerczy na 100g masy ciała niż osobniki LR (Lemaire i wsp., 1999).

Liczba komórek układu odpornościowego również jest nieco odmienna u tych dwóch typów behawioralnych (HR vs. LR). Zwierzęta HR posiadają we krwi wyższą liczbę limfocytów B, Th, niższą limfocytów T (ogólna populacja). Z kolei w śledzience osobniki HR posiadają niższą liczbę komórek NK, niższy stosunek limfocytów Th1/Th2, a wyższą liczbę limfocytów supresorowych niż zwierzęta LR. W zaburzeniach chorobowych, które aktywują silnie układ odpornościowy, to zwierzęta HR posiadają wyższy poziom przeciwciał IgE przeciwko pasożytom, a są mniej podatne na zaburzenia alergiczne niż szczury LR (Cools i Gingras, 1998).

U tych populacji zwierząt zauważono odmienne reagowanie na substancje chemiczne. HR są bardziej wrażliwe na terapię z zastosowaniem agonistów dopaminergicznych, natomiast LR są bardziej wrażliwe na substancje przeciwpsychotyczne (Cools i Gingras, 1998). Co

ciekawe gdy zwierzętom podawane są związki o potencjale uzależniającym np. etanol, amfetamina, kokaina to HR są bardziej wrażliwe na te substancje w kontekście behawioralnym np. poprzez rozwinięcie szybciej mechanizmu samopodowania (Piazza i wsp., 1991a; Cools i Gingras, 1998).

Aktywność dopaminergiczna układu mezo-kortykolimbicznego została zmierzona w różnych regionach mózgu. Osobniki HR miały niższy stosunek kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC - metabolitu dopaminy) do samej dopaminy w korze mózgowej, a wyższy w jądrze półleżącym niż osobniki LR (Dellu i wsp., 1996). Zwierzęta HR i LR różnią się także poziomem neurogenezy. W zakręcie zębatym hipokampa u osobników HR stwierdzono mniejszą liczbę komórek znakowanych 5-bromo-2'-deoksyurydyną (BrdU, tu marker nowopowstałych neuronów) w porównaniu do zwierząt LR (Lemaire i wsp., 1999).

Zauważono także, że spożycie pokarmów u zwierząt HR i LR jest na podobnym poziomie w warunkach standardowych, jednak po okresie głodzenia to zwierzęta HR szybciej i bardziej kompulsywnie spożywają pokarm. W przypadku spożycia wody wykazano, że osobniki HR spożywają ten płyn kompulsywniej niż zwierzęta LR, a polidypsja może być związana z sytuacją stresową u tych zwierząt (Dellu i wsp., 1996).

Wykazano także w teście labiryntu promieniowego (radial maze), że osobniki HR uczą się szybciej niż zwierzęta LR (Cools i Gingras, 1998). W labiryncie wodnym Morrisa, u osobników HR które wcześniej zostały poddane socjalnemu stresowi, zauważono dłuższą latencję dopłynięcia do platformy oraz niższy odsetek spędzonego czasu w krytycznym kwadrancie basenu w stosunku do zwierząt HR z grupy niezestresowanej. U osobników LR nie zauważono takich zmian, zatem to zwierzęta HR w warunkach stresowych charakteryzują się pogorszeniem pamięci przestrzennej (Touyarot i wsp., 2004).

Po podawaniu pemoliny (pośredni agonista monaminowy) u zwierząt rozwinął się behawior samouszkodzający (obrzęk, zdarta skóra, rumień, otwarte uszkodzenie). Szczury HR spędzały więcej czasu na samookaleczaniu się, miały więcej miejsc uszkodzonych, większy obszar uszkodzenia niż osobniki LR, ponadto próbę okaleczania się podjęło 100% szczurów HR, a jedynie 56% osobników LR (Muehlmann i wsp., 2011).

### **1.13. Insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1) i rodzina białek IGF**

Insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1) jest jednym z elementów rodziny IGF. Oprócz niego w skład tego układu wchodzi: insulinopodobny czynnik wzrostu-2 (IGF-2), ich receptory IGF-1R, IGF-2R, receptor dla insuliny (IR) oraz białka wiążące (IGFBP) (Le Roith,

2003; O’Kusky i Ye, 2012). IGF-1 swoje działanie realizuje na drodze endokrynej, parakrynej i autokrynej przyczyniając się do wzrostu oraz proliferacji komórek oraz syntezy białek (Le Roith i wsp., 2021).

IGF-1 jest peptydem anabolicznym, zbudowanym z 70 aminokwasów, pomiędzy którymi w miejscach 6-48, 18-61 oraz 47-52 występują trzy wiązania disiarczkowe, przyczyniające się do utworzenia trzeciorzędowej struktury związku, służącej do optymalnego związania się z receptorem (O’Kusky i Ye, 2012; Bailes i Soloviev, 2021). Związek ten został po raz pierwszy opisany przez Salmon’a i Daughaday’a w 1957r., gdzie oryginalnie nazywany był somatomedyną C (Le Roith i wsp., 2021). IGF-1 produkowany jest głównie w wątrobie pod wpływem hormonu wzrostu (GH), ale jego produkcja zależna jest także od insuliny lub stopnia odżywienia organizmu (Le Roith, 2003; O’Kusky i Ye, 2012; Lewitt i Boyd, 2019; Le Roith i wsp., 2021). Ponadto na poziomie lokalnym inne substancje przyczyniają się do wzrostu mRNA tego peptydu np. w komórkach tarczycowych tyreotropina (TSH), a w osteoblastach estradiol zwiększa taką syntezę (Le Roith, 2003). Jego obecność została stwierdzona także w mózgu, gdzie był syntetyzowany przez neurony, astrocyty, mikroglej i oligodendrocyty (Lobie i wsp., 2000; O’Kusky i Ye, 2012). Warto dodać, że substancja ta posiada zdolność migrowania przez BBB, dzięki czemu może realizować swoje funkcje. W czasie krążenia w organizmie IGF-1 występuje w 3 postaciach: wolnej, związanej z białkiem wiążącym lub związany jednocześnie z białkiem wiążącym i kwasolabilną podjednostką (ALS). W zależności od stopnia złożoności kompleksu okres półtrwania IGF-1 wydłuża się (Lewitt i Boyd, 2019). Około 90% IGF-1 który krąży po organizmie stanowi połączenie z IGFBP-3 oraz ALS (Józefiak i wsp., 2008). Okres półtrwania we krwi wolnego IGF-1 trwa 10 min., w połączeniu z białkiem wiążącym IGFBP-3 czas ten wydłuża się do 4h, natomiast gdy dodatkowo złączony jest z ALS okres ten wydłuża się do 15 godzin (Józefiak i wsp., 2008; Filus i Zdrojewicz, 2014; Bach, 2018).

Białek wiążących IGF (IGFBP) zidentyfikowano dziesięć: sześć o wysokim stopniu powinowactwa oraz cztery o niskim stopniu powinowactwa (O’Kusky i Ye, 2012). Prawie 100% krążącego IGF-1 oraz IGF-2 znajduje się w kompleksie z tymi białkami. IGFBP-1 łączy się zarówno z IGF-1 i IGF-2 z takim samym powinowactwem (Bach, 2018). Białko to wiąże IGF głównie w płynie owodniowym człowieka (Filus i Zdrojewicz, 2014), gdzie poprzez inhibicje ich działań reguluje wzrost płodu (Bach, 2018). Ponadto odgrywa ważną rolę w syntezie białek mięśni szkieletowych, reguluje metabolizm i zaburzenia związane z cukrzycą (Song i wsp., 2021). IGFBP-2 wiąże silniej IGF-2 niż IGF-1 (Bach, 2018). Jest on głównym białkiem wiążącym IGF w płynie mózgowo-rdzeniowym i nasieniu (Filus i Zdrojewicz, 2014).

Ponadto reguluje poziom lipidów we krwi, gdzie wzrost stężenia tego białka redukuje zawartość lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) (Song i wsp., 2021). W OUN jest czynnikiem neurotroficznym, a obecność jego podwyższonego stężenia we krwi obwodowej jest czynnikiem świadczącym o zwiększonym ryzyku demencji lub AD (Song i wsp., 2021). IGFBP-3 jest głównym białkiem wiążącym IGF w surowicy krwi. Wiąże z takim samym powinowactwem IGF-1 i IGF-2, ale jest to najważniejsze białko wiążące IGF-1 (Filus i Zdrojewicz, 2014; Bach, 2018). Jego zredukowane stężenie w obecności podwyższonego stężenia insuliny jest związane ze zwiększonym wystąpieniem nowotworu płuc u palaczy, ponieważ między innymi hamuje angiogenezę i wzrost guzów. Z drugiej strony jest czynnikiem pro-nowotworowym, ponieważ jego wysokie stężenie jest związane z wystąpieniem nowotworu prostaty. Jest także markerem stopnia wytrenowania organizmu (Song i wsp., 2021). IGFBP-4 jest białkiem, które z takim samym stopniem powinowactwa wiąże IGF-1 i IGF-2 (Bach, 2018), a jego działanie polega na hamowaniu procesów zależnych od IGF (Mazerbourg i wsp., 2004). Nadprodukcja tego białka powoduje hipoplazję mięśniową, a także spadek masy aorty, żołądka i pęcherza, a iniekcja tego związku związana jest z zahamowaniem formowania kości (Mazerbourg i wsp., 2004). IGFBP-5 wiąże zarówno IGF-1 jak i IGF-2, jednak częściej łączy się z tym drugim związkiem (Bach, 2018). Jest to najbardziej konserwatywne białko spośród wiążących IGF, które zaangażowane jest między innymi w rozwój płodu oraz różnicowanie komórkowe. Wspomaga osteogenezę, a jego wysokie stężenie związane jest z wyższą masą urodzeniową (Song i wsp., 2021). IGFBP-6 łączy się zarówno z IGF-1 jak i IGF-2, jednak 50-krotnie silniejsze jest połączenie z tą drugą substancją (Bach, 2018). Jest białkiem ważnym dla funkcji odpornościowych ustroju, ponieważ indukuje chemotaksję monocytów i limfocytów T oraz jest białkiem ostrej fazy i odpowiedzi na hipertermię. Ponadto jest czynnikiem pro-zapalnym w OUN, ponieważ promuje powstawanie ROS (Liso i wsp., 2022). Co więcej działa jako czynnik przeciwnowotworowy ponieważ hamuje wzrost i angiogenezę guzów (Song i wsp., 2021). IGFBP-7 jest białkiem o słabym powinowactwie z IGF-1, ponieważ łączy się z nim 100 razy słabszym wiązaniem niż inne białka wiążące. Chętniej łączy się natomiast z insuliną i jest zaangażowany w zaburzenia układu krążenia i wystąpienie cukrzycy. Jego zwiększone stężenie w surowicy krwi zostało stwierdzone u osób z uszkodzeniami serca. Ponadto zaangażowany jest w hamowanie procesów nowotworzenia, dzięki właściwościom hamującym angiogenezę, wzrost komórkowy oraz syntezę protein (Szyszkowska i wsp., 2019). IGFBP-8 w literaturze określane jest też jako białko CTGF lub CCN2 (Michenko i wsp., 2015). Jest to białko o niskim stopniu powinowactwa z rodziną IGF. W warunkach fizjologicznych najwyższa ekspresja tego białka

spotykana jest w tkance kostnej i sercowo-naczyniowej u rozwijającego się zarodka, jednak w okresie postnatalnym także ma ona miejsce. Białko to wspomaga rozwój tkanki chrzęstnej, formowanie tkanki kostnej oraz reguluje proces angiogenezy (Hall-Glenn i Lyons, 2011). IGFBP-9 szerzej znane jest jako białko NOV lub CCN3 (Michenko i wsp., 2015; Henrot i wsp., 2019). Jest to proteina o niskim powinowactwie z IGF. Białko to odgrywa główną rolę w homeostazie melanocytów, gdzie wspomaga ich adhezję. Ponadto działa przeciwko szklakowi profibrotycznemu, a leczenie za pomocą jego rekombinowanej postaci zmniejszyło zwłóknienie kłębuszków nerkowych w mysim modelu cukrzycy (Henrot i wsp., 2019). IGFBP-10 znane jest głównie jako białko CYR61 lub CCN1 (Minchenko i wsp., 2015). Zaangażowane jest w proces fagocytozy komórek apoptotycznych w procesach gojenia ran skóry, naprawę uszkodzeń hepatocytów i indukcję angiogenezy (Kim i wsp., 2018).

Kwasolabilna podjednostka (ALS) jest to białko o masie 100-110 kDa, które w środowisku kwaśnym, poniżej 4,5 pH, traci swoją aktywność. Wiąże się z kompleksami binarnymi np. IGF-1-IGFBP-3, a nie z wolnymi postaciami mediatorów. Przy czym siła wiązania do kompleksu binarnego jest nawet 300-1000 razy słabsza niż wiązanie pomiędzy składowymi kompleksu binarnego. Jej stężenie w osoczu wzrasta raptownie po urodzeniu się. ALS odpowiedzialna jest za utrzymanie optymalnego stężenia związków do których się przyłącza. W zwierzęcym modelu niedoboru ALS stwierdzono łagodne upośledzenie wzrostu organizmu, a u ludzi z tą przypadłością stwierdzono między innymi obniżenie stężenia IGF-1 oraz niewrażliwość na insulinę (Domene i Domene, 2020).

Receptor IGF-1 (IGF-1R) jest heterotetramerem zbudowanym z dwóch zewnątrzkomórkowych podjednostek  $\alpha$ , wiążących IGF-1 oraz dwóch wewnątrzkomórkowych podjednostek  $\beta$ , o aktywności kinazy tyrozynowej (O'Kusky i Ye, 2012). Aktywacja domeny tyrozynowej powoduje uruchomienie przesyłania sygnałów w wielu szlakach komórkowych np. PI3K/Akt lub Raf/MEK/ERK (Bailes i Soloview, 2021). Receptor ten w 46% jest homologiczny z receptorem IR (O'Kusky i Ye, 2012). Co ciekawe receptor dla IGF-1 oraz dwie formy receptora dla insuliny (IRA, IRB) mogą tworzyć hybrydę (IRA/IGF-1-R; IRB/IGF-1-R) w postaci heterodimeru, przez który mogą działać oba związki, jednak jego dokładne znaczenie fizjologiczne nie jest w pełni znane (O'Kusky i Ye, 2012; Lewitt i Boyd, 2019). Ponadto IGF-1 może działać przez standardowy receptor dla insuliny - IR, a insulina może łączyć się z receptorem dla IGF-1. Ekspresja receptora IGF-1R ma miejsce w wielu tkankach organizmu, przez co jest zaangażowany w liczne zachodzące tam procesy (Le Roith i wsp., 2021). W OUN receptor ten zlokalizowany jest np. korze mózgowej, hipokampie, opuszce węchowej, mózdzku, podwzgórzu, splocie naczyniówki w komorach bocznych mózgu i rdzeniu kręgowym

(Nieto-Estevez i wsp., 2016). Receptor IGF-1R może być internalizowany do wnętrza komórki. Poprzez wiązanie DNA reguluje transkrypcję genów, apoptozę i cykl komórkowy (Le Roith i wsp., 2021).

#### **1.14. Rola insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oraz jego wpływ na behavior**

W OUN IGF-1 poprzez wpływ na metabolizm glukozy, zaangażowany jest w wiele kluczowych procesów tj neuroprotekcję, neuroregenerację, neurogenezę, synaptogenezę, wspieranie komórek glejowych i nerwowych, neuroplastyczność, angiogenezę oraz regulację tworzenia śladu pamięciowego, a także działa jako związek przeciwłękowy (Herrera i wsp., 2024; Aguiar-Oliveira i wsp., 2025).

IGF-1 wspiera proliferację komórek nerwowych poprzez aktywację szlaku PI3K/Akt lub kinazy MAPK. Wzrost proliferacji komórek stwierdzony został np. w opuszce węchowej i zakręcie zębatym hipokampa. IGF-1 wspiera również proliferację komórek nie-neuronowych w mózgu tj. oligodendrocytów i astrocytów, poprzez wpływ na różnicowanie neuronalnych komórek progenitorowych, w warunkach homeostazy bądź też po urazie tkanki nerwowej (Nieto-Estevez i wsp., 2016). Warto dodać, że astrocyty zdolne są do produkcji IGF-1, a taka synteza chroni komórki nerwowe przed stresem oksydacyjnym i wspiera po urazach. Sam IGF-1 również oddziałuje na astrocyty np. poprzez regulację ich metabolizmu glukozy oraz hamowanie przez nie produkcji mediatorów zapalenia (Labandeira-Garcia i wsp., 2017). IGF-1 promuje przeżycie komórek poprzez zahamowanie apoptozy. Taki efekt udało się zaobserwować np. w komórkach kory mózgowej, motoneuronach oraz neuronach Purkinjego (Nieto-Estevez i wsp., 2016). Podwyższona ekspresja IGF-1 w mysich neuronach kory mózgowej spowodowała zwiększoną proliferację neuronów w okresie życia embrionalnego, a to z kolei spowodowało zmniejszenie odsetka komórek apoptotycznych w późnym okresie prenatalnym i wczesnym okresie postnatalnym (Hodge i wsp., 2007).

IGF-1 wspiera również proces neurogenezy w dorosłym mózgu. Odbywa się to poprzez wspieranie różnicowania komórek lub procesu migracji neuronów np. w opuszce węchowej z udziałem szlaku PI3K (Nieto-Estevez i wsp., 2016). Stwierdzono, że nadekspresja tej neurotrofiny przyczynia się do wyższej liczby neuronów w mózgu, a zaburzenia na poziomie genetycznym dla tego związku lub jego receptora związane są z zahamowaniem wzrostu mózgowia (Anderson i wsp., 2002). U starzejących się szczurów podanie IGF-1 do komór

bocznych mózgu spowodowało 3-krotne zwiększenie tempa neurogenezy w zakręcie zębatym hipokampa (Lichtenwalner i wsp., 2001).

Poprzez wpływanie na aktywność mikrogleju (przez szlak TLR4/NF- $\kappa$ B) oraz astrocytów IGF-1 wykazuje swoje przeciwzapalne działanie (Herrera i wsp., 2024). Neurotrofina ta wspiera ponadto przekształcenie mikrogleju w przeciwzapalny fenotyp M2, przy jednoczesnym zahamowaniu substancji promujących indukcję fenotypu M1 np. TNF- $\alpha$  (Labandeira-Garcia i wsp., 2017). Po podaniu do komórek bocznych mózgu samic szczurów wektora z genem IGF-1 stwierdzono w prążkowiu zwiększoną liczbę komórek z dodatnim sygnałem dla arginazy-1 czyli enzymu związanego z przekształceniem się mikrogleju w fenotyp M2 (Falomir-Lockhart i wsp., 2022).

IGF-1 ponadto wpływa na działanie/metabolizm mitochondriów co zapobiega rozprzestrzenieniu się stresu oksydacyjnego. Swoje działanie wywiera poprzez wzmacnianie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), która katalizuje przekształcanie rodników ponadtlenkowych w mniej szkodliwe cząstki, a także wspiera działanie enzymów glutationowych przez co poprawia działanie ochronne komórki (Herrera i wsp., 2024). Co więcej niska sygnalizacja IGF-1 związana jest z większą produkcją ROS, zaburzoną produkcją ATP oraz pracy mitochondriów, jak również zwiększoną podatnością na działanie stresu oksydacyjnego (Zegarra-Valdivia i wsp., 2025). IGF-1 chroni również neurony dopaminergiczne przed stresem oksydacyjnym, przyczyniając się do zapobiegania neurodegeneracji (Aguiar-Oliveira i wsp., 2025).

Insulinopodobny czynnik wzrostu-1 reguluje również behavior. Związek ten posiada właściwości antydepresyjne (Szczęsny i wsp., 2013). Badacze podkreślają jednak, że działanie IGF-1 w tym zaburzeniu może być odmienne w ośrodku jak i na obwodzie. U pacjentów z depresją w osoczu stwierdzono podwyższone stężenie tego mediatora, które zmniejszało się po leczeniu za pomocą antydepresantów, natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym terapia podwyższała takie stężenie. Z drugiej strony obwodowe podanie IGF-1 powodowało wystąpienie efektów antydepresyjnych (Levy i wsp., 2018). U zwierząt poddanych stresowi prenatalnemu, iniekcja IGF-1 do komórek bocznych mózgu, spowodowała zmniejszenie behavioru depresyjnego, rozumianego jako zwiększony czas wspinania oraz zmniejszony czas bezruchu w teście wymuszonego pływania (Basta-Kaim i wsp., 2014). Ponadto przy analizowaniu wpływu IGF-1 na przebieg zaburzeń depresyjnych należy wziąć pod uwagę, że jest to choroba wieloczynnikowa, a poziom IGF-1 zależy będzie od wielu czynników jak np. płeć, wiek, terapia, przebieg choroby oraz fluktuacje białek wiążących (Levada i Troyan, 2017).

IGF-1 działa również przeciwłękowo oraz wpływa na wygaszanie pamięci strachu (Baldini i wsp., 2013; Maglio i wsp., 2021). Podskórne podanie IGF-1 w młodym wieku, przyczynia się do obniżenia zachowań lękowych u dorosłych szczurów, rozumianych jako wzrost odsetka udziału wejść i czasu przebywania w otwartych ramionach labiryntu EPM (Baldini i wsp., 2013). IGF-1 w oreksynowych neuronach, które są zaangażowane w regulację nastroju, odpowiedź na stres i strach, zwiększa defosforylację podjednostki receptora GABA B przez hamowanie kinazy AMPK, a z kolei hamowanie kinazy AMPK naśladowało działanie IGF-1, co w konsekwencji redukowało zachowania lękowe w zwierzęcym modelu stresu pourazowego (Fernandez de Sevilla i wsp., 2022).

IGF-1 wpływa również na pamięć. U starszych myszy (15 i 18 miesięcznych) z modelem inaktywacji produkcji IGF-1 zaobserwowano upośledzenie pamięci przestrzennej rozumianej jako dłuższy czas latencji znalezienia platformy w teście MWM (Svensson i wsp., 2006). U myszy, którym podawano IGF-1 donosowo, zaobserwowano, że polepszyła się pamięć robocza w teście Y-maze, a także pamięć wizualno-przestrzenna podczas testów rozmieszczenia i rozpoznawania obiektów. Neurotrofina te korzystne działanie na pamięć wywiera poprzez zwiększanie poziomu neurogenezy w zakręcie zębatym hipokampa (Farias-Quipillor i wsp., 2019).

IGF-1 zaangażowany jest też w behavior socjalny. Po pierwsze w korze przedczołowej wpływa na transmisję synaptyczną i reguluje procesy poznawcze związane z tworzeniem kontaktów społecznych, a po drugie poprzez wpływ na neurogenezę i synaptogenezę utrzymuje szlaki neuronalne związane z zachowaniami społecznymi (Zegarra-Valdivia i wsp., 2025).

### 1.15. Cele i hipotezy pracy

W pracy zostały postawione następujące cele i hipotezy:

1. Zbadanie czy różnice osobnicze we wrażliwości na stres, mierzone poziomem aktywności lokomotorycznej (osobniki wysoko (HR) i nisko (LR) ruchliwe), znajdą odzwierciedlenie w zróżnicowaniu podatności na rozwój sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) i związanych z nią deficytów pamięci oraz zaburzeń depresyjnych i lękowych.

**Hipoteza:** Osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR), którym przypisuje się cechę większej wrażliwości na stres, wykażą większą podatność na rozwój sAD, przejawiającą się silniejszymi i/lub wcześniejszymi deficytami pamięci oraz zaburzeń depresyjnych/lękowych wraz z progresją choroby.

2. Zbadanie czy dokomorowe podanie insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) z jednoczesną indukcją sAD u szczurów zapobiegnie deficytom pamięci i/lub zmniejszy poziom zaburzeń depresyjnych/lękowych towarzyszących progresji choroby.

**Hipoteza:** Odtworzenie zaburzonej sygnalizacji insulinowej poprzez domózgowe podanie neurotrofiny IGF-1 wykaże neuroprotekcyny wpływ zmniejszając deficyty pamięci przestrzennej oraz zaburzeń depresyjnych/lękowych w modelu sAD.

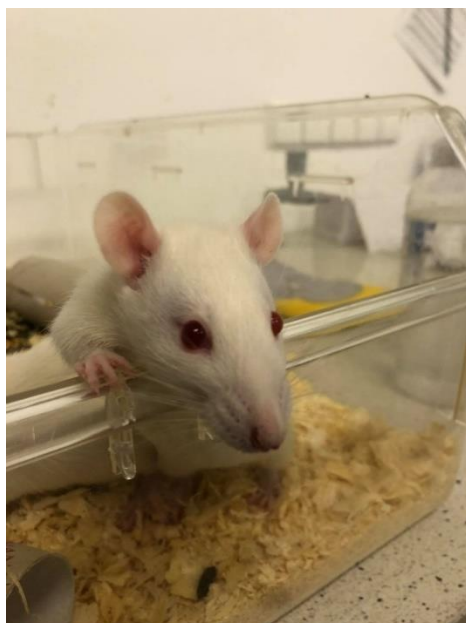
3. Zbadanie czy różnice osobnicze we wrażliwości na stres, mierzone poziomem aktywności lokomotorycznej (HR vs. LR) znajdą odzwierciedlenie w zróżnicowaniu efektywności terapii z użyciem IGF-1 deficytów pamięci oraz zaburzeń depresyjnych/lękowych w modelu sAD.

**Hipoteza:** Osobniki LR, którym przypisuje się cechę mniejszej wrażliwości na stres, wykażą większą skuteczność terapii z użyciem IGF-1 deficytów pamięci oraz zaburzeń depresyjnych/lękowych w modelu sAD.

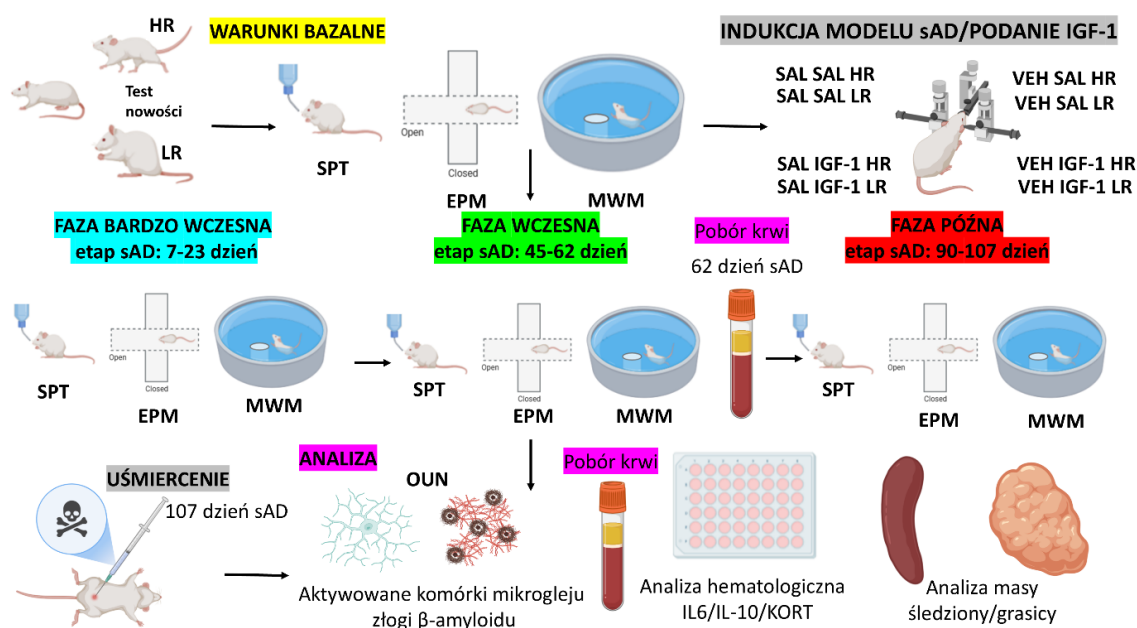
## 2. Metodyka wyników nieopublikowanych

### 2.1. Zwierzęta

Doświadczenia na zwierzętach (**rycina 1**) przeprowadzono zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego (2010/63/EU) oraz po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Bydgoszczy (nr 60/2017). W eksperymencie wykorzystano samce stada nie krewniaczego szczurów Wistar Han (N=41), które pochodziły z Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej w Gdańsku (nr hodowcy 041). Wszystkie procedury wykonano w Zwierzętarni przy Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (nr użytkownika 0169), w której przetrzymywano zwierzęta w pojedynczych polikarbonowych klatkach (wysokość 18 cm, szerokość 20 cm, długość 40 cm) z zachowaniem kontaktu wzrokowego i węchowego z innymi osobnikami, w klimatyzowanym pomieszczeniu o stałej temperaturze wynoszącej ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) z zachowaniem cyklu dzień/noc (światło włączane o 6.00) ze stałym dostępem do pokarmu i wody *ad libitum*. Przed rozpoczęciem procedur doświadczalnych szczury odbyły okres kwarantanny (2 tygodnie) oraz handlingu (5 min./dzień; 2 tygodnie) w celu przyzwyczajenia do eksperymentatora i sytuacji doświadczalnej. W momencie rozpoczęcia pomiarów zwierzęta osiągnęły wiek 11-12 tyg., przy wadze  $300\pm 10\text{g}$ . Następnie po przeprowadzeniu testów behawioralnych w warunkach bazalnych, szczury losowo rozdzielono do 8 grup doświadczalnych: STZ SAL HR (N=5), STZ SAL LR (N=5), STZ IGF-1 HR (N=5), STZ IGF-1 LR (N=5), VEH SAL HR (N=5), VEH SAL LR (N=5), VEH IGF-1 HR (N=5), VEH IGF-1 LR (N=5). Schemat doświadczenia przedstawiono na **rycinie 2**.



Rycina 1. Fotografia szczura w klatce domowej przed rozpoczęciem procesu handlingu.



Rycina 2. Schemat eksperymentu. Objasnienia: HR-osobniki wysokoaktywne ruchowo; LR-osobniki niskoaktywne ruchowo; SPT-test preferencji sacharozы, EPM-test uniesionego labiryntu krzyżowego; MWM-test labiryntu wodnego Morrisa, sAD-sporadyczna postać choroby Alzheimera; STZ SAL-grupa zwierząt, która do komór bocznych mózgu otrzymała iniekcję streptozotocyny (STZ) oraz fizjologicznego roztworu soli (SAL); STZ IGF-1-grupa zwierząt, która do komór bocznych mózgu otrzymała iniekcję streptozotocyny (STZ) oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1); VEH SAL-grupa zwierząt, która do komór bocznych mózgu otrzymała iniekcję buforu cytrynianowego (VEH) oraz fizjologicznego roztworu soli (SAL); VEH IGF-1- grupa zwierząt, która do komór bocznych mózgu otrzymała iniekcję buforu cytrynianowego (VEH) oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1); OUN-ośrodkowy układ nerwowy; IL-6-interleukina-6; IL-10-interleukina-10; KORT-kortykosteron. Rycinę wygenerowano przy użyciu programów Power Point i Biorender.

### **Czasy trwania poszczególnych etapów:**

1.Kwarantanna-14 dni.

2.Handling-14 dni.

3.Warunki bazalne: długość etapu wynosiła 19 dni. Poszczególne czynności: test nowości-1 dzień; SPT-8 dni; EPM-1 dzień; MWM-1 dzień treningu; 1-3 dni MWM-nabywanie pamięci referencyjnej, 4ty dzień MWM-test bez platformy służący odtwarzaniu pamięci referencyjnej; 5-8 dni MWM-nabywanie pamięci roboczej.

4.Indukcja modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera/podanie neurotrofiny oraz stworzenie grup kontrolnych: długość etapu wynosiła 4 dni. Dnia pierwszego przeprowadzono operację, podczas której zaimplantowano kaniule do komór bocznych mózgu. W tym dniu podano również pierwszą dawkę IGF-1 lub SAL. W dniu drugim podano pierwszą dawkę STZ lub VEH. Dnia trzeciego podano drugą dawkę IGF-1 lub SAL. Ostatniego dnia wykonano iniekcję drugiej dawki STZ lub VEH.

5.Faza bardzo wczesna (BWF)-jest to faza sAD, która rozpoczęła się 7 dnia po indukcji modelu choroby Alzheimera. Poszczególne czynności: SPT-8 dni (dni trwania sAD: 7-14); EPM-1 dzień (dzień trwania sAD: 15); 1-3 dni MWM-nabywanie pamięci referencyjnej (dni trwania sAD: 16-18), 4ty dzień MWM dzień-próba bez platformy służąca odtworzeniu pamięci referencyjnej (dzień trwania sAD: 19); 5-8 dni MWM-nabywanie pamięci roboczej (dni trwania sAD: 20-23).

6.Faza wczesna (WF)-jest to faza sAD, która rozpoczęła się 45 dnia po indukcji modelu choroby Alzheimera. Poszczególne czynności: SPT-8 dni (dni trwania sAD: 45-52); EPM-1 dzień (dzień trwania sAD: 53); 1-3 dni MWM-nabywanie pamięci referencyjnej (dni trwania sAD: 54-56), 4ty dzień MWM-próba bez platformy służąca odtworzenia pamięci referencyjnej (dzień trwania sAD: 57); 5-8 dni MWM-nabywanie pamięci roboczej (dni trwania sAD: 58-61). Ostatniego dnia pobrano krew przez punkcję serca (dzień trwania sAD:62).

7.Faza późna (PF)- jest to faza sAD, która rozpoczęła się 90 dnia po indukcji modelu choroby Alzheimera. Poszczególne czynności: SPT-8 dni (dni trwania sAD: 90-97); EPM-1 dzień (dzień trwania sAD: 98); 1-3 dni MWM-nabywanie pamięci referencyjnej (dni trwania sAD: 99-101), 4ty dzień MWM-próba bez platformy służąca odtworzeniu pamięci referencyjnej (dzień trwania sAD:102); 5-8 dni MWM-badanie pamięci roboczej (dni trwania sAD: 103-106).

Ostatniego dnia pobrano przeprowadzono uśmiercenie z pobraniem tkanek i narządów (dzień trwania sAD:107).

## 2.2. Test nowości

Test nowości przeprowadzono wg procedury opisanej wcześniej z pewnymi modyfikacjami (Piazza i wsp., 1989; 1991a; 1993; 1996; Wrona i wsp., 2003; Dunacka i wsp., 2024), w warunkach bazalnych doświadczenia. Szczury pojedynczo umieszczono w aktometrze (Opto Varimex Minor-Columbus, USA), czyli w swoistej pleksiglasowej komorze (43×43×20 cm) na okres 2 h pomiędzy 16-18, w celu określenia aktywności lokomotorycznej. W tym czasie urządzenie automatycznie za pomocą 15 fotokomórek (co 10 minut) zliczało ruchy zwierzęcia w płaszczyźnie horyzontalnej, wertykalnej oraz ambulatoryjne. Na podstawie mediany (Piazza i wsp., 1989) dla ruchów horyzontalnych podzielono zwierzęta na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR, wynik powyżej mediany) oraz osobniki niskoaktywne ruchowo (LR, wynik poniżej mediany).

Średni wynik uzyskany przez zwierzęta HR wynosił  $4671,05 \pm 1885,48$  (zakres ruchów w płaszczyźnie horyzontalnej 8024-2249), a przez zwierzęta LR  $1357,20 \pm 673,16$  (zakres ruchów w płaszczyźnie horyzontalnej 2098-513). Wynik liczby ruchów stanowiących medianę wynosił 2113, a szczura który uzyskał taki rezultat wykluczono z dalszych etapów doświadczenia. Otrzymane wyniki, pozwoliły uzyskać różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupami na poziomie  $p < 0,001$  (test t-studenta  $t=7,40$ ;  $F=7,85$ ;  $df=38$ ).

## 2.3. Test preferencji spożycia sacharozy (SPT)

Test preferencji spożycia sacharozy został wykonany kilkakrotnie w przebiegu eksperymentu: w warunkach bazalnych oraz w 3 fazach rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera (etapy sAD: bardzo wczesny, wczesny, późny) wg metodyki opisanej wcześniej z pewnymi modyfikacjami (Berry i wsp., 2012; Fonesca-Rodrigues i wsp., 2022; Dunacka i wsp., 2025b). Każdorazowo zwierzę przez okres 8 dni (7 pomiarów) miało dostęp do dwóch butelek: jedna z nich zawierała wodę, druga natomiast roztwór sacharozy. Stężenie sacharozy podczas pomiarów 1-3 wynosiło 2%, natomiast podczas pomiarów 4-7 4%. Co 24 h ważono butelki w celu zebrania pomiarów oraz zmieniano ich pozycję, aby wyeliminować preferencję strony przez zwierzę. Wyniki przedstawione na **rycinie nr 4** oraz w **tabeli 1**, stanowią dane

zebrane podczas 7-go pomiaru, a wcześniejsze dni potraktowano jako etap treningu. Współczynnik preferencji sacharozy wyznaczono na podstawie poniższego wzoru:

Współczynnik preferencji sacharozy (%) =  $(\text{pobór sacharozy (g)}) / (\text{pobór sacharozy oraz wody (g)}) \times 100\%$

#### **2.4. Test uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)**

Test uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) został wykonany kilkakrotnie w przebiegu eksperymentu: w warunkach bazalnych oraz w 3 fazach rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera (etapy sAD: bardzo wczesny, wczesny, późny) wg metodyki opisanej wcześniej z pewnymi modyfikacjami (Podlacha i wsp., 2016; Dunacka i wsp., 2024, 2025b). Pleksiglasowy aparat EPM zbudowany był z położonych naprzeciwko, dwóch ramion otwartych (50 × 10 cm) oraz dwóch ramion zamkniętych (50 × 10 cm, wysokość ściany: 40 cm), połączonych centrum (10 × 10 cm), formując kształt przypominający symbol +. Wszystkie składowe przestrzenie labiryntu znajdowały się 50 cm nad powierzchnią podłogi. Każda z prób (czas trwania: 5 min) nagrywana była przez kamerę umieszczoną na suficie pomieszczenia (położenie 200 cm nad labiryntem), połączoną z systemem nagrywania (Etho Vision XT, Noldus, Holandia). Podczas każdego pomiaru, wykonywanego pomiędzy 8-12 rano, głowa szczura umieszczana była zawsze w tę samą stronę tj. w kierunku ramion otwartych. Po zakończeniu testu, za każdym razem labirynt był czyszczony za pomocą etanolu (70%) i pozostawiony do wyschnięcia (5 min.), w celu usunięcia śladu zapachowego zwierzęcia. Podczas testu określono takie parametry jak: czas przebywania i liczbę wejść do ramion otwartych, do centrum, do ramion zamkniętych oraz liczbę epizodów mikcji i defekacji. Wyniki przedstawiono na **rycinach 5-7** oraz w **tabelach 2-6**.

#### **2.5. Test labiryntu wodnego Morrisa (MWM)**

Pamięć przestrzenną badano kilkakrotnie w przebiegu eksperymentu: w warunkach bazalnych oraz w 3 fazach rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera (etapy sAD: bardzo wczesny, wczesny, późny) wg metodyki opisanej wcześniej (Majkutewicz i wsp., 2016, 2018; Dunacka i wsp., 2024; 2025a). Podczas testu zwierzę umieszczano w basenie (ø 150 cm, wysokość 60 cm) wypełnionym wodą (25 cm, 25 °C), a jego zadaniem było zlokalizowanie platformy lub miejsca, w którym ta platforma powinna się znajdować (test bez platformy-probe

test). Wszystkie próby były nagrywane za pomocą kamery, umieszczonej 200 cm nad powierzchnią basenu, połączonej z oprogramowaniem komputerowym, pozwalającym na zmierzenie latencji dopłynięcia, % czasu przebywania w kwadrancie krytycznym oraz pokonany całkowity dystans (EthoVision XT, Noldus, Holandia). Każdorazowo w programie, na planie basenu, wyznaczono cyfrową powierzchnię platformy oraz kwadrantów, co pozwoliło dokonać precyzyjnych pomiarów. Dodatkowo na wewnętrznej ścianie basenu, zawieszono białą wskazówkę wzrokową w postaci niewielkiego kwadratu, ułatwiającą szczirom albinotycznym orientację przestrzenną.

W warunkach bazalnych, przed rozpoczęciem właściwego eksperymentu, każdy szczur został poddany 2 próbom treningu (max. 60 s), podczas którego platforma znajdowała się nad powierzchnią wody, a eksperymentator nakierowywał szczura na to miejsce, ucząc go, że zlokalizowanie platformy zakończy próbę treningową. Następnie przystąpiono do właściwej części doświadczalnej, poprzez nabywanie/odtworzenie pamięci referencyjnej (3 dni nauki + probe test) oraz nabywanie pamięci roboczej (4 dni). Podczas nabywania pamięci referencyjnej w każdym z 3 dni, zwierzę odbyło 4 próby pływania, w odstępie 10 minut. W tym czasie platforma, za każdym razem znajdowała się w stałym miejscu, pod powierzchnią wody, a kończyło ją zlokalizowanie platformy przez zwierzę (maksymalny czas 120 s.). **W tabelach 7-9** przedstawiono średnie dla próby nr 1., w każdym z trzech dni nauki. Następnie przystąpiono do głównego pomiaru pamięci referencyjnej za pomocą próby bez platformy (**ryciny 8-10** oraz **tabela 10**), podczas której platforma została usunięta z basenu, a zwierzę w czasie 120 sekund odbyło sesję badawczą. Podczas kolejnych 4 dni (4 próby na dzień, 120 s., odstęp między próbami 10 min.) badano nabywanie pamięci roboczej, podczas którego platforma codziennie znajdowała się w innym kwadrancie basenu. **W tabelach 11-13** przedstawiono średnie dla poszczególnych numerów prób w obrębie badanych dni.

## **2.6. Rozdział zwierząt do poszczególnych grup eksperymentalnych**

Po przeprowadzeniu testów behawioralnych w warunkach bazalnych, szczury podzielono losowo na cztery grupy: STZ SAL, STZ IGF-1, VEH SAL, VEH IGF-1, a w ich obrębie znajdowały się zwierzęta zarówno o charakterystyce behawioralnej HR jak i LR, dając tym samym osiem podgrup zwierząt: STZ SAL HR, STZ SAL LR, STZ IGF-1 HR, STZ IGF-1 LR, VEH SAL HR, VEH SAL LR, VEH IGF-1 HR, VEH IGF-1 LR.

## **2.7. Indukcja modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) oraz podanie związku terapeutycznego (IGF-1)**

Po zakończeniu pomiarów behawioralnych w warunkach bazalnych przeprowadzono operację (**rycina 3**), pozwalającą na indukcję modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera oraz podanie substancji leczniczej. Na początku zwierzę poddano anestezji wziewnej za pomocą izofluranu (stężenie 2,5%, przepływ 0,5 L/min) podawanego za pośrednictwem waporizatora (Rotchacher-Medical, Szwajcaria) i pompy (Bitmos OXY 600, Niemcy), a następnie unieruchomiono głowę szczura w aparacie stereotaktycznym (Hugo Sachs Elektronik, Niemcy). Podczas operacji zaimplantowano bilateralnie (AP:-1,3 mm; L:± 2 mm; D:+3,6 mm) kaniule (3 mm, C311G/Spc, Bilaney, Niemcy) do komór bocznych mózgu (ICV), kompatybilne z igłą iniekcyjną (4mm, C311I/Spc, Bilaney, Niemcy), na podstawie koordynatów wyznaczonych z użyciem atlasu stereotaktycznego (Paxinos i Watson, 2007). Kaniule zostały na stałe przytwierdzone do powierzchni czaszki za pomocą akrylu dentystycznego (Duracryl spofa Dental, Czechy) oplatającego śruby, wkręcone na powierzchni czaszki. Po implantacji kaniul przystąpiono do podawania substancji za pomocą igły iniekcyjnej. W dniu operacji (dzień 1) oraz w dniu 3 podawano insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1) lub jego substancję kontrolną czyli fizjologiczny roztwór soli (SAL), a w dniu 2 i 4 podawano streptozotocynę (STZ) lub jej substancję kontrolną czyli bufor cytrynianowy (VEH). Łączna dawka IGF-1 (Biotechne, 291-G1, USA), wcześniej rozpuszczonego w SAL wynosiła 2 µg (Basta-Kaim i wsp. 2014; Dunacka i wsp., 2025a; 2025b), a rozdzielona była na dwie komory, po dwie iniekcje (1 iniekcja=0,5 µg/2 µl). Fizjologiczny roztwór soli podawano w objętości 2 µl na komorę. Streptozotocyna posłużyła do indukcji modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera. Przed iniekcjami do komór bocznych mózgu, STZ rozpuszczono w buforze cytrynianowym (pH 4,5; 0,02 M). Związek podawano w łącznej dawce 3 mg/kg m.c. (Majkutewicz i wsp., 2016; Dunacka i wsp., 2024, 2025a, 2025b) rozdzielony na dwie komory, po dwie iniekcje (1 iniekcja=0,75 mg/kg m.c./ 2 µl). Bufor cytrynianowy podawano również w objętości 2 µl. Wszystkie iniekcje związków przeprowadzono z wykorzystaniem pompy (Legato-1000-Series Syringe Pump, KD SCIENTIFIC, USA) oraz strzykawki Hamiltona (10 µl) połączonej z igłą iniekcyjną za pomocą polietylenowego wężyka. Tempo podawania substancji wynosiło 0,5 µl/min. Aby uniknąć wycieku substancji, igłę iniekcyjną zostawiono w komorach bocznych mózgu przez dodatkową minutę. Po zakończeniu operacji oraz iniekcji w kolejnych dniach, zwierzę umieszczono

w ciepłym pokoju, do czasu odzyskania przytomności, a następnie przeniesiono do zwierzętarni do klatek domowych.



Rycina 3. Zwierzę podczas operacji, dzięki której dokonano implantacji kaniul do komór bocznych mózgu.

## **2.8. Pobór krwi przez punkcję serca**

Po zakończeniu fazy wczesnej (objętość ok. 3 ml) i późnej (objętość ok. 5 ml) przeprowadzono pobór krwi przez punkcję serca, u zwierząt poddanych anestezji wziewnej (izofluran 2,5%, przepływ 0,5 L/min) w godzinach porannych, pomiędzy 9-10. Krew poddano analizie w liczniku hematologicznym ABX Micros ES 60 Horriba (Francja), który automatycznie wygenerował następujące wyniki: liczba leukocytów, limfocytów, monocytów granulocytów, % udział tych komórek we krwi, liczba czerwonych krwinek (RBC), zawartość

hemoglobiny w erytrocytach (HGB), średnie stężenie hemoglobiny w erytrocytach (MCHC), średnia masa hemoglobiny w erytrocytach (MCH), średnia objętość czerwonej krwinki (MCV), hematokryt (HCT), rozkład objętości czerwonych krwinek (RDW), liczba płytek krwi (PLT), średnia objętość płytek krwi (MPV), płytkokryt (PCT).

Część tej płynnej tkanki zwirowano, aby uzyskać osocze (4 °C, 10 min, 3000 rpm, Jouan CR 322, Francja). Po ekstrakcji osocza, zamrożono je w -70 °C i przechowywano do dalszych oznaczeń, aby wyznaczyć stężenia interleukiny-6, interleukiny-10 oraz kortykosteronu.

Wyniki przedstawiające parametry układu białokrwinkowego, czerwonekrwinkowego oraz płytkowego przedstawiono na **rycinach 15-16** oraz w **tabelach 15-16**.

## **2.9. Oznaczenie stężenia interleukiny-6 (IL-6) oraz interleukiny-10 (IL-10) w osoczu**

Stężenia cytokin IL-6 oraz IL-10 w osoczu określono za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów immunoenzymatycznych ELISA (IL-6: ERA23RB, IL-10: ERA31RB, Invitrogen, USA). Absorbancję badanych próbek odczytano za pomocą czytnika płytek DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, USA), przy długości fali wynoszącej 450 nm. Koncentracja IL-6 oraz IL-10 została wyliczona na podstawie krzywej standardowej wygenerowanej przez program Biomek (Beckman Coulter, USA, wersja i5), na podstawie absorbancji standardów. Wyniki przedstawiono na **rycinie 17**.

## **2.10. Oznaczenie stężenia kortykosteronu (KORT) w osoczu**

Krew pobrana pomiędzy 9-10 rano, pozwala na określenie stężenia kortykosteronu, gdy jest ono najmniejsze. Stężenie to określono za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu odczynników (rCorticosterone 125 I RIA KIT, RK-548, isotop Institute of Isotopes Co., Węgry) z wykorzystaniem metody radioimmunologicznej. Badane stężenie w próbkach oznaczono z wykorzystaniem licznika gamma (Pharmacia-LKB, Finlandia). Dla jednej próbki osocza wykonano po 2 pomiary. Wyniki przedstawiony na **rycinie 18** stanowił średnią z 2 oznaczonych próbek.

## **2.11. Uśmiercenie zwierząt oraz pobranie tkanek i narządów**

Po zakończeniu późnej fazy sAD przeprowadzono uśmiercenie zwierząt znajdujących się w narkozie wziewnej (izofluran 2,5%; przepływ 0,5 L/min) za pomocą dootrzewnowej iniekcji Morbitalu (dawka letalna 2 mL/kg m.c., Biowet, Polska). Jak wspomiano wcześniej, podczas tego etapu, pobrano krew przez punkcję serca, wyizolowano grasicę oraz śledzionę w celu określenia wskaźnika mas (**Tabela 17**), a następnie poprzez perfuzję (PBS + 4% paraformaldehyd) wstępnie utrwalono i wyizolowano mózg. Mózg po wyjęciu z czaszki, został umieszczony na 24 h w roztworze 4% paraformaldehydu, a następnie odwodniony za pomocą 30% roztworu sacharozy. Po odwodnieniu mózgi pocięto, w płaszczyźnie korowej, na skrawki o grubości 20  $\mu\text{m}$  w krysotacie (CM 1850, Leica Biosystem, Niemcy) i wykonano dalsze oznaczenia w tej tkance.

## **2.12. Określenie liczby aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) i złożeń $\beta$ -amyloidu w mózgu**

Wcześniej pocięte skrawki mózgu umieszczono w roztworze buforowanej soli (PBS) (Pracownia Chemii Ogólnej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, Wrocław) o pH 7,4 zawierającym 5% roztwór albuminy surowicy bydlęcej (BSA) oraz 0,3% roztwór Tris X, w celu 2 h blokowania. Następnie 3 razy (po 5 minut) przepłukano skrawki roztworem PBS. Wówczas tkankę umieszczono na czas 48 h w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych (w przypadku mikrogleju: mysz anty szczur, Sigma Aldrich, USA, MAB1435, 1:250; w przypadku złożeń  $\beta\text{A}$ : mysz-anty szczur Novus Biologicals, USA, NBP2-13075, 1:300) w PBS, zawierającym 2% BSA oraz 0,3% Triton-X. Po kolejnym 3-krotnym płukaniu, zarówno skrawki badające liczbę aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) jak i liczbę złożeń  $\beta$ -amyloidu, umieszczono w roztworze przeciwciał drugorzędowych (koza anty mysz, Abcam, Alexa Fluor 488, ab150113, 1:500) w PBS na 2 h. Po tej procedurze ponownie dokonano 3-krotnego płukania, a skrawki umieszczono na żelatynowanych szkiełkach i pokryto roztworem medium Fluoromount-G w DAPI (Thermo Fisher, 00-4959-52, USA), w celu zamknięcia preparatów szkiełkiem nakrywkowym. Przygotowane preparaty sfotografowano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego (Zeiss Axio Scope A1) kompatybilnego z programem Axio Vision w przypadku komórek mikrogleju, a w przypadku sfotografowania skrawków na których znajdowały się złoże  $\beta$ -amyloidu wykorzystano mikroskop fluorescencyjny DM 1000 LED Leica (Niemcy) oraz program komputerowy LAS X Multi

Channel. Liczbę aktywowanych komórek mikrogleju jak i liczbę złogów  $\beta$ -amyloidu zliczono za pomocą skalibrowanej ramki na powierzchni 1 mm<sup>2</sup>. Wyniki przedstawiono na **rycinach 11-14** oraz w **tabeli 14**.

### **2.13. Analiza statystyczna**

Ze względu na niejednorodność wariancji (test Levena) lub odstępstwo danych od rozkładu normalnego (test Kołmogorowa-Smirnowa) lub/i występowanie niektórych wyników w skali porządkowej lub/i niewielką liczebność w grupach zdecydowano się na przeprowadzenie analizy statystycznej otrzymanych wyników za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa (do zbadania różnic pomiędzy wszystkimi grupami w badanych czynnikach: model choroby, środek leczniczy, etap choroby, charakterystyka behawioralna, dzień testu, numer próby) oraz testu nieparametrycznego U-Manna-Whitney'a do określenia różnic pomiędzy dwoma konkretnymi grupami. Wyniki analizowano w programie Statistica 13.1.3360 (Statsoft, USA). Na rycinach i w tabelach przedstawiono wyniki jako średnia arytmetyczna $\pm$ SD, przy prawdopodobieństwie  $p < 0,05$  uznanym jako istotne statystycznie.

### 3. Wyniki

#### 3.1. Wyniki opublikowane

##### 3.1.1. Publikacja 1

**Publikacja:** Dunacka J., Świątek G., Wrona D. High behavioral reactivity to novelty as a susceptibility factor for memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation as a rat model of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Science*, 2024, 25, 11562. <https://doi.org/10.3390/ijms252111562>. **IF=4.9; MNiSW=140 pkt.**

**Cel:** Zbadanie czy różnice osobnicze we wrażliwości na stres, mierzone poziomem aktywności lokomotorycznej, mają wpływ na rozwój sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) i związanych z nią zaburzeń pamięci oraz zaburzeń lękowych.

**Metodyka:** Szczury Wistar Han (n=31), rozdzielono na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR) w teście nowości. Następnie w warunkach bazalnych a także na 2 etapach rozwoju (45 i 90 dzień choroby) sAD (indukcja za pomocą streptozotocyny podanej do komór bocznych mózgu, dawka 3 mg/kg) zmierzono poziom pamięci przestrzennej w teście labiryntu wodnego Morrisa (MWM) oraz poziom lęku w teście otwartego jasno oświetlonego pola (OF) i uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM). Dodatkowo dwa razy w przebiegu eksperymentu pobrano krew (54 i 99 dzień sAD) w celu określenia poziomu obwodowego zapalenia (analiza hematologiczna, cytometria przepływowa, ELISA) i stężenia kortykosteronu w osoczu (RIA), a po uśmierceniu zwierząt (99 dzień sAD) określono liczbę aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) jak również liczbę złogów  $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w celu sprawdzenia poziomu neurozapalenia (immunohistochemia).

**Wyniki:** Badania wykazały, że u osobników HR rozwinęły się silniejsze zaburzenia pamięci oraz zaburzenia lęku związane z sAD, niż u osobników LR. U gryzoni HR stwierdzono dłuższą latencję dopłynięcia do platformy w 48 i 49 dniu sAD (2 i 3 dzień MWM) oraz w 92 i 94 dniu sAD (1 i 3 dzień MWM) lub do miejsca w którym ona powinna się znajdować (test bez platformy, 50 dzień sAD), krótszy czas spędzany w kwadrancie krytycznym basenu (test bez platformy, 95 dzień sAD). Ponadto zwierzęta HR odznaczały się podwyższonym poziomem lęku, o czym świadczy dłuższy czas bezruchu w teście OF (46 dzień sAD) oraz krótszy czas spędzany w ramionach otwartych (45 dzień sAD) i centrum (90 dzień sAD) EPM oraz dłuższy czas w ramionach zamkniętych (90 dzień sAD) labiryntu. W grupie zwierząt HR silniejszym deficytom pamięci i zaburzeniom lękowym towarzyszyła wyższa liczba złogów  $\beta$ A w hipokampie i części brzeżnej jądra półęzącego (NAcS) oraz wyższa liczba komórek CD68<sup>+</sup>

w podwzgórzu, a jednocześnie niższa liczba tych komórek w obszarze CA1 hipokampa, w porównaniu ze szczurami LR. Ponadto u osobników HR doszło do supresji obwodowego układu odpornościowego, mierzonej niższą liczbą komórek NK, monocytów i granulocytów niż u szczurów LR w 54 dniu sAD.

**Podsumowanie:** Szczury z wysoką aktywnością ruchową (HR), którym przypisuje się cechę większej wrażliwości na stres wykazywały większą progresję sAD, mierzoną większymi deficytami pamięci referencyjnej i zaburzeniami lękowymi. Zaburzeniom behawioralnym, związanym z pamięcią przestrzenną i lękiem towarzyszył większy poziom neurozapalenia i odkładania złogów  $\beta$ -amyloidu u osobników HR z modelem sAD.



Article

# High Behavioral Reactivity to Novelty as a Susceptibility Factor for Memory and Anxiety Disorders in Streptozotocin-Induced Neuroinflammation as a Rat Model of Alzheimer's Disease

Joanna Dunacka, Grzegorz Świątek and Danuta Wrona \*

Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Gdansk, 59 Wita Stwosza Str., 80-308 Gdansk, Poland; joanna.dunacka@ug.edu.pl (J.D.); grzegorz.swiatek@phdstud.ug.edu.pl (G.Ś.)

\* Correspondence: danuta.lewandowska@ug.edu.pl

**Abstract:** Individual differences in responsiveness to environmental factors, including stress reactivity and anxiety levels, which differ between high (HR) and low (LR) responders to novelty, might be risk factors for development of memory and anxiety disorders in sporadic Alzheimer's disease (sAD). In the present study, we investigated whether behavioral characteristics of the HR and LR rats, influence the progression of sAD (neuroinflammation,  $\beta$ -amyloid peptide, behavioral activity related to memory (Morris water maze) and anxiety (elevated plus maze, white and illuminated open field test) in streptozotocin (STZ)-induced neuroinflammation as a model of early pathophysiological alterations in sAD. Early (45 days) in disease progression, there was a more severe impairment of reference memory and higher levels of anxiety in HRs compared with LR. Behavioral depression in HRs was associated with higher expression of  $\beta$ -amyloid deposits, particularly in the NAcS, and activation of microglia (CD68<sup>+</sup> cells) in the hypothalamus, as opposed to less inflammation in the hippocampus, particularly in CA1, compared with LR in late (90 days) sAD progression. Our findings suggest that rats with higher behavioral activity and increased responsiveness to stressors show more rapid progression of disease and anxiety disorders compared with low responders to novelty in the STZ-induced sAD model.



**Citation:** Dunacka, J.; Świątek, G.; Wrona, D. High Behavioral Reactivity to Novelty as a Susceptibility Factor for Memory and Anxiety Disorders in Streptozotocin-Induced Neuroinflammation as a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 11562. <https://doi.org/10.3390/ijms252111562>

Academic Editors: Frenkel Dan and Ivana Munitic

Received: 20 September 2024

Revised: 18 October 2024

Accepted: 25 October 2024

Published: 28 October 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** neuroinflammation; rat Alzheimer's disease model; high and low responders to novelty; spatial memory and anxiety disorders; streptozotocin; white and illuminated open field; elevated plus maze; Morris water maze;  $\beta$ -amyloid; cytokines

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized by multiple cognitive deficits as a result of neuronal and synaptic loss [1]. The pathophysiological characteristics include extracellular formation of senile plaques consisting of  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) peptide, intracellular accumulation of aggregates of hyperphosphorylated tau protein, neuronal and synaptic loss, proliferation of astrocytes and activation of microglia [2–4]. Although the exact cause of AD remains poorly understood, neuropathological studies have supported early involvement of neuroinflammation in AD by demonstrating the accumulation of activated microglia and inflammatory mediators in the cerebral neocortex at a low stage for AD pathology [5–7]. Microglia are involved in AD pathogenesis through the release of inflammatory mediators known to contribute to the production and accumulation of  $A\beta$ . On the other hand,  $A\beta$  itself, an inducer of microglia activation and neuroinflammation, has been considered as a primary and unifying factor in the development of AD. A vicious cycle of inflammation arises between  $A\beta$  accumulation, activated microglia, and microglial inflammatory mediators, which increase  $A\beta$  deposition and neuroinflammation.

The risk of AD increases significantly with age. Endothelial dysfunction and inflammaging are the most frequent impairment characterizing aging patients [8–10]. AD has multiple etiological factors, including genetics or environmental conditions, which also

play a role in the development of individual differences in stress sensitivity and disease susceptibility [11]. There is considerable heterogeneity between individuals in their response to these environmental factors [12]. Differences in behavioral characteristics might be due to differences in baseline anxiety or stress levels among patients or between animals used in studies. Individual differences in stress reactivity measured as behavioral response to novelty (high (HR) or low (LR) responders to novelty) are closely related to differences in anxiety and susceptibility/resistance to stress [13].

HR rats characterize increased responsivity (behavioral, hormonal, and neurochemical) to stressors, including higher and prolonged secretion of corticosterone (CORT) in response to a novelty stress challenge [14–16]. The effect of the level of spontaneous locomotor activity on the risk of AD has not yet been investigated. Therefore, in the present study, we tested the hypothesis that the animal's behavioral characteristics (HRs vs. LRs), and thus baseline anxiety/stress levels, are risk factors for the development of memory impairment and anxiety disorders in an animal model of AD, and that these factors determine differences in the neuroimmune correlates of disease between individuals. Since most cases of AD are sporadic rather than hereditary [17,18], we used rats subjected to intracerebroventricular (ICV) injections of streptozotocin (STZ), which proved to be the best animal model of early pathophysiological changes in sporadic AD (sAD) [19]. ICV-STZ-induced neuroinflammation is a sporadic AD model based on brain resistance to insulin [19–22], which mimics many physiopathological aspects of sAD in human, such as memory impairment, changes of glucose metabolism, neuroinflammation, oxidative stress and phosphorylation of tau protein [23–25]. Therefore, we examined behavioral activity related to memory processes (Morris water maze (MWM), anxiety (elevated plus maze; EPM; white and illuminated open field test; OF), central (CD68<sup>+</sup> microglia cell number) and peripheral (T lymphocyte CD4<sup>+</sup>/TCD8<sup>+</sup> number, interleukin (IL)-6/IL-10 concentration) functions of the immune system playing a key role in cognitive and memory processes. To test for differences in the rate of AD progression between HR and LR rats, we examined these parameters before (baseline) ICV-STZ-induced neuroinflammation as a model of early pathophysiological alterations in sAD and at early (45 days) and late (90 days) of disease progression.

## 2. Results

### 2.1. Behavioural Results

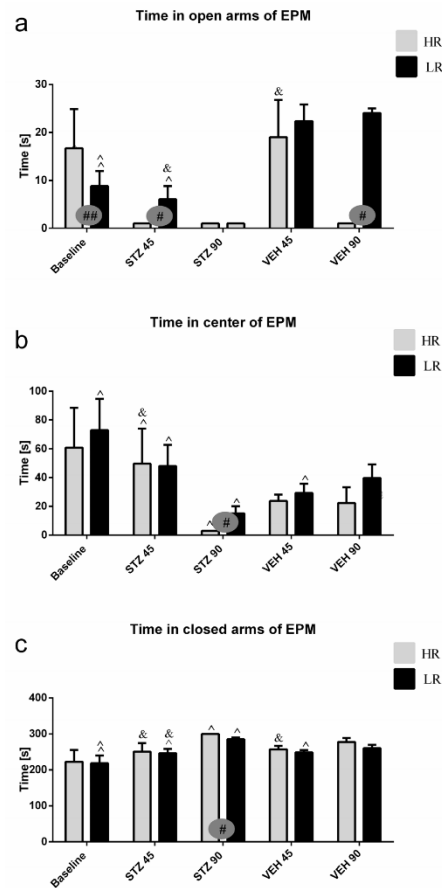
#### 2.1.1. Novelty Test

The median value of the locomotor activity score (based on horizontal movements) for the whole group ( $n = 31$ ) tested was 4607. The lowest value within the whole group was 1320, while the highest value was 6794. The animals with an activity score above the median were designated as HRs ( $n = 16$ ,  $5565 \pm 574$ , mean  $\pm$  SD), while those with a motility score below the median were designated as LRs ( $n = 14$ ,  $2275 \pm 854$  mean  $\pm$  SD). Rat with the median activity score was rejected from the further experiments.

#### 2.1.2. Fear/Anxiety, Spatial Memory, and Learning in the Elevated Plus-Maze Test (EPM)

Behavioral activity assessed in the EPM test measured as time spent in the open arms, time spent in the closed arms and in the center of the maze, as well as and the number of entries into the open arms, closed arms, and into the center during the test and 1 h after test (re-test) are presented in Figure 1 and Table S1. As compared to the baseline and control VEH group, rats with the STZ-induced AD model spent a significantly less time in the open arms and center of the maze, whereas they spent more time in the closed arms on the 45th and 90th post-injection days (Table S1). There was a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) in both time spent and the number of entries into the open arms, center, and closed arms of the EPM between HRs and LRs within the STZ group. As opposed to the baseline (HR vs. LR,  $p \leq 0.01$ ), the number of entries into the open arms and time spent in the center were decreased ( $p \leq 0.05$ ) in the HRs as compared to LRs on the 45th and 90th days after AD induction (Figure 1, Table S1). Moreover, significantly decreased time spent in the center

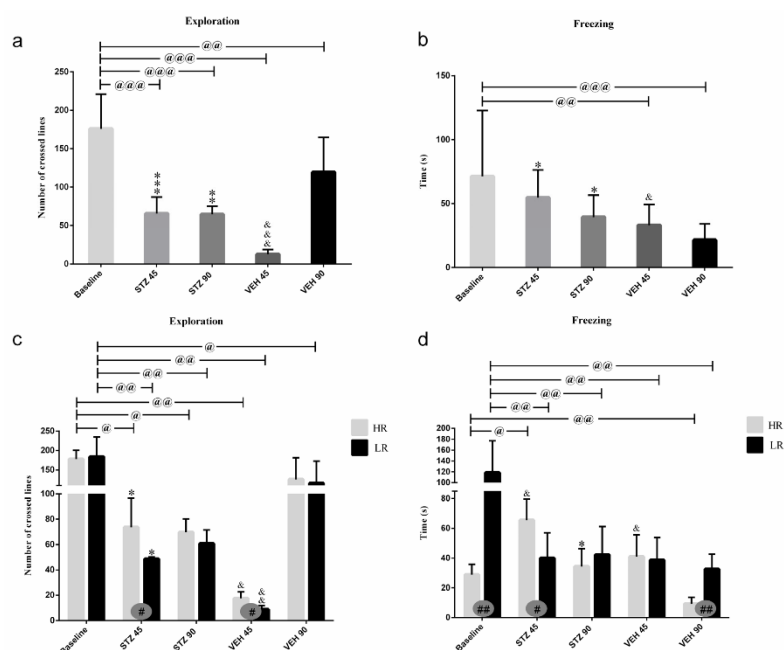
( $p \leq 0.001$ ) of the EPM 45 days after STZ injections, whereas increased time spent in the open arms ( $p \leq 0.05$ ) and center ( $p < 0.01$ ) on the 90th post-injection day during the re-test rather than test in the STZ group was observed (Table S1). However, all measured behavioral parameters returned to the baseline values in re-test on the 90th day after STZ injection in LRs only.



**Figure 1.** Behavioral activity associated with anxiety in the elevated plus maze (EPM) test measured as time spent in the open arms (a), time spent in the center (b), and time spent in the closed arms (c) of the maze in rats with high (HR) or low (LR) reactivity to novelty at baseline (before injections) and 45 and 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ,  $n = 16$ ) or citrate buffer (VEH,  $n = 14$ ). Explanations: Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using a Mann–Whitney–U test; # in a painted circle— $p \leq 0.05$ , ## in a painted circle indicate significance of differences between HR and LR rats; ^— $p \leq 0.05$ , ^^— $p \leq 0.01$  indicate significance of differences between test and re-test; &— $p \leq 0.05$  indicates significance of differences between 45 day and 90 day after injection.

### 2.1.3. Behavioral Activity and Fear/Anxiety in the White and Illuminated Open Field Test (OF)

Behavioral activity in the white and illuminated open field test measured as an exploration (a number of crossed lines), rearing, grooming, time of freezing, defecation, and miction frequency at the baseline and on the 45th and 90th days after STZ or VEH injection are presented in Figure 2 and Table 1. The significantly higher amounts of exploration ( $p \leq 0.001$ ), rearing ( $p \leq 0.01$ ), miction ( $p \leq 0.05$ ), and defecation ( $p \leq 0.05$ ) in the STZ group as compared to the control VEH on the 45th post-injection day was observed (Figure 2, Table 1). As shown in Figure 2, time of freezing was increased ( $p \leq 0.05$ ) within the STZ group in comparison with the control animals both on the 45th and 90th post-injection days. As compared to the baseline, in the STZ group, the decreased behavioral activity including an exploration ( $p \leq 0.001$ ), entries into the center ( $p \leq 0.01$ ), and time spent in the center ( $p \leq 0.01$ ) of the OF maze and miction ( $p \leq 0.001$ ), whereas increased time spent in the periphery ( $p \leq 0.01$ ) was observed 45 and 90 days following injections. Moreover, decreases in rearing ( $p \leq 0.001$ ) and grooming ( $p \leq 0.05$ ) in the STZ group in comparison with the baseline values were observed on the 90th post-injection day only.



**Figure 2.** Behavioral activity associated with anxiety in the white and illuminated open field (OF) test measured as exploration (number of crossed lines) and time of freezing in rats non-divided (a,b) and divided into rats with high (HR) or low (LR) reactivity to novelty (c,d) at baseline (before injections) and 45 and 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ,  $n = 16$ ) or citrate buffer (VEH,  $n = 14$ ). Explanations: Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using a Mann–Whitney–U test; # in a painted circle— $p \leq 0.05$ , ## in a painted circle indicate significance of differences between HR and LR rats; \*— $p \leq 0.05$ , \*\*— $p \leq 0.01$ , \*\*\*— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between STZ and VEH at 45 or 90 days after injection; &— $p \leq 0.05$ , &&— $p \leq 0.01$ , &&&— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between 45 days and 90 days after injection; @ in brackets above the bars— $p \leq 0.05$ , @@ in brackets above the bars— $p \leq 0.01$ , @@@ in brackets above the bars— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences vs. baseline.

**Table 1.** Behavioral activity in the white and illuminated open field (OF) test measured as time spent in the periphery and center, entries to the center, rearing, grooming, miction, and defecation in rats non-divided and divided into rats with high (HR) or low (LR) reactivity to novelty at baseline (before injections) and 45 and 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ, n = 16) or citrate buffer (VEH, n = 14).

Parameter/Group	Rearing (No.)	Grooming (No.)	Time at Periphery (s)	Time at the Center (s)	Center Entries (No.)	Miction (No.)	Defecation (No.)	
Baseline Mean ± SD	Non-divided	14.39 ± 6.66	2.70 ± 1.11	1791.7 ± 7.70	8.3 ± 7.70	4.67 ± 4.32	5.69 ± 2.55	4.75 ± 2.18 <sup>h</sup>
	HR	14.71 ± 6.47	2.71 ± 0.76	1798.67 ± 0.58 <sup>#</sup>	1.33 ± 0.58 <sup>#</sup>	1.33 ± 0.58 <sup>#</sup>	4.14 ± 1.68	3.25 ± 0.5
	LR	15.91 ± 7.22	2.82 ± 1.08	1784.73 ± 1.55	15.27 ± 1.55	8. ± 3.61	6.36 ± 3.04	5.67 ± 2.35
STZ 45 Mean ± SD	Non-divided	10.25 ± 3.23 <sup>***&amp;&amp;&amp;</sup>	2.43 ± 0.79	1800 ± 0 <sup>@@@</sup>	0 ± 0 <sup>@@@</sup>	0 ± 0 <sup>@@@</sup>	1.63 ± 0.52 <sup>@@@</sup>	3.63 ± 1.60 <sup>*</sup>
	HR	10 ± 1 <sup>%&amp;</sup>	3 ± 0 <sup>##&amp;</sup>	1800 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	1.66 ± 0.58 <sup>@</sup>	4.33 ± 1.15 <sup>5</sup>
	LR	10.75 ± 4.92 <sup>&amp;</sup>	1.67 ± 0.58 <sup>5</sup>	1800 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	1.75 ± 0.5 <sup>%@</sup>	3.75 ± 1.5
STZ 90 Mean ± SD	Non-divided	3 ± 1.41 <sup>@@@</sup>	1.71 ± 0.49 <sup>@</sup>	1800 ± 0 <sup>@@@</sup>	0 ± 0 <sup>@@@</sup>	0 ± 0 <sup>@@@</sup>	1.17 ± 0.41 <sup>@@@</sup>	4 ± 1.26 <sup>*</sup>
	HR	3 ± 1.41 <sup>@</sup>	1.67 ± 0.58	1800 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	1.33 ± 0.58 <sup>@</sup>	3 ± 0 <sup>#</sup>
	LR	3 ± 1.41 <sup>@@@</sup>	1.75 ± 0.5	1800 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	1 ± 0 <sup>5@@</sup>	5 ± 1
VEH 45 Mean ± SD	Non-divided	6.2 ± 1.87 <sup>&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	3.13 ± 2.36	1800 ± 0 <sup>@@@</sup>	0 ± 0 <sup>@@@</sup>	0 ± 0 <sup>@@@</sup>	1.08 ± 0.29 <sup>@@@</sup>	2.13 ± 1.55 <sup>@@@</sup>
	HR	4.5 ± 0.58 <sup>##&amp;@@</sup>	1 ± 0 <sup>##&amp;</sup>	1800 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	1.33 ± 0.58 <sup>@</sup>	1 ± 0 <sup>##&amp;</sup>
	LR	8 ± 1.73 <sup>&amp;@</sup>	4.4 ± 2.07 <sup>&amp;</sup>	1800 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	1 ± 0 <sup>&amp;&amp;&amp;@@</sup>	3.25 ± 1.5
VEH 90 Mean ± SD	Non-divided	2.71 ± 0.95 <sup>@@@</sup>	1.7 ± 0.67 <sup>@</sup>	1800 ± 0 <sup>@@@</sup>	0 ± 0 <sup>@@@</sup>	0 ± 0 <sup>@@@</sup>	0.67 ± 0.65 <sup>@@@</sup>	2.55 ± 1.04 <sup>@@@</sup>
	HR	3 ± 0 <sup>@</sup>	1.33 ± 0.58 <sup>@</sup>	1800 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	1.25 ± 0.5 <sup>##@@</sup>	2.25 ± 1.26
	LR	2 ± 1 <sup>@@@</sup>	1.8 ± 0.84	1800 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@</sup>	0 ± 0 <sup>@@@</sup>	3 ± 1.15 <sup>@</sup>

Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using a Mann–Whitney–U test; #— $p \leq 0.05$ , ##— $p \leq 0.01$  indicate significance of differences between HR and LR within the STZ or VEH animals; \*— $p < 0.05$ , \*\*— $p < 0.01$  indicate significance of differences between STZ and VEH at 45 or 90 days after injection; &— $p \leq 0.05$ , &&— $p \leq 0.01$ , &&&— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between 45 days and 90 days after injection; @— $p \leq 0.05$ , @@— $p \leq 0.01$ , @@@— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences vs. baseline; \$— $p < 0.05$ , indicates significance of differences between STZHR and VEHHR or STZLR and VEHLR.

There were significant differences in the number of crossed lines (exploration) and time of freezing between the HR and LR animals within the STZ and VEH groups (Figure 2). Increased exploration number ( $p \leq 0.05$ ) in the STZ HRs and VEH HRs rather than STZ LRs or VEH LRs were observed 45 days after injections. Moreover, the higher amounts of grooming ( $p \leq 0.05$ ) in the HRs within the STZ group as opposed to the lower amounts of grooming ( $p \leq 0.05$ ) in the VEH HRs rather than the LRs of the respective groups were noticed. In contrast to the HR vs. LR differences at the baseline ( $p \leq 0.01$ ) and in the VEH animals 90 days after injections ( $p \leq 0.01$ ), on the 45th post-injection day, the HRs within the STZ group had longer time of freezing compared to LRs ( $p \leq 0.05$ ; Figure 2).

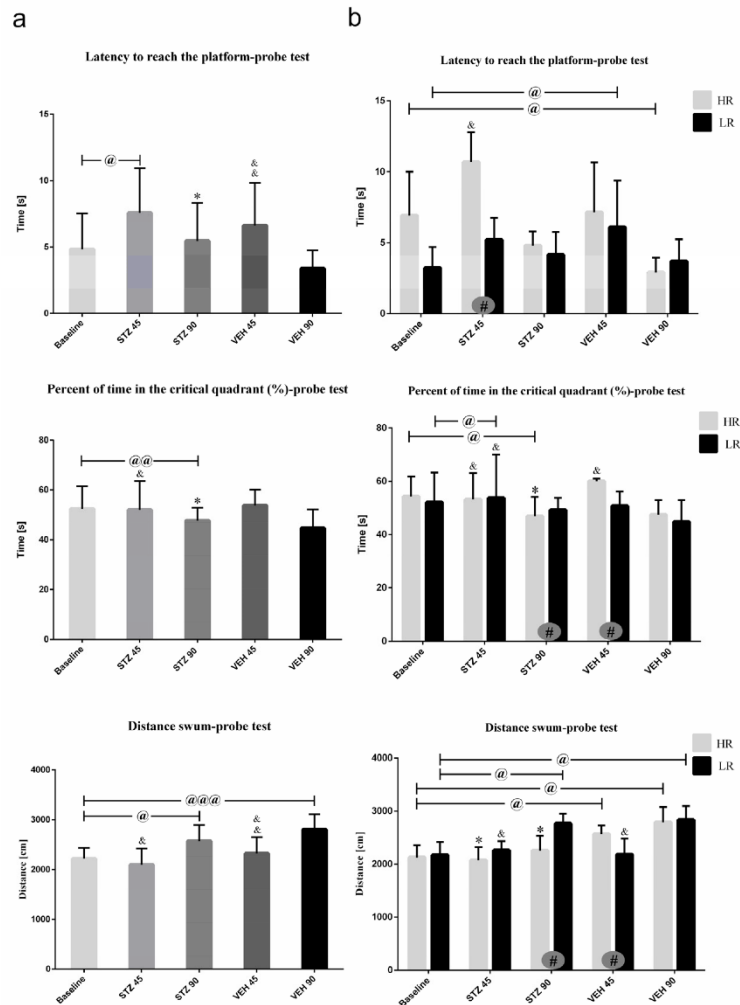
#### 2.1.4. Behavioral Activity Associated with Memory Impairments in the Morris Water Maze Test (MWM)

Behavioral activity in the Morris water maze test measured as latency to reach the platform, total distance swum, and time spent in critical quadrant at the baseline and on the 45th and 90th day after STZ or VEH injection are presented in Figure 3 (on the day of probe test with removed platform) and Table 2 (Reference memory during 1–3 consecutive days of MWM and working memory during Trial 1–4 of one day). As shown in Figure 3a, on the day of probe the latency to reach the platform was significantly ( $p \leq 0.05$ ) longer in the STZ group as compared to the VEH animals on the 45 and 90 post-injection days. There was significantly ( $p \leq 0.01$ ) longer latency to reach the platform both in the STZ and VEH groups on the 90th as compared to 45th post-injection day and baseline ( $p \leq 0.001$ ). On the 90th post-injection day, a significantly lower percentage of time spent in the critical quadrant as compared to the control VEH animals ( $p \leq 0.05$ ) and baseline ( $p \leq 0.01$ ) in the STZ animals was observed.

As shown in Figure 3b, significant HR vs. LR differences within the STZ animals in all measured parameters on the probe test were observed. A significantly longer the latency to reach the platform at baseline and on the 45th post-lesion day ( $p \leq 0.05$ ) in HRs rather than LRs within the STZ animals were observed. In HRs within the STZ group, lower percentage of time spent in the critical quadrant and total distance swum ( $p \leq 0.05$ ) were noticed on the 90th day after AD model induction as compared to the LRs and to the control VEH HR animals ( $p \leq 0.05$ ).

Working memory measured in the MWM that is indicated as the latency to reach the platform during four trials (Trials 1–4) per one day is presented in Table 2a. As compared to the controls, a significantly ( $p \leq 0.001$ ) longer latency to reach the platform from Trial 1 to Trial 4 on the 45th and 90th post-injection days in the STZ animals was observed. The HR vs. LR difference in the latency to reach the platform within the STZ animals was observed during Trial 2 ( $p \leq 0.001$ ), Trial 3 ( $p \leq 0.001$ ) and Trial 4 ( $p \leq 0.05$ ) on the 90th day after AD induction, with lower latency in the HRs rather than LRs.

Reference memory measured as the latency to reach the platform during three consecutive days of MWM (Days 1–3; Table 2b) was significantly impaired, as indicated by the longer latency to reach the platform within the STZ animals as compared to the control group, both on the 45th and 90th post-injection day. Moreover, the total distance swum was significantly longer ( $p \leq 0.001$ ) in the STZ animals rather than the control VEH group on the 45th and 90th day after AD induction. There were significant differences in the latency to reach the platform and total distance swum ( $p \leq 0.05$ ) between the HR and LR animals within the STZ group, with longer latency both on the 45th and 90th days after STZ injections and shorter total distance swum ( $p \leq 0.05$ ) on the 45th post-injection day in the HR compared to LR rats.



**Figure 3.** Behavioral activity associated with reference memory performance in the Morris water maze (MWM) test measured as latency to reach the platform, the percentage of time in the critical quadrant, and the total distance swum in the critical quadrant in a probe test in rats non-divided (a) and divided into rats with high (HR) or low (LR) reactivity to novelty (b) at baseline (before injections) and 45 and 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ, n = 16) or citrate buffer (VEH, n = 14). Explanations: latency to reach the platform: latency to reach the critical quadrant in which the platform was located in the previous sessions of spatial learning in the MWM (Days 1–3); probe test: single trial without the platform (Day 4); data are presented as mean ± SD and were analyzed using a Mann–Whitney–U test; # in a painted circle— $p \leq 0.05$  indicates significance of differences between HR and LR rats; \*— $p \leq 0.05$  indicates significance of differences between STZ and VEH at 45 or 90 days after injection; &— $p \leq 0.05$ , &&— $p \leq 0.01$  indicate significance of differences between 45 day and 90 day after injection; @ in brackets above the bars— $p \leq 0.05$ , @@@ in brackets above the bars— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences vs. baseline, @@@@— $p \leq 0.0001$  indicate significance of differences vs. baseline.

**Table 2.** Behavioral activity associated with working memory during Trial 1–4 of one day (a) and reference memory over 1–3 consecutive days (b) in the Morris water maze (MWM) test measured as latency to reach the platform and total distance swum in the critical quadrant in rats non-divided and divided into rats with high (HR) or low (LR) reactivity to novelty at baseline (before injections) and 45 and 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ, n = 16) or citrate buffer (VEH, n = 14).

Latency to Reach the Platform (s)				
Group	Trial 1	Trial 2	Trial 3	Trial 4
Baseline	92.02 ± 30.26	7.51 ± 3.9 <sup>***</sup>	5.28 ± 2.6 <sup>%%</sup>	4.78 ± 2.1
STZ 45	100.43 ± 19.78 <sup>***&amp;&amp;&amp;</sup>	86.08 ± 27.12 <sup>***&amp;&amp;&amp;@</sup>	78.09 ± 35.93 <sup>***&amp;&amp;&amp;@</sup>	82.98 ± 29.89 <sup>***&amp;&amp;&amp;@</sup>
STZ 90	25.43 ± 9.84 <sup>***@</sup>	19.73 ± 10.68 <sup>***@</sup>	22.03 ± 14.32 <sup>***@</sup>	20.18 ± 13.75 <sup>***@</sup>
VEH 45	36.75 ± 11.08 <sup>&amp;&amp;&amp;@</sup>	6.68 ± 3.37 <sup>&amp;&amp;&amp;~</sup>	3.41 ± 1.37 <sup>@@%,%</sup>	2.88 ± 1.26 <sup>@@!</sup>
VEH 90	10.89 ± 6.41 <sup>@@</sup>	3.73 ± 1.43 <sup>@@~</sup>	3.28 ± 1.35 <sup>@@</sup>	2.83 ± 1.05 <sup>@@</sup>
Baseline HR	90.68 ± 28.26	6.08 ± 2.58 <sup>#~</sup>	4.95 ± 2.38 <sup>%</sup>	5.08 ± 2.41
Baseline LR	93.37 ± 32.68	8.95 ± 4.50 <sup>~</sup>	5.6 ± 2.8 <sup>%%</sup>	4.48 ± 1.73
STZ 45 HR	99.63 ± 20.62 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;</sup>	90.38 ± 27.43 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;@</sup>	81.57 ± 37.53 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;@</sup>	87.4 ± 25.53 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;@</sup>
STZ 45 LR	101.22 ± 19.77 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;</sup>	81.78 ± 27.30 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;@</sup>	74.62 ± 35.56 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;@</sup>	78.55 ± 34.25 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;@</sup>
STZ 90 HR	22.35 ± 8.87 <sup>@@</sup>	12.33 ± 5.4 <sup>\$\$\$#@</sup>	10.95 ± 5.09 <sup>\$\$\$#@</sup>	7.9 ± 2.79 <sup>\$\$\$#@</sup>
STZ 90 LR	28.52 ± 10.15 <sup>\$\$\$@</sup>	27.42 ± 9.06 <sup>\$\$\$@</sup>	33.5 ± 10.77 <sup>\$\$\$@</sup>	32.47 ± 7.66 <sup>@@</sup>
VEH 45 HR	39.88 ± 10.89 <sup>&amp;&amp;&amp;@</sup>	8.45 ± 3.7 <sup>&amp;&amp;#@</sup>	3.64 ± 1.76 <sup>%%</sup>	3.32 ± 1.57 <sup>@@</sup>
VEH 45 LR	33.60 ± 10.80 <sup>&amp;&amp;&amp;@</sup>	4.9 ± 1.8 <sup>@@~</sup>	3.20 ± 0.87 <sup>@@%</sup>	2.45 ± 0.68 <sup>@@!</sup>
VEH 90 HR	16.15 ± 4.35 <sup>###@</sup>	3.87 ± 1.65 <sup>@@~</sup>	3.37 ± 1.24 <sup>@</sup>	2.53 ± 0.81 <sup>@</sup>
VEH 90 LR	5.62 ± 2.56 <sup>@@</sup>	3.6 ± 1.22 <sup>@@</sup>	3.2 ± 1.49 <sup>@@</sup>	3.12 ± 1.22 <sup>@</sup>

Latency to Reach the Platform (s)				Total Distance Swum (cm)
Group	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1
Baseline	97.32 ± 44.71	26.58 ± 12.90 <sup>~</sup>	20.39 ± 12.35 <sup>~%</sup>	625.23 ± 293.05
STZ 45	42.23 ± 17.02 <sup>***&amp;@</sup>	10.97 ± 3.38 <sup>***@</sup>	11.09 ± 7.93 <sup>**@</sup>	715.74 ± 324.31 <sup>***&amp;</sup>
STZ 90	23.79 ± 8.89 <sup>***@</sup>	17.53 ± 8.56 <sup>***@</sup>	13.16 ± 9.60 <sup>**</sup>	428.65 ± 114.29 <sup>***@</sup>
VEH 45	8.52 ± 1.81 <sup>&amp;@</sup>	6.54 ± 4.83 <sup>@@</sup>	4.64 ± 2.32 <sup>@@</sup>	255.83 ± 141.97 <sup>@@</sup>
VEH 90	5.75 ± 2.28 <sup>@@</sup>	4.36 ± 1.99 <sup>@@</sup>	3.69 ± 1.24 <sup>@@</sup>	148.40 ± 41.49 <sup>@@</sup>
Baseline HR	100.98 ± 44.66	22.7 ± 9.5 <sup>~</sup>	17.15 ± 5.97 <sup>~</sup>	643.96 ± 280.13
Baseline LR	86.38 ± 27.86	26.85 ± 10.63 <sup>~</sup>	17.2 ± 8.27 <sup>~%</sup>	578.88 ± 280.76
STZ 45 HR	28.87 ± 10.25 <sup>S#@</sup>	13.77 ± 3.7 <sup>##</sup>	17.92 ± 7.98 <sup>##</sup>	426.02 ± 158.81 <sup>#</sup>
STZ 45 LR	51.2 ± 16.99 <sup>£&amp;</sup>	8.9 ± 0.35 <sup>@</sup>	6.02 ± 1.52 <sup>&amp;@%</sup>	993.47 ± 251.72 <sup>£&amp;@</sup>
STZ 90 HR	30.62 ± 0.08 <sup>##@</sup>	18.38 ± 10.13 <sup>£</sup>	13.63 ± 6 <sup>S#</sup>	504.45 ± 66.46 <sup>£</sup>
STZ 90 LR	13.2 ± 2.85 <sup>\$\$\$@</sup>	10.72 ± 2.33 <sup>S@</sup>	3.97 ± 0.21 <sup>@@%</sup>	374.04 ± 124.45 <sup>£</sup>
VEH 45 HR	9.66 ± 0.65 <sup>#&amp;&amp;@</sup>	4.28 ± 2.04 <sup>@@</sup>	3.85 ± 2.23 <sup>@@</sup>	339.36 ± 157.47 <sup>£##@</sup>
VEH 45 LR	7.75 ± 1.96 <sup>@@</sup>	8.05 ± 5.72 <sup>@</sup>	5.17 ± 2.43 <sup>@@</sup>	158.81 ± 28.66 <sup>@@</sup>

Table 2. Cont.

(b)	VEH 90 HR	5.88 ± 2.15 <sup>@@</sup>	4.53 ± 2.17 <sup>@@</sup>	3.59 ± 1.31 <sup>@@</sup>	152.67 ± 46.93 <sup>@@</sup>
	VEH 90 LR	5.66 ± 2.54 <sup>@@@</sup>	4.24 ± 2.02 <sup>@@@</sup>	3.76 ± 1.28 <sup>@@@</sup>	145.96 ± 41.82 <sup>@@@</sup>

Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using a Mann–Whitney–U test; #— $p \leq 0.05$ , ##— $p \leq 0.01$ , ###— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between HR and LR within the STZ or VEH animals; \*— $p \leq 0.05$ , \*\*— $p \leq 0.01$ , \*\*\*— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between STZ and VEH 45 or 90 days after injection; &— $p \leq 0.05$ , &&— $p \leq 0.01$ , &&&— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between 45 day and 90 day after injection; @— $p \leq 0.05$ , @@— $p \leq 0.01$ , @@@— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences vs baseline; \$— $p \leq 0.05$ , \$\$\$— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between STZHR and VEHHR or STZLR and VEHLR; ^— $p \leq 0.05$ , ^^— $p \leq 0.01$ , ^^— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between Trial 1; %— $p \leq 0.05$ , %%— $p \leq 0.01$ , %%%— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between Trial 2; !— $p \leq 0.05$  indicates significance of differences between Trial 3.

## 2.2. Microglia Activated Cells (CD68<sup>+</sup> Cells) and Amyloid $\beta$ ( $A\beta_{40-42}$ ) Deposits in the Hippocampal Areas (CA1, CA2, CA3, DG) and Nucleus Accumbens (NAcC and NAcS)

As shown in the Figure 4a, a significantly higher number of CD68<sup>+</sup> cells in the STZ ( $p \leq 0.001$ ) rather than VEH group as well as HRs and LR of the STZ group and their behavioral counterparts in the control VEH animals in all hippocampal areas (CA1, CA2, CA3,  $p \leq 0.01$ ; DG,  $p \leq 0.05$ ) and the nucleus accumbens (NAcS: HR, LR  $p \leq 0.05$ ; NAcC: HR  $p \leq 0.05$ , LR  $p \leq 0.01$ ) was observed on the 90 day after STZ injection. There were no significant differences in the CD68<sup>+</sup> cell number in the hippocampal areas and NAcS and NAcC observed within the VEH group. Additionally, as compared to the VEH group, a significantly higher number of activated microglia cells in the limbic structures (prefrontal cortex:  $p \leq 0.001$ ), corpus callosum:  $p \leq 0.001$ , caudate putamen:  $p \leq 0.01$ , medial septal nucleus:  $p \leq 0.001$ ), preoptic area (medial and lateral preoptic nuclei:  $p \leq 0.001$ , supraoptic nucleus:  $p \leq 0.05$ ) and hypothalamic nuclei (arcuate:  $p \leq 0.01$ , dorsomedial:  $p \leq 0.001$ , lateral:  $p \leq 0.001$ , paraventricular:  $p \leq 0.001$ , ventromedial:  $p \leq 0.001$ ) were observed (Table 3). Moreover, both the HR and LR animals within the STZ group had a significantly higher numbers of CD68<sup>+</sup> microglia cells in all studied brain areas, except for the arcuate and supraoptic nuclei (Table 3) rather than the VEH animals. There was a significant HR vs. LR difference ( $p \leq 0.05$ ) in the number of CD68<sup>+</sup> cells within the STZ group with a lower cell number in the CA1 part of the hippocampus (Figures 4a and 5A), whereas it was a higher microglia cell activation in the dorsomedial hypothalamic nucleus in HRs rather than LR (Table 3). Furthermore, a significant positive correlation ( $R = 0.92$ ,  $p \leq 0.01$ ) between the number of CD68<sup>+</sup> microglia cells in the CA1 part of the hippocampus and the IL-6 plasma concentration was found in STZHRs.

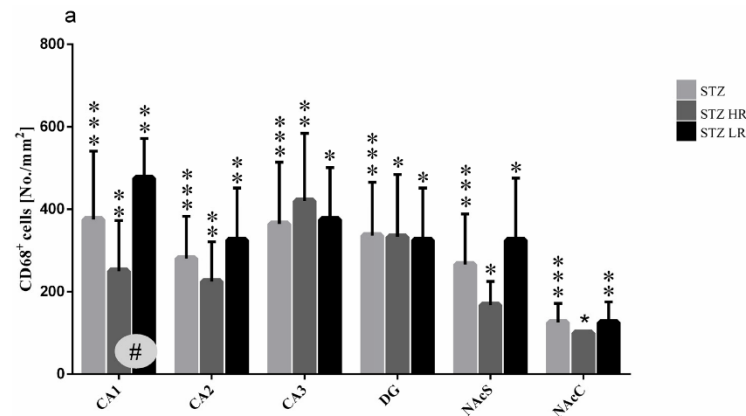
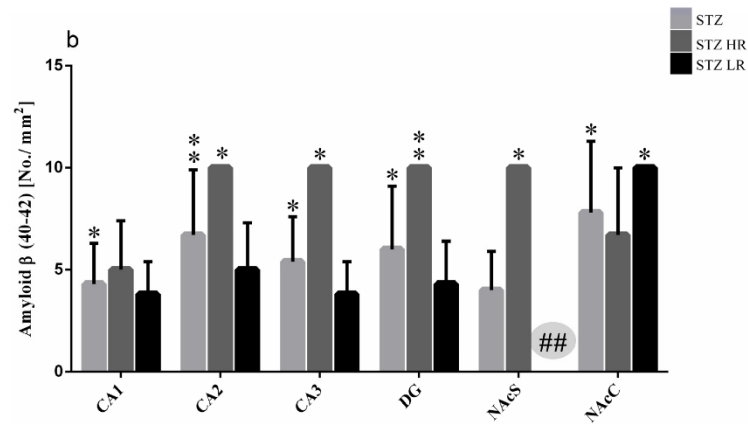


Figure 4. Cont.



**Figure 4.** Number of activated microglia cells (CD68<sup>+</sup> cells) (a) and  $\beta$ -amyloid counts (b) in the hippocampus (CA1, CA2, CA3, DG) and nucleus accumbens (NAcC, NAcS) in non-divided rats and divided into rats with high (HR) or low (LR) reactivity to novelty 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ, n = 16). Explanations: Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using a Mann–Whitney–U test; # in a painted circle— $p \leq 0.05$ , ## in a painted circle  $p \leq 0.01$  indicate significance of differences between HR and LR rats; \*— $p \leq 0.05$ , \*\*— $p \leq 0.01$ , \*\*\*— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between STZ and VEH 90 days after injection.

**Table 3.** Number of activated microglia cells (CD68<sup>+</sup> cells) (a) and  $\beta$ -amyloid counts (b) in brain structures in rats non-divided and divided into rats with high (HR) or low (LR) reactivity to novelty 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ, n = 16) or citrate buffer (VEH, n = 14).

	Microglia Cells (CD68 <sup>+</sup> ) No./mm <sup>2</sup>					
	STZ Mean $\pm$ SD	VEH Mean $\pm$ SD	STZ HR Mean $\pm$ SD	STZ LR Mean $\pm$ SD	VEH HR Mean $\pm$ SD	VEH LR Mean $\pm$ SD
(a) Prefrontal cortex	117 $\pm$ 41 ***	0 $\pm$ 0	133 $\pm$ 58 <sup>§</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>§</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Corpus callosum	1018 $\pm$ 268 ***	280 $\pm$ 131	1000 $\pm$ 322 <sup>§§</sup>	1000 $\pm$ 23 <sup>§§</sup>	300 $\pm$ 115	267 $\pm$ 170
Caudate putamen	463 $\pm$ 207 **	100 $\pm$ 0	325 $\pm$ 50 <sup>§</sup>	533 $\pm$ 208 <sup>§</sup>	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
Medial septal nucleus	473 $\pm$ 142 ***	0 $\pm$ 0	400 $\pm$ 155 <sup>§§</sup>	550 $\pm$ 58 <sup>§§</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Lateral preoptic area	200 $\pm$ 87 ***	0 $\pm$ 0	175 $\pm$ 50 <sup>§§</sup>	200 $\pm$ 115 <sup>§</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Medial preoptic nucleus	244 $\pm$ 124 ***	0 $\pm$ 0	225 $\pm$ 150 <sup>§</sup>	250 $\pm$ 129 <sup>§</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Supraoptic nucleus	189 $\pm$ 93 *	100 $\pm$ 0	150 $\pm$ 58	200 $\pm$ 115	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
Arcuate hypothalamic nucleus	464 $\pm$ 225 **	100 $\pm$ 65	767 $\pm$ 58	300 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	233 $\pm$ 115
Dorsomedial hypothalamic nucleus	220 $\pm$ 103 ***	0 $\pm$ 0	300 $\pm$ 71 <sup>§§§</sup>	125 $\pm$ 50 <sup>§</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Lateral hypothalamus	220 $\pm$ 79 ***	0 $\pm$ 0	250 $\pm$ 58 <sup>§§</sup>	133 $\pm$ 58 <sup>§</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Paraventricular hypothalamic nucleus	163 $\pm$ 74 ***	0 $\pm$ 0	160 $\pm$ 89 <sup>§§</sup>	167 $\pm$ 58 <sup>§</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Ventromedial hypothalamic nucleus	113 $\pm$ 35 ***	0 $\pm$ 0	133 $\pm$ 58 <sup>§</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>§</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Table 3. Cont.

Group/Structure	Amyloid $\beta$ (40–42)/No./mm <sup>2</sup>					
	STZ Mean $\pm$ SD	VEH Mean $\pm$ SD	STZ HR Mean $\pm$ SD	STZ LR Mean $\pm$ SD	VEH HR Mean $\pm$ SD	VEH LR Mean $\pm$ SD
(b) Prefrontal cortex	2.5 $\pm$ 2.25	0 $\pm$ 0	5 $\pm$ 2.75	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Lateral preoptic area	8.9 $\pm$ 1.65 **	0 $\pm$ 0	8.3 $\pm$ 2.05 <sup>S</sup>	1 $\pm$ 0 <sup>\$</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Medial preoptic nucleus	5 $\pm$ 2.6	0 $\pm$ 0	6.67 $\pm$ 2.6	3.33 $\pm$ 2.6	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Explanations: Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using Mann–Whitney–U test; #— $p \leq 0.05$  indicates significance of differences between HR and LR within the STZ animals; \*— $p \leq 0.05$ , \*\*— $p \leq 0.01$ , \*\*\*— $p \leq 0.001$  indicate significance of differences between STZ and VEH at 90 days after injection; \$— $p \leq 0.05$ , \$\$— $p \leq 0.01$  indicate significance of differences between STZHR and VEHHR or STZLR and VEHLR.

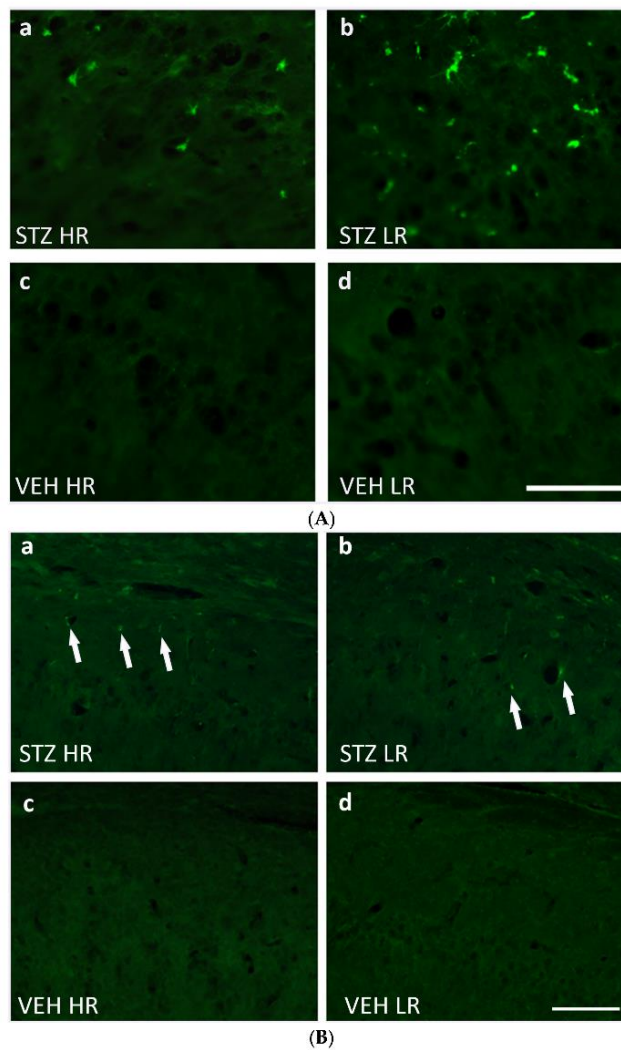


Figure 5. (A) Representative photomicrographs showing activated microglia cells (CD68<sup>+</sup> cells) in the CA1 area of the hippocampus of STZ HR (a), STZ LR (b), VEH HR (c), and VEH LR rats (d) 90 days

after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ) or citrate buffer (VEH). Scale bar = 100  $\mu$ m. (B) Representative photomicrographs showing amyloid beta (indicated by arrows) in the CA1 area of the hippocampus of STZ HR (a), STZ LR (b), VEH HR (c), and VEH LR rats (d) 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ) or citrate buffer (VEH). Scale bar = 100  $\mu$ m.

As compared to the VEH animals, amyloid  $\beta$  ( $A\beta_{40-42}$ ) deposits were observed in the hippocampal areas and nucleus accumbens in the STZ-injected animals in the 90 days after an induction of the AD model (Figure 4b). There were no  $A\beta_{40-42}$  deposits noted in the studied brain areas within the VEH animals. The significantly higher number of  $A\beta_{40-42}$  peptides in the hippocampal areas (CA1, CA2, CA3, DG) and nucleus accumbens (shell and core) were observed in the STZ animals and both STZHRs and STZLRs groups (Figures 4b and 5B). As shown in Figures 4b and 5B, within the STZ group, the higher level of  $A\beta_{40-42}$  was observed in HRs rather than LR in the hippocampal areas and nucleus accumbens. However, the significance of difference in  $A\beta_{40-42}$  number between STZHRs and STZLRs was reached in NAcS only ( $p \leq 0.01$ ).

### 2.3. Peripheral Blood Leukocyte and Lymphocyte and Their Subpopulation Number

There were no significant differences in the peripheral blood leukocyte as well as the total and percentage number of lymphocytes between the STZ and VEH groups and their behavioral counterparts (HR vs. LR) on the 45th and 90th post-injection days (Table S2). However, significant differences in the number of peripheral blood lymphocyte subpopulations (T, B, NK), granulocytes, and monocytes between STZ and VEH as well as between HRs and LR within the STZ group were noticed. As compared to the controls, in the STZ group, the total number of TCD3<sup>+</sup> lymphocytes ( $p \leq 0.01$ ), especially in STZLRs and TCD4<sup>+</sup> subpopulation of T lymphocytes (Figure 6), the total ( $p \leq 0.05$ ) and percentage ( $p \leq 0.01$ ) number of monocytes (Table S2) increased on the 45th day after injection. Ninety days after the STZ injections, a significantly ( $p \leq 0.01$ ) lower NK (CD161a<sup>+</sup>) cell number, in comparison with the controls, was observed (Figure 6).

Forty-five days after the STZ injections, a higher total number of B (CD45RA<sup>+</sup>) lymphocytes ( $p \leq 0.05$ ), concomitantly with a lower number of NK cells (CD161a<sup>+</sup>) ( $p \leq 0.05$ ; Figure 6), granulocytes, and monocytes ( $p \leq 0.05$ ; Table S2), in HR rather than LR animals was noticed. As opposed to the control VEH animals, there was a significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) total number of B (CD45RA<sup>+</sup>) lymphocytes in HRs as compared to LR within the STZ group on the 90th post-injection day.

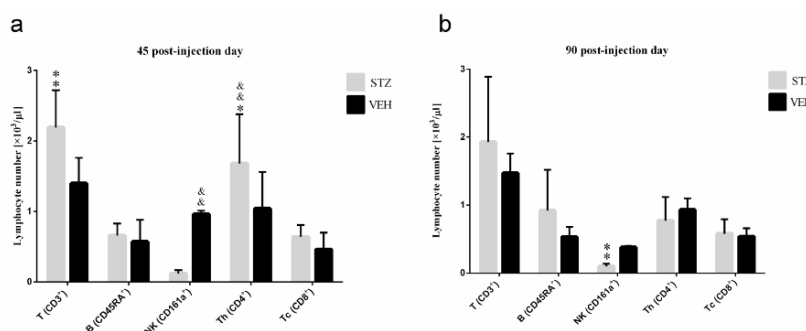
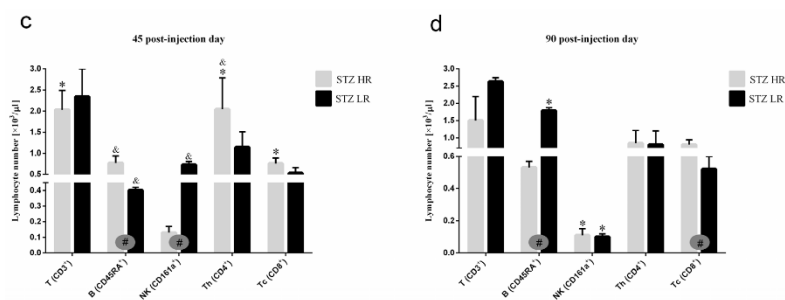


Figure 6. Cont.



**Figure 6.** The total number of T, B, NK, TCD4<sup>+</sup>, and TCD8<sup>+</sup> lymphocytes in the peripheral blood mononuclear cells analyzed by the flow cytometric method 45 and 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ, n = 16) or citrate buffer (VEH, n = 14) in non-divided rats (a,b) and divided into rats with high (HR, n = 8) or low (LR, n = 8) reactivity to novelty after intracerebroventricular injections of STZ (c,d). Explanations: Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using a Mann–Whitney–U test; # in a painted circle— $p \leq 0.05$  indicate significance of differences between HR and LR rats; \*— $p \leq 0.05$ , \*\*— $p \leq 0.01$  indicate significance of differences between STZ and VEH 45 and 90 days after injection; &— $p \leq 0.05$ , &&— $p \leq 0.01$  indicate significance of differences between 45 day and 90 day after injection.

#### 2.4. Relative Thymus and Spleen Weights

There was no significant difference in the relative thymus and spleen weights between the STZ (thymus:  $31.16 \pm 9.31$  mg/100 g b.w., spleen:  $183.82 \pm 12.27$  mg/100 g b.w.) and VEH (thymus:  $33.56 \pm 15.40$  mg/100 g b.w., spleen:  $175.47 \pm 17.81$  mg/100 g b.w.) animals on the 90th post-injection day. However, within the STZ group, significantly ( $p \leq 0.05$ ) lower relative thymus and spleen weights in HRs (thymus:  $23.54 \pm 6.6$  mg/100 g b.w., spleen:  $172.95 \pm 10.85$  mg/100 g b.w.) were found compared to LR (thymus:  $38.53 \pm 5.28$  mg/100 g b.w., spleen:  $193.73 \pm 2.66$  mg/100 g b.w.). There was no significant difference in the relative thymus and spleen weights between HRs and LR within the VEH group.

#### 2.5. Plasma Interleukin-6 (IL-6)/Interleukin-10 (IL-10) and Corticosterone (CORT) Concentration

There were no significant differences in plasma IL-6 concentrations between the STZ and VEH animals and their behavioral counterparts (HR vs. LR) on the 90th day after injections (Table S2). On the other hand, an increased level of IL-10 in the STZ group, in comparison with the controls ( $p \leq 0.05$ ), was observed. Moreover, a significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) plasma CORT concentration in the STZ animals ( $209.17 \pm 87.16$  ng/mL), rather than the control group ( $147.90 \pm 56.16$  ng/mL), especially in the STZLRs ( $225.74 \pm 102.71$  ng/mL,  $p \leq 0.01$ ), was noticed on the 90th day after STZ injection. Within the VEH animals, the higher plasma CORT concentrations in VEHHRs ( $167.20 \pm 65.51$  ng/mL) rather than VEHLRs ( $123.79 \pm 30.97$  ng/mL) were noticed. However, no significant differences in this parameter between HRs and LR within both the STZ and VEH groups were observed.

#### 2.6. Hematological Parameters

There were significant differences in some hematological parameters, including red blood cell (RBC) number, hemoglobin (HGB) concentration, hematocrit (HCT), and mean hemoglobin concentration in the red blood cell (MCHC) between the STZ and VEH groups and their behavioral counterparts (HR vs. LR) within the STZ animals (Table S2). As compared to the controls, a significantly higher number of RBC in the STZ group on the 45th ( $p \leq 0.01$ ) post-injection day was noticed. HGB concentration decreased 45 days ( $p \leq 0.05$ ) after the STZ injections whereas it increased ( $p \leq 0.01$ ) concomitantly with the MCHC on the 90th post-injection day, as compared to the controls. Moreover, significant

HR vs. LR differences in these parameters were noticed (Table S2), with lower RBC number ( $p \leq 0.05$ ), HGB concentration ( $p \leq 0.05$ ), and HCT ( $p \leq 0.01$ ), whereas higher MCHC ( $p \leq 0.05$ ) in HRs rather than LR animals within the STZ animals.

### 3. Discussion

The current findings, to the best of our knowledge, are the first to show an interaction between individual behavioral characteristics and stress reactivity of an animal, measured as the differences in a spontaneous locomotor response to novelty (HRs vs. LR animals), on the behavioral activity related to memory and fear/anxiety disorders, and neuroimmunological responses in rats with the streptozotocin-induced neuroinflammation model of sAD. In the present report, we provide the first evidence that rats with higher behavioral activity (high responders to novelty) and increased sensitivity to stressors show faster progression of sAD and disease-related anxiety disorders. An inherent limitation of our research is using the rat model to study sAD in humans and thus the translational value of animal-based results. However, we believe that the results of our studies may provide diagnostic and prognostic support and inspire new approaches to prevent or delay dementia in humans by modifying environmental risk factors throughout the life course.

The differences in the behavioral responses to novelty are known to be related to variations in the central dopaminergic and serotonergic pathway [26–30]. The HRs show higher dopaminergic activity in the nucleus accumbens (NAc) or dorsal striatum but lower dopaminergic activity in the prefrontal cortex at baseline than LR animals [29]. In the present study, at a late stage of the disease (90 days after induction of the AD model), greater neuroinflammation (increased CD68<sup>+</sup> microglia cell number) and elevated  $\beta$ -amyloid levels in the prefrontal cortex were associated with lower microglia activation but higher  $\beta$ -amyloid numbers in the NAc in HR rats compared to LR animals. Thus, our immunohistochemical and behavioral data suggest a correlation between brain dopamine, microglia immune response, and  $\beta$ -amyloid accumulation and thus impairment of cognitive processes in the ICV-STZ-induced model of AD. The correlation between brain dopamine and immune system response has been previously described [31]. In fact, we too have previously observed a correlation between spontaneous locomotor activity (HR vs. LR) and the level of immune system response in rats [32–35].

Regarding hippocampal-dependent spatial memory impairment, especially reference memory, were more pronounced in HRs compared to LR animals, and indicated as a longer latency to reach the platform during Days 1–3 and shorter time swum in the critical quadrant during the probe test (without the platform) in Morris water maze test on day 45 after the ICV-STZ injection. These effects suggest an impairment of hippocampal function at the early stage of AD development in HRs. In fact, we observed larger  $\beta$ -amyloid deposits in the hippocampal CA1, CA2, CA3, and dentate gyrus, in STZHRs as compared to STZLRs. Thus, it is possible that our findings of greater memory impairment in HRs in the AD model may be due to damage of the hippocampal projections, in particular from the CA1, which terminate in the prefrontal cortex or NAc shell. Besides the hypothalamus, the hippocampus, prefrontal cortex and NAc are involved in behavior associated with stress regulation, anxiety and memory processes. Other authors reported that the dorsal hippocampus is critical for learning and memory whereas the ventral hippocampus is associated with emotion-related behavior, especially those that are associated with anxiety [36–38]. A strong connectivity between the ventral CA1 and medial prefrontal cortex has been reported to be related to anxiety [38–41]. The input of the ventral CA1 towards NAc also impacts anxiogenic behavior [42,43]. Furthermore, the prefrontal infralimbic cortex, necessary for fear extinction, projects preferentially to the shell subregion of the NAc [44,45].

Since reduced behavioral activity at baseline in LR rats was associated with lower glucocorticoid-induced dopamine release than in HR animals [26–28,46] and dopamine-dependent locomotion [47,48], we would expect that dopamine deficiency might be involved in depressed behavioral activity in tests of anxiety and/or memory impairment

in LR animals after the STZ injections. Surprisingly, in contrast to the baseline, we observed behavioral depression associated with anxiety behavior, as measured by specific suppression of open-arm and center exploration in the elevated plus maze test on Days 45 and 90 after the AD induction and prolonged freezing time on Day 45 after the STZ injections in the white and illuminated open field test in HR animals. Elevated levels of anxiety and behavioral depression suggest that dopamine levels in the brains of the HR rats decline during disease progression, particularly in NAc. Several studies have implicated dopamine actions in NAc in conditioned fear. For example, dopamine activity in the NAc is implicated in the blocking of learned fear responses [49]. The NAc, a critical node for limbic motor integration, is a heterogenous structure divided into core (NAcC) and shell (NAcS) subregions which participate in emotional learning [44,50], including specific contribution of the NAcC and NAcS in regulating both fear expression and fear extinction [51–53]. The NAcC is specifically active only in response to an associative fear cue during an expression test. In contrast, the NAcS is specifically active during fear extinction [53]. Our evidence for increased behavior related to anxiety and memory disorders in HRs in the course of AD here is supported by additional immunohistochemical evidence that significantly more  $\beta$ -amyloid counts in NAcS in HRs compared to their absence in LR were observed (Figures 4b and 5B). These findings suggest that  $\beta$ -amyloid-induced damage to the NAcS and thus a reduction in dopamine levels in this part of NAc disrupted the consolidation of extinction of fear response in HRs.

On the other hand, HRs vs. LR differences in response to novelty stress may be related to individual stress reactivity and differences in the hypothalamic—pituitary—adrenal (HPA) axis activity and glucocorticoid effects on memory processes [14–16,54]. HR animals have a higher and prolonged secretion of CORT in response to a novelty stress challenge and thus are considered as more susceptible to stress even though they have a lower baseline anxiety level [14–16]. They also exhibit a higher sensitivity to the behavioral and dopaminergic effects of glucocorticoids [29,46,55,56]. Therefore, we wanted to determine whether HRs and LR in the AD model differ in HPA axis activity, as indicated by plasma CORT levels. In fact, at Day 90 after disease induction, elevated plasma CORT levels in the STZ group compared to the controls were due to increased hormone levels in LR but not in HRs (Table S2). It should be noted, however, that the higher stressor susceptibility and HPA axis response, and thus the prolonged elevated CORT levels in HRs early in the course of the disease, may explain not only the memory impairment but also why we did not observe significant differences in CORT levels between HRs and LR in the STZ group 90 days post-injection. Furthermore, the elevated CORT levels in HRs may be responsible for peripheral suppression of their innate immunity, as indicated by the reduced total number of NK cells, monocytes and granulocytes and the lower relative thymus and spleen weight compared to LR. It is possible that this effect is due to the greater sensitivity of immune cells and lymphoid organs in HR rats to such stress hormones as CORT than in LR [15,55] and/or to the CORT-induced redistribution of peripheral immune cells to the other lymphoid organs [46]. Other CORT-induced peripheral immunomodulatory effects in the STZ rats in this study might have resulted from a shift of peripheral Th1 to Th2 lymphocytes and thus from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory response in the late development of the disease. Indeed, we found an increased total number of TCD3<sup>+</sup> lymphocytes in the peripheral blood, particularly the TCD4<sup>+</sup> subpopulation, and higher plasma levels of anti-inflammatory IL-10 but not pro-inflammatory IL-6 in rats with the ICV-STZ model of AD at Day 90 post-injection supporting such an anti-inflammatory effect. Other authors [57] reported that relative suppression of pro-inflammatory IL-6 production was associated with impairment of memory retrieval of emotional, but not neutral words. According to the authors, glucocorticoid sensitivity and thus impairment of emotional memory retrieval is correlated with suppression of IL-6 cytokine production. It should be noted, however, that we failed to show significant differences in these peripheral blood immunological parameters, including plasma IL-6 concentration, between HRs and LR within the STZ animals. Interestingly, we also found lower values for several peripheral hematological

parameters, including total red blood cell (RBC) count, hemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT) and mean cellular hemoglobin concentration (MCHC) in HRs but not LR rats on day 45 after the ICV-STZ injection. Regarding a decrease in the RBC number in the ICV-STZ model of AD, the available data suggest that plasma  $\beta$ -amyloid peptides bind to ageing erythrocytes, implying a pathogenic role of erythrocyte amyloid complex in AD. This complex induces changes in the red blood cell morphology, adhesion to endothelium and influences vessel activity [58]. In the present study, the higher number of  $\beta$ -amyloid after the ICV-STZ injections observed in the HR animals, and thus the increased number of  $\beta$ -amyloid complexes with erythrocytes, may explain the reduced hematologic parameters and indicate the deterioration of red blood cell system function in these animals compared to LR rats with the AD model.

In addition to the effect of differences in animal behavioral reactivity on neuroinflammation, cognitive performance and anxiety level observed in the sAD model, the influence of other factors or confounding factors cannot be excluded. Other authors [59] found that the forced swim test induced markedly divergent hippocampal gene expression, as indicated by activation of the serotonergic system and neurogenesis in LR rats, whereas it increased levels of the pro-inflammatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase and apoptotic mechanisms in HR animals despite their comparable depressive-like status. According to the authors, the hippocampus of HR and LR rats undergoes distinct transcriptional remodeling in response to the same stressor. Both in rats and humans, much of the variability of stress reactivity reflects individual differences in behaviorally evoked sympathetic nervous system activation. However, various degrees of inconsistency for risk factors exist between observational studies and clinical trials. Genetically, longer educational attainment has been well-established as associated with lower risk for AD, whereas other risk factors, including blood pressure, lipid traits, body mass index, smoking and alcohol consumption have shown inconclusive associations with AD. Based on genomic study [60], genetically determined modifiable risk factors, such as high-density lipoprotein cholesterol concentration and high systolic blood pressure, were associated with an increased risk of AD. Therefore, thoroughly unfolding the genomic background for association between modifiable risk factors and dementia might help to develop future effective preventive and therapeutic approaches.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Animals

All animal experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), and under the authority of the Local Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals at University of Technology in Bydgoszcz, Poland (No. 60/2017).

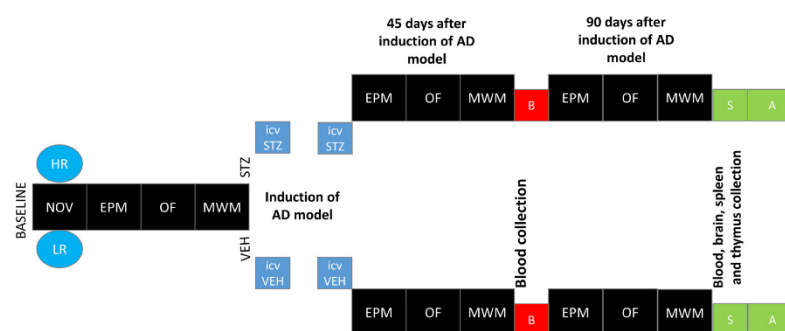
Four-month-old rats ( $n = 31$ ) weighing  $300 \pm 80$  g (Tri-City Central Animal Laboratory, Research and Service Centre of the Medical University of Gdansk, Poland). For the duration of the experiment, rats were housed separately in polycarbonate cages (20 cm width, 37 cm length, 18 cm height) on a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:00) in an air-conditioned, constant-temperature ( $22 \pm 2$  °C) room could visually observe other subjects and were indirectly exposed to other subjects' cage odors. Water and food were available ad libitum. Animals were allowed to adapt to the laboratory conditions for one week before the beginning of the experimental procedure. Then, rats were subjected to daily handling for about 5 min each day for two weeks in order to minimize stress caused by the procedure.

##### 4.2. Experimental Procedure

###### 4.2.1. Novelty Test (NOV)

The novelty test was performed according to a method that we have described previously [32,33]. All of the rats were placed in the actometer (Opto Varimex Minor-Columbus, OH, USA) for 2 h (4–6 P.M. according to [13], where their locomotor activity was automatically recorded. Each of three photocell apparatus was constructed of clear plexiglass,

measured  $43 \times 43 \times 20$  cm, and was equipped with 15 photocells. For each rat, the number of horizontal, vertical, and ambulatory plane photocell counts, accumulated for 10 min, were measured. The number of horizontal plane photocell counts accumulated over 2 h was used as an index of individual locomotor response to the new environment. Based on the median of activity score [13], rats were divided into high (HR) or low (LR) responders to novelty. Subsequently, rats from each activity group were randomly divided into STZ ( $n = 16$ ; HR = 8, LR = 8) or VEH ( $n = 14$ ; HR = 7, LR = 7) group. After being assigned to experimental groups, the animals were subjected to further procedures according to the diagram presented in Figure 7.



**Figure 7.** Scheme of experimental procedure and group assignments. Explanations: NOV—novelty test; EPM—elevated plus maze test: test and re-test after 1 h; OF—white and illuminated open-field test; MWM—Morris water maze test: phase of acquisition of reference memory (Day 1–Day 3), probe test (single trial without the platform (reference memory evaluation), working memory performance (Days 5–8)); HR—high responders to novelty; LR—low responders to novelty; ICVSTZ—intracerebroventricular (ICV) injections of streptozotocin (STZ) (a total dose of 3 mg/kg b.w. divided into 2 injections to both lateral ventricles: 0.75 mg/kg STZ in 2  $\mu$ L of citrate buffer per ventricle)—sAD model; ICVVEH—intracerebroventricular (ICV) injections of citrate buffer (VEH) (2  $\mu$ L per ventricle); B—blood collection; S—1 h after the last MWM trial euthanasia and blood, brain, spleen, and thymus collection for further analysis (A).

#### 4.2.2. Intracerebroventricular (ICV) Injections of Streptozotocin (STZ)—sAD Induction

ICV injections of streptozotocin (STZ) or vehicle (VEH: 0.02M citrate buffer pH 4.5) were performed according to our previous study with some modifications [61]. Briefly, rats under 2.5% isoflurane (airflow: 0.5 L per min) anesthesia using an isoflurane pump (Bitmos OXY 6000, Bitmos GmbH Düsseldorf, Germany) were prepared for surgery, and the head of the animal was fixed using a stereotaxic apparatus (Hugo Sachs Elektronik, Germany). A stainless steel guide cannula (22GA, 9 mm long, Plastic One, USA) was implanted into each lateral ventricle according to coordinates from the Paxinos and Watson atlas (coordinates: AP:  $-1.3$  mm, L:  $\pm 2$  mm, D:  $+3.6$  mm according to bregma) [62]. The cannulae were permanently anchored to three stainless steel skull screws with dental acrylic (Duracryl, spofaDental a.s., Jicin, Czech Republic). STZ was administered through the implanted cannulae in a cumulative dose of 3 mg/kg over two injections on Days 2 and 4 ( $2 \times 1.5$  mg/kg, dissolved in 0.02 M citrate buffer pH 4.5) with separate injections into each lateral ventricle (0.75 mg/kg in 2  $\mu$ L of vehicle) at a rate of 1  $\mu$ L/min. The total dose of STZ was divided in order to reduce procedure-associated mortality [63]. During the infusion procedure, the animal under 2.5% isoflurane anaesthesia was held gently in the hand. The injections were performed using a microinfusion pump (Legato-100—Series Syringe Pump, KD SCIENTIFIC, Holliston, MA, USA) and a Hamilton syringe (10  $\mu$ L) connected via polyethylene tube to an injection cannula (28GA, 11 mm long, Plastic One, Roanoke, VA, USA) which was placed into the guide cannula 2 mm below its tip. In order

to avoid a backflow of the solution, the injection cannula was left inside the guide for an additional 60 s. The control groups received the same vehicle injection volumes by the same procedure. As the stability of STZ solution is maximum at pH close to 4, we used citrate buffer pH 4.5 as vehicle. After surgery, the animals were transferred to the worm room, where they stayed until regaining consciousness. Like other authors [64] using the open field test and the same dose of ICV injected STZ (3 mg/kg), we did not observe locomotor sensitization after ICV-STZ injections.

#### 4.2.3. Elevated Plus Maze Test (EPM)

Anxiety-related spatial memory and learning in the elevated plus maze (EPM) test was performed according to a procedure that we described previously [65] with some modifications. In order to increase fear/anxiety and the difference between the open and enclosed arms, the EPM test was made of plexiglass and consisted of two white, open arms 50 × 10 cm, and two opposite, black arms enclosed by 40 cm high walls. The arms were connected by a central 10 × 10 cm white square, and thus the maze formed a cross or a plus sign. The whole apparatus was elevated 50 cm above the floor. The EPM test was conducted between 8:00 and 12:00 A.M. in the test/re-test (after 1 h) paradigm. Rats were carried in their home cages to the experimental room, placed in the maze always in the same position (heading towards the open end of the maze) and allowed to explore the EPM for 5 min (test session). Then, the animals were carried back to their home cages for 60 min. After the 60 min interval, rats were returned to the experimental room and placed again in the EPM test for 5 min (re-test session). Recording was performed at baseline and on the 45th and 90th post-injection days (Figure 7) in the test/re-test paradigm.

In order to minimize bias, during the exposure of the rats to the EPM test, the behavioral responses of the individuals were recorded using a video camera, positioned approximately 200 cm over the center of the maze and connected to a video-tracking digitizing device (EthoVision XT, Noldus, Wageningen, The Netherlands). The EPM test was calibrated in the computer software, so the camera could create physical distance information from pixel-based data. After each rat testing, the whole apparatus was cleaned with a solution of 70% ethanol and left to dry for 5 min to avoid any influence of olfactory cues. Registered reactions included: time in the open/closed arms and the center, open/closed arms, and center entries. Then, a trained observer who was blinded to the experimental treatment of the rats scored behavioral responses.

#### 4.2.4. White and Illuminated Open Field Test (OF)

Recording was performed: at baseline and on the 45th and 90th post-injection days (Figure 7) according to the procedure that we have described previously [33]. The open area (100 × 100 × 60 cm) was made of white wood and was placed in a quiet and dark room adjacent to the housing room. Each arena surface was divided into 25 equal squares with white lines. A white-light lamp of 200 W was placed 75 cm over the center of the arena during testing (for the rodents, an illuminated and open compartment is considered to be more stressful than a dark enclosed one) [56]. The animals were gently transported in the home cages to the room and released into one of the corners of the arena (start corner). Each OF exposure lasted for 30 min, during which the animals were left undisturbed in the testing room. After the test, the arena was cleaned with water, alcohol, and water again.

In order to minimize bias, during the exposure of the rats to the OF test, the behavioral responses of the individuals were recorded using a video camera, positioned approximately 200 cm over the center of the maze and connected to a video-tracking digitizing device (EthoVision XT, Noldus, Wageningen, The Netherlands). Behavioral responses recorded included: exploration (measured as number of lines crossed), freezing time, time at periphery and center, center entries, rearing, grooming, defecation and miction (frequency—number of behaviors occurring) [66]. Then, a trained observer who was blinded to the experimental treatment of the rats scored behavioral responses.

#### 4.2.5. Test of Spatial Memory in Morris Water Maze (MWM)

Morris water maze (MWM) testing was determined at baseline and on the 45th and 90th post-injection days (after the first STZ or VEH injections (Figure 7)). Spatial reference memory was tested first followed by spatial working memory according to the procedure that we described previously [61,67]. Briefly, MWM training with a visible platform was performed initially. If the rat did not locate the platform within 60 s, it was gently steered towards the platform by hand. After 5 min, a screening trial with a visible platform was performed in order to exclude rats with motivational or sensory-motor deficits. The spatial memory testing phase occurred over 8 days and was performed in two stages: reference memory testing with platform position remaining constant for all training sessions (3 days, 4 120 s trials per day and a probe test without a platform on the 4th day) and working memory testing with the platform position changed every day (4 days, 4 trials a day). Inter-trial interval (ITI) was 10 min. In order to minimize bias, during the exposure of the rats to the MWM test, the behavioral responses of the individuals were recorded using a video camera, positioned approximately 200 cm over the center of the maze and connected to a video-tracking (EthoVision XT, Noldus, Wageningen, The Netherlands). Three MWM parameters were measured with the use of a video-tracking digitizing device: latency to reach the platform (in most trials) or the critical annulus (CA—virtual contour of the removed platform) in the probe test, distance swum (path length), and the percentage of time spent in the critical quadrant (CQ) of the pool (where the platform was located). Then, a trained observer who was blinded to the experimental treatment of the rats scored behavioral responses.

#### 4.2.6. Immunohistochemistry

In order to determine activated microglia cells and unaggregated, oligomeric and fibrillar forms of beta Amyloid 42 and unaggregated beta Amyloid 40 ( $A\beta_{1-42}$  and  $A\beta_{1-40}$ ) we used immunofluorescence labeling on brain sections. Since numerous studies have shown that strong expression of the lysosomal protein CD68 can be used for activated microglia staining [68,69], we detected activated microglia cells (CD68<sup>+</sup> cells) according to the method we described earlier [67]. Fixed brains were cut on a cryostat (CM1850, Leica Wetzlar, Germany) to obtain 20  $\mu$ m thick sections. The sections were then placed in buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 5% bovine serum albumin (BSA) and 0.3% Tris X for 2 h blocking. In the next step, the sections were rinsed 3 times for 5 min each with PBS solution. The tissue was then placed for 48 h in a primary antibody solution (mouse anti-rat, Sigma Aldrich, MAB1435, 1:250 for determination of CD68<sup>+</sup> cells or the monoclonal mouse antibody anti-rat, Novusbio NBP2-13075, 1:300 for the detection of  $A\beta$  peptide 42 or 40) in PBS containing 5% BSA and 0.3% Tris-X. After another 3 washings, the sections were placed in a secondary antibody solution (goat anti-mouse, Abcam, Alexa Fluor 488, ab150113, 1:500 for both CD68<sup>+</sup> microglia cells or  $A\beta$  peptide) in PBS for 2 h. After this procedure, the sections for labeling of CD68<sup>+</sup> microglia cells were placed on gelatinized slides and covered with DPX solution to cover the slides with a coverslip. The prepared slides were photographed using a fluorescence microscope (Zeiss Axio Scope A1, Oberkochen Germany) compatible with the Axio Vision software. 2.10. The sections for detecting  $A\beta$  peptide deposits were then placed on gelatinized slides and covered with a fluoromount-G solution in dapi (Invitrogen, 00-4959-52, Waltham, MA, USA) to cover the slides with a coverslip. The prepared slides were photographed using a fluorescence microscope (DM1000 LED, Leica, Wetzlar, Germany) compatible with the LAS X program.

#### 4.2.7. Quantification of Labelled Cells

In order to minimize bias, counting of microglia cells and beta-amyloid deposits was performed by an observer who was blinded to the experimental treatment of the rats. CD68 positive (CD68<sup>+</sup>) cells and beta amyloid ( $A\beta$ ) positive peptides were counted in both hemispheres of each tested structure. The borders of the brain structures were determined on the basis of the Paxinos and Watson atlas [62], outlined by a counter, and an area of

the region was computed by the software. The image was adjusted through a threshold procedure such that neighboring areas with only nonspecific background staining would contain no positive signals. The number of microglia cells (CD68<sup>+</sup>) was counted with a calibrated frame over an area of 0.01 mm<sup>2</sup> whereas the number of beta-amyloid (A $\beta$ ) peptide was counted with a calibrated frame over an area of 0.1 mm<sup>2</sup>. The density of CD68<sup>+</sup> cells or A $\beta$  peptide were computed (number per 1 mm<sup>2</sup>) in each tested area. When possible, the value of three separate counts including both brain hemispheres of an individual brain region for each animal (3 sections) was averaged and used as a single data point.

#### 4.2.8. Peripheral Blood Total Leukocyte and Leukocyte Subset Number

One hour after the last session of EPM, OF and Morris test, blood samples in a volume of 5 mL were collected by a cardiac puncture under 2.5% isoflurane (airflow: 0.5 l per min) anesthesia using an isoflurane pump (Bitmos OXY 6000, Bitmos GmbH, Düsseldorf, Germany). Then, rats were euthanized with Morbital (2 mL/kg), brain, spleen and thymus were harvested from STZ and VEH animals. The total leukocyte number and total and percentage of lymphocytes, granulocytes and monocytes were determined with the hematology analyzer (Horriba, Loos, France).

Lymphocyte populations and subpopulations were determined using cytometric analysis according to the method that we described previously [61,70] with some modifications. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized whole blood by the Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and Uropolinum (Polfa, Starogard, Poland) density centrifugation method. After the centrifugation (1113 $\times$  g, 30 min at 4 °C), the isolated cells were collected with a Pasteur pipette, washed with phosphate-buffered saline (PBMC) suspension in RPMI-1640 with a 10% calf bovine serum, and seeded at a concentration of 4  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL and used in the flow cytometry analysis.

A three-color combination of fluorescent monoclonal antibodies was used in the blood and spleen lymphocyte study to identify T (CD3<sup>+</sup>), B (CD45RA<sup>+</sup>), NK (CD161a<sup>+</sup>) lymphocytes and T lymphocyte subsets of the T helper (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) and T cytotoxic (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) lymphocyte percentage. A total of 25  $\mu$ L of the whole blood was added to 25  $\mu$ L of IOTest CD3-FITC/CD45RA-PC7/CD161a-APC or CD3-FITC/CD4-PC7/CD8-APC (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Erythrocytes were lysed (Versalyse, Beckman Coulter), and then blood and spleen samples were mixed and incubated at room temperature for 20 min in darkness. After incubation, 25  $\mu$ L of Fixative Solution (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and 700  $\mu$ L of PBS was added to the separate sample. Samples were protected from light and stored at 4 °C until flow cytometry had been performed with a Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and MXP Software version 2.0. The percentages of lymphocyte population and T lymphocyte subsets were assessed during the assay, displaying forward- and side-scatter characteristics. Then, total numbers of the lymphocyte population and their subsets were calculated on respective counts of the total leukocyte number and a percentage of the T (CD3<sup>+</sup>), B (CD45RA<sup>+</sup>), NK (CD161a<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>T, and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes.

#### 4.2.9. Determination of Pro-Inflammatory Interleukin (IL)-6 and Anti-Inflammatory Interleukin (IL)-10

IL-6 and IL-10 concentrations in plasma were determined by enzyme-linked immunoassay (ELISA) using a commercially available kit (Rat-IL6 and Rat-IL-10 ELISA kits Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions and our previous study [35]. Briefly, 100 or 50  $\mu$ L of standards or samples were dispensed into 96 wells coated with rat IL-6 and IL-10 antibody, respectively, and incubated for 2 h (IL-6) and 1 h (IL-10) at room temperature. After extensive washing, 100  $\mu$ L of the biotinylated anti-IL-6 or anti-IL-10 were added to each well, and the plates were incubated for 1 h (IL-6 and IL-10) at room temperature. The wells were again washed 3 times, 100  $\mu$ L of Streptavidin-HRP was added, and incubation was carried out for 30 min. 3,3',5,5'-

tetramethylbenzidine (TMB) (100  $\mu$ L/well) was used as the chromogen for the colorimetric assay. The reaction was stopped after 10 min by adding 100  $\mu$ L/well of stop solution, and the absorbance was determined using the DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) system set to 450 nm. Cytokine concentrations were calculated based on the standard curve generated by Beckman Coulter's Biomek software version i5 program based on the absorbance of standard samples. The sensitivity of detection was 16 pg/mL for IL-6 and 3 pg/mL for IL-10.

#### 4.2.10. Determination of Plasma Corticosterone (CORT) Concentration

Concomitantly with the immune parameters, in the same animals, the plasma corticosterone (CORT) concentrations were measured. Blood samples were collected via heart puncture under 2.5% isoflurane (airflow: 0.5 L per min) anesthesia using an isoflurane pump (Bitmos OXY 6000, Bitmos GmbH Düsseldorf, Germany) between 9:00 and 10:00 A.M., when CORT levels are at their lowest [71]. The plasma CORT concentration was measured by radioimmunoassay using a commercially available kit (rCorticosterone ( $^{125}$ I) RIA KIT, isotop Institute of Isotopes Co, Ltd., Budapest, Hungary) and Wizard 1470 gamma counter (Pharmacia—LKB, Turku, Finland). The measures were made in a duplicate. The sensitivity of the assay was 0.01 ng/tube.

#### 4.2.11. Peripheral Blood Hematological Parameters

Peripheral blood hematological parameters—red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (HGB), mean hemoglobin concentration in the red blood cell (MCHC), mean mass of the hemoglobin in the red blood cell (MCH), mean corpuscular volume (MCV), hematocrit (HCT), and red cell distribution width (RDW)—were determined in the heparinized whole blood with the hematology analyzer (Horriba, France).

#### 4.2.12. Data Analysis

The data are presented as the mean  $\pm$  SD. The normality of the distribution of the variables was checked with Kolmogorow-Smirnov test and the homogeneity of the variances with a Levene test. As the outcome of Kolmogorow-Smirnov test indicated that all data, was not distributed normally, we used for further statistical evaluation of behavioral and neuroimmune parameters, non-parametric tests. Data were evaluated using the Kruskal–Wallis one-way ANOVA with factors AD-like induction (STZ\_VEH), and response to novelty (HRs\_LRs) for multiple comparisons, followed by the Mann–Whitney U test for comparisons between two groups. A *p* value lower than 0.05 was considered statistically significant.

## 5. Conclusions

The results suggest that mechanisms underlying individual differences in responsiveness to environmental factors, including stress reactivity and anxiety levels influence the progression of memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation used as a rat model of early pathophysiological changes in sporadic Alzheimer's disease (sAD). Behavioral activity associated with memory and anxiety disorders, levels of neuroinflammation, and  $\beta$ -amyloid peptide accumulation in the brain are more pronounced in rats with high reactivity to novelty, suggesting that HRs have an elevated risk of developing sAD. These findings highlight that an individual's behavioral characteristics should be considered as risk factors and predictors of sAD pathology and thus may help to develop future effective preventive and therapeutic approaches for this disease.

**Supplementary Materials:** The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms252111562/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.D. and D.W.; methodology, J.D., G.Š. and D.W.; validation, J.D. and D.W.; formal analysis, J.D. and D.W.; investigation, J.D. and D.W.; writing—original draft preparation, J.D.; writing—review and editing, D.W.; visualization, J.D.; supervision, D.W.; project

administration, D.W.; funding acquisition, J.D. and D.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Statutory Activities of the Department of Animal and Human Physiology of the University of Gdansk (531-D080-D248-23 and 531-D080-D248-24).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Local Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals at the University of Technology in Bydgoszcz, Poland (60/2017, 14 December 2017).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article and Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Paweł Matulewicz for his help with stereotactic procedure and Irena Majkutewicz for her help with the microscope photography.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Yang, A.; Daya, T.; Carlton, K.; Yan, J.H.; Schmid, S. Differential effect of clomipramine on habituation and pre pulse inhibition in dominant versus subordinate rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2016**, *26*, 591–601. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Walsh, D.; Selkoe, D.J. A beta oligomers—A decade of discovery. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1172–1184. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Mao, P.; Reddy, P.H. Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Implications for early intervention and therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1812*, 1359–1370. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Feng, Y.; Wang, X. Antioxidant Therapies for Alzheimer's Disease. *Oxidative Med. Cellul. Longev.* **2012**, *2012*, 472932. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Esiri, M. The interplay between inflammation and neurodegeneration in cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* **2007**, *184*, 4–16. [\[CrossRef\]](#)
6. Naseri, N.N.; Wang, H.; Guo, J.; Sharma, M.; Luo, W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **2019**, *705*, 183–194. [\[CrossRef\]](#)
7. Lorenzi, E.; Franceschini, D.; Contardi, C.; Martino, R.; Seghetti, F.; Serra, M.; Bisceglia, F.; Pagetta, A.; Zusso, M.; Belluti, F. Modulation of Amyloid  $\beta$ -Induced Microglia Activation and Neuronal Cell Death by Curcumin and Analogues. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4381. [\[CrossRef\]](#)
8. Bomboi, G.; Castello, L.; Cosentino, F.; Giubilei, F.; Orzi, F.; Volpe, M. Alzheimer's disease and endothelial dysfunction. *Neurol. Sci.* **2010**, *31*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
9. Vlassara, H.; Cai, W.; Chen, X.; Serrano, E.J.; Shobha, M.S.; Uribarri, J.; Woodward, M.; Striker, G.E. Managing chronic inflammation in the aging diabetic patient with CKD by diet or sevelamer carbonate: A modern paradigm shift. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2012**, *67*, 1410–1416. [\[CrossRef\]](#)
10. Puca, A.A.; Carrizzo, A.; Villa, F.; Ferrario, A.; Casaburo, M.; Maciag, A.; Vecchione, C. Vascular aging: The role of oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 556–559. [\[CrossRef\]](#)
11. Claessens, S.E.; Daskalakis, N.P.; van der Veen, R.; Oitzl, M.S.; de Kloet, E.; Champagne, D.L. Development of individual differences in stress responsiveness: An overview of factors mediating the outcome of early life experiences. *Psychopharmacology* **2011**, *214*, 141–154. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Ebner, K.; Singewald, N. Individual differences in stress susceptibility and stress inhibitory mechanisms. *Curr. Opin. Behav. Sci.* **2017**, *14*, 54–64. [\[CrossRef\]](#)
13. Piazza, P.V.; Deminiere, J.M.; Le Moal, M.; Simon, H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* **1989**, *245*, 1511–1513. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Ingram, D.K.; Corfman, T.P. An overview of neurobiological comparisons in mouse strains. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1980**, *4*, 421–435. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Piazza, P.V.; Maccari, S.; Deminiere, J.M.; Le Moal, M.; Mormede, P.; Simon, H. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2088–2092. [\[CrossRef\]](#)
16. Deroche, V.; Piazza, P.V.; Casolini, P.; Maccari, S.; Le Moal, M.; Simon, H. Stress-induced sensitization to amphetamine and morphine psychomotor effects depend on stress-induced corticosterone secretion. *Brain Res.* **1992**, *598*, 343–348. [\[CrossRef\]](#)
17. Lecanu, L.; Papadopoulos, V. Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat models. *Alzheimers Res. Ther.* **2013**, *5*, 17. [\[CrossRef\]](#)
18. Moreira-Silva, D.; Carrettiro, D.; Oliveira, A.; Rodrigues, S.; Santos-Lopes, J.; Canas, P.; Cunha, R.; Almeida, M.; Ferreira, T. Anandamide effects in a streptozotocin-induced Alzheimer's Disease-Like Sporadic Dementia in Rats. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 653. [\[CrossRef\]](#)

19. Salkovic-Petrisic, M.; Hoyer, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: An experimental approach. *J. Neural. Transm. Suppl.* **2007**, *72*, 217–233. [[CrossRef](#)]
20. Mayer, G.; Nitsch, R.; Hoyer, S. Impairments in passive avoidance learning after cerebral inhibition of cerebral glucose metabolism. *J. Neural. Transm.* **1989**, *1*, 103–104. [[CrossRef](#)]
21. Grünblatt, E.; Salkovic-Petrisic, M.; Osmanovic, J.; Riederer, P.; Hoyer, S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 757–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Espinosa, J.; Rocha, A.; Nunes, F.; Costa, M.S.; Schein, V.; Kazlauckas, V.; Kalinine, E.; Souza, D.O.; Cunha, R.A.; Porciúncula, L.O. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *34*, 509–518. [[CrossRef](#)]
23. Santos, T.O.; Mazucanti, C.H.; Xavier, G.F.; Torráo, A.S. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol. Behav.* **2012**, *107*, 401–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Peng, D.; Pan, X.; Cui, J.; Ren, Y.; Zhang, J. Hyperphosphorylation of tau protein in hippocampus of central insulin-resistant rats is associated with cognitive impairment. *Cell Physiol. Biochem.* **2013**, *32*, 1417–1425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yang, W.; Ma, J.; Liu, Z.; Lu, Y.; Hu, B.; Yu, H. Effect of naringenin on brain insulin signaling and cognitive functions in ICV-STZ induced dementia model of rats. *Neurol. Sci.* **2014**, *35*, 741–751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Deminiere, J.M.; Piazza, P.V.; Le Moal, M.; Simon, H. Experimental approach to individual vulnerability to psychostimulant addiction. *Neurosci. Behav. Rev.* **1989**, *13*, 141–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bradberry, C.W.; Gruen, R.J.; Berridge, C.W.; Roth, R.H. Individual differences in behavioral measures: Correlations with nucleus accumbens dopamine measured by microdialysis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1991**, *39*, 877–882. [[CrossRef](#)]
28. Hooks, M.S.; Jones, G.H.; Smith, A.D.; Neill, D.B.; Justice, J.B., Jr. Individual differences in locomotor activity and sensitization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1991**, *38*, 467–470. [[CrossRef](#)]
29. Piazza, P.V.; Rougé-Pont, F.; Deminière, J.M.; Kharoubi, M.; Le Moal, M.; Simon, H. Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Res.* **1991**, *567*, 169–174. [[CrossRef](#)]
30. Cools, A.R.; Gingras, M.A. Nijmegen high and low responders to novelty: A new tool in the search after the neurobiology of drug abuse liability. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, *60*, 151–159. [[CrossRef](#)]
31. Basu, S.; Dasgupta, P.S. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J. Neuroimmunol.* **2000**, *102*, 113–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wrona, D.; Jurkowski, M.; Luszawska, D.; Tokarski, J.; Trojniar, W. The effects of lateral hypothalamic lesions on peripheral blood natural killer cell cytotoxicity in rats hyper- and hyporesponsive to novelty. *Brain Behav. Immun.* **2003**, *17*, 453–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wrona, D.; Jurkowski, M.K.; Tokarski, J. Blood and spleen natural killer cell cytotoxicity after exposure to open field stress in rats: Effect of spontaneous locomotor activity. *J. Neuroimmunol.* **2004**, *150*, 88–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wrona, D.; Sukiennik, L.; Jurkowski, M.K.; Jurkowlanec, E.; Glac, W.; Tokarski, J. Effects of amphetamine on NK-related cytotoxicity in rats differing in locomotor reactivity and social position. *Brain Behav. Immun.* **2005**, *19*, 69–77. [[CrossRef](#)]
35. Wrona, D.; Listowska, M.; Kubera, M.; Glac, W.; Grembecka, B.; Plucińska, K.; Majkutewicz, I.; Podlacha, M. Effects of chronic desipramine pretreatment on open field-induced suppression of blood natural killer cell activity and cytokine response depend on the rat's behavioral characteristics. *J. Neuroimmunol.* **2014**, *268*, 13–24. [[CrossRef](#)]
36. Bannerman, D.M.; Rawlins, J.N.; McHugh, S.B.; Deacon, R.M.; Yee, B.K.; Bast, T.; Zhang, W.N.; Pothuizen, H.H.; Feldon, J. Regional dissociations within the hippocampus—Memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2004**, *28*, 273–283. [[CrossRef](#)]
37. Bannerman, D.M.; Sprengel, R.; Sanderson, D.J.; McHugh, S.B.; Rawlins, J.N.; Monyer, H.; Seeburg, P.H. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15*, 181–192. [[CrossRef](#)]
38. Hong, L.; Kaang, B.K. The complexity of ventral CA1 and its multiple functionalities. *Genes Brain Behav.* **2022**, *21*, e12826. [[CrossRef](#)]
39. Richmond, M.A.; Yee, B.K.; Pouzet, B.; Veenman, L.; Rawlins, J.N.; Feldon, J.; Bannerman, D.M. Dissociating context and space within the hippocampus: Effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav. Neurosci.* **1999**, *113*, 1189–1203. [[CrossRef](#)]
40. Phillips, M.L.; Robinson, H.A.; Pozzo-Miller, L. Ventral hippocampal projections to the medial prefrontal cortex regulate social memory. *eLife* **2019**, *8*, e44182. [[CrossRef](#)]
41. Jimenez, J.C.; Berry, J.E.; Lim, S.C.; Ong, S.K.; Kheirbek, M.A.; Hen, R. Contextual fear memory retrieval by correlated ensembles of ventral CA1 neurons. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. LeDoux, J.E. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **2000**, *23*, 155–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kosugi, K.; Yoshida, K.; Suzuki, T.; Kobayashi, K.; Yoshida, K.; Mimura, M.; Tanaka, K.F. Activation of ventral CA1 hippocampal neurons projecting to the lateral septum during feeding. *Hippocampus* **2021**, *31*, 294–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Brog, J.S.; Salyapongse, A.; Deutch, A.Y.; Zahm, D.S. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the “accumbens” part of the rat ventral striatum: Immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J. Comp. Neurol.* **1993**, *338*, 255–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Sierra-Mercado, D.; Padilla-Coreano, N.; Quirk, G. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral Hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* **2010**, *36*, 529–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Marinelli, M.; Piazza, P.V. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur. J. Neurosci.* **2002**, *16*, 387–394. [[CrossRef](#)]
47. Simon, H.; Taghzouti, K.; Gozlan, H.; Studler, J.M.; Louilot, A.; Herve, D.; Glowinski, J.; Tassin, J.P.; Le Moal, M. Lesion of dopaminergic terminals in the amygdala produces enhanced locomotor response to D-amphetamine and opposite changes in dopaminergic activity in prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res.* **1988**, *447*, 335–340. [[CrossRef](#)]
48. Meyer, M.E.; Hartesveldt, C.; Potter, T.J. Locomotor activity following intra-accumbens microinjections of dopamine D1 agonist SK and F 38393 in rats. *Synapse* **1993**, *13*, 310–314. [[CrossRef](#)]
49. Iordanova, M.D.; Westbrook, R.F.; Killcross, A.S. Dopamine activity in the nucleus accumbens modulates blocking in fear conditioning. *Eur. J. Neurosci.* **2006**, *24*, 3265–3270. [[CrossRef](#)]
50. Brauer, K.; Hausser, M.; Hartig, W.; Arendt, T. The core-shell dichotomy of nucleus accumbens in the rhesus monkey as revealed by double-immunofluorescence and morphology of cholinergic interneurons. *Brain Res.* **2000**, *858*, 151–162. [[CrossRef](#)]
51. Jensen, J.; McIntosh, A.R.; Crawley, A.; Mikulis, D.J.; Remington, G.; Kapur, S. Direct activation of the ventral striatum in anticipation of aversive stimuli. *Neuron* **2003**, *40*, 1251–1257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Levita, L.; Dalley, J.W.; Robbins, T.W. Nucleus accumbens dopamine and learned fear revisited: A review and some new findings. *Behav. Brain Res.* **2002**, *137*, 115–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Dutta, S.; Beaver, J.; Halcomb, C.; Jasnow, A. Dissociable roles of the nucleus accumbens core and shell subregions in the expression and extinction of conditioned fear. *Neurobiol. Stress* **2021**, *15*, 100365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sandi, C. Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trends Neurosci.* **2011**, *34*, 165–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Piazza, P.V.; Rouge-Pont, F.; Deroche, V.; Maccari, S.H.; LeMoal, M. Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8716–8720. [[CrossRef](#)]
56. Piazza, P.V.; Le Moal, M. Glucocorticoids as a biological substrate of reward: Physiological and pathophysiological implications. *Brain Res. Rev.* **1997**, *25*, 359–372. [[CrossRef](#)]
57. Rohleder, N.; Wolf, J.M.; Kirschbaum, C.; Wolf, O.T. Effects of cortisol on emotional but not on neutral memory are correlated with peripheral glucocorticoid sensitivity of inflammatory cytokine production. *Int. J. Psychophysiol.* **2009**, *72*, 74–80. [[CrossRef](#)]
58. Nakagawa, K.; Kiko, T.; Kuriwada, S.; Miyazawa, T.; Kimura, F.; Miyazawa, T. Amyloid  $\beta$  induces adhesion of erythrocytes to endothelial cells and affects endothelial viability and functionality. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 2030–2033. [[CrossRef](#)]
59. Pitychoutis, P.M.; Sanoudou, D.; Papandreou, M.; Nasias, D.; Kouskou, M.; Tomlinson, C.R.; Tsonis, P.A.; Papadopoulou-Daifoti, Z. Forced swim test induces divergent global transcriptomic alterations in the hippocampus of high versus low novelty-seeker rats. *Hum. Genom.* **2014**, *8*, 4. [[CrossRef](#)]
60. Luo, J.; Thomassen, J.Q.; Bellenguez, C.; Grenier-Boley, B.; de Rojas, I.; Castillo, A.; Parveen, K.; Küçükali, F.; Nicolas, A.; Peters, O.; et al. Genetic associations between modifiable risk factors and Alzheimer disease. *JAMA Netw. Open* **2023**, *6*, e2313734. [[CrossRef](#)]
61. Wrona, D.; Majkutewicz, I.; Świątek, G.; Dunacka, J.; Grembecka, B.; Glac, W. Dimethyl fumarate as the peripheral blood inflammatory mediators inhibitor in prevention of streptozotocin-induced neuroinflammation in aged rats. *J. Neuroinflamm. Res.* **2022**, *15*, 33–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2007; ISBN 978-0-0804-7515-8.
63. Salkovic-Petrisic, M.; Osmanovic-Barilar, J.; Bruckner, M.K.; Hoyer, S.; Arendt, T.; Riederer, P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: A long-term follow up study. *J. Neural. Transm.* **2011**, *118*, 765–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bloch, K.; Gil-Ad, I.; Vanichkin, A.; Hornfeld, S.; Koroukhov, N.; Taler, M.; Vardi, P.; Weizman, A. Intracerebroventricular streptozotocin induces obesity and dementia in Lewis rats. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *60*, 121–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Podlacha, M.; Glac, W.; Listowska, M.; Grembecka, B.; Majkutewicz, I.; Myślińska, D.; Plucińska, K.; Jerzemowska, G.; Grzybowska, M.; Wrona, D. Medial septal NMDA glutamate receptors are involved in modulation of blood natural killer cell activity in rats. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2016**, *11*, 121–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Clamage, D.; Sanford, C.; Vander, A.; Mouw, D. Effects of psychosocial stimuli on plasma renin in rats. *Am. J. Physiol.* **1976**, *231*, 1290–1294. [[CrossRef](#)]
67. Majkutewicz, I.; Kurowska, E.; Podlacha, M.; Myślińska, D.; Grembecka, B.; Ruciński, J.; Plucińska, K.; Jerzemowska, G.; Wrona, D. Dimethyl fumarate attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory impairment and hippocampal neurodegeneration in rats. *Behav. Brain Res.* **2016**, *308*, 24–37. [[CrossRef](#)]
68. Slepko, N.; Levi, G. Progressive activation of adult microglia cells in vitro. *Glia* **1996**, *16*, 241–246. [[CrossRef](#)]
69. Schnieder, T.P.; Trenceska, I.; Rosoklia, G.; Stankov, A.; Mann, J.J.; Smiley, J.; Dwork, A.J. Microglia of prefrontal white matter in suicide. *J. Neuropathol. Exp.* **2014**, *73*, 880–890. [[CrossRef](#)]

70. Listowska, M.; Glac, W.; Grembecka, B.; Grzybowska, M.; Wrona, D. Change in blood CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in stressed rats pretreated chronically with desipramine are more pronounced after chronic open field stress challenge. *J. Neuroimmunol.* **2015**, *282*, 54–62. [[CrossRef](#)]
71. Ulrich-LAI, Y.; Herman, J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 397–409. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Behavioural activity in the elevated plus maze (EPM) during the Test and re-Test (60 min after the Test) measured as entries to the open/closed arms and centre (a) and time spent in the open/closed arms and centre (b) of the maze in rats with high (HR) or low (LR) reactivity to novelty at baseline (before injections) and 45 and 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ, n=16) or citrate buffer (VEH, n=14).

Parameter/Group		Baseline		STZ 45		STZ 90		VEH 45		VEH 90	
		HR	LR	HR	LR	HR	LR	HR	LR	HR	LR
Open arm entries	Test	2.5±1	1.4±0.55	0±0 <sup>‡</sup>	1.33±0.58	0±0	0±0	1.67±0.58 <sup>‡</sup>	3.67±1.53	0±0 <sup>‡</sup>	1.67±0.58
	re-Test	1.25±0.5	1±0	0±0	0.67±0.58	0±0 <sup>‡</sup>	1.33±0.58 <sup>^</sup>	2±0 <sup>‡</sup>	0±0 <sup>‡</sup>	1±0 <sup>‡</sup>	0±0 <sup>‡</sup>
Entries to the centre	Test	3.75±1.71	5.6±2.61	5±0 <sup>‡</sup>	4.67±0.58	0±0 <sup>‡</sup>	1±0	3.67±1.15	3.67±1.53	2±1	4±1
	re-Test	9±3.27 <sup>‡</sup>	4.2±1.3	0±0 <sup>‡</sup>	1±0 <sup>^</sup>	4.67±0.58 <sup>^</sup>	4.67±0.58 <sup>^</sup>	6±2	3.67±0.58	1.33±0.58	1.33±0.58 <sup>^</sup>
Closed arm entries	Test	4.75±1.71	6.6±2.61	6±0	5.67±0.58	1±0 <sup>‡</sup>	2±0	4.67±1.15	4.67±1.53	3±1	5±1
	re-Test	10±3.27 <sup>‡</sup>	5.2±1.3	1±0 <sup>‡</sup>	2±0 <sup>^</sup>	5.67±0.58 <sup>^</sup>	5.67±0.58 <sup>^</sup>	7±2	4.67±0.58	2.33±0.58	2.33±0.58 <sup>^</sup>
Parameter/Group		Baseline		STZ 45		STZ 90		VEH 45		VEH 90	
Time in the open arms (s)	Test	12.33±6.90		3.65±3.20 <sup>***</sup>		0±0 <sup>***</sup>		20.88±4.9 <sup>*</sup>		12±13.16	
	re-Test	1.8±0.98 <sup>***</sup>		0.6±0.66 <sup>**</sup>		19.11±17.32 <sup>*</sup>		20.38±19.09		2.5±2.74	
Time in the centre (s)	Test	67.53±23.76		46.64±15.97 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>		7.5±8.80 <sup>***</sup>		31.23±10.54 <sup>***</sup>		31±13.22 <sup>***</sup>	
	re-Test	52.56±18.63		9.01±10.63 <sup>*&amp;&amp;***</sup>		32.33±13.06 <sup>***</sup>		22.34±6.48 <sup>***</sup>		27±11.28 <sup>***</sup>	
Time in the closed arms (s)	Test	220.13±25.44		249.67±16.88 <sup>&amp;&amp;&amp;***</sup>		292.5±8.80 <sup>***</sup>		249.12±10.75 <sup>&amp;&amp;***</sup>		269±13.22 <sup>***</sup>	
	re-Test	226.25±7.41 <sup>^</sup>		281.18±18.27 <sup>*&amp;&amp;***</sup>		252.5±17.82 <sup>***</sup>		259.84±22.16		270.5±9.42 <sup>**</sup>	

Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using Mann-Whitney-U test; # - p≤0.05 indicates significance of differences between HR and LR within the STZ or VEH animals; ^ - p≤0.05, ^^ - p≤0.01, ^^ - p≤0.001 indicate significance of differences between Test and re-Test; & - p≤0.05, && - p≤0.01, &&& - p≤0.001 indicate significance of differences between 45 day and 90 day after injection; @ - p≤0.05, @@ - p≤0.01, @@@ - p≤0.001 indicate significance of differences vs baseline.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

Table S2. Total numbers of leukocytes, percentage and total numbers of lymphocytes (TCD3<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, B, NK), granulocytes and monocytes, plasma level of interleukin 6 (IL-6) and interleukin 10 (IL-10), number of red blood cells (RBC), haemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT), mean haemoglobin concentration in the red blood cell (MCHC), mean mass of the haemoglobin in the red blood cell (MCH), mean corpuscular volume (MCV), Red Cell Distribution Width (RDW) in rats non-divided and divided into rats with high (HR) or low (LR) reactivity to novelty 45 and 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ, n=16) or citrate buffer (VEH, n=14).

Group/Parameter	STZ 45	STZ 90	VEH 45	VEH 90	STZ 45 HR	STZ 45 LR	STZ 90 HR	STZ 90 LR	VEH 45 HR	VEH 45 LR	VEH 90 HR	VEH 90 LR
Leukocytes (No.x 10 <sup>9</sup> /μl)	7.53±1.83	6.44±1.47	6.01±1.76	5.46±1.97	7.7±1.28	7.44±2.42	6.2±2.04	6.13±1.08	5.43±1.13	5.82±1.72	5.03±2.24	5.69±2.1
Lymphocytes (No.x 10 <sup>9</sup> /μl)	5.71±1.77	4.78±1.4	4.46±1.37	4.63±1.81	6.3±1.44	5.38±2.2	4.83±1.7	4.45±1.44	4±1.21	4.42±1.36	5.48±2.44	4.27±1.51
Lymphocyte percentage (%)	77.48±5.22	75.03±10.02	76.33±6.37	76.49±5.96	75.82±6.08	78.72±1.63	72.58±13.56	72.58±13.56	74.68±7.43	78.61±1.36	75.38±1.46	76.5±7.15
CD3 <sup>+</sup> cell percentage (%)	38.08±7.21	36.57±7.78	31.34±10.41	35.63±5.22	32.9±6.78 <sup>z</sup>	43.27±1.84 <sup>z</sup>	30.29±3.86	37.52±7.68	36.55±8.99	26.13±9.98	37.12±4.67	34.03±7.43
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cell percentage (%)	27.17±9.62 <sup>z,4</sup>	16.42±3.53 <sup>z</sup>	19.43±8.92	19.61±3.47	32.71±9.95 <sup>z,4</sup>	21.63±6.33	17.15±5.38	16.51±2.14 <sup>z</sup>	15.63±6.09 <sup>z</sup>	18.37±8.4	20.6±5.62	19.43±0.45
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cell percentage (%)	11.09±2 <sup>*</sup>	13.63±2.58 <sup>*</sup>	9.35±3.63	11.42±1.46	12.26±2.23 <sup>*</sup>	9.91±0.92 <sup>*</sup>	12.35±2.91	15.03±2.47	6.16±3.06 <sup>*</sup>	10.14±3.16	11.47±1.58	11.51±1.95
CD3 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> cell percentage (%)	11.47±2.53 <sup>z,4</sup>	17.53±4.23	11.18±5.26 <sup>z,4</sup>	12.88±3.5	12.26±1.18	10.67±3.61	16.54±5.9	17.83±5	9.74±2.67	14.27±5.26	11.51±1.06	13.23±5.28
CD3 <sup>+</sup> CD161a <sup>+</sup> cell percentage (%)	2±0.65	3.13±2.02	2.03±0.68 <sup>*</sup>	1.4±0.51	1.99±0.33	2.02±0.98	1.92±1.48	3.3±2.27	2.01±0.8 <sup>*</sup>	2.06±0.66	0.97±0.23 <sup>*</sup>	1.9±0.23
Granulocytes (No.x 10 <sup>9</sup> /μl)	0.87±0.31	0.74±0.35	0.83±0.16	0.68±0.31	0.6±0.2 <sup>z</sup>	1.13±0.21 <sup>z</sup>	0.5±0.1	0.8±0.31	0.85±0.17 <sup>*</sup>	0.83±0.2	0.53±0.15	0.72±0.31
Granulocyte percentage (%)	8.39±3.77 <sup>*</sup>	10.19±4.4	12.4±3.86	11.14±4.18	6.17±2.83 <sup>*</sup>	9.43±4.41	7.27±1.33	12.03±5.24	13.6±1.49	12.47±4.69	10.48±5.06	12.53±3.22
Monocytes (No.x 10 <sup>9</sup> /μl)	1±0.21 <sup>z</sup>	0.89±0.43	0.57±0.24	0.73±0.32	0.8±0.13 <sup>z</sup>	1.15±0.17 <sup>z</sup>	0.6±0.2	1.03±0.55	0.43±0.06	0.57±0.23	0.93±0.37	0.64±0.28
Monocyte percentage (%)	13.6±4.06 <sup>*</sup>	15.96±6.17	9.27±1.97 <sup>z,4</sup>	13.13±3.23	11.7±2.66	14.66±5.02 <sup>z</sup>	14.17±5.58	18.53±6.94	8.73±1.65 <sup>*</sup>	9.5±2.16	14.15±3.3	12.47±3.52

Table S2 cont.

Group/Parameter	STZ 45	STZ 90	VEH 45	VEH 90	STZ 45 HR	STZ 45 LR	STZ 90 HR	STZ 90 LR	VEH 45 HR	VEH 45 LR	VEH 90 HR	VEH 90 LR
Plasma IL-6 concentration (pg/ml)	252.16±59.16	301.99±111.08	296.94±97.57	382.53±141.05	267.97±87.68	242.67±44.51	312.70±132.83	298.61±106.93	349.51±80.73 <sup>‡</sup>	266.89±98.55	362.33±149.28	396.34±148.26
Plasma IL-10 concentration (pg/ml)	36.29±10.22 <sup>‡</sup>	53.55±19.3 <sup>*</sup>	35.5±9.6	35.05±15.32	41.29±8.29	36.03±10.4 <sup>*</sup>	62.71±14.94	58±16.37 <sup>§</sup>	33.52±8.55	36.49±10.71	41.47±15.74	32.92±14.66
RBC (No. x10 <sup>6</sup> /μl)	8.38±0.4 <sup>***</sup>	7.19±1.71	7.74±0.73	7.76±0.41	8.12±0.4 <sup>*</sup>	8.57±0.28 <sup>‡</sup>	6.46±2.6	7.71±1.19	7.78±0.67	7.71±0.8	7.63±0.58	7.84±0.3
HGB (g/dL)	14.1±0.71 <sup>*</sup>	13.85±0.76 <sup>**</sup>	14.61±0.53 <sup>‡‡‡</sup>	12.82±0.83	13.72±0.74 <sup>‡*</sup>	14.31±0.57	13.4±0.36 <sup>‡</sup>	14.4±0.64 <sup>§</sup>	14.64±0.51 <sup>‡</sup>	14.7±0.44 <sup>‡‡‡</sup>	12.6±1.23	12.97±0.54
HCT (%)	44.55±2.38 <sup>‡</sup>	39.74±7.31	41.62±4.71	41.02±2.27	42.9±2.54 <sup>‡‡</sup>	45.7±1.46	35.8±11	43.23±3.25	41.73±4.38	41.45±5.38	40.4±2.76	41.4±2.18
MCHC (g/dL)	32.46±3.98 <sup>‡</sup>	33.18±1.14 <sup>**</sup>	33.93±3.17 <sup>‡‡</sup>	31.22±1.49	34.74±4.39 <sup>‡</sup>	30.43±2.64 <sup>‡‡‡</sup>	32.33±0.06	33.43±1.2 <sup>‡</sup>	33.71±3.07 <sup>‡</sup>	34.3±3.45	31.1±1.31	31.34±1.81
MCH (pg)	18.77±3.96	18.15±2.06 <sup>**</sup>	18.59±1.67 <sup>‡‡‡</sup>	16.5±0.75	20.98±5.49	17.13±0.67 <sup>‡</sup>	17.1±0.3	19±2.78 <sup>‡</sup>	18.36±1.3 <sup>‡‡</sup>	18.33±1.3 <sup>‡‡</sup>	16.5±0.69	16.54±0.88
MCV (μm <sup>3</sup> )	55.71±3.08	56.5±6.52	54.23±0.86	52.77±1.42	56.43±3.81	55.31±2.59	57.67±8.14	56.75±6.89	54.08±2.53	53.65±2.19	53±1.22	52.71±1.7
RDW (%)	12.67±1.76 <sup>‡</sup>	14.94±1.73 <sup>***</sup>	13.46±1.35 <sup>‡‡</sup>	12.42±0.84	11.7±2.14	12.96±1.61	14.8±1.99 <sup>‡</sup>	15.33±1.92 <sup>‡</sup>	12.83±0.31 <sup>‡</sup>	13.27±0.71	12.22±0.49	12.67±1.02
Group/Parameter	VEH 45 HR			VEH 45 LR			VEH 90 HR			VEH 90 LR		
CD3 <sup>+</sup> cell (No.x 10 <sup>3</sup> / μl)	1.39±0.16			1.43±0.53			1.67±0.21			1.30±0.32		
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> cell (No.x 10 <sup>3</sup> / μl)	0.76±0.26 <sup>‡</sup>			1.02±0.48			0.85±0.04			0.96±0.26		
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cell (No.x 10 <sup>3</sup> / μl)	0.29±0.13			0.55±0.20			0.51±0.19			0.55±0.05		
CD3 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> cell (No.x 10 <sup>3</sup> / μl)	0.58±0.31			0.59±0.4			0.52±0.08			0.52±0.24		
CD3 <sup>+</sup> CD161a <sup>+</sup> cell (No.x 10 <sup>3</sup> / μl)	0.79±0.04 <sup>‡</sup>			0.12±0.05			0.23±0.03 <sup>‡</sup>			0.54±0.06		

Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using Mann–Whitney-*U* test; # - p≤0.05, ## - p≤0.01 indicate significance of differences between HR and LR within the STZ or VEH animals; \* - p≤0.05, \*\* - p≤0.01, \*\*\* p≤0.001 indicate significance of differences between STZ and VEH 45 and 90 days after injection; & - p≤0.05, && - p≤0.01, &&& p≤0.001 indicate significance of differences between 45 day and 90 day after injection; \$ - p≤0.05, \$\$ - p≤0.01 indicate significance of differences between STZHR and VEHHR or STZLR and VEHLR.

### 3.1.2. Publikacja 2

**Publikacja:** Dunacka J., Grembecka B., Majkutewicz I., Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 treatment enhances working and reference memory by reducing neuroinflammation and amyloid beta deposition in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*, 2025, 18, 527. <https://doi.org/10.3390/ph18040527>. **IF=4.8; MNiSW=100 pkt.**

**Cel:** Zbadanie czy dokomorowe (ICV) podanie insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) z jednoczesną indukcją modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) złagodzi zaburzenia pamięci przestrzennej, obserwowane w tej chorobie i/lub zredukuje poziom neurozapalenia (aktywowane komórki mikrogleju CD68<sup>+</sup>) oraz tworzenie  $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN).

**Metodyka:** U szczurów Wistar Han (n=40) w warunkach bazalnych zbadano poziom pamięci przestrzennej w teście labiryntu wodnego Morrisa (MWM), a następnie poddano je dokomorowej iniekcji IGF-1 (dawka 2  $\mu$ g) jednocześnie z indukcją sAD (streptozotocyna, 3 mg/kg). Następnie na 3 etapach rozwoju sAD (7, 45 oraz 90 dzień sAD) ponownie zbadano poziom pamięci przestrzennej w teście MWM. Po uśmierceniu zwierząt (98 dzień sAD) natomiast określono (immunohistochemia) poziom neurozapalenia (aktywowane komórki mikrogleju, CD68<sup>+</sup>) oraz liczbę złogów  $\beta$ A w OUN.

**Wyniki:** Podanie ICV-IGF-1 w modelu sAD zredukowało zaburzenia referencyjnej pamięci przestrzennej o czym świadczy: (1) krótsza latencja dopłynięcia do platformy w 8 i 9 dniu sAD (2 i 3 dzień MWM), w 45 dniu sAD (1 dzień MWM) oraz w 90 dniu sAD (1 dzień MWM); (2) zwiększony % czasu spędzany w kwadrancie krytycznym w 45 dniu sAD (1 dzień MWM); oraz (3) krótszy pokonany dystans w 7,8 i 9 dniu sAD (dni 1-3 MWM). Podczas próby z usuniętą platformą (probe test) podanie ICV-IGF-1 również zwiększyło poziom pamięci referencyjnej, na co wskazuje krótsza latencja w 10 i 48 dniu sAD (4 dzień MWM) i krótszy pokonany dystans w 48 dniu sAD. Na etapie nabywania roboczej (dni 5-8 MWM) pamięci przestrzennej podanie ICV-IGF-1 u szczurów z modelem sAD również zniwelowało zaburzenia pamięci, o czym świadczy krótsza latencja dopłynięcia do platformy podczas próby 1 (11-14 dzień sAD), 2 oraz 4 (94-97 dzień sAD), a także krótszy przepłynięty dystans podczas 1 (11-14 dzień sAD, 94-97 dzień sAD), 3 (94-97 dzień sAD) i 4 (49-52 dzień sAD; 94-97 dzień sAD) próby. Ponadto w grupie zwierząt z modelem sAD, poddanych leczeniu z użyciem neurotrofiny IGF-1, zaobserwowano niższą liczbę złogów  $\beta$ A w obszarze CA1 hipokampa oraz niższą liczbę aktywowanych komórek mikrogleju w rejonie CA2 hipokampa, w jądrze

nadwzrokowym oraz w boczny obszarze przedwzrokowym, w porównaniu ze zwierzętami z modelem sAD niepoddanych leczeniu.

**Posumowanie:** Uzyskane wyniki wykazały, że podanie IGF-1 złagodziło zaburzenia pamięci roboczej i w mniejszym stopniu referencyjnej pamięci przestrzennej w modelu sAD, poprzez zredukowanie poziomu neurozapalenia, mierzonego liczbą komórek CD68<sup>+</sup>, w obszarze CA2 hipokampa oraz zniwelowanie gromadzenia złogów  $\beta$ A zwłaszcza w rejonie CA1 hipokampa.



Article

# Central Insulin-like Growth Factor-1 Treatment Enhances Working and Reference Memory by Reducing Neuroinflammation and Amyloid Beta Deposition in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease

Joanna Dunacka , Beata Grembecka , Irena Majkutewicz and Danuta Wrona \*

Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Gdansk, 59 Wita Stwosza Str, 80-308 Gdansk, Poland; joanna.dunacka@ug.edu.pl (J.D.); beata.grembecka@ug.edu.pl (B.G.); irena.majkutewicz@ug.edu.pl (I.M.)

\* Correspondence: danuta.lewandowska@ug.edu.pl

**Abstract: Background/Objectives:** Brain insulin resistance is a potential causal factor for dementia in Alzheimer's disease (AD). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), a neurotrophin, plays a key role in central insulin signaling and neuroprotection. Intracerebroventricular (ICV) administration of streptozotocin (STZ) disrupts insulin signal transduction, leading to brain insulin resistance, which may mimic the early pathophysiological changes in sporadic AD (sAD). In this study, we investigated whether restoring insulin signaling through ICV injection of IGF-1 could ameliorate spatial memory deficits during sAD progression in a rat model induced by ICV STZ injection. **Methods:** Male Wistar rats (n = 40) were subjected to double ICV injections of STZ (0.75 mg/kg/ventricle, days 2 and 4) and IGF-1 (1 µg/single injection, days 1 and 3), and placed at the Morris water maze (MWM) at baseline, 7, 45 and 90 days after injections. Reference (days 1–3 and day 4 MWM) and working (days 5–8 MWM) memory, microglia activation (CD68<sup>+</sup> cells), and amyloid β (Aβ) deposition (immunohistochemistry) were measured. **Results:** We found that ICVIGF-1 administration protected working memory demonstrated as (1) reduced latency to reach the platform, and reduced swimming distance in trials 3 ( $p < 0.05$ ) and 4 ( $p < 0.01$ ) on days 45 and 90 post-injection and (2) a short-term (up to 45 days post-injection) enhancement of reference memory, manifested by a reduction in swimming distance and latency ( $p < 0.05$ ). Furthermore, IGF-1 treatment reduced neuroinflammation in CA2 ( $p < 0.05$ ) and Aβ deposition in CA1 ( $p < 0.01$ ) of the hippocampus. **Conclusions:** Central IGF-1 attenuates spatial memory deficits in the ICVSTZ-induced sAD model by reducing neuroinflammation and Aβ accumulation in the hippocampus.

**Keywords:** IGF-1; insulin signaling; sporadic Alzheimer's disease; spatial memory; neuroinflammation; amyloid-β; streptozotocin; rat



Academic Editor: Wei Yang

Received: 17 February 2025

Revised: 27 March 2025

Accepted: 1 April 2025

Published: 4 April 2025

**Citation:** Dunacka, J.; Grembecka, B.; Majkutewicz, I.; Wrona, D. Central Insulin-like Growth Factor-1 Treatment Enhances Working and Reference Memory by Reducing Neuroinflammation and Amyloid Beta Deposition in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals* **2025**, *18*, 527. <https://doi.org/10.3390/ph18040527>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

in the consolidation of memory traces [1] and promoting the conversion of microglia to an anti-inflammatory M2 phenotype, thereby repairing damaged neural tissue in AD [3] or after stroke [4] by inhibiting neuroinflammation. This neurotrophin has protective properties against amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ )-induced toxicity in hippocampal cells [1]. Furthermore, the cooperation of insulin and IGF-I is needed to recover neuronal activity after hypoglycemia [2].

Insulin plays multiple neuronal roles, including regulating synaptic plasticity and synapse density [5–7]. Emerging evidence suggests that disruptions in the insulin/IGF-1/growth hormone axis, characteristic of diabetes, contribute to excessive  $A\beta$  production and neurodegenerative processes, potentially driving AD pathology. Hyperinsulinemia associated with type 2 diabetes leads to decreased insulin signaling in the brain [8]; thus, the brain in AD is in a state of insulin resistance [9], and AD has been referred to as “type 3 diabetes” [10,11]. Furthermore, loss of insulin receptors in the brain leads to increased levels of hyperphosphorylated Tau [12,13], which is prone to form neurofibrillary tangles in neurons [14]. Molecular findings suggest that insulin resistance and dysregulated IGF-1 signaling promote atherosclerosis and a pro-inflammatory state [13]. It suggests that type 2 mellitus and AD, in particular sporadic AD (sAD), share common risk factors, and molecular mechanisms, including impairment of insulin/IGF-1 signaling, and thus potentially common therapeutic targets [15].

Recent preclinical and clinical evidence indicates that central IGF-1, apart from regulating growth and development, prevents neuronal death mediated by amyloidogenesis, cerebral glucose deprivation, neuroinflammation, and apoptosis through modulation of phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B (PI3K), mammalian target of rapamycin and mitogen-activated protein kinase [16]. Acute administration of IGF-1 centrally can restore whole-body glucose homeostasis in old insulin-resistant animals [17,18]. IGF-1, as a regulator of oxidative stress responses, plays a regulatory role in the emergence of progressive neurodegenerative and neuroinflammatory conditions. However, the role of IGF-1 in the aging brain is complex and debated, due to its conflicting positive and negative effects [11,19]. In certain contexts, reduced IGF-1 signaling can enhance survival by limiting the production of reactive oxygen species and age-related neurodegenerative disorders [20,21]. Conversely, a deficiency in IGF-1 has been linked to cognitive impairments and a higher risk of poor cognitive performance in humans [19,22].

Intracerebroventricular (ICV) injection of streptozotocin (STZ) is a widely used animal model for mimicking dementia associated with sAD [23]. ICVSTZ injections alter the functioning of enzymes involved in cerebral glucose metabolism [24] and disrupt the insulin/IGF pathway simulating some of the cerebral alterations observed in AD [25]. ICVSTZ administration also induces neuroinflammation and oxidative stress [26], which are major characteristic features of AD and other dementias, and thus affects neurogenesis [27]. One of the early events observed during sporadic AD (sAD) was that ICVSTZ injection induces brain insulin receptor dysfunction [15,25] leading to a resistant brain state. Therefore, in this study, we investigated the effect of ICVIGF-1 administration, as a potential protective mechanism to counteract the ICVSTZ co-injection-induced insulin resistance state of the brain and changes in behavioral activity associated with reference and working memory (Morris Water Maze; MWM), neuroinflammation measured by number of activated microglia cells (CD68<sup>+</sup>), and  $A\beta$  deposition in the brain. To test the potential protective effect of IGF-1 on sAD progression in the rat model, we examined these parameters before ICV injection of IGF-1 and STZ (baseline) and after 7, 45, and 90 days of disease progression. We used the same procedure to induce the sAD model, as in our previous studies (injections of ICVSTZ at a cumulative dose of 3 mg/kg administered twice on days 2 and 4) [28–32]. Our findings suggest that enhancing central insulin signaling via IGF-1 can

improve cognitive functions in the rat model of sAD induced by ICV administration of STZ. This suggests the potential role of IGF-1 as a novel therapeutic target, also in combination with insulin, in the treatment of dementia in sporadic Alzheimer's disease.

## 2. Results

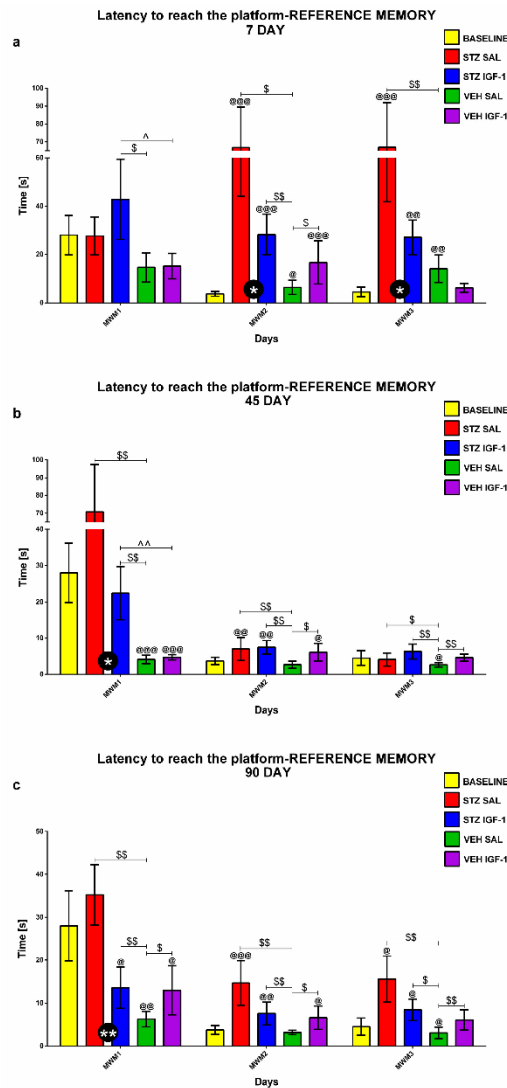
### 2.1. Spatial Memory Impairments in the Morris Water Maze (MWM) Test

#### 2.1.1. Reference Memory in the Morris Water Maze (MWM) Test

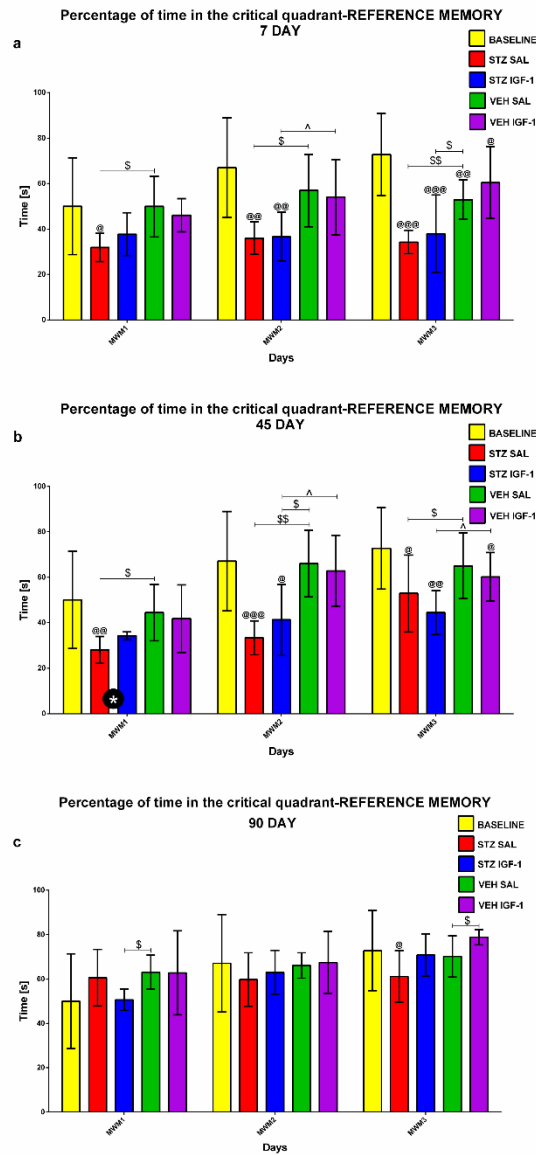
Reference memory in the MWM during 3 consecutive days (MWM1-MWM3, 4 Trials/day) and on the day without the platform (probe test, 1 Trial) was investigated at the baseline conditions (before injection) and starting from days 7, 45, and 90 after injection. Figures 1–3 show the results for behavioral activity during Trial 1 measured as latency to reach the platform (Figure 1), time spent in the critical quadrant (Figure 2), and total distance swum (Figure 3) within the STZSAL, STZIGF-1, VEHSAL, and VEHIGF-1 groups in comparison with the baseline (before injection).

Compared to STZSAL rats, the latency to reach the platform was significantly shorter in the STZIGF-1 group on days 8–9 (corresponding to MWM days 2 and 3,  $p < 0.05$ ; Figure 1a), day 45 (MWM day 1,  $p < 0.05$ ; Figure 1b), and day 90 post-injection (MWM day 1,  $p < 0.01$ ; Figure 1c). At days 91 and 92 post-injection (days 2 and 3 of the MWM) in the STZIGF-1 group, the latency was shorter compared to the STZSAL group, but the difference did not reach statistical significance. In the STZIGF-1 animals, the time spent in the critical quadrant was significantly longer 45 days after injection (Figure 2b;  $p < 0.05$ ) and the total distance swum was shorter at 7–9 days post-injection (Figure 3a; days 1–3 of the MWM,  $p < 0.01$ ), compared to the STZSAL group. At both 45 and 90 days post-injection, there were no significant differences in swimming distance between the STZIGF-1 and STZSAL groups, although a trend toward reduced swimming distance was observed in STZIGF-1 animals.

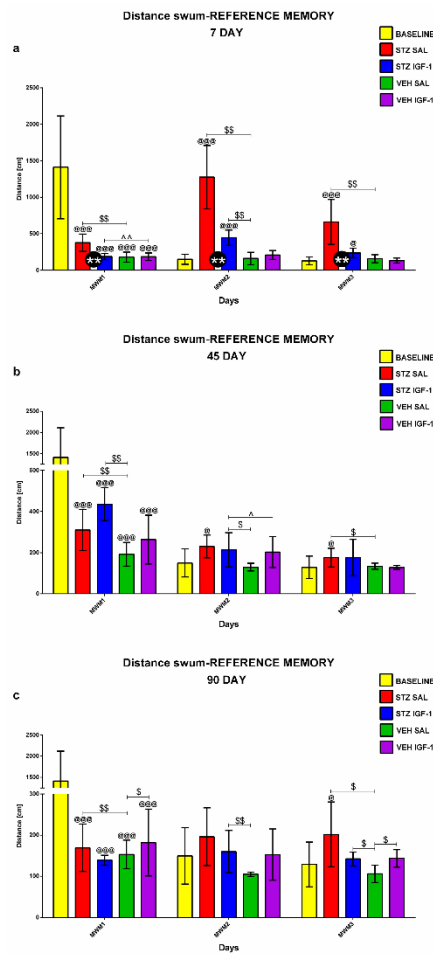
In addition, there was no significant difference between the STZIGF-1 and control VEHIGF-1 groups in the latency to reach the platform (except for days 7 and 45 post-injection, Figure 1a,b), in the time spent in the critical quadrant (except for days 46 and 47 post-injection, Figure 2b) and in the swimming distance (except for days 7 and 46 post-injection, Figure 3a,b). However, despite significantly shorter latency to reach the platform (Figure 1) and swimming distance (Figure 3) during Trial 1 of 3 consecutive days of the MWM compared to the STZSAL group, these parameters were still worsened in STZIGF-1 animals, particularly at days 45 and 90 after injection, compared to the control VEHSAL group.



**Figure 1.** Reference memory in the Morris water maze (MWM) test during 3 consecutive days (MWM1-MWM3, Trial 1) measured as latency to reach the platform in rats before injection (BASELINE, n = 40) and 7 (a), 45 (b), and 90 (c) days after intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) (STZSAL, n = 10) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1, n = 10) or citrate buffer (VEH) and SAL (VEHSAL, n = 10) or VEH and IGF-1 (VEHIGF-1, n = 10). Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using Mann–Whitney-U test; \* in a circle— $p < 0.05$ , \*\* in a circle— $p < 0.01$  difference between STZSAL and STZIGF-1 group; \$ above the line between the bars— $p < 0.05$ , \$\$ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEH SAL group; ^ above the line between the bars— $p < 0.05$ , ^^ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEH IGF-1 group; @— $p < 0.05$ , @@— $p < 0.01$ , @@@— $p < 0.001$  difference vs. baseline.



**Figure 2.** Reference memory in the Morris water maze (MWM) test during 3 consecutive days (MWM1-MWM3, Trial 1) measured as percentage of time spent in the critical quadrant in rats before injection (BASELINE, n = 40) and 7 (a), 45 (b), and 90 (c) days after intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) (STZSAL, n = 10) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1, n = 10) or citrate buffer (VEH) and SAL (VEHSAL, n = 10) or VEH and IGF-1 (VEHIGF-1, n = 10). Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using Mann–Whitney-U test; \* in a circle— $p < 0.05$ , difference between STZSAL and STZIGF-1 group; \$ above the line between the bars— $p < 0.05$ , \$\$ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEH SAL group; ^ above the line between the bars— $p < 0.05$ , difference vs. VEHIGF-1 group; @— $p < 0.05$ , @@— $p < 0.01$ , @@@— $p < 0.001$  difference vs. baseline.

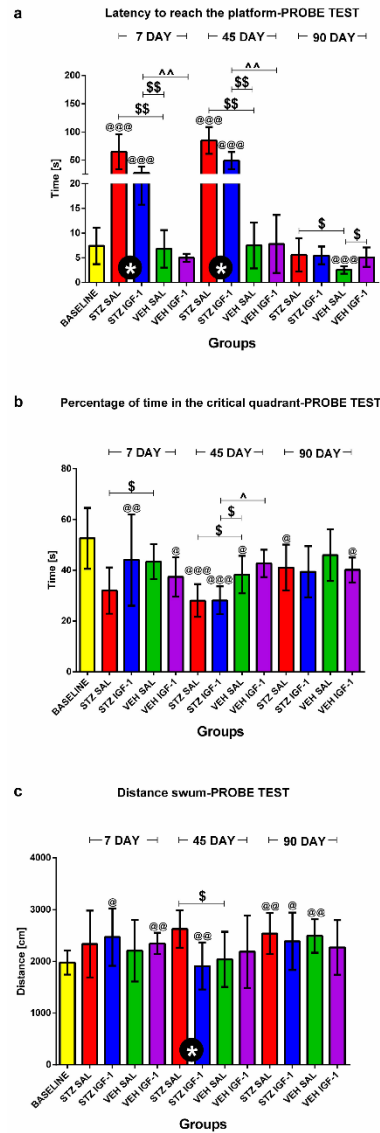


**Figure 3.** Reference memory in the Morris water maze (MWM) test during 3 consecutive days (MWM1-MWM3, Trial 1) measured as total distance swum in rats before injection (BASELINE, n = 40) and 7 (a), 45 (b), and 90 (c) days after intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) (STZSAL, n = 10) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1, n = 10) or citrate buffer (VEH) and SAL (VEHSAL, n = 10) or VEH and IGF-1 (VEHIGF-1, n = 10). Explanations: Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using Mann-Whitney-U test; \*\* in a circle— $p < 0.01$ , difference between STZSAL and STZIGF-1 group; \$ above the line between the bars— $p < 0.05$ , \$\$ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEH SAL group; ^ above the line between the bars— $p < 0.05$ , ^^ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEH IGF-1 group; @— $p < 0.05$ , @@— $p < 0.001$  difference vs. baseline.

### 2.1.2. Reference Memory Performance in the Probe Test on Day 4 of the Morris Water Maze (MWM) Test

The reference memory during the probe test is presented in Figure 4 and shows reference memory performance during a single trial on day 4 of the MWM when the platform was removed. As shown in Figure 4a, the latency to reach the platform was significantly ( $p < 0.05$ ) shorter in the STZIGF-1 group compared with STZSAL animals 7 and 45 days after injection. However, the latency was significantly longer in both STZSAL

and STZIGF-1 animals compared to the controls: VEHSAL and VEHIGF-1 groups at days 7 ( $p < 0.01$ ) and 45 ( $p < 0.01$ ) after STZ injection. In addition, there was a significantly ( $p < 0.05$ ) reduced total swimming distance in the STZIGF-1 animals, compared to the STZSAL group at day 45 post-injection (Figures 4c and S1). On the other hand, there were no significant differences in the percentage of time spent in the critical quadrant (Figure 4b) between the STZIGF-1 and STZSAL groups 7, 45, and 90 days after injection.

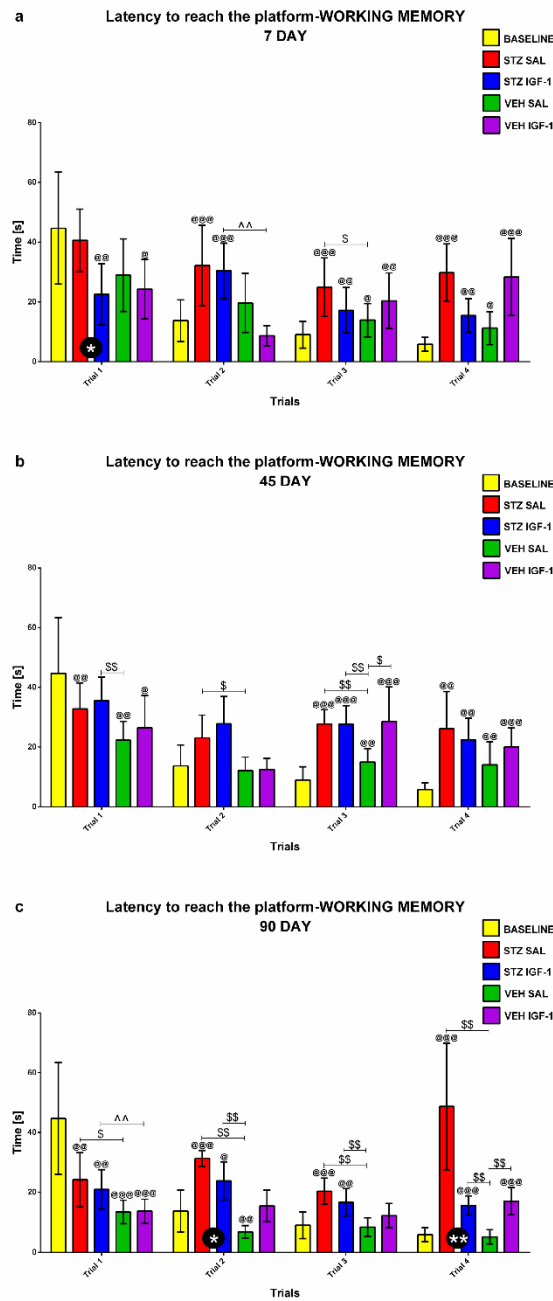


**Figure 4.** Reference memory performance in the Morris water maze (MWM) test measured as latency to reach the platform (a), the percentage of time in the critical quadrant (b), and the total distance

swum (c) on a day without the platform (probe test) in rats before injection (BASELINE,  $n = 40$ ) and 7, 45 and 90 days after intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) (STZSAL,  $n = 10$ ) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1,  $n = 10$ ) or citrate buffer (VEH) and SAL (VEHSAL,  $n = 10$ ) or VEH and IGF-1 (VEHIGF-1,  $n = 10$ ). Explanations: Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using Mann–Whitney-U test; \* in a circle— $p < 0.05$  difference between STZSAL and STZIGF-1 group; \$ above the line between the bars— $p < 0.05$ , \$\$ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEHSAL; ^ above the line between the bars— $p < 0.05$ , ^^ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEHIGF-1; @— $p < 0.05$ , @@— $p < 0.01$ , @@@— $p < 0.001$  difference vs. baseline.

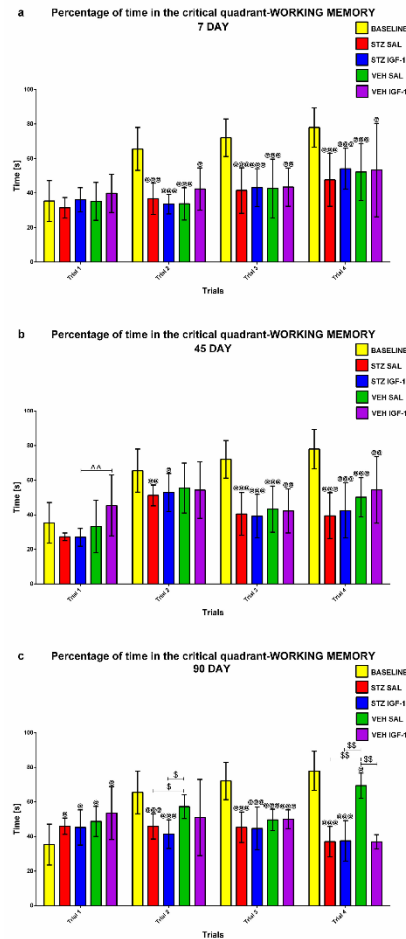
### 2.1.3. Working Memory During Trials 1–4 of Consecutive Days 5–8 of the Morris Water Maze (MWM) Test

Working memory during Trials 1–4 of consecutive days 5–8 of the MWM (MWM5–MWM8) was investigated at the baseline conditions (before injection) and starting from days 7, 45, and 90 after injection. Figures 5–7 present the average behavioral activity scores during Trials 1–4 across MWM5–MWM8, measured by latency to reach the platform (Figure 5), time spent in the critical quadrant (Figure 6), and total distance swum (Figure 7), comparing the STZSAL, STZIGF-1, VEHSAL, and VEHIGF-1 groups with baseline (before injection) conditions. Compared to STZSAL animals, a significantly shorter latency to reach the platform was observed during Trial 1 on day 7 ( $p < 0.05$ ; Figure 5a), and during Trials 2 ( $p < 0.05$ ) and 4 ( $p < 0.01$ ) on day 90 after sAD induction in STZIGF-1 rats (Figure 5c). In addition, a significantly shorter total distance swum was observed in the STZIGF-1 group during Trial 1 on day 7 ( $p < 0.01$ ; Figure 7a), Trial 4 on day 45 ( $p < 0.01$ ; Figures 7b and S2) and Trials 1 ( $p < 0.01$ ), 3 ( $p < 0.05$ ) and 4 ( $p < 0.01$ ) at 90 days post-injection compared with STZSAL rats (Figure 7c). The only differences between the STZIGF-1 and control VEHIGF-1 groups were observed in the latency to reach the platform on day 7 post-injection during Trial 2 (Figure 5a), the percentage of time spent in the critical quadrant on day 45 during Trial 1 (Figure 6b), and the total swimming distance on day 45 during Trials 1 and 4 (Figure 7b). No significant differences were observed in the percentage of time spent in the critical quadrant (Figure 6) between the STZSAL and STZIGF-1 groups.

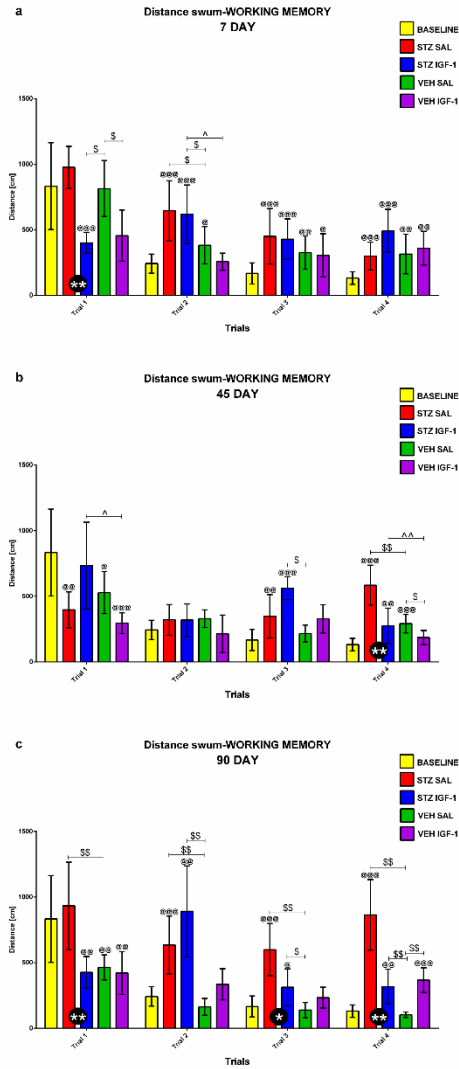


**Figure 5.** Working memory (average scores) during Trials 1–4 obtained for consecutive days 5–8 in the Morris water maze test measured as latency to reach the platform in rats before injection (BASELINE, n = 40) and starting from days 7 (a), 45 (b), and 90 (c) after intracerebroventricular

injection of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) (STZSAL, n = 10) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1, n = 10) or citrate buffer (VEH) and SAL (VEHSAL, n = 10) or VEH and IGF-1 (VEHIGF-1, n = 10). Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using Mann–Whitney–U test; \* in a circle— $p < 0.05$ , \*\* in a circle— $p < 0.01$  difference between STZSAL and STZIGF-1 group; \$ above the line between the bars— $p < 0.05$ , \$\$ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEHSAL; ^ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEHIGF-1; @— $p < 0.05$ , @@— $p < 0.01$ , @@@— $p < 0.001$  difference vs. baseline.



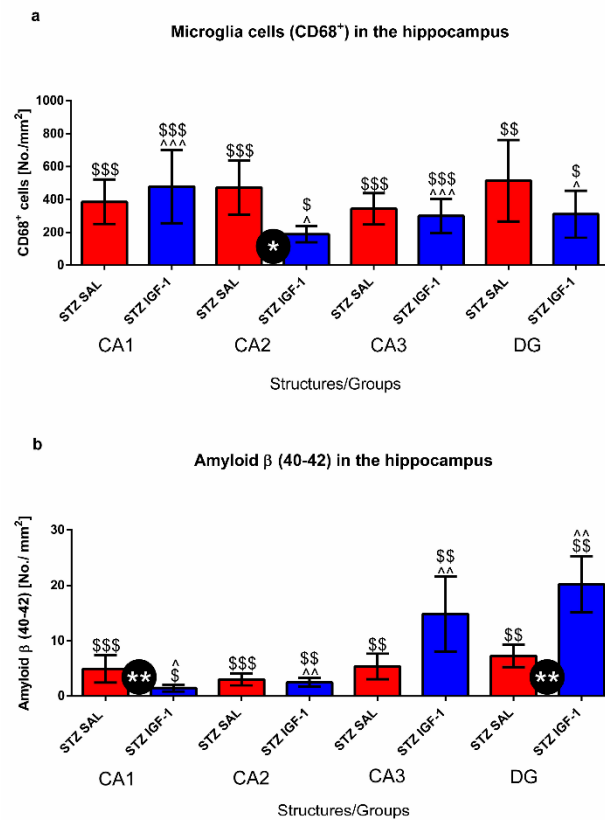
**Figure 6.** Working memory (average scores) during Trials 1–4 obtained for consecutive days 5–8 in the Morris water maze test measured as a percentage of time spent in the critical quadrant in rats before injection (BASELINE, n = 40) and 7 (a), 45 (b), and 90 (c) days after intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) (STZSAL, n = 10) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1, n = 10) or citrate buffer (VEH) and SAL (VEHSAL, n = 10) or VEH and IGF-1 (VEHIGF-1, n = 10). Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using the Mann–Whitney–U test; \$ above the line between the bars— $p < 0.05$ , \$\$ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEHSAL; ^ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEHIGF-1; @— $p < 0.05$ , @@— $p < 0.01$ , @@@— $p < 0.001$  difference vs. baseline.



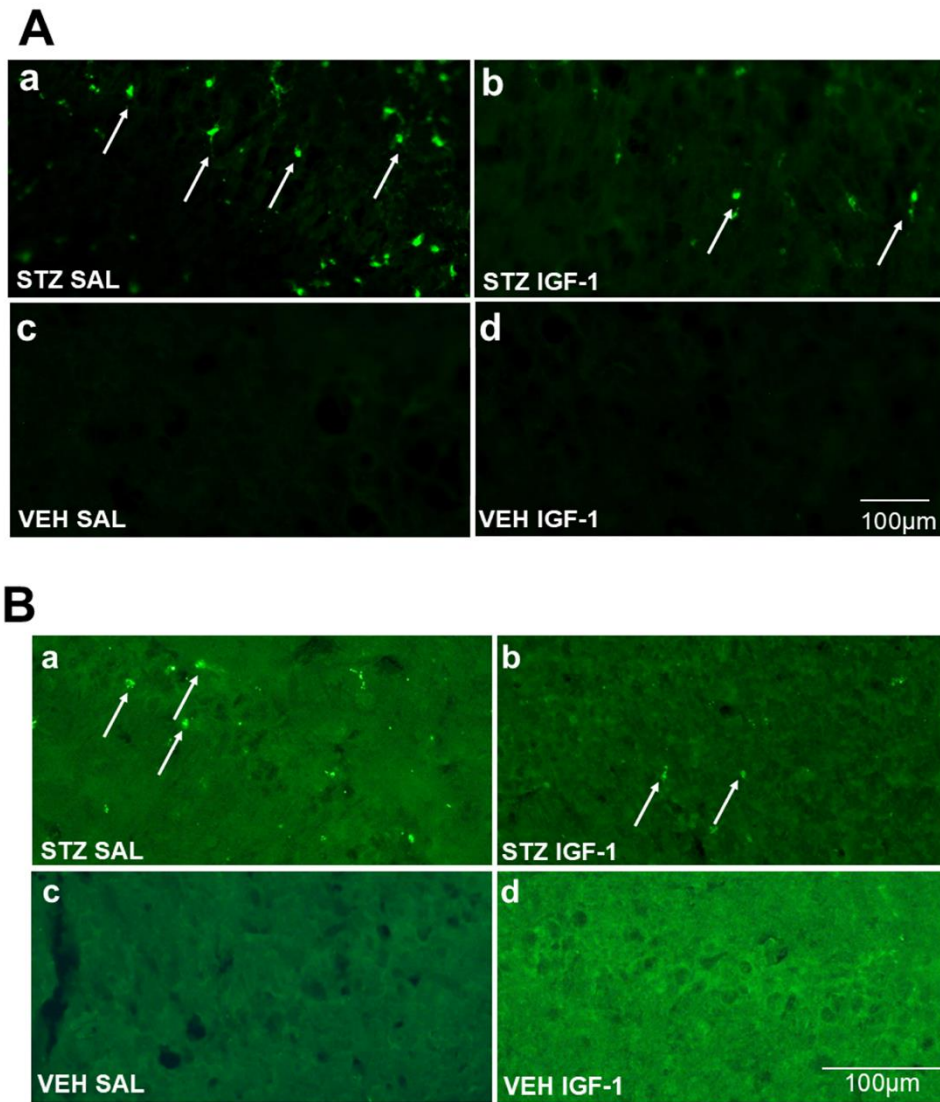
**Figure 7.** Working memory (average scores) during Trials 1–4 obtained for consecutive days 5–8 in the Morris water maze test measured as total distance swum in rats before injection (BASELINE, n = 40) and 7 (a), 45 (b), and 90 (c) days after intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) (STZSAL, n = 10) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1, n = 10) or citrate buffer (VEH) and SAL (VEHSAL, n = 10) or VEH and IGF-1 (VEHIGF-1, n = 10). Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using Mann–Whitney-U test; \* in a circle— $p < 0.05$ , \*\* in a circle— $p < 0.01$  difference between STZSAL and STZIGF-1 group; \$ above the line between the bars— $p < 0.05$ , \$\$ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEHSAL; ^ above the line between the bars— $p < 0.05$ , ^^ above the line between the bars— $p < 0.01$  difference vs. VEHIGF-1; @— $p < 0.05$ , @@— $p < 0.01$ , @@@— $p < 0.001$  difference vs. baseline.

## 2.2. Microglia Activated Cells (CD68<sup>+</sup> Cells) and Amyloid $\beta$ (A $\beta$ 40–42) Deposition in the Hippocampus (CA1, CA2, CA3, DG)

We observed significantly lower numbers of CD68<sup>+</sup> microglia cells in the hippocampal CA2 ( $p < 0.05$ ), but not in areas CA1 and CA3 (Figures 8a, 9A and S3A), and in the lateral preoptic area ( $p < 0.05$ ), and supraoptic nucleus ( $p < 0.001$ ) (Table 1) in the STZIGF-1 group, compared with STZSAL rats 90 days after AD induction. In the DG area of the hippocampus, a lower number of CD68<sup>+</sup> cells was observed in STZIGF1 animals compared to STZSAL animals (Figure 8a). Furthermore, there were no activated microglia cells in all areas of the hippocampus, nucleus accumbens, prefrontal cortex, preoptic area, medial septal nucleus, caudate putamen, and hypothalamic nuclei within the VEHSAL and VEHIGF1 control groups (Table 1).



**Figure 8.** Number of activated microglia cells (CD68<sup>+</sup>) (a) and amyloid  $\beta$  counts (b) in the CA1, CA2, CA3, and DG of the hippocampus in rats at 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) (STZSAL,  $n = 10$ ) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1,  $n = 10$ ). Explanations: Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using Mann–Whitney–U test; \* in a circle— $p < 0.05$ , \*\*— $p < 0.01$  differences between STZSAL and STZIGF-1; \$— $p < 0.05$ , \$\$— $p < 0.01$ , \$\$\$— $p < 0.001$  differences vs. VEHSAL; ^— $p < 0.05$ , ^^— $p < 0.01$ , ^^— $p < 0.001$  differences vs. VEHIGF-1.



**Figure 9.** Example microscopic images showing activated microglia cells (CD68<sup>+</sup> cells, indicated by arrows, magnification 10 × 20) in the CA2 area of the hippocampus (A) and amyloid β (Aβ<sub>40–42</sub>, indicated by arrows, magnification 10 × 10) in the CA1 area of the hippocampus (B) of STZSAL (a), STZIGF-1 (b), VEHSAL (c), and VEHIGF-1 (d) rats at 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) or citrate buffer (VEH) and SAL or VEH and IGF-1. Scale bar = 100 μm.

**Table 1.** Number of activated microglia cells (CD68<sup>+</sup> cells) (a,b) and  $\beta$ -amyloid counts (c,d) in brain structures of rats at 90 days after intracerebroventricular co-injection of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) (STZSAL, n = 10) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1, n = 10) or citrate buffer (VEH) and SAL (VEHSAL, n = 10) or VEH and IGF-1 (VEH IGF-1, n = 10).

		Microglia Cells (CD68 <sup>+</sup> ) No./mm <sup>2</sup>			
Structures/Groups		STZ SAL	STZ IGF-1	VEH SAL	VEH IGF-1
a	Prefrontal cortex	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Corpus calosum	560 ± 151.66	475 ± 103.51	300 ± 115	371.43 ± 131.39
	Caudate putamen	242.86 ± 85.91 <sup>\$</sup>	287.5 ± 105.01 <sup>\$\$\$^*</sup>	0 ± 0	22.22 ± 11.03
	Medial septal nucleus	142.86 ± 61.00	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Lateral preoptic area	57.14 ± 26.73 <sup>\$</sup>	0 ± 0 *	0 ± 0	0 ± 0
	Medial preoptic nucleus	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Supraoptic nucleus	550 ± 207.36 <sup>\$\$</sup>	0 ± 0 <sup>***</sup>	0 ± 0	37.5 ± 12.93
	Arcuate hypothalamic nucleus	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Dorsomedial hypothalamic nucleus	42.86 ± 13.37	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Lateral hypothalamus	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Paraventricular hypothalamic nucleus	114.29 ± 36.60	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Ventromedial hypothalamic nucleus	0 ± 0	60 ± 29.44	0 ± 0	0 ± 0
	Nucleus accumbens-Shell	71.42 ± 37.40	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Nucleus accumbens-Core	57.14 ± 19.67	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
b	Structures/Groups	VEH SAL		VEH IGF-1	
	Hippocampus CA1	0 ± 0		0 ± 0	
	Hippocampus CA2	0 ± 0		0 ± 0	
	Hippocampus CA3	0 ± 0		0 ± 0	
	Dentate gyrus	0 ± 0		0 ± 0	
		Amyloid $\beta$ (40–42)/No./mm <sup>2</sup>			
Structures/Groups		STZ SAL	STZ IGF-1	VEH SAL	VEH IGF-1
c	Prefrontal cortex	3 ± 1.06 <sup>\$</sup>	03.06 ± 1.72	0 ± 0	0 ± 0
	Lateral preoptic area	3 ± 1.13 <sup>\$\$</sup>	2.65 ± 0.97 <sup>\$\$^*</sup>	0 ± 0	0 ± 0
	Medial preoptic nucleus	5.38 ± 2.36 <sup>\$\$</sup>	1.99 ± 0.63 <sup>\$\$^*</sup>	0 ± 0	0 ± 0
	Nucleus accumbens-Shell	2.35 ± 1.5 <sup>\$</sup>	3.27 ± 1.34 <sup>\$\$\$^*</sup>	0 ± 0	0 ± 0
	Nucleus accumbens-Core	2.75 ± 0.86 <sup>\$\$\$</sup>	02.16 ± 0.96 <sup>\$\$\$^*</sup>	0 ± 0	0 ± 0
d	Structures/Groups	VEH SAL		VEH IGF-1	
	Hippocampus CA1	0 ± 0		0 ± 0	
	Hippocampus CA2	0 ± 0		0 ± 0	
	Hippocampus CA3	0 ± 0		0 ± 0	
	Dentate gyrus	0 ± 0		0 ± 0	

Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using Mann–Whitney-U test; \*-p < 0.05, \*\*\*-p < 0.001 differences between STZSAL and STZIGF-1 group; \$-p < 0.05, \$\$-p < 0.01, \$\$\$-p < 0.001 differences vs. VEHSAL group; ^-p < 0.01, ^^p < 0.001 differences vs. VEHIGF-1 group.

As shown in Figures 8b, 9B and S3B, there was a significantly ( $p < 0.01$ ) lower number of amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) deposits in CA1, whereas there was an increased number of  $A\beta$  deposition in CA3 and DG ( $p < 0.01$ ) in the STZIGF1 group compared with STZSAL animals. There were no significant differences in  $A\beta$  counts in the prefrontal cortex, preoptic areas, and nucleus accumbens between STZIGF-1 and STZSAL rats 90 days after STZ injection (Table 1). In addition, no  $A\beta$  deposits were found in both VEHSAL and VEHIGF-1 control groups (Table 1).

### 3. Discussion

Our results demonstrate, to the best of our knowledge for the first time, that ICVIGF-1 injection (dose of 0.5  $\mu$ g administered twice on days 1 and 3, into each lateral ventricle for an accumulative dose of 2  $\mu$ g.), alongside the induction of sAD via ICV administration of STZ (a cumulative dose of 3 mg/kg, administered in smaller doses twice on days 2 and 4), mitigates the deleterious effects of STZ-induced working memory impairment, and—to a lesser extent—reference memory, and reduces  $A\beta$  deposition in the brain during sAD progression. The current findings underline the significance of central IGF-1 signaling in the mechanisms and outcomes of brain insulin resistance, confirming its protective role against spatial memory deficits in sAD. Our results suggest that an effective treatment to slow or prevent early pathogenic events in sAD may involve attenuation of brain insulin resistance in AD, which highlights the therapeutic potential of future research on brain insulin resistance, including IGF-1 signaling as a novel therapeutic target for Alzheimer's disease treatment.

Cognitive deficits are linked to insulin signaling abnormalities. Changes in the levels of various insulin signaling molecules in the forebrain of AD patients [1,33,34] have been associated with memory improvements in AD cases and those at high risk. Those changes may follow selective elevation of forebrain insulin via intranasal administration of the hormone [35,36]. Talbot et al. [33], using an ex vivo stimulation protocol with near-physiological doses of insulin and IGF-1, demonstrated that the brain in AD, particularly the hippocampal formation (CA1-CA3, DG) and, to a lesser extent, the cerebellar cortex, exhibited insulin and IGF-1 resistance. That resistance occurred in the absence of diabetes and without affecting basal neuronal glucose uptake. According to the authors, brain insulin resistance appears to be an early and common feature of AD, a phenomenon accompanied by IGF-1 resistance and closely associated with the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) dysfunction, which is a critical element in the insulin-signaling pathway, potentially triggered by  $A\beta$  oligomers and cognitive decline.

Our findings align with previous studies supporting the protective effect of central IGF-1 recovery on spatial memory during sAD progression. We hypothesize that IGF-1 injection may prevent STZ-induced spatial memory deficits. Indeed, an improvement in reference memory, measured during MWM1-MWM3, was observed, as indicated by increased time spent in the critical quadrant, reduced total distance swum on day 45 of sAD progression, and reduced latency to reach the platform on day 90 following ICV co-injection of IGF-1 and STZ compared to STZSAL animals. The reference memory after IGF-1 administration in rats with the ICVSTZ model generally did not differ from that observed in the control VEHIGF-1 rats over three consecutive days of MWM testing. However, it did not return to the control values seen in the VEHSAL animals, especially at a later stage (90 days post-injection) of disease progression. Furthermore, there was a protective effect of ICVIGF-1 injection on working memory measured as a reduction in latency in trials 2 and 4 at the late stage of sAD progression (90 days after injection) and a reduction in total swimming distance in trials 3 and 4 at 45 and 90 days after ICVIGF-1 and ICVSTZ administration compared to the STZSAL group. However, working memory performance

in the STZIGF-1 animals differed from the control values in the VEHSAL group 90 days after injection.

The results from the probe test suggest that the IGF-1-induced protective effect on reference memory performance was weak and short-term. By day 90, no significant differences were observed between the STZSAL and STZIGF-1-treated animals. In fact, control VEHIGF-1 rats showed even deterioration in memory performance compared to the VEHSAL group. Alternatively, the improvement in reference memory performance observed in STZSAL rats (without IGF-1 treatment) during the probe test at 45 and 90 days after injection could be attributed to compensatory mechanisms triggered by insulin resistance induced by long-term deleterious effects of STZ. These mechanisms may mask early cognitive dysfunction, as assessed by behavioral activity in the MWM test. Histopathological evidence of specific neurotoxic damage caused by ICVSTZ administration to axons and myelin in the fornix, anterior hippocampus, and periventricular structures essential for learning and spatial memory has been reported [37,38]. Brain insulin system dysfunction was observed 1 month after ICVSTZ administration (3 mg/kg b.w.) while an increase in total tau-protein in the brain and amyloid formation in leptomeningeal vessels was found three months after ICVSTZ injection [39], which corresponds to 90 days post-injection in our study. Additionally, cerebral amyloid angiopathy was observed 6 and 9 months after STZ-icv [40]. According to the authors, this was a continuation and progression of the amyloid pathology already observed 3 months after STZ-icv treatment. Therefore, we suggest that the lack of significant differences between the STZIGF-1 and STZSAL groups, particularly in the latency to reach the platform at 7 days post-injection, may be related to the stage of STZ-induced insulin resistance and cerebral A $\beta$  accumulation. These factors may influence cognitive performance in different ways. After ICVSTZ administration, IGF-1 receptor gene expression was found to be reduced [41]. However, it should be considered that ICVIGF-1 treatment may have restored this important compensatory mechanism in ICVSTZ-injected rats.

A limitation of our study is the use of a rat model to study sAD in humans, and thus the translational value of animal-based results. In the present experiment, we designed three control groups as sufficient control: VEHSAL to control the entire experimental procedure (MWM, all the injections, and neuroimmune correlates), VEHIGF-1 to control the effect of IGF-1 treatment in the control rats, and intact BASELINE (naive) to control behavioral activity in the Morris water maze prior to injections in non-intact rats. However, another blank control group receiving no treatment at all might be a valuable control to minimize the influence of all potential confounding variables in the experiment and constitute a baseline for all measured parameters. Additionally, only a single dose of IGF-1 (2  $\mu$ g divided into two injections) was used in our study. Future research could explore the effects of multiple doses, prolonged IGF-1 administration, or the simultaneous use of ICVIGF-1 and intranasal insulin to provide a more comprehensive understanding of IGF-1 treatment in this sAD model. However, the results of our study may support the therapeutic potential of future work on brain insulin resistance in AD and highlight the potential for combination therapies involving IGF-1 to prevent or delay dementia in humans.

Regarding the positive action of central IGF-1 in animal models, other authors reported that ICV co-administration of IGF-1 and A $\beta$ 25–35 to male rats showed its protective effects against A $\beta$ 25–35-related down-regulation of hippocampal somatostatinergic system through up-regulation of protein kinase A activity and cAMP response element-binding protein phosphorylation [42]. Additionally, Ghaffari et al. [43] demonstrated that memory and anxiogenic behavioral improvements could be attributed to the enhancement of neuronal and oligodendroglial survival and the reduction in neuroinflammation in the hippocampus in rats after ICVSTZ injection (6 mg/kg) with intranasal co-treatment of

insulin (4 U/40  $\mu$ L) and administration of growth factor-rich serum (1  $\mu$ L/kg). According to the authors, the anti-inflammatory effect of IGF-1 could be associated with its influences on microglial and astrocyte activity. Our results also indicate that the protective effect of central IGF-1 on STZ-induced impairment of spatial memory is mediated through a reduction in neuroinflammation, as evidenced by a reduced number of activated microglial cells (CD68<sup>+</sup>), particularly in the CA2 area of the hippocampus and the prelimbic/hypothalamic nuclei, in the late stage of sAD progression (90 days post-injection). It is known that IGF-1 promotes an anti-inflammatory phenotype in microglia [44]. In astrocytes, IGF-1 signaling is essential for maintaining the integrity of the neurovascular unit, and its disruption may impair neurovascular coupling [45]. IGF-1 also regulates astrocytic phagocytosis and inflammation through PI3K signaling [46]. Furthermore, insulin modulates brain glucose metabolism by acting on astrocytes in cooperation with IGF-I [47]. Park et al. [48] showed that IGF-1 tempers the innate immune response within the brain and reduces the expression of inflammatory markers such as interleukin (IL)-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . Nevertheless, IGF-1 can also enhance the production of anti-inflammatory cytokines, including IL-4 and IL-10.

Additionally to the central IGF-1 effect of reducing neuroinflammation, the improvement in spatial memory observed in this study can also be attributed to the protective effect of IGF-1 against A $\beta$  deposition. Indeed, we found a reduced number of A $\beta$  deposits, particularly in the CA1 area of the hippocampus after 90 days of sAD progression in rats ICV injected with IGF-1. However, it should be noted that we were not able to show that neuroinflammation and A $\beta$  accumulation were significantly reduced in CA2, CA3, and DG areas of the hippocampus, as they were in CA1; yet, a trend towards reduced neuroinflammation was observed in these areas. This may suggest different roles of various hippocampal regions in insulin-resistant brain conditions. Our results are consistent with those of Carro et al. [49] who also reported that IGF-I enhances the clearance of brain A $\beta$  by modulating the transport/production of A $\beta$  carriers at the blood–brain interface in the choroid plexus. According to the authors, the administration of ICVIGF-1 leads to an increase in megalin protein, which mediates IGF-I-induced clearance of A $\beta$ , thereby improving memory impairment associated with brain amyloidosis. Furthermore, our findings of improved working memory following ICVIGF-1 administration and reduced A $\beta$  accumulation in the CA1 region of the hippocampus, are in line with other reports [50], which found that basal activation states of multiple insulin signaling molecules in CA1 pyramidal cells were highly related to episodic and working memory. Given the ability of oligomeric A $\beta$  to inactivate IRS-1 [50,51], it may in part mediate the effects of these oligomers on cognition. In contrast to this observation, Freude et al. [52] showed that impaired IGF-1/insulin receptor substrate 2 (IRS-2) signaling prevented premature death and delayed amyloid accumulation predominantly in the hippocampus in mice with Swedish mutation of amyloid precursor protein (APP) as a model of AD and deficient for IRS-2, neuronal IGF-1 receptor or neuronal insulin receptor. The authors suggested that delayed A $\beta$  accumulation resulted from decreased APP processing.

Besides reduced neuroinflammation and A $\beta$  accumulation, another mechanism, including IGF-1-induced neurogenesis, may be responsible for the observed protective effects of central administration of IGF-1 on cognitive function in the ICVSTZ-induced sAD model. Insulin/IGF-1 signaling has been implicated in the regulation of adult neurogenesis in the DG [53,54]. Adult-born neurons have the ability to functionally integrate into the hippocampal circuitry and have been found to contribute to select types of hippocampal-dependent learning and memory tasks [55]. Deletion of the IGF-1 receptor gene (*Igf1r*) resulted in an almost complete loss of the DG in mice [56] and impaired learning and memory function, leading to dementia [57,58], while exogenous IGF-1 enhanced hippocampal neuronal

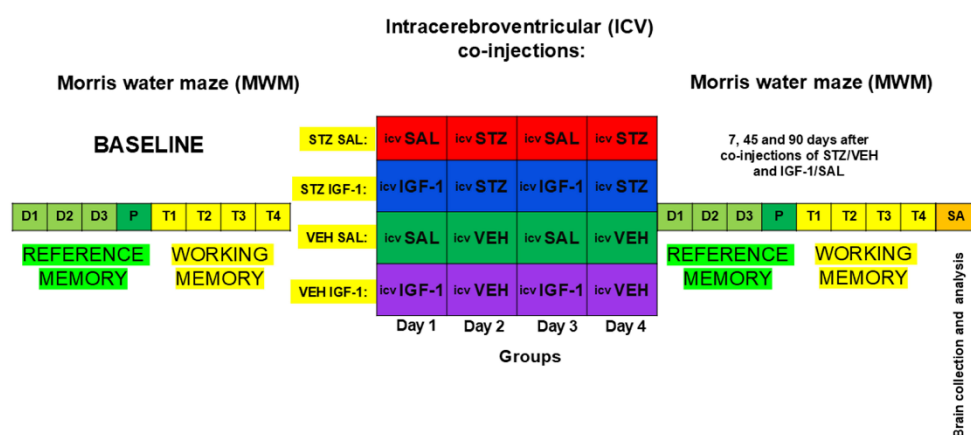
precursor cells proliferation [59,60] and directed the generation of mature granule cells. Furthermore, IGF-1 could support synaptogenesis, in particular, in the hippocampus [5,58]. It has been reported that IGF-1 improved neuronal complexity and synaptic connectivity under insulin resistance conditions [61]. Other authors [62,63] reported acute effects of IGF-1 on excitatory synaptic transmission in the CA1 region of the hippocampus associated with attenuation of spatial learning deficits in aged rats. According to the authors, increases in AMPA receptor-mediated synaptic transmission may contribute directly to cognitive improvement or initiate long-term changes in the synthesis of proteins, such as brain-derived neurotrophic factors, that are important for neurogenesis, learning, and memory. Indeed, in our study, we observed significantly reduced A $\beta$  accumulation in the CA1 area after IGF-1 treatment in rats with the ICVSTZ model, which also suggests the involvement of this part of the hippocampus in enhanced spatial memory observed in our study.

Furthermore, serotonin is known to promote hippocampal neurogenesis [54,64]. Many serotonergic neurons project to the hippocampal DG. It has also been reported that hippocampal neurogenesis is important for the antidepressant effects caused by antidepressants. Recently, it has been reported that agonist stimulation of serotonin type 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptors promotes IGF-1 release in the hippocampus and increases hippocampal neurogenesis via the IGF-1 signaling pathway [54], resulting in antidepressant effects [54,65], which could improve cognitive function. Clarifying whether IGF-1-induced neurogenesis and/or antidepressant effects are involved in the improvement in spatial memory observed in this study may be the subject of future research.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Animals

All animal experiments were carried out at the University of Gdańsk, Faculty of Biology license number 0169 in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament, and under the authority of the Local Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals at University of Technology in Bydgoszcz, Poland (No. 60/2017). Male Wistar Han rats (n = 40) were obtained from a licensed breeding facility (Tri-City Central Animal Laboratory, Research and Service Centre of the Medical University of Gdansk, Poland, breeder registration number 041). Rats were allowed to adapt to the laboratory conditions for a two-week acclimatization period. Subsequently, rats were subjected to handling for two weeks in order to minimize stress during the experimental procedure. Handling lasted for about 5 min each day. During the experiment, rats were housed separately in polycarbonate cages (width 20 cm, length 40 cm, height 18 cm) on a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:00) in an air-conditioned, constant-temperature (22  $\pm$  2  $^{\circ}$ C) room and with water and food available ad libitum. The animals could visually observe other rats and were indirectly exposed to their cage odors. Before starting the behavioral tests under baseline conditions (before injections), the rats reached a body weight of 300  $\pm$  20 g, corresponding to 11–12 weeks of age. The slightly higher body weight ranges of our experimental rats compared with the usual biological variability of rat body weight (10%) [66] may be due to individual differences in stress reactivity during the two-week handling procedure that preceded the body weight measurement. However, we believe that this did not affect the results of our study. After completion of the baseline behavioral measurement, the animals were randomly divided into four groups: STZSAL (n = 10), STZIGF-1 (n = 10), control VEHSAL (n = 10), control VEHIGF-1 (n = 10), according to the diagram presented in Figure 10.



**Figure 10.** Scheme of experimental procedure and group assignments. Explanations: MWM—Morris water maze test: D1–D3 days of phase of acquisition of reference memory, P—probe test (single trial without the platform (reference memory evaluation), T1–T4 trials of working memory performance; ICVSTZ—intracerebroventricular (ICV) injections of streptozotocin (STZ) (a total dose of 3 mg/kg b.w. divided into two injections on Days 2 and 4 into each lateral ventricle: 0.75 mg/kg in 2 µL of citrate buffer per ventricle)—sAD model; ICVVEH—intracerebroventricular (ICV) injections of citrate buffer (VEH) (2 µL per ventricle); ICVIGF-1—intracerebroventricular (ICV) injections of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (1 µg per single administration on Days 1 and 3 into each lateral ventricle: 0.5 µg in 2 µL of saline per ventricle)—neurotrophin treatment; ICVSAL—intracerebroventricular (ICV) injections of saline (SAL) (2 µL per ventricle); S—sacrifice of animals, brain collections to future analysis (A).

#### 4.2. Experimental Procedure

##### 4.2.1. Intracerebroventricular (ICV) Co-Injections of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) and Streptozotocin (STZ)

Rats under 2.5% isoflurane anesthesia (airflow: 0.5 L per min) using an isoflurane pump (Bitmos OXY 6000, Bitmos GmbH Düsseldorf, Germany) were prepared for surgery, at the beginning the head of the animal was immobilized using a stereotaxic apparatus (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten Germany). Next, the 3 mm steel stainless guide cannula (C311G/Spc, Bilaney, Düsseldorf, Germany) was implanted on the surface of the skull above the positions of each lateral ventricle according to coordinates from the Paxinos and Watson [67] atlas (coordinates: AP: −1.3 mm, L: ±2 mm). The 4 mm injection needle (C311I/Spc, Bilaney), compatible with the main guide cannula, was placed in the lateral ventricles (D: +3.6 mm). Guide cannula and injection needle were a way to administer the substance. The injection needle, after drug administration, was left inside the guide cannula for the next 60 s, after which it helped to avoid a reverse flow of the solutions. The guide cannulas were permanently attached to three stainless steel skull screws using dental acrylic (Duracryl, spofa Dental a.s., Jicin, Czech Republic). After the attachment of the cannulas and stitching of the head skin, the administration of the substances was started (Day 1).

##### 4.2.2. Drug Administration

In line with our previous study using the ICVSTZ model in rats [28–32], in this study we used double ICV injections of STZ in a total dose of 3 mg/kg divided into two microinjections (2 × 1.5 mg/kg, dissolved in citrate buffer 0.02 M, pH 4.5) with separate

microinjections into each lateral ventricle (0.75 mg/kg dissolved in 2  $\mu$ L of the vehicle) on Days 2 and 4. Control rats were injected with ICV citrate buffer (VEH), following the same procedure as ICVSTZ administration. ICV administration of IGF-1 was performed according to the method and a dose of IGF-1 described previously [68,69]. A single ICV injection of IGF-1 at a dose of 1  $\mu$ g, which was used in that and our studies, was sufficient to induce an improvement in behavioral activity, related to working memory, manifested as a reduction in swimming distance and latency to reach the platform in rats during trials 1–4 of the MWM test. Prior to ICV injections of IGF-1 (Biotechne, 291-G1, Minneapolis, MN, USA), the substance was diluted in saline (SAL) to obtain a dose of 0.5  $\mu$ g/2  $\mu$ L/ventricle. The resulting dilution allowed IGF-1 to be administered at doses of 1  $\mu$ g per single administration on Days 1 and 3. Control animals received ICV saline injections using the same procedure as ICVIGF-1 administration. All co-injections of IGF-1/SAL and STZ/VEH were performed with the use of a microinfusion pump (Legato-100—Series Syringe Pump, KD SCIENTIFIC, Holliston, MA, USA) and a Hamilton syringe (capacity: 10  $\mu$ L) combined with polyethylene connected to an injection cannula at a rate of 0.5  $\mu$ L/min. In order to avoid a reverse flow of the solution, the injection cannula was left inside the guide for an additional 60 s. After surgery and injections, rats were moved to the worm accommodation, where they stayed until recovery.

#### 4.2.3. Behavior Associated with Reference and Working Memory in Morris Water Maze (MWM)

Morris water maze (MWM) testing was determined at baseline (before injection) conditions and at 7, 45, and 90 days post-injection. First, reference memory was measured, followed by measurements of working memory according to the methodology that we described previously [28,31,32]. The MWM training sessions with a visible, located above the water surface, platform was performed at the beginning of the behavioral testing. If the animal did not locate the platform within 1 min, it was gently directed toward the platform by the experimenter. After 5 min, a screening trial also with a visible, located above the water surface platform was performed in order to eliminate rats with sensory-motor and motivational deficits. Spatial memory testing was performed four times during the experiment, each lasting eight days, and was divided into two stages: reference memory testing with the platform remaining in constant position for all training sessions (3 days, four trials per day, and a probe test with one trial on the 4th day with platform removed, the duration of a single attempt was 2 min) and working memory testing with the platform position in the maze changed every day (4 days, 4 trials a day). The inter-trial interval (ITI) lasted 10 min. In order to minimize experimenter bias, during the exposure of the animals to the MWM test, the behavioral responses of the rats were saved using a video camera, located approximately 200 cm over the center point of the maze and connected to a video-tracking program (EthoVision XT, Noldus, Wageningen, The Netherlands). Three parameters labeled in MWM were measured with the use of a digitizing device with a video-tracking function: latency to reach the platform (in most trials) or the critical annulus (CA—virtual contour of the removed platform) in the probe test, distance swum (path length), and the percentage of time spent in the critical quadrant (CQ) of the pool (where the platform was located). Then, a trained observer who was blinded to the experimental treatment of the rats scored behavioral responses.

#### 4.2.4. Immunohistochemistry

Immunofluorescence was used for labeling activated microglia and various forms of amyloid  $\beta$  (oligomeric and fibrillar forms of amyloid  $\beta$  42 (A $\beta$ 1–42) and non-aggregated amyloid  $\beta$  40 (A $\beta$ 1–40)). Since numerous studies have shown that strong expression of the lysosomal protein CD68<sup>+</sup> can be used as the marker of activated microglia cells [70],

we detected activated microglia (CD68<sup>+</sup> cells) according to the method we described earlier [28,32]. Brains were fixed by perfusion with 4% paraformaldehyde in PBS, dehydrated in 30% sucrose, and cut in a cryostat (CM1850, Leica Wetzlar, Germany) to obtain 20 µm thick coronal sections. The sections were then blocked in buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 5% bovine serum albumin (BSA) and 0.3% Triton X for 2 h. After triple rinsing with PBS, the sections were incubated for 48 h in a primary antibody solution: mouse monoclonal anti-CD68 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, MAB1435, dilution 1:250) or monoclonal mouse antibody anti-amyloid β (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA, NBP2-13075, 1:300) in PBS containing 0.3% Triton X and 2% BSA. After three times rinsing, the sections were incubated for 2 h in a secondary antibody solution (goat anti-mouse, Abcam, Cambridge, United Kingdom, Alexa Fluor 488, ab150113, 1:500 in PBS) for both CD68<sup>+</sup> microglia and Aβ. Next, the sections were rinsed three times, placed on gelatinized slides, and overslipped with the use of Fluoromount-G solution with DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA 00-4959-52). The slides containing CD68<sup>+</sup> microglia were photographed with a Zeiss fluorescent microscope (Axio Scope A1, Oberkochen, Germany) compatible with the Axio Vision software 4.8.2. The prepared slides of Aβ were photographed using a fluorescence microscope (DM1000 LED, Leica, Wetzlar, Germany) compatible with the LAS X Multi Channel program.

#### 4.2.5. Quantification of Labeled Cells

Images were taken on a blue channel (DAPI) and a green channel (CD68 or amyloid β), but when the two channels were combined into one image, it was found that the DAPI channel generated high background fluorescence. Therefore, quantification of CD68<sup>+</sup> cells and amyloid β aggregates was performed on an image containing only the main green channel in order to accurately identify the labeled objects.

Counting of microglia cells and beta-amyloid deposits was performed by an observer blinded to the experimental group allocation. CD68-positive (CD68<sup>+</sup>) cells and beta-amyloid (Aβ) positive aggregates were counted in both hemispheres of each tested structure. The borders of the brain structures were determined on the basis of the Paxinos and Watson atlas [67]. Active microglia cells (CD68<sup>+</sup>) were counted in a calibrated frame of 0.01 mm<sup>2</sup>, and Aβ aggregates were counted in a calibrated frame of 0.1 mm<sup>2</sup> area imposed in the software. The density of CD68<sup>+</sup> cells or Aβ aggregates was computed (number per 1 mm<sup>2</sup>) in each tested area. When possible, the value of three separate counts including both brain hemispheres of an individual brain region for each animal (three sections) was averaged and used as a single data point.

#### 4.2.6. Slaughtering Animals and Collection of Tissues

Rats were sacrificed with a lethal dose (2 mL/kg i.p.) of Morbital (Biowet, Puławy, Poland) under 2.5% isoflurane anesthesia (airflow: 0.5 L per min). Then, perfusion (throughout the left ventricle of the heart) using PBS (approx. 200 mL/per rat) and 4% paraformaldehyde solution (approx. 200 mL/per rat) was carried out. After the perfusion was completed, the brain was collected and immediately placed in a 4% paraformaldehyde solution, where it stayed for about 4 days. The fixed brain was dehydrated with 30% sucrose solution and then placed in a low-temperature freezer (−70 °C).

#### 4.2.7. Data Analysis

For a statistical analysis of the results, Statistica 13.1.336.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA), run on a PC-compatible computer, was used. The data are presented as the mean ± SD. The normality of the distribution of the variables was checked with the Kolmogorow-Smirnov test and the homogeneity of the variances with a Levene test. As the outcome of the Kolmogorow-Smirnov test indicated that assumptions of parametric

analysis were not fulfilled, we used it for further statistical evaluation of differences in behavioral activity and brain correlates, non-parametric statistical tests. Data were analyzed using the Kruskal–Wallis ANOVA by ranks for multiple comparisons (time: baseline, 7, 45, and 90 days post-injection; and treatment: STZ, IGF-1, VEH, SAL) and the Mann–Whitney U test for comparisons between two groups of rats. A P value lower than 0.05 was considered statistically significant.

## 5. Conclusions

The results show that double ICV injections of IGF-1 at a cumulative dose of 2 µg attenuate the deleterious effects of ICVSTZ administration on working and reference memory deficits in a rat model of sAD. The protective effect of central IGF-1 was mediated by a reduction in STZ-induced neuroinflammation, including a decrease in the number of activated microglia cells (CD68<sup>+</sup>) in the hippocampus and supra/preoptic hypothalamic area, and reduced brain Aβ deposition. Our data indicate that improving central insulin signaling, which targets IGF-1, may enhance cognitive function impaired during sAD progression. This suggests the potential role of IGF-1 as a novel therapeutic target, also in combination with insulin, in therapeutic strategies to repair impaired glucose metabolism in the treatment of dementia in sporadic Alzheimer’s disease and type 2 diabetes.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph18040527/s1>, Figure S1. Visualization of spatial memory performance in Morris water maze (MWM) test illustrating the time spent in each quadrant of the pool (a. heat maps) and distance swum (b. path shapes) of representative rats of all groups at baseline and 8 days after ICV co-injections of streptozotocin (STZ) and saline (STZSAL), STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1), citrate buffer and saline (VEHSAL), citrate buffer and IGF-1, during the first trial on the second day of reference memory testing (MWM2). During the trial, the platform was located in the center of the lower left quadrant. In heat maps (Figure S1a), the longer time stay of an individual in a given location was marked with a warmer color (red part). Figure S2. Visualization of spatial memory performance in Morris water maze (MWM) test illustrating the time spent in each quadrant of the pool (a. heat maps) and distance swum (b. path shapes) of representative rats of all groups on the baseline and 49–52 days after ICV co-injection of streptozotocin (STZ) and saline (STZSAL), STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1), citrate buffer and saline (VEHSAL), citrate buffer and IGF-1, during four trials of 5–8 consecutive days of working memory testing. During the trials, the platform was placed in one of the centers of each quadrant. In heat maps (Figure S2a), the longer time stay of an individual in a given location was marked with a warmer color (red part). Figure S3. Original microscopy images showing CD68<sup>+</sup> microglia cells in the CA2 area of the hippocampus (5Aa (STZSAL), 5Ab (STZIGF-1), 5Ac (VEHSAL), 5Ad (VEHIGF-1), fluorescence microscope Zeiss Axio Scope A1, Oberkochen, Germany, compatible with the Axio Vision software 4.8.2.) and amyloid β (Aβ40–42) in the CA1 area of the hippocampus (5Ba (STZSAL), 5Bb (STZIGF-1), 5Bc (VEHSAL), 5Bd (VEHIGF-1), fluorescence microscope DM1000 LED, Leica, Wetzlar, Germany, compatible with the LAS X Multi Channel program) of rats at 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) or citrate buffer (VEH) and SAL or VEH and IGF-1. Figure S3 is also available at the link <https://drive.google.com/drive/folders/10BoB2fpfAjr2IH2lgMT7GZnMeVjlpKcE?usp=sharing> (accessed on 10 March 2025).

**Author Contributions:** Conceptualization, J.D. and D.W.; methodology, J.D., B.G., I.M. and D.W.; validation, J.D. and D.W.; formal analysis, J.D. and D.W.; investigation, J.D. and D.W.; writing—original draft preparation, J.D.; writing—review and editing, D.W.; visualization, J.D.; supervision, D.W.; project administration, D.W.; funding acquisition, J.D. and D.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was partly funded by Statutory Activities of the Department of Animal and Human Physiology of the University of Gdansk (531-D080-D248-24 and 531-D080-D248-25).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Local Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals at the University of Technology in Bydgoszcz, Poland (60/2017, 14 December 2017).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article and Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Biotechne for the gift of IGF-1, Grzegorz Świątek for technical assistance with behavioral testing, and Ewelina Kurowska-Rucińska for technical support with images from EthoVision. Special thanks to Irena Jerzemowska and Emilia Leszkowicz for their help with the proofreading.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

IGF-1	Insulin-like growth factor-1
SAL	Saline
A $\beta$	Amyloid $\beta$
STZ	Streptozotocin
VEH	Citrate buffer
AD	Alzheimer's disease
sAD	Sporadic Alzheimer's disease
CD68 <sup>+</sup> cells	activated microglia cells
ICV	Intracerebroventricular
MWM	Morris Water Maze test
CA1CA2	Cornus ammonis 1 area of the hippocampus Cornus ammonis 2 area of the hippocampus
CA3	Cornus ammonis 3 area of the hippocampus
DG	Dentate gyrus area of the hippocampus
IL-10	Interleukin-10
IL-4	Interleukin-4
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
APP	Amyloid precursor protein
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
IRS-2	Insulin receptor substrate 2
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
PI3KPBS	Phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B Phosphate-buffered saline

## References

- Miao, J.; Zhang, Y.; Su, C.; Zheng, Q.; Guo, J. Insulin-like growth factor signaling in Alzheimer's disease: Pathophysiology and therapeutic strategies. *Mol. Neurobiol.* **2024**. *Epub ahead of print.* [[CrossRef](#)]
- Qiao, X.; Yan, J.; Zang, Z.; Xi, L.; Zhu, W.; Zhang, E.; Wu, L. Association between IGF-1 levels and MDD: A case-control and meta-analysis. *Front. Psychiatry* **2024**, *15*, 1396938. [[CrossRef](#)]
- Gray, S.C.; Kinghorn, K.J.; Woodling, N.S. Shifting equilibriums in Alzheimer's disease: The complex roles of microglia in neuroinflammation, neuronal survival and neurogenesis. *Neural Regen. Res.* **2020**, *15*, 1208–1219. [[CrossRef](#)]
- El-Hakim, Y.; Mani, K.K.; Pickle, K.A.; Akbari, Z.; Samiya, N.; Pham, C.; Salas, G.; Pilla, R.; Sohrabji, F. Peripheral, but not central, IGF-1 treatment attenuates stroke-induced cognitive impairment in middle-aged female Sprague Dawley rats: The gut as a therapeutic target. *Brain Behav. Immun.* **2024**, *122*, 150–166. [[CrossRef](#)]

5. Zhao, F.; Siu, J.J.; Huang, W.; Askwith, C.; Cao, L. Insulin modulates excitatory synaptic transmission and synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Neuroscience* **2019**, *411*, 237–254. [[CrossRef](#)]
6. Takeishi, J.; Tatewaki, Y.; Nakase, T.; Takano, Y.; Tomita, N.; Yamamoto, S.; Mutoh, T.; Taki, Y. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: The use of MCT oil and a ketogenic diet. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12310. [[CrossRef](#)]
7. Zappa Villar, M.F.; López Hanotte, J.; Crespo, R.; Pardo, J.; Reggiani, P.C. Insulin-like growth factor 1 gene transfer for sporadic Alzheimer's disease: New evidence for trophic factor mediated hippocampal neuronal and synaptic recovery-based behavior improvement. *Hippocampus* **2021**, *31*, 1137–1153. [[CrossRef](#)]
8. Chami, B.; Steel, A.J.; De La Monte, S.M.; Sutherland, G.T. The rise and fall of insulin signaling in Alzheimer's disease. *Metab. Brain Dis.* **2016**, *31*, 497–515. [[CrossRef](#)]
9. Dineley, K.T.; Jahrling, J.B.; Denner, L. Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *72*, 92–103. [[CrossRef](#)]
10. Lewitt, M.S.; Boyd, G.W. The role of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins in the nervous system. *Biochem. Insights* **2019**, *12*, 1–18. [[CrossRef](#)]
11. Fluca, A.L.; Pani, B.; Janjusevic, M.; Zwas, D.R.; Abraham, Y.; Calligaris, M.; Beltrami, A.P.; Campos Corgosinho, F.; Marketou, M.; D'Errico, S.; et al. Unraveling the relationship among insulin resistance, IGF-1, and amyloid-beta 1-40: Is the definition of type 3 diabetes applicable in the cardiovascular field? *Life Sci.* **2024**, *352*, 122911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bi, A.; An, W.; Wang, C.; Hua, Y.; Fang, F.; Dong, X.; Chen, R.; Zhang, Z.; Luo, L. SCR-1693 inhibits tau phosphorylation and improves insulin resistance associated cognitive deficits. *Neuropharmacology* **2020**, *168*, 108027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Mishra, S.K.; Singh, S.; Shukla, S.; Shukla, R. Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. *Neurochem. Int.* **2018**, *113*, 56–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ma, N.; Liang, Y.; Yue, L.; Liu, P.; Xu, Y.; Zhu, C. The identities of insulin signaling pathway are affected by overexpression of Tau and its phosphorylation form. *Front. Aging Neurosci.* **2022**, *14*, 1057281. [[CrossRef](#)]
15. Hamzé, R.; Delangre, E.; Tolu, S.; Moreau, M.; Janel, N.; Bailbé, D.; Movassat, J. Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease: Shared molecular mechanisms and potential common therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15287. [[CrossRef](#)]
16. Bhalla, S.; Mehan, S.; Khan, A.; Rehman, M.U. Protective role of IGF-1 and GLP-1 signaling activation in neurological dysfunctions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2022**, *142*, 104896. [[CrossRef](#)]
17. Huffman, D.M.; Farias Quipildor, G.; Mao, K.; Zhang, X.; Wan, J.; Apontes, P.; Cohen, P.; Barzilai, N. Central insulin-like growth factor-1 (IGF-1) restores whole-body insulin action in a model of age-related insulin resistance and IGF-1 decline. *Aging Cell* **2016**, *15*, 181–186. [[CrossRef](#)]
18. Farias Quipildor, G.E.; Mao, K.; Hu, Z.; Novaj, A.; Cui, M.H.; Gulinello, M.; Branch, C.A.; Gubbi, S.; Patel, K.; Moellering, D.R.; et al. Central IGF-1 protects against features of cognitive and sensorimotor decline with aging in male mice. *Geroscience* **2019**, *41*, 185–208. [[CrossRef](#)]
19. Gubbi, S.; Quipildor, G.F.; Barzilai, N.; Huffman, D.M.; Milman, S. 40 years of IGF1: IGF1: The Jekyll and Hyde of the aging brain. *J. Mol. Endocrinol.* **2018**, *61*, T171–T185. [[CrossRef](#)]
20. Ashpole, N.M.; Herron, J.C.; Mitschelen, M.C.; Farley, J.A.; Logan, S.; Yan, H.; Ungvari, Z.; Hodges, E.L.; Csiszar, A.; Ikeno, Y.; et al. IGF-1 regulates vertebral bone aging through sex-specific and time-dependent mechanisms. *J. Bone Miner. Res.* **2016**, *31*, 443–454. [[CrossRef](#)]
21. Hossain, M.A.; Adithan, A.; Alam, M.J.; Kopalli, S.R.; Kim, B.; Kang, C.W.; Hwang, K.C.; Kim, J.H. IGF-1 facilitates cartilage reconstruction by regulating PI3K/AKT, MAPK, and NF- $\kappa$ B signaling in rabbit osteoarthritis. *J. Inflamm. Res.* **2021**, *14*, 3555–3568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Herrera, M.L.; Camparini, L.G.; Oliveros, A.L.; Bellini, M.J.; Herenu, C.B. Potentialities of IGF-1 for regulating oxidative stress in neuroinflammation and neurodegeneration: Theoretical review. *Explor. Neuroprot. Ther.* **2024**, *4*, 442–458. [[CrossRef](#)]
23. Salkovic-Petrisic, M.; Knezovic, A.; Hoyer, S.; Riederer, P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J. Neural. Transm.* **2013**, *120*, 233–252. [[CrossRef](#)]
24. Hoyer, S.; Lannert, H. Long-term abnormalities in brain glucose/energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: Implication of tau-protein. *J. Neural. Transm. Suppl.* **2007**, *72*, 195–202. [[CrossRef](#)]
25. Agrawal, R.; Tyagi, E.; Shukla, R.; Nath, C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: A study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2011**, *21*, 261–273. [[CrossRef](#)]
26. Rai, S.; Kamat, P.K.; Nath, C.; Shukla, R. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: The key events in streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2014**, *117*, 104–117. [[CrossRef](#)]
27. Fuster-Matanzo, A.; Llorens-Martín, M.; Hernández, E.; Avila, J. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: Therapeutic approaches. *Mediat. Inflamm.* **2013**, *2013*, 260925. [[CrossRef](#)]

28. Majkutewicz, I.; Kurowska, E.; Podlacha, M.; Myślińska, D.; Grembecka, B.; Ruciński, J.; Plucińska, K.; Jerzemowska, G.; Wrona, D. Dimethyl fumarate attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory impairment and hippocampal neurodegeneration in rats. *Behav. Brain Res.* **2016**, *308*, 24–37. [[CrossRef](#)]
29. Majkutewicz, I.; Kurowska, E.; Podlacha, M.; Myślińska, D.; Grembecka, B.; Ruciński, J.; Pierzynowska, K.; Wrona, D. Age-dependent effects of dimethyl fumarate on cognitive and neuropathological features in the streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* **2018**, *1686*, 19–33. [[CrossRef](#)]
30. Kurowska-Rucińska, E.; Ruciński, J.; Myślińska, D.; Grembecka, B.; Wrona, D.; Majkutewicz, I. Dimethyl fumarate alleviates adult neurogenesis disruption in hippocampus and olfactory bulb and spatial cognitive deficits induced by intracerebroventricular streptozotocin injection in young and aged rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15449. [[CrossRef](#)]
31. Wrona, D.; Majkutewicz, I.; Świątek, G.; Dunacka, J.; Grembecka, B.; Glac, W. Dimethyl fumarate as the peripheral blood inflammatory mediators inhibitor in prevention of streptozotocin-induced neuroinflammation in aged rats. *J. Inflamm. Res.* **2022**, *15*, 33–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Dunacka, J.; Świątek, G.; Wrona, D. High behavioral reactivity to novelty as a susceptibility factor for memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation as a rat model of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 11562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Talbot, K.; Wang, H.Y.; Kazi, H.; Han, L.Y.; Bakshi, K.P.; Stucky, A.; Fuino, R.L.; Kawaguchi, K.R.; Samoyedny, A.J.; Wilson, R.S.; et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 1316–1338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Moloney, A.M.; Griffin, R.J.; Timmons, S.; O'Connor, R.; Ravid, R.; O'Neill, C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signaling. *Neurobiol. Aging* **2010**, *31*, 224–243. [[CrossRef](#)]
35. Reger, M.A.; Watson, G.S.; Green, P.S.; Baker, L.D.; Cholerton, B.; Fishel, M.A.; Plymate, S.R.; Cherrier, M.M.; Schellenberg, G.D.; Frey, W.H., II; et al. Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid- $\beta$  in memory-impaired older adults. *J. Alzheimers Dis.* **2008**, *13*, 323–331. [[CrossRef](#)]
36. Craft, S.; Baker, L.D.; Montine, T.J.; Minoshima, S.; Watson, G.S.; Claxton, A.; Arbuckle, M.; Callaghan, M.; Tsai, E.; Plymate, S.R.; et al. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment, a pilot clinical trial. *Arch. Neurol.* **2012**, *69*, 29–38. [[CrossRef](#)]
37. Shoham, S.; Bejar, C.; Kovalev, E.; Weinstock, M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp. Neurol.* **2023**, *184*, 1043–1052. [[CrossRef](#)]
38. Grünblatt, E.; Salkovic-Petrisic, M.; Osmanovic, J.; Riederer, P.; Hoyer, S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 757–770. [[CrossRef](#)]
39. Salkovic-Petrisic, M.; Tribl, F.; Schmidt, M.; Hoyer, S.; Riederer, P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signaling pathway. *J. Neurochem.* **2006**, *96*, 1005–1015. [[CrossRef](#)]
40. Salkovic-Petrisic, M.; Osmanovic-Barilar, J.; Bruckner, M.K.; Hoyer, S.; Arendt, T.; Riederer, P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: A long-term follow up study. *J. Neural. Transm.* **2011**, *118*, 765–772. [[CrossRef](#)]
41. Grünblatt, E.; Hoyer, S.; Riederer, P. Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **2004**, *111*, 367–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Aguado-Llera, D.; Canelles, S.; Frago, L.M.; Chowen, J.A.; Argente, J.; Arilla, E.; Barrios, V. The protective effects of IGF-I against  $\beta$ -amyloid-related downregulation of hippocampal somatostatinergic system involve activation of Akt and protein kinase A. *Neuroscience* **2018**, *374*, 104–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ghaffari, M.K.; Rafati, A.; Karbalaeei, N.; Haghani, M.; Nemati, M.; Sefati, N.; Namavar, M.R. The effect of intra-nasal co-treatment with insulin and growth factor-rich serum on behavioral defects, hippocampal oxidative-nitrosative stress, and histological changes induced by icv-STZ in a rat model. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2024**, *397*, 4833–4849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sun, Z.; Wu, K.; Gu, L.; Huang, L.; Zhuge, Q.; Yang, S.; Wang, Z. IGF-1R stimulation alters microglial polarization via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway after cerebral hemorrhage in mice. *Brain Res. Bull.* **2020**, *164*, 221–234. [[CrossRef](#)]
45. Toth, L.; Czizler, A.; Hegedus, E.; Komaromy, H.; Amrein, K.; Czeiter, E.; Yabluchanskiy, A.; Koller, A.; Orsi, G.; Perlaki, G.; et al. Age-related decline in circulating IGF-1 associates with impaired neurovascular coupling responses in older adults. *Cerebrovasc. Dis.* **2022**, *44*, 2771–2783. [[CrossRef](#)]
46. Pinto-Benito, D.; Paradelo-Leal, C.; Ganchala, D.; de Castro-Molina, P.; Arevalo, M.A. IGF-1 regulates astrocytic phagocytosis and inflammation through the p110 $\alpha$  isoform of PI3K in a sex-specific manner. *Glia* **2022**, *70*, 1153–1169. [[CrossRef](#)]
47. Fernandez, A.M.; Hernandez-Garzon, E.; Perez-Domper, P.; Perez-Alvarez, A.; Mederos, S.; Matsui, T.; Santi, A.; Trueba-Saiz, A.; Garcia-Guerra, L.; Pose-Utrilla, J.; et al. Insulin regulates astrocytic glucose handling through cooperation with IGF-I. *Diabetes* **2017**, *1*, 64–74. [[CrossRef](#)]

48. Park, S.E.; Dantzer, R.; Kelley, K.W.; McCusker, R.H. Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice. *J. Neuroinflammation* **2011**, *8*, 12. [[CrossRef](#)]
49. Carro, E.; Spuch, C.; Trejo, J.L.; Antequera, D.; Torres-Aleman, I. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10884–10893. [[CrossRef](#)]
50. Ma, Q.L.; Yang, F.; Rosario, E.R.; Ubeda, O.J.; Beech, W.; Gant, D.J.; Chen, P.P.; Hudspeth, B.; Chen, C.; Zhao, Y.; et al.  $\beta$ -amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: Suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 9078–9089. [[CrossRef](#)]
51. Bomfim, T.R.; Forny-Germano, L.; Sathler, L.B.; Brito-Moreira, J.; Houzel, J.C.; Decker, H.; Silverman, M.A.; Kazi, H.; Melo, H.M.; McClean, P.L.; et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 1339–1353. [[CrossRef](#)]
52. Freude, S.; Hettich, M.M.; Schumann, C.; Stöhr, O.; Koch, L.; Köhler, C.; Udelhoven, M.; Leeser, U.; Müller, M.; Kubota, N.; et al. Neuronal IGF-1 resistance reduces Abeta accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **2009**, *23*, 3315–3324. [[CrossRef](#)]
53. Ziegler, A.N.; Levison, S.W.; Wood, T.L. Insulin and IGF-1 receptor signaling in neural-stem-cell homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 161–170. [[CrossRef](#)]
54. Kondo, M. Molecular mechanisms of exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects. *JMA J.* **2023**, *6*, 114–119. [[CrossRef](#)]
55. Mir, S.; Cai, W.; Carlson, S.W.; Saatman, K.E.; Andres, D.A. IGF-1 mediated neurogenesis involves a Novel RIT1/Akt/Sox2 Cascade. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3283. [[CrossRef](#)]
56. Liu, W.; Ye, P.; O'Kusky, J.R.; D'Ercole, A.J. Type 1 insulin-like growth factor receptor signaling is essential for the development of the hippocampal formation and dentate gyrus. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87*, 2821–2832. [[CrossRef](#)]
57. Soto, M.; Cai, W.; Konishi, M.; Kahn, C.R. Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 6379–6384. [[CrossRef](#)]
58. Hayes, C.A.; Wilson, D.; De Leon, M.A.; Jolayemi Mustapha, M.; Morale, S.; Odden, M.C.; Ashpole, N.M. Insulin-like growth factor-1 and cognitive health: Exploring cellular, preclinical, and clinical dimensions. *Front. Neuroendocrinol.* **2025**, *76*, 101161. [[CrossRef](#)]
59. Blume, G.R.; Royes, L.F.F. Peripheral to brain and hippocampus crosstalk induced by exercise mediates cognitive and structural hippocampal adaptations. *Life Sci.* **2024**, *352*, 122799. [[CrossRef](#)]
60. Kim, Y.K.; Jo, D.; Arjunan, A.; Ryu, Y.; Lim, Y.H.; Choi, S.Y.; Kim, H.K.; Song, J. Identification of IGF-1 effects on white adipose tissue and hippocampus in Alzheimer's disease mice via transcriptomic and cellular analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 2567. [[CrossRef](#)]
61. Jo, D.; Choi, S.Y.; Ahn, S.Y.; Song, J. IGF1 enhances memory function in obese mice and stabilizes the neural structure under insulin resistance via AKT-GSK3 $\beta$ -BDNF signaling. *Biomed. Pharmacother.* **2025**, *183*, 117846. [[CrossRef](#)]
62. Akbari, S.; Haghani, M.; Ghobadi, M.; Hooshmandi, E.; Haghighi, A.B.; Salehi, M.S.; Pandamooz, S.; Azarpira, N.; Afshari, A.; Zabihi, S.; et al. Combination therapy with platelet-rich plasma and epidermal neural crest stem cells increases treatment efficacy in vascular dementia. *Stem Cells Int.* **2023**, *2023*, 3784843. [[CrossRef](#)]
63. Kim, S.H.; Kim, C.H. Neuronal IGF-1 overexpression restores hippocampal newborn cell survival and recent CFC memory consolidation in Ca $_v$ 1.3 knock-out mice. *Brain Res.* **2024**, *1825*, 148712. [[CrossRef](#)]
64. Azarjoojahromi, A. Serotonin enhances neurogenesis biomarkers, hippocampal volumes, and cognitive functions in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* **2024**, *17*, 93. [[CrossRef](#)]
65. Kondo, M.; Koyama, Y.; Nakamura, Y.; Shimada, S. A novel 5HT $_3$  receptor-IGF1 mechanism distinct from SSRI-induced antidepressant effects. *Mol. Psychiatry* **2018**, *23*, 833–842. [[CrossRef](#)]
66. van Berlo, D.; Woutersen, M.; Muller, A.; Pronk, M.; Vriend, J.; Hakkert, B. 10% Body weight (gain) change as criterion for the maximum tolerated dose: A critical analysis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2022**, *134*, 105235. [[CrossRef](#)]
67. Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2007; ISBN 978-0-0804-7515-8.
68. Malberg, J.E.; Platt, B.; Sukoff Rizzo, S.J.; Ring, R.H.; Lucki, I.; Schechter, L.E.; Rosenzweig-Lipson, S. Increasing the levels of insulin-like growth factor-1 by an IGF binding protein inhibitor produces anxiolytic and antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 2360–2368. [[CrossRef](#)]

69. Basta-Kaim, A.; Szczesny, E.; Glombik, K.; Stachowicz, K.; Slusarczyk, J.; Nalepa, I.; Zelek-Molik, A.; Rafa-Zablocka, K.; Budziszewska, B.; Kubera, M.; et al. Prenatal stress affects insulin-like growth factor-1 (IGF-1) level and IGF-1 receptor phosphorylation in the brain of adult rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2014**, *24*, 1546–1556. [CrossRef]
70. Schnieder, T.P.; Trenceska, I.; Rosoklia, G.; Stankov, A.; Mann, J.J.; Smiley, J.; Dwork, A.J. Microglia of prefrontal white matter in suicide. *J. Neuropathol. Exp.* **2014**, *73*, 880–890. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

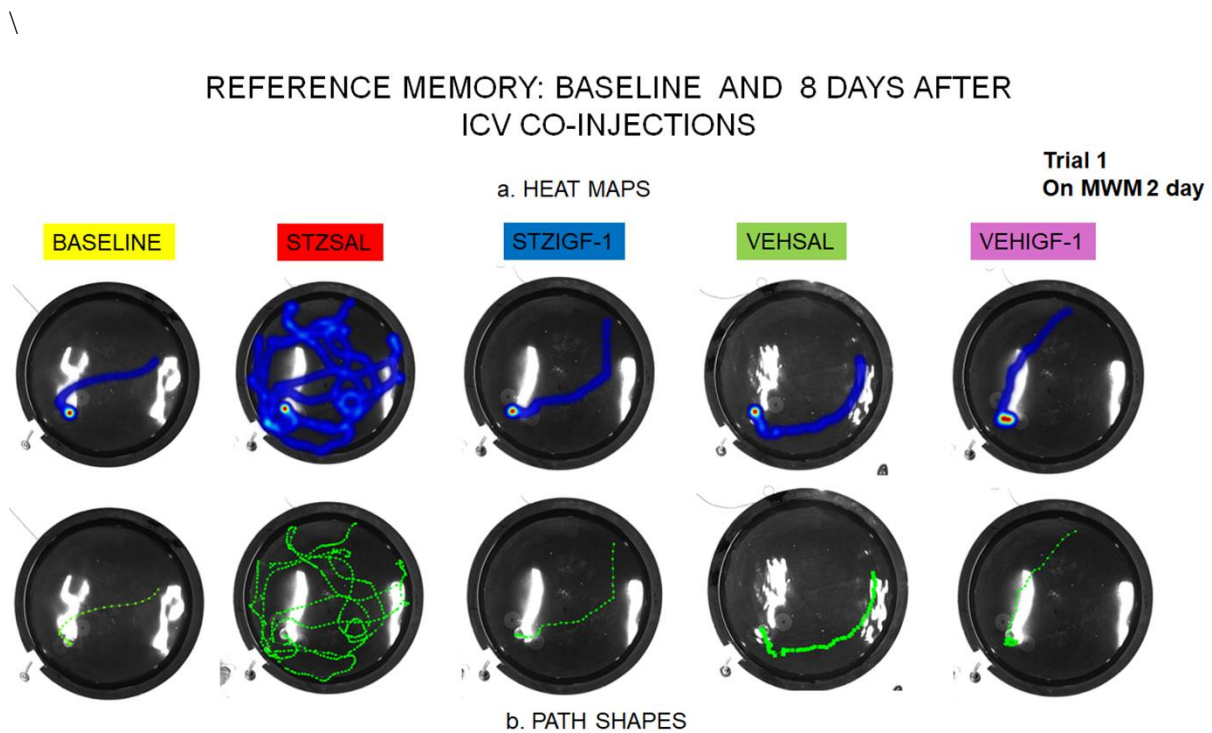


Figure S1. Visualization of spatial memory performance in Morris water maze (MWM) test illustrating the time spent in each quadrant of the pool (a. heat maps) and distance swum (b. path shapes) of representative rats of all groups at baseline and 8 days after ICV co-injections of streptozotocin (STZ) and saline (STZSAL), STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1), citrate buffer and saline (VEHSAL), citrate buffer and IGF-1, during the first trial on the second day of reference memory testing (MWM2). During the trial, the platform was located in the center of the lower left quadrant. In heat maps (Figure S1a), the longer time stay of an individual in a given location was marked with a warmer color (red part).

WORKING MEMORY: BASELINE AND 49-52 DAYS AFTER  
ICV CO-INJECTIONS

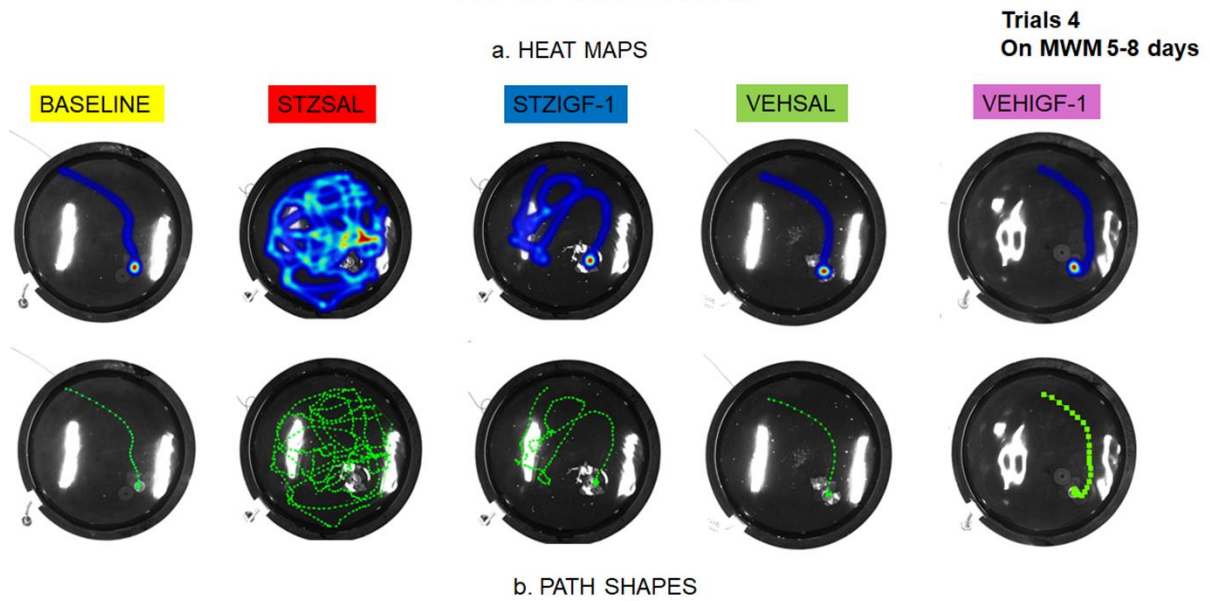
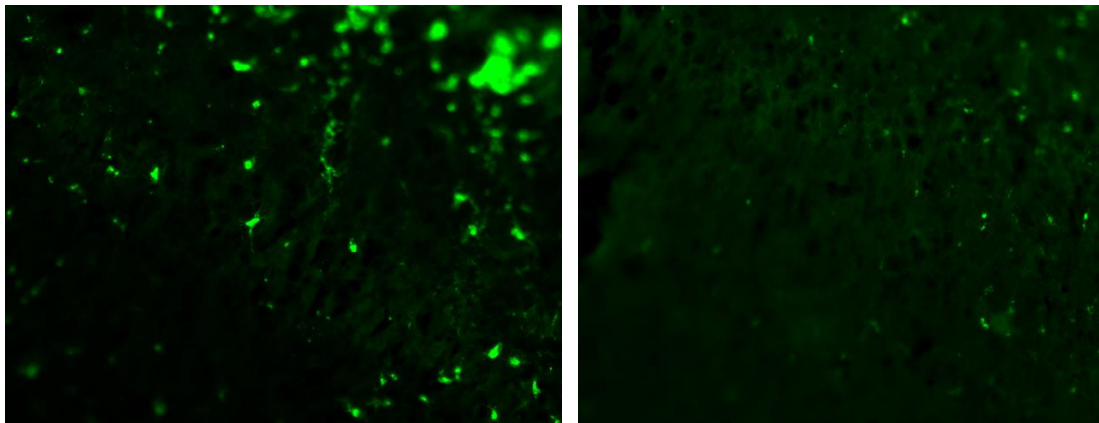


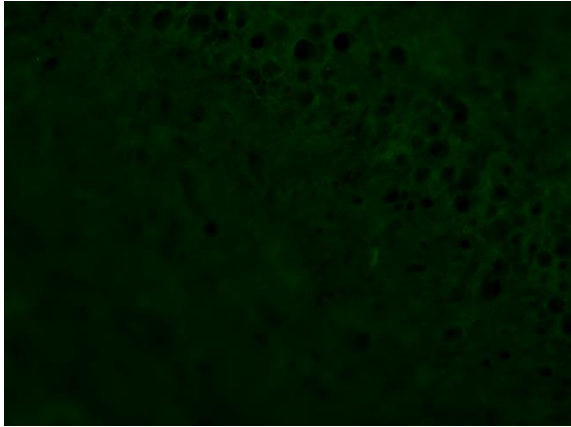
Figure S2. Visualization of spatial memory performance in Morris water maze (MWM) test illustrating the time spent in each quadrant of the pool (a. heat maps) and distance swum (b. path shapes) of representative rats of all groups on the baseline and 49-52 days after ICV co-injection of streptozotocin (STZ) and saline (STZSAL), STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (STZIGF-1), citrate buffer and saline (VEHSAL), citrate buffer and IGF-1, during four trails of 5-8 consecutive days of working memory testing. During the trials, the platform was placed in one of the centers of each quadrant. In heat maps (Figure S2a), the longer time stay of an individual in a given location was marked with a warmer color (red part).

Figure S3:

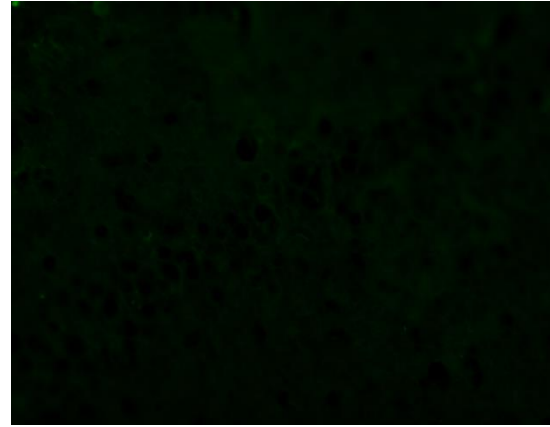


S3.5Aa.

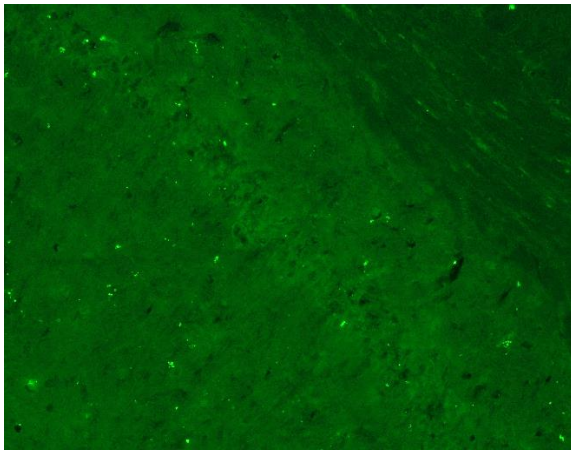
S3.5Ab.



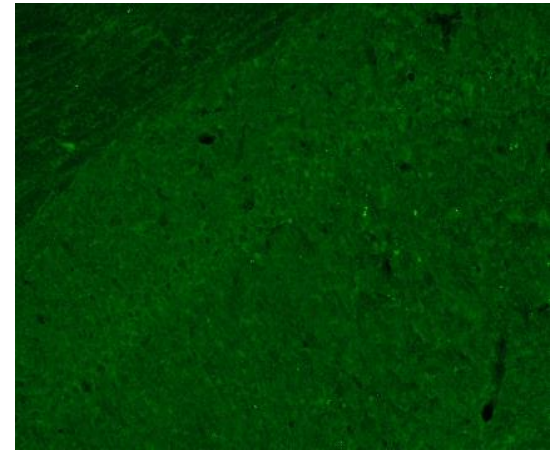
S3.5Ac.



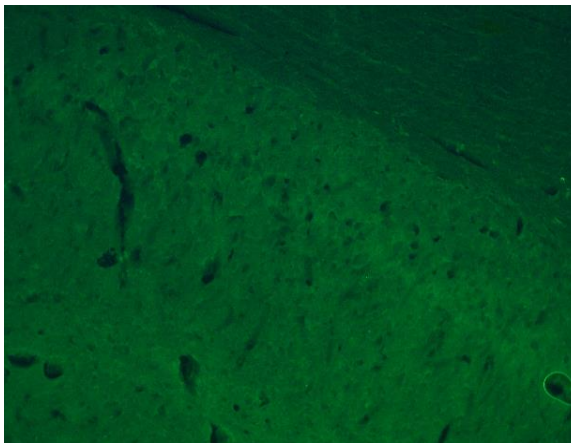
S3.5Ad.



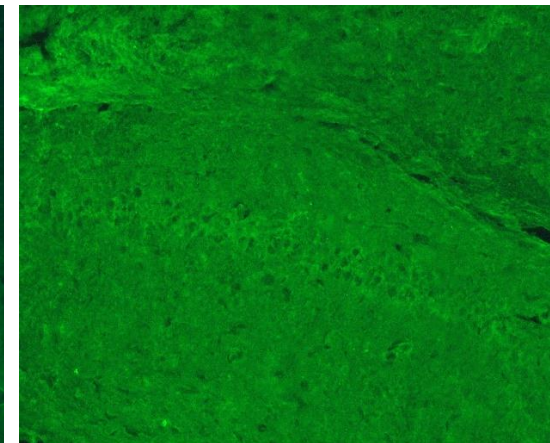
S3.5Ba.



S3.5Bb.



S3.5Bc.



S3.5Bd.

Figure S3. Original microscopy images showing CD68<sup>+</sup> microglia cells in the CA2 area of the hippocampus (5Aa (STZSAL), 5Ab (STZIGF-1), 5Ac (VEHSAL), 5Ad (VEHIGF-1), fluorescence microscope Zeiss Axio Scope A1, Oberkochen, Germany, compatible with the Axio Vision software 4.8.2.) and amyloid  $\beta$  (A $\beta$ 40-42) in the CA1 area of the hippocampus (5Ba (STZSAL), 5Bb (STZIGF-1), 5Bc (VEHSAL), 5Bd (VEHIGF-1), fluorescence microscope DM1000 LED, Leica, Wetzlar, Germany, compatible with the LAS X Multi Channel program) of rats at 90 days after intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ) and saline (SAL) or STZ and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) or citrate buffer (VEH) and SAL or VEH and IGF-1.

### 3.1.3. Publikacja 3

**Publikacja:** Dunacka J., Grembecka B., Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 induced anxiolytic and antidepressant effects in a rat model of sporadic Alzheimer's disease are associated with the peripheral suppression of inflammation. *Cells*, 2025b, 14, 1189. <https://doi.org/10.3390/cells14151189>. **IF=5.2; MNiSW=140 pkt.**

**Cel:** Zbadanie czy dokomorowe (ICV) podanie insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) z jednoczesną indukcją modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) wpłynie na poziom anhedonii i/lub zaburzeń lękowych obserwowanych w tej chorobie oraz na poziom obwodowego zapalenia.




**Metodyka:** Szczury Wistar Han (n=32) poddano badaniu poziomu anhedonii w teście preferencji sacharozy (SPT) oraz poziomu lęku w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach bazalnych, a następnie podano im dokomorowo (ICV) insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1) jednocześnie z indukcją sAD (streptozotocyna, 3 mg/kg). Następnie ponownie wykonano pomiary behawioralne, mierzące poziom zaburzeń neuropsychiatrycznych, na 3 etapach rozwoju sAD (7, 45 i 90 dzień sAD). Ponadto w czasie wczesnego (54 dzień sAD) i późnego (99 dzień sAD) etapu sAD pobrano krew w celu określenia obwodowych wskaźników zapalenia (analiza hematologiczna, cytometria przepływowa, ELISA) i wskaźnika reakcji stresowej- stężenia kortykosteronu (RIA).

**Wyniki:** U szczurów z modelem sAD, IGF-1 zadziałał przeciwdepresyjnie, o czym świadczy wyższe spożycie roztworu sacharozy w teście SPT podczas wczesnej (52 dzień sAD) i późnej (97 dzień sAD) fazy sAD. Ponadto badana neurotrofina wykazała działanie przeciwlękowe, wydłużając czas spędzony w ramionach otwartych (15 i 53 dzień sAD) i centrum (15 dzień sAD) EPM, jak również skracając czas spędzony w ramionach zamkniętych labiryntu (15 i 98 dzień sAD). Podanie IGF-1 u gryzoni z modelem sAD, wpłynęło również na obniżenie liczby leukocytów, limfocytów (ogólna liczba oraz limfocyty T i Th), monocytów jak i granulocytów (głównie w 99 dniu sAD), a także obniżyło stężenie pro-zapalnej interleukiny-6 (IL-6) w osoczu. Ponadto, podanie dokomorowe IGF-1 u tych zwierząt, poskutkowało obniżeniem obwodowego wskaźnika reakcji stresowej- kortykosteronu (99 dzień rozwoju sAD).

**Posumowanie:** Dokomorowe podanie ICV-IGF-1 szczurom w modelu sAD, zredukowało poziom zaburzeń depresyjnych i lękowych, co wiązało się nie tylko z wykazaną wcześniej redukcją neurozapalenia, ale również z supresją obwodowych markerów zapalenia.

Article

# Central Insulin-Like Growth Factor-1-Induced Anxiolytic and Antidepressant Effects in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease Are Associated with the Peripheral Suppression of Inflammation

Joanna Dunacka , Beata Grembecka  and Danuta Wrona \* 

Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Gdansk, Wita Stwosza 59 Street, 80-308 Gdansk, Poland; joanna.dunacka@ug.edu.pl (J.D.); beata.grembecka@ug.edu.pl (B.G.)

\* Correspondence: danuta.lewandowska@ug.edu.pl

## Abstract

(1) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is a neurotrophin with anti-inflammatory properties. Neuroinflammation and stress activate peripheral immune mechanisms, which may contribute to the development of depression and anxiety in sporadic Alzheimer's disease (sAD). This study aims to evaluate whether intracerebroventricular (ICV) premedication with IGF-1 in a rat model of streptozotocin (STZ)-induced neuroinflammation can prevent the emergence of anhedonia and anxiety-like behavior by impacting the peripheral inflammatory responses. (2) Male Wistar rats were subjected to double ICVSTZ (total dose: 3 mg/kg) and ICVIGF-1 injections (total dose: 2 µg). We analyzed the level of anhedonia (sucrose preference), anxiety (elevated plus maze), peripheral inflammation (hematological and cytometric measurement of leukocyte populations, interleukin (IL)-6), and corticosterone concentration at 7 (very early stage, VES), 45 (early stage, ES), and 90 days after STZ injections (late stage, LS). (3) We found that ICVIGF-1 administration reduces behavioral symptoms: anhedonia (ES and LS) and anxiety (VES, ES), and peripheral inflammation: number of leukocytes, lymphocytes, T lymphocytes, monocytes, granulocytes, IL-6, and corticosterone concentration (LS) in the rat model of sAD. (4) The obtained results demonstrate beneficial effects of central IGF-1 administration on neuropsychiatric symptoms and peripheral immune system activation during disease progression in the rat model of sAD.

**Keywords:** sporadic Alzheimer's disease model; insulin-like growth factor-1; anhedonia; anxiety; peripheral inflammation



Academic Editor: Antonella Caccamo

Received: 3 July 2025

Revised: 25 July 2025

Accepted: 31 July 2025

Published: 1 August 2025

**Citation:** Dunacka, J.; Grembecka, B.; Wrona, D. Central Insulin-Like Growth Factor-1-Induced Anxiolytic and Antidepressant Effects in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease Are Associated with the Peripheral Suppression of Inflammation. *Cells* **2025**, *14*, 1189. <https://doi.org/10.3390/cells14151189>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder. The disease occurs in two forms: familial (fAD) and sporadic (sAD). The second type (also known as late onset) is diagnosed much more frequently, as it affects up to 95% of cases and its occurrence relates to the elderly, i.e., over 65 years of age [1]. The exact causes of the development of sAD are not known, but the following aspects, among other things, are suspected: genetic risk factors (ε4 form of *APOE gene*), dysfunction of insulin pathways and glymphatic system in the brain, β-amyloid accumulation, the presence of oxidative stress, neuroinflammation, chronic stress, head trauma, sleep disturbances, exposure to aluminum, malnutrition, and virus infection [1–9]. The disorder is characterized by impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, neuroinflammation, the presence of β-amyloid

(A $\beta$ ) and tau aggregation in the brain, memory loss, anxiety, and depression, and hormonal changes, such as the dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis [2,10,11]. Currently, the therapy of disease (drugs: memantine, donepezil, galantamine, and rivastigmine) is primarily based on increasing acetylcholine and reducing glutamate levels in the brain to ensure the proper functioning of cholinergic pathways and reduce neuronal death [12]. However, lecanemab is also used in this application. This substance is an antibody, directed against large soluble forms of beta-amyloid and insoluble fibrils that build senile plaques [13]. Therefore, the available treatment focuses only on selected symptoms of AD, which is the basis for the search for more drugs to ameliorate other symptoms of the disease.

One of the most common models of sAD is intracerebroventricular (ICV) injections of streptozotocin (STZ). The administration of this substance allows for the representation of symptoms and features of sAD in animals, such as neuroinflammation, oxidative stress [14], disturbances of insulin signaling in the brain, insulin-resistant brain state (IRBS) [15] changes in the activity of enzymes involved in cerebral glucose metabolism [16], and also behavioral disturbances related to spatial memory, anxiety, and anhedonia disorders [17–21]. Moreover, after the central injection of STZ, the accumulation of A $\beta$ , building of senile plaques, and hyperphosphorylated tau protein forming neurofibrillary tangles were observed [22].

The presence of oxidative stress in the brain increases the activity of the HPA axis by reducing the function of its negative feedback loop [23]. One of the results of HPA axis activation is the secretion of glucocorticoids (GCs) [23], for which receptors are located on all types of immune cells [24]. Glucocorticoids are hormones that inhibit the immune response by inducing the apoptosis of immune cells or reducing the activity of NF- $\kappa$ B and MAPK pathways, thereby preventing the activation of genes that promote inflammation, but in some cases GCs increase immune response [25]. GCs inhibit neurogenesis, synaptic plasticity, and neuronal survival, and increase A $\beta$  synthesis as well as tau protein hyperphosphorylation, and therefore support the development of AD [26]. Moreover, peripheral inflammation also affects the central nervous system by damaging the brain–blood barrier (BBB) and allowing peripheral immune cells to flow into the brain, which causes a stronger neuroimmunological response [27]. It was found that in the course of AD neutrophils accumulate near A $\beta$  and disrupt blood flow in the brain, helper TCD4<sup>+</sup> (Th17) lymphocytes synthesize interleukin-17 (IL-17), which contributes to cognitive impairment, T cytotoxic CD8<sup>+</sup> lymphocytes disrupt synaptic plasticity, B lymphocytes increase the accumulation of senile plaques or microglial dysfunction, and NK cells, through interaction with microglia, contribute to the synthesis of inflammatory mediators [28]. Changes in the immune response also contribute to behavioral disorders such as anxiety or depression [29]; therefore, the neuroinflammation and peripheral immune system activation observed in AD may contribute to behavioral changes.

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is a neurotrophin with anti-inflammatory properties. IGF-1 in the brain reduces the neuroinflammatory response by promoting the conversion of microglia into an anti-inflammatory M2 phenotype and inhibits reactive oxygen species (ROS) production [30], thereby repairing damaged neural tissue [31]. Moreover, it can enhance neurogenesis in the hippocampus, protect neurons against A $\beta$ -induced toxicity in the hippocampus, and increase the release of neurotransmitters, such as acetylcholine. Acetylcholine acts as an antioxidant, reduces the levels of pro-inflammatory cytokines and reactive species [32–34], and its synthesis is reduced in AD. In addition, IGF-1 reduces depressive disorders and memory impairment, and improves cognitive functions [32,35,36]. Furthermore, a higher level of IGF-1 can prevent neurodegeneration [37].

Although anxiety and depressive disorders are not major symptoms of sporadic Alzheimer's disease and can occur as symptoms of other neurodegenerative disorders, they are an important aspect of treating the disorder. In patients with AD, the following behavioral changes were found: anxiety (39%), depression (42%), aggression (40%), and apathy (49%) [12]. This being the case, eliminating or reducing these negative symptoms of the disease is both a challenge and a real need for improving the quality of life of patients and their caregivers. Therefore, the aim of our study was to examine whether the intracerebroventricular administration of IGF-1 reduces anxiety and depressive disorders and influences peripheral inflammation in a rat model of sporadic Alzheimer's disease, and whether this effect is dependent on the stage of the disease. To investigate as thoroughly as possible the effect of ICVIGF-1 administration, behavioral determinations (sucrose preference test, elevated plus maze) were carried out at four time points and peripheral immune parameters (hematological and cytometric distribution of leukocyte population; determination of IL-6, IL-10, and corticosterone concentrations) were measured at two time points.

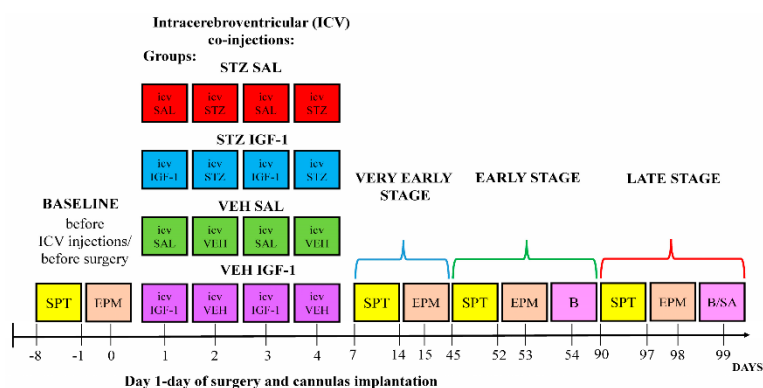
## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Research was carried out in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament, and with the approval of the Local Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals at the University of Technology in Bydgoszcz, Poland (no. 60/2017). The experiment was conducted using male Wistar Han rats (N = 32, weight:  $300 \pm 10$  g, and age: 11–12 weeks old) bred in the Tri-City Central Animal Laboratory, Research and Service Centre of the Medical University of Gdansk in Poland (breeder registration number: 041). All research procedures were performed at the Vivarium of the University of Gdańsk, Faculty of Biology (license number: 0169). Rats were housed with one individual per cage (width: 20 cm, length: 40 cm, and height: 18 cm), with visual and olfactory contact with other individuals, on a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:00 a.m.) in an air-conditioned, constant-temperature ( $22 \pm 2$  °C) room, with constant (ad libitum) access to water and food. Before starting the measurements in basal conditions, animals were acclimatized to laboratory conditions (2 weeks) and then to the presence of experimenters (handling, 2 weeks, 5 min/day) in order to minimize the stress caused by the experimenters and procedures. After the completion of the baseline behavioral measurement and before stereotaxic cannula implantation, the animals were randomly divided into 4 groups (N = 8/group): STZ SAL, STZ IGF-1, VEH SAL, and VEH IGF-1, according to the diagram presented in Figure 1.

### 2.2. Induction of Sporadic Alzheimer's Disease Model and Treatment with Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1)

Briefly, the animals were subjected to inhalation anesthesia (2.5% isoflurane, airflow: 0.5 L/min) using a vaporizer (Rothacher-Medical, Heitenried, Switzerland) and pump (Bitmos OXY 6000, Bitmos GmbH, Dusseldorf, Germany), and afterward the head of the rat was fixed using a stereotaxic apparatus (Hugo Sachs Elektronik, March, Germany). During the surgeries, the guide cannulas (3 mm, C311G/Spc, Bilaney, Dusseldorf, Germany) were implanted bilaterally according to coordinates from the stereotaxic atlas [38] (coordinates: AP:  $-1.3$  mm, L:  $\pm 2$  mm). The cannulas were compatible with an injection needle (4 mm, C311I/Spc, Bilaney, Dusseldorf, Germany) and both constituted a route of administration of chemicals to lateral ventricles of the brain (D:  $+3.6$  mm). The two guide cannulas were constantly anchored to three stainless steel skull screws by using a dental acrylic (Duracryl, spofa Dental a.s., Jicin, Czech Republic). ICV injections were carried out on days 1–4.



**Figure 1.** Scheme of procedures and group assignments. Explanations: SPT—sucrose preference test; EPM—elevated plus maze; ICVIGF-1—intracerebroventricular (ICV) injections of insulin-like growth factor-1 (IGF-1, total dose: 2  $\mu\text{g}$ , divided into two injections on days 1 and 3, 0.5  $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}/\text{ventricle}$ , neurotrophin treatment); ICVSAL—intracerebroventricular (ICV) injections of saline (SAL, 2  $\mu\text{L}/\text{ventricle}$ ); ICVSTZ—intracerebroventricular (ICV) injections of streptozotocin (STZ, total dose: 3  $\text{mg}/\text{kg}$ , divided into two injections on days 2 and 4, 0.75  $\text{mg}/\text{kg}/2 \mu\text{L}/\text{ventricle}$ , induction of sporadic Alzheimer’s disease model); ICVVEH—intracerebroventricular (ICV) injections of vehicle (VEH, 2  $\mu\text{L}/\text{ventricle}$ ), B—blood collection, B/SA—blood collection and sacrifice of animals; very early stage—stage of sporadic Alzheimer’s disease progression starting 7 days after ICV injections; early stage—stage of sporadic Alzheimer’s disease progression starting 45 days after ICV injections; and late stage—stage of sporadic Alzheimer’s disease progression starting 90 days after ICV injections.

In order to induce the Alzheimer’s disease model, the ICV injections of streptozotocin (STZ, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, total dose: 3  $\text{mg}/\text{kg}$ ,  $2 \times 1.5 \text{ mg}/\text{kg}$ , and 0.75  $\text{mg}/\text{kg}/2 \mu\text{L}/\text{ventricle}$ ) [18–20,36], dissolved in a 0.02 M citrate buffer (pH 4.5), were administered on days 2 and 4. Control rats were ICV injected with a citrate buffer (VEH, 2  $\mu\text{L}/\text{ventricle}$ ) (Figure S1).

On days 1 and 3, insulin-like growth factor-1 (IGF-1, Biotechne, 291-G1, Minneapolis, MN, USA) was administered ICV at a total dose of 2  $\mu\text{g}$  ( $2 \times 1 \mu\text{g}$ , 0.5  $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}/\text{ventricle}$  diluted in saline). The IGF-1 dose and route of administration were based on our [36] and other authors’ reports [35,39]. Rats from control groups received ICV saline (SAL) injections. A single 1  $\mu\text{g}$  ICV injection of IGF-1, which was used in the present study, was sufficient for inducing improvements in behavioral activity related to anxiety and anhedonia, as indicated by the increased percentage of time in the open arms of the EPM test and the increased sucrose intake in the SPT in a rat model of ICVSTZ-induced sAD.

All co-injections (ICV) of IGF-1/SAL and STZ/VEH were carried out by using a microinfusion pump (Legato-100—Series Syringe Pump, KD SCIENTIFIC, Holliston, MA, USA) and a Hamilton syringe (10  $\mu\text{L}$ ) connected to an injection needle by a polyethylene tube. The rate of administration of substances was 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . To prevent the backflow of the solution, the injection needle was left inside the guide cannula for an additional 1 min. After the surgery and co-injections were completed, the animals were moved to a warm room, where they stayed until they regained consciousness. Following ICV implantation of the cannulas and ICV injection of substances, the animals remained in their home cages for a 1-week recovery period until the wounds on their heads healed. The rats were then subjected to two behavioral tests.

### 2.3. Sucrose Preference Test (SPT)

In order to determine the level of anhedonia, a primary depression-like behavior, the sucrose consumption in the sucrose preference test (SPT) was measured according to the procedure described previously [40,41], with some modifications. The SPT was performed at the baseline and at the very early (starting 7 days after the induction of sAD, VES), early (starting 45 days after the induction of sAD, ES), and late (starting 90 days after the induction of sAD, LS) stages of sAD progression. In order to determine the sucrose preference coefficient, the animals had access to two bottles for 8 consecutive days (7 measurements). The first bottle always contained drinking water, while the second bottle contained an aqueous solution of sucrose, with the first three measurements concerning a 2% solution and the last four measurements concerning a 4% sucrose solution. All measurements were collected every 24 h, as there were differences in the weight of the bottle with liquid. Additionally, the position of the bottles was changed after 24 h to eliminate side preferences by the rats. The data obtained during the last measurement, in which the sucrose concentration was 4%, were presented as a percentage of sucrose solution consumption relative to all fluid consumption over 24 h. The remaining days of the test were treated as a training phase.

Sucrose consumption preference was calculated as follows:

$$\text{sucrose preference (\%)} = \frac{\text{sucrose intake (g)}}{(\text{water} + \text{sucrose intake (g)})} \times 100$$

The trained observer who was blinded to the experimental treatment of the animals analyzed the behavioral responses.

### 2.4. Elevated Plus Maze (EPM)

In order to determine the level of anxiety, the time spent, entrances, and episodes of miction and defecation in open arms, center and closed arms of the elevated plus maze (EPM) were measured. The test was performed according to a methodology described earlier [20,42], with some modifications. The EPM apparatus was made of plexiglass and consisted of two black, open arms (50 × 10 cm) and two opposite black, closed arms (high walls: 40 cm) connected by a black square center (10 × 10 cm), and thus the maze formed a plus sign. The whole maze was elevated 50 cm above the level of the floor. All EPM trials (duration: 5 min) were recorded using a video camera (200 cm above the apparatus) connected to a video-tracking system (EthoVision XT, Noldus, Wageningen, The Netherlands), and were conducted between 8:00 and 12:00 a.m. To ensure reproducible measurements between the baseline conditions and disease stages (a. very early stage, VES, starting 7 days after the induction of sAD; b. early stage, ES, starting 45 days after the induction of sAD; and c. late stage, LS, starting 90 days after the induction of sAD), the animal was always placed in the maze with its head toward the open arms. After each trial, the maze was cleaned with a solution of ethanol (70%) and left to dry (5 min) to avoid the influence of olfactory cues. The trained observer who was blinded to the division of animals into different groups analyzed behavioral responses.

### 2.5. Determination of Hematological and Immunological Parameters in the Blood and Spleen

In order to determine the level of peripheral inflammation, blood was collected two times: at the early (volume: 2–3 mL) and late (volume: 5 mL) stages of disease progression, via heart puncture, and at this time the animals were under inhalation anesthesia (2.5% isoflurane). The hematological parameters (number and percentage of various leukocyte populations, red blood and platelet cell system parameters) were determined in the heparinized whole blood with a hematology analyzer (Horriba, Loos, France).

Lymphocyte blood and spleen subpopulations were determined using cytometric analysis according to a method described previously [20,43,44], with some modification. In order to identify lymphocyte subpopulations, two types of three-color combinations of fluorescent monoclonal antibodies (powder form mixed with distilled water—0.5 mL/vial) were used: CD3:FITC/CD4:RPE/CD8:AlexaFluor 647 (Biorad, TC018, Hercules, CA, USA) and CD3:FITC/CD45RA:RPE/CD161:AlexaFluor 647 (Biorad, TC019, Hercules, CA, USA).

From the spleen, before cytometric assays, isolated spleen mononuclear cells (SMCs) were obtained. For this purpose, tissue of the spleen was placed in a solution of Hank's balanced salt (HBSS Sigma-Aldrich Manufacturer Life Technologies, Paisley, UK) and HEPES/sodium bicarbonate ingredients, and the samples were then blended and centrifuged (30 min, 4 °C, 1113× g). The isolated SMCs were collected with a pasteur pipette, washed with a phosphate-buffered saline (PBS) suspension in RPMI-1640 with 10% calf bovine serum, and seeded at a  $4 \times 10^6$  cells/mL concentration and used in the flow cytometry analysis.

In a light-resistant test tube, 25 µL of whole-blood or isolated SMC samples were mixed with 25 µL of an antibody solution and incubated (30 min) in dark. Then, IO test 3 was added (25 µL, Beckman Coulter, A07800, Brea, CA, USA), and red blood cells were lysed by adding Versalyse solution (Beckman Coulter, A09777, Brea, CA, USA). In another step, 700 µL of PBS was added to the samples and they were mixed. The prepared solutions were protected from light and stored (4 °C) in darkness until flow cytometry had been performed with a Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and MXP Software version 2.1. The percentages of lymphocyte population/subpopulation were assessed during the analysis, displaying forward- and side-scatter characteristics. The total lymphocyte subpopulation numbers were obtained from the hematology counter (Horriba, Loos, France).

#### *2.6. Determination of Anti-Inflammatory Interleukin-10 (IL-10) and Pro-Inflammatory Interleukin-6 (IL-6) Concentrations in Plasma*

In order to determine the level of peripheral inflammation, the concentrations of plasma cytokines, IL-10 and IL-6, were determined via the enzyme-linked immunoassay (ELISA) method by using commercially available Rat-IL-10 (sensitivity: 3 pg/mL) and Rat-IL-6 (sensitivity: 16 pg/mL) ELISA kits (catalog numbers: ERA23RB and ERA31RB, Invitrogen, Waltham, MA, USA). The absorbance was read using a DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) system set to 450 nm. Concentrations of IL-10 and IL-6 were calculated based on the standard curve generated by Beckman Coulter's Biomek software version i5 program, based on the absorbance of standard samples.

#### *2.7. Determination of Corticosterone (CORT) Concentration in Plasma*

In order to determine the level of peripheral HPA axis activation, the corticosterone (CORT) concentrations were determined according to a method previously described [43]. Blood samples from rats were collected between 9:00 and 10:00 a.m. (the time of lowest concentration) through a cardiac puncture, and at this time animals were under inhalation anesthesia (2.5% isoflurane, airflow: 0.5 L/min). The CORT concentration in plasma was measured by a radioimmunoassay method using a commercially available kit (rCorticosterone (125I) RIA KIT, RK-548, isotop Institute of Isotopes Co., Ltd., Budapest, Hungary, sensitivity: 0.5 ng/mL) and Wizard 1470 gamma counter (Pharmacia—LKB, Turku, Finland). The determinations for each sample were made twice.

#### *2.8. Sacrifice of Animal and Collection of Tissues and Organs*

Animals were sacrificed under inhalation anesthesia (2.5% isoflurane, airflow: 0.5 L/min) by administering a lethal dose (2 mL/kg, i.p.) of Morbital (Biowet, Puławy,

Poland). Blood was taken by cardiac puncture, and the thymus and spleen were collected. The spleen and thymus were weighed, and their relative weights were calculated according to their body weight (mg/100 g b.w.). After thymus and spleen collections, animals were transcardially perfused with PBS and 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were post-fixed (overnight, 4% PFA) and cryoprotected (30% sucrose), and 30  $\mu$ m coronal sections were cut (CM 1850, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Coronal brain sections containing the placement of the guide cannulas were stained by the Nissl procedure and analyzed using Stemi 508 microscope and Zen 3.5—blue edition software (Zeiss, München, Germany). The representative photograph of microscopic slide showing Nissl-stained sections of the localization of the guide cannulas at the  $-1.3$  mm Bregma level was shown in Figure S1.

### 2.9. Data Analysis

The data are presented as mean  $\pm$  SD. For the power analysis, the sample size estimation was based on preliminary experiments and the previous literature, and sample size tools were available from Test power analysis, G\*Power 3.1.9.7. Nonparametric tests (Statistica 13.1.3360 software, Statsoft, Tulsa, OK, USA) were performed because some parameters (Table S1) were characterized by non-homogeneous variance (Levene test) or the abnormal distribution of the variables (Kolmogorow–Smirnov test). Statistical analyses were performed using the Kruskal–Wallis ANOVA by rank for multiple comparisons (time: baseline conditions, a very early stage, an early stage, and a late stage; treatment: STZ, IGF-1, VEH, and SAL) and the Mann–Whitney U test for comparison between two groups of animals. Probability ( $p$ ) values lower than 0.05 were regarded as being statistically significant.

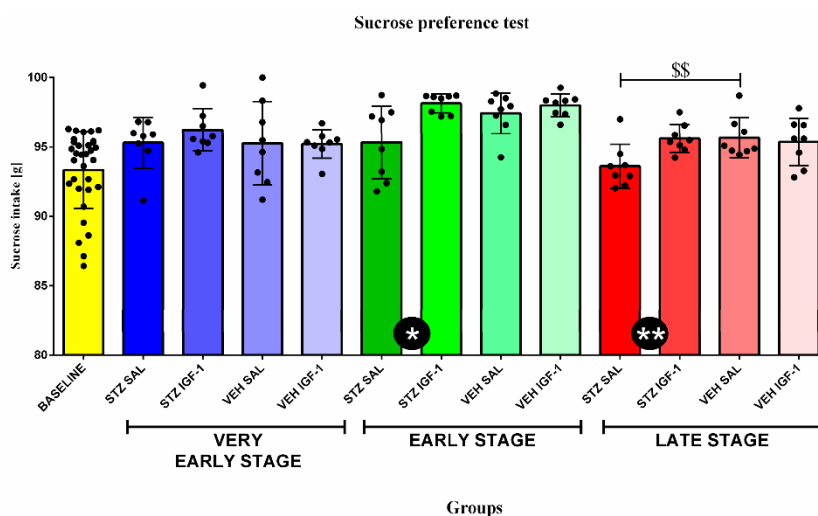
Due to the varying blood volumes collected during the heart puncture and the occurrence of technical interference during recording in some cases, the statistical analysis was performed on a diverse range of data. The exact number of N for a single parameter is presented in the graphs.

## 3. Results

### 3.1. Behavioral Activity Associated with Anhedonia in the Sucrose Preference Test (SPT)

Statistical analysis showed a significant difference ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , respectively) in sucrose consumption between STZ IGF-1 and STZ SAL animals, with STZ IGF-1 rats consuming more sucrose at the 4% sucrose dose at the early and late stages. Furthermore, we found that STZ SAL animals significantly ( $p < 0.01$ ) decreased their intake of the 4% sucrose solution compared to VEH SAL rats at the late stage (Figure 2).

Table 1 shows the effect of time (stage of sAD) on sucrose intake. Compared to the baseline (before injection), rats from the STZ IGF-1 ( $p < 0.001$ ), VEH SAL ( $p < 0.001$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.001$ ) groups showed significantly increased sucrose solution intake measured at the early stage of sAD progression. In addition, at the very early stage, significantly higher ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , respectively) sucrose solution intake than at the baselines was observed in STZ SAL and STZ IGF-1 rats, and at the late phase significantly higher ( $p < 0.05$ ) sucrose consumption than at the baseline was observed in the STZ IGF-1, VEH SAL, and VEH IGF-1 groups (in all comparisons,  $p < 0.05$ ). Moreover, sucrose intake was lower at the late phase than at the early stage in the STZ IGF-1 ( $p < 0.01$ ) and VEH IGF-1 ( $p < 0.01$ ) groups, but sucrose consumption in these rats at the early stage was higher than at the very early phase (STZ IGF-1  $p < 0.05$ , VEH IGF-1  $p < 0.001$ ).



**Figure 2.** The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment on behavioral activity associated with anhedonia in the sucrose preference test at the baseline conditions, at the very early, early, and late stages after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1). Data are presented as the mean ± SD and were analyzed by using the Mann-Whitney U test. Explanations: \* in a black circle— $p < 0.05$ , \*\* in a black circle— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences between STZ SAL and STZ IGF-1; \$\$ above the lines— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences to VEH SAL.

**Table 1.** The effect of time (stage) on behavioral activity associated with anhedonia in the sucrose preference test at baseline conditions, at the very early, early, and late stages after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1).

Group	Phase	Sucrose Intake (g)
BASELINE	Baseline	93.34 ± 2.78
STZ SAL	Very early stage	95.31 ± 1.82 @
STZ IGF-1		96.24 ± 1.53 @@
VEH SAL		95.26 ± 3.01
VEH IGF-1		95.21 ± 1.03
STZ SAL		95.33 ± 2.62
STZ IGF-1	Early stage	98.13 ± 0.68 @@@%
VEH SAL		97.42 ± 1.47 @@@
VEH IGF-1		98.00 ± 0.82 @@@%%
STZ SAL	Late stage	93.61 ± 1.59
STZ IGF-1		95.62 ± 1.03 @&&
VEH SAL		95.67 ± 1.45 @
VEH IGF-1		95.36 ± 1.71 @&&

Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed by using the Mann-Whitney U test. @— $p < 0.05$ , @@— $p < 0.01$ , and @@@— $p < 0.001$ , indicating the significance of differences to baseline conditions; %— $p < 0.05$  and %%%— $p < 0.001$ , indicating the significance of differences between very early and early stage/late stage; and &&— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences between early and late stages of disease progression.

### 3.2. Behavioral Activity Associated with Anxiety in the Elevated Plus Maze (EPM)

Figure 3 and Table 2 present behavioral activity assessed in the EPM test measured as time spent in the open arms, time spent in the center of the maze, time spent in the closed arms, at the baseline (before injection), and at the very early, early, and late stages of sAD progression. Rats from STZ IGF-1 spent more time than STZ SAL rats in the open arms of the maze at the very early and early stages (both  $p < 0.01$ ) as well as in the center of the maze at the very early stage, and less time in closed arms at the very early ( $p < 0.01$ ) and late stages ( $p < 0.05$ ) of sAD.

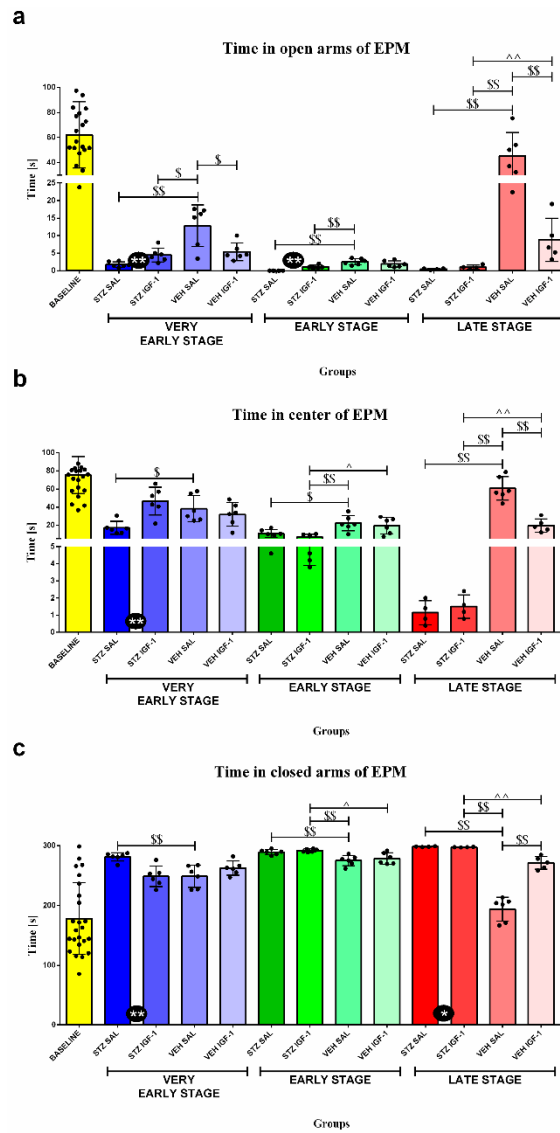
**Table 2.** The effect of time (stage) on behavioral activity associated with anxiety presented as the time spent in the open arms (a), the center (b), and the closed arms (c) of the elevated plus maze (EPM) at the baseline conditions, at the very early, early, and late stages after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1).

Group	Phase	Time (s)		
		a. Open Arms	b. Center	c. Closed Arms
BASELINE	Baseline	62.04 ± 26.48	75.55 ± 20.26	178.03 ± 60
STZ SAL	Very early stage	1.77 ± 0.77 @@@	16.93 ± 7.17 @@@	281.3 ± 7.04 @@@
STZ IGF-1		4.47 ± 2 @@@	46.77 ± 15.37 @@	248.77 ± 17.03 @
VEH SAL		12.83 ± 5.95 @@@	38.30 ± 14.48 @@@	248.87 ± 18.44 @
VEH IGF-1		5.37 ± 2.52 @@@	31.93 ± 13.19 @@@	262.70 ± 11.77 @@
STZ SAL		0 ± 0 @@@%%	10.77 ± 4.36 @@@%	289.23 ± 4.36 @@@%
STZ IGF-1	Early stage	1.07 ± 0.53 @@@%%	6.9 ± 3 @@@%%	292.03 ± 2.7 @@@%%
VEH SAL		2.53 ± 0.88 @@@%%	22.17 ± 8.58 @@@%	275.3 ± 8.51 @@@%
VEH IGF-1		1.9 ± 0.9 @@@%%	19.33 ± 8.95 @@@	278.77 ± 9.49 @@@%
STZ SAL	Late stage	0.45 ± 0.19 @@@%&&	1.15 ± 0.7 @@@%&&	299 ± 0.71 @@@%&&
STZ IGF-1		1 ± 0.59 @@@%&&	1.5 ± 0.68 @@@%&&	298.5 ± 1.11 @@@%&&
VEH SAL		45.27 ± 18.77 %&&	60.70 ± 12.98 %&&	194.03 ± 19.98 %&&
VEH IGF-1		8.8 ± 6.21 @@@%&&	19.68 ± 7.35 @@@	271.52 ± 10.52 @@

Explanations: Data are presented as mean ± SD and were analyzed using the Mann-Whitney U test. @— $p < 0.05$ , @@— $p < 0.01$ , and @@@— $p < 0.001$ , indicating the significance of differences to the baseline conditions; %— $p < 0.05$ , %%— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences between the very early and early stage/late stage; and &&— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences between the early and late stages of disease progression.

Moreover, the time spent in the open arms of the VEH SAL group was longer compared to the (1) STZ SAL ( $p < 0.01$ ), STZ IGF-1 ( $p < 0.05$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.05$ ) groups at the very early stage; the (2) STZ SAL ( $p < 0.01$ ) and STZ IGF-1 ( $p < 0.01$ ) groups at the early stage; and the (3) STZ SAL ( $p < 0.01$ ), STZ IGF-1 ( $p < 0.01$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.01$ ) groups at the late stage of sAD progression. In addition, at the late stage, animals from the VEH IGF-1 group spent more time in the open arms than those from the STZ IGF-1 group ( $p < 0.01$ ).

The time spent in the center of maze was longer for the VEH SAL group compared to (1) STZ SAL rats ( $p < 0.05$ ) at the very early stage; (2) STZ SAL ( $p < 0.05$ ), STZ IGF-1 ( $p < 0.01$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.05$ ) rats at the early stage; and (3) STZ SAL, STZ IGF-1, and VEH IGF-1 animals (in all comparisons  $p < 0.01$ ) at the late stage. Rats from STZ IGF-1 spent less time in the center than VEH IGF-1 rodents at the early ( $p < 0.05$ ) and late stages ( $p < 0.01$ ).



**Figure 3.** The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment on behavioral activity associated with anxiety presented as the time spent in the open arms (a), the center (b), and the closed arms (c) of the elevated plus maze (EPM) at the baseline conditions, at the very early, early, and late stages after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1). Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using a Mann–Whitney U test. Explanations: \* in a black circle— $p < 0.05$ , \*\* in a black circle— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences between STZ SAL and STZ IGF-1; \$ above the lines— $p < 0.05$ , \$\$ above the lines— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences to the VEH SAL group; ^ above the lines— $p < 0.05$ , ^^ above the lines— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences between the STZ IGF-1 and VEH IGF-1 groups.

The time spent in the closed arms was shorter for VEH SAL rats compared to (1) STZ SAL rats at the very early stage ( $p < 0.01$ ), the (2) STZ SAL and STZ IGF-1 groups (in both comparisons,  $p < 0.01$ ) at the early stage, and (3) all the rats at the late stage (in all comparisons,  $p < 0.01$ ). What is more, STZ IGF-1 animals spent more time in the closed arms than VEH IGF-1 rodents at the early ( $p < 0.05$ ) and late stages ( $p < 0.01$ ) of sAD.

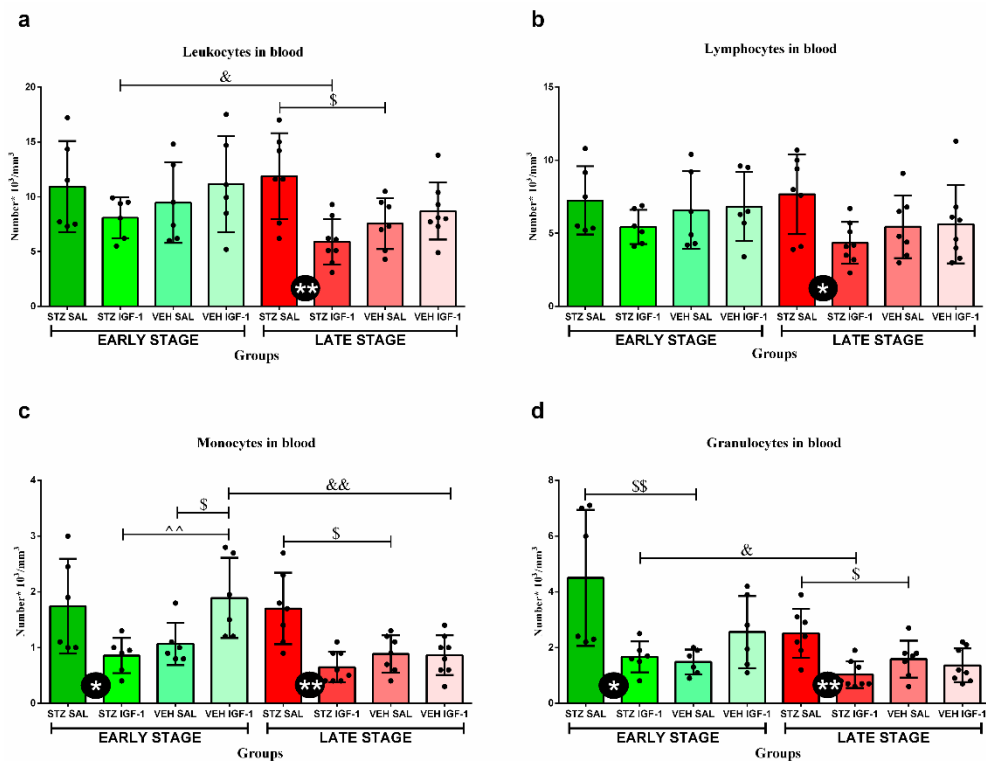
Additionally, time spent in the open arms (1) at the very early stage in the STZ SAL, STZ IGF-1, VEH SAL, and VEH IGF-1 groups (in all comparisons,  $p < 0.001$ ); (2) at the early stage in the STZ SAL, STZ IGF-1, VEH SAL, and VEH IGF-1 groups (in all comparisons,  $p < 0.001$ ); and (3) at the late stage in STZ SAL ( $p < 0.01$ ), STZ IGF-1 ( $p < 0.001$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.001$ ) groups was shorter than at the baseline conditions. Time spent in the center was shorter (1) at the very early stage in the STZ SAL ( $p < 0.001$ ), STZ IGF-1 ( $p < 0.01$ ), VEH SAL ( $p < 0.001$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.001$ ) groups; (2) at the early stage in the STZ SAL, STZ IGF-1, VEH SAL, and VEH IGF-1 groups (in all comparisons,  $p < 0.001$ ); and (3) at the late stage in the STZ SAL ( $p < 0.01$ ), STZ IGF-1 ( $p < 0.01$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.001$ ) groups than at the baseline conditions. Time spent in the closed arms was longer (1) at the very early stage in the STZ SAL ( $p < 0.001$ ), STZ IGF-1 ( $p < 0.05$ ), VEH SAL ( $p < 0.05$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.01$ ) groups; (2) the early stage in the STZ SAL ( $p < 0.001$ ), STZ IGF-1 ( $p < 0.001$ ), VEH SAL ( $p < 0.01$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.01$ ) groups; and (3) the late stage in the STZ SAL ( $p < 0.01$ ), STZ IGF-1 ( $p < 0.01$ ), and VEH IGF-1 ( $p < 0.01$ ) groups than at the baseline conditions. At the early stage all the rats spent less time in the open arms of the maze than at the very early stage ( $p < 0.01$ ). In addition, rats from the STZ SAL group spent less time in the open arms at the late stage compared to the very early phase ( $p < 0.01$ ), but more time compared to the early stage ( $p < 0.01$ ). Moreover, STZ IGF-1 animals spent less time in the open arms ( $p < 0.01$ ) at the late stage than the very early stage, and rats from the VEH SAL group spent more time in the open arms at the late stage than at the very early and early stages (in both comparisons,  $p < 0.01$ ); the time spent in this part of the maze was longer in the VEH IGF-1 group at the late stage compared to the early stage ( $p < 0.01$ ). In addition, time spent in the center was longer at the very early stage than the early and late phases of AD progression in the STZ SAL ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) and STZ IGF-1 groups (in both comparisons,  $p < 0.01$ ). In the VEH SAL group, the time spent in the center at the very early phase was longer compared to the early stage ( $p < 0.05$ ), but time at the very early stage was shorter than at the late stage ( $p < 0.05$ ). At the late stage compared to the early phase, the time spent in the maze center was shorter (in both comparisons,  $p < 0.01$ ) in the STZ SAL and STZ IGF-1 animals, but longer in the VEH SAL rats ( $p < 0.01$ ). All of the rats spent more time in the closed arms at the early stage than at the very early stage (STZ SAL  $p < 0.05$ , STZ IGF-1  $p < 0.01$ , VEH SAL  $p < 0.01$ , and VEH IGF-1  $p < 0.05$ ). Furthermore, the STZ SAL and STZ IGF-1 rats spent more time in the closed arms at the late than at the very early (STZ SAL,  $p < 0.05$ ; STZ IGF-1,  $p < 0.01$ ) and early (in both comparisons,  $p < 0.01$ ) stages of sAD progression. The control VEH SAL animals spent more time in the closed arms at the very early and early stages than at the late phase of disease progression (in both comparisons,  $p < 0.01$ ).

Moreover, Table S2 shows the effect of treatment and time on the number of entries to open arms, center, and closed arms, and the number of miction and defecations episodes in the EPM test.

### 3.3. Peripheral Blood Leukocytes and Their Subpopulations' Numbers and Percentages

There were no significant differences in the total number of blood leukocytes and their populations, except for monocytes and granulocytes between the STZ SAL and STZ IGF-1 groups, with a lower cell number in STZ IGF-1 animals ( $p < 0.05$ ) at the early stage of sAD progression (Figure 4). Moreover, at this stage, VEH IGF-1 rats had a higher number of

monocytes than STZ IGF-1 ( $p < 0.01$ ) and VEH SAL ( $p < 0.05$ ) animals, and in the case of granulocytes STZ SAL rodents had a higher number of cells than the VEH SAL group ( $p < 0.01$ ). However, at the late stage, a significantly lower total number of leukocytes ( $p < 0.01$ ), lymphocytes ( $p < 0.05$ ), monocytes ( $p < 0.01$ ), and granulocytes ( $p < 0.01$ ) in the blood was observed in STZ IGF-1 rats compared to STZ SAL animals. In addition, at this stage in STZ SAL rats, the number of leukocytes was higher than in the VEH SAL ( $p < 0.05$ ) group. In the STZ IGF-1 group the number of WBCs was lower at the late stage than at the early stage ( $p < 0.05$ ). What is more, the number of monocytes and granulocytes was higher in STZ SAL rats than in the VEH SAL group (in both comparisons,  $p < 0.05$ ) at the late stage of sAD. Additionally, the number of monocytes in the VEH IGF-1 group was lower at the late phase than at the early stage ( $p < 0.01$ ). The STZ IGF-1 group also had a lower number of granulocytes at this stage than at the early phase of sAD progression ( $p < 0.05$ ).



**Figure 4.** The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment and time (stage) on the number of leukocytes (a), lymphocytes (b), monocytes (c), and granulocytes (d) at the early and late stages after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1) in the peripheral blood. Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using the Mann–Whitney U test. Explanations: \* in a black circle— $p < 0.05$ , \*\* in a black circle— $p < 0.01$ , indicating the significance of the differences between the STZ SAL and STZ IGF-1 groups; \$ above the lines— $p < 0.05$ , \$\$ above the lines— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences to the VEH SAL group; ^^ above the lines— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences between the STZ IGF-1 and VEH IGF-1 groups; and &— $p < 0.05$ , &&— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences between the early and late stages of disease progression.

The percentages of lymphocytes, monocytes, and granulocytes in the peripheral blood are shown in Table 3. VEH SAL rats had higher percentages of lymphocytes than VEH IGF-1 animals ( $p < 0.05$ ) at the early phase of sAD. At this phase, animals from the STZ IGF-1 group had lower percentages of monocytes than VEH IGF-1 ( $p < 0.05$ ) rats, but the percentages of granulocytes in VEH IGF-1 rodents were higher than in the VEH SAL ( $p < 0.05$ ) group. The percentages of granulocytes at the late ( $p < 0.01$ ) phases were lower in STZ IGF-1 animals than in the STZ SAL ( $p < 0.05$ ) group. Moreover, in the STZ IGF-1 animals, the percentages of granulocytes at the late stage were lower than at the early stage of sAD ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment and time (stage) on the percentage of lymphocytes, monocytes, and granulocytes at the early (a) and late stages (b) after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1) in the peripheral blood.

	Group	Phase	Percentage of Lymphocytes [%]	Percentage of Monocytes [%]	Percentage of Granulocytes [%]
a.	STZ SAL	EARLY STAGE	67.93 ± 5.09	14.03 ± 3.43	18.05 ± 1.86
	STZ IGF-1		68.28 ± 7.53	10.78 ± 2.14 <sup>^</sup>	20.94 ± 6.73
	VEH SAL		73.17 ± 6.99	11.37 ± 2.33	15.47 ± 5.75
	VEH IGF-1		62.45 ± 7.96 <sup>\$</sup>	14.03 ± 2.51	23.53 ± 6.52 <sup>\$</sup>
b.	STZ SAL	LATE STAGE	67.64 ± 7.51	13.89 ± 3.20	21.47 ± 6.30
	STZ IGF-1		74.38 ± 9.41	10.76 ± 2.79	13.61 ± 5.19 <sup>**&amp;</sup>
	VEH SAL		73.17 ± 6.99	11.37 ± 2.33	15.47 ± 5.75
	VEH IGF-1		62.45 ± 7.96	14.03 ± 2.51	23.53 ± 6.52

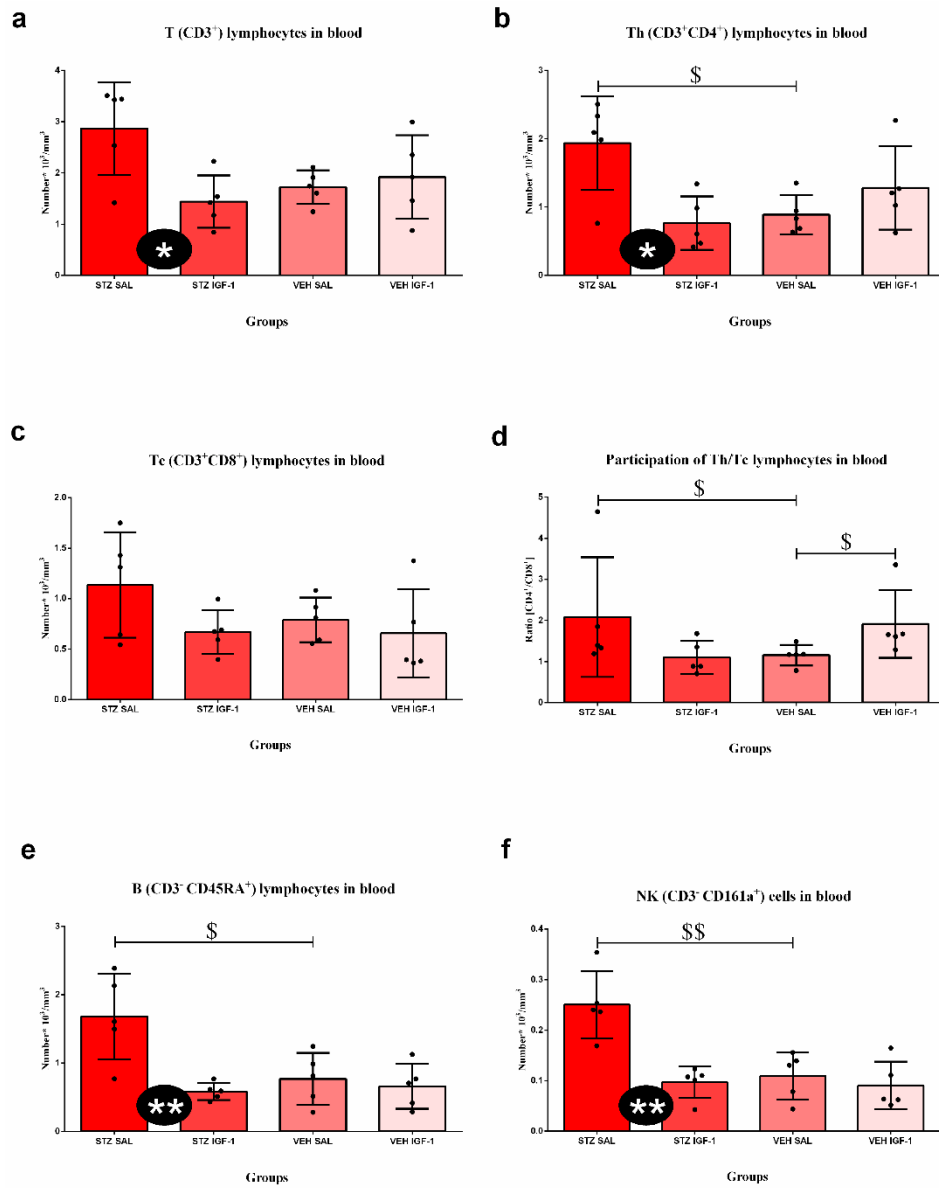
Explanations: \*  $p < 0.05$  indicates significance of differences between STZ SAL and STZ IGF-1, \$— $p < 0.05$  indicates significance of differences to VEH SAL, <sup>^</sup>— $p < 0.05$  indicates significance of differences between STZ IGF-1 and VEH IGF-1, &— $p < 0.05$  indicates significance of differences between early and late stage of disease progression.

#### 3.4. Peripheral Blood and Spleen Lymphocytes and Their Subpopulations' Numbers and Percentages

At the late stage of sAD (Figure 5), the number of T CD3<sup>+</sup>, Th CD4<sup>+</sup>, B CD45RA<sup>+</sup>, and NK cell CD161a<sup>+</sup> was lower in STZ IGF-1 animals than in the STZ SAL rodents ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.01$ , respectively). Moreover, the VEH SAL group had a lower number of T helper lymphocytes than STZ SAL rats ( $p < 0.05$ ), a lower ratio of Th/Tc cells than STZ SAL ( $p < 0.05$ ) and VEH IGF-1 ( $p < 0.05$ ) animals, and a lower number of B lymphocytes and NK cells than STZ SAL ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , respectively) group.

Table 4a shows the percentage of lymphocytes' subpopulations in the blood. There were no significant differences in the percentages of T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells among groups. The percentage of Th lymphocytes was higher in the VEH IGF-1 group than in VEH SAL animals ( $p < 0.05$ ). In addition, the percentage of Tc lymphocytes was higher in STZ IGF-1 rats than in STZ SAL rodents ( $p < 0.05$ ).

Table 4b shows the percentages of T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells in the spleen. The percentage of T lymphocytes was higher in STZ IGF-1 animals than in STZ SAL ( $p < 0.05$ ) and VEH SAL rats ( $p < 0.01$ ). Moreover, the percentage of these cells was also higher in the VEH IGF-1 group than in the VEH SAL group ( $p < 0.01$ ). The percentages of B lymphocytes and NK cells in STZ IGF-1 rodents were higher than in STZ SAL (in both comparisons,  $p < 0.05$ ) and VEH SAL animals (in both comparisons,  $p < 0.01$ ). In addition, the percentage of these cells was higher in the VEH IGF-1 group than in VEH SAL rats (in both comparisons,  $p < 0.05$ ).



**Figure 5.** The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment on the number of T CD3<sup>+</sup> (a), Th CD4<sup>+</sup> (b), Tc CD8<sup>+</sup> (c), B CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes (e), NK cell CD161a<sup>+</sup> (f), and ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> lymphocytes (d) at the late stage after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1) in the peripheral blood. Data are presented as mean ± SD and were analyzed using the Mann–Whitney U test. Explanations: \* in a black circle—*p* < 0.05, \*\* in a black circle—*p* < 0.01, indicating the significance of differences between the STZ SAL and STZ IGF-1 groups; \$ above the lines—*p* < 0.05, \$\$ above the lines—*p* < 0.01, indicating the significance of differences to the VEH SAL group.

**Table 4.** The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment on the percentages of T CD3<sup>+</sup>, Th CD4<sup>+</sup>, Tc CD8<sup>+</sup>, B CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes, and NK cell CD161a<sup>+</sup> in the blood (a); T CD3<sup>+</sup>, B CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes, and NK cell CD161a<sup>+</sup> in the spleen (b). The relative weight of the spleen and thymus (c) at the late stage after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1).

Group	Percentage of Blood T (CD3 <sup>+</sup> ) Lymphocytes [%]	Percentage of Blood Th (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) Lymphocytes [%]	Percentage of Blood Tc (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ) Lymphocytes [%]	Percentage of Blood B (CD45RA <sup>+</sup> ) Lymphocytes [%]	Percentage of Blood NK (CD161a <sup>+</sup> ) Cells [%]
	a. STZ SAL	35.81 ± 5.97	23.88 ± 5.58	14.12 ± 4.42	20.47 ± 1.61
STZ IGF-1	41.19 ± 8.35	21.99 ± 9.12	19.15 ± 3.05 *	17.35 ± 3.76	2.96 ± 1.28
VEH SAL	37.60 ± 4.01	17.28 ± 3.38	16.95 ± 5.83	13.80 ± 5.89	2.17 ± 0.94
VEH IGF-1	34.28 ± 7.27	28.74 ± 9.51 <sup>§</sup>	13.84 ± 5.05	14.66 ± 5.32	2.11 ± 0.95
Group	Percentage of Spleen T (CD3 <sup>+</sup> ) Lymphocytes [%]	Percentage of Spleen B (CD45RA <sup>+</sup> ) Lymphocytes [%]	Percentage of Spleen NK (CD161a <sup>+</sup> ) cells [%]		
	b. STZ SAL	22.70 ± 10.76	8.96 ± 3.88	2.29 ± 1.06	
STZ IGF-1	43.59 ± 10.55 * <sup>§§</sup>	18.58 ± 3.88 * <sup>§§</sup>	4.91 ± 1.51 * <sup>§§</sup>		
VEH SAL	16.82 ± 2.97	11.12 ± 1.39	1.42 ± 0.64		
VEH IGF-1	39.34 ± 15.33 <sup>§§</sup>	14.54 ± 2.66 <sup>§</sup>	3.64 ± 1.66 <sup>§</sup>		
Group	Relative Weight of Spleen (mg/kg b.w.)		Relative Weight of Thymus (mg/kg b.w.)		
	c. STZ SAL	178.07 ± 23.40		55.69 ± 12.42 <sup>§</sup>	
STZ IGF-1	187.56 ± 25.46		52.56 ± 14.91		
VEH SAL	175.35 ± 20.16		43.15 ± 10.58		
VEH IGF-1	180.60 ± 9.93		44.97 ± 12.97		

Explanations: \*— $p < 0.05$ , indicating the significance of differences between the STZ SAL and STZ IGF-1 groups; <sup>§</sup>— $p < 0.05$ , <sup>§§</sup>— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences to the VEH SAL group.

### 3.5. Relative Weights of the Spleen and Thymus

The relative weights of the spleen and thymus at the late phase of sAD progression are shown in Table 4c. There is no statistical difference in the relative weight of the spleen between the groups, but the relative weight of the thymus was higher in the STZ SAL group than in VEH SAL ( $p < 0.05$ ) rats.

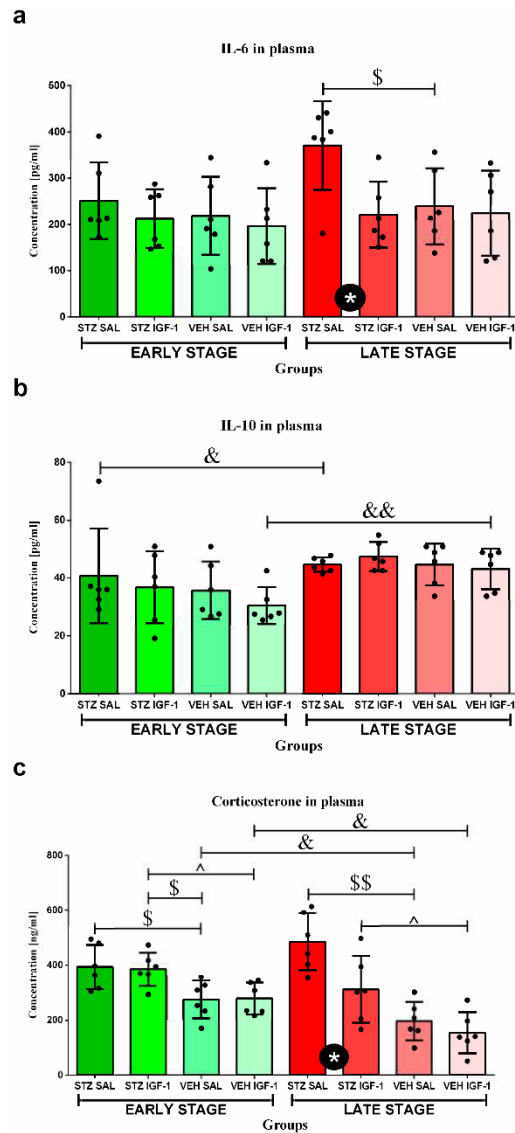
### 3.6. Hematological Parameters

The results of hematological parameters, along with their descriptions, are presented in Table S3.

### 3.7. The Concentrations of Interleukin 6 (IL-6) and Interleukin 10 (IL-10) in Plasma

The concentration of IL-6 (Figure 6a) in the STZ SAL group was higher than in STZ IGF-1 and VEH SAL animals (in both comparisons,  $p < 0.05$ ) at the late phase.

The concentration of IL-10 (Figure 6b) in the STZ SAL ( $p < 0.05$ ) and VEH IGF-1 ( $p < 0.01$ ) groups was higher at the late stage than at the early phase of sAD progression.



**Figure 6.** The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment and time (stage) on the concentrations of interleukin-6 (IL-6) (a), interleukin-10 (IL-10) (b), and corticosterone (CORT) (c) at the early and late stages after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1) in plasma. Data are presented as mean  $\pm$  SD and were analyzed using the Mann–Whitney U test. Explanations: \* in a black circle— $p < 0.05$ , indicating the significance of differences between STZ SAL and STZ IGF-1; \$ above the lines— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences to the VEH SAL group; ^ above the lines— $p < 0.05$ , indicating the significance of differences between the STZ IGF-1 and VEH IGF-1 groups; and &— $p < 0.05$ , &&— $p < 0.01$ , indicating the significance of differences between the early and late stages of disease progression.

### 3.8. Determination of Plasma Corticosterone (CORT) Concentration

The concentration of corticosterone (CORT) in plasma (Figure 6c) was higher in STZ SAL and STZ IGF-1 rats than in the VEH SAL group (in both comparisons,  $p < 0.05$ ) at the early stage. Moreover, at that phase, the CORT concentration was higher in STZ IGF-1 rats compared to animals from the VEH IGF-1 group ( $p < 0.05$ ). At the late stage, STZ SAL rodents had higher concentrations of CORT than the STZ IGF-1 ( $p < 0.05$ ) and VEH SAL ( $p < 0.01$ ) groups. Moreover, the STZ IGF-1 group had higher CORT concentrations than VEH IGF-1 rats ( $p < 0.05$ ). At that phase, the CORT concentrations were lower in VEH SAL and VEH IGF-1 rats than at the early phase of sAD progression (in both comparisons,  $p < 0.05$ ).

## 4. Discussion

To the best of our knowledge, the results of our research demonstrate for the first time that ICVIGF-1 injections (total dose: 2  $\mu\text{g}$ , administered twice, on days 1 and 3, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ventricle}/\text{injection}$ ), simultaneously with the induction of the sporadic AD model by ICVSTZ injections (total dose: 3  $\text{mg}/\text{kg}$ , administered twice, on days 2 and 4, 0.75  $\text{mg}/\text{kg}/\text{ventricle}/\text{injection}$ ), reduce the anhedonia and anxiety levels in the streptozotocin-induced sAD model. These positive effects were associated with a reduction in the peripheral inflammation state. Our data highlight that IGF-1 pretreatment in a STZ-induced model of sAD influences peripheral inflammation and corticosterone concentration, and can be a new therapeutic approach to treating anxiogenic/depressive behavior.

Neuropsychiatric symptoms, including apathy, depression, and anxiety, have been linked with cerebral  $\text{A}\beta$  deposition, neuronal loss, cognitive decline [45,46], and inflammation [47] in AD patients. The associations between anxiety and regional  $\text{A}\beta$  in the cingulate, prefrontal, and parietal cortices (which partly overlap with regions involved in  $\text{A}\beta$  accumulation in the very early stages of AD) were documented by Palmqvist et al. [48] and Johansson et al. [46]. Anhedonia and apathy levels are elevated in individuals with late-stage AD, and these symptoms have been associated with metabolic changes in the anterior cingulate cortex and other frontal regions [49,50], as well as the hippocampus, nucleus accumbens, thalamus, and putamen [46]. In our previous study, we showed that ICVIGF-1 administration in a rat STZ-induced model of AD reduced amyloid  $\beta$  ( $\text{A}\beta_{40-42}$ ) aggregation in the hippocampus. Our study proved a reduction in protein aggregation in the CA1 region of the hippocampus, prefrontal cortex, and nucleus accumbens (NAc) after IGF-1 premedication in a late STZ-induced rat model of AD [36]. In addition, a reduction in the number of  $\text{CD}68^+$  cells in the hippocampus was noted 90 days after ICVIGF-1 injection in a STZ-induced rat model of AD [36]. The  $\text{CD}68^+$  marker of cell activation is a lysosomal glycoprotein associated with increased phagocytic activity [51]. In a post mortem study of AD patients,  $\text{CD}68^+$  expression was strongly related to neuritic plaques and tangles, as well as the dementia score [52]. Taken together, the  $\text{CD}68^+$  marker of microglial phagocytic activation is present in brain tissue during the late phase of AD, when anhedonia and anxiety are observed [53,54]. Furthermore, our previous research [20] on an ICVSTZ sAD model showed that anxiety disorders, which were measured as less time spent in the open arms and the center of elevated plus maze (EPM) and more time spent in the closed arms of the maze, developed at different sAD stages. The progressive increase in anxiety levels induced by ICV-STZ administration in rats has also been reported by other groups [55,56], and such a change promotes the development of depressive behavior [57]. Therefore, in order to investigate the effect of ICVIGF-1 administration on depressive and anxiety behavior in the sAD model, we conducted two behavioral tests: the sucrose preference (SPT) test and EPM at three different stages of sAD progression. Our experiment showed that IGF-1 reduces anhedonia levels at the early (45 days after injection) and late (90 days after

injection) stages of sAD in the SP test, as indicated by increased sucrose intake. Moreover, central IGF-1 administration decreased anxiety levels in the EPM, demonstrated as more time spent in the open arms and the center of the maze at 7 and 90 days after injection concomitantly with a higher number of entrances to the open arms of maze at the early stage of sAD. Other researchers have found similar results related to a reduction in depressive behavior mediated via increased IGF-1 acting at the IGF-1 receptor. Basta-Kaim et al. [35] showed that adult rats that were prenatally stressed exhibited depressive behavior in the forced-swim test, which was associated with reduced IGF-1 levels in the hippocampus and frontal cortex, while IGF-1 reversed this depressive disorder through influencing the IGF-1 receptor. Other authors demonstrated that IGF-1 led to the facilitation of fear extinction memory consolidation, pointing to IGF-1 as a key regulator of anxiety and its potential role as a novel therapeutic target for the treatment of anxiety [58]. In addition, other studies demonstrated that increasing the central level of IGF-1 by ICV injections of its binding protein inhibitor produced anxiolytic-like and antidepressant-like behavioral effects in the mouse *in vivo*, similar to IGF-1 administration [39].

The positive effects of ICVIGF-1 administration associated with the reduction in behavioral disorders related to anhedonia and anxiety observed in the present work are connected with decreased inflammation in the body. Our previous study showed that ICVIGF-1 injection reduced STZ-induced neuroinflammation, decreasing the number of microglia CD68<sup>+</sup> cells and  $\beta$ -amyloid plaques in the hippocampus and thus improving spatial memory deficits [36]. The present results suggest that the improvements in spatial memory observed after ICVIGF-1 administration in the sAD model may also be attributed to IGF-1-induced reductions in anhedonia and anxiety and peripheral anti-inflammatory effects. Another study demonstrated that central injections of IGF-1 in a rat model of stroke had a protective effect on the brain–blood barrier (BBB), which prevented the development of neuroinflammation [59]. Current research has shown that IGF-1 also reduces peripheral inflammation, especially at the late stage of sAD progression. It was manifested by the reduced number of leukocytes, lymphocytes, T lymphocytes, Th lymphocytes, NK cells, B lymphocytes, monocytes, and granulocytes, as well as lower IL-6 concentrations in plasma. In AD subjects, IGF-1 signaling disorders were found [60], as in dwarf animals, in which IGF-1 administration decreased the total number of leukocytes and T lymphocytes [61]. In addition, we observed elevated corticosterone concentration at the early sAD stage, which decreased in the late phase of disease progression. This suggests the involvement of the HPA axis in reducing peripheral inflammation. In our opinion, increased levels of corticosterone, which has anti-inflammatory properties, early in the disease progression, combined with the administration of IGF-1, which also has anti-inflammatory properties, resulted in a decrease in the numbers of various leukocyte subpopulations late in the disease progression. We assume that this effect was only noticed at the late phase (90 days after ICVSTZ injection), because at the very early stage of the disease development (7 days after ICVSTZ injection) the corticosterone concentration was not high enough to induce an immunosuppressive effect. However, this hypothesis should at least be tested by measuring the corticosterone concentration at the very early phase. Two to four weeks after the peripheral administration of STZ in rats, an increased concentration of corticosterone was observed compared to healthy animals, yet its lowest concentration was recorded in week 3 in STZ-treated rodents [62]. This suggests that the concentration of this hormone is not high enough to trigger a sufficiently strong immunosuppressive reaction in the body during the first period of disease. On the other hand, we observed an increase in the percentage of T cytotoxic (CD8<sup>+</sup>) lymphocytes in the blood at the late stage of sAD. It is worth noting that IGF-1 plays a crucial role in thymopoiesis, the process of T cell development in the thymus [63]. When IGF-1 is administered in mice, it leads to an increase in the percent-

age of naive TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> lymphocytes in the periphery [64]. This suggests that IGF-1 enhances the thymic output of mature T cells. In addition, in the ICVIGF-1- and ICVSTZ-treated rats, the relative mass of the thymus was lower (statistically unconfirmed) than in rats with the sAD model, which may be an effect of T lymphocytes release to the peripheral blood. However, infiltrating TCD8<sup>+</sup> lymphocytes triggered microglia activation and promoted behavioral deficits in the APP-PS1 transgenic mice [65]; therefore, the elevated level of TCD8<sup>+</sup> lymphocytes in the peripheral blood may be the result of lymphocyte retention and improved BBB integrity. Some evidence in a rat model of ischemia supports this thesis. Bake et al. [66,67] showed that IGF-1 reduced the trafficking of immune cells to the ischemic site and promoted barrier function by increasing anchorage and stabilizing the cell geometry of surviving endothelial cells. In our study, we observed that IGF-1 decreased plasma IL-6 concentrations in our model of AD at the late stage of disease progression. In contrast, other studies, using a rat stroke model, demonstrated that 5 days after the model induction, ICVIGF-1 increased IL-6 plasma concentration, but the intraperitoneal injection of IGF-1 reduced this concentration [68]. This suggests that the anti-inflammatory effects of IGF-1, understood as a reduction in the concentration of pro-inflammatory cytokines, administered centrally occur via an additional mechanism (indirectly). It is obvious that this mechanism involves a reduction in the number of lymphocytes producing these cytokines.

Other authors observed an increase in the weight of the spleen and thymus, as well as the number of T, B, TCD4<sup>+</sup>, and TCD8<sup>+</sup> cells in the spleen after IGF-1 administration [69]. Our research has shown that ICVIGF-1 injection increases the percentage of T and B lymphocytes, as well as NK cells in the spleen and also the relative spleen weight (statistically unconfirmed). This suggests that IGF-1 promotes the migration of immune cells from the periphery to the splenic pool, where they can be phagocytosed or await release in the event of the need for an increased immune response. However, the mechanism of IGF-1 effect on peripheral inflammation in AD requires further investigation, because this neurotrophin can strengthen the immune response even through the activation of the proliferation of T regulatory cells [70].

Moreover, the reduced activity of the HPA axis observed at the late stage of sAD may be the cause of the reduction in depressive-like behavior at this stage. Although the direct effects of IGF-1 on the HPA axis are currently unknown, it is worth noting that corticosterone and IGF-1 can carry out their activities through the same pathway. Studies on the model of chronic unpredictable stress have shown that IGF-1 exerts its anti-inflammatory effect by activating the PI3K/Akt/FoxO3 pathway [71], and a component of this pathway, PI3K/Akt, is responsible for antidepressant effects [72]. Corticosterone inhibits this pathway, and thus induces the cell death of hippocampal neurons, while IGF-1 administration eliminates this effect. This suggests that restoring normal HPA axis activity and, consequently, reduced plasma corticosterone levels are neuroprotective in an Alzheimer's disease model.

A primary limitation of our study is the absence of direct assessments verifying that the ICVIGF-1 pretreatment modulates brain glucose metabolism and counteracts the effects induced by STZ administration. Nonetheless, multiple previous studies describing the properties of IGF-1 (for a review, see [73]) support the assumption that a similar mechanism may have been active under our experimental conditions. Furthermore, the impact of sex differences on the prevalence of sAD and differences in the immune response between female and male rats, as well as behavior and inflammatory outcomes over a longer period of time, e.g., 6 months after ICV injections of IGF-1 and STZ, should be investigated in future studies. However, our current results clearly indicate positive effects of this neurotrophin on a sAD model and provide a solid basis for the development of effective treatments of depression and anxiety associated with AD in humans.

## 5. Conclusions

Our results show that ICV injections of IGF-1 (total dose: 2 µg) reduce the anxiety and anhedonia disturbances in an ICVSTZ model of sporadic Alzheimer's disease in rats. IGF-1 induced beneficial behavioral changes by reducing peripheral inflammation (a decreased number of leukocytes, lymphocytes, T lymphocytes, Th lymphocytes, monocytes, and granulocytes in the peripheral blood; reduced IL-6 concentration in plasma) and reduced the HPA axis response (reduced corticosterone concentration in plasma) at the late stage (90 days after ICVSTZ administration) of sAD progression. This suggests that IGF-1, through its anti-inflammatory, anti-anxiety, and antidepressant properties, may be a novel therapeutic agent for the treatment of neuropsychiatric disorders in sAD. However, further research is necessary that takes into consideration additional variables, such as the longer development of the disease or the sex of the individuals.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells14151189/s1>, Figure S1. Photograph of microscopic slide showing a Nissl-stained section of a brain of a representative rat. The asterisk indicates the area where the injection needle was inserted into the lateral ventricle. Images were obtained using a Stemi 508 Zeiss microscope equipped with imaging software (Zen 3.5—blue edition) at a magnification of 0.5 × 0.65. Table S1. The results obtained from the Levene test. Table S2. The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment and time (stage) on the behavioral activity associated with anxiety, presented as the entrances to the open arms, center, and closed arms, and the number of miction and defecation in the elevated plus maze (EPM) at the baseline conditions, at the very early, early, and late stages after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1). Table S3. The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment and time (stage) on the number of red blood cells (RBCs), hemoglobin concentration (HGB), mean hemoglobin concentration in the red blood cells (MCHC), mean mass of the hemoglobin in the red blood cells (MCH), mean corpuscular volume (MCV), hematocrit (HCT), and red cell distribution width (RDW) (a); the number of platelets (PLTs), mean platelet volume (MPV), and plateletcrit (PCT) (b) at the early and late stages after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), and citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1) in the peripheral blood.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.D. and D.W.; methodology, J.D., B.G., and D.W.; validation, J.D., and D.W.; formal analysis, J.D. and D.W.; investigation, J.D. and D.W.; resources, J.D. and D.W.; data curation, J.D. and D.W.; writing—original draft preparation, J.D.; writing—review and editing, D.W.; visualization, J.D.; supervision, D.W.; project administration, D.W.; funding acquisition, J.D. and D.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was partly funded by Statutory Activities of the Department of Animal and Human Physiology of the University of Gdansk (531-D080-D248-24 and 531-D080-D248-25).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Local Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals at the University of Technology in Bydgoszcz, Poland (number 60/2017, 14 December 2017).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article and Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Biotechnie for the gift of IGF-1, Grzegorz Świątek for technical support with behavioral testing, Wojciech Glac for support with performing flow cytometry, and Emilia Leszkowicz for her help with the proofreading.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. Moreover, the providers of the IGF-1 gift had no role in the design of the experiment, data collection, analysis of the results or interpretation of the data, writing the article, or the decision to publish the results.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

IGF-1	Insulin-like growth factor-1
AD	Alzheimer’s disease
sAD	Sporadic Alzheimer’s disease
STZ	Streptozotocin
VEH	Vehicle
SAL	Saline
ICV	Intracerebroventricular injection
VES	Very early state of sAD progression
ES	Early state of sAD progression
LS	Late state of sAD progression
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-17	Interleukin 17
EPM	Elevated plus maze
SPT	Sucrose preference test
GC	Glicocorticoid
BBB	Brain–blood barrier
ROS	Reactive oxygen species
CORT	Corticosterone
Th	T helper lymphocytes
Tc	T cytotoxic lymphocytes
A $\beta$	Beta amyloid
IRBS	Insulin-resistant brain state
HPA axis	Hypothalamic–pituitary–adrenal axis
PBS	Phosphate-buffered saline
RBC	Red blood cell
HGB	Hemoglobin concentration
MCHC	Mean hemoglobin concentration in the red blood cells
MCH	Mean mass of the hemoglobin in the red blood cells
MCV	Mean corpuscular volume
HCT	Hematocrit
RDW	Red cell distribution width
PLT	Platelet
MPV	Mean platelet volume
PCT	Plateletcrit

## References

1. Zhang, J.; Zhang, Y.; Wang, J.; Xia, Y.; Zhang, J.; Chen, L. Recent advances in Alzheimer’s disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 211. [\[CrossRef\]](#)
2. Rabinovici, G.D. Late-onset Alzheimer Disease. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **2019**, *25*, 14–33. [\[CrossRef\]](#)
3. Correia, S.C.; Santos, R.X.; Perry, G.; Zhu, X.; Moreira, P.L.; Smith, M.A. Insulin-resistant brain state: The culprit in sporadic Alzheimer’s disease? *Ageing Res. Rev.* **2011**, *10*, 264–273. [\[CrossRef\]](#)
4. Buccellato, F.R.; D’Anca, M.; Serpente, M.; Arighi, A.; Galimberti, D. The role of glymphatic system in Alzheimer’s and Parkinson’s disease pathogenesis. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2261. [\[CrossRef\]](#)
5. Huang, W.J.; Zhang, X.; Chen, W.W. Role of oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Biomed. Rep.* **2016**, *4*, 519–522. [\[CrossRef\]](#)
6. Balin, B.J.; Hudson, A.P. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer’s disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2014**, *14*, 417. [\[CrossRef\]](#)

7. Mravec, B.; Horvathova, L.; Padova, A. Brain under stress and Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2018**, *38*, 73–84. [[CrossRef](#)]
8. Armstrong, R.A. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* **2019**, *57*, 87–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Bruno, F.; Abondio, P.; Bruno, R.; Ceraudo, L.; Paparazzo, E.; Citrigno, L.; Luiselli, D.; Bruni, A.C.; Passarino, G.; Colao, R.; et al. Alzheimer's disease as a viral disease: Revisiting the infectious hypothesis. *Ageing Res. Rev.* **2023**, *91*, 102068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Yuan, Y.; Zhao, G.; Zhao, Y. Dysregulation of energy metabolism in Alzheimer's disease. *J. Neurol.* **2024**, *272*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Sharan, P.; Vellapandian, C. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis: Unveiling the potential mechanisms involved in stress-induced Alzheimer's disease and depression. *Cureus* **2024**, *16*, e67595. [[CrossRef](#)]
12. Passeri, E.; Elkhoury, K.; Morsink, M.; Broersen, K.; Linder, M.; Tamayol, A.; Malaplate, C.; Yen, F.T.; Arab-Tehrany, E. Alzheimer's disease: Treatment strategies and their limitations. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13954. [[CrossRef](#)]
13. Vitek, G.E.; Decourt, B.; Sabbagh, M.N. Lecanemab (BAN2401): An anti-beta-amyloid monoclonal antibody for the treatment of Alzheimer disease. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2023**, *32*, 89–94. [[CrossRef](#)]
14. Kamat, P.K.; Kalani, A.; Rai, S.; Tota, S.K.; Kumar, A.; Ahmad, A.S. Streptozotocin intracerebroventricular-induced neurotoxicity and brain insulin resistance: A therapeutic intervention for treatment of sporadic Alzheimer's disease (sAD)-like pathology. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 4548–4562. [[CrossRef](#)]
15. Titisari, N.; Ahmad, H.; Samsulrizal, N.; Fauzi, A.; Abdul Razak, I.S. The mechanism underlying streptozotocin injection for the development of a nontransgenic Alzheimer's disease animal model. *Open Vet. J.* **2025**, *15*, 594–600. [[CrossRef](#)]
16. Salkovic-Petrisic, M.; Hoyer, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: An experimental approach. *J. Neural. Transm. Suppl.* **2007**, *72*, 217–233. [[CrossRef](#)]
17. Mehla, J.; Pahuja, M.; Gupta, Y.K. Streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: Selection of appropriate dose. *J. Alzheimer Dis.* **2013**, *33*, 17–21. [[CrossRef](#)]
18. Majkutewicz, I.; Kurowska, E.; Podlacha, M.; Myślińska, D.; Grembecka, B.; Ruciński, J.; Plucińska, K.; Jerzemowska, G.; Wrona, D. Dimethyl fumarate attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory impairment and hippocampal neurodegeneration in rats. *Behav. Brain Res.* **2016**, *308*, 24–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Majkutewicz, I.; Kurowska, E.; Podlacha, M.; Myślińska, D.; Grembecka, B.; Ruciński, J.; Pierzynowska, K.; Wrona, D. Age-dependent effects of dimethyl fumarate on cognitive and neuropathological features in the streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* **2018**, *1686*, 19–33. [[CrossRef](#)]
20. Dunacka, J.; Świątek, G.; Wrona, D. High behavioral reactivity to novelty as a susceptibility factor for memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation as a rat model of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 11562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Naghibi, S.; Shariatzadeh Joneydi, M.; Barzegari, A.; Davoodabadi, A.; Ebrahimi, A.; Eghdami, E.; Fahimpour, N.; Ghorbani, M.; Mohammadikia, E.; Rostami, M.; et al. Treadmill exercise sex-dependently alters susceptibility to depression-like behaviour, cytokines and BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiol. Behav.* **2021**, *241*, 113595. [[CrossRef](#)]
22. Knezovic, A.; Osmanovic-Barilar, J.; Curlin, M.; Hof, P.R.; Simic, G.; Riederer, P.; Salkovic-Petrisic, M. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **2015**, *122*, 577–592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Spiers, J.G.; Chen, H.J.; Sernia, C.; Lavidis, N.A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Front. Neurosci.* **2015**, *8*, 456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rocamora-Reverte, L.; Villunger, A.; Wieggers, G.J. Cell-Specific Immune regulation by glucocorticoids in murine models of infection and inflammation. *Cells* **2022**, *11*, 2126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cruz-Topete, D.; Cidlowski, J.A. One hormone, two actions: Anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* **2015**, *22*, 20–32. [[CrossRef](#)]
26. Vyas, S.; Rodrigues, A.J.; Silva, J.M.; Tronche, F.; Almeida, O.F.; Sousa, N.; Sotiropoulos, I. Chronic stress and glucocorticoids: From neuronal plasticity to neurodegeneration. *Neural Plast.* **2016**, *2016*, 6391686. [[CrossRef](#)]
27. Hu, P.; Lu, Y.; Pan, B.X.; Zhang, W.H. New insights into the pivotal role of the amygdala in inflammation-related depression and anxiety disorder. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11076. [[CrossRef](#)]
28. Zhang, Q.; Yang, G.; Luo, Y.; Jiang, L.; Chi, H.; Tian, G. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Insights from peripheral immune cells. *Immun. Ageing* **2024**, *21*, 38. [[CrossRef](#)]
29. Guo, B.; Zhang, M.; Hao, W.; Wang, Y.; Zhang, T.; Liu, C. Neuroinflammation mechanisms of neuromodulation therapies for anxiety and depression. *Transl. Psychiatry* **2023**, *13*, 5. [[CrossRef](#)]
30. Labandeira-Garcia, J.L.; Costa-Besada, M.A.; Labandeira, C.M.; Villar-Cheda, B.; Rodríguez-Pérez, A. Insulin-like growth factor-1 and neuroinflammation. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 365. [[CrossRef](#)]

31. Gray, S.C.; Kinghorn, K.J.; Woodling, N.S. Shifting equilibriums in Alzheimer's disease: The complex roles of microglia in neuroinflammation, neuronal survival and neurogenesis. *Neural Regen. Res.* **2020**, *15*, 1208–1219. [[CrossRef](#)]
32. Carlson, S.W.; Saatman, K.E. Central infusion of insulin-like growth factor-1 increases hippocampal neurogenesis and improves neurobehavioral function after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* **2018**, *35*, 1467–1480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lackey, B.R.; Gray, S.L.; Henricks, D.M. Actions and interactions of the IGF system in Alzheimer's disease: Review and hypotheses. *Growth Horm. IGF Res.* **2000**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)]
34. Herrera, M.L.; Camparini, L.G.; Oliveros, A.L.; Bellini, M.J.; Herenu, C.B. Potentialities of IGF-1 for regulating oxidative stress in neuroinflammation and neurodegeneration: Theoretical review. *Explor. Neuroprot. Ther.* **2024**, *4*, 442–458. [[CrossRef](#)]
35. Basta-Kaim, A.; Szczesny, E.; Glombik, K.; Stachowicz, K.; Slusarczyk, J.; Nalepa, I.; Zelek-Molik, A.; Rafa-Zablocka, K.; Budziszewska, B.; Kubera, M.; et al. Prenatal stress affects insulin-like growth factor-1 (IGF-1) level and IGF-1 receptor phosphorylation in the brain of adult rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2014**, *24*, 1546–1556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Dunacka, J.; Grembecka, B.; Majkutewicz, I.; Wrona, D. Central insulin-like growth factor-1 treatment enhances working and reference memory by reducing neuroinflammation and amyloid beta deposition in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals* **2025**, *18*, 527. [[CrossRef](#)]
37. Westwood, A.J.; Beiser, A.; Decarli, C.; Harris, T.B.; Chen, T.C.; He, X.M.; Roubenoff, R.; Pikula, A.; Au, R.; Braverman, L.E.; et al. Insulin-like growth factor-1 and risk of Alzheimer dementia and brain atrophy. *Neurology* **2014**, *82*, 1613–1619. [[CrossRef](#)]
38. Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2007; ISBN 978-0-0804-7515-8.
39. Malberg, J.E.; Platt, B.; Rizzo, S.J.; Ring, R.H.; Lucki, I.; Schechter, L.E.; Rosenzweig-Lipson, S. Increasing the levels of insulin-like growth factor-I by an IGF binding protein inhibitor produces anxiolytic and antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *11*, 2360–2368. [[CrossRef](#)]
40. Berry, A.; Bellisario, V.; Capoccia, S.; Tirassa, P.; Calza, A.; Alleva, E.; Cirulli, F. Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 762–772. [[CrossRef](#)]
41. Fonseca-Rodrigues, D.; Gonçalves, J.; Laranjeira, I.; Almeida, A.; Pinto-Ribeiro, F. Sucrose intake and preference by Wistar Han rats are not influenced by sex or food/water deprivation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2022**, *216*, 73387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Podlacha, M.; Glac, W.; Listowska, M.; Grembecka, B.; Majkutewicz, I.; Myślińska, D.; Plucińska, K.; Jerzemowska, G.; Grzybowska, M.; Wrona, D. Medial septal NMDA glutamate Receptors are involved in modulation of blood natural killer cell activity in rats. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2016**, *11*, 121–132. [[CrossRef](#)]
43. Wrona, D.; Majkutewicz, I.; Świątek, G.; Dunacka, J.; Grembecka, B.; Glac, W. Dimethyl fumarate as the peripheral blood inflammatory mediators inhibitor in prevention of streptozotocin-induced neuroinflammation in aged rats. *J. Inflamm. Res.* **2022**, *15*, 33–52. [[CrossRef](#)]
44. Listowska, M.; Glac, W.; Grembecka, B.; Grzybowska, M.; Wrona, D. Change in blood CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in stressed rats pretreated chronically with desipramine are more pronounced after chronic open field stress challenge. *J. Neuroimmunol.* **2015**, *282*, 54–62. [[CrossRef](#)]
45. Jack, C.R., Jr.; Bennett, D.A.; Blennow, K.; Carrillo, M.C.; Dunn, B.; Haeberlein, S.B.; Holtzman, D.M.; Jagust, W.; Jessen, F.; Karlawick, J.; et al. NIA-AA research framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2018**, *14*, 535–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Johansson, M.; Stomrud, E.; Lindberg, O.; Westman, E.; Johansson, P.M.; van Westen, D.; Mattsson, N.; Hansson, O. Apathy and anxiety are early markers of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2020**, *85*, 74–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Swann, P.; Mirza-Davies, A.; O'Brien, J. Associations between neuropsychiatric symptoms and inflammation in neurodegenerative dementia: A systematic review. *J. Inflamm. Res.* **2024**, *17*, 6113–6141. [[CrossRef](#)]
48. Palmqvist, S.; Schöll, M.; Strandberg, O.; Mattsson, N.; Stomrud, E.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Landau, S.; Jagust, W.; Hansson, O. Earliest accumulation of  $\beta$ -amyloid occurs within the default-mode network and concurrently affects brain connectivity. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1214. [[CrossRef](#)]
49. Rosenberg, P.B.; Nowrangi, M.A.; Lyketsos, C.G. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: What might be associated brain circuits? *Mol. Asp. Med.* **2015**, *43–44*, 25–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Theleritis, C.; Politis, A.; Siarkos, K.; Lyketsos, C.G. A review of neuroimaging findings of apathy in Alzheimer's disease. *Int. Psychogeriatr.* **2014**, *26*, 195–207. [[CrossRef](#)]
51. Hopperton, K.E.; Mohammad, D.; Trépanier, M.O.; Giuliano, V.; Bazinet, R.P. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: A systematic review. *Mol. Psychiatry* **2018**, *23*, 177–198. [[CrossRef](#)]
52. Minett, T.; Classy, J.; Matthews, F.E.; Fahrenhold, M.; Taga, M.; Brayne, C.; Ince, P.G.; Nicoll, J.A.R.; Boche, D.; MRC CFAS. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 135. [[CrossRef](#)]

53. Lee, J.R.; Suh, S.W.; Han, J.W.; Byun, S.; Kwon, S.J.; Lee, K.H.; Kwak, K.P.; Kim, B.J.; Kim, S.G.; Kim, J.L.; et al. Anhedonia and dysphoria are differentially associated with the risk of dementia in the cognitively normal elderly individuals: A prospective cohort study. *Psychiatry Investig.* **2019**, *16*, 575–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Botto, R.; Callai, N.; Cermelli, A.; Causarano, L.; Rainero, I. Anxiety and depression in Alzheimer's disease: A systematic review of pathogenetic mechanisms and relation to cognitive decline. *Neurol. Sci.* **2022**, *43*, 4107–4124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Moreira-Silva, D.; Carrettiero, D.C.; Oliveira, A.S.A.; Rodrigues, S.; Dos Santos-Lopes, J.; Canas, P.M.; Cunha, R.A.; Almeida, M.C.; Ferreira, T.L. Anandamide effects in a streptozotocin-induced Alzheimer's disease-like sporadic dementia in rats. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 653. [[CrossRef](#)]
56. Roy, A.; Sharma, S.; Nag, T.C.; Katyal, J.; Gupta, Y.K.; Jain, S. Cognitive dysfunction and anxiety resulting from synaptic downscaling, hippocampal atrophy, and ventricular enlargement with intracerebroventricular streptozotocin injection in male Wistar rats. *Neurotox. Res.* **2022**, *40*, 2179–2202. [[CrossRef](#)]
57. Kleinridders, A.; Cai, W.; Cappellucci, L.; Ghazarian, A.; Collins, W.R.; Vienberg, S.G.; Pothos, E.N.; Kahn, C.R. Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 3463–3468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Maglio, L.E.; Noriega-Prieto, J.A.; Maroto, I.B.; Martín-Cortecero, J.; Muñoz-Callejas, A.; Callejo-Móstoles, M.; Fernández de Sevilla, D. IGF-1 facilitates extinction of conditioned fear. *eLife* **2021**, *10*, e67267. [[CrossRef](#)]
59. Bake, S.; Selvamani, A.; Cherry, J.; Sohrabji, F. Blood brain barrier and neuroinflammation are critical targets of IGF-1-mediated neuroprotection in stroke for middle-aged female rats. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91427. [[CrossRef](#)]
60. Galle, S.A.; Geraedts, I.K.; Deijen, J.B.; Milders, M.V.; Drent, M.L. The interrelationship between insulin-like growth factor 1, apolipoprotein E  $\epsilon$ 4, lifestyle factors, and the aging body and brain. *J. Prev. Alzheimers Dis.* **2020**, *7*, 265–273. [[CrossRef](#)]
61. Schurmann, A.; Spencer, G.S.; Berry, C.J.; Decuypere, E.; Goddeeris, B. Evidence for suppression of immune function by insulin-like growth factor-1 in dwarf rats in vivo. *Experientia* **1996**, *52*, 55–59. [[CrossRef](#)]
62. Shin, J.H.; Seong, J.K.; Yi, S.S. Sequential alterations of glucocorticoid receptors in the hippocampus of STZ-treated type 1 diabetic rats. *J. Vet. Sci.* **2014**, *15*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Savino, W.; Mendes-da-Cruz, D.A.; Lepletier, A.; Dardenne, M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 77–89. [[CrossRef](#)]
64. Chu, Y.W.; Schmitz, S.; Choudhury, B.; Telford, W.; Kapoor, V.; Garfield, S.; Howe, D.; Gress, R.E. Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. *Blood* **2008**, *112*, 2836–2846. [[CrossRef](#)]
65. Unger, M.S.; Li, E.; Scharnagl, L.; Poupardin, R.; Altendorfer, B.; Mrowetz, H.; Hutter-Paier, B.; Weiger, T.M.; Heneka, M.T.; Attems, J.; et al. CD8<sup>+</sup> T-cells infiltrate Alzheimer's disease brains and regulate neuronal- and synapse-related gene expression in APP-PS1 transgenic mice. *Brain Behav. Immun.* **2020**, *89*, 67–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Bake, S.; Okoreeh, A.K.; Alaniz, R.C.; Sohrabji, F. Insulin-like growth factor (IGF)-I modulates endothelial blood-brain barrier function in ischemic middle-aged female rats. *Endocrinology* **2016**, *157*, 61–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Bake, S.; Okoreeh, A.; Khosravian, H.; Sohrabji, F. Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 treatment stabilizes the microvascular cytoskeleton under ischemic conditions. *Exp. Neurol.* **2019**, *311*, 162–172. [[CrossRef](#)]
68. El-Hakim, Y.; Mani, K.K.; Pickle, K.A.; Akbari, Z.; Samiya, N.; Pham, C.; Salas, G.; Pilla, R.; Sohrabji, F. Peripheral, but not central, IGF-1 treatment attenuates stroke-induced cognitive impairment in middle-aged female Sprague Dawley rats: The gut as a therapeutic target. *Brain Behav. Immun.* **2024**, *122*, 150–166. [[CrossRef](#)]
69. Clark, R.; Strasser, J.; McCabe, S.; Robbins, K.; Jardieu, P. Insulin-like growth factor-1 stimulation of lymphopoiesis. *J. Clin. Investig.* **1993**, *92*, 540–548. [[CrossRef](#)]
70. Bilbao, D.; Luciani, L.; Johannesson, B.; Piszczek, A.; Rosenthal, N. Insulin-like growth factor-1 stimulates regulatory T cells and suppresses autoimmune disease. *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 1423–1435. [[CrossRef](#)]
71. Kuang, W.H.; Dong, Z.Q.; Tian, L.T.; Li, J. IGF-1 defends against chronic-stress induced depression in rat models of chronic unpredictable mild stress through the PI3K/Akt/FoxO3a pathway. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2018**, *34*, 370–376. [[CrossRef](#)]
72. Guo, N.; Wang, X.; Xu, M.; Bai, J.; Yu, H.; Zhang, L. PI3K/AKT signaling pathway: Molecular mechanisms and therapeutic potential in depression. *Pharmacol. Res.* **2024**, *206*, 107300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Arjunan, A.; Sah, D.K.; Woo, M.; Song, J. Identification of the molecular mechanism of insulin-like growth factor-1 (IGF-1): A promising therapeutic target for neurodegenerative diseases associated with metabolic syndrome. *Cell Biosci.* **2023**, *13*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

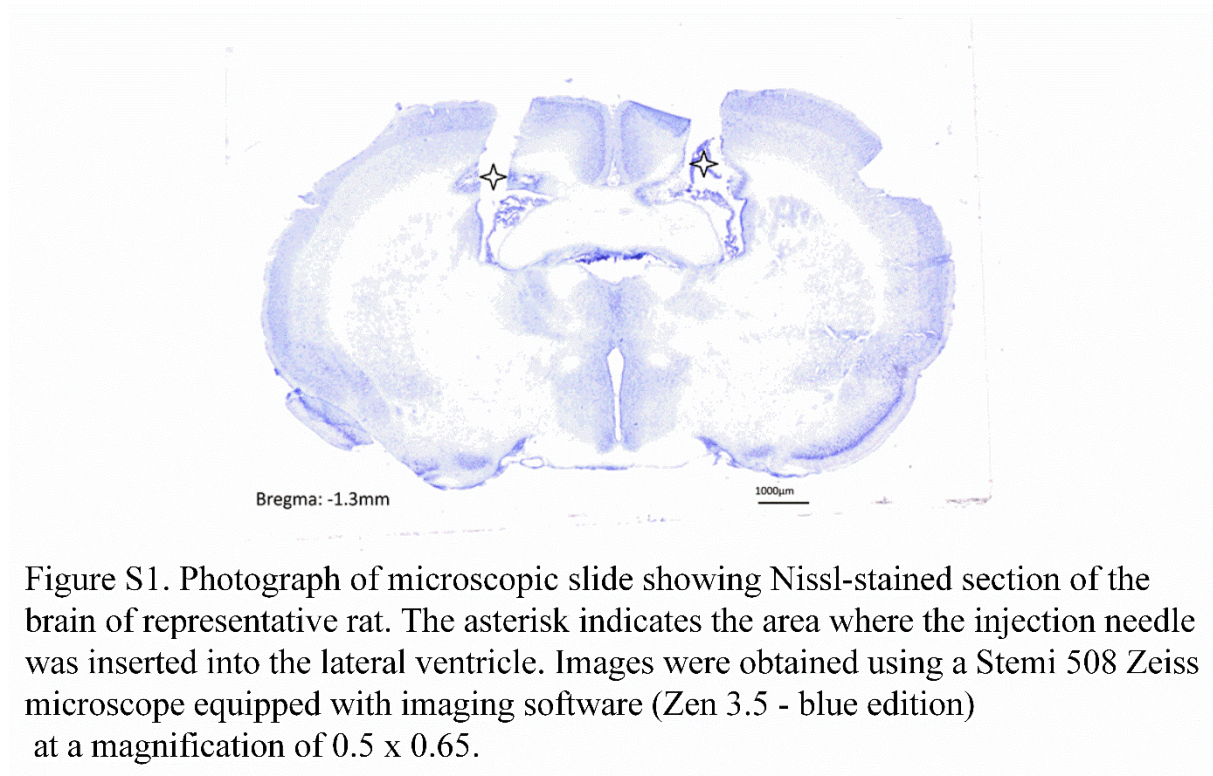


Figure S1. Photograph of microscopic slide showing Nissl-stained section of the brain of representative rat. The asterisk indicates the area where the injection needle was inserted into the lateral ventricle. Images were obtained using a Stemi 508 Zeiss microscope equipped with imaging software (Zen 3.5 - blue edition) at a magnification of 0.5 x 0.65.

**Table S1.** The results obtained from Levene test.

Parameters	p
Consumption of sucrose (SPT)	0.00231
Time in the center (EPM)	0.000918
Time in the open arms (EPM)	0.0000001
Time in the closed arms (EPM)	0.0000001
Entrances to the center (EPM)	0.0006
Entrances to the open arms (EPM)	0.000006
Entrances to the closed arms (EPM)	0.09
Miction (EPM)	0.000764
Defecation (EPM)	0.001
Number of leukocytes in the blood	0.19
Number of lymphocytes in the blood	0.52
Number of monocytes in the blood	0.004509
Number of granulocytes in the blood	0.0000001
Percentage of lymphocytes in the blood	0.10
Percentage of monocytes in the blood	0.43
Percentage of granulocytes in the blood	0.015673
Number of red blood cells in the blood	0.80
Hemoglobin concentration	0.43
Hematocrit	0.35
Mean corpuscular volume	0.07
Mean mass of the hemoglobin	0.012161
Mean hemoglobin concentration	0.041055
Red cell distribution width	0.336676
Number of platelets in the blood	0.000015
Mean platelet volume	0.11
Platelecrit	0.0000001
Number of T lymphocytes in the blood	0.19
Number of Th lymphocytes in the blood	0.62
Number of Tc lymphocytes in the blood	0.06
Number of B lymphocytes in the blood	0.10
Number of NK cells in the blood	0.68

Ratio Th/Tc lymphocytes in the blood	0.08
Percentage of T lymphocytes in the blood	0.66
Percentage of Th lymphocytes in the blood	0.008132
Percentage of Tc lymphocytes in the blood	0.54
Percentage of B lymphocytes in the blood	0.026031
Percentage of NK cells in the blood	0.72
Percentage of T lymphocytes in the spleen	0.23
Percentage of B lymphocytes in the spleen	0.42
Percentage of NK cells in the spleen	0.38
IL-6 concentration in the plasma	0.99
IL-10 concentration in the plasma	0.11
Corticosterone concentration in the plasma	0.50
Relative weights of spleen	0.34
Relative weights of thymus	0.89

**Table S2.** The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment and time (stage) on behavioral activity associated with anxiety presented as the entrances to the open arms, center and closed arms and number of miction and defecation in elevated plus maze (EPM) at baseline conditions, at the very early, early, and late stage after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1).

Groups	Phase	Enters (No.)			Episodes (No.)	
		Open arms	Center	Close arms	Miction	Defecation
Baseline	Baseline	9.67±4.22	21.04±6.99	12±4.88	4±1.93	0±0
STZ SAL	VERY EARLY STAGE	1.67±0.52 <sup>5@#</sup>	4.5±1.25 <sup>5@#</sup>	3.67±1.4 <sup>4@#</sup>	1.83±0.41 <sup>4@#</sup>	0±0
STZ IGF-1		2.83±0.97 <sup>4@#</sup>	10.2±4.66 <sup>4@#</sup>	8±4	1.17±0.41 <sup>*@#</sup>	0±0
VEH SAL		3.6±1.82 <sup>4@#</sup>	10.5±4.72 <sup>4@#</sup>	7.2±3.42 <sup>4@#</sup>	1.33±0.52 <sup>4@#</sup>	0±0
VEH IGF-1		3.4±0.89 <sup>4@#</sup>	10.33±2.86 <sup>4@#</sup>	8.2±2.05 <sup>4@#</sup>	1.67±0.82 <sup>4@#</sup>	0±0
STZ SAL	EARLY STAGE	0±0 <sup>5%#</sup>	3.33±1.63 <sup>5@#</sup>	3.33±1.63 <sup>5@#</sup>	2±0.89 <sup>4@#</sup>	1.67±0.82 <sup>5@#</sup>
STZ IGF-1		1.33±0.82 <sup>**@#</sup>	3.67±1.97 <sup>5@#</sup>	3.33±1.37 <sup>5@#</sup>	1.33±0.52 <sup>4@#</sup>	0±0 <sup>**</sup>
VEH SAL		1.67±0.61 <sup>4@#</sup>	7±3.35 <sup>4@#</sup>	6.83±2.93 <sup>4@#</sup>	1.67±0.52 <sup>4@#</sup>	0±0
VEH IGF-1		1.5±0.55 <sup>4@#</sup>	6.17±2.32 <sup>4@#</sup>	5.5±2.66 <sup>4@#</sup>	1.17±0.41 <sup>4@#</sup>	0±0

STZ SAL	LATE STAGE	1±0 <sup>&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	1±0 <sup>S%&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	1±0 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	0±0 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	0±0 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>
STZ IGF-1		1.25±0.5 <sup>^&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	2.25±1.26 <sup>^%&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	2±0.71 <sup>\$^%&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	1±0 <sup>*^&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	0±0
VEH SAL		5.33±1.99 <sup>@&amp;</sup>	9.67±4.89 <sup>@&amp;&amp;&amp;</sup>	5.83±2.31 <sup>@&amp;&amp;</sup>	1.33±0.52 <sup>@&amp;&amp;</sup>	0±0
VEH IGF-1		3.6±1.14 <sup>&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	6.4±2.51 <sup>@&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	4.8±1.30 <sup>%&amp;&amp;&amp;&amp;</sup>	2.6±0.89 <sup>S&amp;&amp;&amp;</sup>	0±0

Explanations: \*-p<0.05, \*\*-p<0.01 indicate significance of differences between STZ SAL and STZ IGF-1, ^-p<0.05, ^^~p<0.01 indicate significance of differences between STZ IGF-1 and VEH IGF-1, %-p<0.05, %%-p<0.01 indicate significance of differences between very early and early stage/late stage, S-p<0.05, \$\$\$-p<0.01 indicate significance of differences to VEH SAL, &-p<0.05, &&-<0.01 indicate significance of differences between early and late stage of disease progression, @-p<0.05, @@@-p<0.01, @@@@-p<0.001 indicate significance of differences to baseline conditions.

**Results description:** In all the groups (STZ SAL, STZ IGF-1, VEH SAL, VEH IGF-1) rats more frequently entered the open arms at baseline conditions than at all the stages (very early stage: p<0.001, p<0.001, p<0.01 p<0.01; early stage: in all comparisons p<0.001; late stage: p<0.01, p<0.01, p<0.05 p<0.01 respectively). At the very early stage, VEH SAL rats entered the open arms more often than STZ SAL rats (p<0.05). At the early stage, STZ SAL rodents entered these arms less frequently than VEH SAL (p<0.01) and STZ IGF-1 groups (p<0.01). In addition, at the late stage, STZ IGF-1 group also less frequently visited the open arms than VEH IGF-1 (p<0.05) animals. STZ SAL rats less frequently entered the open arms at the early stage than at the very early stage (p<0.01) and late stage (p<0.01). Rats from VEH SAL group also less frequently visited this part of maze at the early stage compared to the very early stage (p<0.05). Moreover, VEH IGF-1 rats entered open arms less frequently at the early stage than at the very early and late stages (in both comparisons p<0.01).

In all the groups (STZ SAL, STZ IGF-1, VEH SAL, VEH IGF-1) rats more frequently visited the center of the maze at baseline conditions than at all the stages of sAD progression (very early stage: p<0.001, p<0.01, p<0.01 p<0.01; early stage: all comparisons p<0.001; late stage: p<0.01, p<0.01, p<0.001 p<0.001 respectively). The center of the maze was more frequently visited by VEH SAL rats compared to STZ SAL group at the very early, early and late stages (in all comparisons p<0.05). Moreover, rats from STZ IGF-1 group less frequently entered the maze center than (1) VEH SAL rats at the early stage (p<0.05) and (2) VEH IGF-1 animals at the late stage (p<0.05). STZ IGF-1 and VEH IGF-1 groups entered less frequently the maze center at the early stage than at the very early stage (in both comparisons p<0.05). STZ SAL rats entered the center less often at the late stage than at the very early and early stages (p<0.01, p<0.05), and STZ IGF-1 also less frequently visited this part of the maze at the late stage than at the very early stage (p<0.05).

The closed arms of maze at baseline conditions was visit more frequently than at the very early stage in STZ SAL (p<0.001), VEH SAL (p<0.05), VEH IGF-1 (p<0.05) groups, at the early (p<0.001, p<0.001, p<0.01 p<0.01 respectively) and late stage (all comparisons p<0.01) in all

the groups (STZ SAL, STZ IGF-1, VEH SAL, VEH IGF-1). Moreover at the early stage VEH SAL animals often enters to closed arms than STZ SAL, STZ IGF-1 and VEH IGF-1 animals (all comparisons  $p < 0.05$ ). In addition also VEH SAL rodent more frequently visit closed arms at the late stage than STZ SAL ( $p < 0.01$ ), and STZ IGF-1 ( $p < 0.05$ ) animals but STZ IGF-1 at this time rarely visit this part of maze than VEH IGF-1 rodents ( $p < 0.05$ ). At the very early stage, STZ IGF-1 animals visit closed arms more frequently than at the early stage ( $p < 0.05$ ) and late stage ( $p < 0.05$ ). In addition STZ SAL rodent more frequently visit closed arms at the early than late stage ( $p < 0.05$ ). Additionally at the very early stage VEH IGF-1 group more frequently enter closed arms than at the late stage ( $p < 0.05$ ).

In all the groups (STZ SAL, STZ IGF-1, VEH SAL, VEH IGF-1) the number of miction instances was higher at baseline conditions than at the very early (in all comparisons  $p < 0.01$ ) and the early stage ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$  respectively). In addition also the number of miction episodes in STZ SAL, STZ IGF-1, and VEH SAL groups was higher at the late stage compared to baseline conditions (in all comparisons  $p < 0.01$ ). In STZ IGF-1 group, the number of miction instances at the very early stage was lower but at the late stage higher than in STZ SAL (in both comparisons  $p < 0.05$ ) rats. What's more, at the late stage, the number of miction episodes in STZ SAL animals was lower than in VEH SAL ( $p < 0.01$ ) animals and compared to the very early and early stages (in both comparisons  $p < 0.01$ ). In addition, VEH IGF-1 rats had a higher number of miction instances compared to VEH SAL ( $p < 0.05$ ) and STZ IGF-1 ( $p < 0.01$ ) at the late stage. Compared to baseline conditions, at the early stage of sAD progression the higher number of defecation in STZ SAL rodents was observed ( $p < 0.001$ ). Moreover, at the early stage, the number of defecation episodes in STZ SAL group was higher than in STZ IGF-1 and VEH SAL rats ( $p < 0.01$ ). In addition, in STZ SAL group at early phase number of defecation was higher than at very early and late stages (in all comparisons  $p < 0.01$ ).

**Table S3.** The effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) treatment and time (stage) on the number of red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (HGB), mean hemoglobin concentration in the red blood cells (MCHC), mean mass of the hemoglobin in the red blood cells (MCH), mean corpuscular volume (MCV), hematocrit (HCT), red cell distribution width (RDW) (a), the number of platelet (PLT), mean platelet volume (MPV), platelecrit (PCT) (b) at the early and late stage after intracerebroventricular injections of streptozotocin and saline (STZ SAL), streptozotocin and insulin-like growth factor-1 (STZ IGF-1), citrate buffer and saline (VEH SAL), citrate buffer and insulin-like growth factor-1 (VEH IGF-1) in the peripheral blood.

a.	Parameter	STZ SAL	STZ IGF-1	VEH SAL	VEH IGF-1	STZ SAL	STZ IGF-1	VEH SAL	VEH IGF-1
	Phase	EARLY STAGE				LATE STAGE			
	RBC (No. $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	7.86 $\pm$ 0.56	7.94 $\pm$ 0.57	8.23 $\pm$ 0.45	8.32 $\pm$ 0.47	7.43 $\pm$ 0.66 <sup>S</sup>	7.72 $\pm$ 0.44	8.11 $\pm$ 0.48	7.92 $\pm$ 0.32
	HGB (g/dL)	14.65 $\pm$ 0.39	14.18 $\pm$ 0.86	14.65 $\pm$ 0.33	14.42 $\pm$ 0.43	14.31 $\pm$ 0.54	13.91 $\pm$ 0.76	14.31 $\pm$ 0.57	13.88 $\pm$ 0.40 <sup>S&amp;</sup>
	MCHC (g/dL)	33.5 $\pm$ 2.27	31.88 $\pm$ 0.65	33.02 $\pm$ 2.49	32.17 $\pm$ 2.41	34.2 $\pm$ 1.28	32.91 $\pm$ 1.92	32.66 $\pm$ 2.11	33.14 $\pm$ 1.59
	MCH (pg)	18.75 $\pm$ 1.67	18.1 $\pm$ 0.81	17.88 $\pm$ 1.16	17.37 $\pm$ 0.75	19.4 $\pm$ 2.03	18.08 $\pm$ 0.94	17.7 $\pm$ 1.26	17.55 $\pm$ 0.73
	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	55.75 $\pm$ 1.08	56.58 $\pm$ 1.43 <sup>*</sup>	55.17 $\pm$ 1.94	54.17 $\pm$ 0.98	56.43 $\pm$ 4.93	54.88 $\pm$ 1.46 <sup>^&amp;</sup>	54.14 $\pm$ 1.21	52.88 $\pm$ 1.13
	HCT (%)	43.83 $\pm$ 2.43	44.69 $\pm$ 2.47	45.13 $\pm$ 2.80	45.27 $\pm$ 3.29	41.83 $\pm$ 0.76 <sup>S</sup>	42.31 $\pm$ 1.79	43.9 $\pm$ 2.27	41.93 $\pm$ 1.65 <sup>&amp;</sup>

	RDW (%)	13.8±0.64	13.69±0.52	13.93±0.36	14.38±0.61	14.17±1.55	13.78±0.83	13.43±0.97	14.2±0.77
b.	PLT (No. x10 <sup>3</sup> /μl)	411.25±250.29	376.75±123.46 <sup>\$^</sup>	203.50±84.94	219±86.33	175.57±64.17	419.13±118.24 <sup>**\$^</sup>	203.43±90.33	225.13±106.04
	MPV (μm <sup>3</sup> )	9.05±2.57	7.8±1.06	8.05±0.50	9.15±2.43	8.16±2.61	8.1±0.58	8.53±1.44	8.16±1.57
	PCT (%)	0.29±0.24	0.28±0.10 <sup>^^</sup>	0.19±0.11	0.11±0.04	0.08±0.05 <sup>\$</sup>	0.36±0.06 <sup>***\$^</sup>	0.17±0.06	0.12±0.05

Explanations: \*\*-p<0.01, \*\*\*-p<0.001 indicate significance of differences between STZ SAL and STZ IGF-1, \$-p<0.05, \$\$-p<0.01, \$\$\$-p<0.001 indicate significance of differences to VEH SAL, ^-p<0.05, ^^-p<0.01, ^^^-p<0.001 indicate significance of differences between STZ IGF-1 and VEH IGF-1, &-<0.05 indicates significance of differences between early and late stage of disease progression.

**Results descriptions:** As shown in Table S3a, at the early phase of sAD, in STZ IGF-1 animals the mean corpuscular volume was higher than in VEH IGF-1 rats (p<0.05). At the late phase, RBC number was lower in STZ SAL rats than in VEH SAL rodents (p<0.05). In VEH IGF-1 group the hemoglobin concentration was lower compared to VEH SAL animals at the late stage (p<0.05). Moreover, HGB in VEH IGF-1 group was lower at the late stage than at the early stage (p<0.05). In addition, in STZ IGF-1 group MCV was higher compared to VEH IGF-1 rats at the late stage (p<0.05). What's more in STZ IGF-1 rats, MCV at the late stage was lower than at the early stage (p<0.05). At the late stage, HCT was lower in STZ SAL rats than VEH SAL animals (p<0.05). In VEH IGF-1 group HCT was lower at the late phase compared to the early stage (p<0.05).

Table S3b shows the results of the platelet system parameters. The number of platelet cells was higher in STZ IGF-1 group compared to VEH SAL and VEH IGF-1 animals (in both comparisons p<0.05) at the early phase. At the late phase, the number of PLT also was higher in STZ IGF-1 group compared to STZ SAL, VEH SAL and VEH IGF-1 rats (in all comparisons p<0.01). The plateletcrit was higher in STZ IGF-1 group than in VEH IGF-1 rats (p<0.01) at the early phase of sAD progression. At the late phase the plateletcrit was higher in STZ IGF-1 rats than in STZ SAL, VEH SAL, and VEH IGF-1 animals (in all comparison p<0.001). Moreover, PCT was higher in VEH SAL group than in STZ SAL animals at the late stage (p<0.01).

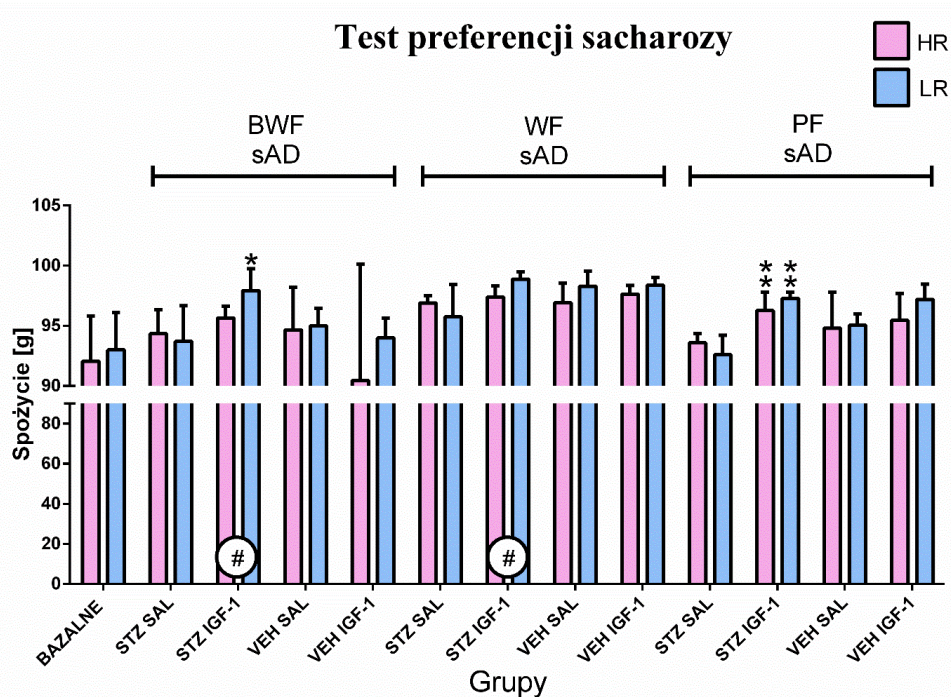
### 3.2. Wyniki nieopublikowane

**Cel:** Zbadanie czy różnice osobnicze we wrażliwości na stres, mierzone poziomem aktywności lokomotorycznej (HR vs. LR) znajdują odzwierciedlenie w zróżnicowaniu efektywności terapii z użyciem IGF-1 deficytów pamięci oraz zaburzeń depresyjnych/lękowych w modelu sAD.

#### 3.2.1. Test preferencji sacharozy (SPT)

##### 3.2.1.1. Poziom anhedonii zmierzony w teście preferencji sacharozy (SPT)

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie w poziomie spożycia sacharozy pomiędzy grupami zwierząt ( $H=95,74$ ;  $p<0,001$ ;  $df1=25$ ;  $df2=160$ ). Test U-Manna-Whitney'a (rycina 4, tabela 1) wykazał, że zwierzęta w obrębie grupy STZ IGF-1 o charakterystyce behawioralnej LR spożywają więcej sacharozy niż szczury HR podczas bardzo wczesnej (dzień 14 sAD) i wczesnej (dzień 52 sAD) fazy rozwoju sAD (w obu porównaniach  $U=2$ ;  $p<0,05$ ).



Rycina 4. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na poziom spożycia roztworu sacharozy w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 14 sAD), wczesnej (WF, dzień 52 sAD) oraz późnej (PF, dzień 97 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objasnienia: #- $p<0,05$  różnice istotne

statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05; \*\*-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

Podczas bardzo wczesnej fazy choroby szczury STZ IGF-1 LR spożyły więcej sacharozy w porównaniu ze zwierzętami z grup: STZ SAL LR (U=2; p<0,05) oraz VEH SAL LR (U=2; p<0,05). Ponadto, w późnej (dzień 97 sAD) fazie sAD zwierzęta z grupy STZ IGF-1 spożyły więcej sacharozy niż szczury STZ SAL, zarówno te o charakterystyce behawioralnej HR (U=0,5; p<0,01) jak i LR (U=0; p<0,01). Podczas tego etapu rozwoju choroby szczury z grupy VEH SAL LR spożyły więcej roztworu sacharozy niż zwierzęta STZ SAL LR (U=2; p<0,05), natomiast mniej w stosunku do grupy STZ IGF-1 LR (U=0; p<0,01).

Tabela 1. Wpływ etapu rozwoju choroby na poziom spożycia roztworu sacharozy w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 14 sAD), wczesnej (WF, dzień 52 sAD) oraz późnej (PF, dzień 97 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulino -podobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

<b>Pobór sacharozy (g)</b>				
<b>Grupa/Faza</b>	<b>BAZALNE HR</b>		<b>BAZALNE LR</b>	
BAZALNE	92,05±3,76		93±3,11	
<b>Grupa/Faza</b>	<b>STZ SAL HR</b>	<b>STZ IGF-1 HR</b>	<b>VEH SAL HR</b>	<b>VEH IGF-1 HR</b>
BWF sAD	94,35±1,97	95,65±0,97 <sup>@</sup>	94,67±3,52	90,47±9,63
WF sAD	96,89±0,6 <sup>@@@%</sup>	97,39±0,93 <sup>@@@%</sup>	96,93±1,6 <sup>@@</sup>	97,64±0,72 <sup>@@@%%</sup>
PF sAD	93,58±0,79 <sup>&amp;&amp;</sup>	96,27±1,55 <sup>@@</sup>	94,79±3,02	95,47±2,24 <sup>@</sup>
<b>Grupa/Faza</b>	<b>STZ SAL LR</b>	<b>STZ IGF-1 LR</b>	<b>VEH SAL LR</b>	<b>VEH IGF-1 LR</b>
BWF sAD	93,71±2,95	97,93±1,82 <sup>@@</sup>	95±1,43	93,98±1,65
WF sAD	95,76±2,69	98,87±0,64 <sup>@@@</sup>	98,29±1,27 <sup>@@@%</sup>	98,39±0,64 <sup>@@@%%</sup>
PF sAD	92,59±1,63	97,28±0,54 <sup>@@@&amp;&amp;</sup>	95,04±0,95 <sup>&amp;&amp;</sup>	95,04±0,95 <sup>&amp;&amp;</sup>

Objaśnienia: @-p<0,05; @@-p<0,01; @@@-p<0,001 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05; %%-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &&-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.2. Poziom łęku zmierzony w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami szczurów (df1=25, df2=129; p<0,001) w czasie spędzonym w ramionach

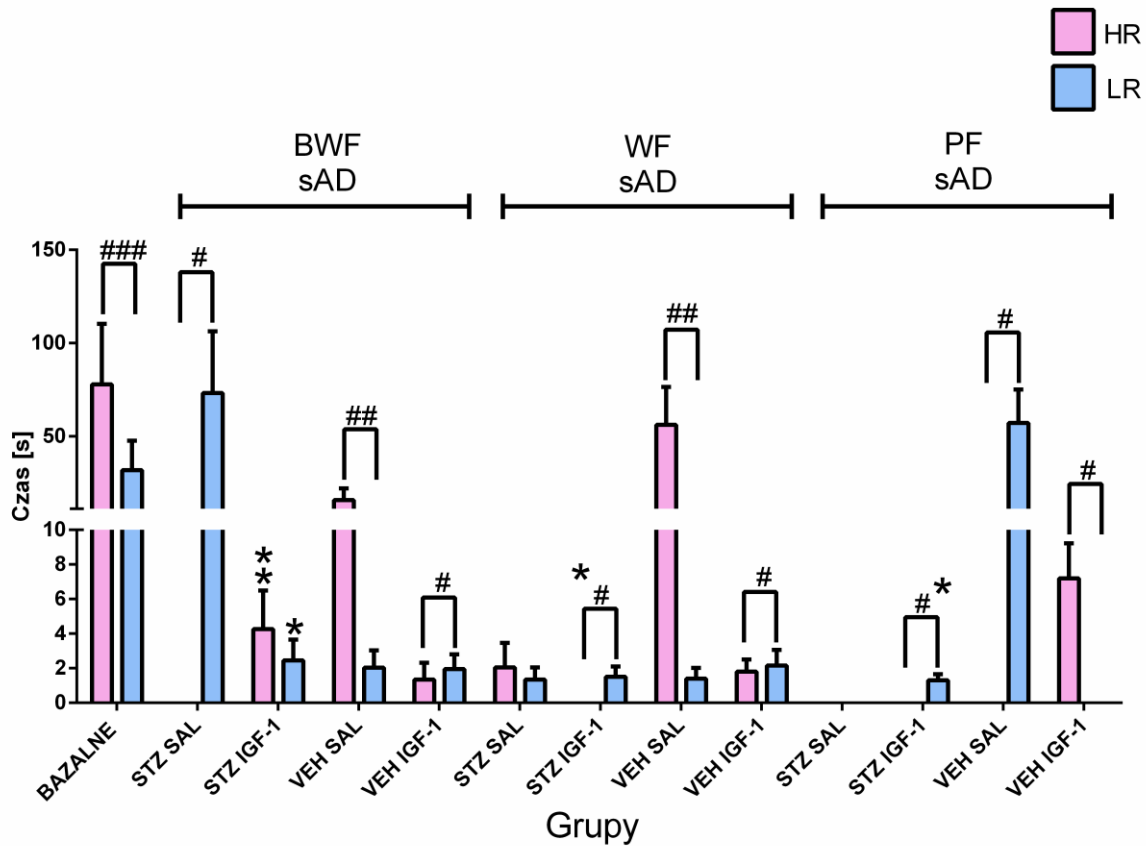
otwartych (H=120,33), w centrum (H=109,87), w ramionach zamkniętych (H=115,56) labiryntu oraz w liczbie wejść do ramion otwartych (H=111,89), do centrum (H=107), do ramion zamkniętych (H=86,65) labiryntu oraz w liczbie epizodów mikcji (H=97,16) i defekacji (H=107,98).

### 3.2.2.1. Czas spędzony w ramionach otwartych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Jak pokazano na **rycynie 5**, osobniki HR i LR różniły się istotnie pod względem czasu przebywania w ramionach otwartych EPM. W warunkach bazalnych (**tabela 2**) to zwierzęta HR w stosunku do osobników LR spędzały tam więcej czasu (U=19; p<0,001). Zwierzęta w grupie STZ SAL o charakterystyce behawioralnej LR, w tej części labiryntu, spędziły więcej czasu w porównaniu ze zwierzętami HR (U=0; p<0,05) podczas bardzo wczesnej (dzień 15 sAD) fazy sAD. Osobniki LR w grupie STZ IGF-1 w porównaniu do szczurów HR spędziły również więcej czasu w otwartych ramionach EPM podczas wczesnej (dzień 53 sAD) i późnej (dzień 98 sAD) fazy choroby (w obu porównaniach U=0; p<0,01). Zwierzęta z grupy kontrolnej VEH SAL HR w bardzo wczesnej i wczesnej fazie sAD (w obu U=0; p<0,01) spędziły więcej czasu w otwartych ramionach EPM, natomiast mniej w późnej fazie sAD (U=0; p<0,05), w stosunku do szczurów LR. Szczury z grupy kontrolnej VEH IGF-1 LR w bardzo wczesnej (U=3; p<0,05) i wczesnej fazie sAD (U=0; p<0,05) spędziły więcej czasu w otwartych ramionach, natomiast mniej w późnym etapie sAD (U=0; p<0,05) w stosunku do osobników HR.

Podczas bardzo wczesnej fazy choroby w ramionach otwartych więcej czasu spędziły: (1) osobniki VEH SAL HR w porównaniu do szczurów STZ SAL HR (U=0; p<0,05) i STZ IGF-1 HR (U=1; p<0,05); (2) grupa STZ IGF-1 HR w stosunku do szczurów STZ SAL HR (U=0; p<0,01); (3) szczury STZ SAL LR w porównaniu do osobników STZ IGF-1 LR (U=0; p<0,05) i VEH SAL LR (U=0; p<0,01). Podczas wczesnej fazy choroby ramiona otwarte były odwiedzane dłużej przez gryzonie: (1) VEH SAL HR niż STZ SAL HR i STZ IGF-1 HR (we wszystkich porównaniach U=0; p<0,05); (2) STZ SAL HR w porównaniu do grupy STZ IGF-1 HR (U=0; p<0,05). W czasie późnej fazy sAD do tego fragmentu labiryntu częściej udawały się zwierzęta: (1) VEH SAL LR niż osobniki z grup STZ SAL LR i STZ IGF-1 LR (we wszystkich porównaniach U=0; p<0,05); (2) STZ IGF-1 LR w stosunku do zwierząt STZ SAL LR (U=0; p<0,05).

## Czas spędzony w ramionach otwartych EPM



Rycina 5. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na czas spędzony w ramionach otwartych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 15 sAD), wczesnej (WF, dzień 53 sAD) oraz późnej (PF, dzień 98 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimerera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objasnienia: #- $p < 0,05$ ; ##- $p < 0,01$ ; ###- $p < 0,001$  różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

Tabela 2. Wpływ etapu rozwoju choroby na czas spędzony w ramionach otwartych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 14 sAD), wczesnej (WF, dzień 52 sAD) oraz późnej (PF, dzień 97 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

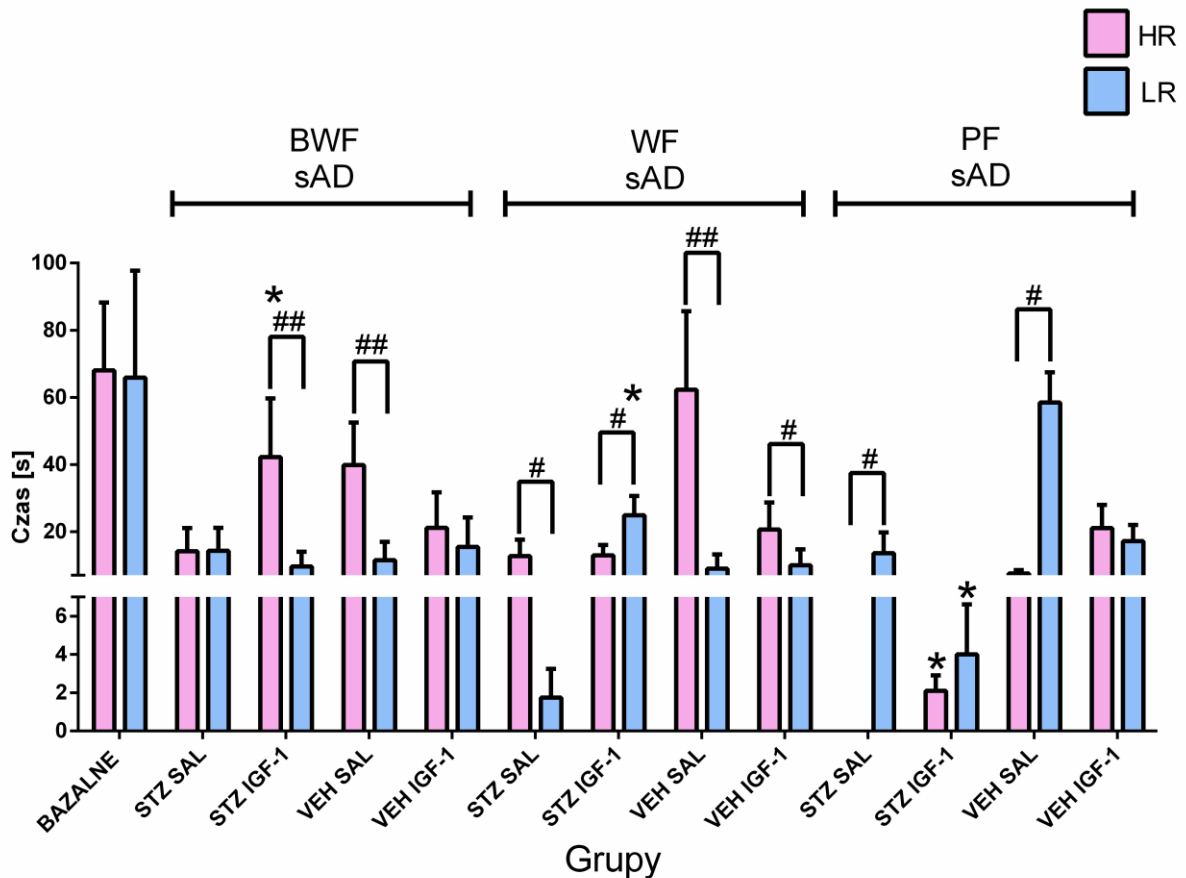
Czas spędzony w ramionach otwartych (s)				
Grupa/Faza	BAZALNE HR		BAZALNE LR	
BAZALNE	77,85±32,41		31,75±15,84	
Grupa/Faza	STZ SAL HR	STZ IGF-1 HR	VEH SAL HR	VEH IGF-1 HR
BWF sAD	0±0 <sup>@@</sup>	4,26±2,23 <sup>@@@</sup>	15,7±6,33 <sup>@@</sup>	1,35±0,97 <sup>@@</sup>
WF sAD	2,05±1,42 <sup>@@%</sup>	0±0 <sup>@@%%</sup>	56,15±20,25 <sup>%</sup>	1,8±0,71 <sup>@@</sup>
PF sAD	0±0 <sup>@@&amp;</sup>	0±0 <sup>@@%%</sup>	0±0 <sup>@@%&amp;</sup>	7,2±2,02 <sup>@@%&amp;</sup>
Grupa/Faza	STZ SAL LR	STZ IGF-1 LR	VEH SAL LR	VEH IGF-1 LR
BWF sAD	73,2±33,03 <sup>@@</sup>	2,45±1,20 <sup>@@</sup>	2,04±0,99 <sup>@@</sup>	1,95±0,85 <sup>@@</sup>
WF sAD	1,35±0,7 <sup>@@%</sup>	1,5±0,6 <sup>@@</sup>	1,4±0,62 <sup>@@</sup>	2,15±0,91 <sup>@@</sup>
PF sAD	0±0 <sup>@@%&amp;</sup>	1,3±0,35 <sup>@@</sup>	57,1±17,98 <sup>@%%&amp;&amp;</sup>	0±0 <sup>@@%&amp;</sup>

Objaśnienia: @-p<0,05; @@-p<0,01; @@@-p<0,001 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05; %%-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &-p<0,05; &&-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.2.2. Czas spędzony w centrum uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Jak pokazano na **rycinie 6** osobniki HR i LR różniły się istotnie pod względem czasu przebywania w centrum EPM. Podczas bardzo wczesnego (**tabela 3**, dzień 15 sAD) etapu rozwoju sAD to osobniki HR spędzały więcej czasu w tej części labiryntu niż szczury LR w grupach: STZ IGF-1 oraz VEH SAL (w obu porównaniach U=0; p<0,01). Podczas wczesnej (dzień 53 sAD) fazy sAD to osobniki HR spędzały więcej czasu w centrum labiryntu niż gryzonie LR w grupach: STZ SAL (U=0; p<0,05), VEH SAL (U=0; p<0,01) i VEH IGF-1 (U=1; p<0,05). Natomiast w grupie STZ IGF-1 (U=0; p<0,05) to osobniki LR częściej odwiedzały centrum labiryntu. Podczas późnego (dzień 98 sAD) etapu sAD to osobniki LR spędzały więcej czasu w tej części labiryntu niż gryzonie HR w grupach: STZ SAL oraz VEH SAL (w obu porównaniach U=0; p<0,05).

## Czas spędzony w centrum EPM



Rycina 6. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na czas spędzony w centrum uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 15 sAD), wczesnej (WF, dzień 53 sAD) oraz późnej (PF, dzień 98 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objaśnienia: #- $p < 0,05$ ; ##- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \*- $p < 0,05$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

Podczas bardzo wczesnej fazy choroby osobniki STZ SAL HR spędziły mniej czasu w centrum EPM niż szczury: STZ IGF-1 HR ( $U=1$ ;  $p < 0,05$ ) oraz VEH SAL HR ( $U=0$ ;  $p < 0,05$ ). Podczas wczesnej fazy choroby w centrum EPM dłużej przebywały zwierzęta VEH SAL HR niż STZ SAL HR oraz STZ IGF-1 HR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p < 0,05$ ). Ponadto grupa szczurów STZ IGF-1 LR w centrum labiryntu spędziła więcej czasu niż zwierzęta STZ SAL LR ( $U=0$ ;  $p < 0,05$ ) oraz VEH SAL LR ( $U=0$ ;  $p < 0,01$ ), a szczury VEH SAL LR więcej niż osobniki STZ SAL LR ( $U=0$ ;  $p < 0,01$ ). Podczas późnej fazy sAD zwierzęta HR z grupy STZ

IGF-1 spędziły więcej czasu w centrum EPM niż grupa STZ SAL oraz mniej niż gryzonie VEH SAL, ponadto zwierzęta VEH SAL także przebywały dłużej w tej części labiryntu niż osobniki STZ SAL (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Na tym etapie choroby szczury VEH SAL LR spędziły więcej czasu w centrum labiryntu w porównaniu ze zwierzętami: STZ SAL LR i STZ IGF-1 LR, natomiast gryzonie STZ IGF-1 LR spędziły tam mniej czasu w stosunku do zwierząt STZ SAL LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Tabela 3. Wpływ etapu rozwoju choroby na czas spędzony w centrum uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 14 sAD), wczesnej (WF, dzień 52 sAD) oraz późnej (PF, dzień 97 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Czas spędzony w centrum (s)				
Grupa/Faza	BAZALNE HR		BAZALNE LR	
BAZALNE	68,04±20,22		65,85±31,87	
Grupa/Faza	STZ SAL HR	STZ IGF-1 HR	VEH SAL HR	VEH IGF-1 HR
BWF sAD	14,15±6,9 <sup>@@</sup>	42,24±17,48 <sup>@</sup>	39,85±12,62 <sup>@</sup>	21,15±10,58 <sup>@@</sup>
WF sAD	12,75±4,89 <sup>@@</sup>	12,9±3,13 <sup>@@%%</sup>	62,3±23,35	20,6±8,10 <sup>@@</sup>
PF sAD	0±0 <sup>@@%&amp;</sup>	2,1±0,81 <sup>@@%%&amp;</sup>	7,55±1,01 <sup>@@%&amp;</sup>	21,05±6,92 <sup>@@</sup>
Grupa/Faza	STZ SAL LR	STZ IGF-1 LR	VEH SAL LR	VEH IGF-1 LR
BWF sAD	14,3±6,82 <sup>@@</sup>	9,6±4,41 <sup>@@</sup>	11,48±5,50 <sup>@@</sup>	15,45±8,79 <sup>@@</sup>
WF sAD	1,75±1,5 <sup>@@%</sup>	24,85±5,81 <sup>@%</sup>	8,96±4,24 <sup>@@</sup>	9,95±4,78 <sup>@@</sup>
PF sAD	13,55±6,20 <sup>@@&amp;</sup>	4±2,62 <sup>@@&amp;</sup>	58,45±9,02 <sup>%%&amp;&amp;</sup>	17,15±4,85 <sup>@@</sup>

Objaśnienia: @- $p<0,05$ ; @@- $p<0,01$  różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %- $p<0,05$ ; %%- $p<0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &- $p<0,05$ ; &&- $p<0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

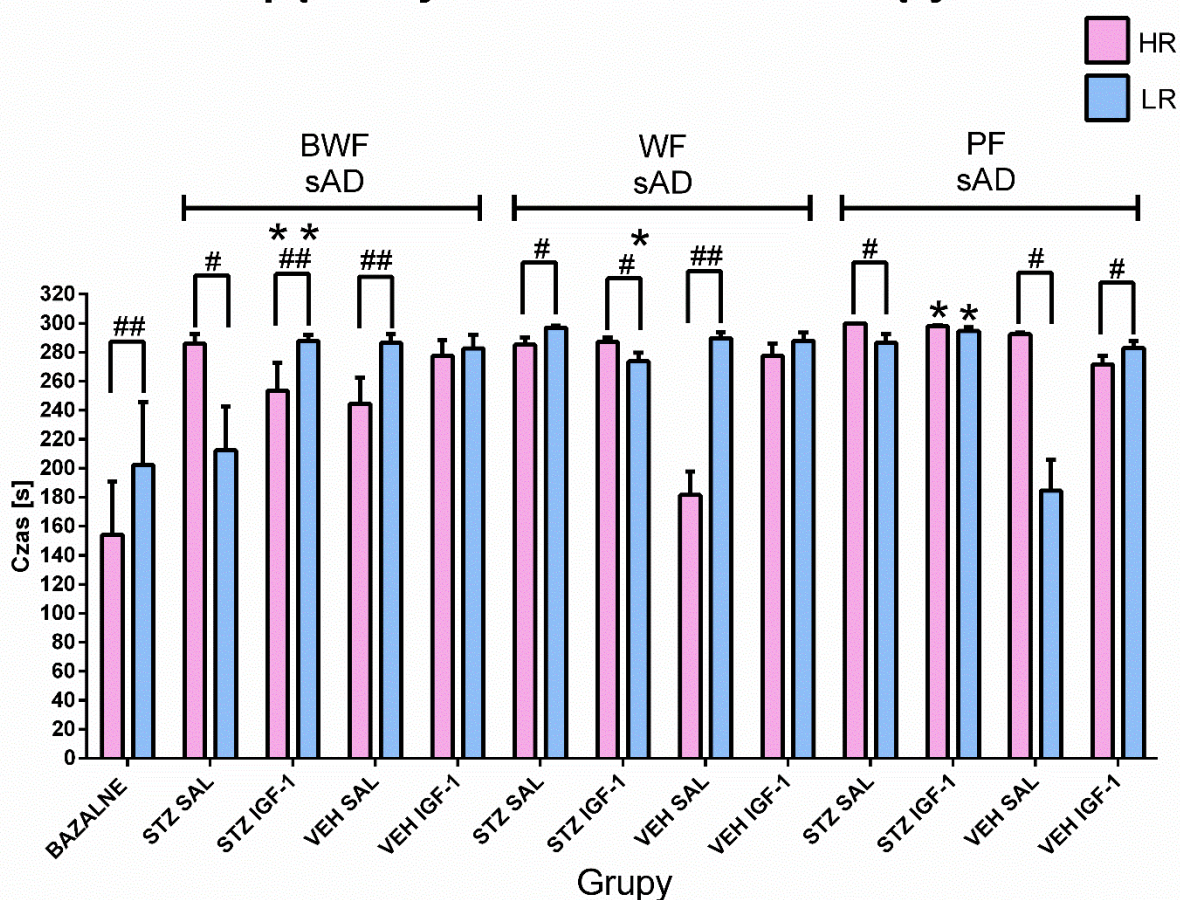
### 3.2.2.3. Czas spędzony w ramionach zamkniętych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Jak pokazano na **rycinie 7** osobniki HR i LR różniły się istotnie pod względem czasu przebywania w ramionach zamkniętych EPM. W warunkach bazalnych (**tabela 4**) to osobniki LR spędziły więcej czasu w tych ramionach ( $U=39$ ;  $p<0,01$ ) niż szczury HR. Osobniki HR podczas bardzo wczesnej (dzień 15 sAD) fazy sAD spędzały więcej czasu w ramionach zamkniętych labiryntu niż zwierzęta LR w grupie STZ SAL ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Ponadto w grupach szczurów: STZ IGF-1 i VEH SAL (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ) to zwierzęta LR,

w kontraście do osobników HR, spędzały dłuższy czas w ramionach zamkniętych labiryntu podczas 15 dnia sAD. Zwierzęta HR podczas wczesnej (dzień 53 sAD) fazy sAD spędzały więcej czasu w zamkniętych ramionach EPM niż osobniki LR w grupie STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Natomiast szczury LR na tym etapie sAD w ramionach zamkniętych spędziły więcej czasu niż szczury HR z grup: STZ SAL ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) i VEH SAL ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Szczury HR podczas późnej (98 dzień sAD) fazy sAD spędzały więcej czasu w zamkniętych ramionach niż gryzonie LR w grupach: STZ SAL ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) oraz VEH SAL ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ), natomiast w grupie VEH IGF-1 to zwierzęta HR w porównaniu do osobników LR odznaczał, krótszy czas spędzany w tej części labiryntu ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ).

Czas przebywania w ramionach zamkniętych był dłuższy w czasie bardzo wczesnej fazy sAD u szczurów: (1) STZ SAL HR w porównaniu do grup STZ IGF-1 HR oraz VEH SAL HR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ), (2) STZ IGF-1 LR/VEH SAL LR w porównaniu do gryzoni STZ SAL LR (odpowiednio  $U=0$ ;  $p<0,05$  i  $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Co więcej dłużej w ramionach zamkniętych podczas wczesnej fazy sAD spędzały grupy: (1) STZ SAL HR/STZ IGF-1 HR w stosunku do osobników z grupy VEH SAL HR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ); (2) STZ SAL LR w porównaniu do osobników STZ IGF-1 LR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) i VEH SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ); (3) VEH SAL LR w porównaniu ze zwierzętami STZ IGF-1 LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Podczas późnego etapu sAD więcej czasu w ramionach zamkniętych spędzały zwierzęta: (1) STZ SAL HR w porównaniu ze szczurami STZ IGF-1 HR i VEH SAL HR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ); (2) STZ IGF-1 HR w porównaniu do osobników VEH SAL HR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ); (3) STZ IGF-1 LR w porównaniu do grupy STZ SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ); (4) STZ SAL LR w stosunku do szczurów VEH SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) oraz (5) STZ IGF-1 LR w stosunku do grupy VEH SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

## Czas spędzony w ramionach zamkniętych EPM



Rycina 7. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na czas spędzony w ramionach zamkniętych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 15 sAD), wczesnej (WF, dzień 53 sAD) oraz późnej (PF, dzień 98 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objasnienia: #-p<0,05; ##-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

Tabela 4. Wpływ etapu rozwoju choroby na czas spędzony w ramionach zamkniętych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 15 sAD), wczesnej (WF, dzień 53 sAD) oraz późnej (PF, dzień 98 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Czas spędzony w ramionach zamkniętych (s)				
Grupa/Faza	BAZALNE HR		BAZALNE LR	
BAZALNE	154,11±36,73		202,4±42,98	
Grupa/Faza	STZ SAL HR	STZ IGF-1 HR	VEH SAL HR	VEH IGF-1 HR
BWF sAD	285,85±6,9 <sup>@@</sup>	253,5±19,30 <sup>@@@</sup>	244,45±17,84 <sup>@@</sup>	277,5±11,10 <sup>@@</sup>
WF sAD	285,2±5,02 <sup>@@</sup>	287,1±3,13 <sup>@@%%</sup>	181,55±16,17 <sup>%</sup>	277,6±8,26 <sup>@@</sup>
PF sAD	300±0 <sup>@@%&amp;</sup>	297,9±0,81 <sup>@@%&amp;</sup>	292,45±1,01 <sup>@@%&amp;</sup>	271,75±5,96 <sup>@@</sup>
Grupa/Faza	STZ SAL LR	STZ IGF-1 LR	VEH SAL LR	VEH IGF-1 LR
BWF sAD	212,5±29,92	287,95±3,98 <sup>@@</sup>	286,48±6,08 <sup>@@</sup>	282,6±9,61 <sup>@@</sup>
WF sAD	296,9±1,43 <sup>@@%</sup>	273,65±6 <sup>@@%</sup>	289,64±4,23 <sup>@@</sup>	287,9±5,55 <sup>@@</sup>
PF sAD	286,45±6,20 <sup>@@%&amp;</sup>	294,7±2,39 <sup>@@%&amp;</sup>	184,45±21,18 <sup>8%&amp;&amp;</sup>	282,85±4,85 <sup>@@</sup>

Objaśnienia: @@-p<0,01; @@@-p<0,001 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05; %%-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &-p<0,05; &&-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.2.4. Liczba wejść do ramion otwartych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Jak pokazano w tabeli 5a osobniki HR i LR różniły się istotnie pod względem liczby wejść do ramion otwartych EPM. Podczas bardzo wczesnej (dzień 15 sAD) fazy choroby w grupie STZ SAL to osobniki LR (U=0; p<0,05) wchodziły częściej do tego fragmentu labiryntu, a z kolei szczury LR w grupie STZ IGF-1 (U=0; p<0,01) rzadziej odwiedzały ramiona otwarte w porównaniu do osobników HR. Podczas wczesnej (dzień 53 sAD) fazy sAD szczury LR rzadziej wchodziły do otwartych ramion labiryntu w porównaniu do zwierząt HR w grupach: STZ SAL (U=0; p<0,05) oraz VEH SAL (U=0; p<0,01). Natomiast w grupie STZ IGF-1 (U=0; p<0,05) to osobniki LR w porównaniu ze zwierzętami HR częściej odwiedzały te ramiona. Podczas późnej (98 dzień sAD) fazy sAD ramiona otwarte były odwiedzane rzadziej przez gryzonie LR, w stosunku do szczurów HR w grupie VEH IGF-1, natomiast w grupach: STZ IGF-1 oraz VEH SAL to osobniki LR częściej wchodziły do ramion otwartych niż szczury HR (we wszystkich porównaniach U=0; p<0,05).

Liczba wejść do ramion otwartych podczas bardzo wczesnej fazy sAD w grupie STZ SAL HR była mniejsza w porównaniu do zwierząt: STZ IGF-1 HR (U=0; p<0,01) oraz VEH

SAL HR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ), a z kolei w grupie STZ SAL LR liczba wejść do tych ramion EPM była większa w stosunku do szczurów: STZ IGF-1 LR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) i VEH SAL LR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej fazy sAD ramiona otwarte częściej odwiedzały zwierzęta VEH SAL HR w porównaniu do szczurów: STZ SAL HR i STZ IGF-1 HR, natomiast szczury STZ IGF-1 HR rzadziej odwiedzały tę część labiryntu w stosunku do grupy STZ SAL HR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Ponadto podczas wczesnej fazy sAD osobniki LR z grupy STZ IGF-1 częściej wchodziły do otwartych ramion EPM niż szczury: STZ SAL ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) oraz VEH SAL ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Podczas późnego etapu sAD osobniki LR w grupie zwierząt VEH SAL częściej odwiedzały ramiona otwarte EPM niż szczury STZ SAL oraz STZ IGF-1, a z kolei szczury STZ IGF-1 częściej wchodziły do tej części EPM niż gryzonie STZ SAL (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

### 3.2.2.5. Liczba wejść do centrum uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Jak pokazano w **tabeli 5b** osobniki HR i LR różniły się istotnie pod względem liczby wejść do centrum EPM. Podczas bardzo wczesnej (dzień 15 sAD) fazy sAD szczury LR wchodziły rzadziej do tego miejsca niż osobniki HR w grupach: STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) oraz VEH IGF-1 ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej (dzień 53 sAD) fazy sAD zwierzęta LR wchodziły rzadziej do centrum EPM niż osobniki HR w grupach: STZ IGF-1 ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ) oraz VEH SAL ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Podczas późnej (dzień 98 sAD) fazy sAD szczury HR wchodziły rzadziej do centrum labiryntu niż osobniki LR w grupach: STZ SAL ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) oraz VEH SAL ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Podczas bardzo wczesnej fazy choroby do centrum EPM częściej wchodziły zwierzęta STZ IGF-1 HR w porównaniu do grupy STZ SAL HR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Ponadto podczas tego etapu sAD szczury STZ IGF-1 LR rzadziej odwiedzały tę część labiryntu niż gryzonie: STZ SAL LR ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ) i VEH SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ), a z kolei grupa STZ SAL LR rzadziej odwiedzała centrum niż szczury VEH SAL LR ( $U=1,5$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnego etapu sAD szczury STZ SAL HR rzadziej wchodziły do centrum niż szczury: STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) i VEH SAL HR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Centrum EPM podczas późnej fazy sAD rzadziej było odwiedzane przez gryzonie STZ SAL HR w stosunku do grup: STZ IGF-1 HR oraz VEH SAL HR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ), a z drugiej strony grupa VEH SAL LR częściej wchodziła do tego miejsca niż zwierzęta: STZ SAL LR oraz STZ IGF-1 LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

### 3.2.2.6. Liczba wejść do ramion zamkniętych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Jak pokazano w **tabeli 5c** osobniki HR i LR różniły się istotnie pod względem liczby wejść do ramion zamkniętych EPM. Szczury HR z grup: STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) oraz VEH IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) częściej wchodziły do ramion zamkniętych EPM niż osobniki LR podczas bardzo wczesnej (dzień 15 sAD) fazy sAD, podobnie jak zwierzęta z grupy VEH SAL ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) podczas fazy wczesnej (dzień 53 sAD) sAD. Natomiast podczas późnej (dzień 98 sAD) fazy sAD to szczury LR w stosunku do osobników HR częściej odwiedzały ramiona zamknięte w grupach: STZ SAL ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) oraz VEH SAL ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ).

Podczas bardzo wczesnej fazy do omawianej części labiryntu częściej wchodziły zwierzęta STZ IGF-1 HR w stosunku do zwierząt: STZ SAL HR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) oraz VEH SAL HR ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej fazy sAD częściej do ramion zamkniętych labiryntu wchodziły zwierzęta VEH SAL HR niż grupy: STZ SAL HR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) oraz STZ IGF-1 HR ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ), podobnie jak zwierzęta STZ IGF-1 LR w porównaniu do szczurów STZ SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas późnego etapu rozwoju sAD do ramion zamkniętych labiryntu rzadziej wchodziły szczury STZ SAL HR niż grupy: STZ IGF-1 HR oraz VEH SAL HR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Grupa VEH SAL LR częściej odwiedzała zamknięte ramiona niż zwierzęta STZ IGF-1 LR ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ) podczas późnej fazy sAD.

Tabela 5. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), charakterystyki behawioralnej oraz etapu rozwoju choroby na liczbę wejść (a) do ramion otwartych, (b) do centrum i (c) do ramion zamkniętych uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 15 sAD), wczesnej (WF, dzień 53 sAD) oraz późnej (PF, dzień 98 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa	Etap	a.Wejścia do ramion otwartych (liczba)	b.Wejścia do centrum (liczba)	c.Wejścia do ramion zamkniętych (liczba)	
Bazalne HR	BAZALNE	10,26±4,86	20,79±7,28	11,26±5,29	
Bazalne LR		7,45±4,03	18,73±9,24	11,45±5,39	
STZ SAL HR	BWF sAD	0±0@@@s	3,75±1,71@@	3,5±1,91@@	
STZ SAL LR		3,25±0,96#s	2,75±0,96@@s	2,25±0,96@@	
STZ IGF-1 HR		3,6±1,82@@**	11,6±5,18@**^	9,8±3,56**^s	
STZ IGF-1 LR		1±0##@@*	1,25±0,5###@@**s	1,5±0,58###@@	
VEH SAL HR		3±1,41@@	7±3,56@@	4,75±2,22@@	
VEH SAL LR		1,6±0,89@@	5,4±2,61@	3,6±2,88@@	
VEH IGF-1 HR		1,5±1@@	6,25±1,26@@	6,5±1,29@	
VEH IGF-1 LR		2,5±1,29@	3,25±1,5#@@	3±1,15#@	
STZ SAL HR		WF sAD	2,5±0,58@@@s%	1±0@@@s%	2,5±0,58@@@s
STZ SAL LR			1±0#@@%	1,5±1@@	1,5±1@@
STZ IGF-1 HR	0±0@@@*s%%		4±1,83@@@*^%	4±1,83@s	
STZ IGF-1 LR	6,75±1,89##sS%		1,25±0,5#@@	7±2,16*^	
VEH SAL HR	13,75±2,75@@@%		5,25±0,5@@	9±3,56	
VEH SAL LR	1,4±0,55###@@		1,2±0,45###@@%%	3,6±1,67###@@	
VEH IGF-1 HR	6±2,16@@@s%		1,25±0,5@@@s%	5,25±@	
VEH IGF-1 LR	3±1,83		2±0,82@@	2,75±0,96@	
STZ SAL HR	PF sAD	0±0@@@&	0±0@@@s&	1±0@@@s	
STZ SAL LR		0±0@@@s%&	2,5±0,58#@@s	2,75±0,5#@	
STZ IGF-1 HR		0±0@@@^%&	3,5±1,73@@@*%&	3,5±1,73@@@*	
STZ IGF-1 LR		1,25±0,5#@@**s&	1,75±0,96@@@s	1,75±0,96@@@s	
VEH SAL HR		0±0@@@%&	1,75±0,96@@@%&	2,25±0,5@@	
VEH SAL LR		6,75±2,87###%&&	10,75±3,77###%&&	6,25±2,75#	
VEH IGF-1 HR		2,5±1,91@@@s	4,75±3,20@@@&	4,75±2,22@@	
VEH IGF-1 LR		0±0#@@s%&	3,25±1,71@@@s	4±1,83@	

Objaśnienia: #-p<0,05; ##-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \$-p<0,05; \$\$-p<0,01 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05; \*\*-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; @-p<0,05; @@-p<0,01 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05; %%-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &-p<0,05; &&-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.2.7. Liczba mikcji i defekacji podczas badania poziomu łęku w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Jak pokazano w **tabeli 6a** osobniki HR i LR różniły się istotnie pod względem liczby mikcji w czasie badania poziomu łęku w teście EPM. Analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a wykazała, że liczba mikcji u osobników HR była wyższa w stosunku do zwierząt LR w grupach: STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) podczas bardzo wczesnej (dzień 15 sAD) fazy sAD i STZ SAL ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ) podczas wczesnej (dzień 53 sAD) fazy sAD. Natomiast liczba mikcji u osobników LR była wyższa w stosunku do szczurów HR w grupach zwierząt: VEH SAL ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ) podczas bardzo wczesnej fazy, VEH IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) w czasie wczesnej fazy, STZ IGF-1 oraz VEH SAL podczas późnej (dzień 98 sAD) fazy sAD (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). U osobników o charakterystyce behawioralnej LR podczas bardzo wczesnej fazy sAD zwierzęta VEH SAL oddały częściej mocz niż gryzonie: STZ SAL ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ) oraz STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ), a gryzonie STZ IGF-1 rzadziej niż grupy: STZ SAL oraz VEH IGF-1 (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej fazy sAD zwierzęta STZ SAL HR charakteryzowały się większą liczbą mikcji niż osobniki STZ IGF-1 HR ( $U=0,5$ ;  $p<0,05$ ). Podczas późnej fazy sAD szczury STZ SAL LR rzadziej oddały mocz niż gryzonie: STZ IGF-1 LR oraz VEH SAL LR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Liczba defekacji (**tabela 6b**) w grupie STZ SAL HR podczas wczesnej fazy sAD była wyższa w stosunku do zwierząt: STZ SAL LR, STZ IGF-1 HR oraz VEH SAL HR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Tabela 6. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), charakterystyki behawioralnej oraz etapu rozwoju choroby na liczbę (a) mikcji i (b) defekacji w czasie badania poziomu lęku w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 15 sAD), wczesnej (WF, dzień 53 sAD) oraz późnej (PF, dzień 98 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa	Etap	a.Mikcja (liczba)	b.Defekacja (liczba)	
Bazalne HR	BAZALNE	4,42±2,17	0±0	
Bazalne LR		3,09±1,51	0±0	
STZ SAL HR	BWF sAD	3,25±2,63	0±0	
STZ SAL LR		1,25±0,5 <sup>@@</sup> \$	0±0	
STZ IGF-1 HR		1,4±0,55 <sup>@@</sup> ^	0±0	
STZ IGF-1 LR		0±0 <sup>###</sup> @ <sup>*</sup> \$\$	0±0	
VEH SAL HR		1,25±0,5 <sup>@@</sup>	0±0	
VEH SAL LR		4,2±2,17 <sup>#</sup>	0±0	
VEH IGF-1 HR		3,5±1,29 <sup>\$</sup>	0±0	
VEH IGF-1 LR		2±0,82	0±0	
STZ SAL HR		WF sAD	6±2,94	2±0,82 <sup>@@</sup> \$
STZ SAL LR			1,5±1 <sup>#</sup> @	0±0 <sup>#</sup>
STZ IGF-1 HR	1,5±1 <sup>@</sup> *^		0±0 <sup>*</sup>	
STZ IGF-1 LR	1,5±1 <sup>@</sup> %		0,5±1	
VEH SAL HR	1,75±1,5 <sup>@</sup>		0±0	
VEH SAL LR	1,2±0,45 <sup>@@</sup> %%		0±0	
VEH IGF-1 HR	0±0 <sup>@</sup> \$\$%		0±0	
VEH IGF-1 LR	1±0 <sup>#</sup> @@		0±0	
STZ SAL HR	PF sAD		0±0 <sup>@</sup> %%&	0±0 <sup>&amp;</sup>
STZ SAL LR			0±0 <sup>@</sup> \$\$%&	0±0
STZ IGF-1 HR		0±0 <sup>@</sup> ^%%&	0±0	
STZ IGF-1 LR		1,25±0,5 <sup>#</sup> @ <sup>*</sup> %%	0±0	
VEH SAL HR		0±0 <sup>@</sup> %%&	0±0	
VEH SAL LR		2,25±1,89 <sup>#</sup>	0±0	
VEH IGF-1 HR		1,25±0,5 <sup>@</sup> \$\$%&	0±0	
VEH IGF-1 LR		1,5±1 <sup>@</sup>	0±0	

Objaśnienia: #-p<0,05; ##p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \$-p<0,05; \$\$-p<0,01 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; @-p<0,05; @@-p<0,01 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05; %%-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### **3.2.3. Poziom zaburzeń pamięci przestrzennej w teście labiryntu wodnego Morrisa (MWM)**

#### **3.2.3.1. Nabywanie referencyjnej pamięci przestrzennej (dni 1-3 MWM)**

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie ( $df_1=77$ ,  $df_2=384$ ;  $p<0,001$ ) pomiędzy grupami szczurów w latencji dopłynięcia do platformy ( $H=291,65$ ), % czasu spędzonego w kwadrancie krytycznym ( $H=290,39$ ) oraz pokonanym całkowitym dystansie ( $H=300,72$ ) podczas nabywania przestrzennej pamięci referencyjnej.

##### **3.2.3.1.1. Latencja dopłynięcia do platformy podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej (dni 1-3 MWM)**

Test U-Manna-Whitney'a wykazał różnice pomiędzy osobnikami HR i LR w latencji (**tabela 7**) dopłynięcia do platformy podczas badania pamięci referencyjnej. W grupie STZ IGF-1 podczas bardzo wczesnej (dni 16-18 sAD) fazy choroby szczury LR w dniach 1-3 MWM charakteryzowały się dłuższą latencją dopłynięcia do platformy niż osobniki HR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). W grupie VEH IGF-1 podczas tego etapu choroby w próbie podczas dnia 1 to szczury HR płynęły dłużej do platformy niż zwierzęta LR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Co więcej podczas wczesnej (dni 54-56 sAD) fazy choroby w grupie STZ IGF-1 w dniach 1-2 MWM to osobniki LR charakteryzowały się dłuższą latencją (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

W obrębie bardzo wczesnej fazy sAD to zwierzęta STZ SAL HR płynęły dłużej do platformy niż gryzonie STZ IGF-1 HR podczas 2 i 3 dnia MWM (D2  $U=1$ ;  $p<0,05$ ; D3  $U=0$ ;  $p<0,05$ ) oraz dłużej niż zwierzęta VEH SAL HR podczas dni 1-3 MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej fazy w dniu 3 MWM to gryzonie STZ IGF-1 HR płynęły dłużej do platformy niż grupa STZ SAL HR ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ). W tej fazie choroby gryzonie STZ SAL HR w stosunku do grupy VEH SAL HR, podczas dni 1 i 2 MWM, charakteryzowały się dłuższym czasem dopłynięcia do platformy (D1  $U=0$ ;  $p<0,05$ ; D2  $U=1$ ;  $p<0,05$ ). Co więcej w tym czasie podczas prób w dniu 1 ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) i 3 MWM ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ) szczury STZ IGF-1 HR płynęły dłużej do platformy niż osobniki VEH SAL HR. Podczas późnej (dni 99-101 sAD) fazy sAD w dniu 3 MWM to osobniki STZ IGF-1 HR płynęły dłużej do platformy niż gryzonie STZ SAL HR ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ).

Podczas bardzo wczesnej fazy sAD szczury z grupy STZ IGF-1 LR płynęły dłużej do platformy niż zwierzęta STZ SAL LR podczas dni 1 i 3 MWM oraz dłużej niż gryzonie VEH SAL LR podczas dni 1-3 MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Z kolei w tym czasie choroby, podczas dni 1-3 MWM, gryzonie STZ SAL LR płynęły dłużej do platformy niż osobniki VEH SAL LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej fazy sAD w dniu 1 i 2 MWM zwierzęta STZ IGF-1 LR płynęły dłużej do platformy niż grupy: STZ SAL LR (D1  $U=0$ ;  $p<0,05$ ; D2  $U=1$ ;  $p<0,05$ ) i VEH SAL LR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ), a zwierzęta STZ SAL LR dłużej niż osobniki VEH SAL LR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas późnej fazy sAD w dniu 1 MWM osobniki STZ SAL LR płynęły krócej do platformy niż grupa STZ IGF-1 LR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Na tym etapie choroby w dniu 2 MWM zwierzęta STZ SAL LR płynęły dłużej do platformy niż grupa VEH SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ), a w dniu 1 ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) i 3 MWM ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ) osobniki STZ IGF-1 LR płynęły dłużej niż zwierzęta VEH SAL LR.

Tabela 7. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), charakterystyki behawioralnej oraz etapu rozwoju choroby na latencję dopłynięcia do platformy podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej w dniach 1-3 labiryntu wodnego Morrisa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dni 16-18 sAD), wczesnej (WF, dni 54-56 sAD) oraz późnej (PF, dni 99-101 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa	Etap	Dzień 1 (s)	Dzień 2 (s)	Dzień 3 (s)	
Bazalne HR	BAZALNE	51,65±23,49	3,41±1,56 <sup>!!!</sup>	4,15±1,66 <sup>!!!</sup>	
Bazalne LR		62,58±31,56	3,79±1,68 <sup>!!!</sup>	3,65±1,57 <sup>!!!</sup>	
STZ SAL HR	BWF sAD	21,5±7,44 <sup>@@S</sup>	21,05±7,46 <sup>@@S</sup>	29,90±13,97 <sup>@@S</sup>	
STZ SAL LR		17,65±4,11 <sup>@@S</sup>	35,4±17,56 <sup>@@S</sup>	24,45±11,44 <sup>@@S</sup>	
STZ IGF-1 HR		14,8±3,6 <sup>@^</sup>	9±4,26 <sup>@*^</sup>	5,5±1,45 <sup>*1</sup>	
STZ IGF-1 LR		68,15±23,78 <sup>#*^S</sup>	67±26,29 <sup>#@@^S</sup>	81,45±14,54 <sup>#@@*^S</sup>	
VEH SAL HR		8,25±3,08 <sup>@@</sup>	8±2,90 <sup>@@</sup>	8,2±3,04 <sup>@</sup>	
VEH SAL LR		7,10±2,43 <sup>@@</sup>	4,6±0,85 <sup>1</sup>	4,65±0,79 <sup>1</sup>	
VEH IGF-1 HR		29,65±4,02 <sup>S</sup>	25,05±7,29 <sup>@@S</sup>	9±3,67 <sup>@!?</sup>	
VEH IGF-1 LR		7,35±3,60 <sup>#@@</sup>	14,1±4,69 <sup>@@S</sup>	6,25±2,09 <sup>@</sup>	
STZ SAL HR		WF sAD	15,3±6,61 <sup>@@S</sup>	5,45±1,52 <sup>@S%! </sup>	4,65±1,86 <sup>%!</sup>
STZ SAL LR			14,05±3,91 <sup>@@S</sup>	6,9±1,59 <sup>@S%! </sup>	5,3±1,57 <sup>%!</sup>
STZ IGF-1 HR	15,65±1,69 <sup>@^S</sup>		5,15±2,09 <sup>1</sup>	7,65±1,02 <sup>@@*^S%! </sup>	
STZ IGF-1 LR	71,9±28,86 <sup>#*^S</sup>		14,35±6,05 <sup>#@@*^S%! </sup>	6,1±2,10 <sup>@%! </sup>	
VEH SAL HR	4,7±1,04 <sup>@@</sup>		3,2±1,23 <sup>%</sup>	4,2±1,86	
VEH SAL LR	4,65±1,36 <sup>@@</sup>		3,4±1,21	4±2,17	
VEH IGF-1 HR	5,05±0,72 <sup>@@%</sup>		3,95±1,42 <sup>%</sup>	3,7±1,47	
VEH IGF-1 LR	4,9±0,74 <sup>@@</sup>		5,65±2,7 <sup>%</sup>	4,1±0,87 <sup>@</sup>	
STZ SAL HR	PF sAD		5,3±2,28 <sup>@@%&amp;</sup>	7,75±3,58 <sup>@%</sup>	4,7±1,55 <sup>%</sup>
STZ SAL LR			4,7±1,68 <sup>@@%&amp;</sup>	6,1±1,79 <sup>@S%</sup>	4,5±2,13 <sup>%</sup>
STZ IGF-1 HR		7,9±3,95 <sup>@@&amp;</sup>	4,55±0,64 <sup>%</sup>	8,55±2,70 <sup>@@*</sup>	
STZ IGF-1 LR		8,7±1,04 <sup>@@*^S%&amp;</sup>	7,25±3,41 <sup>@%</sup>	6,4±2,87 <sup>@^S%</sup>	

VEH SAL HR		4,65±1,91 <sup>@@</sup>	3,95±2,72	3,75±1,71
VEH SAL LR		3,85±2,12 <sup>@@</sup>	3,4±1,70	2,6±0,91 <sup>%</sup>
VEH IGF-1 HR		5,1±2,27 <sup>@%</sup>	6±3,02 <sup>%</sup>	5,95±2,39
VEH IGF-1 LR		4,95±2,43 <sup>@@</sup>	3,8±2,07 <sup>%</sup>	2,6±0,43 <sup>%%&amp;</sup>

Objaśnienia: #-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \$-p<0,05 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05; różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; @-p<0,05; @@-p<0,01 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD; !-p<0,05; !!!-p<0,001 różnice istotne statystycznie do próby w dniu 1; ?-p<0,05 różnice istotne statystycznie do próby w dniu 2. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.3.1.2. Procent czasu spędzony w kwadrancie krytycznym podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej (dni 1-3 MWM)

Jak pokazano w **tabeli 8** procent czasu spędzony w kwadrancie krytycznym podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej różnił się pomiędzy osobnikami HR i LR. U zwierząt z grupy STZ SAL podczas bardzo wczesnej (dni 16-18 sAD) fazy sAD to osobniki LR spędziły większy % czasu w kwadrancie krytycznym niż osobniki HR podczas 1 (U=0; p<0,05) i 3 (U=1; p<0,05) dnia MWM, natomiast w grupie STZ IGF-1 stwierdzono, że to zwierzęta HR przebywały dłużej w krytycznym kwadrancie basenu niż osobniki LR w czasie dnia 1 i 3 MWM (w obu porównaniach U=0; p<0,05). Podczas tego etapu choroby w dniu 1 MWM to zwierzęta LR spędziły większy % czasu w badanym kwadrancie niż szczury HR w grupie VEH IGF-1 (U=0; p<0,05). Dodatkowo podczas bardzo wczesnej fazy sAD szczury VEH SAL LR odznaczał wyższy % czasu spędzony w kwadrancie krytycznym niż szczury VEH SAL HR w dniu 2 i 3 MWM (w obu porównaniach: U=0, p<0,05). Podczas wczesnej (dni 54-56 sAD) fazy sAD to osobniki HR spędziły większy % czasu w kwadrancie krytycznym niż szczury LR w dniu 1 MWM w grupie STZ IGF-1 (U=1; p<0,05). Podczas późnej (dni 99-101 sAD) fazy sAD osobniki STZ IGF-1 HR charakteryzował wyższy % czasu spędzony w kwadrancie krytycznym niż osobniki STZ IGF-1 LR (U=1; p<0,05) w dniu 3 MWM.

Podczas bardzo wczesnej fazy sAD w dniu 2 i 3 MWM to osobniki STZ IGF-1 HR spędziły większy % czasu w kwadrancie krytycznym niż szczury STZ SAL HR (w obu porównaniach U=0; p<0,05). Natomiast osobniki VEH SAL HR charakteryzowały się większym % czasu spędzonym w kwadrancie krytycznym niż grupa STZ SAL HR w dniach

1-3 MWM (U=1; p<0,05) podczas bardzo wczesnego etapu sAD. W dniu 3 MWM osobniki STZ IGF-1 HR spędziły dłuższy czas w kwadrancie krytycznym niż osobniki VEH SAL HR (U=0; p<0,05) podczas tego etapu choroby. Podczas późnej fazy sAD w dniu 3 MWM gryzonie VEH SAL HR spędziły większy % czasu w badanym kwadrancie basenu niż osobniki STZ SAL HR (U=0; p<0,05).

Osobniki LR podczas bardzo wczesnej fazy sAD, w dniu 1 i 3 MWM, z grupy STZ SAL spędziły większy % czasu w kwadrancie krytycznym niż gryzonie STZ IGF-1 (w obu porównaniach U=0; p<0,05). Natomiast w dniu 2 i 3 MWM na tym etapie choroby to grupa VEH SAL LR spędziła więcej czasu w badanym kwadrancie niż osobniki STZ SAL LR (w obu porównaniach U=0; p<0,05). Ponadto grupę STZ IGF-1 LR podczas bardzo wczesnej fazy sAD charakteryzował niższy % czasu spędzany w kwadrancie krytycznym niż szczury VEH SAL LR w dniach 1-3 MWM (dni 1 i 3 U=0; p<0,05; dzień 2 U=1; p<0,05). Podczas wczesnej fazy sAD w dniu 2 MWM to osobniki VEH SAL LR spędziły większy % czasu w badanym kwadrancie niż osobniki STZ SAL LR (U=0; p<0,05). W dniu 1 MWM to osobniki STZ IGF-1 LR spędziły niższy % czasu w kwadrancie krytycznym niż gryzonie VEH SAL LR (w obu porównaniach U=0; p<0,05). Podczas późnej fazy sAD w dniu 2 MWM osobniki VEH SAL LR charakteryzowały się wyższym % czasu spędzonym w kwadrancie krytycznym basenu niż grupa STZ SAL LR (U=1; p<0,05). Co więcej grupa STZ IGF-1 LR spędziła niższy % czasu w kwadrancie krytycznym niż osobniki VEH SAL LR w dniu 1 (U=1; p<0,05) oraz w dniu 3 MWM (U=0; p<0,05).

Tabela 8. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), charakterystyki behawioralnej oraz etapu rozwoju choroby na % czasu spędzonego w kwadrancie krytycznym podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej w dniach 1-3 labiryntu wodnego Morrisa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dni 16-18 sAD), wczesnej (WF, dni 54-56 sAD) oraz późnej (PF, dni 99-101 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimer'a u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa	Etap	Dzień 1 (s)	Dzień 2 (s)	Dzień 3 (s)	
Bazalne HR	BAZALNE	40,10±9,51	83,81±12,87 <sup>!!!</sup>	78,86±12,25 <sup>!!!</sup>	
Bazalne LR		35,50±7,35	76,55±11,11 <sup>!!!</sup>	80,18±8,93 <sup>!!!</sup>	
STZ SAL HR	BWF sAD	31,98±2,75 <sup>s</sup>	32,74±2,68 <sup>@@s</sup>	30,83±3,57 <sup>@@s</sup>	
STZ SAL LR		42,71±1,21 <sup>#@</sup>	38,86±7,54 <sup>@@s</sup>	37,61±2,74 <sup>#@*s!</sup>	
STZ IGF-1 HR		43,34±10,54	55,71±7,54 <sup>@*^</sup>	62,99±8,07 <sup>@*s!</sup>	
STZ IGF-1 LR		22,94±5,09 <sup>#*^s</sup>	44,75±12,64 <sup>@*s!</sup>	31,50±1,63 <sup>#*^s!</sup>	
VEH SAL HR		51,90±15,57	45,73±8,74 <sup>@@</sup>	41,74±7,17 <sup>@@</sup>	
VEH SAL LR		47,71±7,04 <sup>@</sup>	67,88±9,60 <sup>#!</sup>	66,95±8,90 <sup>#@!</sup>	
VEH IGF-1 HR		37,99±4,76	42,58±8,80 <sup>@@</sup>	52,90±16,06 <sup>@@</sup>	
VEH IGF-1 LR		59,78±13,85 <sup>#*^@</sup>	51,75±7,63 <sup>@@s</sup>	66,25±21,34	
STZ SAL HR		WF	40,09±9,29	64,25±16,34 <sup>@%!</sup>	66,15±8,08 <sup>%!</sup>

STZ SAL LR	sAD	39,13±11,99	57,64±1,84 <sup>@\$%! </sup>	66,72±1,50 <sup>@@%!? </sup>
STZ IGF-1 HR		41,30±10,36 <sup>^</sup>	62,9±2,88 <sup>@%!</sup>	59,05±7,07 <sup>@!</sup>
STZ IGF-1 LR		28,79±4,62 <sup>#*\$</sup>	63,97±16,38 <sup>!</sup>	60,22±10,40 <sup>@%!</sup>
VEH SAL HR		49,73±10,24	67,99±12,10 <sup>@%!</sup>	67,37±13,35 <sup>%</sup>
VEH SAL LR		64,45±12,02 <sup>@@</sup>	75,78±15,34	70,01±4,14 <sup>@</sup>
VEH IGF-1 HR		61,69±8,50 <sup>@%&amp;</sup>	61,70±11,05 <sup>@%&amp;</sup>	58,46±9,20 <sup>@@</sup>
VEH IGF-1 LR		71,51±10,19 <sup>@@</sup>	70,66±6,95 <sup>%</sup>	72,76±10,27
STZ SAL HR		66,93±9,47 <sup>@%&amp;</sup>	62,67±17,74 <sup>@%</sup>	72,19±2,03 <sup>\$% </sup>
STZ SAL LR	PF sAD	64,67±13,41 <sup>@%&amp;</sup>	58,68±11,11 <sup>@\$% </sup>	73,90±8,85 <sup>%?</sup>
STZ IGF-1 HR		56,93±6,48 <sup>@%&amp;</sup>	69,19±4,11 <sup>@%!</sup>	75,88±4,10 <sup>%&amp;!?</sup>
STZ IGF-1 LR		56,79±8,66 <sup>@\$%&amp;</sup>	70,12±6,71 <sup>%</sup>	68,00±6,34 <sup>#@^\$% </sup>
VEH SAL HR		66,51±10,80 <sup>@@&amp;</sup>	76,70±10,89 <sup>%</sup>	81,75±1,70 <sup>%!</sup>
VEH SAL LR		73,59±10,31 <sup>@%&amp;</sup>	76,18±8,16	79,17±4,42 <sup>&amp;</sup>
VEH IGF-1 HR		73,17±4,41 <sup>@%&amp;</sup>	72,87±3,04 <sup>%</sup>	80,28±5,24 <sup>%&amp;?</sup>
VEH IGF-1 LR		62,37±19,18 <sup>@@</sup>	71,45±14,65	77,75±4,57

Objaśnienia: #-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \$-p<0,05 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; @-p<0,05; @@-p<0,01 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD; !-p<0,05; !!!-p<0,001 różnice istotne statystycznie do próby w dniu 1; ?-p<0,05 różnice istotne statystycznie do próby w dniu 2. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.3.1.3.Przeplnięty całkowity dystans podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej (dni 1-3 MWM)

Jak pokazano w **tabeli 9** całkowity pokonany dystans różnił się pomiędzy osobnikami HR i LR podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej. Podczas bardzo wczesnej (dni 16-18 sAD) fazy choroby w dniach 1-3 MWM w grupie STZ IGF-1 to osobniki LR pokonały dłuższy dystans niż zwierzęta HR (we wszystkich porównaniach U=0; p<0,05). Na tym etapie sAD w dniu 2 i 3 MWM w grupie VEH SAL to osobniki HR przeplnęły dłuższy dystans (w obu porównaniach U=0; p<0,05) niż szczury LR. Co więcej w grupie VEH IGF-1 w dniu 1 MWM również osobniki HR przeplnęły dłuższy całkowity dystans niż szczury LR (U=1; p<0,05). Podczas wczesnego (dni 54-56 sAD) etapu sAD w dniu 1 MWM w grupie STZ IGF-1 to osobniki LR przeplnęły dłuższy dystans niż zwierzęta HR (U=1; p<0,05), z kolei w grupie VEH IGF-1 to osobniki HR pokonały dłuższy dystans niż szczury LR (U=0; p<0,05).

Podczas bardzo wczesnej fazy sAD osobniki STZ SAL HR przeplnęły dłuższy całkowity dystans niż zwierzęta STZ IGF-1 HR w dniach 1-3 MWM (we wszystkich porównaniach U=0; p<0,05) oraz grupa VEH SAL HR w dniach 1-3 MWM (dni 1-2 U=0;

p<0,05; dzień 3 U=1; p<0,05). Podczas wczesnej fazy sAD osobniki STZ IGF-1 HR pokonały dłuższy dystans niż zwierzęta: STZ SAL HR w dniu 3 (U=1; p<0,05) oraz VEH SAL HR w dniu 2 i 3 MWM (w obu porównaniach U=1; p<0,05). Podczas późnej fazy sAD grupa STZ IGF-1 HR charakteryzowała się dłuższym przepłyniętym dystansem niż szczury STZ SAL HR w dniu 1 (U=1; p<0,05) i 3 MWM (U=0; p<0,05).

Osobniki LR podczas bardzo wczesnej fazy sAD z grupy STZ IGF-1 pokonały dłuższy całkowity dystans niż osobniki STZ SAL (we wszystkich porównaniach U=1; p<0,05) i VEH SAL podczas dni 1-3 MWM (we wszystkich porównaniach U=0; p<0,05). Na tym etapie choroby osobniki VEH SAL LR pokonały krótszy dystans niż szczury STZ SAL LR w dniach 1-3 MWM (we wszystkich porównaniach U=0; p<0,05). Podczas wczesnej fazy sAD szczury STZ IGF-1 LR pokonały dłuższy dystans niż zwierzęta: STZ SAL LR podczas dnia 1 MWM (U=0; p<0,05) i VEH SAL w dniu 1 MWM (U=0; p<0,05). Na tym etapie choroby gryzonie STZ SAL LR przepłynęły dłuższy dystans niż grupa VEH SAL LR w dniach 1 (U=0; p<0,05) i 2 MWM (U=1; p<0,05). Podczas późnej (dni 99-100 sAD) fazy sAD osobniki VEH SAL LR pokonały krótszy dystans niż szczury: STZ SAL LR w dniu 2 MWM (U=1; p<0,05) i STZ IGF-1 LR w dniu 2 i 3 MWM (w obu porównaniach U=1; p<0,05).

Tabela 9. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), charakterystyki behawioralnej oraz etapu rozwoju choroby na przepłynięty całkowity dystans podczas nabywania referencyjnej pamięci przestrzennej w dniach 1-3 labiryntu wodnego Morrisa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dni 16-18 sAD), wczesnej (WF, dni 54-56 sAD) oraz późnej (PF, dni 99-101 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa	Etap	Dzień 1 (cm)	Dzień 2 (cm)	Dzień 3 (cm)	
Bazalne HR	BAZALNE	1330,32±660,53	96,84±33,71 <sup>!!!</sup>	127,02±48,84 <sup>!!!</sup>	
Bazalne LR		1520,06±619,67	101,89±24,91 <sup>!!!</sup>	98,17±23,15 <sup>!!!</sup>	
STZ SAL HR	BWF sAD	374,86±65,11 <sup>@@S</sup>	403,06±76,10 <sup>@@S</sup>	571,49±264,87 <sup>@@S</sup>	
STZ SAL LR		371,81±132,63 <sup>@@S</sup>	823,06±386,44 <sup>@@S</sup>	707,51±331,33 <sup>@@S</sup>	
STZ IGF-1 HR		217,34±17,31 <sup>@@*</sup>	202,61±36,16 <sup>@@*^</sup>	155,47±29,72 <sup>*!</sup>	
STZ IGF-1 LR		994,54±443,03 <sup>#**^S</sup>	1306,82±184,64 <sup>#@@**^S</sup>	1261,58±224,15 <sup>#@@**^S</sup>	
VEH SAL HR		218,74±57,80 <sup>@@</sup>	224,16±60,78 <sup>@@</sup>	241,86±75,02 <sup>@</sup>	
VEH SAL LR		138,90±37,55 <sup>@@</sup>	98,53±4,30 <sup>#</sup>	85,56±6,30 <sup>#!?</sup>	
VEH IGF-1 HR		476,69±226,44 <sup>@@</sup>	460,89±222,43 <sup>@@S</sup>	158,19±32,51 <sup>?</sup>	
VEH IGF-1 LR		144,09±33,73 <sup>#@@</sup>	293,92±105,74 <sup>@@S</sup>	119,18±29,67 <sup>?</sup>	
STZ SAL HR		WF sAD	261,29±74,21 <sup>@@%</sup>	140,62±51,37 <sup>%</sup>	119,70±20,11 <sup>%!</sup>
STZ SAL LR			295,85±73,19 <sup>@@S</sup>	178,53±65,02 <sup>@@S%!</sup>	140,16±25,43 <sup>@@%!</sup>
STZ IGF-1 HR	373,84±113,17 <sup>@@^%</sup>		172,09±28,12 <sup>@@^S!</sup>	166,12±23,23 <sup>**S!</sup>	
STZ IGF-1 LR	1220,27±707,12 <sup>#**^S</sup>		312,87±144,72 <sup>@@^%!</sup>	162,73±61,21 <sup>@@^%!</sup>	
VEH SAL HR	228,24±120,69 <sup>@@</sup>		123,31±25,43 <sup>%</sup>	123,27±14,01 <sup>%</sup>	
VEH SAL LR	126,98±15,11 <sup>@@</sup>		104,11±34,92	109,90±17,36 <sup>%</sup>	
VEH IGF-1 HR	138,94±13,01 <sup>@@%</sup>		122,47±15,27 <sup>%</sup>	107,60±18,22 <sup>!</sup>	
VEH IGF-1 LR	101,48±18,19 <sup>#@@</sup>		106,13±21,63 <sup>%</sup>	97,27±18,34	

STZ SAL HR	PF sAD	129,24±9,90@@%&	169,35±53,64@@@%	120,75±6,64% <sup>?</sup>
STZ SAL LR		150,08±44,68@@%&	208,75±72,14@@@%	169,92±73,65@@@%
STZ IGF-1 HR		168,99±30,61@@*%&	127,78±15,99@%!	206,84±77,62@* <sup>^</sup>
STZ IGF-1 LR		183,26±57,37@@%&	169,00±52,45@@@%	156,63±57,97@% <sup>\$</sup>
VEH SAL HR		134,57±30,76@@	141,01±72,59	120,69±27,92
VEH SAL LR		113,73±30,14@@	107,75±24,50	101,34±13,31
VEH IGF-1 HR		111,68±6,17@@%&	118,70±6,67% <sup>!</sup>	125,83±26,43
VEH IGF-1 LR		179,81±75,10@@	120,16±35,88% <sup>!</sup>	105,60±16,67

Objaśnienia: #-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \$-p<0,05 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; @-p<0,05; @@-p<0,01 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD; !-p<0,05; !!!-p<0,001 różnice istotne statystycznie do próby w dniu 1; ?-p<0,05 różnice istotne statystycznie do próby w dniu 2. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.3.2.Odtwarzanie referencyjnej pamięci przestrzennej-próba z usuniętą platformą (probe test, dzień 4 MWM)

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa (df1=25, df2=135, p<0,001) wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami zwierząt: w latencji (H=100,67) dopłynięcia do miejsca, w którym powinna znajdować się platforma, % czasu spędzonym w kwadrancie krytycznym (H=77,06) oraz pokonanym całkowitym dystansie (H=60,27) w czasie próby z usuniętą platformą.

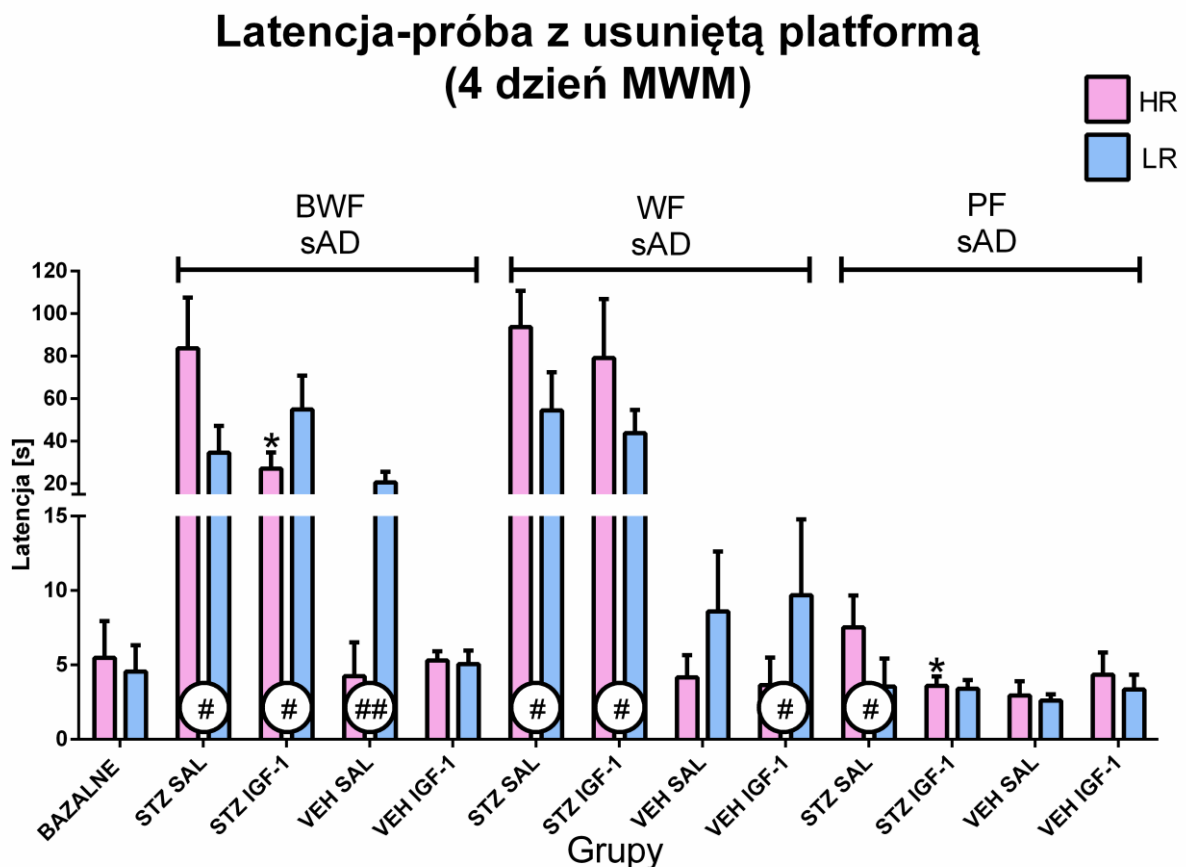
#### 3.2.3.2.1.Latencja dopłynięcia do miejsca, w którym powinna znajdować się platforma podczas odtwarzania referencyjnej pamięci przestrzennej-próba z usuniętą platformą (probe test, dzień 4 MWM)

Podczas próby z usuniętą platformą (probe test) czas dopłynięcia do miejsca, w którym powinna znajdować się platforma (**rycina 8, tabela 10a**) różnił się pomiędzy osobnikami HR i LR. Podczas bardzo wczesnej (dzień 19 sAD) fazy sAD w grupie STZ SAL (U=0; p<0,05) to osobniki HR płynęły dłużej do tego miejsca niż szczury LR, a w grupach: STZ IGF-1 (U=0; p<0,05) i VEH SAL (U=0; p<0,01) to latencja dopłynięcia była dłuższa u osobników LR w porównaniu ze zwierzętami HR. Podczas wczesnej (dzień 57 sAD) fazy sAD w grupach STZ SAL (U=1; p<0,05) i STZ IGF-1 (U=0; p<0,05) to osobniki HR charakteryzowały się dłuższą

latencją niż szczury LR, a w grupie VEH IGF-1 stwierdzono, że to osobniki LR płynęły dłużej do miejsca w którym powinna znajdować się platforma w porównaniu ze zwierzętami HR z tej grupy (U=2; p<0,05). Podczas późnego (dzień 102 sAD) etapu sAD, w grupie STZ SAL to osobniki HR charakteryzowały się dłuższą latencją niż szczury LR (U=2; p<0,05).

W obrębie bardzo wczesnego etapu sAD osobniki HR z grupy STZ SAL charakteryzowały się dłuższym czasem dopłynięcia do miejsca, w którym powinna znajdować się platforma niż szczury STZ IGF-1 i VEH SAL, a z kolei szczury STZ IGF-1 odznaczały się dłuższą latencją niż grupy: VEH IGF-1 i VEH SAL (we wszystkich porównaniach U=0; p<0,05). Podczas wczesnej fazy sAD osobniki STZ SAL HR i STZ IGF-1 HR odznaczały się dłuższą latencją niż szczury VEH SAL HR (w obu porównaniach U=0; p<0,01). Podczas późnej fazy sAD osobniki STZ SAL HR charakteryzowały się dłuższą latencją niż grupa STZ IGF-1 HR (U=2; p<0,05) i VEH SAL HR (U=1; p<0,05).

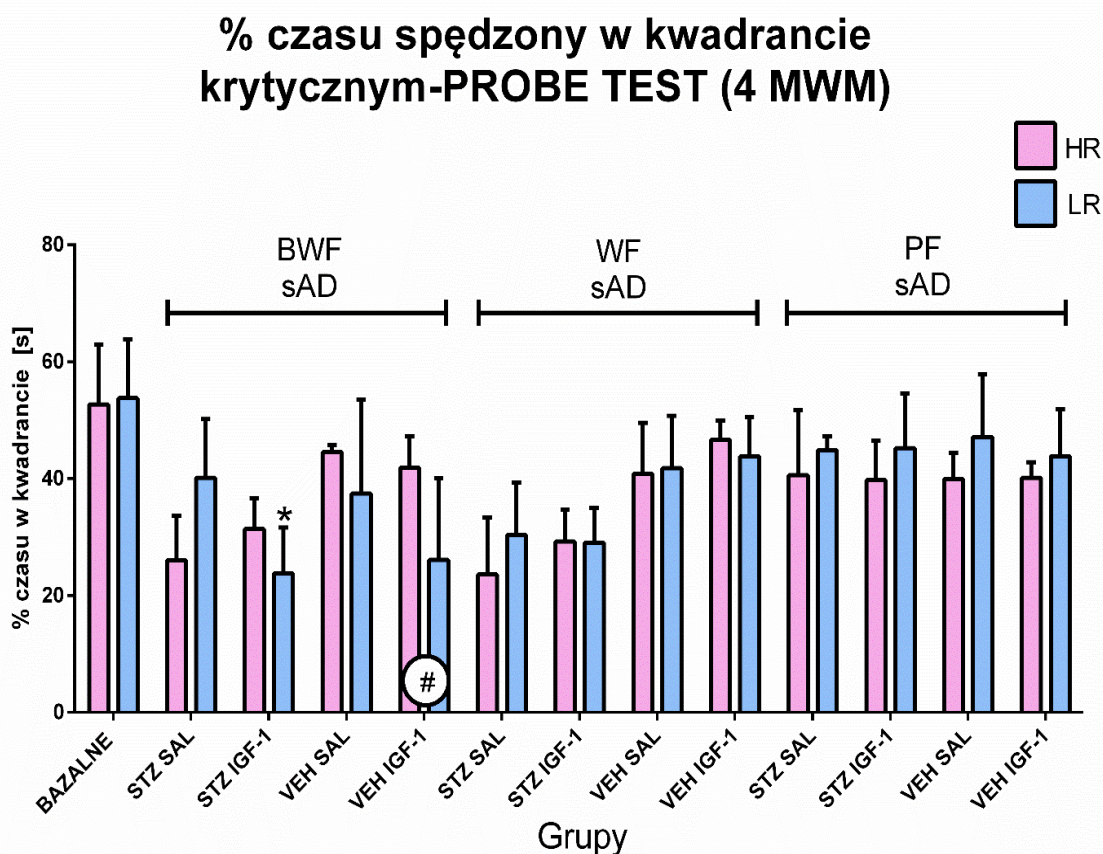
Osobniki LR podczas bardzo wczesnej fazy sAD z grup: STZ SAL i STZ IGF-1 odznaczały się dłuższą latencją niż grupa VEH SAL (odpowiednio U=2; p<0,05; U=0; p<0,01). Podczas wczesnej fazy choroby dłuższa latencja dopłynięcia została stwierdzona u osobników STZ SAL LR w porównaniu do grupy VEH SAL LR oraz w grupie STZ IGF-1 LR w stosunku do zwierząt VEH SAL LR (U=0; p<0,01).



Rycina 8. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na latencję dopłynięcia do miejsca, w którym powinna znajdować się platforma w trakcie testu z usuniętą platformą w labiryncie wodnym Morrisa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 19 sAD), wczesnej (WF, dzień 57 sAD) oraz późnej (PF, dzień 102 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objasnienia: #-p<0,05; ##-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.3.2.2. Procent czasu spędzony w kwadrancie krytycznym podczas odtwarzania referencyjnej pamięci przestrzennej-próba z usuniętą platformą (probe test, 4 dzień MWM)

Procent czasu spędzony w kwadrancie krytycznym (rycina 9, tabela 10b) w trakcie próby z usuniętą platformą różnił się pomiędzy osobnikami HR i LR. Podczas bardzo wczesnej (dzień 19 sAD) fazy sAD osobniki HR charakteryzował wyższy % czasu spędzony w kwadrancie krytycznym niż szczury LR w grupie VEH IGF-1 (U=0; p<0,05).



Rycina 9. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na procent czasu spędzonego w kwadrancie krytycznym w trakcie testu z usuniętą platformą w labiryncie wodnym Morrisa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 19 sAD), wczesnej (WF, dzień 57 sAD) oraz późnej (PF, dzień 102 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objaśnienia: #- $p < 0,05$  różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \*- $p < 0,05$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

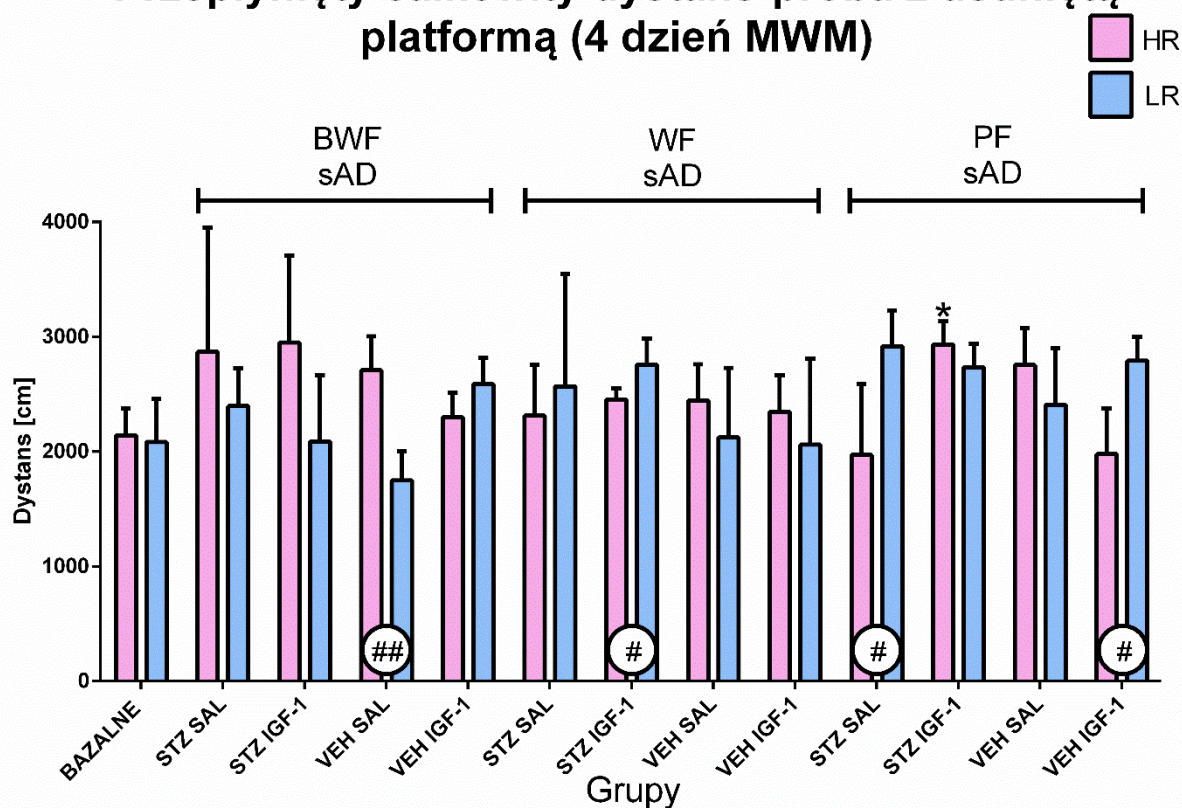
Osobniki HR podczas bardzo wczesnej i wczesnej (dzień 57 sAD) fazy sAD z grupy VEH SAL odznaczał wyższy % czasu spędzony w badanym kwadrancie niż osobniki STZ SAL i STZ IGF-1 (bardzo wczesna faza w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p < 0,05$ ; wczesna faza w obu porównaniach  $U=2$ ;  $p < 0,05$ ).

Osobniki LR podczas bardzo wczesnej fazy choroby z grupy STZ IGF-1 charakteryzował niższy % czasu spędzony w kwadrancie krytycznym w porównaniu ze zwierzętami STZ SAL ( $U=1$ ;  $p < 0,05$ ). W czasie wczesnej fazy sAD osobniki STZ IGF-1 LR charakteryzował niższy badany % czasu niż zwierzęta VEH SAL LR ( $U=2$ ;  $p < 0,05$ ).

### **3.2.3.2.3. Całkowity dystans przeplnięty podczas odtwarzania referencyjnej pamięci przestrzennej-próba z usuniętą platformą (probe test, dzień 4 MWM)**

Całkowity dystans pokonany (rycina 10, tabela 10c) podczas próby z usuniętą platformą (probe test) różnił się pomiędzy osobnikami HR i LR. Podczas bardzo wczesnej (dzień 19 sAD) fazy sAD w grupie VEH SAL to osobniki HR pokonały dłuższy dystans niż zwierzęta LR ( $U=0$ ;  $p < 0,01$ ). Podczas wczesnej (dzień 57 sAD) fazy sAD w grupie STZ IGF-1 to osobniki LR pokonały dłuższy dystans niż szczury HR ( $U=0$ ;  $p < 0,05$ ). Podczas późnej (dzień 102 sAD) fazy sAD osobniki LR pokonały dłuższy całkowity dystans niż szczury HR w grupach: STZ SAL ( $U=1$ ;  $p < 0,05$ ) oraz VEH IGF-1 ( $U=0$ ;  $p < 0,05$ ).

## Przepląnięty całkowity dystans-próba z usuniętą platformą (4 dzień MWM)



Rycina 10. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na przepłynięty całkowity dystans w trakcie testu z usuniętą platformą w labiryncie wodnym Morrisa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 19 sAD), wczesnej (WF, dzień 57 sAD) oraz późnej (PF, dzień 102 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objasnienia: #- $p < 0,05$ ; ##- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \*- $p < 0,05$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

W czasie późnej fazy sAD osobniki VEH SAL HR pokonały dłuższy całkowity dystans niż szczury STZ SAL HR ( $U=2$ ;  $p < 0,05$ ). Natomiast osobniki STZ IGF-1 HR przepląnęły dłuższy dystans niż szczury STZ SAL HR ( $U=1$ ;  $p < 0,05$ ). Na bardzo wczesnym etapie sAD to osobniki VEH SAL LR pokonały krótszy dystans niż gryzonie STZ SAL LR ( $U=0$ ;  $p < 0,01$ ).

Tabela 10. Wpływ etapu rozwoju choroby na (a) latencję dopłynięcia do miejsca, w którym powinna znajdować się platforma, (b) procent czasu spędzony w kwadrancie krytycznym oraz (c) przepłynięty całkowity dystans w trakcie próby z usuniętą platformą (probe test) w labiryncie wodnym Morrisa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dzień 19 sAD), wczesnej (WF, dzień 57 sAD) oraz późnej (PF, dzień 102 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera

u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa	Etap	a.Latencja (s)	b.% czasu (s)	c.Dystans (cm)	
Bazalne HR	BAZALNE	5,48±2,46	52,69±10,27	2140,76±235,22	
Bazalne LR		4,56±1,77	53,76±10,04	2083,12±377,71	
STZ SAL HR	BWF sAD	83,65±23,92@@	26,04±7,60@@	2869,94±1082,29	
STZ SAL LR		34,65±12,56@@	40,13±10,05@	2397,34±331,19	
STZ IGF-1 HR		27,15±7,55@@	31,40±5,24@@	2950,23±758,60@	
STZ IGF-1 LR		54,9±15,93@@	23,78±7,85@@	2086,44±579,30	
VEH SAL HR		4,25±2,26	44,52±1,18	2710,01±293,18@@	
VEH SAL LR		20,64±4,99@@@	37,47±16,03@	1748,70±254,75	
VEH IGF-1 HR		5,3±0,62	41,88±5,35@	2298,54±215,30	
VEH IGF-1 LR		5,05±0,91	26,13±13,98@@	2588,09±231,26@	
STZ SAL HR		WF sAD	93,7±17,01@@	23,58±9,78@@	2315,68±443,57
STZ SAL LR			54,45±17,99@@	30,33±9@@	2568,67±979,72
STZ IGF-1 HR	79,1±27,79@@@%		29,26±5,40@@	2454,29±95,51@@	
STZ IGF-1 LR	43,8±10,96@@		29,04±5,95@@	2758,44±225,79@@@%	
VEH SAL HR	4,16±1,49		40,83±8,72@	2444,41±315,76@	
VEH SAL LR	8,16±4,02@%		41,8±8,95@	2124,85±605,16	
VEH IGF-1 HR	3,65±1,84		46,67±3,29	2346,17±317,35	
VEH IGF-1 LR	9,68±5,10@		43,8±6,77@%	2061,44±746,99	
STZ SAL HR	PF sAD	7,52±2,15%%&	40,6±11,16@%&	1971,59±616,10	
STZ SAL LR		3,55±1,88%&	44,88±2,32&	2916,70±314,19@@@%	
STZ IGF-1 HR		3,6±0,63%&	39,75±6,28@&	2933,04±201,21@@&	
STZ IGF-1 LR		3,4±0,59%&	45,24±9,33%&	2736,64±202,09@@	
VEH SAL HR		2,95±0,96@	39,92±4,51@	2753,61±323,89@@	
VEH SAL LR		2,6±0,43@%&&	47,13±10,67	2408,01±491,60%	
VEH IGF-1 HR		4,35±1,48	40,13±2,71@@&	1978,89±399,99	
VEH IGF-1 LR		3,35±1%&	43,88±7,93%	2792,01±209,81@@&&	

Objaśnienia: @-p<0,05; @@-p<0,01; @@@-p<0,001 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05; %%-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &-p<0,05; &&-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.3.3. Nabywanie roboczej pamięci przestrzennej (dni 5-8 MWM)

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami szczurów podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej (df1=103; df2=428; p<0,01) w latencji (H=351,23) dopłynięcia do platformy, % czasu (H=343,09) spędzonym w kwadrancie krytycznym oraz pokonanym całkowitym dystansie (H=335,59).

### 3.2.3.3.1 Latencja dopłynięcia do platformy podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej (dni 5-8 MWM)

Latencja dopłynięcia do platformy podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej (tabela 11) różniła się pomiędzy osobnikami HR i LR. Średnia latencja z próby 1 testu MWM była wyższa u osobników LR w porównaniu ze szczurami HR w grupach: VEH IGF-1 podczas bardzo wczesnej (dni 20-23 sAD) fazy i STZ SAL podczas wczesnej (dni 58-61 sAD) fazy sAD, z kolei ta sama średnia u osobników HR była wyższa w stosunku do szczurów LR, w grupach: STZ IGF-1 podczas wczesnej fazy i STZ IGF-1 oraz VEH IGF-1 podczas późnej (dni 103-106 sAD) fazy sAD (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Średnia latencja z drugiej próby testu MWM była wyższa u osobników HR w porównaniu ze zwierzętami LR w grupie VEH IGF-1 podczas późnej fazy choroby ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Średnia latencja z trzeciej próby testu MWM była wyższa u osobników HR w porównaniu ze zwierzętami LR w grupach: STZ IGF-1 podczas bardzo wczesnej fazy sAD i STZ SAL podczas późnej fazy choroby, z kolei średnia ta była wyższa u osobników LR w stosunku do gryzoni HR w grupach: VEH IGF-1 podczas wczesnej fazy sAD i STZ IGF-1 podczas późnej fazy sAD (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Średnia latencja z próby 4 testu MWM była wyższa u gryzoni HR w stosunku do LR w grupach: STZ SAL podczas bardzo wczesnej fazy, wczesnej fazy oraz późnej fazy sAD, a z kolei w grupach: VEH SAL podczas wczesnej fazy i STZ IGF-1 podczas późnej fazy choroby to osobniki LR w stosunku do HR miały wyższą średnią latencję dopłynięcia do platformy (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Osobniki STZ SAL HR podczas bardzo wczesnego etapu sAD charakteryzowała krótsza latencja dopłynięcia do platformy niż grupę VEH SAL HR ( $U=0,05$ ;  $p<0,05$ ) w czasie próby 4 testu MWM. Podczas wczesnej fazy sAD osobniki STZ IGF-1 HR odznaczały się dłuższą latencją niż gryzonie STZ SAL HR w czasie próby 1 ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Z kolei średnia ta podczas 1 próby była wyższa u osobników VEH SAL HR w stosunku do grupy STZ SAL HR, natomiast podczas próby 4 testu MWM stwierdzono, że osobniki STZ SAL HR charakteryzują się wyższą średnią niż grupa VEH SAL HR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Osobniki STZ IGF-1 HR charakteryzowały się dłuższą latencją niż szczury VEH SAL HR podczas próby 3 testu MWM ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) w czasie wczesnego etapu sAD. Podczas późnej fazy choroby zwierzęta STZ IGF-1 HR charakteryzowały się dłuższą latencją niż z szczury STZ SAL HR podczas próby 1, natomiast podczas prób 3 i 4 testu MWM zaobserwowano, że to szczury STZ SAL HR odznaczały się dłuższą latencją niż grupa STZ IGF-1 HR (we wszystkich przypadkach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Co więcej szczury STZ SAL HR odznaczały się dłuższą latencją dopłynięcia do

platformy niż gryzonie VEH SAL HR podczas prób 2-4 testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Osobniki STZ IGF-1 HR odznaczają się dłuższą latencją niż gryzonie VEH SAL HR podczas prób 1-2 testu MWM w czasie późnego etapu sAD ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Podczas bardzo wczesnej fazy sAD osobniki LR z grupy STZ SAL odznaczały się dłuższą latencją niż gryzonie STZ IGF-1 podczas 1 i 3 próby oraz zwierzęta VEH SAL podczas próby 1 testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej fazy sAD osobniki STZ IGF-1 LR odznaczała dłuższa latencja niż szczury STZ SAL LR podczas 3 próby testu MWM ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Osobniki VEH SAL LR odznaczała dłuższa latencja niż szczury STZ SAL LR podczas 4 próby ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ) w czasie wczesnego etapu rozwoju sAD. Z kolei grupa VEH SAL LR charakteryzowała się dłuższą latencją niż szczury STZ IGF-1 LR podczas próby 1 i 4, natomiast podczas próby 3 testu MWM zaobserwowano, że to zwierzęta STZ IGF-1 LR charakteryzowały się dłuższą latencją niż grupa VEH SAL LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ) w czasie tego etapu rozwoju sAD. Podczas późnej fazy sAD osobniki STZ IGF-1 LR odznaczały się dłuższą latencją niż grupa STZ SAL LR podczas 1 i 4 próby, natomiast podczas 2 próby testu MWM stwierdzono, że to szczury STZ SAL LR charakteryzują się dłuższą latencją niż grupa STZ IGF-1 LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Ponadto gryzonie STZ SAL LR odznaczają się dłuższą latencją niż szczury VEH SAL LR podczas próby 2 i 4 testu MWM na tym etapie choroby (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Co więcej osobniki STZ IGF-1 LR charakteryzowały się dłuższą latencją niż szczury VEH SAL LR podczas prób 1-4 testu MWM w czasie późnego etapu rozwoju sAD (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Tabela 11. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), charakterystyki behawioralnej oraz etapu rozwoju choroby na latencję dopłynięcia do platformy podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej w trakcie prób 1-4 labiryntu wodnego Morrissa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dni 20-23 sAD), wczesnej (WF, dni 58-61 sAD) oraz późnej (PF, dni 103-106 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa	Etap	Próba 1 (s)	Próba 2 (s)	Próba 3 (s)	Próba 4 (s)	
Bazalne HR	BAZALNE	47,62±17,97	17,87±8,72 <sup>!!!</sup>	9,11±4,54 <sup>!!!??</sup>	6,14±2,78 <sup>!!!???</sup>	
Bazalne LR		49,68±13,51	12,63±6,30 <sup>!!!</sup>	7,83±3,90 <sup>!!!?</sup>	5,73±1,78 <sup>!!!???</sup>	
STZ SAL HR	BWF sAD	33,95±8,38	37,06±15,01 <sup>@</sup>	30,88±9,26 <sup>@@</sup>	35,53±17,15 <sup>@@S</sup>	
STZ SAL LR		48,22±5,83 <sup>S</sup>	31,68±9,43 <sup>@@!</sup>	18,98±2,03 <sup>@@!?</sup>	14,12±2,03 <sup>#@@!?!(</sup>	
STZ IGF-1 HR		22,40±10,56 <sup>@</sup>	31,52±13,70 <sup>^</sup>	25,97±8,31 <sup>@@^</sup>	27,32±9,17 <sup>@@^</sup>	
STZ IGF-1 LR		19,27±6,62 <sup>@@*^</sup>	19,87±9,30 <sup>^</sup>	14,93±0,81 <sup>#*^</sup>	23,40±11,34 <sup>@@^</sup>	
VEH SAL HR		17,07±9,90 <sup>@@</sup>	23,12±9,13	13,95±5,08	11,68±6,28	
VEH SAL LR		21,68±7,33 <sup>@@</sup>	25,50±12,62 <sup>@</sup>	13,12±6,37	11,27±5,22	
VEH IGF-1 HR		22,93±11,15 <sup>@</sup>	7,84±3,94 <sup>@S</sup>	6,78±2,98	5,30±1,92	
VEH IGF-1 LR		84,55±35,18 <sup>#S</sup>	7,13±2,00 <sup>S</sup>	6,82±1,73	6,03±0,85	
STZ SAL HR		WF SAD	18,80±1,31 <sup>@@@S%</sup>	21,60±10,21	19,93±7,30 <sup>@</sup>	29,80±3,10 <sup>@@S!</sup>
STZ SAL LR			44,81±20,70 <sup>#</sup>	12,09±3,62 <sup>%! </sup>	16,00±7,81 <sup>@</sup>	18,84±0,36 <sup>#@@S%!?</sup>
STZ IGF-1 HR	48,29±17,23 <sup>*^%</sup>		33,21±16,16 <sup>@^</sup>	26,81±7,71 <sup>@@^S</sup>	36,64±17,39 <sup>@@^</sup>	
STZ IGF-1 LR	31,07±1,50 <sup>#@S%</sup>		20,60±9,30 <sup>^</sup>	55,13±24,20 <sup>@@*S%</sup>	19,80±3,50 <sup>@@S</sup>	
VEH SAL HR	37,52±9,08 <sup>%</sup>		14,12±4,10 <sup>!</sup>	12,52±2,31 <sup>!</sup>	16,58±3,00 <sup>@@! (</sup>	
VEH SAL LR	48,53±10,04 <sup>%</sup>		28,00±13,18 <sup>!</sup>	18,00±5,4 <sup>@@!</sup>	31,53±5,85 <sup>#@@%! </sup>	
VEH IGF-1 HR	12,80±6,21 <sup>@@S</sup>		10,23±4,93	3,97±0,15 <sup>@S!?</sup>	4,55±2,15 <sup>S</sup>	
VEH IGF-1 LR	20,43±9,68 <sup>@@S%</sup>		6,52±0,08 <sup>S!</sup>	20,67±9,61 <sup>#@@%?</sup>	11,22±5,28 <sup>S</sup>	
STZ SAL HR	PF sAD	50,90±12,02	45,90±25,75 <sup>@S</sup>	48,08±20,33 <sup>@@S&amp;</sup>	63,22±12,08 <sup>@@S&amp;</sup>	
STZ SAL LR		25,78±9,30 <sup>@@%</sup>	34,80±8,02 <sup>@@S&amp;</sup>	14,68±7,00 <sup>#?</sup>	13,78±6,33 <sup>#S&amp;?</sup>	
STZ IGF-1 HR		84,20±6,70 <sup>@@*^S%&amp;</sup>	18,20±3,10 <sup>^S!</sup>	10,47±2,54 <sup>*%&amp;!?</sup>	12,98±5,69 <sup>*!</sup>	
STZ IGF-1 LR		48,67±6,31 <sup>#*^S%&amp;</sup>	16,60±5,63 <sup>*^S!</sup>	20,07±2,90 <sup>#@@^S%&amp;! </sup>	19,20±0,35 <sup>#@@*^S!</sup>	
VEH SAL HR		17,27±5,52 <sup>@@&amp;</sup>	6,90±2,29 <sup>@%&amp;! </sup>	7,78±1,59 <sup>%&amp;! </sup>	4,30±2,21 <sup>&amp;! </sup>	

<b>VEH SAL LR</b>		27,48±9,25 <sup>@&amp;</sup>	5,45±2,58 <sup>@%&amp;!&amp;</sup>	4,85±2,38 <sup>&amp;!&amp;</sup>	4,02±1,59 <sup>&amp;!&amp;</sup>
<b>VEH IGF-1 HR</b>		48,00±7,40 <sup>\$%&amp;</sup>	47,67±4,31 <sup>@\$@%&amp;</sup>	15,67±9,50 <sup>&amp;!&amp;?&amp;</sup>	16,13±4,80 <sup>@@\$%&amp;!&amp;?&amp;</sup>
<b>VEH IGF-1 LR</b>		29,30±8,65 <sup>#@%&amp;</sup>	26,97±5,25 <sup>#@\$%&amp;</sup>	6,55±2,70 <sup>&amp;!&amp;?&amp;</sup>	21,20±1,11 <sup>@@\$%&amp;</sup>

Objaśnienia: #-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR, w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \$-p<0,05 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05; różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; @-p<0,05; @@-p<0,01; @@@-p<0,001 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &- p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD; !-p<0,05; !!!-p<0,001 różnice istotne statystycznie do próby 1; ?-p<0,05; ??-p<0,01; ???-p<0,001 różnice istotne statystycznie do próby 2; (-p<0,05 różnice istotne statystycznie do próby 3. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.3.3.2. Procent czasu spędzony w kwadrancie krytycznym podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej

Jak pokazano w tabeli 12 % czasu spędzony w kwadrancie krytycznym podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej różnił się pomiędzy osobnikami HR i LR. W warunkach bazalnych podczas próby 2 testu MWM to zwierzęta LR spędziły większy % czasu w badanym kwadrancie w porównaniu ze zwierzętami HR ( $U=47$ ,  $p<0,01$ ). Podczas bardzo wczesnej (dni 20-23 sAD) fazy choroby to osobniki LR w porównaniu ze szczurami HR spędziły więcej czasu w badanym kwadrancie w grupach: STZ SAL podczas próby 1 i 3 oraz VEH IGF-1 podczas próby 1 testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej (dni 58-61 sAD) fazy sAD w grupie STZ SAL w 1 próbie w kwadrancie krytycznym dłużej przebywały zwierzęta LR, a podczas drugiej próby testu MWM zwierzęta HR charakteryzował wyższy % czasu spędzony w tej części basenu (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Z kolei na tym etapie choroby w grupie VEH SAL to osobniki HR dłużej pływały w badanym kwadrancie niż szczury LR podczas 2 i 4 próby testu MWM (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas późnej (dni 103-106 sAD) fazy choroby w kwadrancie krytycznym większy % czasu spędziły: (1) osobniki LR podczas 4 próby w grupie STZ SAL niż gryzonie HR; (2) osobniki HR z grupy STZ IGF-1 podczas prób 3-4 w odniesieniu do zwierząt LR; (3) osobniki LR z grupy VEH SAL podczas 2 próby niż zwierzęta HR; (4) osobniki LR podczas 1 i 2 próby testu MWM w grupie VEH IGF-1 względem szczurów HR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Osobniki HR podczas bardzo wczesnej fazy sAD z grupy STZ IGF-1 spędziły wyższy % czasu w badanym kwadrancie niż szczury STZ SAL podczas 1 i 3 próby, co więcej grupa VEH SAL również odznaczała się wyższym % czasu w stosunku do zwierząt STZ SAL podczas 1 próby testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnego etapu sAD zwierzęta HR z grupy VEH SAL spędziły większy odsetek czasu w kwadrancie krytycznym niż gryzonie STZ SAL podczas 3 próby oraz osobniki STZ IGF-1 podczas 4 próby testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas późnej fazy sAD osobniki STZ SAL HR spędziły więcej czasu w badanym kwadrancie niż gryzonie STZ IGF-1 HR podczas 1 próby, a osobniki STZ IGF-1 HR natomiast większy % czasu niż grupa STZ SAL HR podczas próby 4, co więcej grupa VEH SAL HR spędziła więcej czasu w badanym kwadrancie basenu w porównaniu do grup STZ SAL HR podczas prób 2-4, a także grupy STZ IGF-1 podczas 1 próby testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Osobniki LR podczas wczesnej fazy sAD z grupy STZ IGF-1 spędziły w kwadrancie krytycznym więcej czasu niż osobniki STZ SAL oraz VEH SAL podczas 1 próby, a z kolei grupa STZ SAL spędziła więcej czasu w tym miejscu basenu niż zwierzęta VEH SAL podczas 2 próby testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej fazy sAD to osobniki STZ SAL LR w stosunku do grupy STZ IGF-1 LR spędziły więcej czasu w kwadrancie krytycznym podczas prób 2-3 niż zwierzęta VEH SAL LR podczas prób 1-2 testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas późnej fazy sAD to osobniki STZ SAL LR charakteryzowały się wyższym % czasu spędzonym w badanym kwadrancie niż grupę STZ IGF-1 LR podczas prób 1, 3 i 4, a z kolei grupa VEH SAL LR charakteryzowała się większym odsetkiem czasu spędzonym w tej części basenu w porównaniu z osobnikami STZ SAL LR podczas prób 2-3, a także w porównaniu do osobników STZ IGF-1 LR podczas prób 1-4 testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Tabela 12. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), charakterystyki behawioralnej oraz etapu rozwoju choroby na procent czasu spędzonego w kwadrancie krytycznym podczas badania nabywania roboczej pamięci przestrzennej w trakcie prób 1-4 labiryntu wodnego Morrisa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dni 20-23 sAD), wczesnej (WF, dni 58-61 sAD) oraz późnej (PF, dni 103-106 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa	Etap	Próba 1 (s)	Próba 2 (s)	Próba 3 (s)	Próba 4 (s)
Bazalne HR	BAZALNE	34,51±11,49	57,34±9,24 <sup>!!!</sup>	71,88±10,14 <sup>!!!!???</sup>	78,13±8,37 <sup>!!!!???</sup>
Bazalne LR		31,77±8,22 <sup>!!!</sup>	69,76±10,48 <sup>###!!!</sup>	74,56±10,31 <sup>!!!</sup>	80,29±8,88 <sup>!!!!??</sup>
STZ SAL HR	BWF sAD	26,62±1,74 <sup>\$</sup>	30,14±5,47 <sup>@@</sup>	30,77±7,06 <sup>@@</sup>	42,05±18,05 <sup>@@</sup>
STZ SAL LR		36,23±3,25 <sup>#</sup>	43,08±5,80 <sup>@@<sup>\$</sup></sup>	52,20±3,32 <sup>#@@!?</sup>	53,15±2,47 <sup>@@!?</sup>
STZ IGF-1 HR		39,89±5,31 <sup>*^</sup>	41,83±4,36 <sup>@^</sup>	44,56±0,86 <sup>@@^</sup>	45,32±2,05 <sup>@@^</sup>
STZ IGF-1 LR		48,14±8,56 <sup>@*<sup>\$</sup></sup>	37,88±14,18 <sup>@@</sup>	47,51±14,81 <sup>@@^</sup>	36,07±17,85 <sup>@@^</sup>
VEH SAL HR		44,75±8,61	36,02±11,96 <sup>@@</sup>	41,14±12,28 <sup>@@</sup>	53,82±14,59 <sup>@@</sup>
VEH SAL LR		34,12±2,93	28,28±13,85 <sup>@@</sup>	50,70±16,21 <sup>@</sup>	56,88±16,98 <sup>@@</sup>
VEH IGF-1 HR		8,76±2,50 <sup>@</sup>	66,74±11,77 <sup>\$!</sup>	66,72±13,09 <sup>\$!</sup>	71,02±11,87 <sup>!</sup>
VEH IGF-1 LR		19,94±9,45 <sup>#<sup>\$</sup></sup>	58,11±12,33 <sup>\$</sup>	79,32±8,77 <sup>\$</sup>	78,81±3,98 <sup>\$</sup>
STZ SAL HR		25,75±1,82	57,00±5,79 <sup>%!</sup>	32,63±10,93 <sup>@@<sup>\$?</sup></sup>	36,74±17,89 <sup>@@</sup>
STZ SAL LR		37,05±11,39 <sup>#<sup>\$</sup></sup>	48,71±2,06 <sup>#@@<sup>\$</sup></sup>	48,28±7,28 <sup>@@</sup>	42,18±8,14 <sup>@@</sup>
STZ IGF-1 HR		27,15±5,54 <sup>^%</sup>	52,93±9,43 <sup>!</sup>	42,01±16,92 <sup>@@^</sup>	40,94±8,13 <sup>@@^<sup>\$!</sup></sup>
STZ IGF-1 LR		26,83±6,06 <sup>%</sup>	31,18±12,28 <sup>@@^<sup>\$</sup></sup>	28,80±1,10 <sup>@@<sup>%</sup></sup>	33,88±9,17 <sup>@@</sup>
VEH SAL HR	WF sAD	23,69±0,83 <sup>%</sup>	43,85±7,20 <sup>@!</sup>	51,96±1,93 <sup>@@!</sup>	52,21±1,78 <sup>@@!</sup>
VEH SAL LR		23,86±1,52 <sup>%</sup>	30,98±4,59 <sup>#@@!</sup>	42,90±15,58 <sup>@@!</sup>	27,73±11,40 <sup>#@@@%</sup>
VEH IGF-1 HR		59,19±22,87 <sup>@<sup>\$</sup></sup>	57,08±13,93	72,70±3,03 <sup>\$?</sup>	65,86±13,97
VEH IGF-1 LR		39,32±9,80 <sup>\$</sup>	58,74±6,08 <sup>\$!</sup>	47,98±23,04	54,14±20,27 <sup>@%</sup>
STZ SAL HR		37,98±10,90 <sup>&amp;</sup>	35,21±0,93 <sup>@@<sup>\$&amp;</sup></sup>	36,09±16,24 <sup>@@<sup>\$</sup></sup>	26,72±3,39 <sup>@@<sup>\$?</sup></sup>
STZ SAL LR		42,92±10,96	35,82±13,61 <sup>@@<sup>\$</sup></sup>	52,78±4,27 <sup>@@<sup>\$?</sup></sup>	65,26±0,39 <sup>#@@@%&amp;!?</sup>
STZ IGF-1 HR		20,92±1,57 <sup>@*<sup>\$%</sup></sup>	41,66±11,41 <sup>^</sup>	56,45±6,20 <sup>@%</sup>	56,85±10,56 <sup>@@^*</sup>
STZ IGF-1 LR		18,18±3,27 <sup>@@^<sup>\$%</sup></sup>	38,38±15,17 <sup>@@<sup>\$!</sup></sup>	35,17±7,60 <sup>#@@@*<sup>\$!</sup></sup>	34,89±3,18 <sup>#@@@*<sup>\$!</sup></sup>
VEH SAL HR		39,48±2,69 <sup>&amp;</sup>	58,02±12,05 <sup>!</sup>	60,98±10,92 <sup>%&amp;!</sup>	68,16±11,41 <sup>!&amp;</sup>
VEH SAL LR		48,18±10,98 <sup>@&amp;</sup>	73,77±0,70 <sup>#%&amp;!</sup>	73,89±8,52 <sup>%&amp;!</sup>	72,05±11,82 <sup>!&amp;</sup>
VEH IGF-1 HR		21,06±0,31 <sup>@<sup>\$%&amp;</sup></sup>	21,44±3,66 <sup>@@<sup>\$%&amp;</sup></sup>	40,33±16,65 <sup>@@&amp;!?</sup>	35,65±1,90 <sup>@@<sup>\$%&amp;!</sup></sup>
VEH IGF-1 LR		34,80±0,87 <sup>#%</sup>	46,04±16,17 <sup>#@@<sup>\$</sup></sup>	58,76±14,65 <sup>!</sup>	35,14±2,60 <sup>@@<sup>\$%&amp;</sup></sup>

Objaśnienia: #-p<0,05; ##-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR, w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \$-p<0,05 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05; różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; @-

p<0,05; @@-p<0,01 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD; !-p<0,05; !!!-p<0,001 różnice istotne statystycznie do próby 1; ?-p<0,05; ??-p<0,01; ???-p<0,001 różnice istotne statystycznie do próby 2; (-p<0,05 różnice istotne statystycznie do próby 3. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.3.3.3. Całkowity dystans przepłynięty podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej

Całkowity dystans (**tabela 13**) pokonany przez szczury podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej różnił się pomiędzy osobnikami HR i LR. W warunkach bazalnych to osobniki HR pokonały dłuższy dystans niż szczury LR podczas 2 próby testu MWM ( $U=65$ ;  $p<0,05$ ). Podczas bardzo wczesnej (dni 20-23 sAD) fazy sAD to osobniki HR pokonały dłuższy dystans niż osobniki LR w grupach szczurów: STZ SAL podczas próby 4, STZ IGF-1 podczas próby 1 i VEH IGF-1 podczas próby 3 (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnego (dni 58-61 sAD) etapu sAD w grupach: STZ SAL podczas 3 próby i STZ IGF-1 podczas 1 próby to osobniki HR pokonały dłuższy całkowity dystans niż szczury LR, natomiast w grupach: VEH SAL podczas 4 próby testu MWM i VEH IGF-1 podczas 3 próby testu MWM to osobniki LR przeplnęły dłuższą odległość (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ) niż osobniki LR. Podczas późnego (dni 103-106 sAD) etapu choroby szczury HR przeplnęły dłuższy całkowity dystans niż osobniki LR w grupach: STZ SAL podczas prób 3-4 testu MWM i VEH IGF-1 podczas 1 i 2 próby testu MWM, natomiast gryzonie LR dłuższy całkowity dystans pokonały w grupach: STZ IGF-1 podczas 1 próby i VEH IGF-1 podczas 4 próby testu MWM niż zwierzęta HR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Osobniki HR podczas bardzo wczesnej fazy choroby z grupy STZ IGF-1 w stosunku do szczurów VEH IGF-1 pokonały dłuższy całkowity dystans podczas prób 2-4 testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnej fazy sAD grupa STZ SAL HR pokonała dłuższy całkowity dystans niż osobniki VEH SAL HR podczas 3 i 4 próby testu MWM, natomiast podczas 1 próby testu MWM stwierdzono, że to grupa VEH SAL HR przeplnęła dłuższy całkowity dystans niż gryzonie STZ SAL HR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Grupa STZ IGF-1 HR pokonała dłuższy całkowity dystans niż grupy: STZ SAL HR podczas 1 próby i VEH SAL HR podczas 4 próby testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ) w czasie wczesnego etapu sAD. Podczas późnego etapu sAD grupa STZ IGF-1 HR pokonała dłuższy dystans niż szczury: STZ SAL HR oraz osobniki VEH SAL HR podczas prób 1-2 testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Na tym etapie choroby grupa STZ SAL HR przeplnęła dłuższą odległość niż osobniki STZ IGF-1 HR i VEH SAL HR podczas prób 2-4 testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Podczas wczesnej fazy choroby grupa STZ SAL LR pokonała dłuższy całkowity dystans niż gryzonie STZ IGF-1 LR podczas prób 1 i 3, natomiast podczas próby 4 testu MWM

stwierdzono, że to zwierzęta STZ IGF-1 LR pokonały dłuższy dystans niż gryzonie STZ SAL LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Na tym etapie sAD, grupa VEH SAL LR pokonała krótszy całkowity dystans niż: szczury STZ SAL LR podczas prób 1-2 i osobniki STZ IGF-1 LR podczas 4 próby testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Podczas wczesnego etapu sAD osobniki STZ SAL LR pokonały krótszy dystans niż szczury STZ IGF-1 LR podczas 3 próby testu MWM ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Natomiast grupa STZ IGF-1 LR przeplęła dłuższą odległość niż osobniki VEH SAL LR podczas 3 próby testu MWM ( $U=0$ ;  $p<0,05$ ). W czasie późnego etapu sAD osobniki STZ SAL LR przeplęły dłuższy całkowity odcinek niż: osobniki STZ IGF-1 LR podczas 2 próby testu MWM i grupa VEH SAL LR podczas prób 2-4 testu MWM (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ). Z kolei grupa STZ IGF-1 LR przeplęła dłuższy całkowity dystans niż osobniki VEH SAL LR podczas prób 2-4 testu MWM (we wszystkich próbach  $U=0$ ;  $p<0,05$ ).

Tabela 13. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), charakterystyki behawioralnej oraz etapu rozwoju choroby na pokonany całkowity dystans podczas nabywania roboczej pamięci przestrzennej w trakcie prób 1-4 labiryntu wodnego Morrisa (MWM) w warunkach bazalnych, w bardzo wczesnej (BWF, dni 20-23 sAD), wczesnej (WF, dni 58-61 sAD) oraz późnej (PF, dni 103-106 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa	Etap	Próba 1 (cm)	Próba 2 (cm)	Próba 3 (cm)	Próba 4 (cm)
Bazalne HR	BAZALNE	927,90±353,81	403,04±186,42 <sup>!!!</sup>	215,56±107,70 <sup>!!!!??</sup>	140,28±42,93 <sup>!!!!???</sup>
Bazalne LR		860,02±228,57	263,20±131,07 <sup>!!!#</sup>	190,14±92,31 <sup>!!!</sup>	128,66±52,65 <sup>!!!!???</sup>
STZ SAL HR	BWF sAD	744,39±246,04	618,73±293,98	543,20±239,09 <sup>@@</sup>	583,78±213,35 <sup>@@</sup>
STZ SAL LR		1070,17±69,55 <sup>\$</sup>	540,72±122,64 <sup>@\$!</sup>	354,81±8,42 <sup>@!?</sup>	280,36±32,56 <sup>#@!?</sup>
STZ IGF-1 HR		601,19±262,94	716,10±296,44 <sup>^</sup>	625,67±311,00 <sup>@^</sup>	686,43±342,97 <sup>@@^</sup>
STZ IGF-1 LR		311,15±120,06 <sup>#@@*^</sup>	365,41±178,88 <sup>^</sup>	216,66±74,64 <sup>*^</sup>	670,73±279,73 <sup>@*^\$(</sup>
VEH SAL HR		544,02±260,12	357,02±168,96	335,17±156,01	302,14±145,90 <sup>@</sup>
VEH SAL LR		533,34±186,61	225,45±62,39 <sup>!</sup>	310,72±131,83	203,78±54,34 <sup>!</sup>
VEH IGF-1 HR		415,42±122,35 <sup>@@</sup>	211,09±75,43 <sup>!</sup>	206,60±80,69 <sup>\$!</sup>	174,92±47,03 <sup>\$!</sup>
VEH IGF-1 LR		513,37±7,32 <sup>@</sup>	173,09±68,99 <sup>!</sup>	124,81±0,18 <sup>#\$!</sup>	141,44±0,88 <sup>\$!(</sup>
STZ SAL HR		323,39±4,93 <sup>@@\$%</sup>	276,36±6,17 <sup>%</sup>	540,65±245,04 <sup>@\$?</sup>	558,97±212,23 <sup>@@\$?</sup>
STZ SAL LR		504,10±214,43 <sup>@%</sup>	276,73±59,25 <sup>%!</sup>	227,43±46,33 <sup>#%?</sup>	460,99±70,88 <sup>@@%!</sup>
STZ IGF-1 HR		955,03±199,78 <sup>*^</sup>	405,81±180,44 <sup>!</sup>	487,68±237,30 <sup>@!^</sup>	567,78±257,23 <sup>@@^\$!</sup>
STZ IGF-1 LR		440,70±201,36 <sup>#@</sup>	309,69±115,71 <sup>^</sup>	528,45±42,71 <sup>@@*^\$%</sup>	287,33±92,77 <sup>@@%!</sup>
VEH SAL HR	WF sAD	600,22±160,71	248,04±69,24 <sup>!</sup>	238,59±2,15 <sup>!</sup>	163,13±34,08 <sup>!(</sup>
VEH SAL LR		890,10±399,36	345,35±58,72 <sup>!</sup>	293,72±125,46 <sup>@!</sup>	453,78±177,22 <sup>#@%!</sup>
VEH IGF-1 HR		393,82±159,65 <sup>@@</sup>	197,08±98,17	133,63±5,75 <sup>\$</sup>	149,90±54,15
VEH IGF-1 LR		427,34±185,13 <sup>@</sup>	143,78±24,83 <sup>\$!</sup>	351,28±120,56 <sup>#@%?</sup>	251,39±124,58
STZ SAL HR		706,48±310,44 <sup>&amp;</sup>	727,50±221,91 <sup>@\$&amp;</sup>	816,66±111,96 <sup>@@\$</sup>	1230,47±559,28 <sup>@@\$</sup>
STZ SAL LR		703,42±296,94 <sup>%</sup>	804,52±179,10 <sup>@@\$&amp;?</sup>	384,99±182,20 <sup>#\$?</sup>	349,86±155,85 <sup>#@\$</sup>
STZ IGF-1 HR		1577,37±53,91 <sup>@@*^\$%&amp;</sup>	376,78±2,89 <sup>^\$*!</sup>	337,87±256,50 <sup>*!</sup>	240,35±122,07 <sup>*!?</sup>
STZ IGF-1 LR		716,48±66,97 <sup>#%&amp;</sup>	397,32±36,72 <sup>^\$!\$!</sup>	381,96±67,97 <sup>@^\$%&amp;!\$!</sup>	372,37±60,56 <sup>@@^\$%!</sup>
VEH SAL HR		452,29±121,03 <sup>@</sup>	197,21±73,50 <sup>@!</sup>	183,68±48,53 <sup>!</sup>	104,82±23,13 <sup>%!?</sup>
VEH SAL LR		695,97±127,43	127,55±35,82 <sup>@&amp;!\$!</sup>	114,47±52,06 <sup>@%&amp;!\$!</sup>	108,48±39,46 <sup>&amp;!\$!</sup>
VEH IGF-1 HR		949,56±125,29 <sup>\$%&amp;</sup>	829,90±90,95 <sup>@@\$%&amp;</sup>	307,42±181,77 <sup>!?</sup>	330,89±120,80 <sup>@@\$!?</sup>
VEH IGF-1 LR		654,78±161,81 <sup>#</sup>	494,10±39,32 <sup>#@\$%&amp;?</sup>	170,37±51,34 <sup>&amp;!\$!</sup>	458,63±9,13 <sup>#@\$%&amp;!(</sup>

Objaśnienia: #-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR, w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \$-p<0,05 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; @-p<0,05; @@-

p<0,01 różnice istotne statystycznie w stosunku do warunków bazalnych; %-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy bardzo wczesną fazą a wczesną/późną fazą sAD; &- p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną fazą a późną fazą sAD; !-p<0,05; !!!-p<0,001 różnice istotne statystycznie do próby 1; ?-p<0,05; ??-p<0,01; ???-p<0,001 różnice istotne statystycznie do próby 2; (-p<0,05; ((-p<0,01 różnice istotne statystycznie do próby 3. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.4. Poziom ośrodkowego zapalenia-liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) w różnych strukturach mózgu

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie w liczbie aktywowanych komórek mikrogleju pomiędzy grupami szczurów w następujących strukturach: część CA1 hipokampa ( $H=47,02$ ;  $p<0,001$ ;  $df1=7$ ;  $df2=52$ ), część CA2 hipokampa ( $H=45,07$ ;  $p<0,001$ ;  $df1=7$ ;  $df2=49$ ), część CA3 hipokampa ( $H=49,13$ ;  $p<0,001$ ;  $df1=7$ ;  $df2=53$ ), zakręt zębaty (DG) hipokampa ( $H=43,25$ ;  $p<0,001$ ;  $df1=7$ ;  $df2=49$ ), ciało modzelowate (CC) ( $H=33,06$ ;  $p<0,001$ ;  $df1=7$ ;  $df2=49$ ), część brzeżna jądra półleżącego (NAcS) ( $H=44,03$ ;  $p<0,001$ ;  $df1=7$ ;  $df2=46$ ), rdzeń jądra półleżącego (NAcC) ( $H=41$ ;  $p<0,001$ ;  $df1=7$ ;  $df2=44$ ), jądro grzbietowo-przyśrodkowe podwzgórza (DMH) ( $H=44,61$ ;  $p<0,001$ ;  $df1=7$ ;  $df2=47$ ). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w liczbie komórek CD68<sup>+</sup> pomiędzy grupami szczurów w korze przedczołowej (PFC) ( $H=0$ ;  $p=1$ ;  $df1=7$ ;  $df2=40$ ).

#### 3.2.4.1. Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) w hipokampie

Jak pokazano na **rycinie 11a** analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a wykazała, że w części CA1 hipokampa osobniki STZ SAL LR charakteryzują się wyższą liczbą komórek CD68<sup>+</sup> w porównaniu ze zwierzętami STZ SAL HR ( $U=3$ ;  $p<0,05$ ). Ponadto zwierzęta z grupy STZ SAL HR i STZ SAL LR mają wyższą liczbę komórek CD68<sup>+</sup> niż szczury (odpowiednio) VEH SAL HR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) i VEH SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,001$ ). Podobnie gryzonie z grup: STZ IGF-1 HR i STZ IGF-1 LR mają również wyższą liczbę aktywowanych komórek mikrogleju w CA1 niż grupy kontrolne VEH SAL HR/LR (HR: $U=0$ ;  $p<0,01$ ; LR: $U=0$ ;  $p<0,001$ ) i VEH IGF-1 HR/LR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

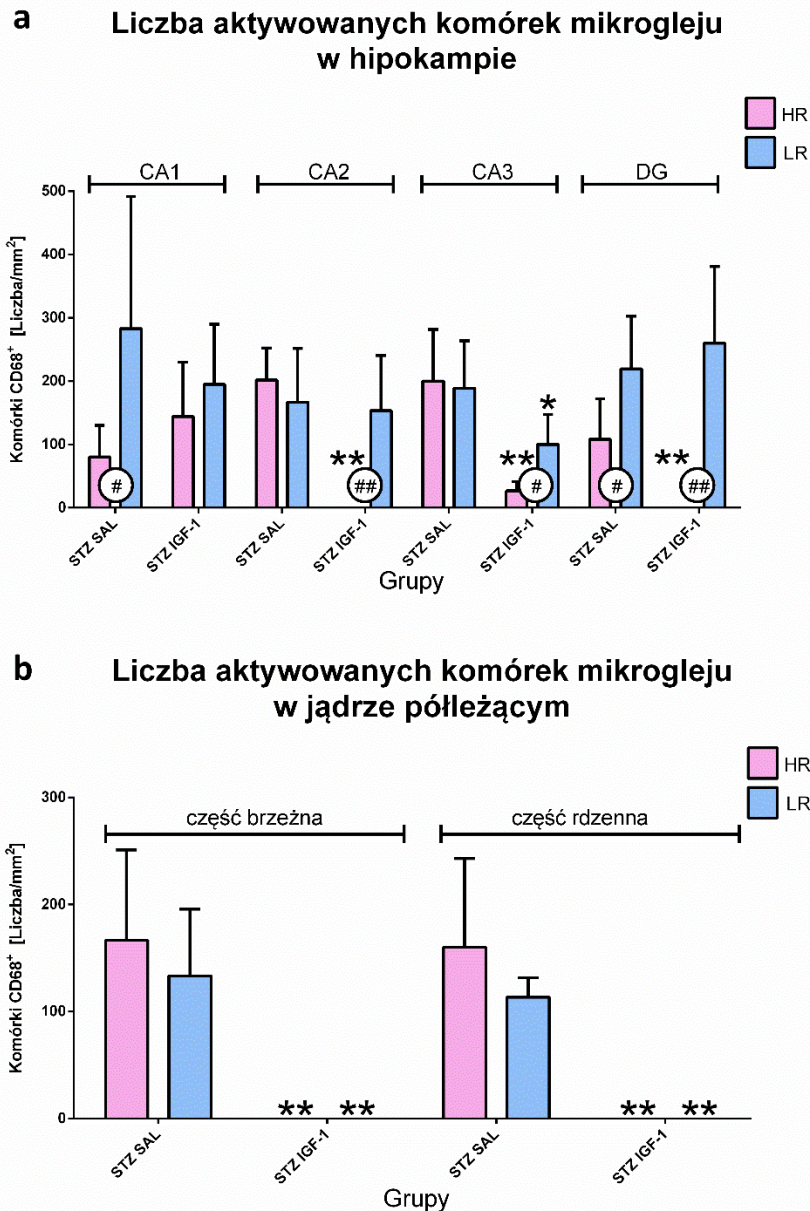
Analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a wykazała, że w części CA2 hipokampa w grupie zwierząt STZ IGF-1 to szczury LR w porównaniu z osobnikami HR miały wyższą liczbę komórek CD68<sup>+</sup> ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). W grupie STZ SAL HR liczba komórek CD68<sup>+</sup> była wyższa w stosunku do grup: STZ IGF-1 HR oraz VEH SAL HR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Co więcej zwierzęta STZ SAL LR odznaczały się również wyższą liczbą analizowanych komórek niż grupa VEH SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,001$ ). Podobnie zwierzęta STZ IGF-1 LR wykazały wyższą liczbę aktywowanych komórek mikrogleju niż szczury: VEH IGF-1 LR oraz VEH SAL LR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

W części CA3 hipokampa analiza statystyczna wykazała, że u szczurów STZ IGF-1 osobniki LR w stosunku do zwierząt HR posiadały wyższą liczbę komórek CD68<sup>+</sup> ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ). Osobniki HR jak i LR z grupy STZ SAL posiadają wyższą liczbę omawianych

komórek niż zwierzęta: STZ IGF-1 HR/LR (HR:  $U=0$ ;  $p<0,01$ ; LR:  $U=4$ ;  $p<0,05$ ) i VEH SAL HR/LR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,001$ ). Zwierzęta HR i LR z grupy STZ IGF-1 odznaczają się wyższą liczbę komórek CD68<sup>+</sup> niż szczury: VEH IGF-1 HR/LR (HR:  $U=2,5$ ;  $p<0,05$ ; LR:  $U=0$ ;  $p<0,01$ ) i VEH SAL HR/LR (HR  $U=5$ ;  $p<0,01$ ; LR:  $U=0$ ;  $p<0,001$ ).

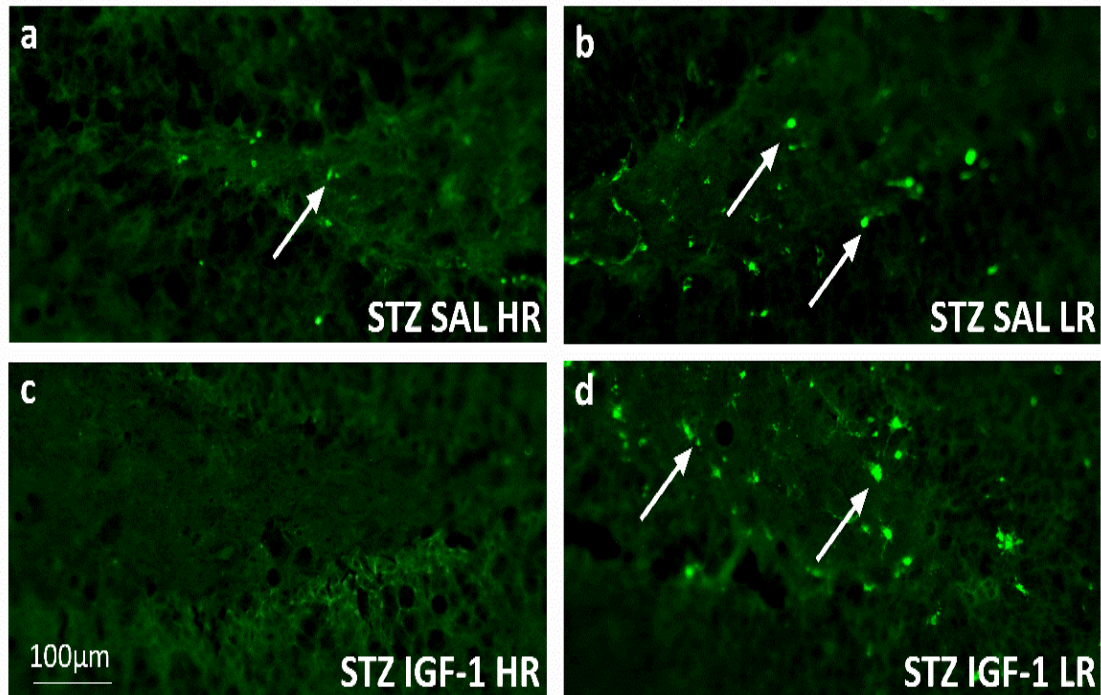
W zakręcie zębatym hipokampa (DG) zwierzęta LR (**rycina 12**) w stosunku do osobników HR odznaczały się wyższą liczbą komórek CD68<sup>+</sup> w grupach: STZ SAL ( $U=7,5$ ;  $p<0,05$ ) i STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Grupa STZ SAL HR odznaczała się wyższą liczbą aktywowanych komórek mikrogleju niż szczury: STZ IGF-1 HR ( $U=2,5$ ;  $p<0,01$ ) i VEH SAL HR ( $U=3$ ;  $p<0,01$ ). Z kolei grupa STZ SAL LR odznaczała się wyższą liczbą komórek CD68<sup>+</sup> niż grupa VEH SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,001$ ). Co więcej zwierzęta STZ IGF-1 LR posiadały wyższą liczbę komórek CD68<sup>+</sup> niż szczury z grup kontrolnych: VEH IGF-1 LR i VEH SAL LR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

Liczba komórek CD68<sup>+</sup> pomiędzy grupami zwierząt VEH SAL HR vs. VEH IGF-1 HR oraz VEH SAL LR vs. VEH IGF-1 LR w obszarach CA1, CA2, CA3 oraz DG hipokampa nie różniła się istotnie statystycznie.



Rycina 11. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na liczbę aktywowanych komórek mikrogleju w (a) hipokampie i (b) jądrze półzającym w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL) oraz streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objasnienia: #- $p < 0,05$ ; ##- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej; \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

## Aktywowane komórki mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) w DG



Rycina 12. Przykładowe fotografie aktywowanych komórek mikrogleju w zakręcie zębatym hipokampa (DG) w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL) (a,b) oraz streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) (c,d) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

### 3.2.4.2. Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) w jądrze półłożącym (NAc)

Analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a (rycina 11b), wykazała, że w części brzeżnej jądra półłożącego (NAcS) grupy STZ SAL HR/LR posiadały więcej komórek CD68<sup>+</sup> niż szczury z grup: STZ IGF-1 HR/LR oraz VEH SAL HR/LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

W części rdzennej jądra półłożącego (NAcC) u szczurów VEH IGF-1 zwierzęta HR odznaczały się wyższą liczbą aktywowanych komórek mikrogleju niż gryzonie LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Ponadto zwierzęta z grupy STZ SAL HR posiadały więcej komórek CD68<sup>+</sup> niż szczury z grup: STZ IGF-1 HR i VEH SAL HR, a szczury VEH IGF-1 HR charakteryzowały się wyższą liczbą omawianych komórek niż zwierzęta: VEH SAL HR i STZ IGF-1 HR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Co więcej szczury STZ SAL LR charakteryzowały

się wyższą liczbą komórek CD68<sup>+</sup> niż gryzonie: STZ IGF-1 LR i VEH SAL LR (w obu porównaniach U=0; p<0,01).

### 3.2.4.3.Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) w korze przedczołowej (PFC)

Liczba aktywowanych komórek mikrogleju w korze przedczołowej nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami.

### 3.2.4.4.Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) w ciele modzelowatym (CC)

W obszarze CC (**tabela 14a**) u zwierząt LR w porównaniu do szczurów HR stwierdzono wyższą liczbę aktywowanych komórek mikrogleju w grupach: STZ IGF-1 (U=0,5; p<0,01) i VEH SAL (U=8; p<0,05). Grupa STZ SAL HR odznaczała się wyższą liczbę komórek CD68<sup>+</sup> niż szczury z grup: STZ IGF-1 HR (U=2; p<0,01) oraz VEH SAL HR (U=0; p<0,01). Szczury STZ SAL LR (U=1; p<0,01) i STZ IGF-1 LR (U=4,5; p<0,05) posiadały więcej komórek CD68<sup>+</sup> niż zwierzęta VEH SAL LR. Ponadto grupa STZ IGF-1 LR posiadała wyższą liczbę omawianych komórek niż szczury VEH IGF-1 (U=1; p<0,01).

Tabela 14. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na liczbę aktywowanych komórek mikrogleju (a) w ciele modzelowatym (CC) i (b) w jądrze przysiodkowo-grzbietowym podwzgórza (DMH) w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa/Struktura	a.CC (liczba/mm <sup>2</sup> )	b.DMH (liczba/mm <sup>2</sup> )
STZ SAL HR	500±163,30 <sup>\$\$</sup>	175±70,71 <sup>\$\$</sup>
STZ SAL LR	533±69,92 <sup>\$\$</sup>	0±0 <sup>##</sup>
STZ IGF-1 HR	200±98,88 <sup>**</sup>	0±0
STZ IGF-1 LR	500±129,96 <sup>##\$\$^^</sup>	146,67±50,55 <sup>##**\$\$^^</sup>
VEH SAL HR	109,53±46	0±0
VEH SAL LR	271,43±126,83 <sup>#</sup>	0±0
VEH IGF-1 HR	183,33±91,29	0±0
VEH IGF-1 LR	220±116,90	0±0

Objaśnienia: ##-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej; \*\*-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej; \$-p<0,05; \$\$-p<0,01 różnice

istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej;  $^{**}p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$ SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

#### **3.2.4.5. Liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) w jądrze przyśrodkowo-grzbietowym podwzgórza (DMH)**

Jak pokazano w **tabeli 14b** w DMH u szczurów STZ SAL to zwierzęta HR posiadały wyższą liczbę aktywowanych komórek mikrogleju niż zwierzęta LR, a w grupie STZ IGF-1 to osobniki LR odznaczały się wyższą liczbą komórek CD68<sup>+</sup> w porównaniu do gryzoni HR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p < 0,01$ ). Gryzonie STZ SAL HR posiadały wyższą liczbę omawianych komórek niż grupy: STZ IGF-1 HR ( $U=0$ ;  $p < 0,001$ ) oraz VEH SAL HR ( $U=0$ ;  $p < 0,01$ ). Zwierzęta STZ IGF-1 LR cechowała wyższa liczba komórek CD68<sup>+</sup> w stosunku do grup: STZ SAL LR, VEH IGF-1 LR oraz VEH SAL LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p < 0,01$ ).

#### **3.2.5. Liczba złogów $\beta$ -amyloidu w ośrodkowym układzie nerwowym**

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała, że liczba złogów  $\beta$ -amyloidu różniła się pomiędzy grupami szczurów ( $df_1=7$ ;  $df_2=40$ ;  $p < 0,001$ ) w następujących strukturach: fragment CA1 ( $H=35,03$ ), obszar CA2 ( $H=34,60$ ), rejon CA3 ( $H=38,29$ ), obszar DG ( $H=36,60$ ) hipokampa, korze przedczołowej (PFC) ( $H=37,23$ ), części brzeżnej (NAcS) ( $H=37,56$ ) i rdzeniu (NAcC) ( $H=35,00$ ) jądra półleżącego.

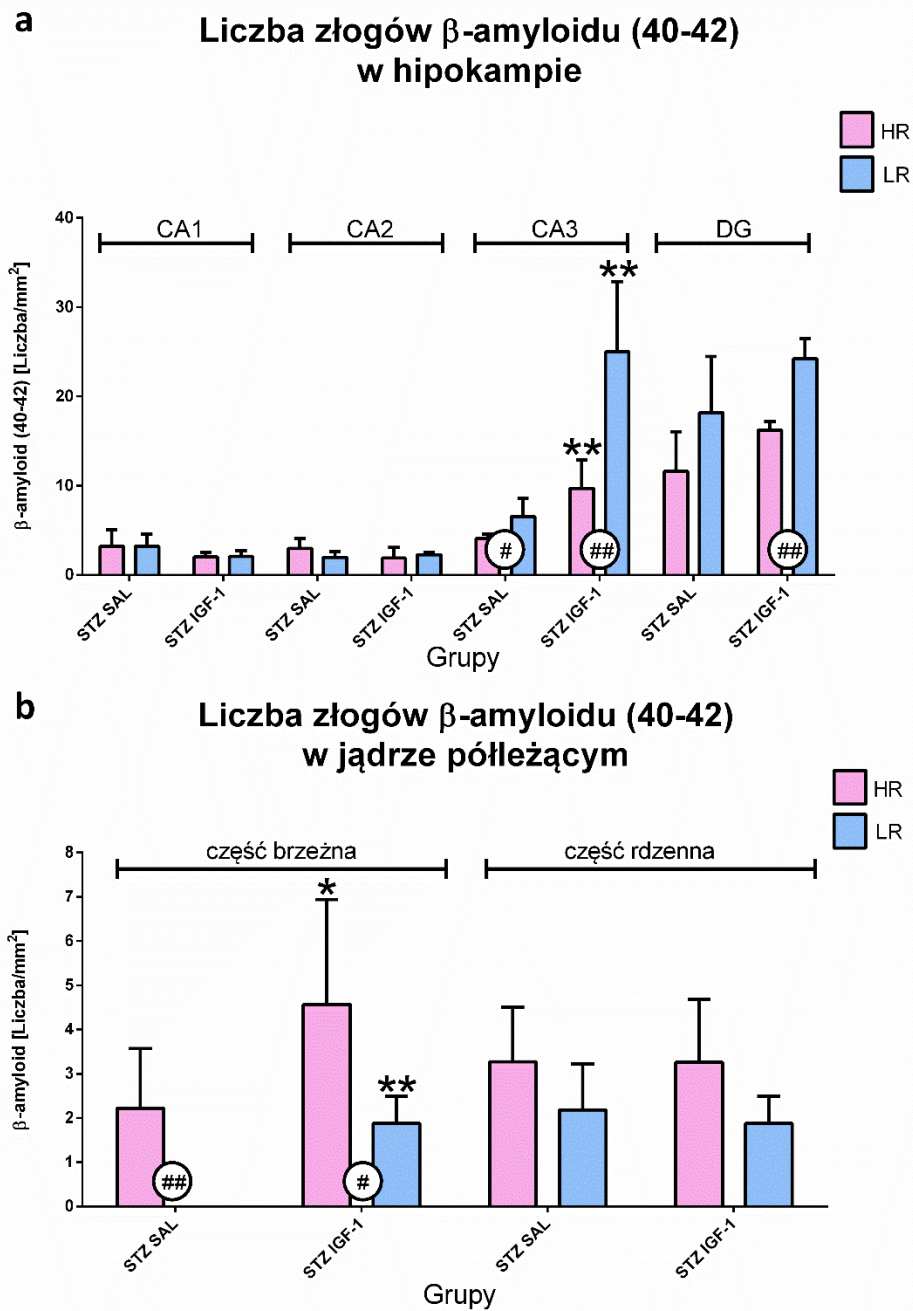
##### **3.2.5.1. Liczba złogów $\beta$ -amyloidu w hipokampie**

Analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a wykazała, że w obszarach CA1 i CA2 hipokampa (**rycina 13a**) szczury STZ SAL HR/LR charakteryzują się wyższą liczbą złogów  $\beta$ A w stosunku do grup VEH SAL HR/LR, podobnie jak zwierzęta STZ IGF-1 HR/LR, które odznaczają się wyższym poziomem  $\beta$ -amyloidu niż gryzonie z grup: VEH IGF-1 HR/LR oraz VEH SAL HR/LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p < 0,01$ ).

W rejonie CA3 hipokampa zwierzęta LR posiadają więcej oligomerów  $\beta$ A niż szczury HR w grupach: STZ SAL ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ) oraz STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). W grupach STZ IGF-1 HR/LR liczba złogów  $\beta$ A była wyższa w stosunku do zwierząt STZ SAL HR/LR (w obu porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Co więcej zwierzęta STZ SAL HR/LR odznaczały się wyższą liczbą oligomerów  $\beta$ A w porównaniu ze zwierzętami VEH SAL HR/LR, a szczury STZ IGF-1 HR/LR podobnie posiadały również wyższą liczbę złogów  $\beta$ -amyloidu niż gryzonie VEH IGF-1 HR/LR oraz VEH SAL HR/LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

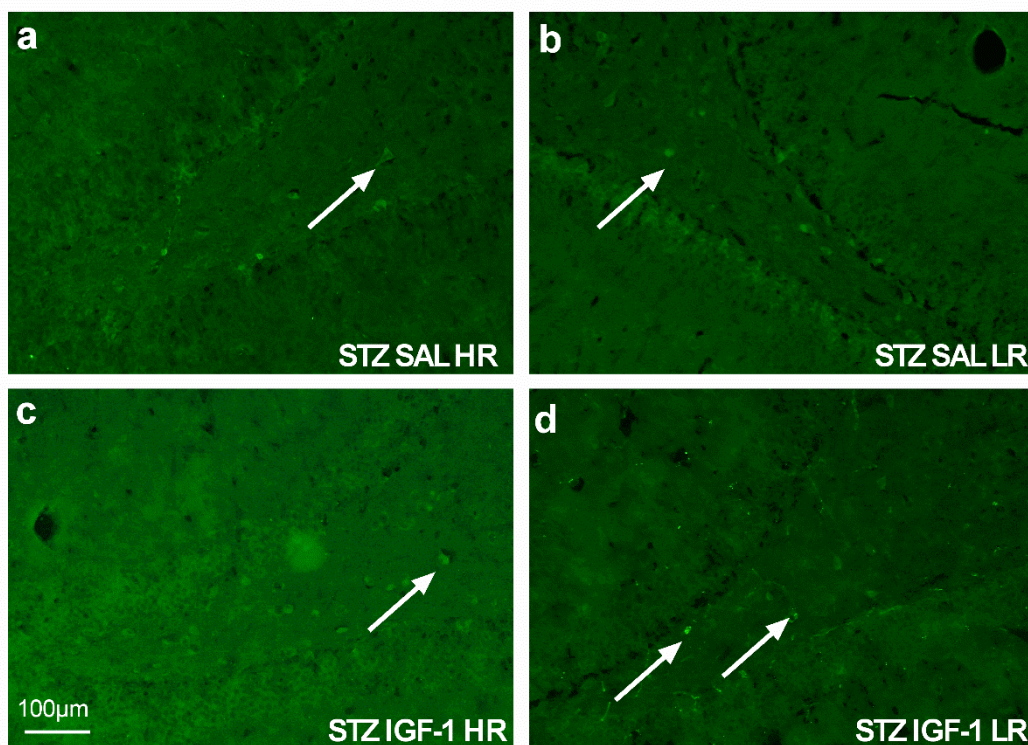
W DG (**rycina 14**) hipokampa w grupie STZ IGF-1 to szczury LR posiadały więcej złogów  $\beta$ -amyloidu niż gryzonie HR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Ponadto zwierzęta STZ SAL HR/LR odznaczały się wyższą liczbą  $\beta$ A w porównaniu ze zwierzętami VEH SAL HR/LR, a szczury STZ IGF-1 HR/LR podobnie posiadały również większą liczbę złogów  $\beta$ A niż gryzonie VEH IGF-1 HR/LR oraz VEH SAL HR/LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

Liczba złogów  $\beta$ A w obszarach CA1, CA2, CA3, DG hipokampa nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy grupami kontrolnymi VEH SAL HR/LR i VEH IGF-1 HR/LR.



Rycina 13. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na liczbę złożeń  $\beta$ -amyloidu w (a) hipokampie i (b) w jądrze półleżącym w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL) oraz streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objasnienia: #- $p < 0,05$ ; ##- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej; \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### Złogi $\beta$ -amyloidu (40-42) w DG



Rycina 14. Przykładowe fotografie złogów  $\beta$ -amyloidu w zakręcie zębatym hipokampa (DG) w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL) (a,b) oraz streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) (c,d) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

#### 3.2.5.2. Liczba złogów $\beta$ -amyloidu w jądrze półleżącym (NAc)

Jak pokazano na **rycinie 13b** w części brzeżnej jądra półleżącego (NAcS) osobniki HR posiadały więcej złogów  $\beta$ -amyloidu niż gryzonie LR w grupach: STZ SAL ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) oraz STZ IGF-1 ( $U=3$ ;  $p<0,05$ ). Ponadto zwierzęta STZ IGF-1 HR/LR odznaczały się wyższą liczbą oligomerów  $\beta$ A niż gryzonie STZ SAL HR/LR (HR:  $U=2$ ;  $p<0,05$ ; LR:  $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Co więcej zwierzęta STZ SAL HR odznaczały się wyższą liczbą złogów w porównaniu ze zwierzętami VEH SAL HR, a szczury STZ IGF-1 HR/LR podobnie posiadały również wyższą liczbę złogów  $\beta$ A niż gryzonie VEH IGF-1 HR/LR oraz VEH SAL HR/LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

W części rdzennej jądra półężącego (NAcC) grupy STZ SAL HR/LR odznaczały się wyższą liczbą złoęów  $\beta$ A w porównaniu ze zwierzętami VEH SAL HR/LR, a szczury STZ IGF-1 HR/LR również charakteryzowały się wyższą liczbę złoęów  $\beta$ A niż gryzonie VEH IGF-1 HR/LR oraz VEH SAL HR/LR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

Liczba złoęów  $\beta$ A w NAcS i NAcC nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy grupami kontrolnymi: VEH SAL HR/LR i VEH IGF-1 HR/LR.

### **3.2.5.3.Liczba złoęów $\beta$ -amyloidu w korze przedczołowej (PFC)**

W korze przedczołowej szczury HR posiadały więcej złoęów  $\beta$ -amyloidu niż gryzonie LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) w grupie STZ IGF-1 (HR= $5,47\pm 1,30$ ; LR= $0\pm 0$  liczba/mm<sup>2</sup>). Szczury STZ IGF-1 HR posiadały w PFC więcej oligomerów  $\beta$ A niż grupa STZ SAL HR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ; HR= $3,71\pm 0,87$  liczba/mm<sup>2</sup>), a z kolei gryzonie STZ SAL LR (LR= $4,60\pm 2,06$  liczba/mm<sup>2</sup>) odznaczały się wyższą liczbą złoęów  $\beta$ A w porównaniu ze zwierzętami STZ IGF-1 LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Ponadto zwierzęta STZ SAL HR/LR odznaczały się wyższą liczbą złoęów  $\beta$ A w porównaniu ze zwierzętami VEH SAL HR/LR, a szczury STZ IGF-1 HR podobnie posiadały r wyższą liczbę złoęów  $\beta$ A niż gryzonie VEH IGF-1 HR oraz VEH SAL HR (we wszystkich porównaniach  $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

Liczba złoęów  $\beta$ A w PFC nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy grupami kontrolnymi: VEH SAL HR/LR i VEH IGF-1 HR/LR.

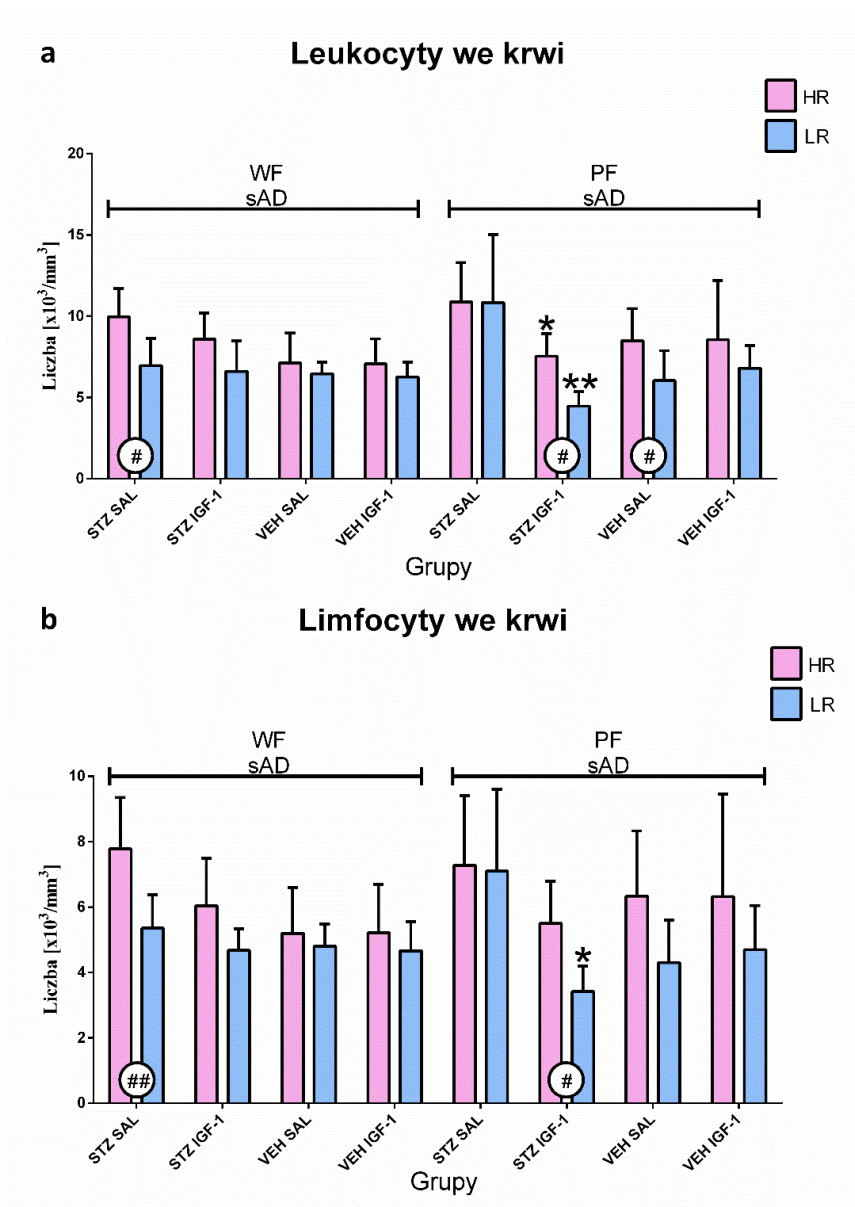
### **3.2.6.Aktywność obwodowego układu odpornościowego we wczesnej oraz późnej fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera**

#### **3.2.6.1.Bezwzględna liczba leukocytów i limfocytów we krwi**

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie w bezwzględnej liczbie leukocytów we krwi obwodowej ( $H=37,01$ ;  $p<0,001$ ;  $df_1=15$ ;  $df_2=80$ ). Test U-Manna-Whitney'a (rycina 15a) wykazał, że osobniki LR posiadają niższą liczbę białych krwinek niż zwierzęta HR w nastęujących grupach: STZ SAL ( $U=2,5$ ;  $p<0,05$ ) we wczesnej (dzień 62 sAD) fazie, STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) oraz VEH SAL ( $U=3$ ;  $p<0,01$ ) w późnej (dzień 107 sAD) fazie sAD. Ponadto we wczesnej fazie choroby gryzonie STZ SAL HR posiadały wyższą liczbę leukocytów we krwi niż zwierzęta z grupy VEH SAL HR ( $U=2,5$ ;  $p<0,05$ ). W późnej fazie sAD gryzonie STZ SAL LR posiadały wyższą bezwzględną liczbę

białych krwinek niż zwierzęta z grupy VEH SAL LR ( $U=3$ ;  $p<0,05$ ). Liczba leukocytów u gryzoni STZ IGF-1 HR oraz STZ IGF-1 LR była niższa w porównaniu ze zwierzętami STZ SAL HR ( $U=3$ ;  $p<0,05$ ) i STZ SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) w późnej fazie sAD. Co więcej zwierzęta STZ IGF-1 LR charakteryzowały się w późnej fazie choroby niższą liczbą białych krwinek niż szczury VEH IGF-1 LR ( $U=3$ ;  $p<0,05$ ). W czasie rozwoju choroby bezwzględna liczba leukocytów we krwi w grupie STZ IGF-1 LR zmniejszyła się ( $U=3$ ;  $p<0,05$ ).

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie w bezwzględnej liczbie limfocytów we krwi ( $H=30,58$ ;  $p<0,01$ ;  $df_1=15$ ;  $df_2=80$ ). Analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a (**rycina 15b**) wykazała, że osobniki LR charakteryzują się niższą liczbą limfocytów we krwi niż szczury HR w grupach: STZ SAL ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) we wczesnej (dzień 62 sAD) fazie sAD i STZ IGF-1 ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ) w późnej (dzień 107 sAD) fazie sAD. We wczesnej fazie sAD w grupie STZ SAL HR bezwzględna liczba limfocytów była wyższa w porównaniu ze zwierzętami VEH SAL HR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ). Podczas późnej fazy choroby osobniki STZ IGF-1 LR posiadały niższą liczbę tych białych krwinek niż szczury STZ SAL LR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ). W późnym stadium choroby u osobników STZ IGF-1 LR bezwzględna liczba limfocytów obniżyła się w porównaniu z wczesną fazą sAD ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ).

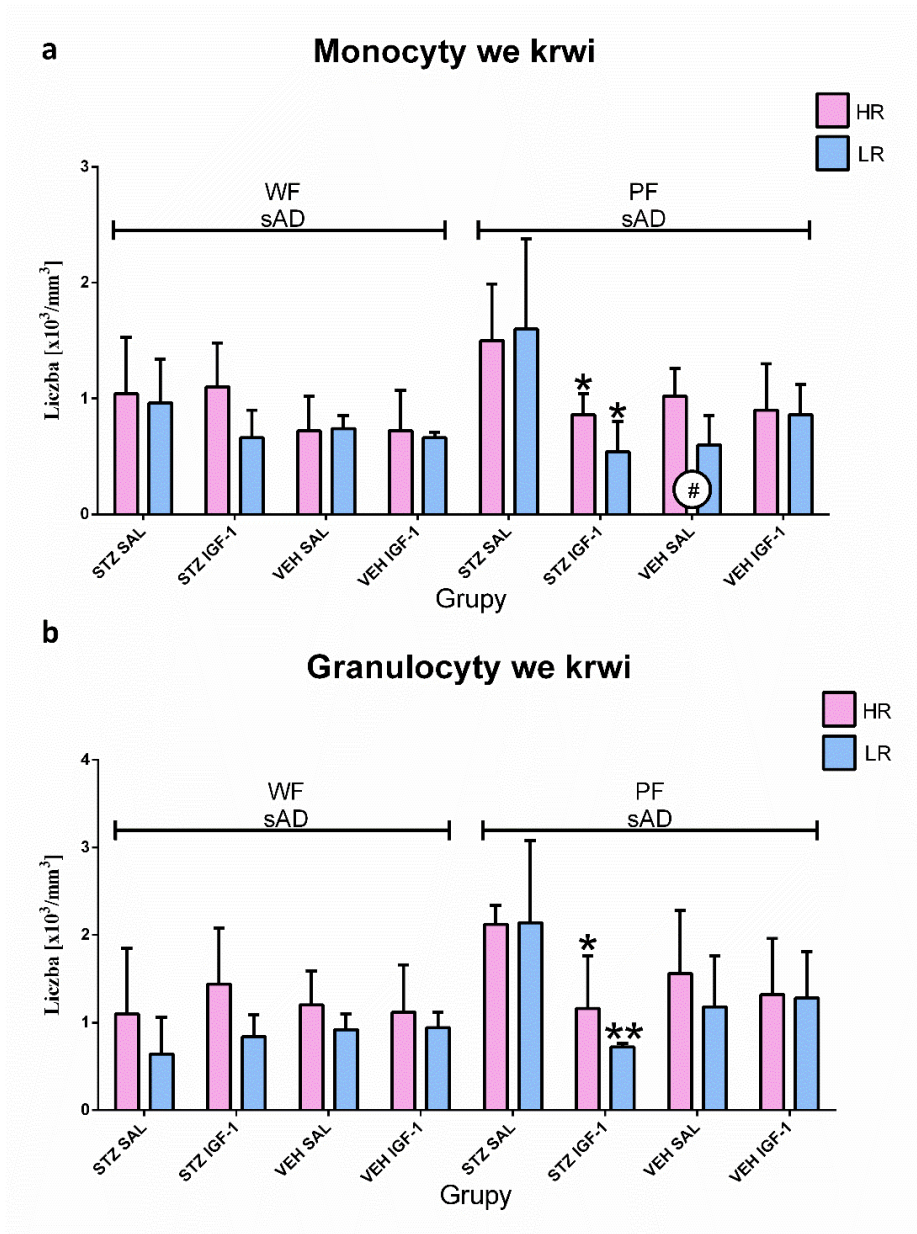


Rycina 15. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na bezwzględną liczbę (a) leukocytów i (b) limfocytów we krwi we wczesnej (WF, dzień 62) oraz w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objasnienia: #- $p < 0,05$ ; ##- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.6.2. Bezwzględna liczba monocytów i granulocytów we krwi

Analiza statystyczna za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie w bezwzględnej liczbie monocytów we krwi ( $H=31,48$ ;  $p<0,01$ ;  $df_1=15$ ;  $df_2=80$ ) pomiędzy grupami szczurów. Analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a (**rycina 16a**) wykazała, że osobniki LR charakteryzują się niższą bezwzględną liczbą monocytów niż zwierzęta HR z grupy VEH SAL ( $U=2,5$ ;  $p<0,05$ ) podczas późnej (dzień 107 sAD) fazy rozwoju sAD. Na tym samym etapie rozwoju sAD osobniki z grup: STZ IGF-1 HR i STZ IGF-1 LR posiadały niższą liczbę tych białych krwinek niż szczury STZ SAL HR ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ) i STZ SAL LR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ). Co więcej osobniki STZ SAL LR posiadają wyższą liczbę monocytów niż gryzonie VEH SAL LR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ).

Analiza statystyczna za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie w bezwzględnej liczbie granulocytów pomiędzy grupami ( $H=29,59$ ;  $p<0,01$ ;  $df_1=15$ ,  $df_2=80$ ) zwierząt. Analiza za pomocą U-Manna-Whitney'a (**rycina 16b**) wykazała, że w późnej (dzień 107 sAD) fazie rozwoju sAD osobniki STZ IGF-1 HR jak i STZ IGF-1 LR mają niższą bezwzględną liczbę granulocytów niż szczury (odpowiednio): STZ SAL HR ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ) i STZ SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Ponadto osobniki STZ IGF-1 LR podczas tego etapu choroby miały niższą bezwzględną liczbę tych białych krwinek niż szczury VEH IGF-1 LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ). Podczas późnej fazy rozwoju sAD bezwzględna liczba granulocytów wzrosła u gryzoni z grup: STZ SAL HR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ) oraz STZ SAL LR ( $U=1,5$ ;  $p<0,05$ ) w porównaniu z wczesnym etapem (dzień 62 sAD) sAD.



Rycina 16. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na bezwzględną liczbę (a) monocytów i (b) granulocytów we krwi we wczesnej (WF, dzień 62) oraz w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objasnienia: #- $p < 0,05$  różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej; \*- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.6.3. Procentowy udział limfocytów, monocytów i granulocytów we krwi

Analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a wykazała, że procentowy udział limfocytów we krwi nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy grupami (**tabela 15a**). Natomiast procentowy udział monocytów (**tabela 15b**) we krwi w grupie STZ IGF-1 HR był wyższy w porównaniu ze zwierzętami VEH SAL HR ( $U=3$ ;  $p<0,05$ ) we wczesnej (dzień 62 sAD) fazie choroby. Procentowy udział granulocytów (**tabela 15c**) we krwi we wczesnej fazie sAD u gryzoni STZ SAL LR był niższy w porównaniu z grupą VEH SAL LR ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ). W późnej (dzień 107 sAD) fazie choroby szczury z grup: STZ IGF-1 HR oraz STZ IGF-1 LR miały niższy procentowy udział granulocytów w porównaniu ze zwierzętami STZ SAL HR ( $U=3$ ;  $p<0,05$ ) i STZ SAL LR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ). Ponadto zwierzęta STZ IGF-1 LR w późnej fazie sAD miały niższy procentowy udział granulocytów niż gryzonie VEH IGF-1 LR ( $U=3$ ;  $p<0,05$ ). W grupach STZ SAL HR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ) oraz STZ SAL LR ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ) % udział granulocytów we wczesnej fazie choroby był niższy niż w późnej fazie sAD.

Tabela 15. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na procentowy udział (a) limfocytów, (b) monocytów i (c) granulocytów we krwi we wczesnej (WF, dzień 62) oraz w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimer'a u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Grupa/Parametr	Faza choroby	a.Limfocyty (%)	b.Monocyty (%)	c.Granulocyty (%)
STZ SAL HR	WF	78,24±9,83	10,76±3,69	10,6±6,89
STZ SAL LR	sAD	78,42±5,18	13,78±3,39	7,78±3,85 <sup>s</sup>
STZ IGF-1 HR		70,64±7,36	13,12±1,86 <sup>s</sup>	16,24±7,44
STZ IGF-1 LR		74,2±11,36	10,64±2,58	12,72±5,34
VEH SAL HR		74,96±5,50	10,42±2,24	14,62±4,77
VEH SAL LR		74,72±4,60	11,82±2,09	13,46±2,97
VEH IGF-1 HR		73,36±11,15	11,24±4,34	15,4±2,28
VEH IGF-1 LR		74,72±5,51	11,18±1,42	14,1±4,27

<b>STZ SAL HR</b>	PF	65,7±7,01	14,14±2,10	20,16±6,67 <sup>&amp;</sup>
<b>STZ SAL LR</b>	SAD	67,58±8,02	13,34±3,46	19,08±4,99 <sup>&amp;</sup>
<b>STZ IGF-1 HR</b>		72,66±10,78	12,56±2,07	12,78±6,22 <sup>*</sup>
<b>STZ IGF-1 LR</b>		77,24±6,09	11,04±5,74	11,72±4,25 <sup>*^</sup>
<b>VEH SAL HR</b>		72,22±7,78	11,8±1,36	15,98±7,85
<b>VEH SAL LR</b>		71,9±9,59	10,44±2,04	17,66±7,90
<b>VEH IGF-1 HR</b>		75,58±8,35	10,98±1,54	13,42±6,50
<b>VEH IGF-1 LR</b>		69,72±11,48	12,18±4,24	18,1±7,10

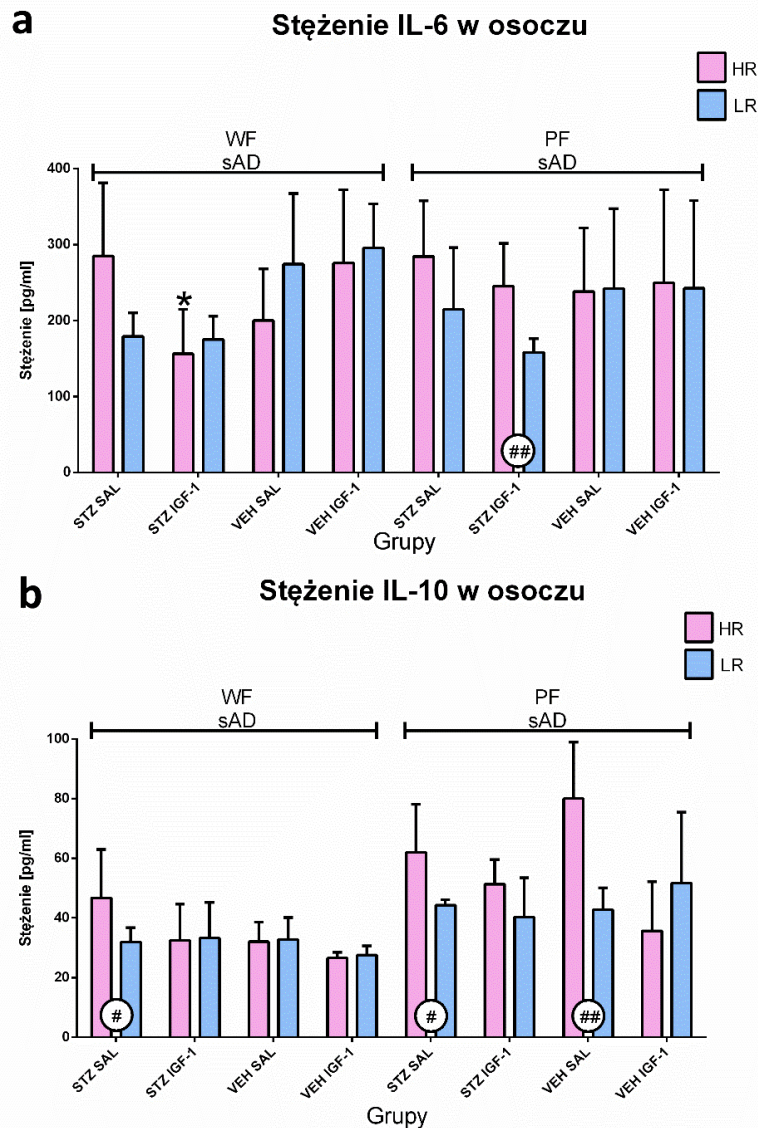
Objaśnienia: \$-p<0,05 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; &-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną, a późną fazą rozwoju choroby Alzheimera. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

#### 3.2.6.4. Stężenie pro-zapalnej interleukiny-6 (IL-6) oraz przeciwzapalnej interleukiny-10 (IL-10) w osoczu

Analiza z użyciem testu U-Manna-Whitney'a wykazała, że w późnej (dzień 107 sAD) fazie sAD w grupie STZ IGF-1 zwierzęta LR posiadały niższe stężenie IL-6 (**rycina 17a**) w osoczu w porównaniu ze szczurami HR (U=0; p<0,01). Podczas wczesnej (dzień 62 sAD) fazy sAD szczury STZ IGF-1 HR wykazywały niższe stężenie IL-6 w osoczu w stosunku do grup: STZ SAL HR (U=2; p<0,05) i VEH IGF-1 HR (U=3; p<0,05). Ponadto podczas trwania tego etapu gryzonie STZ IGF-1 LR miały niższe stężenie tej cytokiny niż grupa VEH IGF-1 LR (U=0,5; p<0,01).

Analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a wykazała, że osobniki HR odznaczają się wyższym stężeniem IL-10 (**rycina 17b**) w osoczu niż zwierzęta LR w grupach: STZ SAL podczas wczesnej (dzień 62 sAD) fazy sAD (U=3; p<0,05) oraz STZ SAL (U=2; p<0,05) i VEH SAL (U=0,5; p<0,01) w czasie późnej (dzień 107 sAD) fazy sAD. Dodatkowo podczas wczesnej fazy choroby zwierzęta STZ SAL HR charakteryzowały się wyższym stężeniem IL-10 w osoczu niż gryzonie VEH SAL HR (U=3; p<0,05). Podczas późnej fazy sAD stężenie IL-10 w osoczu było wyższe u szczurów VEH SAL HR niż u zwierząt z grup: STZ IGF-1 HR (U=3; p<0,05) oraz VEH IGF-1 HR (U=1; p<0,05). Stężenie IL-10 w osoczu pomiędzy

wczesną a późną fazą choroby uległo wzrostowi u szczurów: STZ IGF-1 HR (U=2; p<0,05), VEH SAL HR (U=0; p<0,01) i STZ SAL LR (U=0; p<0,01).

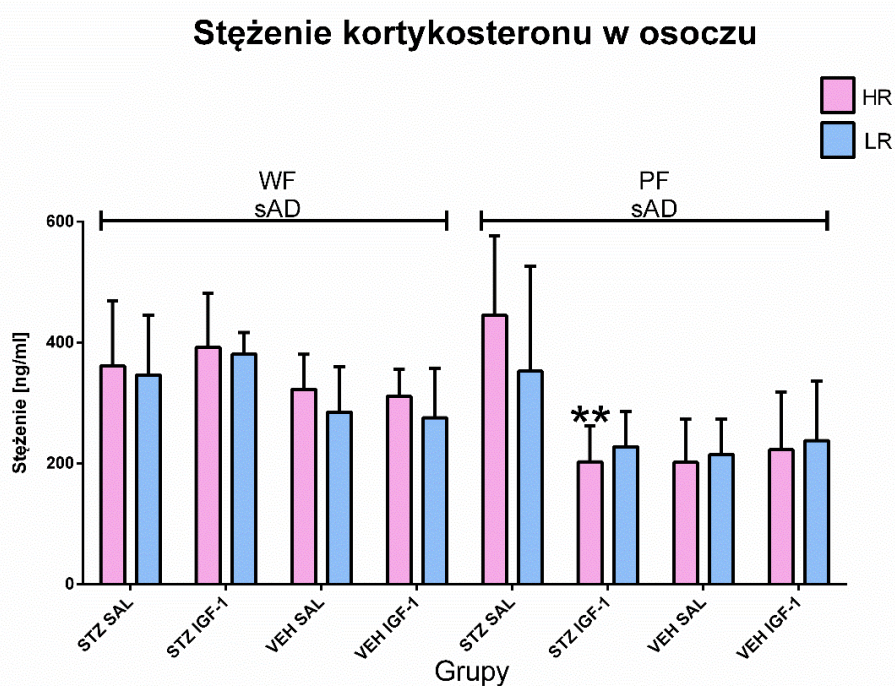


Rycina 17. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na stężenie (a) interleukiny-6 (IL-6) i (b) interleukiny-10 (IL-10) w osoczu we wczesnej (WF, dzień 62) oraz w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR). Objaśnienia: #-p<0,05; ##-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w obrębie jednej grupy doświadczalnej, podczas tej samej fazy choroby; \*-p<0,05 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej,

podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.7. Poziom aktywacji osi podwzgórzowo-przysadko-nadnerczowej (HPA)-stężenie kortykosteronu w osoczu

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami zwierząt ( $H=37,68$ ;  $p<0,001$ ;  $df_1=15$ ;  $df_2=80$ ) w stężeniu kortykosteronu w osoczu. Test U-Manna-Whitney'a (**rycina 18**) wykazał, że podczas wczesnej (dzień 62 sAD) fazy choroby stężenie kortykosteronu w osoczu w grupie STZ IGF-1 LR było wyższe niż u szczurów VEH SAL LR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ). Podczas późnej (dzień 107 sAD) fazy sAD w grupie STZ SAL HR stężenie kortykosteronu było wyższe w porównaniu do szczurów: STZ IGF-1 HR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) oraz VEH SAL HR ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ). W późnej fazie sAD stężenie hormonu obniżyło się w grupach: STZ IGF-1 HR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ), STZ IGF-1 LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) oraz VEH SAL HR ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ) w porównaniu do wczesnego etapu sAD.



Rycina 18. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na stężenie kortykosteronu w osoczu we wczesnej (WF, dzień 62) oraz w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo

(LR). Objaśnienia: \*\*- $p < 0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.8. Parametry hematologiczne

Analiza za pomocą testu Manna-Whitney'a (**tabela 16ab**) wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR w wybranych parametrach hematologicznych. Zawartość hemoglobiny w erytrocytach ( $U=0$ ;  $p < 0,01$ ) oraz średnia objętość czerwonych krwinek ( $U=0$ ;  $p < 0,01$ ) była wyższa u osobników VEH SAL HR niż u gryzoni VEH SAL LR na wczesnym etapie sAD. Na późnym etapie sAD zawartość hemoglobiny w czerwonych ( $U=1,5$ ;  $p < 0,05$ ) krwinkach oraz średnia masa hemoglobiny ( $U=3$ ;  $p < 0,05$ ) były wyższe w grupie STZ SAL LR w porównaniu do grupy STZ SAL HR.

Podczas wczesnej fazy sAD liczba płytek krwi (**tabela 16cd**) ( $U=0$ ;  $p < 0,01$ ) oraz płytkokryt ( $U=1$ ;  $p < 0,05$ ) były niższe w grupie STZ SAL LR niż w porównaniu ze zwierzętami STZ SAL HR. Na tym etapie choroby grupa VEH SAL LR odznaczała się niższą liczbą płytek krwi ( $U=3$ ;  $p < 0,05$ ) i niższym płytkokrytem ( $U=2$ ;  $p < 0,05$ ) niż osobniki VEH SAL HR. Ponadto zwierzęta VEH IGF-1 LR charakteryzował wyższy płytkokryt ( $U=2$ ;  $p < 0,05$ ) niż szczury VEH IGF-1 HR na wczesnym etapie sAD.

Tabela 16. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) charakterystyki behawioralnej oraz etapu rozwoju choroby na (a,b) parametry hematologiczne: liczba czerwonych krwinek (RBC), zawartość hemoglobiny (HGB), średnie stężenie hemoglobiny (MCHC), średnia masa hemoglobiny (MCH), średnia objętość krwinki (MCV), hematokryt (HCT), rozkład objętości czerwonych krwinek (RDW), liczba płytek krwi (PLT), średnia objętość płytek krwi (MPV), płytkokryt (PCT) we krwi we wczesnej (WF, dzień 62) oraz w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Parametr/Grupa	Etap	STZ SAL HR	STZ SAL LR	STZ IGF-1 HR	STZ IGF-1 LR
<b>RBC (Liczba ×10<sup>6</sup>/μl)</b>	a.WF SAD	7,77±0,52	7,58±0,29	7,88±0,05 <sup>^^\$</sup>	7,99±0,64
<b>HGB (g/dl)</b>		14,28±0,4 <sup>\$</sup>	14,22±0,75	14,48±0,08 <sup>\$</sup>	13,86±0,87
<b>MCHC (g/dl)</b>		36,54±4,65	36,36±1,61 <sup>\$</sup>	32,24±0,05 <sup>^^\$</sup>	31,48±0,56 <sup>**</sup>
<b>MCH (pg)</b>		15,98±1,42 <sup>\$</sup>	18,24±2,31	18,38±0,15 <sup>**^^\$</sup>	17,82±0,82
<b>MCV (μm<sup>3</sup>)</b>		52,2±2,68 <sup>\$</sup>	55,6±2,70	57±0,71 <sup>**^^</sup>	55,66±1,08 <sup>^</sup>
<b>HCT (%)</b>		43,9±2,03	44,58±1,33	45,08±0,18 <sup>\$</sup>	44,34±2,72
<b>RDW (%)</b>		13,78±0,72	13,4±0,23 <sup>\$</sup>	13,6±0,25	13,74±0,52
<b>PLT (Liczba×10<sup>3</sup>/μl)</b>		483,4±173,05	164±28,40 <sup>###**</sup>	380,6±106,33 <sup>^</sup>	388±117,37 <sup>\$</sup>
<b>MPV (μm<sup>3</sup>)</b>		7,46±0,74	12,48±3,85	8,16±0,85	7,56±1
<b>PCT (%)</b>		0,37±0,16	0,12±0,06 <sup>#</sup>	0,27±0,04 <sup>^^*</sup>	0,30±0,13 <sup>\$</sup>
<b>RBC (Liczba×10<sup>6</sup>/μl)</b>	b.PF SAD	7,87±0,20	7,45±0,96	7,57±0,09 <sup>&amp;&amp;***^</sup>	7,86±0,54
<b>HGB (g/dl)</b>		13,82±0,44	14,72±0,48 <sup>#</sup>	13,82±0,48 <sup>&amp;</sup>	14±0,87
<b>MCHC (g/dl)</b>		32,88±0,97	34,46±1,27	33,22±1,47	32,68±2,04
<b>MCH (pg)</b>		17,58±0,85	19,96±2,09 <sup>#</sup>	18,28±0,57	17,9±1,07
<b>MCV (μm<sup>3</sup>)</b>		53,4±1,34	57,6±5,41	54,8±1,10 <sup>&amp;</sup>	55±1,58
<b>HCT (%)</b>		42,06±0,29	42,74±2,49	41,68±0,91 <sup>&amp;&amp;</sup>	42,96±1,99
<b>RDW (%)</b>		13,7±0,54	14,86±1,93	13,8±0,83	13,76±0,72
<b>PLT (Liczba×10<sup>3</sup>/μl)</b>		174±76,69 <sup>&amp;</sup>	259±78,47 <sup>&amp;</sup>	476,2±46,43 <sup>**^^\$</sup>	362,2±125,86
<b>MPV (μm<sup>3</sup>)</b>		7,1±0,60 <sup>\$</sup>	8,99±2,81	8,04±0,70 <sup>*</sup>	8,15±0,32
<b>PCT (%)</b>	0,06±0,02 <sup>&amp;&amp;\$</sup>	0,16±0,12	0,39±0,03 <sup>&amp;&amp;***^^\$</sup>	0,34±0,06 <sup>**^^\$</sup>	

Parametr/Grupa	Etap	VEH SAL HR	VEH SAL LR	VEH IGF-1 HR	VEH IGF-1 LR
<b>RBC (Liczba ×10<sup>6</sup>/μl)</b>	a.WF SAD	8,15±0,05	8,31±0,49	8,34±0,26	8,22±0,51
<b>HGB (g/dl)</b>		14,82±0,19	14,42±0,08 <sup>#</sup>	14,18±0,33 <sup>SS</sup>	14,36±0,50
<b>MCHC (g/dl)</b>		31,84±0,23	32,76±2,11	30,86±0,37 <sup>SS</sup>	32,62±1,21
<b>MCH (pg)</b>		18,14±0,11	17,46±1,19	17,06±0,21 <sup>SS</sup>	17,48±0,49
<b>MCV (μm<sup>3</sup>)</b>		56,8±0,84	54,2±,30 <sup>#</sup>	54,8±0,45 <sup>SS</sup>	53±0,71
<b>HCT (%)</b>		46,58±0,82	44,42±2,77	46,16±1,54	44,±3,09
<b>RDW (%)</b>		13,72±0,13	14,08±0,36	14,14±0,55	14,04±1,06
<b>PLT (Liczba×10<sup>3</sup>/μl)</b>		268,6±76,57	165,2±57,61 <sup>#</sup>	163,8±61,29	323,2±127,43 <sup>S</sup>
<b>MPV (μm<sup>3</sup>)</b>		7,78±0,19	7,82±0,93	7,98±0,93	8,76±1,47
<b>PCT (%)</b>		0,26±0,09	0,13±0,04 <sup>#</sup>	0,09±0,04 <sup>S</sup>	0,24±0,15 <sup>#S</sup>
<b>RBC (Liczba×10<sup>6</sup>/μl)</b>	b.PF SAD	7,83±0,19 <sup>&amp;&amp;</sup>	8,21±0,53	7,83±0,17 <sup>&amp;</sup>	7,97±0,37
<b>HGB (g/dl)</b>		13,9±0,98	13,8±0,90	13,9±0,37	13,78±0,37
<b>MCHC (g/dl)</b>		32,46±1,42	31,5±2,66	33,5±1,58 <sup>&amp;&amp;</sup>	32,58±1,23
<b>MCH (pg)</b>		17,72±1,06	16,84±1,43	17,72±0,41 <sup>&amp;&amp;</sup>	17,22±0,84
<b>MCV (μm<sup>3</sup>)</b>		54,6±1,14 <sup>&amp;</sup>	53,4±0,89	53±1,22 <sup>&amp;</sup>	53,2±0,84
<b>HCT (%)</b>		42,72±1,33 <sup>&amp;&amp;</sup>	43,9±2,76	41,54±1,42 <sup>&amp;&amp;</sup>	42,36±1,57
<b>RDW (%)</b>		13,04±0,82	13,2±1,07	14,24±0,50 <sup>S</sup>	14,62±0,27 <sup>SS</sup>
<b>PLT (Liczba×10<sup>3</sup>/μl)</b>		222,6±86,31	209±82,61	206,2±101,38	237,2±96,78
<b>MPV (μm<sup>3</sup>)</b>		8,86±1,63	7,78±0,73	7,92±1,71	8,3±1,16
<b>PCT (%)</b>	0,20±0,05	0,15±0,05	0,11±0,06	0,13±0,02	

Objaśnienia: #-p<0,05; ##-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR; \*-p<0,05; \*\*-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ SAL i STZ IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; \$-p<0,05; \$\$-p<0,01 różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; ^-p<0,05; ^^p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami STZ IGF-1 i VEH IGF-1 o tej samej charakterystyce behawioralnej, podczas tej samej fazy choroby; &-p<0,05; &&-p<0,01 różnice istotne statystycznie pomiędzy wczesną, a późną fazą rozwoju choroby Alzheimera. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

### 3.2.9. Wskaźniki masy śledziony i grasicy

Analiza za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami zwierząt dotyczącymi wskaźnika masy śledziony ( $H=20,22$ ;  $p<0,01$ ;  $df1=7$ ;  $df2=40$ ) oraz grasicy ( $H=14,25$ ;  $p<0,05$ ;  $df1=7$ ;  $df2=40$ ).

Analiza za pomocą testu U-Manna-Whitney'a (tabela 17ab) wykazała, że wskaźnik masy śledziony jest wyższy u zwierząt LR w porównaniu do osobników HR w następujących grupach: STZ SAL ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ), STZ IGF-1 ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) oraz VEH IGF-1 ( $U=1$ ;  $p<0,05$ ). Wskaźnik masy grasicy u zwierząt z grupy STZ IGF-1 był wyższy u gryzoni LR ( $U=2$ ;  $p<0,05$ ) w porównaniu do szczurów HR, natomiast u osobników VEH SAL to zwierzęta HR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) odznaczały się wyższym wskaźnikiem masy tego organu. Dodatkowo zwierzęta VEH SAL LR posiadały niższy wskaźnik masy grasicy niż szczury STZ SAL LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ) oraz STZ IGF-1 LR ( $U=0$ ;  $p<0,01$ ).

Tabela 17. Wpływ podania insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz charakterystyki behawioralnej na wskaźnik masy (a) śledziony i (b) grasicy w późnej (PF, dzień 107 sAD) fazie rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera u zwierząt poddanych iniekcji streptozotocyny (STZ) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), streptozotocyny (STZ) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), buforu cytrynianowego (VEH) i fizjologicznego roztworu soli (SAL), buforu cytrynianowego (VEH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) rozdzielonych behawioralnie na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) oraz niskoaktywne ruchowo (LR).

Wskaźniki	a. Wskaźnik masy śledziony (mg/100 g m.c)		b. Wskaźnik masy grasicy (mg/100 g m.c)	
	HR	LR	HR	LR
STZ SAL	165,49±18,48	193,88±18,24 <sup>#</sup>	46,58±11,82	54,18±15,60 <sup>\$\$</sup>
STZ IGF-1	169,15±16,71	204,77±15,21 <sup>##</sup>	37,31±16,11	57,98±9,59 <sup>##\$\$</sup>
VEH SAL	172,79±16,68	178,55±20,46	54,27±11,40	35,74±3,11 <sup>#</sup>
VEH IGF-1	173,91±6,19	197,29±13,79 <sup>#</sup>	43,08±9,40	45,49±14,50

Objaśnienia: #- $p<0,05$ ; ##- $p<0,01$  różnice istotne statystycznie pomiędzy zwierzętami HR i LR; \$\$- $p<0,01$  różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą VEH SAL o tej samej charakterystyce behawioralnej. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna±SD. Różnice istotne statystycznie wykazano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a.

## 4. Dyskusja

W przedstawionych badaniach po raz pierwszy dokonaliśmy analizy wpływu charakterystyki behawioralnej związanej z osobniczą wrażliwością na stres (szczury z wysoką (HR) vs. szczury z niską (LR) aktywnością lokomotoryczną) na rozwój zaburzeń w przebiegu streptozotocynowego (STZ) modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) u szczurów. Ponadto po raz pierwszy zbadaliśmy w tym modelu sAD wpływ osobniczych różnic (HR vs. LR) na rozwój zaburzeń związanych z sAD oraz na efektywność terapii z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1). W przeprowadzonych doświadczeniach sprawdzono efekty związane z progresją choroby oraz z jej terapią z użyciem IGF-1 w trzech aspektach zmian: **behawioralnych** związanych z zaburzeniami pamięci przestrzennej, zaburzeniami lękowymi oraz depresyjnymi; **w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN)**, obejmujących poziom neurozapalenia mierzonego liczbą aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>), a także poziom odkładania złogów beta-amyloidu ( $\beta$ A), jak również **obwodowych** markerów zapalenia.

### 4.1. Zmiany behawioralne związane z zaburzeniami pamięci przestrzennej oraz zaburzeniami lękowymi/depresyjnymi w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD)

Jednym z priorytetów moich badań (**Cel 1**) było sprawdzenie czy zróżnicowanie pod względem osobniczej wrażliwości na stres, mierzone poziomem aktywności lokomotorycznej, wpływa na poziom zaburzeń pamięci przestrzennej i/lub na poziom zaburzeń lękowych i depresyjnych w przebiegu sAD. Wyniki badań zamieszczone w pracy 1. (Dunacka i wsp., 2024) wskazują, że u zwierząt bardziej wrażliwych na stres (HR) zaburzenia pamięci przestrzennej oraz zaburzenia lękowe podczas rozwoju sAD były silniejsze w porównaniu z osobnikami mniej wrażliwymi na czynniki stresowe (LR).

Wystąpienie silniejszych zaburzeń pamięci przestrzennej u osobników HR w porównaniu ze szczurami LR sugeruje, że u zwierząt tych doszło do większych zakłóceń funkcjonowania hipokampa i/lub innych struktur z nim połączonych, co wskazuje na silniejsze zmiany związane z postępem choroby w tych rejonach OUN. Wykazałam (rycina 19) wyższą liczbę złogów  $\beta$ A w obszarach CA1, CA2, CA3 oraz zakrętu zębatego hipokampa (DG) u szczurów STZ HR w stosunku do grupy STZ LR (różnice nie osiągnęły poziomu istotności

statystycznej). Stwierdziliśmy ponadto (Dunacka i wsp., 2024), że w części brzeżnej jądra półleżącego (NAcS) dochodzi do odkładania się wyższej liczby oligomerów  $\beta$ A w grupie STZ u osobników HR w porównaniu ze zwierzętami LR. Obecność tych patologicznych zmian może przyczyniać się do zakłóceń funkcjonalnych pomiędzy hipokampem a innymi strukturami mózgu, w szczególności do zaburzeń połączeń regionu CA1 hipokampa z korą przedczołową (PFC) i NAcS. Jądro półleżące (NAc) jest kluczową strukturą dla dróg dopaminergicznych w OUN (otrzymuje projekcje dopaminergiczne) (Hasue i Shammah-Lagnado, 2002) i stanowi limbiczny węzeł aktywności motorycznej. Podzielone jest na część rdzenną (NAcC) oraz na część brzeżną (NAcS), przy czym rdzeń jest zaangażowany w procesy uczenia związane z emocjami, a część brzeżna w pojawienie się oraz wygaszanie lęku (Levita i wsp., 2002; Jensen i wsp., 2003; Dutta i wsp., 2021). Stwierdziliśmy ponadto (Dunacka i wsp., 2024), że w części NAcS dochodzi do odkładania się wyższej liczby oligomerów  $\beta$ A w grupie STZ u osobników HR w porównaniu ze zwierzętami LR. Zwiększony poziom neurodegeneracji obejmującej hipokamp oraz NAcS u zwierząt HR w modelu sAD, wywołany większą liczbą złogów  $\beta$ A może zatem skutkować pojawianiem się silniejszych zaburzeń pamięci przestrzennej i/lub zaburzeń lękowych obserwowanych w naszych badaniach.

U osobników zróżnicowanych behawioralnie (HR vs. LR) pod względem wrażliwości na stres zauważone różnice w poziomie zaburzeń lękowych w zastosowanym przez nas modelu sAD, mogą być spowodowane także odmienną aktywacją neuronalną w OUN. Zwierzęta HR w warunkach stresowych charakteryzują się silniejszą aktywacją serotonergiczną w grzbietowym jądrze szwu, które przesyła impulsy m. in. do hipokampa i ciała migdałowatego (Cohen i wsp., 2017). Zwiększona aktywność jąder ciała migdałowatego (jądra podstawno-bocznego (BLA), jądra przyśrodkowego (MeA) i jądra środkowego (CeA)) przyczynia się do indukcji strachu, a z kolei aktywacja hipokampa w takich stanach może skutkować powstaniem śladu pamięciowego, kodującego związek między daną sytuacją i odczuwaniem strachu (Zhang i wsp., 2019, 2021; Simic i wsp., 2021). W naszych badaniach u zwierząt HR doszło do nasilenia reakcji strachu, co zostało wyrażone wyższym poziomem zachowań lękowych, zmierzonych w testach EPM i OF w porównaniu ze szczurami LR (rycina 19). Być może powodem tego było silniejsze zakłócenie pracy hipokampa oraz jego obwodów funkcjonalnych, w tym połączeń z ciałem migdałowatym, spowodowanych odkładaniem  $\beta$ A. Inni eksperymetatorzy wykazali, że grzbietowa część hipokampa jest kluczowa dla procesów uczenia się i pamięci a brzuszna część tej struktury odgrywa ważną rolę w regulacji zachowań lękowych (Bannerman i wsp., 2004, 2014; Hong i Kaang, 2022). Połączenia pomiędzy brzusznią częścią obszaru CA1 hipokampa a środkową częścią kory przedczołowej i NAc są

zaangażowane w wystąpienie behawioru lękowego, natomiast infralimbiczna część kory przedczołowej, niezbędna do wygaszania reakcji strachu, posiada połączenia z NAcS (Brog i wsp., 1993; LeDoux, 2000; Sierra-Mercado i wsp., 2010; Kosugi i wsp., 2021; Hong i Kaang, 2022). Silniejsze odkładanie się złogów  $\beta$ A w części NAcS u zwierząt HR niż u LR może zatem tłumaczyć słabszą reakcję wygaszania strachu u tych osobników, co przełożyło się na silniejsze zaburzenia lękowe. Inne badania wykazały, że osobniki HR poddane stresowi socjalnemu, charakteryzowały się dłuższą latencją i krótszym czasem spędzonym w kwadrancie krytycznym basenu w teście MWM (Touyarot i wsp., 2004). Doniesienia te oraz uzyskane przeze mnie wyniki sugerują zatem, że zakłócenia funkcjonowania hipokampa wywierają negatywny wpływ nie tylko na procesy pamięciowe, ale mogą również przyczyniać się do rozwoju zaburzeń lękowych, które silniej manifestowały się u osobników HR.

Zwierzęta HR i LR przejawiają różnice w budowie i funkcjonowaniu dróg dopaminergicznych w OUN. Szczury HR oznaczają się wyższą liczbą komórek dopaminergicznych ( $TH^+$ ) w śródmózgowiu w porównaniu ze zwierzętami LR (Jerzemowska i wsp., 2012), jak również wyższym poziomem dopaminy w NAc niż szczury LR (Mabrouk i wsp., 2017). Co więcej, wyładowania w brzuszonym polu nakrywki śródmózgowia (VTA) są częstsze u osobników HR w stosunku do zwierząt LR (Mabrouk i wsp., 2017). Ponadto u osobników bardziej wrażliwych na czynniki stresowe (HR) uwalnianie dopaminy w OUN pod wpływem markera reakcji stresowej - kortykosteronu (KORT), jest wyższe niż u szczurów LR (Deminiere i wsp., 1989; Bradberry i wsp., 1991; Hooks i wsp., 1991; Dellu i wsp., 1996; Marinelli i Piazza, 2002). Działanie dopaminy jest również silniejsze u osobników HR pod wpływem noradrenaliny (NE), a właśnie w NAc to szczury HR odznaczają się wyższym poziomem NE w stosunku do szczurów LR (Mabrouk i wsp., 2017). Moje badania pokazały, że zwierzęta z modelem sAD odznaczają się wyższym stężeniem KORT w osoczu niż zdrowe zwierzęta kontrolne. Sugeruje to, że u osobników HR z grupy STZ z wyższą reaktywnością stresową doszło do silniejszej aktywacji dróg dopaminergicznych i/lub noradrenergicznych. Obserwowany w naszych badaniach większy poziom zmian patologicznych u szczurów HR w NAcS - strukturze otrzymującej projekcje z tych dróg, mógł wywołać silniejsze zaburzenia komunikacji pomiędzy strukturami OUN, co w efekcie poskutkowało wyższym poziomem zaburzeń lękowych i zaburzeń pamięci u osobników HR w porównaniu ze zwierzętami LR. Z drugiej strony, możliwa neurodegeneracja w różnych strukturach otrzymujących projekcje dopaminergiczne, które w warunkach fizjologicznych są bardziej aktywne u osobników HR, mogła doprowadzić do deficytów dopaminy, zakłócając skuteczną komunikację w szlakach neuronalnych i zwiększając poziom lęku. W regulację

reakcji stresowej, zachowań lękowych oraz procesów pamięciowych zaangażowane jest wiele struktur np. hipokamp, PFC, NAc i podwzgórze, a więc zaburzenia projekcji pomiędzy tymi strukturami będą wpływały negatywnie na realizowane przez nie funkcje (Li i wsp., 2015; Simic i wsp., 2021).

Inną możliwą przyczyną obserwowanej intensyfikacji zaburzeń pamięci i zachowań lękowych u zwierząt HR może być zróżnicowany przebieg neurogenezy pomiędzy osobnikami HR i LR. U szczurów chroniczny stres np. stres prenatalny, porażki socjalne, nieprzewidywalny umiarkowany stres lub unieruchomienie przyczyniają się do redukcji procesu neurogenezy (Anacker i Hen, 2018). Zatem u zwierząt bardziej wrażliwych na stres (HR) można spodziewać się większych zakłóceń tego procesu niż u szczurów LR, a w konsekwencji silniejszych nieprawidłowości w przesyłaniu informacji pomiędzy różnymi strukturami OUN np. podwzgórzem i ciałem migdałowatym, co mogłoby skutkować większym poziomem lęku u zwierząt HR (Anacker i Hen, 2018). Przypuszczenia te potwierdzają badania Lemaire i wsp., (1999), którzy wykazali, że w warstwie podziarnistej DG hipokampa zwierzęta LR odznaczają się wyższą liczbą komórek znakowanych BrdU - markerem nowopowstałych komórek. Dodatkowo w odpowiedzi na warunki stresowe, w teście wymuszonego pływania (FST) zauważono odmienną ekspresję genów pomiędzy zwierzętami zróżnicowanymi pod względem osobniczej wrażliwości na stres. U zwierząt HR doszło do zmian transkrypcji w 238 genach a u zwierząt LR aż w 569 genach, przy czym zmiany te obejmowały tylko 20 wspólnych genów (Pitychoutis i wsp., 2014). Ponadto, u zwierząt LR zmianie uległo 7 genów związanych z procesami neurogenezy (*Nog*, *Ntf3*, *Tgfb1*, *Srr*, *Ephb2*, *Sox2*, *Smad7*) a u osobników HR zmiany te obejmowały tylko 3 geny (*Jag1*, *Gsk3b*, *Bmpr1a*). Zatem warunki stresowe przyczyniają się do zmian w procesie neurogenezy, która jest zależna od charakterystyki behawioralnej zwierzęcia. Analizując wszystkie zmiany na poziomie genetycznym u tych zwierząt można wywnioskować, że stres u osobników LR aktywował geny związane z promowaniem neuroprotekcji, a z kolei u osobników HR związanych z procesami apoptotycznymi (Pitychoutis i wsp., 2014). Inni eksperymetatorzy zauważyli, że u osobników LR pod wpływem stresu dochodzi do zwiększenia poziomu mRNA neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF), chociaż to w warunkach wyjściowych zwierzęta HR odznaczały się wyższym poziomem tego białka (Duclot i Kabbaj, 2013). Można przypuszczać, że większa liczba złogów  $\beta$ A obserwowana u osobników HR w moich badaniach, przyczynia się do zaburzeń neurogenezy i deficytów mechanizmów związanych z powstawaniem BDNF. Zaburzenia neurogenezy w połączeniu z neurodegeneracją skutkują zmianami anatomicznymi i czynnościowymi w połączeniach neuronalnych, w tym nieprawidłowym analizowaniem

informacji, co odzwierciedlają obserwowane silniejsze deficyty pamięci i zaburzenia lękowe u szczurów HR w modelu sAD.

Uzyskane w naszych badaniach wyniki dotyczące wystąpienia anhedonii - podstawowego wskaźnika zaburzeń depresyjnych - nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej pomiędzy osobnikami HR i LR z grupy STZ SAL (wyniki nieopublikowane). Jednakże zwierzęta z grupy STZ SAL LR spożyły mniej sacharozy niż grupa kontrolna VEH SAL LR podczas późnej fazy sAD. Sugeruje to, że na rozwój zaburzeń depresyjnych w przebiegu sAD bardziej wrażliwe są zwierzęta LR. Być może dłuższy czas trwania eksperymentu pozwoliłby zaobserwować istotność statystyczną różnic w poziomie anhedonii w grupie STZ SAL pomiędzy osobnikami HR i LR.

#### **4.2. Zmiany behawioralne związane z zaburzeniami pamięci przestrzennej oraz zaburzeniami lękowymi/depresyjnymi po zastosowaniu terapii z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimerera (sAD)**

Zróznicowanie występowania zaburzeń behawioralnych związanych z deficytami pamięci i zaburzeniami lękowymi u szczurów HR i LR w przebiegu sAD stanowiło podstawę dalszych badań, których celem było określenie czy terapia z użyciem ośrodkowego podawania IGF-1 złagodzi bądź zniweluje te niekorzystne zmiany (Cel 2). W pierwszym etapie doświadczeń (Dunacka i wsp., 2025a) sprawdzono czy iniekcje dokomorowe (ICV) IGF-1 wpływają na redukcję deficytów pamięci przestrzennej obserwowanych w modelu sAD. Badania po raz pierwszy wykazały, że ośrodkowe podanie IGF-1 w streptozotocynowym modelu sAD wykazuje działanie ochronne w odniesieniu do pamięci przestrzennej: w czasie nabywania pamięci referencyjnej, w czasie odtwarzania pamięci referencyjnej oraz podczas nabywania pamięci roboczej. Następnie zbadalam (Dunacka i wsp., 2025b) czy podanie IGF-1 okaże się równie skuteczne w zakresie ograniczenia zaburzeń depresyjnych i lękowych w tym modelu choroby. Nasz eksperyment po raz pierwszy wykazał, że iniekcje dokomorowe z użyciem IGF-1 u szczurów z modelem sAD przyczyniły się do osłabienia zaburzeń depresyjnych i lękowych. Korzystny wpływ neurotrofiny IGF-1 na poprawę zaburzeń behawioralnych związanych z deficytami pamięci oraz zaburzeń lękowych/depresyjnych u szczurów w modelu sAD związany był z redukcją neurozapalenia, mierzonego liczbą aktywowanych komórek mikrogleju, zwłaszcza w obszarze CA2 hipokampa oraz ze zmniejszonym odkładaniem złogów  $\beta$ A w rejonie CA1 hipokampa. Ponadto stwierdziliśmy, że

oprócz redukcji neurozapalenia po dokomorowym podaniu IGF-1 wystąpiła redukcja obwodowego stanu zapalnego.

Redukcja deficytów pamięci przestrzennej oraz zaburzeń lękowych/depresyjnych u szczurów z modelem sAD stała się podstawą do sprawdzenia czy ograniczenie tych zaburzeń behawioralnych w wyniku działania IGF-1, zależne jest od osobniczej wrażliwości na czynniki stresowe, mierzone zróżnicowaną aktywnością lokomotoryczną (HR vs. LR) (Cel 3). W przypadku deficytów pamięci (wyniki nieopublikowane rycina 8) podanie ICV-IGF-1 silniej redukowało te deficyty u szczurów HR niż LR. Na etapie nabywania pamięci referencyjnej (dni 1-3 MWM) i jej odtwarzania (dzień 4 MWM, próba bez platformy) protekcyjne działanie IGF-1 na procesy kognitywne u zwierząt HR z modelem sAD było widoczne głównie podczas bardzo wczesnej i wczesnej fazy sAD. Sugeruje to, że skuteczność podawanego ICV-IGF-1 w tym modelu choroby, zależna jest od fazy rozwoju sAD. Krótkotrwały stres zwiększa uwalnianie NE w hipokampie, a więc neuroprzekaźnika wspierającego uczenie się i koncentrację (Rosario i Abercrombie, 1999; Lapis i Morilak, 2006). Być może u gryzoni HR doszło do zwiększonego uwalniania tego mediatora w hipokampie. Jak wcześniej wspomniałam to właśnie szczury HR w NAc posiadają wyższy poziom tego neuroprzekaźnika niż szczury LR (Mabrouk i wsp., 2017), więc prawdopodobnie w innych strukturach OUN, a zwłaszcza związanych z uczeniem się, również zwierzęta HR będzie charakteryzowało wyższe stężenie NE w porównaniu ze szczurami LR. Hipoteza ta wymagałaby jednak określenia poziomu NE i ewentualnie innych neurotransmiterów związanych z uczeniem się jak np. acetylocholina i glutaminian, w strukturach OUN zaangażowanych w procesy kognitywne, przede wszystkim w hipokampie i PFC, na różnych etapach rozwoju sAD. Z kolei wpływ iniekcji IGF-1 na przestrzenną pamięć roboczą (dni 5-8 MWM) u tych dwóch typów behawioralnych szczurów (HR vs. LR) jest niejednoznaczny. Na bardzo wczesnym etapie sAD terapia z użyciem IGF-1 przyczyniła się do skrócenia latencji dotarcia do platformy u gryzoni LR w stosunku do szczurów HR w próbie 3 testu MWM (dni 5-8 MWM, dni 20-23 sAD). Jednak w większości prób na tym etapie choroby nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie pomiędzy zwierzętami HR a LR. Z kolei na późnym etapie sAD, podanie IGF-1 skróciło latencję dopłynięcia do platformy bardziej skutecznie u gryzoni HR w czasie prób 3 i 4 (dni 5-8 MWM, dni 103-106 sAD). Również procent czasu spędzonego w kwadrancie krytycznym różnił się istotnie pomiędzy grupami STZ IGF-1 HR vs. LR w czasie późnego etapu sAD, podczas którego zwierzęta HR odznaczały się wyższym procentem czasu spędzonego w krytycznym fragmencie basenu (próba 3 i 4, dni 5-8 MWM) w dniach 103-106 rozwoju sAD. Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że na końcowych etapach

nabywania pamięci roboczej (próba 3 i 4) terapia z użyciem IGF-1 ponownie korzystniej oddziaływała na zwierzęta HR. Uzyskane przez nas wyniki są zgodne z wnioskami innych autorów (Farias-Quipillor i wsp., 2019), którzy stwierdzili korzystny wpływ IGF-1 na procesy pamięciowe, a efekt ten był spowodowany wzrostem poziomu neurogenezy w hipokampie. W dostępnej literaturze brakuje danych o wpływie różnic osobniczych na ten korzystny efekt IGF-1. Nasze badania są pierwszymi, które dotyczą wpływu dokomorowych iniekcji IGF-1 w modelu sporadycznej postaci AD u zwierząt rozdzielonych pod względem osobniczej wrażliwości na stres (HR vs. LR). Dokładny mechanizm zróżnicowanej odpowiedzi zwierząt HR i LR w zakresie poprawy pamięci przestrzennej w streptozotocynowym modelu sAD wymaga dalszych badań.

Redukcja zaburzeń neuropsychiatrycznych (zaburzenia lękowe/depresyjne) w modelu sAD po podaniu IGF-1 zależna jest także od charakterystyki behawioralnej zwierzęcia związanej z wrażliwością na stres. Podczas bardzo wczesnego i wczesnego etapu rozwoju sAD podanie IGF-1 zwiększyło spożycie sacharozy (wyniki nieopublikowane rycina 4) u osobników mniej wrażliwych na stres, a więc silniej obniżyło poziom anhedonii u osobników LR w porównaniu ze zwierzętami HR. Podobnie terapia z użyciem neurotrofiny IGF-1 silniej zredukowała poziom lęku zmierzony w teście EPM (wyniki nieopublikowane rycina 5) u szczurów LR w porównaniu z osobnikami HR, zwłaszcza na wczesnym etapie rozwoju sAD. Jedną z przyczyn silniejszego niwelowania zaburzeń neuropsychiatrycznych w modelu sAD u zwierząt LR w wyniku terapii IGF-1 można upatrywać w niższym poziomie tych zaburzeń behawioralnych obserwowanych w przebiegu choroby w porównaniu ze zwierzętami HR (Dunacka i wsp., 2024). Wydaje się więc oczywiste, że IGF-1 wywołał silniejszy efekt prowadzący do redukcji tych zaburzeń w grupie szczurów o łagodniejszych zmianach. Większa oporność osobników LR na stresory w porównaniu ze zwierzętami HR stwarza możliwość korzystniejszego wpływu przeciwdepresyjnego i anksjolitycznego IGF-1 u zwierząt LR (Piazza i wsp., 1991a). Inni badacze zauważyli, że po porażce socjalnej osobniki HR wykazywały wyższy poziom lęku, mniejsze spożycie sacharozy oraz unikały kontaktów społecznych (Duclot i wsp., 2011), co również wspiera powyższe założenia. Wydaje się zatem, że kluczowym elementem w terapii anhedonii/lęku w przebiegu sAD jest połączenie niższej bazalnej stresowrażliwości i zastosowanie leku odpowiedniego do redukcji tych zaburzeń. Ponadto, IGF-1 jest uważany za kluczowy regulator lęku, gdyż ułatwia konsolidację pamięci i wygaszanie strachu (Maglio i wsp., 2021). Zatem szczególnie u osobników LR, wykazujących mniejszą reaktywność stresową, widoczne jest jego anksjolityczne działanie.

Aby jak najlepiej określić mechanizm wpływu IGF-1 na deficyty pamięci przestrzennej i zaburzenia lękowe, który bierze pod uwagę osobniczą zmienność behawioralną zwierzęcia, należałoby również wziąć pod uwagę różnice w aktywacji osi HPA, w poziomie neurogenezy oraz w funkcjonowaniu szlaków OUN, związanych z koncentracją, uczeniem i pamięcią podczas różnych etapów sAD. Uzyskane przez nas rezultaty wymagają dalszych badań związanych z mechanizmami stojącymi za odmienną odpowiedzią u zwierząt zróżnicowanych pod względem wrażliwości na stres (HR vs. LR).

#### **4.3. Zmiany związane z odkładaniem złogów $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) i poziomem neurozapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD)**

Jak wspomniano wcześniej szczury HR z modelem sAD charakteryzowały się wyższym poziomem złogów  $\beta$ A w obszarach CA1, CA2, CA3 oraz DG hipokampa (rycina 19), a także w NAcS oraz w PFC. Te patologiczne zmiany mogą być jedną z przyczyn silniejszych zaburzeń kognitywnych i lękowych u osobników bardziej wrażliwych na stres.

Zróżnicowanie reaktywności stresowej pomiędzy zwierzętami HR i LR związane jest między innymi, z odmienną aktywacją układu dopaminergicznego, a także ze zróżnicowaniem odpowiedzi układu odpornościowego organizmu (Basu i wsp., 2000; Wrona i wsp., 2003, 2004, 2005, 2014). Nasze badania wykazały, że w 99 dniu po indukcji sAD u zwierząt STZ HR rozwinął się silniejszy poziom neurozapalenia w PFC mierzony liczbą aktywowanych komórek mikrogleju ( $CD68^+$ ) oraz stwierdzono w tej części OUN wyższą liczbę złogów  $\beta$ A w porównaniu z grupą LR. Ponadto u zwierząt STZ HR wykazaliśmy wyższą liczbą oligomerów  $\beta$ A w NAcS w stosunku do szczurów STZ LR. Aktywność dopaminergiczna w NAc jest wyższa, natomiast w PFC niższa u zwierząt HR w porównaniu ze zwierzętami LR (Piazza i wsp., 1991b). Być może niższy wyjściowy poziom dostarczanej dopaminy, silniejszy poziom neurozapalenia oraz wyższa liczba oligomerów  $\beta$ A w PFC jest jedną z przyczyn nasilenia reakcji lękowej oraz silniejszych deficytów pamięci w przebiegu sAD u szczurów HR. Deficyty pamięci oraz nasilona reakcja lękowa obserwowane u tych zwierząt może być także związana z neurodegeneracją powodowaną przez złogi  $\beta$ A w NAcS. Ponadto szczury STZ HR wykazywały wyższą liczbą komórek  $CD68^+$  w stosunku do osobników STZ LR w jądrze przyśrodkowo-grzbietowym podwzgórza (DMH). Jądro DMH odpowiedzialne jest za hamowanie aktywacji osi HPA wywołanej stresem (Ebner i wsp., 2013). Być może zwiększony poziom neurozapalenia w tym jądrze podwzgórza obserwowany w naszych badaniach

przyczynia się do silniejszej stymulacji osi HPA, a w konsekwencji do zwiększenia poziomu lęku w tej grupie zwierząt.

#### **4.4. Zmiany związane z odkładaniem złogów $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) i poziomem neurozapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) po zastosowaniu terapii z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD)**

Zastosowanie terapii z użyciem IGF-1 w modelu sAD (Dunacka i wsp., 2025a) zredukowało poziom neurozapalenia w regionie CA2 hipokampa, w boczny obszarze przedwzrokowym i w jądrze nadwzrokowym podwzgórza oraz zmniejszyło liczbę złogów  $\beta$ A w obszarze CA1 hipokampa. Nasze wyniki sugerują zatem, że ośrodkowe podanie IGF-1 w przebiegu sAD może być czynnikiem spowalniającym albo zapobiegającym rozwojowi choroby, poprzez poprawę działania sygnalizacji insulinowej, a co za tym idzie, redukcję insulinooporności mózgu - jednego z wczesnych objawów sAD (Dineley i wsp., 2014; Lewitt i Boyd, 2019).

Zaburzenia sygnalizacji insulinowej związane są z zaburzeniami kognytywnymi (Ansari i wsp., 2023). U pacjentów z AD i u osób z wysokim ryzykiem wystąpienia tej choroby wykazano, że zmiany w poziomach różnych cząstek sygnalizacyjnych szlaków insulinowych w przodomózgowiu są powiązane z poprawą pamięci (Moloney i wsp., 2010; Talbot i wsp., 2012; Miao i wsp., 2025). Zmiany te mogą następować po selektywnym zwiększeniu poziomu insuliny poprzez donosowe podanie (Reger i wsp., 2008; Craft i wsp., 2012). Badacze sugerują także, że oporność na insulinę w hipokampie jest wczesną i powszechną cechą AD, a temu zaburzeniu towarzyszy również oporność na IGF-1 i zaburzenia substratu dla jego receptora (IGF-1R) czyli substratu receptora insulinowego-1 (IRS-1), które mogą być potencjalnie spowodowane przez obecność złogów  $\beta$ A, a także jednocześnie przyczyniać się do powstawania deficytów poznawczych (Talbot i wsp., 2012). Wiadomo także, że insulina i IGF-1 poprzez regulację metabolizmu glukozy są zaangażowane w wiele ważnych procesów w OUN, w tym w neuroprotekcję, neuroregenerację, plastyczność synaptyczną (szczególnie w hipokampie) a także wspierają funkcje kognitywne oraz procesy pamięciowe (Salkovic-Petrisic i Hoyer, 2007; Pomytkin i wsp., 2018; Zhao i wsp., 2019; Herrera i wsp., 2024; Hayes i wsp., 2025), a więc oporność na insulinę/IGF-1 może przyczynić się do daleko idących patologii w przebiegu sAD.

IGF-1 swoje korzystne działanie, polegające na zmniejszaniu zaburzeń pamięci w przebiegu sAD, wywiera prawdopodobnie poprzez redukcję liczby oligomerów  $\beta$ A w OUN,

zwłaszcza w hipokampie. Nasze badania wykazały, że w modelu sAD podanie neurotrofiny IGF-1 zredukowało liczbę złożeń  $\beta$ A w obszarze CA1 hipokampa, natomiast w regionach CA2 i CA3 hipokampa nie stwierdzono istotnych różnic w stosunku do grupy STZ SAL. Z kolei w regionie DG hipokampa obserwowaliśmy większą liczbę złożeń  $\beta$ A pomimo podania IGF-1. Inni badawcy zauważyli, że jednoczesne dokomorowe podawanie IGF-1 wraz z iniekcją  $\beta$ A (25-35) stanowiącą model AD, wykazało ochronne działanie tej neurotrofiny skierowane przeciwko  $\beta$ A. Według autorów, korzystny efekt działania IGF-1 wiąże się ze zwiększoną aktywnością kinazy białkowej A i fosforylacji białka transkrypcyjnego wiążącego element odpowiedzi na cAMP (CREB) (Aguado-Llera i wsp., 2018). Z drugiej strony nieco odmienne działanie IGF-1 w różnych częściach hipokampa może być spowodowane odmiennym zaangażowaniem tych części w stan insulinooporności mózgu. Inni naukowcy dowiedli, że iniekcja ICV-IGF-1 nasila usuwanie  $\beta$ A z mózgu, poprzez wpływ na transport czy produkcję białek transportowych  $\beta$ A przez barierę krew-mózg (BBB) w splocie naczyniówkowym. Dowiedziono, że omawiana neurotrofina prowadzi do wzrostu stężenia megaliny (białka pośredniczącego w usuwaniu  $\beta$ A), a tym samym redukuje zaburzenia pamięci związane z obecnością amyloidu w OUN (Carro i wsp., 2005). Uzyskane przez nas wyniki, wskazujące na poprawę pamięci przestrzennej po iniekcjach ICV-IGF-1 w modelu sAD w połączeniu z redukcją  $\beta$ A w obszarze CA1 hipokampa, są zgodne z innymi doniesieniami, które dowodzą, że stany aktywacji wielu cząstek szlaku sygnalizacyjnego insuliny w komórkach piramidowych rejonu CA1 hipokampa są silnie związane z roboczą oraz epizodyczną pamięcią (Ma i wsp., 2009). Zdaniem autorów oligomery  $\beta$ A są zdolne do inaktywacji podjednostki IRS-1, co może wskazywać, że  $\beta$ A wpływa na funkcje poznawcze (Ma i wsp., 2009; Bomfirm i wsp., 2012). Przeciwnie wyniki dotyczące roli IGF-1 przedstawił inny zespół badawczy (Freude i wsp., 2009) wykazując, że zaburzona sygnalizacja związana z substratem dla receptora insuliny i IGF-1, czyli podjednostką IRS-2, zapobiegała przedwczesnej śmierci komórek i opóźniała akumulację  $\beta$ A w hipokampie myszy z modelem AD połączonej z niedoborem IRS-2. Według autorów opóźniona akumulacja  $\beta$ A w OUN wynikała ze zmniejszonego przetwarzania białka APP będącego prekursorem  $\beta$ A, co było zależne od deregulacji szlaków sygnalizacyjnych IGF-1/IRS-2, a według badaczy jest to zjawiskiem ochronnym w przebiegu AD.

Jak wcześniej wspomniano podawanie dokomorowe IGF-1 u zwierząt z modelem sAD w naszych badaniach zredukowało liczbę aktywowanych komórek mikrogleju ( $CD68^+$ ) w regionie CA2 hipokampa, w bocznym obszarze przedwzrokowym i w jądrze nadwzrokowym podwzgórza w 107 dniu po indukcji choroby, co wskazuje, że podanie IGF-1 wykazało efekt przeciwzapalny. Jak wiadomo, IGF-1 nasila przekształcanie mikrogleju w przeciwzapalny

fenotyp M2, moduluje aktywność tych komórek przez szlak TLR4/NF- $\kappa$ B, jak również oddziałuje na astrocyty przez szlak PI3K (Labandeira-Garcia i wsp., 2017; Sun i wsp., 2020; Pinto-Benito i wsp., 2022; Herrera i wsp., 2024). Ponadto IGF-1 redukuje produkcję cytokin pro-zapalnych np. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , a nasila produkcję mediatorów przeciwzapalnych np. IL-10 czy IL-4 (Park i wsp., 2011).

Korzystny wpływ podawania ICV-IGF-1 u szczurów w modelu sAD związany z obniżeniem neurozapalenia, poprawą pamięci przestrzennej, jak również z obniżeniem akumulacji  $\beta$ A może wynikać, jak już wcześniej wspomniano, także z zaangażowania tej neurotrofiny w neurogenezę. Zarówno IGF-1, jak i insulina uczestniczą w tym procesie w obszarze DG hipokampa u dorosłych osobników, a nowo powstałe neurony są wbudowywane w istniejące obwody hipokampa, wspierając tym samym procesy uczenia się i zapamiętywania (Ziegler i wsp., 2015; Mir i wsp., 2017; Kondo i wsp., 2023). Wcześniejsze dane wykazały, że egzogenny IGF-1 nasila proliferację neuronalnych komórek prekursorowych hipokampa, a usunięcie genu dla receptora IGF-1R skutkuje śmiercią neuronów w obszarze DG hipokampa oraz upośledzeniem pamięci (Liu i wsp., 2009; Soto i wsp., 2019; Blume i wsp., 2024; Kim i wsp., 2024; Hayes i wsp., 2025). Warto dodać, że w streptozotocynowym modelu sAD dochodzi do zaburzeń neurogenety postnatalnej. Wcześniejsze nasze badania dowiodły, że upośledzenie neurogenety w tym modelu choroby obserwowane jest już nawet 25 dni po iniekcjach ICV-STZ, o czym świadczy niższy procentowy udział neuronów znakowanych BrdU<sup>+</sup>+DCX<sup>+</sup> u młodych (3 miesiące) i starych (22 miesiące) szczurów w DG hipokampa i opuszce węchowej (Kurowska-Rucińska i wsp., 2022). Ponadto, w tym modelu choroby zaobserwowano niższą liczbę komórek produkujących BDNF w obszarach CA1, CA2, CA3, DG hipokampa oraz w opuszce węchowej w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (Kurowska-Rucińska i wsp., 2022). Serotonina jest substancją promującą neurogenezę a wiele neuronów serotonergiczných wysyła projekcje do regionu DG hipokampa (Kondo i wsp., 2018, 2023; Azargoonjahromi, 2024). Pobudzanie serotoninowego receptora 5-HT<sub>3</sub> promuje uwalnianie IGF-1 w hipokampie i wspiera proces neurogenety, co skutkuje działaniem przeciwdepresyjnym i poprawą funkcji poznawczych.

IGF-1 wspiera także łączność synaptyczną pomiędzy neuronami w warunkach insulinooporności (Jo i wsp., 2025). Nasze badania pokazały, że obniżenie liczby złogów  $\beta$ A w regionie CA1 hipokampa po podaniu IGF-1 związane jest z poprawą pamięci przestrzennej. Wyniki te są zgodne z innymi doniesieniami, które wskazują, że działanie IGF-1 wpływa na pobudzenie transmisji synaptycznej w regionie CA1 hipokampa (Ramsey i wsp., 2005; Akbari i wsp., 2023;). Korzystne efekty działania ośrodkowego podania IGF-1 w modelu sAD,

obserwowane w naszych badaniach mogą zależeć także od stopnia zaburzeń wywołanych przez podanie STZ, czasu działania tej neurotoksyny i etapu choroby. Wykazano także, że pod wpływem STZ obniża się ekspresja genu dla receptora IGF-1 (Grünblatt i wsp., 2004).

Badając wpływ podania ICV-IGF-1 na niwelowanie objawów w przebiegu sAD należy również uwzględnić czas jaki upłynie od iniekcji ICV-STZ do wystąpienia zaburzeń u zwierząt oraz możliwość zróżnicowanej odpowiedzi na podanie STZ w różnych strukturach OUN. Knezovic i Salkovic-Petrisic (2025) badając aktywność/ekspresję wybranych enzymów związanych z rozkładaniem oraz syntezą acetylocholiny wykazali, że od 1. tygodnia do 9. miesiąca po podaniu STZ (3 mg/kg) do komór bocznych mózgu neurotransmisja cholinergiczna podlega silnym fluktuacjom w hipokampie i korze mózgowej. Zatem wpływ podania ICV-IGF-1 na redukcję zaburzeń kognitywnych w modelu sAD, w które zaangażowane są drogi cholinergiczne, może przebiegać w zróżnicowany sposób.

Zaburzeniom neurotransmisji cholinergiczej po podaniu ICV-STZ towarzyszą zmiany histopatologiczne w OUN. W pierwszym miesiącu po iniekcjach ICV-STZ zauważono mniejszą grubość kory ciemieniowej (Knezovic i wsp., 2015). Obecność złogów  $\beta$ A różnych regionach OUN tj. w hipokampie, podwzgórzu, wzgórzu, korze mózgowej, jak również w naczyniach włosowatych opon mózgowych została stwierdzona już nawet po 1-szym miesiącu od podania ICV-STZ, a wraz z postępem choroby dochodziło do progresji tej amyloidozy (Salkovic-Petrisic i wsp., 2006, 2011; Knezovic i wsp., 2015; Pierzynowska i wsp., 2019; Dunacka i wsp. 2024; Majkutewicz i wsp., 2024). Nowsze badania STZ (Homolak i wsp., 2025). pokazują dodatkowo, że działanie ośrodkowe podania STZ jest zależne od gatunku zwierzęcia. U szczurów Wistar podanie ośrodkowe STZ (3 mg/kg) przyczyniło się do powstania deficytów poznawczych, natomiast u myszy C57BL/6 iniekcje STZ (6 mg/kg) nie wywołały tych zaburzeń. Dalsze oznaczenia wykazały, że myszy są mniej wrażliwe na dokomorowe podanie streptozotocyny niż szczury, a przy dawce STZ wynoszącej 10 mg/kg zaobserwowano dopiero delikatne deficyty poznawcze u myszy. Zwierzęta te (szczury vs. myszy) różnią się profilem genetycznym. Myszy posiadają wyższą ekspresję mRNA dla genów związanych z rodziną białek IGF-1, co może być przyczyną odmiennego działania STZ (Homolak i wsp., 2025).

Neuropsychiatryczne zaburzenia w tym lęk, depresja i apatia u pacjentów z AD są powiązane z zaburzeniami kognitywnymi, śmiercią neuronów, obecnością  $\beta$ A w korze mózgowej a także neurozapaleniem (Jack i wsp., 2018; Johansson i wsp., 2020; Swann i wsp., 2024). Z kolei obecność złogów  $\beta$ A w korze przedczołowej, ciemieniowej i w korze obręczy jest powiązana z wystąpieniem lęku (Palmqvist i wsp., 2017; Johansson i wsp., 2020). Zmiany

metaboliczne w korze obręczy oraz innych fragmentach czołowych mózgu, hipokampie, jądrze półleżącym, skorupie oraz wzgórzu są skorelowane z anhedonią i apatią, a z kolei te zaburzenia neuropsychiatryczne są stwierdzane w późnej fazie AD (Thelertis i wsp., 2014; Rosenberg i wsp., 2015; Johansson i wsp., 2020). Liczba komórek CD68<sup>+</sup> związanych ze zwiększoną aktywnością fagocytarną mikrogleju u osobników cierpiących na AD była związana z obecnością płytek starczych i splątków neurofibrylarnych oraz demencją (Minett i wsp., 2016; Hopperton i wsp., 2018). Co więcej, w późnej fazie AD, gdy stwierdzono obecność wystąpienia anhedonii i lęku, obecna była także zwiększona aktywność fagocytarna mikrogleju (Lee i wsp., 2019; Botto i wsp., 2022). Jak wspomniałam wcześniej, w modelu sAD, wwołanym iniekcją dokomorową STZ, ośrodkowe podanie IGF-1 zredukowało poziom  $\beta$ A w obszarze CA1 hipokampa oraz poziom neurozapalenia (komórki CD68<sup>+</sup>) w regionie CA2 hipokampa w późnej fazie sAD w naszych badaniach (Dunacka i wsp., 2025a). W kolejnej pracy (Dunacka i wsp., 2025b) dowiedliśmy, że na tym etapie sAD, podanie IGF-1 zredukowało również poziom anhedonii i lęku u szczurów. Zatem u zwierząt z modelem sAD redukcja zaburzeń neuropsychiatrycznych jest powiązana z redukcją neurozapalenia oraz zmniejszeniem odkładania  $\beta$ A w strukturach mózgowych. Inni badacze wykazali, że iniekcje ICV-IGF-1 u zwierząt poddanych stresowi prenatalnemu zredukowały zaburzenia depresyjne w teście wymuszonego pływania i efekt ten zachodził z udziałem receptora IGF-1R (Basta-Kaim i wsp., 2014). Wykazano także, że podanie inhibitora białka wiążącego IGF-1 u myszy skutkowało właściwościami przeciwlękowymi oraz antydepresyjnymi (Malberg i wsp., 2007). Jak wspomniałam wcześniej, IGF-1 jest kluczowym regulatorem lęku, ponieważ ułatwia konsolidację pamięci i wygaszanie reakcji strachu (Maglio i wsp., 2021).

Korzystne działanie IGF-1 u szczurów z modelem sAD zachęciło nas do sprawdzenia czy efekt ten zależy od osobniczej wrażliwości na stres (HR vs. LR). Jak wskazują uzyskane wyniki korzystne zmiany pod wpływem iniekcji ICV-IGF-1 na pamięć przestrzenną były bardziej widoczne u osobników HR. Wydaje się, że skuteczniejsze działanie IGF-1 u szczurów HR w zakresie poprawy pamięci przestrzennej spowodowane jest tym, że osobniki LR odznaczają się wyższym stopniem neurozapalenia w OUN, mierzonym wyższą liczbą aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) w regionach CA2, CA3, DG hipokampa, w CC i jądrze DMH na późnym etapie sAD oraz posiadają wyższą liczbę złogów  $\beta$ A w obszarach CA3 i DG hipokampa (wyniki nieopublikowane rycina 11, 13). Sugeruje to, że IGF-1 lepiej redukuje poziom zmian histopatologicznych w OUN u osobników HR w modelu sAD, co znajduje odzwierciedlenie w skuteczniejszej redukcji deficytów pamięci w tej grupie zwierząt. Wiadomo także, że IGF-1 silniej u szczurów HR wspiera produkcję nośników  $\beta$ A takich jak

albumina czy transferryna (Nieto-Estevez i wsp. 2016). Badacze uważają także, że oporność na insulinę może towarzyszyć również oporności na IGF-1 i zaburzeniu pracy ich receptorów, co może być potencjalnie spowodowane przez obecność  $\beta$ A czy deficyty poznawcze (Talbot i wsp., 2012). Należałoby zatem sprawdzić czy osobniki LR posiadają silniejsze zaburzenia działania szlaków insulinowych i/lub IGF-1, ponieważ zaburzenia sygnalizacji insulinowej są związane z zaburzeniami kognitywnymi (Reger i wsp., 2008; Craft i wsp., 2012). Uzyskane wyniki, które opisują powiązanie pomiędzy charakterystyką behawioralną (HR vs. LR) zwierząt, a ośrodkowym podawaniem IGF-1 w modelu sAD stanowią nowość naukową. Osobniki HR odznaczają się też zwiększonym długotrwałym potencjałem postsynaptycznym (LTP) w obszarze CA3 hipokampa oraz wyższą liczbą kolców dendrytycznych w regionie CA1 hipokampa (Widman i wsp., 2019), co też mogło korzystnie wpłynąć na redukcję zaburzeń pamięci przez IGF-1. Szczury LR miały też wyższą liczbę komórek CD68<sup>+</sup> w regionie CC, co było obserwowane w naszych badaniach. Według Miu i wsp., (2006) uszkodzenia tej struktury sprzyjały zaburzeniom pamięci roboczej. Dlatego dokładne określenie anatomicznych korelatów pamięci i powiązanie ich z charakterystyką behawioralną/wrażliwością na stres może być kluczowe w kontekście skutecznej terapii sAD. Choć osobniki LR w stosunku do zwierząt HR odznaczają się wyższym poziomem neurogenezy w warunkach bazalnych (Lemaire i wsp., 1999), to te dwa typy behawioralne odmiennie reagują na substancje psychotropowe, co sprzyja zmianom procesu neurogenezy. Pod wpływem kokainy zmniejszyła się proliferacja komórek w obszarze DG hipokampa u szczurów LR w stosunku do zwierząt kontrolnych, natomiast u zwierząt HR nie zauważono takich zmian (Garcia-Fuster i wsp., 2010). Być może odmiennie działanie różnych substancji w OUN i wpływ na procesy zachodzące w mózgu, mogą być przyczyną odmiennego działania terapii z użyciem IGF-1 pomiędzy szczurami HR i LR. Ciekawe natomiast jest to, że w PFC oraz w NAcS w grupie szczurów STZ IGF-1 HR stwierdzono więcej złogów  $\beta$ A niż u szczurów LR. W naszych badaniach stwierdziliśmy, że właśnie u osobników HR z modelem sAD doszło do wyższej ekspresji  $\beta$ A w NAcS (Dunacka i wsp., 2024). W PFC grupa STZ HR odznaczała się również wyższym poziomem  $\beta$ A, a więc też nie było zaskoczeniem, że mimo zastosowania terapii z użyciem IGF-1, liczba złogów  $\beta$ A nie uległa silniejszej redukcji w tej strukturze u zwierząt HR. Możliwe także, że zastosowana przez nas dawka IGF-1 nie była wystarczająco skuteczna w redukcji złogów  $\beta$ A u zwierząt HR. Otrzymane przez nas rezultaty podkreślają wiodącą rolę hipokampa, PFC i NAcS w powstawaniu deficytów pamięci w przebiegu oraz terapii sAD, a efekty te są zależne od osobniczej wrażliwości na stres (HR vs. LR).

#### **4.5. Zmiany obwodowe związane z markerami zapalenia i wskaźnikami hematologicznymi w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD)**

Kolejnym aspektem naszych badań było sprawdzenie jak w przebiegu sAD zmienia się odpowiedź pochodząca z obwodowego układu odpornościowego i czy zmiany te są zależne od charakterystyki behawioralnej zwierząt. Indywidualne zróżnicowanie w odpowiedzi na stres (HR vs. LR) i odmienna aktywacja osi HPA, w tym działanie glikokortykoidów, mogą być związane z przebiegiem zaburzeń obserwowanych w sAD (Ingram i Corfman, 1980; Piazza i wsp., 1991a; Deroche i wsp., 1992; Sandi, 2011). Szczury HR w odpowiedzi na nowe środowisko wykazują silniejszą i dłużej utrzymującą się sekrecję KORT, a więc są bardziej stresowrażliwymi osobnikami, nawet jeżeli w warunkach bazalnych charakteryzuje je niższy poziom zachowań lękowych (Ingram i Corfman, 1980; Piazza i wsp., 1991a; Deroche i wsp., 1992; Dellu i wsp., 1996). Zwierzęta te wykazują również silniejsze zmiany behawioralne oraz silniejsze zmiany transmisji dróg dopaminergicznych w odpowiedzi na glikokortykoidy (Piazza i wsp., 1991b, 1996, 1997; Marinelli i Piazza, 2002). Chociaż nie stwierdziliśmy istotnych różnic statystycznych w stężeniu KORT pomiędzy grupą STZ HR i STZ LR, to grupa STZ LR odznaczała się wyższym stężeniem tego hormonu niż osobniki kontrolne VEH LR (Dunacka i wsp., 2024). Przyczyną braku różnic istotnych statystycznie w stężeniach KORT pomiędzy szczurami STZ HR i STZ LR może być opóźniona odpowiedź stresowa u osobników LR w porównaniu ze szczurami HR. O prawdziwości tej hipotezy może świadczyć wyższy poziom zaburzeń behawioralnych u gryzoni HR w początkowym stadium choroby. Nasze badania wykazały, że osobniki STZ HR w początkowym stadium sAD charakteryzowały się niższą liczbą komórek NK, monocytów i granulocytów we krwi (rycina 19), a w późnym stadium choroby ich względna masa śledziony i grasicy była niższa w porównaniu do osobników LR. Świadczy to o większej wrażliwości szczurów HR na immunosupresyjne działanie KORT lub/i hormon ten silniej wpływa na redystrybucję leukocytów pomiędzy krwią a narządami limfocytarnymi u tych zwierząt w przebiegu sAD. U warunkach wyjściowych to osobniki HR charakteryzują się wyższym stężeniem KORT niż zwierzęta LR, a więc hormon ten może silniej wpływać na komórki układu odpornościowego u szczurów HR (Piazza i wsp., 1991a). Z drugiej strony w przebiegu sAD KORT mógł także oddziaływać na limfocyty we krwi, co mogło skutkować zmianą fenotypu limfocytów T pomocniczych (Th1/Th2), a zatem wpływał na rozwój odpowiedzi przeciwzapalnej organizmu.

Ponadto obserwowaliśmy zmiany obwodowych wskaźników hematologicznych w przebiegu sAD. U zwierząt z grupy STZ HR w stosunku do grupy STZ LR stwierdzono we krwi niższą liczbę erytrocytów, niższą zawartość hemoglobiny, niższy hematokryt oraz niższe stężenie hemoglobiny na wczesnym etapie sAD. Dane literaturowe wskazują, że peptydy  $\beta$ -amyloidu w osoczu wiążą się ze starzejącymi się krwinkami czerwonymi, doprowadzając do powstania swoistego kompleksu. Kompleks ten odpowiedzialny jest za zmiany morfologii układu czerwonokrwinkowego, a poprzez wspieranie adhezji erytrocytów do śródbłonka wpływa na aktywność naczynia krwionośnego (Nakagawa i wsp., 2011). Pogorszenie funkcjonowania układu czerwonokrwinkowego u szczurów HR w modelu sAD, związane jest prawdopodobnie z wyższą liczbą kompleksów  $\beta$ A-erytrocyt.

#### **4.6. Zmiany obwodowe związane z markerami zapalenia i wskaźnikami hematologicznymi po zastosowaniu terapii z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD)**

Korzystny efekt podania ICV-IGF-1 obserwowany w naszych badaniach jako redukcja zaburzeń pamięci, lęku, anhedonii a także redukcja neurozapalenia był związany ze zmniejszeniem obwodowego zapalenia. Ośrodkowe podanie IGF-1 u zwierząt z modelem sAD zredukowało poziom obwodowego zapalenia, zwłaszcza w czasie późnej fazy choroby, mierzonego bezwzględną liczbą leukocytów, limfocytów, monocytów, granulocytów, a także subpopulacji limfocytów: TCD3<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup>, B (CD45RA<sup>+</sup>), NK (CD161a<sup>+</sup>), stężeniem IL-6 i IL-10. Podanie IGF-1 zwiększyło także liczbę płytek krwi oraz płytkokryt podczas późnej fazy sAD. Być może efekt ten był spowodowany zmniejszoną migracją mediatorów zapalenia z ośrodka na obwód. W szczurzym modelu udaru IGF-1 wywierał protekcyjny efekt na BBB (Bake i wsp., 2014). U osobników z AD, podobnie jak u zwierząt karłowatych, zaobserwowano zmiany w sygnalizacji szlaków IGF-1, a właśnie u zwierząt karłowatych, którym został podany IGF-1 stwierdzono obniżenie liczby leukocytów i limfocytów T (Schurmann i wsp., 1996; Galle i wsp., 2020). Prowadzone przez nas badania wykazały, że podczas wczesnej fazy choroby podwyższone początkowo stężenie KORT u szczurów w grupie STZ IGF-1, w późnej fazie sAD uległo obniżeniu, co sugeruje wpływ osi HPA na przeciwzapalny efekt IGF-1. Zwiększone podczas wczesnej fazy sAD stężenie KORT, który wykazuje działanie immunosupresyjne, mogło skutkować redukcją liczby poszczególnych populacji leukocytów. Co więcej zaobserwowaliśmy obniżoną liczbę białych krwinek głównie podczas późnej fazy sAD. Być może pomiar stężenia KORT na bardzo wczesnym etapie rozwoju sAD dałby

odpowieź czy stężenie tego hormonu rzeczywiście było na tyle niskie, że w kolejnej fazie choroby skutkowało jedynie obniżoną liczbą monocytów we krwi. Inni autorzy zaobserwowali, że stężenie KORT u szczurów uległo zwiększeniu pomiędzy 2 a 4 tygodniem po obwodowym podaniu STZ w stosunku do zwierząt kontrolnych, przy czym stężenie to było najniższe w 3 tygodniu pomiarów (Shin i wsp., 2014). Zatem na przestrzeni pierwszego miesiąca po podaniu STZ zaobserwowano fluktuację stężenia KORT. To sugeruje, że na bardzo wczesnym etapie sAD stężenie KORT może nie być na tyle duże aby działać immunosupresyjnie na wszystkie komórki układu odpornościowego.

Z drugiej strony zauważyliśmy zwiększony procent udziału limfocytów T cytotoksycznych we krwi podczas późnej fazy sAD. IGF-1 jest związkem, który zaangażowany jest w tymopoezę, a więc w dojrzewanie oraz różnicowanie limfocytów T w grasicy (Savino i wsp., 2016). Gdy IGF-1 jest podawany myszom prowadzi to do wzrostu odsetka naiwnych komórek TCD4<sup>+</sup> oraz TCD8<sup>+</sup> na obwodzie (Chu i wsp., 2008). To sugeruje, że IGF-1 zwiększa uwalnianie dojrzałych limfocytów T z grasicy. Nasze badanie pozwoliło stwierdzić, że u zwierząt STZ IGF-1 dochodzi do nieznacznego obniżenia współczynnika masy grasicy (zmiany te nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej), co może być związane z przeniesieniem puli limfocytów na obwód. U myszy APP-PS1 naciekające limfocyty TCD8<sup>+</sup> wywołały aktywację mikrogleju i deficyty behawioralne (Unger i wsp., 2020). IGF-1 poprawia też szczelność BBB. U szczurów z modelem niedokrwienia neurotrofina ta redukowała transport komórek z obwodowego układu odpornościowego przez BBB do miejsca uszkodzenia mózgu (Bake i wsp., 2016, 2019). Prawdopodobnie zwiększona szczelność bariery BBB w zastosowanym modelu sAD mogła być przyczyną wzrostu procentowego udziału limfocytów Tc we krwi szczurów z grupy STZ IGF-1. Zaobserwowaliśmy także, że w późnej fazie sAD podanie IGF-1 zredukowało stężenie IL-6 w osoczu krwi u szczurów z modelem sAD w stosunku do grupy STZ SAL. 5 dni po wywołaniu udaru u szczurów zaobserwowano, że iniekcje ICV-IGF-1 powodują wzrost stężenia w osoczu IL-6, ale obwodowe iniekcje IGF-1 redukują stężenie tej pro-zapalnej cytokiny (El-Hakim i wsp., 2024). W naszych badaniach grupa STZ IGF-1 charakteryzowała się wyższym stężeniem (zmiana nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej) przeciwzapalnej cytokiny IL-10 w osoczu niż osobniki STZ SAL podczas późnej fazy sAD. Prawdopodobnie podanie IGF-1 zredukowało obwodową produkcję IL-6 przez zmniejszenie liczby limfocytów Th1, produkujących cytokiny pro-zapalne. Z drugiej strony inni badacze zauważyli, że IGF-1 odpowiedzialny jest za wzrost masy grasicy, śledziony, a także wzrost liczby limfocytów T, B, Th, Tc w śledzionie (Clark i wsp., 1993). W naszym eksperymencie stwierdziliśmy, że podczas późnej fazy sAD zwiększył

się współczynnik masy śledzony (choć zmiana nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej) oraz zwiększeniu uległ procentowy udział limfocytów T, B, NK w tym organie w grupie STZ IGF-1 w stosunku do grupy STZ SAL oraz VEH SAL. Jednakże mechanizm wpływu IGF-1 w modelu sAD na układ odpornościowy, w tym na proces zapalenia czy neurozapalenia wymaga dalszych badań, ponieważ IGF-1 potrafi również wzmacniać odpowiedź immunologiczną poprzez aktywację proliferacji limfocytów T regulatorowych (Bilbao i wsp., 2014).

Zmniejszona aktywność osi HPA może być przyczyną redukcji zaburzeń depresyjnych, zaobserwowanych w naszych badaniach w późnym stadium sAD. Chociaż bezpośredni wpływ neurotrofiny IGF-1 na aktywność osi HPA nie jest jeszcze poznany, warto zauważyć, że KORT i IGF-1 mogą działać przez ten sam szlak. Eksperymenty z wykorzystaniem modelu nieprzewidywalnego stresu wykazały, że IGF-1 wywiera działanie przeciwzapalne poprzez aktywację ścieżki PI3K/Akt/FoxO3, a jeden z elementów tej ścieżki (PI3K/Akt) jest odpowiedzialny za działanie antydepresyjne (Kuang i wsp., 2018; Guo i wsp., 2024). KORT hamuje tę ścieżkę wraz z indukcją śmierci neuronów hipokampa, a IGF-1 eliminuje ten efekt. Sugeruje to, że znormalizowanie działania osi HPA, a w konsekwencji obniżenie stężenia KORT ma działanie neuroprotekcyjne w przebiegu sAD.

Poza wpływem na układ odpornościowy, dokomorowe podanie IGF-1 w naszym badaniu wywołało wzrost liczby płytek krwi oraz płytkokrytu podczas późnej fazy sAD. Wiadomo, że IGF-1 poprzez szlak Akt wpływa na trombopoezę. Różnicuje komórki CD34<sup>+</sup> w kierunku megakariocytów, a także ułatwia powstawanie proplateletów krwi oraz regenerację płytek krwi u myszy (Chen i wsp., 2018). W przebiegu AD nie jest to korzystnym zjawiskiem, ponieważ płytki krwi potrafią wytwarzać  $\beta$ A (40-42), który jest uwalniany z tych komórek w czasie aktywacji (Evin i Li, 2012). Dokładny wpływ działania IGF-1 w naszym eksperymencie poprzez oddziaływanie na płytki krwi wymaga dalszych badań, w tym zmierzenia stężenia obwodowej zawartości  $\beta$ A na różnych etapach choroby. Nie odnotowaliśmy istotnych różnic statystycznych w obrębie pozostałych parametrów hematologicznych pomiędzy grupą STZ IGF-1 a VEH SAL, z wyjątkiem liczby czerwonych krwinek, która była niższa w grupie STZ SAL w porównaniu z grupą kontrolną VEH SAL w późnej fazie sAD.

Obserwowana w naszych badaniach redukcja markerów obwodowego zapalenia w przebiegu sAD po podaniu IGF-1 dała podstawę do dalszych badań, których celem było sprawdzenie czy efekt ten jest zależny od charakterystyki behawioralnej zwierząt (HR vs. LR). Jak wskazują nasze wyniki, podanie IGF-1 skuteczniej redukowało obwodowe zapalenie

u szczurów LR (wyniki nieopublikowane rycina 15, 17). Jak wspominałam wcześniej osobniki HR i LR różnią się wrażliwością na stres, a właśnie wtedy gdy stres utrzymuje się chronicznie dochodzi do zwiększonej sekrecji KORT. Nasze badania wykazały, że w czasie późnej fazy sAD dochodzi do obniżenia stężenia KORT u szczurów HR i LR po ośrodkowym podaniu IGF-1 w stosunku do zwierząt z modelem sAD oraz w porównaniu do wczesnego etapu sAD. Podanie ICV-IGF-1 normalizuje zatem działanie osi HPA w modelu sAD u szczurów na późnym etapie choroby. KORT wpływa na liczebność różnych populacji leukocytów poprzez indukcję apoptozy. Glikokortykoidy indukują apoptozę białych krwinek poprzez wpływ na ekspresję genów, przy czym istnieją również geny, których aktywacja chroni przed zaprogramowaną śmiercią komórki. W przypadku tymocytów białkami anti-apoptocznymi są np. Bcl-2 oraz Bcl-X<sub>L</sub>, a jednoczesna obecność cząstek CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> sprzyja śmierci komórkowej. Przy czym białko Bcl-2 uważa się za główny determinant wrażliwości na glikokortykoidy (Herold i wsp., 2006). Z kolei IGF-1 może oddziaływać na promotor genu *bcl-2* poprzez szlak MAPK kinaza 6/p38β MAPK/MAPKAP-K3, co wspierać będzie procesy anti-apoptotyczne (Pugazhenthii i wsp., 1999). Być może IGF-1 u osobników STZ IGF-1 HR silniej niż u zwierząt LR wsparł procesy anti-apoptotyczne, dlatego silniejsze immunosupresyjne działanie KORT zauważyliśmy w grupie zwierząt STZ IGF-1 LR. Inni autorzy zbadali u zwierząt zestresowanych i niezestresowanych ekspresję mRNA dla białek anti-apoptotycznych Bcl-2 oraz Bcl-xL (Kosten i wsp., 2008). U szczurów zestresowanych doszło do obniżenia ekspresji mRNA dla białka Bcl-2 w zakręcie obręczy, jądrze środkowym ciała migdałowatego i korze czołowej oraz obniżenia mRNA dla białka Bcl-xL w obszarach CA1, CA3 oraz DG hipokampa w porównaniu ze szczurami niezestresowanymi (Kosten i wsp., 2008). Nasze badania pokazały, że w przebiegu sAD po iniekcjach ICV-IGF-1 dochodzi do normalizacji działania osi HPA zarówno u szczurów HR jak i LR. Jednakże proces ten zachodzi szybciej u zwierząt HR w stosunku do gryzoni LR. Być może szczury LR potrzebują wyższych dawek IGF-1 lub jego częstszych iniekcji, aby redukcja stężenia KORT było na tyle wystarczająca, żeby hormon ten nie wpływał na obniżenie ekspresji genów dla białek anti-apoptotycznych. Prawdopodobnie szczury HR i LR różnią się także poziomem białek anti- i pro-apoptotycznych w warunkach bazalnych lub w przebiegu sAD dochodzi do zmian na poziomie molekularnym genów (np. Bcl-2 oraz Bcl-xL) u tych zwierząt. Wiadomo także, że osobniki STZ LR posiadają niższą liczbę limfocytów Th we krwi niż szczury STZ HR na wczesnym etapie sAD (Dunacka i wsp., 2024) i może to tłumaczyć silniejszą limfopenię u osobników STZ IGF-1 LR, obserwowaną w naszych badaniach. U osobników LR stwierdziliśmy także wyższe wartości współczynnika masy śledziony i grasicy, co może być

spowodowane recyrkulacją komórek odpornościowych z obwodu do śledziony i grasicy. Zatem u zwierząt LR IGF-1 może silniej wspierać ten proces. Jak wcześniej wspomniałam w szczurzym modelu udaru IGF-1 polepszył szczelność BBB (Bake i wsp., 2014). Możliwe więc, że IGF-1 podany do komór bocznych mózgu lepiej uszczelnił BBB u zwierząt mniej wrażliwych na stres (LR) w porównaniu ze szczurami wrażliwymi na stres (HR). Uszczelnienie BBB oraz efekt przeciwzapalny wywołany przez IGF-1 mogły przyczynić się do obserwowanej w naszych badaniach redukcji zaburzeń neuropsychiatrycznych (poziom anhedonii i lęku) w toku sAD. Grupa STZ IGF-1 LR odznaczała się niższą liczbą złogów  $\beta$ A w NAcS. Być może mniej zmieniona komunikacja tej struktury z innymi rejonami mózgu u szczurów LR niż u zwierząt HR, przyczyniła się do silniejszej redukcji objawów neuropsychiatrycznych towarzyszących sAD.

Wartości parametrów hematologicznych nie różniły się pomiędzy grupami STZ IGF-1 HR i STZ IGF-1 LR, aczkolwiek IGF-1 w modelu sAD wzmógł trombopoezę u zwierząt HR. IGF-1 wspiera regenerację płytek krwi, tworzenie proplatek krwi oraz wspiera powstawanie megakariocytów przez szlak komórkowy Akt (Chen i wsp., 2018). Prawdopodobnie podanie IGF-1 w modelu sAD silniej wpływa na ten szlak sygnalizacyjny u szczurów HR niż u osobników LR.

Podsumowując, wyniki uzyskane w naszych badaniach wykazały, że różnice osobnicze we wrażliwości na stres (HR vs. LR) mają wpływ na progresję zaburzeń w przebiegu sAD oraz wpływają na terapię z zastosowaniem iniekcji ICV-IGF-1, przywracającej zaburzoną sygnalizację insulinową. W steptozotocynowym modelu sAD, który charakteryzuje się insulinoopornością mózgu, szczury HR są narażone na silniejsze deficyty pamięci przestrzennej oraz zaburzenia lękowe w porównaniu z osobnikami LR. Te zmiany behawioralne spowodowane są zmianami w OUN. U gryzoni STZ HR wykazaliśmy wyższą liczbę złogów  $\beta$ A w hipokampie i w NAcS. Ponadto na wczesnym etapie sAD układ odpornościowy u szczurów HR jest bardziej wrażliwy na immunosupresyjne działanie KORT, gdyż u tych zwierząt stwierdziliśmy niższą liczbę monocytów, granulocytów i komórek NK. Przywrócenie prawidłowej sygnalizacji insulinowej na bardzo wczesnym etapie sAD poprzez podanie ośrodkowe IGF-1 łagodzi behawioralne zmiany u szczurów z modelem choroby poprzez redukcję ośrodkowego i obwodowego zapalenia. Skuteczność leczenia zależy jednak od osobniczej wrażliwości na stres. U osobników HR z modelem sAD podanie ICV-IGF-1 przyczyniło się do redukcji deficytów pamięci przestrzennej, co było związane z obniżeniem neurozapalenia w regionach CA2, CA3 i DG hipokampa oraz z redukcją złogów  $\beta$ A w obszarach CA3 i DG hipokampa. U zwierząt LR iniekcje IGF-1 do komór bocznych mózgu

spowodowały redukcję zaburzeń neuropsychiatrycznych (anhedonia/lęk). Ten korzystny efekt u szczurów STZ IGF-1 LR powiązany był z obniżeniem liczby oligomerów  $\beta$ A w NAcS oraz redukcją obwodowego stanu zapalnego. Zaproponowana przez nas terapia związana z przywróceniem prawidłowej sygnalizacji insulinowej u zwierząt zróżnicowanych pod względem wrażliwości na stres wykazała, że poszukiwanie skutecznych terapii zaburzeń obserwowanych w przebiegu sAD powinno uwzględniać indywidualne cechy osobnika, gdyż charakterystyka behawioralna jest kluczowym elementem odpowiedzi na zastosowane leczenie.

## 5. Podsumowanie i wnioski

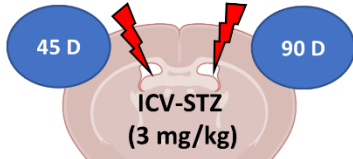
1. W streptozotocynowym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) u szczurów wysokoaktywnych ruchowo (HR) i o większej wrażliwości na stres dochodzi do silniejszych deficytów pamięci oraz zaburzeń lękowych, w porównaniu z osobnikami niskoaktywnymi ruchowo (LR). Zmiany te są związane ze zwiększonym odkładaniem złogów  $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) w hipokampie i części brzeżnej jądra półleżącego (NAcS) oraz z niższym poziomem neurozapalenia, mierzonego liczbą aktywowanych komórek mikrogleju ( $CD68^+$ ) w obszarze CA1 hipokampa u zwierząt HR w porównaniu ze szczurami LR.

2. Indukcja sAD u szczurów, połączona z jednoczesną dokomorową iniekcją insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) zmniejsza deficyty pamięci przestrzennej oraz zaburzenia depresyjne/lękowe, towarzyszące progresji sAD. Ten korzystny efekt neurotrofiny IGF-1 powiązany jest z redukcją liczby złogów  $\beta$ A w obszarze CA1 hipokampa, niższym poziomem neurozapalenia mierzonego liczbą komórek  $CD68^+$  w rejonie CA2 hipokampa oraz z obwodowym efektem przeciwzapalnym.

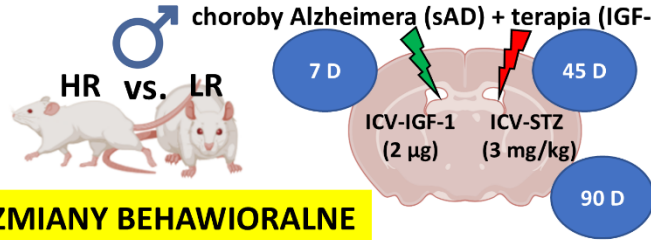
3. Ośrodkowe podanie IGF-1 szczurom z modelem sAD i zróżnicowanym pod względem wrażliwości na stres (HR vs. LR) zmniejsza deficyty pamięci oraz zaburzenia lękowe/depresyjne w sposób zależny od charakterystyki behawioralnej osobnika. U zwierząt HR obserwuje się silniejsze zmniejszenie deficytów pamięci przestrzennej, powiązane z redukcją liczby złogów  $\beta$ A oraz liczby komórek  $CD68^+$  w hipokampie. Natomiast u osobników LR z modelem sAD iniekcje IGF-1 wywierają silniejszy efekt antydepresyjny i anksjolityczny, w porównaniu ze szczurami z wysoką aktywnością behawioralną i większą wrażliwością na stres (HR).

4. Przywrócenie zaburzonej sygnalizacji insulinowej we wczesnym stadium sporadycznej postaci choroby Alzheimera, poprzez ośrodkowe podanie neurotrofiny IGF-1 przywracającej prawidłową sygnalizację insulinową we wczesnym etapie AD, stanowić może nowe podejście w leczeniu tej choroby i związanych z nią zaburzeń neuropsychiatrycznych. Należy jednak pamiętać, że efekt terapeutyczny IGF-1 zależy od osobniczych różnic w reaktywności behawioralnej i stresowej.

**1. Model sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD)**



**2. Model sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) + terapia (IGF-1)**



**MWM**



**A. ZMIANY BEHAVIORALNE**

Grupa STZ HR charakteryzuje się wyższym poziomem zaburzeń pamięci przestrzennej.

Grupa STZ IGF-1 HR charakteryzuje się niższym poziomem zaburzeń pamięci przestrzennej.

**MWM**

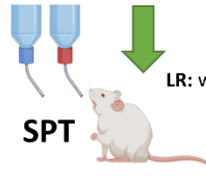
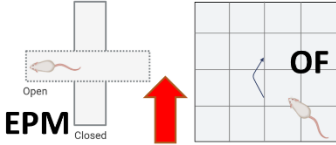


**STZ HR vs. STZ LR**

HR: dłuższa latencja dopłynięcia do platformy lub miejsca w którym powinna się znajdować podczas nabywania/odtworzenia pamięci referencyjnej (48-50 i 92, 94 dzień sAD) w teście MWM.

**STZ IGF-1 HR vs. STZ IGF-1 LR**

HR: krótsza latencja dopłynięcia do platformy lub miejsca w którym powinna się znajdować podczas nabywania/odtworzenia pamięci referencyjnej (16-19 i 54-55 dzień sAD) i nabywania pamięci roboczej (103-106 dzień sAD) w teście MWM, HR: wyższy % czasu przebywania w kwadrancie krytycznym (16,19, 54, 101, 103-106 dzień sAD) w teście MWM.



**STZ IGF-1 HR vs. STZ IGF-1 LR**

LR: większy poziom spożycia sacharozu (14 i 52 dzień sAD).

**STZ HR vs. STZ LR**

HR: krótszy czas spędzony w ramionach otwartych (45 dzień sAD) i centrum EPM (90 dzień sAD), HR: dłuższy czas spędzony w ramionach zamkniętych EPM (90 dzień sAD).

**STZ IGF-1 HR vs. STZ IGF-1 LR**

LR: dłuższy czas spędzony w ramionach otwartych i centrum EPM (53 i 98 dzień sAD), LR: krótszy czas spędzony w ramionach zamkniętych EPM (53 dzień sAD).

Grupa STZ HR charakteryzuje się wyższym poziomem lęku.

Grupa STZ IGF-1 LR charakteryzuje się niższym poziomem lęku oraz anhedonii.

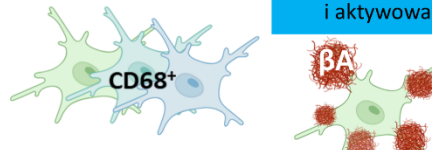
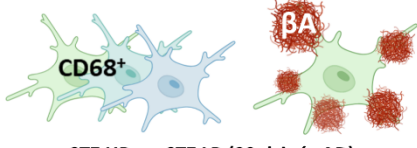
**STZ HR vs. STZ LR**

HR: dłuższy czas bezruchu w OF (46 dzień sAD).

**B. ZMIANY W OUN**

W grupie STZ HR zmiany lękowe i zaburzenia pamięci są związane z uszkodzeniami NAcS i PFC przez  $\beta$ A.

W grupie STZ IGF-1 HR mniejszy poziom zaburzeń pamięci związany jest z mniejszym stopniem uszkodzeń OUN wywołanych przez  $\beta$ A i aktywowany mikroglej.



**STZ HR vs. STZ LR (99 dzień sAD)**

HR: większa liczba aktywowanych komórek mikrogleju w PFC lecz mniejsza w obszarze CA1 hipokampa,

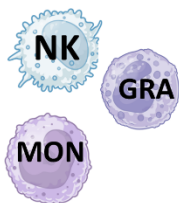
HR: większa liczba złożeń  $\beta$ A w NAcS oraz w hipokampie (regiony CA1-CA3, DG).

**STZ IGF-1 HR vs. STZ IGF-1 LR (107 dzień sAD)**

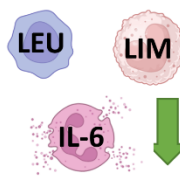
HR: mniejsza liczba aktywowanych komórek mikrogleju w hipokampie (regiony CA2, CA3, DG),

HR: mniejsza liczba złożeń  $\beta$ A w obszarze CA3 i DG hipokampa lecz większa w NAcS.

**C. ZMIANY W UKŁADZIE ODPORNOŚCIOWYM**



W grupie STZ HR stwierdzono wystąpienie obwodowej immunosupresji układu odpornościowego.



W grupie STZ IGF-1 LR mniejszy poziom zaburzeń neuropsychiatrycznych związany jest z redukcją obwodowego poziomu zapalenia.

**STZ HR vs. STZ LR**

HR: spadek bezwzględnej liczby monocytów, granulocytów, komórek NK (54 dzień sAD).

**STZ IGF-1 HR vs. STZ IGF-1 LR**

LR: spadek bezwzględnej liczby leukocytów, limfocytów we krwi i niższe stężenie IL-6 w osoczu (107 dzień sAD).

Rycina 19. Obrazowe podsumowanie najważniejszych wyników uzyskanych w ramach przedstawianej rozprawy. Szczury Wistar Han rozdzielono pod względem osobniczej wrażliwości na stres (test nowości) na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) i niskoaktywne ruchowo (LR). Następnie wywołano u nich (1) model sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) poprzez iniekcje streptozotocyny (STZ, 3 mg/kg) do komór bocznych mózgu (ICV) lub (2) wraz z indukcją modelu sAD podawano im środek terapeutyczny jakim był insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1, 2  $\mu$ g). U zwierząt HR z grupy STZ rozwinęły się silniejsze (1A) zaburzenia pamięci przestrzennej zbadane w teście labiryntu wodnego Morrisa (MWM) oraz silniejsze zaburzenia lękowe zmierzone w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) i w teście otwartego jasno oświetlonego pola (OF) w porównaniu ze zwierzętami LR. U zwierząt z modelem sAD u których zastosowano terapię związaną z ośrodkowym podaniem IGF-1 (2) wykazaliśmy, że neurotrofina ta działa odmiennie w grupach zróżnicowanych behawioralnie pod względem osobniczej wrażliwości na stres (HR vs. LR). U szczurów STZ IGF-1 HR podanie ICV-IGF-1 przyczyniło się do silniejszej redukcji (2A) zaburzeń pamięci przestrzennej (test MWM) w porównaniu z osobnikami LR. Z kolei u zwierząt STZ IGF-1 LR iniekcje ICV-IGF-1 silniej wpłynęły na redukcję zaburzeń neuropsychiatrycznych tj. zmniejszyły poziom anhedonii określony w teście preferencji sacharozy (SPT) oraz poziom lęku wyznaczony w teście EPM w porównaniu z grupą STZ IGF-1 HR. Deficyty pamięci oraz silniejsze zaburzenia lękowe w grupie STZ HR związane były (1B) ze zmianami w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) tj. z wyższą liczbą złożeń  $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) w części brzeżnej jądra półleżącego (NAcS) oraz w różnych regionach hipokampa (obszary CA1-CA3, DG), a także z wyższą liczbą aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) w korze przedczołowej (PFC), lecz z mniejszą liczbą komórek CD68<sup>+</sup> w regionie CA1 hipokampa w stosunku do zwierząt z grupy STZ LR. Z kolei deficyty pamięci przestrzennej u zwierząt STZ IGF-1 HR związane były z niższym poziomem (2B) neurozapalenia (komórki CD68<sup>+</sup>) w hipokampie (obszary CA2, CA3, DG) oraz z obniżeniem liczby złożeń  $\beta$ A w obszarach CA3 i DG hipokampa. U szczurów STZ IGF-1 LR stwierdziliśmy natomiast niższą liczbą złożeń  $\beta$ A w NAcS. Co więcej u osobników HR z grupy STZ (1C) zaburzenia pamięci przestrzennej i silniejszy poziom neurozapalenia związany był z obwodową supresją układu odpornościowego, przejawiającą się jako spadek bezwzględnej liczby monocytów (MON), granulocytów (GRA) i komórek NK. Redukcja poziomu anhedonii oraz lęku, a także niższa liczba złożeń  $\beta$ A w NAcS w grupie STZ IGF-1 LR połączona była z redukcją (2C) obwodowego zapalenia, tj. spadkiem bezwzględnej liczby leukocytów (LEU), limfocytów (LIM) oraz obniżeniem stężenia interleukiny-6 (IL-6) w osoczu w porównaniu ze szczurami STZ IGF-1 HR. Rycinę wygenerowano przy użyciu programów Power Point i Biorender.

## 6. Ograniczenia badań

Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmu rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) oraz poszukiwania skutecznych terapii, uwzględniających zróżnicowaną charakterystykę behawioralną osobnika, zależną od osobniczej wrażliwości na stres (HR vs. LR). Terapia opisana w naszych badaniach skierowana jest na przywrócenie zaburzonej we wczesnym etapie rozwoju sAD sygnalizacji insulinowej. Jednakże nasze eksperymenty posiadały pewne ograniczenia z tego względu, że były to badania podstawowe i jako pierwsze poruszały związek między osobniczą wrażliwością na stres a rozwojem sAD i podatnością na terapię z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), podawanego do komór bocznych mózgu. Badania prowadziliśmy z wykorzystaniem samców szczurów Wistar podczas gdy uwzględnienie różnic płciowych pozwoliłoby sprawdzić czy wpływ płci będzie odzwierciedlony w progresji sAD oraz w skuteczności zaproponowanej terapii. Ponadto, w naszych badaniach, przeprowadzonych z użyciem szczurów, uwzględniliśmy jedną dawkę IGF-1 podawaną do komór bocznych mózgu, aplikowaną jednocześnie z indukcją modelu sAD. Zróżnicowanie dawki, zwiększenie częstotliwości jej podawania oraz drogi podawania (np. przez inhalacje donosową razem z insuliną) poszerzyłoby znacznie bardziej naszą wiedzę o terapeutycznym efekcie tej neurotrofiny w niwelowaniu zaburzeń związanych z rozwojem sAD. Interesujące byłoby również zbadanie czy obserwowane efekty podawania neurotrofiny IGF-1 zachodzą poprzez receptor IGF-1R. Zarówno uzyskane wyniki, jak i wspomniane ograniczenia mogą stanowić podstawę do dalszych badań, dotyczących czynników wpływających na progresję sAD i na skuteczność terapii tej choroby oraz towarzyszących jej zaburzeń neuropsychiatrycznych.

## 7. Piśmiennictwo

1. Aguado-Llera D., Canelles S., Frago L.M., Chowen J.A., Argente J., Arilla E., Barrios V. The protective effects of IGF-I against  $\beta$ -amyloid-related downregulation of hippocampal somatostatinergic system involve activation of Akt and protein kinase A. *Neuroscience*, 2018, 374, 104-118.
2. Aguiar-Oliveira M.H., Boguszewski M.C.S., Rovaris D.L., Donato Junior J. Growth hormone and IGF-1 actions in the brain and neuropsychiatric disease. *Physiology (Bethesda)*, 2025, 10, 1152.
3. Akbari S., Haghani M., Ghobadi M., Hooshmandi E., Haghighi A.B., Salehi M.S., Pandamooz S., Azarpira N., Afshari A., Zabihi S., Nemati M., Bayat M. Combination therapy with platelet-rich plasma and epidermal neural crest stem cells increases treatment efficacy in vascular dementia. *Stem Cells International*, 2023, 2023, 3784843.
4. Alves R., Barbosa de Carvalho J.G., Benedito M.A.C. High and low rearing subgroups of rats selected in the open field differ in the activity of K<sup>+</sup>-stimulated p-nitrophenylphosphatase in the hippocampus. *Brain Research*, 2005, 1058, 178-182.
5. Anacker C., Zunszain P.A., Carvalho L.A., Pariante C.M. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 2011, 36, 3, 415-425.
6. Anacker C., Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2017, 18, 6, 335-346.
7. Anderson M.F., Aberg M.A.I., Nilsson M., Eriksson P.S. Insulin-like growth factor-1 and neurogenesis in the adult mammalian brain. *Developmental Brain Research*, 2002, 134, 1-2, 115-122.
8. Andrade M.K., Souza L.C., Azevedo E.M., Bail E.L., Zanata S.M., Andreatini R., Vital M.A.B.F. Melatonin reduces  $\beta$ -amyloid accumulation and improves short-term memory in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease model. *IBRO Neuroscience Reports*, 2023, 14, 264-272.
9. Ansari M.A., Al-Jarallah A., Babiker F.A. Impaired insulin signaling alters mediators of hippocampal synaptic dynamics/plasticity: a possible mechanism of hyperglycemia-induced cognitive impairment. *Cells*, 2023, 12, 13, 1728.
10. Aprile D., De Marchi F., Menegon F., Comi C., Tondo G. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in the Alzheimer's disease continuum. *International Journal of Molecular Science*, 2025, 26, 11, 5157.
11. Armstrong R.A. What causes Alzheimer's disease? *Folia Neuropathologica*, 2013, 51, 3, 169-188.
12. Azargoonjahromi A. Serotonin enhances neurogenesis biomarkers, hippocampal volumes, and cognitive functions in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 2024, 17, 93.
13. Bach L.A. IGF-binding proteins. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2018, 61, 1, T11-T28.
14. Bai R., Guo J., Ye X-Y., Xie Y., Xie T. Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 2022, 77, 101619.
15. Bailes J., Soloviev M. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its monitoring in medical diagnostic and in sports. *Biomolecules*, 2021, 11, 2, 217.
16. Bake S., Okoreeh A., Khosravian H., Sohrabji F. Insulin-like growth factor (IGF)-1 treatment stabilizes the microvascular cytoskeleton under ischemic conditions. *Experimental Neurology*, 2019, 311, 162-172.
17. Bake S., Okoreeh A.K., Alaniz R.C., Sohrabji F. Insulin-like growth factor (IGF)-I modulates endothelial blood-brain barrier function in ischemic middle-aged female rats. *Endocrinology*, 2016, 157, 61-69.
18. Bake S., Selvamani A., Cherry J., Sohrabji F. Blood brain barrier and neuroinflammation are critical targets of IGF-1-mediated neuroprotection in stroke for middle-aged female rats. *PLoS ONE*, 2014, 9, e91427.

19. Baldini S., Restani L., Baroncelli L., Coltelli M., Franco R., Cenni M. C., Maffei L., Berardi N. Enriched early life experiences reduce adult anxiety-like behavior in rats: a role for insulin-like growth factor 1. *The Journal of Neuroscience*, 2013, 33, 28, 11715-11723.
20. Bannerman D.M., Rawlins J.N., McHugh S.B., Deacon R.M., Yee B.K., Bast T., Zhang W.N., Pothuizen H.H., Feldon J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2004, 28, 273-283.
21. Bannerman D.M., Sprengel R., Sanderson D.J., McHugh S.B., Rawlins J.N., Monyer H., Seeburg P.H. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2014, 15, 181-192.
22. Barage S.H., Sonawane K.D. Amyloid cascade hypothesis: pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 2015, 52, 1-18.
23. Basta-Kaim A., Szczęsny E., Głombik K., Stachowicz K., Ślusarczyk J., Nalepa I., Zelek-Molik A., Rafa-Zabłocka K., Budziszewska B., Kubera M., Leskiewicz M., Lasoń W. Prenatal stress affects insulin-like growth factor-1 (IGF-1) level and IGF-1 receptor phosphorylation in the brain of adult rats. *European Neuropsychopharmacology*, 2014, 24, 1546-1556.
24. Basu S., Dasgupta P.S. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, 102, 113-124.
25. Bekdash R.A. The cholinergic system, the adrenergic system and the neuropathology of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Science*, 2021, 22, 3, 1273.
26. Berlanga-Acosta J., Guilen-Nieto G., Rodriguez-Rodriguez N., Bringas-Vega M.L., Garcia-del-Barco-Herrera D., Berlanga-Saez J.O., Garcia-Ojalvo A., Valdes-Sosa M.J., Valdes-Sosa P.A. Insulin resistance at the crossroad of Alzheimer disease pathology: a review. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11, 560375.
27. Berry A., Bellisario V., Capoccia S., Tirassa P., Calza A., Alleva E., Cirulli F. Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology*, 2012, 37, 762-772.
28. Berthold-Losleben M., Himmerich H. The TNF-alpha system: functional aspects in depression, narcolepsy and psychopharmacology. *Current Neuropharmacology*, 2008, 6, 3, 193-202.
29. Bhushan I., Kour M., Kour G., Gupta S., Sharma S., Yadav A. Alzheimers disease: causes & treatment - a review. *Annals of Biotechnology*, 2018, 1, 1, 1002.
30. Bilbao D., Luciani L., Johannesson B., Piszczek A., Rosenthal N. Insulin-like growth factor-1 stimulates regulatory T cells and suppresses autoimmune disease. *EMBO Molecular Medicine*, 2014, 6, 1423-1435.
31. Blennow K., de Leon M., Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2006, 368, 387-403.
32. Blume G.R., Royes L.F.F. Peripheral to brain and hippocampus crosstalk induced by exercise mediates cognitive and structural hippocampal adaptations. *Life Science*, 2024, 352, 122799.
33. Bolos M., Perea J.R., Avila J. Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomolecular Concepts*, 2017, 8, 1, 37-43.
34. Bomfim T.R., Forny-Germano L., Sathler L.B., Brito-Moreira J., Houzel J.C., Decker H., Silverman M.A., Kazi H., Melo H.M., McClean P.L., Holscher Ch., Arnold S.E., Talbot K., Klein W.L., Munoz D.P., Ferreira S.T., De Felice F.G. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122, 1339-1353.
35. Bordon A. Molecular mechanism of Alzheimer's disease. *The Science Journal of the Lander College of Arts and Sciences*, 2017, 10, 2, 5-15.
36. Botto R., Callai N., Cermelli A., Causarano L., Rainero I. Anxiety and depression in Alzheimer's disease: a systematic review of pathogenetic mechanisms and relation to cognitive decline. *Neurological Sciences*, 2022, 43, 4107-4124.
37. Bradberry C.W., Gruen R.J., Berridge C.W., Roth R.H. Individual differences in behavioral measures: correlations with nucleus accumbens dopamine measured by microdialysis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1991, 39, 877-882.

38. Breijyeh Z., Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: cause and treatment. *Molecules*, 2020, 25, 5789.
39. Brog J.S., Salyapongse A., Deutch A.Y., Zahm D.S. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: Immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *Journal of Comparative Neurology*, 1993, 338, 255–278.
40. Calvo N., Cecchi M., Kabbaj M., Watson S.J., Akil H. Differential effects of social defeat in rats with high and low locomotor response to novelty. *Neuroscience*, 2011, 183, 81-89.
41. Carro E., Spuch C., Trejo J.L., Antequera D., Torres-Aleman I. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *Journal of Neuroscience*, 2005, 25, 10884-10893.
42. Chen S., Hu M., Shen M., Wang S., Wang C., Chen F., Tang Y., Wang X., Zeng H., Chen M., Gao J., Wang F., Su Y., Xu Y., Wang J. IGF-1 facilitates thrombopoiesis primarily through Akt activation. *Blood*, 2018, 132, 2, 210-222.
43. Chen Y., Yu Z. Tau and neuroinflammation in Alzheimer's disease: interplay mechanism and clinical translation. *Journal of Neuroinflammation*, 2023, 20, 165.
44. Chen Y., Zhang Y., Wang J., Li S., Wang Y., Zhang Z., Zhang J., Xin Ch., Wang Y., Rong P. Anti-neuroinflammation effects of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation against depression-like behaviors via hypothalamic  $\alpha 7nAChR/JAK2/STAT3/NF-\kappa B$  pathway in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2023, 29, 2634-2644.
45. Chen Z. Y., Zhang Y. Animal models of Alzheimer's disease: applications, evaluation, and perspectives. *Zoological Research*, 2022, 43, 6, 1026-1040.
46. Chen Z., Zhong Ch. Oxidative stress in Alzheimers disease. *Neuroscience Bulletin*, 2014, 30, 2, 271-281.
47. Chu Y.W., Schmitz S., Choudhury B., Telford W., Kapoor V., Garfield S., Howe D., Gress R.E. Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. *Blood*, 2008, 112, 2836-2846.
48. Clark R., Strasser J., McCabe S., Robbins K., Jardieu P. Insulin-like growth factor-1 stimulation of lymphopoiesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 1993, 92, 540-548.
49. Cohen J.L., Ata A.E., Jackson N.L., Rahn E.J., Ramaker R.C., Cooper S., Kerman I.A., Clinton S.M. Differential stress induced c-Fos expression and identification of region-specific miRNA-mRNA networks in the dorsal raphe and amygdala of high-responder/low-responder rats. *Behavioural Brain Research*, 2017, 319, 110-123.
50. Cools A.R., Gingras M.A. Nijmegen high and low responders to novelty: a new tool in the search after the neurobiology of drug abuse liability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1998, 60, 1, 151-159.
51. Craft S., Baker L.D., Montine T.J., Minoshima S., Watson G.S., Claxton A., Arbuckle M., Callaghan M., Tsai E., Plymate S.R., Green P.S. Leverenz J., Crooss D., Gerton B. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment, a pilot clinical trial. *Archives of Neurology*, 2012, 69, 29-38.
52. Cui L., Li S., Wang S., Wu X., Liu Y., Yu W., Wang Y., Tang Y., Xia M., Li B. Major depressive disorder: hypothesis, mechanism, prevention and treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9, 1, 30.
53. Del Giudice M., Gangestad S.W. Rethinking IL-6 and CRP: why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain, Behaviour, and Immunity*, 2018, 70, 61-75.
54. Dellu F., Piazza P.V., Mayo W., Le Moal M., Simon H. Novelty-seeking in rats biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology*, 1996, 34, 136-145.
55. Deminiere J.M., Piazza P.V., Le Moal M., Simon H. Experimental approach to individual vulnerability to psychostimulant addiction. *Neuroscience and Biobehavioral reviews*, 1989, 13, 141-147.

56. Deroche V., Piazza P.V., Casolini P., Maccari S., Le Moal M., Simon H. Stress-induced sensitization to amphetamine and morphine psychomotor effects depend on stress-induced corticosterone secretion. *Brain Research*, 1992, 598, 343-348.
57. Dineley K., Jahrling J., Denner L. Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 2014, 72, 92-103.
58. Do Carmo S., Cuella A.C. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Molecular Neurodegeneration*, 2013, 8, 37.
59. Domene S., Domene H.M. The role of acid-labile subunit (ALS) in the modulation of GH-IGF-1 action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020, 518, 111006.
60. Dong Y., Yu H., Li X., Bian K., Zheng Y., Dai M., Feng X., Sun Y., He Y., Yu B., Zhang H., Wu J., Yu X., Wu H., Kong W. Hyperphosphorylated tau mediates neuronal death by inducing necroptosis and inflammation in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 2022, 19, 205.
61. Duclot F., Hollis F., Darcy M.J., Kabbaj M. Individual differences in novelty-seeking behavior in rats as a model for psychosocial stress-related mood disorders. *Physiology & Behavior*, 2011, 104, 2, 296-305.
62. Duclot F., Kabbaj M. Individual differences in novelty seeking predict subsequent vulnerability to social defeat through a differential epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor expression. *The Journal of Neuroscience*, 2013, 33, 27, 11048-11060.
63. Dunacka J., Grembecka B., Majkutewicz I., Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 treatment enhances working and reference memory by reducing neuroinflammation and amyloid beta deposition in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*, 2025a, 18, 527.
64. Dunacka J., Grembecka B., Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 induced anxiolytic and antidepressant effects in a rat model of sporadic Alzheimer's disease are associated with the peripheral suppression of inflammation. *Cells*, 2025b, 14, 1189.
65. Dunacka J., Świątek G., Wrona D. High behavioral reactivity to novelty as a susceptibility factor for memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation as a rat model of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Science*, 2024, 25, 11562.
66. Dutta S., Beaver J., Halcomb C., Jasnow A. Dissociable roles of the nucleus accumbens core and shell subregions in the expression and extinction of conditioned fear. *Neurobiology of Stress*, 2021, 15, 100365.
67. Ebner K., Muigg P., Singewald N. Inhibitory function of the dorsomedial hypothalamic nucleus on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to an emotional stressor but not immune challenge. *Journal of Neuroendocrinology*, 2013, 25, 1, 48-55.
68. El-Hakim Y., Mani K.K., Pickle K.A., Akbari Z., Samiya N., Pham C., Salas G., Pilla R., Sohrabji F. Peripheral, but not central, IGF-1 treatment attenuates stroke-induced cognitive impairment in middle-aged female Sprague Dawley rats: The gut as a therapeutic target. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2024, 122, 150-166.
69. Evin G., Li Q.X. Platelets and Alzheimer's disease: potential of APP as a biomarker. *World Journal of Psychiatry*, 2012, 2, 6, 102-113.
70. Falomir-Lockhart E., Dolcetti F. J. C., Herrera M. L., Pennini J., Zappa Villar M. F., Salinas G., Portiansky E., Spittau B., Lacunza E., Hereñú C.B., Bellini M.J. IGF-1 gene transfer modifies inflammatory environment and gene expression in the caudate-putamen of aged female rat brain. *Molecular Neurobiology*, 2022, 59, 6, 3337-3352.
71. Farias Quipildor G. E., Mao K., Hu Z., Novaj A., Cui M. H., Gulinello M., Branch C A., Gubbi S., Patel K., Moellering D.R., Tarantini S., Kiss T., Yabluchanskiy A., Ungvari Z., Sonntag W. E., Huffman D. M. Central IGF-1 protects against features of cognitive and sensorimotor decline with aging in male mice. *Geroscience*, 2019, 41, 2, 185-208.
72. Feng Y., Li L., Sun X.H. Monocytes and Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 2011, 27, 2, 115-122.

73. Fernandez de Sevilla M. E., Pignatelli J., Zegarra-Valdivia J. A., Mendez P., Nunez A., Torres Aleman I. Insulin-like growth factor I mitigates post-traumatic stress by inhibiting AMP-kinase in orexin neurons. *Molecular Psychiatry*, 2022, 27, 4, 2182-2196.
74. Filus A., Zdrojewicz Z. Insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1) - budowa i rola w organizmie człowieka. *Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism*, 2014, 22, 4, 161-169.
75. Foley É. M., Parkinson J.T., Mitchell R.E., Turner L., Khandaker G.M. Peripheral blood cellular immunophenotype in depression: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 2023, 28, 3, 1004-1019.
76. Fonseca-Rodrigues D., Goncalves J., Laranjeira I., Almeida A., Pinto-Ribeiro F. Sucrose intake and preference by Wistar Han rats are not influenced by sex or food/water deprivation. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 2022, 216, 73387.
77. Freude S., Hettich M.M., Schumann C., Stöhr O., Koch L., Köhler C., Udelhoven M., Leeser U., Müller M., Kubota N., Kadowski T., Krone W., Schroder H., Bruning J.C., Schubert M. Neuronal IGF-1 resistance reduces A $\beta$  accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 2009, 23, 3315-3324.
78. Galle S.A., Geraedts I.K., Deijen J.B., Milders M.V., Drent M.L. The interrelationship between insulin-like growth factor 1, apolipoprotein E  $\epsilon$ 4, lifestyle factors, and the aging body and brain. *The Journal of Prevention Alzheimer's Disease*, 2020, 7, 265-273.
79. García-Fuster M.J., Perez J.A., Clinton S.M., Watson S.J., Akil H. Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse. *The European Journal of Neuroscience*, 2010, 31, 1, 79-89.
80. Grieb P. Intracerebroventricular streptozotocin injection as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism. *Molecular Neurobiology*, 2016, 53, 1741-1752.
81. Grossberg S. Acetylcholine neuromodulation in normal and abnormal learning and memory: vigilance control in waking, sleep, autism, amnesia and Alzheimer's disease. *Frontiers in Neural Circuits*, 2017, 11, 82.
82. Grünblatt E., Hoyer S., Riederer P. Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 2004, 111, 3, 367-386.
83. Guo N., Wang X., Xu M., Bai J., Yu H., Zhang L. PI3K/AKT signaling pathway: molecular mechanisms and therapeutic potential in depression. *Pharmacological Research*, 2024, 206, 107300.
84. Hablitz L.M., Nedergaard M. The glymphatic system: a novel component of fundamental neurobiology. *The Journal of Neuroscience*, 2021, 41, 37, 7698-7711.
85. Haj M.E., Colombel F., Kapogiannis D., Gallouj K. False memory in Alzheimer's disease. *Behavioural Neurology*, 2020, 5284504.
86. Hall-Glenn F., Lyons K.M. Roles for CCN2 in normal physiological processes. *Cell Molecular Life Science*, 2011, 68, 19, 3209-3217.
87. Hampel H., Marsel-Mesulam M., Claudio Cuello A., Farlow M.R., Giacobini E., Grossberg G.T. Khachaturian A.S., Vergallo A., Cavado E., Snyder P.J., Khachaturian Z.S. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 2018, 141, 1917-1933.
88. Han Z., Yang X., Huang S. Sleep deprivation: A risk factor for the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Heliyon*, 2024, 10, e28819.
89. Hasue R.H., Shammah-Lagnado S.J. Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 2002, 454, 1, 15-33.
90. Hayes C.A., Wilson D., De Leon M.A., Jolayemi Mustapha M., Morale S., Odden M.C., Ashpole N.M. Insulin-like growth factor-1 and cognitive health: exploring cellular, preclinical, and clinical dimensions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2025, 76, 101161.
91. Henrot P., Truchetet M.E., Fisher G., Taieb A., Cario M. CCN proteins as potential actionable targets in scleroderma. *Experimental Dermatology*, 2019, 28, 11-18.

92. Herold M.J., McPherson K.G., Reichardt H.M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cellular and Molecular Life Science*, 2006, 63, 1, 60-72.
93. Herrera M.L., Champarini L.G., Oliveros A.L., Bellini M.J., Herenu C.B. Potentialities of IGF-1 for regulating oxidative stress in neuroinflammation and neurodegeneration: theoretical review. *Exploration of Neuroprotective Therapy*, 2024, 4, 442-458.
94. Hewett S.J., Jackman N.A., Claycomb R.J. Interleukin-1 $\beta$  in central nervous system injury and repair. *European Journal of Neurodegenerative Disease*, 2012, 1, 2, 195-211.
95. Hodge R.D., D'Ercole A.J., O'Kusky J.R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inhibits neuronal apoptosis in the developing cerebral cortex in vivo. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2007, 25, 4, 233-241.
96. Holmes C. Review: Systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2013, 39, 51-68.
97. Homolak J., Markovic P., Virag D., Knezovic A., Osmanovic Barilar J., Loncar A., Salkovic-Petrisic M., Babic Perhoc A. Species-specific sensitivity to intracerebroventricular streptozotocin in rats and mice highlights pathways and proteins relevant to Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 2025, 132, 10, 1547-1566.
98. Hong, I., Kaang, B.K. The complexity of ventral CA1 and its multiple functionalities. *Genes, Brain and Behavior*, 2022, 21, e12826.
99. Hooks M.S., Jones G.H., Smith A.D., Neill D.B., Justice J.B., Jr. Individual differences in locomotor activity and sensitization. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 1991, 38, 467-470.
100. Hopperton K.E., Mohammad D., Trépanier M.O., Giuliano V., Bazinet R.P. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Molecular Psychiatry*, 2018, 23, 177-198.
101. Huang Y.T., Gan Y.H., Yang L., Cheng W., Yu J.T. Depression in Alzheimer's disease: epidemiology, mechanism, and treatment. *Biological Psychiatry*, 2024, 95, 11, 992-1005.
102. Ingram D.K., Corfman T.P. An overview of neurobiological comparisons in mouse strains. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 1980, 4, 421-435.
103. Ionescu-Tucker A., Cotman C.W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 2021, 107, 86-95.
104. Jack C.R. Jr., Bennett D.A., Blennow K., Carrillo M.C., Dunn B., Haeberlein S.B., Holtzman D.M., Jagust W., Jessen F., Karlawish J., Liu E., Molinuevo J.L., Montine T., Phelps C., Rankin K.P., Rowe C.C., Scheltens P., Siemers E., Snyder H.M. Sperling R. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 2018, 14, 535-562.
105. Jahn H. Memory loss in Alzheimer's disease. *Clinical Research*, 2013, 15, 4, 445-454.
106. Jensen J., McIntosh A.R., Crawley A., Mikulis D.J., Remington G., Kapur S. Direct activation of the ventral striatum in anticipation of aversive stimuli. *Neuron*, 2003, 40, 1251-1257.
107. Jerzemowska G., Plucińska K., Kulikowski M., Trojnar W., Wrona D. Locomotor response to novelty correlates with the number of midbrain tyrosine hydroxylase positive cells in rats. *Brain Research Bulletin*, 2012, 87, 1, 94-102.
108. Jessen N.A., Finmann Munk A.S., Lundgaard I., Nedergaard M. The glymphatic system - a beginner's guide. *Neurochemical Research*, 2015, 40, 12, 2583-2599.
109. Jo D., Choi S.Y., Ahn S.Y., Song J. IGF1 enhances memory function in obese mice and stabilizes the neural structure under insulin resistance via AKT-GSK3 $\beta$ -BDNF signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2025, 183, 117846.
110. Johansson M., Stomrud E., Lindberg O., Westman E., Johansson P.M. van Westen D., Mattsson N., Hansson O. Apathy and anxiety are early markers of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 2020, 85, 74-82.
111. Józefiak A., Pacholska J., Kędzia W. Rola IGF-I i IGFBP w procesie neogenezy. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia*, 2008, 1, 3, 175-183.

112. Kabbaj M., Devine D.P., Savage V.R., Akil H. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. *The Journal of Neuroscience*, 2000, 20, 18, 6983-6988.
113. Kamat P.K., Kalani A., Rai S., Kumar-Tota S., Kumar A., Ahmad A.S. Streptozotocin intracerebroventricular-induced neurotoxicity and brain insulin resistance: a therapeutic intervention of sporadic Alzheimer's disease (sAD)-like pathology. *Molecular Neurobiology*, 2016, 53, 7, 4548-4562.
114. Kim K.H., Won J.H., Cheng N., Lau L.F. The matricellular protein CCN1 in tissue injury repair. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 2018, 12, 273-279.
115. Kim S.H., Kim C.H. Neuronal IGF-1 overexpression restores hippocampal newborn cell survival and recent CFC memory consolidation in Cav1.3 knock-out mice. *Brain Research*, 2024, 1825, 148712.
116. Knezovic A., Osmanovic-Barilar J., Curlin M., Hof P.R., Simic G., Riederer P., Salkovic-Petrisic M. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 2015, 122, 4, 577-592.
117. Knezovic A., Salkovic-Petrisic M. Cholinergic neurotransmission in the brain of streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease: long-term follow up. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 2025, 132, 10, 1461-1477.
118. Kondo M. Molecular mechanisms of exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects. *JMA Journal*, 2023, 6, 114-119.
119. Kondo M., Koyama Y., Nakamura Y., Shimada S. A novel 5HT3 receptor-IGF1 mechanism distinct from SSRI-induced antidepressant effects. *Molecular Psychiatry*, 2018, 23, 833-842.
120. Koo J.W., Russo S.J., Ferguson D., Nestler E.J., Duman R.S. Nuclear factor- $\kappa$ B is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107, 6, 2669-2674.
121. Kosten T.A., Galloway M.P., Duman R.S., Russell D.S., D'Sa C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33, 7, 1545-1558.
122. Kosugi K., Yoshida K., Suzuki T., Kobayashi K., Yoshida K., Mimura M., Tanaka K.F. Activation of ventral CA1 hippocampal neurons projecting to the lateral septum during feeding. *Hippocampus*, 2021, 31, 294-304.
123. Kowalska A. Genetyka zespołów otępiennych. Część 4: spektrum mutacji odpowiedzialnych za rozwój rodzinnej autosomalnie dominującej postaci choroby Alzheimera. *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 2009, 63, 583-591.
124. Kuang W.H., Dong Z.Q., Tian L.T., Li J. IGF-1 defends against chronic-stress induced depression in rat models of chronic unpredictable mild stress through the PI3K/Akt/FoxO3a pathway. *The Kaohsiung Journal of Medical Science*, 2018, 34, 370-376.
125. Kurowska-Rucińska E., Ruciński J., Myślińska D., Grembecka B., Wrona D., Majkutewicz I. Dimethyl fumarate alleviates adult neurogenesis disruption in hippocampus and olfactory bulb and spatial cognitive deficits induced by intracerebroventricular streptozotocin injection in young and aged Rats. *International Journal of Molecular Science*, 2022, 23, 24, 15449.
126. Kvetnansky R., Lu X., Ziegler M. G. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems. *Advances in Pharmacology*, 2013, 68, 359-397.
127. Labandeira-Garcia J.L., Costa-Besada M.A., Labandeira C.M., Villar-Cheda B., Rodriguez-Perez A.I. Insulin-like growth factor-1 and neuroinflammation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2017, 9, 365.
128. Lapid M.D., Morilak D.A. Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability. *Neuroscience*, 2006, 137, 3, 1039-1049.

129. Lauer A.A., Grimm H.S., Apel B., Golobrodzka N., Kruse L., Ratanski E., Schulten N., Schwarze L., Slawik T., Sperlich S., Vohla A., Grimm M.O.W. Mechanistic link between vitamin B12 and Alzheimer's disease. *Biomolecules*, 2022, 12, 129.
130. Le Roith D. The Insulin-like growth factor system. *Experimental Diabetes Research*, 2003, 4, 205-212.
131. Le Roith D., Holly J.M.P., Forbes B.E. Insulin-like growth factors: ligands, binding protein, and receptors. *Molecular Metabolism*, 2021, 101245.
132. LeDoux J.E. Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 2000, 23, 155–184.
133. Lee J.R., Suh, S.W., Han J.W., Byun S., Kwon S.J.,; Lee K.H., Kwak K.P., Kim B.J., Kim S.G., Kim J.L., Kim T.H., Ryu S-H., Moon S.W., Park J.H., Lee D-W., Youn J.C., Lee D.Y., Lee S.B., Lee J.J., Jhoo J.H., Kim K.W. Anhedonia and dysphoria are differentially associated with the risk of dementia in the cognitively normal elderly individuals: a prospective cohort study. *Psychiatry Investigation*, 2019, 16, 575-580.
134. Lehner M., Wisłowska-Stanek A., Skórzewska A., Płaźnik A. Chronic restraint increase apoptosis in the hippocampus of rats with high responsiveness to fear stimuli. *Neuroscience Letters*, 2015, 586, 55-59.
135. Lemaire V., Aourousseau C., Le Moal M., Abrous D.N. Behavioural trait to novelty is related to hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 1999, 11, 4006-4014.
136. Levada O.A., Troyan A.S. Insulin-like growth factor-1: a possible marker for emotional and cognitive disturbances, and treatment effectiveness in major depressive disorder. *Annals of General Psychiatry*, 2017, 16, 38.
137. Levita L., Dalley J.W., Robbins T.W. Nucleus accumbens dopamine and learned fear revisited: a review and some new findings. *Behavioural Brain Research*, 2002, 137, 115-127.
138. Levy M.J.F., Boulle F., Steinbusch H.W., van den Hove D.L.A., Kenis G., Lanfumey L. Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression. *Pharmacology*, 2018, 235, 8, 2195-2220.
139. Lewitt M.S., Boyd G.W. The role of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins in the nervous system. *Biochemistry Insights*, 2019, 12, 1-18.
140. Li Ch. H., Yang M.H., Zhang G. Z., Wang X. X., Li B., Li M., Woelfer M., Walter M., Wang L. Neural networks and the anti-inflammatory effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation in depression. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17, 54.
141. Li M., Long C., Yang L. Hippocampal-prefrontal circuit and disrupted functional connectivity in psychiatric and neurodegenerative disorders. *BioMed Research International*, 2015, 2015, 810548.
142. Liccardo D., Marzeno F., Carraturo F., Guida M., Femminella G.D., Bencivenga L., Agrimi J., Addonizio A., Melino I., Valletta A., Rengo C., Ferrara N., Rengo G., Cannavo A. Potential bidirectional relationship between periodontitis and Alzheimer's disease. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11, 683.
143. Lichtenwalner R.J., Forbes M.E., Bennett S.A., Lynch C.D., Sonntag W.E., Riddle D.R. Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-1 ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 2001, 107, 4, 603-613.
144. Liso A., Venuto S., Coda A.R.D., Giallongo C., Palumbo G.A., Tibullo D. IGFBP-6: at the crossroads of immunity, tissue repair and fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 4358.
145. Liu W., Ye, P., O'Kusky J.R., D'Ercole A.J. Type 1 insulin-like growth factor receptor signaling is essential for the development of the hippocampal formation and dentate gyrus. *Journal of Neuroscience Research*, 2009, 87, 2821-2832.
146. Lobie P.E., Zhu T., Graichen R., Goh E.L.K. Growth hormone, insulin-like growth factor I and the CNS: localization, function and mechanism of action. *Growth Hormone & IGF Research*, 2000, supplement b, S51-S56.

147. Ma L., Wang H.B., Hashimoto K. The vagus nerve: an old but new player in brain-body communications. *Brain, Behaviour, and Immunity*, 2025, 124, 28-39.
148. Ma Q.L., Yang F., Rosario E.R., Ubeda O.J., Beech W., Gant D.J., Chen P.P., Hudspeth B., Chen, C., Zhao, Y., Vinters H.V., Frautschy S.A., Cole G.M.  $\beta$ -amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *Journal of Neuroscience*, 2009, 29, 9078-9089.
149. Mabrouk O.S., Han J.L., Wong J.T., Akil H., Kennedy R.T., Flagel S.B. The in vivo neurochemical profile of selectively bred high-responder and low-responder rats reveals Baseline, cocaine-evoked, and novelty-evoked differences in monoaminergic systems. *ACS Chemical Neuroscience*, 2018, 9, 4, 715-724.
150. Maglio L. E., Noriega-Prieto J. A., Maroto I. B., Martin-Cortecero J., Muñoz-Callejas A., Callejo-Móstoles M., Fernández de Sevilla D. IGF-1 facilitates extinction of conditioned fear. *Elife*, 2021, 10, e67267.
151. Majkutewicz I., Kurowska E., Podlacha M., Myślińska D., Grembecka B., Ruciński J., Plucińska K., Jerzemowska G., Wrona D. Dimethyl fumarate attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory impairment and hippocampal neurodegeneration in rats. *Behavioural Brain Research*, 2016, 308, 24-37.
152. Majkutewicz I., Kurowska E., Podlacha M., Myślińska D., Grembecka B., Ruciński J., Pierzynowska K., Wrona D. Age-dependent effects of dimethyl fumarate on cognitive and neuropathological features in the streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 2018, 1686, 19-33.
153. Majkutewicz I., Kurowska-Rucińska E., Ruciński J., Myślińska D., Grembecka B., Mantej J., Dzik K.P. Diverse efficacy of dimethyl fumarate in alleviating the late-streptozotocin-induced cognitive impairment and neuropathological features in rat. *Molecular Neurobiology*, 2024, 61, 7751-7766.
154. Malberg J.E., Platt B., Rizzo S.J., Ring R.H., Lucki I., Schechter L.E., Rosenzweig-Lipson S. Increasing the levels of insulin-like growth factor-I by an IGF binding protein inhibitor produces anxiolytic and antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology*, 2007, 11, 2360-2368.
155. Marinelli M., Piazza P.V. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *European Journal of Neuroscience*, 2002, 16, 387-394.
156. Marszałek M. Choroba Alzheimera a produkty degradacji białka APP. Formowanie i różnorodność form fibrylujących peptydów-wybrane aspekty. *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 2016, 70, 787-796.
157. Mazerbourg S., Callebaut I., Zapf J., Subburaman M., Overgaard M., Monget P. Up date on IGFBP-4: regulation of IGFBP-4 levels and functions, in vitro and in vivo. *Growth Hormone & IGF Research*, 2004, 14, 71-84.
158. Miao J., Ma H., Yang Y., Liao Y., Lin C., Zheng J., Yu M., Lan J. Microglia in Alzheimer's disease: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic potentials. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2023, 15, 1201982.
159. Miao J., Zhang Y., Su C., Zheng Q., Guo J. Insulin-like growth factor signaling in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic strategies. *Molecular Neurobiology*, 2025, 62, 3, 3195-3225.
160. Michailidis M., Moraitou D., Tata D.A., Kalinderi K., Papamitsou T., Papaliagkas V. Alzheimer's disease a type 3 diabetes: common pathophysiological mechanism between Alzheimer's disease and type 2 disease. *International Journal of Molecular Science*, 2022, 23, 5, 2687.
161. Michenko D.O., Kharkova A.P., Tsymbal D.O., Karbovskyi L.L., Michenko O.H. IRE1 inhibition affects the expression of insulin-like growth factor binding protein genes and modifies its sensitivity to glucose deprivation in U87 glioma cells. *Endocrine Regulations*, 2015, 49, 4, 185-197.

162. Minett T., Classey J., Matthew F.E., Fahrenhold M., Taga M., Brayne C., Ince P.G., Nicoll J.A.R., Boche D., MRC CFAS. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *Journal of Neuroinflammation*, 2016, 13, 135.
163. Mir S., Cai W., Carlson S.W., Saatman K.E., Andres D.A. IGF-1 mediated neurogenesis involves a novel RIT1/Akt/Sox2 Cascade. *Scientific Reports*, 2017, 7, 3283.
164. Miu A.C., Heilman R.M., Paşca S.P., Stefan C.A., Spânu F., Vasiu R., Olteanu A.I., Miclea M. Behavioral effects of corpus callosum transection and environmental enrichment in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 2006, 172, 1, 135-144.
165. Moloney A.M., Griffin R.J., Timmons S., O'Connor R., Ravid R., O'Neill C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signaling. *Neurobiology of Aging*, 2010, 31, 224-243.
166. Morris G.P., Clark I.A., Vissel B. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2014, 2, 135.
167. Mravec B., Horvathova L., Padova A. Brain under stress and Alzheimer's disease. *Cell Molecular Neurobiology*, 2018, 38, 73-84.
168. Muehlmann A.M., Wilkinson J.A., Devine D.P. Individual differences in vulnerability for self-injurious behavior: studies using an animal model. *Behavior Brain Research*, 2011, 217, 1, 148-154.
169. Nakagawa K., Kiko T., Kuriwada S., Miyazawa T., Kimura F., Miyazawa T. Amyloid  $\beta$  induces adhesion of erythrocytes to endothelial cells and affects endothelial viability and functionality. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 2011, 75, 2030-2033.
170. Nieto-Estevéz V., Defterali C., Vicario-Abejon C. IGF-1: a key growth factor that regulates neurogenesis and synaptogenesis from embryonic to adult stages of the brain. *Frontiers in Neuroscience*, 2016, 10, 52.
171. O'Kusky J., Ye P. Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2012, 33, 3, 230-251.
172. Palmqvist S., Schöll M., Strandberg O., Mattsson N., Stomrud E., Zetterberg H., Blennow K., Landau S., Jagust W., Hansson O. Earliest accumulation of  $\beta$ -amyloid occurs within the default-mode network and concurrently affects brain connectivity. *Nature Communications*, 2017, 8, 1214.
173. Park S.E., Dantzer R., Kelley K.W., McCusker R.H. Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressivelike behavior and brain cytokine expression in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 2011, 8, 12.
174. Passeri E., Elkhoury K., Morsink M., Broersen K., Linder M., Tamayol A., Malaplate C., Yen, F.T., Arab-Tehrany E. Alzheimer's disease: treatment strategies and their limitations. *International Journal of Molecular Science*, 2022, 23, 13954.
175. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. Academic Press, 2007.
176. Peng W., Achariyar T.M., Li B., Liao Y., Mestre H., Hitomi E., Regan S., Kasper T., Peng S., Ding F., Benveniste H., Nedergaard M., Deane R. Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 2016, 93, 215-225.
177. Piazza P. V., Deroche V., Deminière J.M., Maccari S., Le Moal M., Simon H. Corticosterone in the range of stress-induced levels possesses reinforcing properties: implications for sensation-seeking behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90, 24, 11738-11742.
178. Piazza P. V., Maccari S., Deminière J. M., Le Moal M., Mormède P., Simon H. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991a, 88, 6, 2088-2092.
179. Piazza P. V., Rougé-Pont F., Deroche V., Maccari S., Simon H., Le Moal M. Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93, 16, 8716-8720.

180. Piazza P.V., Deminière J.M., Le Moal M., Simon H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*, 1989, 245, 4925, 1511-1513.
181. Piazza P.V., Le Moal M. Glucocorticoids as a biological substrate of reward: Physiological and pathophysiological implications. *Brain Research Reviews*, 1997, 25, 359-372.
182. Piazza P.V., Rougé-Pont F., Deminière J.M., Kharoubi M., Le Moal M., Simon H. Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Research*, 1991b, 567, 169-174.
183. Picciotto M.R., Higley M.J., Mineur Y.S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 2012, 76, 1, 116-129.
184. Pierzynowska K., Podlacha M., Gaffke L., Majkutewicz I., Mantej J., Węgrzyn A., Osiały M., Myslińska D., Węgrzyn G. Autophagy-dependent mechanism of ginsenoside-mediated elimination of behavioral and biochemical defects in the rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2019, 148, 332-346.
185. Pinto-Benito D., Paradelo-Leal C., Ganchala D., de Castro-Molina P., Arevalo M.A. IGF-1 regulates astrocytic phagocytosis and inflammation through the p110 $\alpha$  isoform of PI3K in a sex-specific manner. *Glia*, 2022, 70, 1153-1169.
186. Pitychoutis P.M., Sanoudou D., Papandreou M., Nasias D., Kouskou M., Tomlinson C.R., Tsonis P.A., Papadopoulou-Daifoti Z. Forced swim test induces divergent global transcriptomic alterations in the hippocampus of high versus low novelty-seeker rats. *Human Genomics*, 2014, 8, 1, 4.
187. Pizzo P., Basso E., Filadi R., Greotti E., Leparulo A., Pendin D., Redolfi N., Rossini M., Vajente N., Pozzan T., Fasolato C. Presenilin-2 and calcium handling: molecules, organelles, cells and brain networks. *Cells*, 2020, 9, 2166.
188. Pluta R., Ułamek-Kozioł M., Januszewski S., Czuczwar S.J. Gut microbiota and pro/prebiotics in Alzheimer's disease. *Aging*, 2020, 12, 6, 5539-5550.
189. Podlacha M., Glac W., Listowska M., Grembecka B., Majkutewicz I., Myslińska D., Plucińska K., Jerzemowska G., Grzybowska M., Wrona D. Medial septal NMDA glutamate receptors are involved in modulation of blood natural killer cell activity in rats. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2016, 11, 1, 121-132.
190. Pomytkin I., Costa-Nunes J.P., Kasatkin V., Veniaminova E., Demchenko A., Lyundup A., Lesch K.P., Ponomarev E.D., Strekalova T. Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2018, 24, 9, 763-774.
191. Pugazhenthii S., Miller E., Sable C., Young P., Heidenreich K.A., Boxer L.M., Reusch J.E. Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274, 39, 27529-27535.
192. Rabinovici G.D. Late-onset Alzheimer disease. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 2019, 25 (1), 14-33.
193. Ramsey M.M., Adams M.M., Ariwodola O.J., Sonntag W.E., Weiner J.L. Functional characterization of des-IGF-1 action at excitatory synapses in the CA1 region of rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 2005, 94, 1, 247-254.
194. Rao A.T., Degan A.J., Levy L.M. Genetic of Alzheimer Disease. *American Journal of Neuroradiology*, 2014, 35, 457-458.
195. Raport Rzecznika Praw Obywatelskich (RPO). Szczudlik A., Barcikowska-Kotowicz M., Gabryelewicz T., Opala G., Parnowski T., Kuźnicki J., Rossa A., Sadowska A. Sytuacja osób chorych na chorobę Alzheimera w Polsce, 2016, 1-80.
196. Ravelli K.G., Rosário B.D., Camarini R., Hernandes M.S., Britto L.R. Intracerebroventricular streptozotocin as a model of Alzheimer's disease: neurochemical and behavioral characterization in mice. *Neurotoxicity Research*, 2017, 31, 3, 327-333.
197. Reger M.A., Watson G.S., Green P.S., Baker L.D., Cholerton B., Fishel M.A., Plymate S.R., Cherrier M.M., Schellenberg G.D., Frey W.H. II, Craft S. Intranasal insulin administration dose-

- dependently modulates verbal memory and plasma amyloid- $\beta$  in memory-impaired older adults. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2008, 13, 323-331.
198. Roda A., Serra-Mir G., Montoliu-Gaya L., Tiessler L., Villegas S. Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 2022, 17, 8, 1666-1674.
  199. Roohi E., Jaafari N., Hashemian F. On inflammatory hypothesis of depression: what is the role of IL-6 in the middle of the chaos? *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18, 1, 45.
  200. Rosario L.A., Abercrombie E.D. Individual differences in behavioral reactivity: correlation with stress-induced norepinephrine efflux in the hippocampus of Sprague-Dawley rats. *Brain Research Bulletin*, 1999, 48, 6, 595-602.
  201. Rosenberg P.B., Nowrangi M.A., Lyketsos C.G. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: what might be associated brain circuits? *Molecular Aspects of Medicine*, 2015, 43-44, 25-37.
  202. Salkovic-Petrisic M., Tribl F., Schmidt M., Hoyer S., Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 96, 4, 1005-1015.
  203. Salkovic-Petrisic M., Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 2007, 72, 217-233.
  204. Salkovic-Petrisic M., Knezovic A., Hoyer S., Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *Journal of Neural Transmission*, 2013, 120, 233-252.
  205. Salkovic-Petrisic M., Osmanovic-Barilar J., Bruckner M.K., Hoyer S., Arendt T., Riederer P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. *Journal of Neural Transmission*, 2011, 118, 765-772.
  206. Sandi C. Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trends in Neuroscience*, 2011, 34, 165-176.
  207. Savino W., Mendes-da-Cruz D.A., Lepletier A., Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nature Reviews. Endocrinology*, 2016, 12, 77-89.
  208. Schurmann A., Spencer G.S., Berry C.J., Decuyper E., Goddeeris B. Evidence for suppression of immune function by insulin-like growth factor-1 in dwarf rats in vivo. *Experientia*, 1996, 52, 55-59.
  209. Sędzikowska A., Szablewski L. Insulin and insulin resistance in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Science*, 2021, 22, 18, 9987.
  210. Shad K.F., Aghazadeh Y., Ahmad S., Kress B. Peripheral markers of Alzheimer's disease: surveillance of white blood cells. *Synapse*, 2013, 67, 8, 541-543.
  211. Shin J.H., Seong J.K., Yi S.S. Sequential alterations of glucocorticoid receptors in the hippocampus of STZ-treated type 1 diabetic rats. *Journal of Veterinary Science*, 2014, 15, 19-26.
  212. Shishkina G.T., Dygalo N.N. The glucocorticoid hypothesis of depression: history and prospects. *Russian Journal of Genetics*, 2017, 7, 1, 128-133.
  213. Sierra-Mercado D., Padilla-Coreano N., Quirk G. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 36, 529-538.
  214. Silva I., Silva J., Ferreira R., Trigo D. Glymphatic system, AQP4, and their implications in Alzheimer's disease. *Neurological Research and Practice*, 2021, 3, 1, 5.
  215. Simic G., Tkalcic M., Vukić V., Mulc D., Spanić E., Sagud M., Olucha-Bordonau F.E., Vuksic M., R., Hof P. Understanding emotions: origins and roles of the amygdala. *Biomolecules*, 2021, 11, 6, 823.
  216. Skórzewska A., Lehner M., Wisłowska-Stanek A., Krząścik P., Ziemia A., Płaźnik A. The effect of chronic administration of corticosterone on anxiety- and depression-like behavior and the

- expression of GABA-A receptor alpha-2 subunits in brain structures of low-and high-anxiety rats. *Hormones and Behavior*, 2014, 65, 6-13.
217. Slavich G.M., Irwin M.R. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychological Bulletin*, 2014, 140, 3, 774-815.
  218. Smith J.A., Das A., Ray S.K., Banik N.L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Research Bulletin*, 2012, 87, 1, 10-20.
  219. Song F., Zhou X.X., Hu Y., Li G., Wang Y. The roles of insulin-like growth factor binding protein family in development and disease. *Advances in Therapy*, 2021, 38, 885-903.
  220. Soto M., Cai W., Konishi M., Kahn C.R. Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116, 6379-6384.
  221. Steffen J., Focken N., Çalışkan G. Recognizing depression as an inflammatory disease: the search for endotypes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 2024, 327, 1, C205-C212.
  222. Sugama S., Kakinuma Y. Noradrenaline as a key neurotransmitter in modulating microglia activation in stress response. *Neurochemistry International*, 2021, 143, 104943.
  223. Sugama S., Kakinuma Y. Stress and brain immunity: Microglial homeostasis through hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis and sympathetic nervous system. *Brain, Behavior & Immunity-Health*, 2020, 7, 100111.
  224. Sun P., Knezovic A., Parlak M., Cuber J., Karabeg M.M., Deckert J., Riederer P., Hua Q., Salkovic-Petrisic M., Schmitt A.G. Long-term effects of intracerebroventricular streptozotocin treatment on adult neurogenesis in the rat hippocampus. *Current Alzheimer Research*, 2015, 12, 8, 772-784.
  225. Sun Z., Wu K., Gu L., Huang L., Zhuge Q., Yang S., Wang Z. IGF-1R stimulation alters microglial polarization via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway after cerebral hemorrhage in mice. *Brain Research Bulletin*, 2020, 164, 221-234.
  226. Svensson J., Diez M., Engel J., Wass C., Tivesten A., Jansson J. O., Isaksson O., Archer T., Hökfelt T., Ohlsson C. Endocrine, liver-derived IGF-I is of importance for spatial learning and memory in old mice. *The Journal of Endocrinology*, 2006, 189, 3, 617-627.
  227. Swann P., Mirza-Davies A., O'Brien J. Associations between neuropsychiatric symptoms and inflammation in neurodegenerative dementia: a systematic review. *Journal of Inflammation Research*, 2024, 17, 6113-6141.
  228. Szczyński E., Ślusarczyk J., Głombik K., Budziszewska B., Kubera M., Lasoń W., Basta-Kaim A. Possible contribution of IGF-1 to depressive disorders. *Pharmacological Reports*, 2013, 65, 1622-1631.
  229. Szyszowska A., Knapp M., Kamiński K., Lisowska A. Insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7): novel, independent marker of cardiometabolic disease? *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 2019, 73, 735-740.
  230. Talbot K., Wang H Y., Kazi H., Han L.Y., Bakshi K.P., Stucky A., Fuino R.L., Kawaguchi K.R., Samoyedny A.J., Wilson R. S., Arvanitakis Z., Schneider J. A., Wolf B.A., Bennett D.A., Trojanowski J.Q., Arnold S.E. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122, 4, 1316-1338.
  231. Tellechea P., Pujol N., Esteve-Belloch P., Echeveste B., Garcia-Eulate M.R., Arbizu J., Riverol M. Early-and late-onset Alzheimer disease: are they the same entity? *Neurologia*, 2018, 33, 4, 244-253.
  232. Theleritis C., Politis A., Siarkos K., Lyketsos C.G. A review of neuroimaging findings of apathy in Alzheimer's disease. *International Psychogeriatrics*, 2014, 26, 195-207.
  233. Thipani-Madhu M., Balaji O., Kandi V., Ca J., Harikrishna G.V., Metta N., Mudamanchu V.K., Sanjay B.G., Bhupathiraju P. Role of the glymphatic system in Alzheimer's Disease and treatment approaches: a narrative review. *Cureus*, 2024, 16, 6, e63448.

234. Tian S., Ye T., Cheng X. The behavioral, pathological and therapeutic features of the triple transgenic Alzheimer's disease (3xTg-AD) mouse model strain. *Experimental Neurology*, 2023, 368, 114505.
235. Ting E.Y., Yang A.C., Tsai S.J. Role of interleukin-6 in depressive disorder. *International Journal of Molecular Science*, 2020, 21, 6, 2194.
236. Tong R.L., Kahn U.N., Grafe L.A., Hitti F.L., Fried N.T., Corbett B.F. Stress circuitry: mechanisms behind nervous and immune system communication that influence behavior. *Frontiers in Psychiatry*, 2023, 14, 1240783.
237. Touyarot K., Venero C., Sandi C. Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiology correlates. *Psychoneuroendocrinology*, 2004, 29, 290-305.
238. Unger M.S., Li E., Scharnagl L., Poupardin R., Altendorfer B., Mrowetz H., Hutter-Paier B., Weiger T.M., Heneka M.T., Attems J., Aigner L. CD8<sup>+</sup> T-cells infiltrate Alzheimer's disease brains and regulate neuronal - and synapse-related gene expression in APP-PS1 transgenic mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2020, 89, 67-86.
239. Wang H., He Y., Sun Z., Ren S., Liu M., Wang G., Yang J. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. *Journal of Neuroinflammation*, 2022, 19, 1, 132.
240. Werner H., LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: Physiological and pathological aspects. *European Neuropsychopharmacology*, 2014, 24, 1947-1953.
241. Widman A.J., Cohen J.L., McCoy C.R., Unroe K.A., Glover M.E., Khan A.U., Bredemann T., McMahon L.L., Clinton S.M. Rats bred for high anxiety exhibit distinct fear-related coping behavior, hippocampal physiology, and synaptic plasticity-related gene expression. *Hippocampus*, 2019, 29, 10, 939-956.
242. Wolf S.A., Boddeke H.W., Kettenmann H. Microglia in physiology and disease. *Annual Reviews of Physiology*, 2017, 79, 619-643.
243. Wrona D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *Journal of Neuroimmunology*, 2006, 172, 1-2, 38-58.
244. Wrona D., Jurkowski M., Luszczowska D., Tokarski J., Trojnar W. The effects of lateral hypothalamic lesions on peripheral blood natural killer cell cytotoxicity in rats hyper- and hyporesponsive to novelty. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2003, 17, 453-461.
245. Wrona D., Jurkowski M.K., Tokarski J. Blood and spleen natural killer cell cytotoxicity after exposure to open field stress in rats: effect of spontaneous locomotor activity. *Journal of Neuroimmunology*, 2004, 150, 88-97.
246. Wrona D., Listowska M., Kubera M., Glac W., Grembecka B., Plucinska K., Majkutewicz I., Podlacha M. Effects of chronic desipramine pretreatment on open field-induced suppression of blood natural killer cell activity and cytokine response depend on the rat's behavioral characteristics. *Journal of Neuroimmunology*, 2014, 268, 13-24.
247. Wrona D., Majkutewicz I., Świątek G., Dunacka J., Grembecka B., Glac W. Dimethyl fumarate as the peripheral blood inflammatory mediators inhibitor in prevention of streptozotocin-induced neuroinflammation in aged rats. *Journal of Inflammation Research*, 2022, 15, 33-52.
248. Wrona D., Sukiennik L., Jurkowski M.K., Jurkowlaniec, E., Glac W., Tokarski J. Effects of amphetamine on NK-related cytotoxicity in rats differing in locomotor reactivity and social position. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2005, 19, 69-77.
249. Wu M., Zhang M., Yin X., Chen K., Hu Z., Zhou Q., Cao X., Chen Z., Liu D. The role of pathological tau in synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*, 2021, 10, 45.
250. Xie M., Huang Y., Cai W., Zhang B., Huang H., Li Q., Qin P., Han J. Neurobiological Underpinnings of Hyperarousal in Depression: A Comprehensive Review. *Brain Sciences*, 2024, 14, 1, 50.

251. Xu J., Wang B., Ao H. Corticosterone effects induced by stress and immunity and inflammation: mechanisms of communication. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2025, 16, 1448750.
252. Yang Y., Bagyinszky E., Soo S. Presenilin-1 (PSEN1) mutation: clinical phenotypes beyond Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24, 8417.
253. Yu H., Wu J. Amyloid- $\beta$ : a double agent in Alzheimer's disease? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 139, 111575.
254. Zegarra-Valdivia J., Arana-Nombera H., Perez-Fernandez L., del Rocio Casimiro M., Gallegos-Manayay V., del Rosario Oliva-Piscoya M., Alamo-Medina R., Abanto-Saldana E., Cruz-Ordinola M.C. Paredes-Manrique C., Chino-Vilca B. Insulin-like growth factor 1 impact on Alzheimer's disease: role in inflammation, stress and cognition. *Current Issues in Molecular Biology*, 2025, 47, 4, 233.
255. Zhang L., Chen Ch., Mak M.S.H., Lu J., Wu Z., Chen Q., Han Y., Li Y., Pi R. Advance of sporadic Alzheimer's disease animal model. *Medicinal Research Reviews*, 2020, 40, 1, 431-458.
256. Zhang T.R., Larosa A., Di Raddo M.E., Wong V., Wong A.S., Wong T.P. Negative memory engrams in the hippocampus enhance the susceptibility to chronic social defeat stress. *The Journal of Neuroscience*, 2019, 39, 38, 7576-7590.
257. Zhang W-H., Zhang J.Y., Holmes A., Pan B.X. Amygdala circuit substrates for stress adaptation and adversity. *Biological Psychiatry*, 2021, 89, 9, 847-856.
258. Zhao F., Siu J.J., Huan W., Askwith C., Cao L. Insulin modulates excitatory synaptic transmission and synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, 2019, 411, 237-254.
259. Zhao Q.F., Tan L., Wang H.F., Jiang T., Tan M.S., Tan L., Xu W., Li J.Q., Wang J., Lai T.J. Yu J.T. The prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: systemic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 2016, 190, 264-271.
260. Ziegler A.N., Levison S.W., Wood T.L. Insulin and IGF-1 receptor signaling in neural-stem-cell homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, 2015, 11, 161-170.

## **8. Oświadczenia współautorów**

### **8.1. Oświadczenia do Publikacji 1**

mgr Joanna Dunacka

Gdańsk, 16.09.25r.

Pracownia Neurobiologii

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka

Wydział Biologii

Uniwersytet Gdański

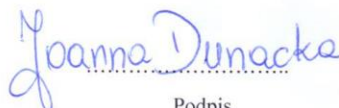
### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J., Świątek G., Wrona D. High behavioral reactivity to novelty as a susceptibility factor for memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation as a rat model of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25 (21): 11562;

polegał na:

1. współdziałanie w zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu eksperymentu tj. współdziałanie w wykonaniu testu nowości, testu uniesionego labiryntu krzyżowego, testu otwartego jasno oświetlonego pola, testu labiryntu wodnego Morrisa; przeprowadzaniu operacji stereotaktycznej, implantacji kaniul do komór bocznych mózgu i podaniu związków do tej struktury mózgowej w celu indukcji modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera; współdziałanie w oznaczeniu stężenia interleukiny-6, interleukiny-10 oraz kortykosteronu w osoczu; współdziałanie w wykonaniu analizy hematologicznej i cytometrycznej; wykonaniu analizy immunohistochemicznej w celu określenia liczby komórek aktywowanych mikrogleju i złogów  $\beta$ -amyloidu w ośrodkowym układzie nerwowym;
2. współdziałanie w analizie oraz interpretacji otrzymanych danych;
3. przygotowaniu rycin;
4. napisaniu treści wstępnej wersji pracy;
5. współdziałanie w odpowiadaniu na uwagi recenzentów;
6. współdziałanie w pozyskaniu funduszy na badania.



Podpis

mgr Grzegorz Świątek  
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 21.07.25r.

#### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J., Świątek G., Wrona D. High behavioral reactivity to novelty as a susceptibility factor for memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation as a rat model of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25 (21): 11562;

polegał na:

1. przeprowadzeniu części eksperymentu tj. współudziale w wykonaniu testów behawioralnych (test otwartego jasno oświetlonego pola, test uniesionego labiryntu krzyżowego, test labiryntu wodnego Morrisa).

  
Podpis

dr hab. Danuta Lewandowska (Wrona), prof. UG

Gdańsk, 16.09.25r.

Pracownia Neurobiologii

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka

Wydział Biologii

Uniwersytet Gdański

### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J., Świątek G., Wrona D. High behavioral reactivity to novelty as a susceptibility factor for memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation as a rat model of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25 (21): 11562; doi:10.3390/ijms252111562.

polegał na:

1. współdziałanie w zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu eksperymentu tj. współdziałanie w wykonaniu testu nowości oraz testu uniesionego labiryntu krzyżowego; pobraniu krwi przez punkcję serca oraz wyizolowaniu mózgu, grasicy, śledziony; współdziałanie w oznaczeniu stężenia interleukiny-6, interleukiny-10 oraz kortykosteronu w osoczu; oraz współwykonaniu analizy hematologicznej i cytometrycznej;
2. współdziałanie w analizie oraz interpretacji otrzymanych danych;
3. korekcie wstępnej wersji pracy;
4. opiece merytorycznej nad doktorantką;
5. współdziałanie w odpowiadaniu na uwagi recenzentów;
6. współdziałanie w pozyskaniu funduszy na badania.



Podpis

## **8.2. Oświadczenia do Publikacji 2**

mgr Joanna Dunacka  
Pracownia Neurobiologii  
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 16.09.25r.

### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J., Grembecka B., Majkutewicz I., Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 treatment enhances working and reference memory by reducing neuroinflammation and amyloid beta deposition in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*, 2025, 8 (4): 527;

polegał na:

1. współdziałanie w zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu eksperymentu tj. współdziałanie w przeprowadzeniu operacji stereotaktycznych, implantacji kaniul do komór bocznych mózgu oraz podaniu związków mających na celu indukcję modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera oraz przeprowadzeniu terapii; współdziałanie w wykonaniu testu labiryntu wodnego Morrisa, współdziałanie w wykonaniu analizy immunohistochemicznej w celu określenia liczby komórek aktywowanych mikrogleju i złogów  $\beta$ -amyloidu w ośrodkowym układzie nerwowym;
2. współdziałanie w analizie oraz interpretacji otrzymanych danych;
3. przygotowaniu rycin;
4. napisaniu treści wstępnej wersji pracy;
5. współdziałanie w odpowiadaniu na uwagi recenzentów;
6. współdziałanie w pozyskaniu funduszy na badania.



Podpis

dr Beata Grembecka  
Pracownia Neurobiologii  
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 16.09.25r.

#### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J., Grembecka B., Majkutewicz I., Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 treatment enhances working and reference memory by reducing neuroinflammation and amyloid beta deposition in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*, 2025, 8 (4): 527;

polegał na:

1. przeprowadzeniu części eksperymentu tj. współdziałale w wykonaniu operacji stereotaktycznych i implantacji kaniul do komór bocznych mózgu;
2. współdziałale w odpowiadaniu na uwagi recenzentów.



Podpis

dr Irena Majkutewicz  
Pracownia Neurobiologii  
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 16.09.25r.

#### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J, Grembecka B, Majkutewicz I, Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 treatment enhances working and reference memory by reducing neuroinflammation and amyloid beta deposition in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*, 2025, 8 (4): 527;

polegał na:

1. przeprowadzeniu części eksperymentu tj. współudziale w wykonaniu analizy immunohistochemicznej w celu określenia liczby komórek aktywowanych mikrogleju i złożeń  $\beta$ -amyloidu w ośrodkowym układzie nerwowym;
2. współudziale w odpowiadaniu na uwagi recenzentów.



Podpis

dr hab. Danuta Lewandowska (Wrona), prof. UG

Gdańsk, 16.09.25r.

Pracownia Neurobiologii

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka

Wydział Biologii

Uniwersytet Gdański

### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J, Grembecka B, Majkutewicz I, Wrona D. Central insulin-like growth factor-1 treatment enhances working and reference memory by reducing neuroinflammation and amyloid beta deposition in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*, 2025, 8 (4): 527; <https://doi.org/10.3390/ph18040527>

polegał na:

1. współudziale w zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu eksperymentu, tj. współudziale w wykonaniu testu labiryntu wodnego Morrisa;
2. współudziale w analizie oraz interpretacji otrzymanych danych;
3. korekcie wstępnej wstępnej wersji manuskryptu;
4. opiece merytorycznej nad doktorantką;
5. współudziale w odpowiadaniu na uwagi recenzentów;
6. współudziale w pozyskaniu funduszy na badania.



Podpis

### **8.3. Oświadczenia do Publikacji 3**

mgr Joanna Dunacka

Gdańsk, 16.09.25r.

Pracownia Neurobiologii

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka

Wydział Biologii

Uniwersytet Gdański


### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J., Grembecka B., Wrona D. Central Insulin-Like Growth Factor-1-Induced Anxiolytic and Antidepressant Effects in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease Are Associated with the Peripheral Suppression of Inflammation. *Cells*, 2025, 14, (15), 1189;

polegał na:

1. współdziałał w zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu eksperymentu tj. współdziałał w wykonaniu testu preferencji spożycia sacharozy, testu uniesionego labiryntu krzyżowego; współdziałał w przeprowadzaniu operacji stereotaktycznej, implantacji kaniul do komór bocznych mózgu i podaniu związków do tej struktury mózgowej w celu indukcji modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera oraz przeprowadzeniu terapii; współdziałał w oznaczeniu stężenia interleukiny-6, interleukiny-10 oraz kortykosteronu w osoczu; współdziałał w wykonaniu analizy hematologicznej i cytometrycznej;
2. współdziałał w analizie oraz interpretacji otrzymanych danych;
3. przygotowaniu rycin;
4. napisaniu treści wstępnej wersji pracy;
5. współdziałał w odpowiadaniu na uwagi recenzentów;
6. współdziałał w pozyskaniu funduszy na badania.



Podpis

dr Beata Grembecka  
Pracownia Neurobiologii  
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 16.09.25r.

#### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J., Grembecka B., Wrona D. Central Insulin-Like Growth Factor-1-Induced Anxiolytic and Antidepressant Effects in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease Are Associated with the Peripheral Suppression of Inflammation. *Cells*, 2025, 14, (15), 1189;

polegał na:

1. przeprowadzeniu części eksperymentu tj. współdziałanie w wykonaniu operacji stereotaktycznych i implantacji kaniul do komór bocznych mózgu;
2. współdziałanie w odpowiadaniu na uwagi recenzentów.



Podpis

dr hab. Danuta Lewandowska (Wrona), prof. UG

Gdańsk, 16.09.25r.

Pracownia Neurobiologii

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka

Wydział Biologii

Uniwersytet Gdański

### Oświadczenie o wkładzie w publikację

Oświadczam, że mój wkład w publikację:

Dunacka J., Grembecka B., Wrona D. Central Insulin-Like Growth Factor-1-Induced Anxiolytic and Antidepressant Effects in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease Are Associated with the Peripheral Suppression of Inflammation. *Cells*, 2025, 14, (15), 1189; doi: 10.3390/cells14151189.

polegał na:

1. współudziale w zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu eksperymentu tj. współudziale w wykonaniu testu preferencji spożycia sacharozy i testu uniesionego labiryntu krzyżowego; pobraniu krwi przez punkcję serca oraz wyizolowaniu mózgu, grasicy, śledziony; współudziale w oznaczeniu stężenia interleukiny-6, interleukiny-10 oraz kortykosteronu w osoczu; oraz współwykonaniu analizy hematologicznej i cytometrycznej;
2. współudziale w analizie oraz interpretacji otrzymanych danych;
3. korekcie wstępnej wersji manuskryptu;
4. opiece merytorycznej nad doktorantką;
5. współudziale w odpowiadaniu na uwagi recenzentów;
6. współudziale w pozyskaniu funduszy na badania.

Podpis