

УДК 616.894-053.8; 611.4; 571.27
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.32-38

Анастасія НЕФЬОДОВА¹, асп.
ORCID ID: 0000-0003-3440-3687
e-mail: nefodova.av@gmail.com

Марія РУДИК¹, канд. біол. наук, доц.
ORCID ID: 0000-0003-1252-885X
e-mail: rudyk_marie@knu.ua

Роман ДОВГИЙ¹, канд. біол. наук, асист.
ORCID ID: 0000-0003-1189-4479
e-mail: romandovgiy@gmail.com

Лариса СКИВКА¹, д-р біол. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0002-2171-1085
e-mail: realmed@ukr.net

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОРГАНОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ У ЩУРІВ ІЗ РІЗНИМИ МОДЕЛЯМИ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Вступ. Хвороба Альцгеймера (ХА) – це прогресуючий нейродегенеративний розлад, який уражає мільйони людей у всьому світі. Усе більше стає доказів того, що антигени центральної нервової системи можуть взаємодіяти з лімфоцитами й антигенпрезентуючими клітинами через менингеальні лімфатичні шляхи. Це свідчить про те, що як уроджені, так і адаптивні імунні реакції можуть брати участь у розвитку нейродегенеративних захворювань. Однією з ознак старіння імунної системи є інволюція тимуса. Зниження функції тимуса призводить до зменшення продукції наївних Т-лімфоцитів, впливаючи на адаптивну імунну відповідь, що призводить до погіршення імунного нагляду. Відсутня ефективна імунна відповідь провокує розвиток нейрозапалення через тривалу активацію імунних клітин, що і є головною ознакою ХА.

Метою представленої роботи було порівняльне оцінювання реакції лімфоїдних органів у щурів із двома найбільш широко застосовуваними інтервенційними моделями ХА, індукованими інтрагіпокампульним введенням Аβ1-40 та Аβ25-35.

Методи. У дослідженні використовували самців щурів лінії Wistar. За контроль брали інтактних і псевдооперованих тварин. Розвиток захворювання підтверджували харчовою поведінкою, вимірюванням ваги тіла й органів, оцінкою когнітивних порушень у поведінковому тесті "Лабіринт Барнса", а також за рівнем загибелі дофамінергічних нейронів (ДА). Показники гемограми досліджували на момент завершення експерименту (37-й день). Оцінювали відносну кількість лімфоцитів. Провели кореляційний аналіз Спірмена між органомеричними показниками тимуса й селезінки та кількісними змінами циркулюючих лімфоцитів у тварин із різними моделями ХА.

Результати. У щурів з Аβ1-40-ХА зареєстровано підвищення спленічного індексу, що свідчить про помірну спленомегалію. Зареєстровано статистично вірогідне збільшення абсолютної кількості лімфоцитів зі зменшенням їхньої відносної кількості й виразним моноцитозом, а також сильну негативну кореляцію між спленічним індексом і кількістю циркулюючих лімфоцитів. У тварин з Аβ25-35-ХА показники спленічного індексу не відрізнялися від таких у тварин контрольних груп.

Висновки. Розвиток хвороби Альцгеймера супроводжується зміною вагових індексів органів лімфатичної системи, залучених у презентацію антигену й генерацію адаптивної імунної відповіді, а також у кліренс антигенного матеріалу з головного мозку, зокрема й спричиненого нейродегенерацією і нейрозапаленням. Порушення кореляційних зв'язків між кількісними характеристиками циркулюючих лімфоцитів і ваговими індексами первинних і вторинних лімфоїдних органів може бути пов'язане з порушеннями процесів імунопоезу й імуногенезу.

Ключові слова: хвороба Альцгеймера, нейрозапалення, лімфоїдні органи, тимус, селезінка.

Вступ

Хвороба Альцгеймера (ХА) – це хронічний нейродегенеративний розлад, пов'язаний із прогресуючим зниженням когнітивних функцій, синаптичною дисфункцією, втратою пам'яті. ХА стала серйозною глобальною проблемою охорони здоров'я, оскільки вражає мільйони людей у всьому світі. Нейропатологічні ознаки ХА включають позаклітинне накопичення бета-амілоїдних (Аβ) бляшок і внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків, що складаються із гіперфосфорильованого білка тау (Rostagno, 2022). Зростаюча кількість доклінічних і клінічних досліджень переконливо доводить, що як уроджений, так і адаптивний компоненти імунної системи відіграють важливу роль у етіології та патогенезі ХА. Розпізнавання неправильно складених Аβ і тау-ефекторами вродженого імунітету може викликати серію складних імунних реакцій, наслідком яких є нейрозапалення як одна із причин нейродегенерації (Wu et al., 2021). Однак шляхи презентації антигенів головного мозку ефекторам адаптивного імунітету

й реакція лімфатичної системи в цілому в умовах розвитку ХА залишаються недослідженими.

Лімфатична система – це розгалужена і складна мережа судин і організованих лімфоїдних утворів, яка відіграє ключову роль у підтримці гомеостазу, імунному нагляді та сприяє очищенню позаклітинного простору від тканинного дебрису (Ding et al., 2021). Традиційно мозок вважали імунологічно привілейованим органом, захищеним від взаємодії із позамозковими компонентами імунної системи гематоенцефалічним бар'єром (ГЕБ). Однак останні дослідження виявили динамічну взаємодію між мозком та імунною системою на периферії від нього. Розвиток нейрозапалення, а саме активація мікроглії та астроцитів, ключових імунних клітин у ЦНС, сприяє виникненню запального середовища, провокуючи каскад подій, які впливають на захисну функцію лімфи. Результати численних експериментальних спостережень свідчать про існування гліально-лімфатичної системи в мозкових оболонках (Natale et al., 2021). Ця система, що

© Нефьодова Анастасія, Рудик Марія, Довгий Роман, Сківка Лариса, 2023

включає менінгеальні лімфатичні судини, відіграє вирішальну роль у скавенджингу та імунному нагляді в центральній нервовій системі (ЦНС) (Aspelund et al., 2015; Mesquita et al., 2018).

Підкреслюється потенційна участь активації астроцитів у модулюванні менінгеального лімфатичного дренажу. Така дренажна система сприяє видаленню потенційно нейротоксичних речовин, включаючи аномально згорнуті білки, причетні до патофізіології ХА. Результати нещодавніх досліджень свідчать про те, що менінгеальні лімфатичні шляхи сприяють обміну імунними клітинами між ЦНС і периферичними лімфоїдними тканинами, впливаючи на нейрозапальні реакції (Louveau et al., 2018; Mesquita et al., 2021). Це свідчить на користь залучення первинних і вторинних лімфоїдних органів у патофізіологію ХА. Проте літературні дані стосовно цього питання досить обмежені. Відомо, зокрема, що майже 40–60 % мозкового Аβ витікає у периферичну систему для очищення.

Однак де і як циркулюючий Аβ очищується на периферії, залишається незрозумілим. Висловлюється припущення, що кліренс периферичного Аβ може здійснювати селезінка, яка функціонує одночасно як вторинний лімфоїдний орган і фільтр крові. Показано, що спленектомія посилює когнітивні розлади у мишей із ХА (Yu et al., 2021). На генетичній моделі ХА показано, що розвиток когнітивних порушень у тварин супроводжувався спленомегалією (Muntsant, & Giménez-Llort, 2022). Участь первинних лімфоїдних органів, таких як тимус, у патофізіології ХА практично не досліджена, хоча в численних оглядових публікаціях підкреслюється виняткова роль старіння тимуса в підвищенні ризику розвитку ХА. З віком кількість наївних Т-клітин зменшується, а частка Т-клітин пам'яті зростає. Цитокіни, що виділяються старими Т-клітинами, збільшують проникність ГЕБ, що посилює прозапальну активацію інших локальних імунних клітин або їх надходження в мозок. Саме серед старих Т-клітин пам'яті виявляють велику кількість так званих сенільних клітин, або клітин-зомбі, які є джерелом прозапальних цитокинів та ініціаторами вікового мета-запалення (Guo et al., 2023).

Тваринні моделі є незамінним інструментом для дослідження патофізіології ХА (Peng et al., 2020; Canet et al., 2023). Метою цієї роботи було порівняльне оцінювання реакції лімфоїдних органів у щурів із двома найширше застосовуваними інтервенційними моделями ХА, індукованими інтрагіпокампальним введенням Аβ1-40 та Аβ25-35.

Методи

Дослідження проводили на самцях щурів лінії Wistar віком 14 місяців (300–500 г) розведення віварію Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварин утримували у стандартних умовах із доступом до води та їжі *ad libitum*. Протокол утримання тварин був затверджений Комітетом з біоетики Університету відповідно до вказівок Закону про захист тварин. Усі дослідження на тваринах проводили відповідно до норм, установлених Законом України № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження", а також стандартів Конвенції з біоетики Ради Європи "Європейська конвенція для захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" (1997), загальних етичних принципів роботи з дослідними тваринами, затверджених Першим національним конгресом із біоетики України (вересень 2001 р.),

та інших міжнародних угод і національного законодавства у цій галузі.

Перед початком експерименту тварини були рандомно розподілені на 4 групи: I (n = 10) – інтактні тварини, що утримувались у стандартних умовах віварію й не піддавались жодним маніпуляціям; II (n = 10) – хибнооперовані; III (n = 10) – щури з Аβ1-40-індукованою ХА (Аβ1-40-ХА); IV (n = 10) – щури з Аβ25-35-індукованою ХА (Аβ25-35-ХА). Рандомізацію виконували за допомогою функції "RAND ()" в Microsoft Excel.

Наркотизацію щурів проводили сумішшю кетаміну (75 мг/кг), розведеного у стерильній воді для ін'єкцій ("Sigma", США), і 2 %-го розчину ксилазину (100 мкл/щур, "Alfasan International B.V", Нідерланди). Суміш вводили інтраперитонеально загальним об'ємом 1 мл. Інтрагіпокампальне введення Аβ виконували у стереотаксі. Для ін'єкцій попередньо робили трепанацію черепа для введення ін'єкційної голки. Трепанацію проводили від точки перетину сагітального шва і брегми: 2 мм дистально, 2 мм латерально і 3,5 мм углиб. Розчинені агрегати Аβ1-40 або Аβ25-35 набирали у мікроін'єктор і опускали його кінчик у трепанаційний отвір. Загальний об'єм суспензії становив 10 мкл на тварину. Інфузія відбувалась протягом 5 хв зі швидкістю 0,5 мкл/хв (кожні 5 секунд). Після введення Аβ кінчик мікроін'єктора залишався у тканині мозку 4 хв, потім його діставали й накладали кожній тварині шви на м'які тканини голови. Контрольним тваринам (хибнооперованим) проводили аналогічну хірургічну операцію, проте замість дослідної суспензії Аβ1-40 або Аβ25-35 вводили розчинник у тому самому об'ємі.

Розвиток хвороби різного ступеню констатували у тварин з обома моделями за результатами оцінювання короткотривалої та довготривалої просторової пам'яті, а також когнітивної гнучкості у лабіринті Барнса, і за рівнем загибелі дофамінергічних нейронів, який оцінювали методом імуногістохімії (Nefodova, 2023).

Концентрацію розчинної форми Аβ (Cloud Clone Corporation, Houston, TX, США) і тау-протеїну (Elabscience, Houston, TX, США) у гомогенатах гіпокампу щурів із ХА визначали методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем (R & D Systems, USA) відповідно до рекомендацій виробників. Для уникнення протеолітичної деградації бета-амілоїду в гомогенаті використовували комплекс інгібіторів протеаз і фосфатаз (Sigma, США).

Гематологічні показники визначали за допомогою аналізатора "Particle Counter Model PCE 210" (ERMA, Японія), адаптованого для експериментів із використанням клітин крові щурів і мишей.

Реакцію органів імунної системи щурів – селезінки, тимуса – оцінювали за відносною масою органа (ваговим індексом), який розраховували за формулою:

$$\text{маса органа} / \text{загальна маса тварини}.$$

Нормальність розподілу даних перевіряли з використанням тесту Шапіро – Вілка. У випадку нормального розподілу дані представляли як середнє $\pm$ SD, у випадку розподілу, відмінного від нормального, – як М (25 %; 75 %), де М – медіана; (25 %; 75 %) – інтерквартильний інтервал між 25-м і 75-м процентилями. Статистичні відмінності між групами порівняння у разі нормального розподілу даних були розраховані за допомогою дисперсійного аналізу із постхок-тестом Тьюкі. У разі розподілу, відмінного від нормального, для порівняння застосовували тест Краскела – Уолліса. При $p < 0,05$ відмінності вважали достовірними.

Кореляційний тест Спірмена використовували для визначення статистичних зв'язків між значеннями вагових індексів селезінки, тимуса і значеннями відносної кількості лімфоцитів.

Результати

Раніше ми повідомляли, що порівняльне оцінювання когнітивних характеристик у тварин з Аβ1-40-ХА та Аβ25-35-ХА виявило значно виразніше відтворення патологічних змін, притаманних клінічному перебігу захворювання на моделі Аβ1-40-ХА (Nefodova, 2023). Порівняльний аналіз органомеричних показників селезінки й тимуса у тварин із зазначеними моделями проводили за їхньою харчовою і питною поведінкою та змінами ваги на

момент завершення експерименту, оскільки ХА на пізніх стадіях може бути властива хахексія (Minaglia et al., 2019). Хахексія, своєю чергою, супроводжується змінами імуні-метаболізму, які позначаються на органомеричних характеристиках первинних і вторинних лімфоїдних органів (Baazim et al., 2021).

Харчову поведінку аналізували за середньодобовим об'ємом спожитого корму й води. Спостерігали незначне зменшення об'ємів спожитого корму й води у тварин з індукованою ХА, наслідком чого стало зменшення середньої ваги дослідних тварин, статистично вірогідне лише у випадку 1-40-Аβ-індукованої моделі (табл. 1).

Таблиця 1

Харчова й питна поведінка у тварин з Аβ 1-40- та Аβ 25-35-індукованою хворобою Альцгеймера

Критерій	Інтактні тварини, n = 10	Хибно оперовані тварини (плацебо), n = 10	1-40-Аβ-індукована модель, n = 10	25-35-Аβ-індукована модель, n = 10
1	2	3	4	5
Зміна ваги на момент завершення дослідження (32 доба після операції), %	106,3 ± 1,5	104,5 ± 4,8	94,3 ± 3,9 ^{1,2}	98,7 ± 3,9
Харчова поведінка				
Середній об'єм спожитого корму за добу, мг	22,3 ± 1,1	27,5 ± 3,5 ¹	21,2 ± 2,5 ²	24,3 ± 2,7
Середній об'єм споживаної води за добу, мл	39,3 ± 3,8	44,1 ± 3,1	37,1 ± 2,2 ²	39,1 ± 3,2

Примітка: ¹ – $p < 0,05$ порівняно з показником інтактних тварин; ² – $p < 0,05$ порівняно з показником хибно оперованих тварин.

Одним із критеріїв відтворення патологічного стану у тварин з інтервенційними моделями ХА є присутність Аβ і тау-протеїну у гіпокампі. За результатами наших досліджень у тварин з обома моделями на момент закінчення експерименту цей показник характеризувався значною індивідуальною варіабельністю, що може

пояснюватися штучним походженням аномальних протеїнів, на відміну від їх накопичення внаслідок мутацій у генетичних моделях хвороби. Концентрація Аβ і тау-протеїну була статистично вірогідно підвищена у щурів з обома моделями ХП (рис. 1).

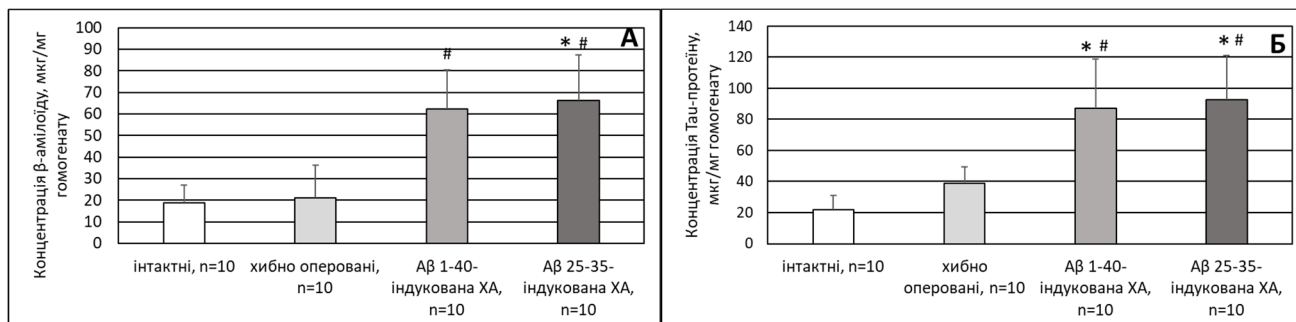


Рис. 1. Концентрація β-амілоїду (А), тау-протеїну (Б) в гомогенаті гіпокампа щурів з Аβ 1-40-індукованою ХА та Аβ 25-35-індукованою ХА, n = 10 у кожній групі тварин

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з показником інтактних тварин, # – $p < 0,05$ порівняно з показником хибно оперованих тварин.

Селезінка є найбільшим вторинним (периферичним) лімфоїдним органом, який служить депо для еритроцитів, характеризується переважанням індукції гуморальної адаптивної імунної відповіді й залучений, як зазначено вище, у кліренс Аβ. Збільшення ваги селезінки може свідчити про активацію гуморальної імунної відповіді, зокрема й автоімунного генезу, а також про посилення кліренсу імунних комплексів, до складу яких потенційно може входити Аβ. Зменшення ваги селезінки може вказувати на зміни в її клітинному складі з експортом клітин у сусідні тканинні компартменти, передусім у

черевну порожнину, за наявності запального процесу. У щурів з Аβ1-40-ХП зареєстровано підвищення спленічного індексу, що свідчить про помірну сплено-мегалію і узгоджується з експериментальними даними, отриманими іншими дослідницькими групами (Yu et al., 2021; Munsant, & Giménez-Llort, 2022). У тварин з Аβ25-35-ХП показники спленічного індексу не відрізнялися від таких у тварин контрольних груп, що свідчить про меншу релевантність цієї моделі щодо відтворення реакції лімфоїдних органів в умовах розвитку ХА (рис. 2 А).

Незначне зменшення вагового індексу тимуса спостерігалось у хибно оперованих тварин і в обох групах щурів із ХА (рис. 2 Б). Зменшення маси та клітинності тимуса асоціюється з віковим зменшенням генерації Т-клітин, а також характерне для процесів системного

запалення, асоційованих із посиленням експорту зрілих Т-клітин на периферію (Zhang et al., 2022).

У тварин з Аβ25-35-ХП показники спленічного індексу не відрізнялися від таких у тварин контрольних груп, що свідчить про меншу релевантність цієї моделі щодо відтворення реакції лімфоїдних органів в умовах розвитку ХА.

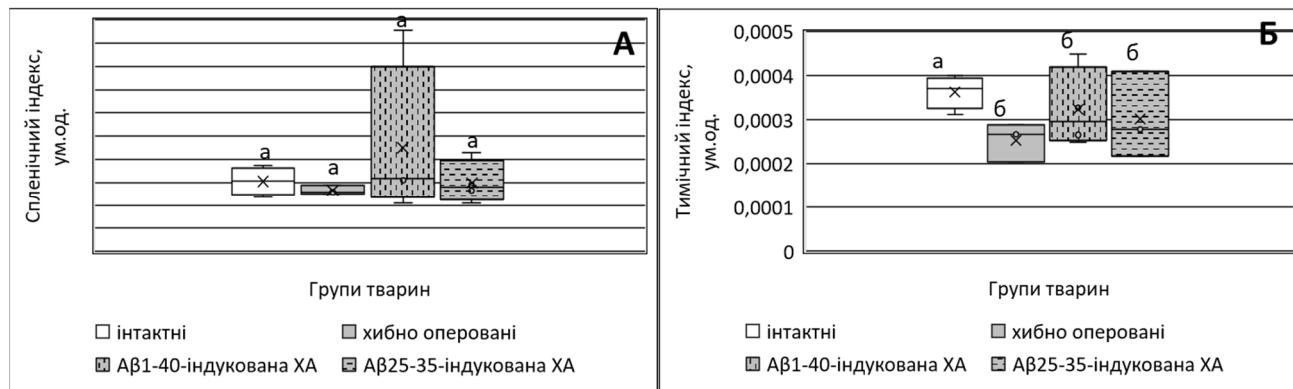


Рис. 2. Вагові індекси селезінки (А), тимуса (Б) у щурів з Аβ1-40- та Аβ25-35-індукованою хворобою Альцгеймера, n = 10 у кожній групі тварин

Примітка: різні літери позначають статистично вірогідні ($p < 0,05$) відмінності між групами порівняння.

Гематологічні зміни, властиві клінічній формі спорадичної ХА, також, згідно з результатами наших досліджень, відтворювалися більшою мірою у щурів з Аβ1-40-ХА і полягали у статистично вірогідному зменшенні абсолютної і відносної кількості лімфоцитів і моноцитів з одночасною виразною нейтрофілією. У тварин з Аβ1-40-ХА ми зареєстрували статистично вірогідне збільшення абсолютної кількості лімфоцитів зі зменшенням відносної їх кількості й виразним моноцитозом. Коливання кількості лімфоцитів периферичної крові напряму пов'язані з функцією селезінки й тимуса. Збільшення загальної кількості лімфоцитів може відбуватися за рахунок міграції із селезінки В-клітин та/або експорту на периферію зрілих тимоцитів. Зменшення кількості лімфоцитів може бути асоційованим із порушенням дозрівання Т-клітин та/або рециркуляції зрілих В-клітин селезінки (Berrón-Ruiz et al., 2016).

Для аналізу взаємозв'язку між органометричними показниками тимуса й селезінки та кількісними змінами циркулюючих лімфоцитів у тварин з різними моделями ХА ми провели кореляційний аналіз Спірмена (рис. 3), який виявив таке. У інтактних тварин виявлено сильний позитивний зв'язок між тимічним індексом і відносною кількістю лімфоцитів периферичної крові, що ілюструє фізіологічну залежність збільшення кількості лімфоцитів від проліферації тимоцитів (рис. 3 А). Залежність між спленічним індексом і кількістю циркулюючих лімфоцитів

була сильною і негативною, що ілюструє відсутність у нормі активації адаптивної гуморальної імунної відповіді, пов'язаної з посиленням хомінгом циркулюючих наївних В-клітин у білій пульпі селезінки зі збільшенням її ваги (рис. 3 Д). У хибно оперованих тварин кореляційна залежність між тимічним індексом і кількістю лімфоцитів не відрізнялася від такої в інтактних тварин (рис. 3 Б), однак спостерігалася втрата залежності між спленічним індексом і часткою циркулюючих лімфоцитів (рис. 4 Е). Це явище можна пояснити віддаленими наслідками нейрохірургічного втручання у цих тварин у формі низькоінтенсивного системного запалення, які були описані нами раніше (Nefodova et al., 2022). У тварин з Аβ1-40-ХА спостерігали сильний негативний кореляційний зв'язок між тимічним індексом і часткою циркулюючих лімфоцитів (рис. 3 В), що може засвідчувати посилену жирову дегенерацію органа, зумовлену розвитком патологічного стану, яка не спричиняє зміну ваги органа, але супроводжується зменшенням проліферації та експорту тимоцитів на периферію. Зв'язок кількості лімфоцитів із ваговим показником селезінки втрачався, що може бути пов'язане зі змінами ваги, зумовленими її залученням у кліренс антигенного матеріалу з головного мозку (рис. 4 Ж). У щурів з Аβ25-35-ХА спостерігалися кореляційні закономірності, подібні до таких у тварин з Аβ1-40-ХА, але менш виразні.

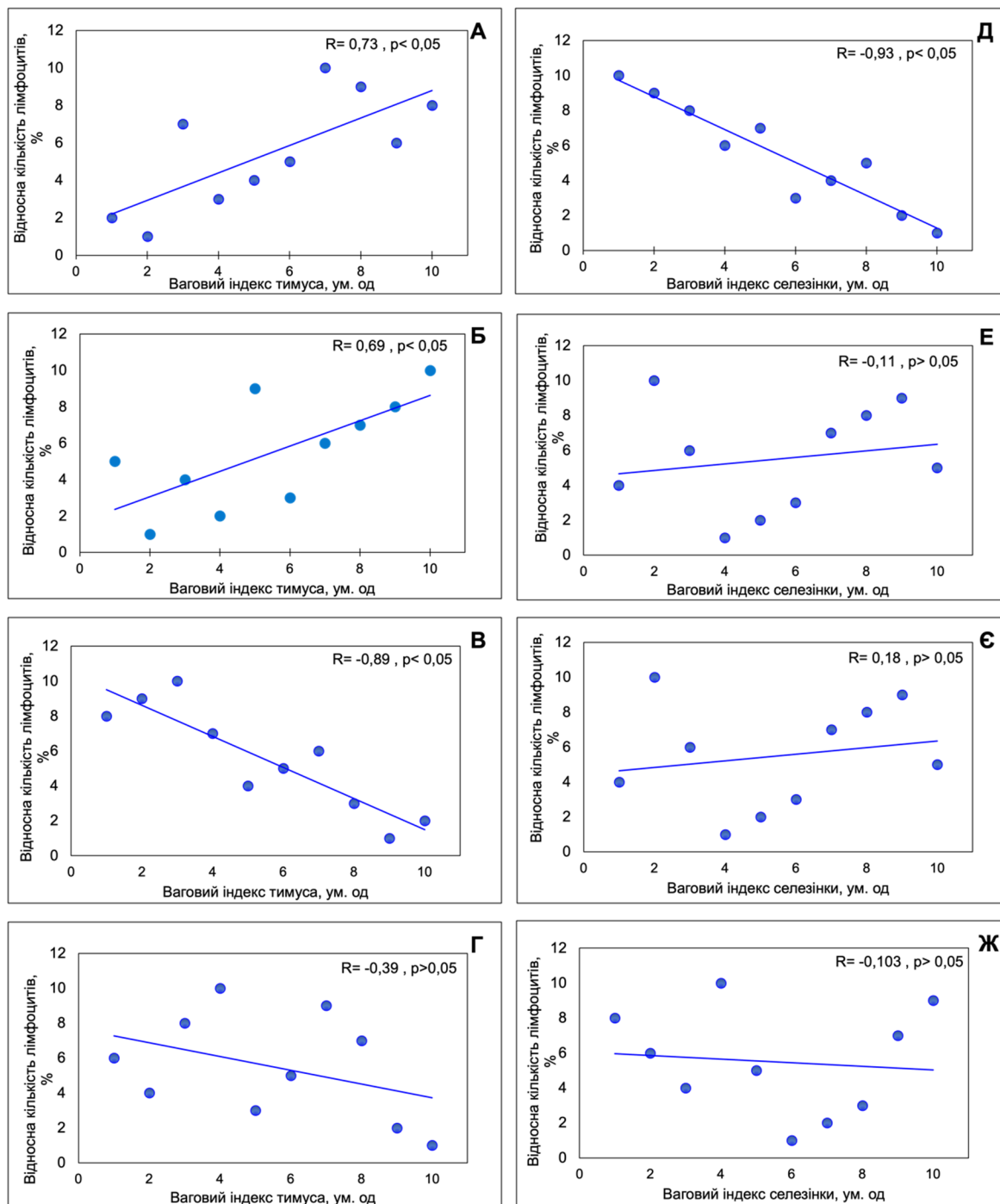


Рис. 3. Кореляція між відносною кількістю лімфоцитів і ваговим індексом тимуса й селезінки:

А – контрольна група; Б – хібно оперовані тварини; В – щури з А β 1-40-індукованою ХА;
 Г – щури з А β 25-35-індукованою ХА;
 Д – контрольна група; Е – хібно оперовані тварини; Є – щури з А β 1-40-індукованою ХА;
 Ж – щури з А β 25-35-індукованою ХА

Дискусія і висновки

Отже, за результатами наших спостережень розвитку хвороби Альцгеймера супроводжується зміною вагових індексів органів лімфатичної системи, залучених у презентацію антигену й генерацію адаптивної імунної відповіді, а також у кліренс антигенного матеріалу з головного мозку, зокрема й спричиненого нейродегенерацією й нейрозапаленням. Порухення кореляційних зв'язків між кількісними характеристиками циркулюючих

лімфоцитів і ваговими індексами первинних і вторинних лімфоїдних органів, яке було притаманне інтактним тваринам, у щурів із ХА вказує на те, що розвиток цього патологічного стану може бути асоційований із порушеннями процесів імунорезу (утворення зрілих наївних клітин імунної системи) та імуногенезу (активації імунної відповіді). Виявлений феномен демонструє нові трансляційні можливості тваринних моделей ХА і потребує додаткового вивчення.

Внесок авторів: Анастасія Нефьодова – виділення лімфатичних органів; Марія Рудик – імуноферментний аналіз і статистична обробка результатів дослідження; Роман Довгий – оцінка харчової і питної поведінки тварин; Лариса Сквіка – формулювання концепції дослідження, аналіз та узагальнення результатів, написання рукопису.

Подяки, джерела фінансування. Автори висловлюють подяку студентам-бакалаврам і магістрам ННЦ "Інститут біології та медицини", які взяли участь у цьому дослідженні, а також Віталіні Святецькій за допомогу в проведенні хірургічних маніпуляцій.

Дослідження проведено в рамках НДР № 19ДП036-03.

Список використаних джерел

- Aspelund, A., Antila, S., Proulx, S. T., Karlén, T. V., Karaman, S., Detmar, M., Wiig, H., & Alitalo, K. (2015). A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *Journal of Experimental Medicine*, 212(7), 991–999. <https://doi.org/10.1084/jem.20142290>
- Baazim, H., Antonio-Herrera, L., & Bergthaler, A. (2021). The interplay of immunology and cachexia in infection and cancer. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00624-w>
- Berrón-Ruiz, L., López-Herrera, G., Ávalos-Martínez, C. E., Valenzuela-Ponce, C., Ramírez-San Juan, E., Santoyo-Sánchez, G., Mújica Guzmán, F., Espinosa-Rosales, F. J., & Santos-Argumedo, L. (2016). Variations of B cell subpopulations in peripheral blood of healthy Mexican population according to age: Relevance for diagnosis of primary immunodeficiencies. *Allergologia Et Immunopathologia*, 44(6), 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.05.003>
- Canet, G., Zussy, C., Hernandez, C., Maurice, T., Desrumaux, C., & Givalois, L. (2023). The pathomimetic oAβ25–35 model of Alzheimer's disease: Potential for screening of new therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 108398. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108398>
- Ding, D., Wang, X., Li, Q., Li, L., & Wu, J. (2021). Research on the glial-lymphatic system and its relationship with alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.605586>
- Guo, L., Li, X., Gould, T., Wang, Z.-Y., & Cao, W. (2023). T-cell aging and Alzheimer's disease. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1154699>
- Louveau, A., Herz, J., Alme, M. N., Salvador, A. F., Dong, M. Q., Viar, K. E., Herod, S. G., Knopp, J., Setliff, J. C., Lupi, A. L., Da Mesquita, S., Frost, E. L., Gaultier, A., Harris, T. H., Cao, R., Hu, S., Lukens, J. R., Smirnov, I., Overall, C. C., ... Kipnis, J. (2018). CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1380–1391. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0227-9>
- Mesquita, S. D., Louveau, A., Vaccari, A., Smirnov, I., Cornelison, R. C., Kingsmore, K. M., Contarino, C., Onengut-Gumuscu, S., Farber, E., Raper, D., Viar, K. E., Powell, R. D., Baker, W., Dabhi, N., Bai, R., Cao, R., Hu, S., Rich, S. S., Munson, J. M., ... Kipnis, J. (2018). Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 560(7717), 185–191. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0368-8>
- Mesquita, S. D., Papadopoulos, Z., Dykstra, T., Brase, L., Farias, F., Wall, M., Jiang, H., Kodira, C. D., De Lima, K. A., Herz, J., Louveau, A., Goldman, D. H., Salvador, A. F., Onengut-Gumuscu, S., Farber, E., Dabhi, N., Kennedy, T., Milam, M. G., Baker, W., ... Kipnis, J. (2021). Meningeal lymphatics affect microglia responses and anti-Aβ immunotherapy. *Nature*, 593(7858), 255–260. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03489-0>
- Minaglia, C., Giannotti, C., Boccardi, V., Mecocci, P., Serafini, G., Odetti, P., & Monacelli, F. (2019). Cachexia and advanced dementia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 10(2), 263–277. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12380>
- Muntsant, A., & Giménez-Llort, L. (2022). Crosstalk of Alzheimer's disease-phenotype, HPA axis, splenic oxidative stress and frailty in late-stages of dementia, with special concerns on the effects of social isolation: A translational neuroscience approach. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.969381>
- Natale, G., Limanagi, F., Busceti, C. L., Mastroiaco, F., Nicoletti, F., & Puglisi-Allegra, S. (2021). Glymphatic system as a gateway to connect neurodegeneration from periphery to CNS. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.639140>
- Nefedova, A. (2023). Microglial phagocytosis in rats with different models of alzheimer's disease. *Biotechnologia Acta*, 16(1), 57–66. <https://doi.org/10.15407/biotech16.01.057>
- Nefodova, A., Rudyk, M., Pasichnichenko, M., Dovhyi, R., Dovbychuk, T., Tolstanova, G., & Skivka, L. (2022). Pro-inflammatory effects of placebo neurosurgery in rats: age-related features. *General Surgery*, 2, 56–63. <https://doi.org/10.30978/gs-2022-2-56>
- Peng, H. B., Noh, K., Pan, S. R., Saldivia, V., Serson, S., Toscan, A., de Lannoy, I. A. M., & Pang, K. S. (2020). Human Amyloid-β40 Kinetics after Intravenous and Intracerebroventricular Injections and Calcitriol Treatment in

- Rats In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition*, 48(10), 944–955. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.090886>
- Rostagno, A. A. (2022). Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 107. <https://doi.org/10.3390/ijms24010107>
- Wu, K.-M., Zhang, Y.-R., Huang, Y.-Y., Dong, Q., Tan, L., & Yu, J.-T. (2021a). The role of the immune system in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 70, 101409. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101409>
- Yu, Z., Chen, D., Tan, C., Zeng, G., He, C., Wang, J., Bu, X., & Wang, Y. (2021). Physiological clearance of Aβ by spleen and splenectomy aggravates Alzheimer-type pathogenesis. *Ageing Cell*, 21(1). <https://doi.org/10.1111/acer.13533>
- Zhang, Y., Wang, J., Chen, S., Wang, H., Li, Y., Ou, Y., Huang, S., Chen, S., Cheng, W., Feng, J., Dong, Q., & Yu, J. (2022). Peripheral immunity is associated with the risk of incident dementia. *Molecular Psychiatry*, 27(4), 1956–1962. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01446-5>

References

- Aspelund, A., Antila, S., Proulx, S. T., Karlén, T. V., Karaman, S., Detmar, M., Wiig, H., & Alitalo, K. (2015). A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *Journal of Experimental Medicine*, 212(7), 991–999. <https://doi.org/10.1084/jem.20142290>
- Baazim, H., Antonio-Herrera, L., & Bergthaler, A. (2021). The interplay of immunology and cachexia in infection and cancer. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00624-w>
- Berrón-Ruiz, L., López-Herrera, G., Ávalos-Martínez, C. E., Valenzuela-Ponce, C., Ramírez-San Juan, E., Santoyo-Sánchez, G., Mújica Guzmán, F., Espinosa-Rosales, F. J., & Santos-Argumedo, L. (2016). Variations of B cell subpopulations in peripheral blood of healthy Mexican population according to age: Relevance for diagnosis of primary immunodeficiencies. *Allergologia Et Immunopathologia*, 44(6), 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.05.003>
- Canet, G., Zussy, C., Hernandez, C., Maurice, T., Desrumaux, C., & Givalois, L. (2023). The pathomimetic oAβ25–35 model of Alzheimer's disease: Potential for screening of new therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 108398. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108398>
- Ding, D., Wang, X., Li, Q., Li, L., & Wu, J. (2021). Research on the glial-lymphatic system and its relationship with alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.605586>
- Guo, L., Li, X., Gould, T., Wang, Z.-Y., & Cao, W. (2023). T-cell aging and Alzheimer's disease. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1154699>
- Louveau, A., Herz, J., Alme, M. N., Salvador, A. F., Dong, M. Q., Viar, K. E., Herod, S. G., Knopp, J., Setliff, J. C., Lupi, A. L., Da Mesquita, S., Frost, E. L., Gaultier, A., Harris, T. H., Cao, R., Hu, S., Lukens, J. R., Smirnov, I., Overall, C. C., ... Kipnis, J. (2018). CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1380–1391. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0227-9>
- Mesquita, S. D., Louveau, A., Vaccari, A., Smirnov, I., Cornelison, R. C., Kingsmore, K. M., Contarino, C., Onengut-Gumuscu, S., Farber, E., Raper, D., Viar, K. E., Powell, R. D., Baker, W., Dabhi, N., Bai, R., Cao, R., Hu, S., Rich, S. S., Munson, J. M., ... Kipnis, J. (2018). Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 560(7717), 185–191. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0368-8>
- Mesquita, S. D., Papadopoulos, Z., Dykstra, T., Brase, L., Farias, F., Wall, M., Jiang, H., Kodira, C. D., De Lima, K. A., Herz, J., Louveau, A., Goldman, D. H., Salvador, A. F., Onengut-Gumuscu, S., Farber, E., Dabhi, N., Kennedy, T., Milam, M. G., Baker, W., ... Kipnis, J. (2021). Meningeal lymphatics affect microglia responses and anti-Aβ immunotherapy. *Nature*, 593(7858), 255–260. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03489-0>
- Minaglia, C., Giannotti, C., Boccardi, V., Mecocci, P., Serafini, G., Odetti, P., & Monacelli, F. (2019). Cachexia and advanced dementia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 10(2), 263–277. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12380>
- Muntsant, A., & Giménez-Llort, L. (2022). Crosstalk of Alzheimer's disease-phenotype, HPA axis, splenic oxidative stress and frailty in late-stages of dementia, with special concerns on the effects of social isolation: A translational neuroscience approach. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.969381>
- Natale, G., Limanagi, F., Busceti, C. L., Mastroiaco, F., Nicoletti, F., & Puglisi-Allegra, S. (2021). Glymphatic system as a gateway to connect neurodegeneration from periphery to CNS. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.639140>
- Nefedova, A. (2023). Microglial phagocytosis in rats with different models of alzheimer's disease. *Biotechnologia Acta*, 16(1), 57–66. <https://doi.org/10.15407/biotech16.01.057>
- Nefodova, A., Rudyk, M., Pasichnichenko, M., Dovhyi, R., Dovbychuk, T., Tolstanova, G., & Skivka, L. (2022). Pro-inflammatory effects of placebo neurosurgery in rats: age-related features. *General Surgery*, 2, 56–63. <https://doi.org/10.30978/gs-2022-2-56>
- Peng, H. B., Noh, K., Pan, S. R., Saldivia, V., Serson, S., Toscan, A., de Lannoy, I. A. M., & Pang, K. S. (2020). Human Amyloid-β40 Kinetics after

Intravenous and Intracerebroventricular Injections and Calcitriol Treatment in Rats In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition*, 48(10), 944–955. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.090886>

Rostagno, A. A. (2022). Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 107. <https://doi.org/10.3390/ijms24010107>

Wu, K.-M., Zhang, Y.-R., Huang, Y.-Y., Dong, Q., Tan, L., & Yu, J.-T. (2021a). The role of the immune system in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 70, 101409. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101409>

Yu, Z., Chen, D., Tan, C., Zeng, G., He, C., Wang, J., Bu, X., & Wang, Y. (2021). Physiological clearance of A β by spleen and splenectomy aggravates

Alzheimer-type pathogenesis. *Ageing Cell*, 21(1). <https://doi.org/10.1111/accel.13533>

Zhang, Y., Wang, J., Chen, S., Wang, H., Li, Y., Ou, Y., Huang, S., Chen, S., Cheng, W., Feng, J., Dong, Q., & Yu, J. (2022). Peripheral immunity is associated with the risk of incident dementia. *Molecular Psychiatry*, 27(4), 1956–1962. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01446-5>

Отримано редакцією журналу / Received: 16.10.23

Прорецензовано / Revised: 17.11.23

Схвалено до друку / Accepted: 17.11.23

Anastasia NEFODOVA¹, PhD Student

ORCID ID: 0000-0003-3440-3687

e-mail: nefodova.av@gmail.com

Maria RUDYK¹, PhD (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID ID: 0000-0003-1252-885X

e-mail: rudyk_marie@knu.ua

Roman DOVHYI¹, PhD (Biol.), Assist.

ORCID ID: 0000-0003-1189-4479

e-mail: romandovgiy@gmail.com

Larisa SKIVKA¹, DSc (Biol.), Prof.

ORCID ID: 0000-0002-2171-1085

e-mail: realmed@ukr.net

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ORGANOMETRIC INDICATORS OF LYMPHOID ORGANS IN RATS WITH DIFFERENT MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Background. Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder that affects millions of people worldwide. Increasing evidence suggests that antigens of the central nervous system can interact with lymphocytes and antigen-presenting cells through meningeal lymphatic pathways, indicating that both innate and adaptive immune responses may play a role in the development of neurodegenerative diseases. Thymic involution, a characteristic of aging immune systems, leads to a reduction in naive T lymphocyte production, affecting adaptive immune responses and resulting in compromised immune surveillance. Ineffective immune response triggers neurodegeneration through prolonged activation of immune cells, a key characteristic of the disease.

The aim of this study was to comparatively assess the reaction of lymphoid organs in rats with two widely used intervention models of Alzheimer's disease induced by intrahippocampal administration of A β 1-40 and A β 25-35.

Methods. Male Wistar rats were used in the experiments, including intact and sham-operated animals as controls. Disease progression was confirmed through feeding behavior, body and organ weight measurements, evaluation of cognitive impairments in the Barnes maze behavioral test, and assessment of dopaminergic neuron loss. Hematological parameters were analyzed at the end of the experiment (day 37), including the relative quantity of lymphocytes. Spearman's correlation analysis was performed between organometric indicators of the thymus and spleen and quantitative changes in circulating lymphocytes in animals with different Alzheimer's disease models.

Results. In rats with A β 1-40-induced Alzheimer's disease, an increase in splenic index was observed, indicating moderate splenomegaly. A statistically significant increase in the absolute quantity of lymphocytes with a decrease in their relative quantity and marked monocytosis was recorded. There was a strong negative correlation between splenic index and the quantity of circulating lymphocytes. Animals with A β 25-35-induced Alzheimer's disease did not show differences in splenic index compared to control groups.

Conclusions. The development of Alzheimer's disease is accompanied by changes in the weight indices of lymphatic organs involved in antigen presentation and the generation of adaptive immune responses, as well as in the clearance of antigenic material from the brain. Disruptions in correlation links between quantitative characteristics of circulating lymphocytes and weight indices of primary and secondary lymphoid organs may be associated with disturbances in immunopoiesis and immunogenesis.

Keywords: Alzheimer's disease, neuroinflammation, lymphoid organs, thymus, spleen.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

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; in the decision to publish the results.