

# **ASSOSIATIIVINEN OPPIMINEN JA UNI ALZHEIMERIN TAUDIN HIIRIMALLISSA**

Johanna Vaarala  
Pro gradu -tutkielma  
Psykologian laitos  
Jyväskylän yliopisto  
Toukokuu 2019

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Psykologian laitos

VAARALA, JOHANNA: Assosiatiivinen oppiminen ja uni Alzheimerin taudin hiirimallissa

Pro gradu -tutkielma, 28 s.

Ohjaajat: Arto Lipponen, Miriam Nokia

Psykologia

Toukokuu 2019

---

Tutkimuksessa tarkastellaan assosiatiivista oppimista ja unen patologisia piirteitä Alzheimerin taudin APP/PS1 -hiirimallissa. Koe-eläiminä oli kolme 10-11 kuukauden ikäistä C57BL/6 -hiirtä, joista yksi oli transgeeninen APP/PS1 -hiiri ja kaksi perimältään tavallista hiirtä. Assosiatiivisen oppimisen mallina käytettiin silmäniskuehdollistamisen aikaväliasetelmaa. Eläimiltä mitattiin lisäksi hippokampuksen CA1-alueen aktiivisuutta luonnollisen unen aikana kroonisesti implantoiduilla tetrodeilla. Unesta tarkasteltiin hippokampuksen aktivaatiopurskeita ja REM-unijaksojen pituutta. Silmäniskuehdollistamisessa koulutettiin yksi transgeeninen ja yksi ei-transgeeninen hiiri. Transgeeninen hiiri suoriutui silmäniskutehtävässä heikommin kuin ei-transgeeninen hiiri. Koulutuksen lopussa transgeenisen hiiri tuotti opitun vasteen 38% koulutuskerran toistoista ja ei-transgeeninen 85% toistoista. Tutkimuksessa käytetty silmäniskuehdollistamisen asetelma voi paljastaa transgeenisten APP/PS1 -hiirten kognitiivisen heikentymisen, mutta ero tulee varmistaa suuremmalla määrällä koe-eläimiä. Unta mitattiin yhdeltä transgeeniselta ja kahdelta ei-transgeeniselta hiireltä. Eläinten välillä oli keskinäisiä eroja aktivaatiopurskeiden esiintymisessä: toisella ei-transgeenisista hiiristä esiintyi vähemmän aktivaatiopurskeita verrattuna kahteen muuhun eläimeen. Eroja havaittiin myös REM-unijaksojen pituudessa: transgeenisen hiiren REM-unijaksot olivat lyhyempiä kuin ei-transgeenisten hiirten. Transgeenisen ja ei-transgeenisten hiirten unessa nähdyt erot tulisi varmistaa suuremmalla määrällä koe-eläimiä. APP/PS1-hiirillä nähtävien unen patologisten piirteiden yhteyttä oppimistehtävässä suoriutumiseen tulisi myös tutkia tulevaisuudessa. Alzheimerin tautiin liittyvien neuraalisen ja käyttäytymisen tason patologisten piirteiden tunnistaminen on tärkeää taudin diagnostiikan ja hoidon kehittämisen kannalta.

Avainsanat: Alzheimerin tauti, amyloidipatologia, silmäniskuehdollistaminen, episodinen muisti, uni

# SISÄLTÖ

<b>1. JOHDANTO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Alzheimerin taudin etiologia.....	1
1.2 Uni ja hippokampuksesta riippuva muisti.....	2
1.3. Unen patologia Alzheimerin taudissa.....	4
1.4. Alzheimerin taudin vaikutus kognitioon: oppimisen mallina silmäniskuehdollistaminen.....	5
1.5. Silmäniskuehdollistamisen oppiminen ja uni Alzheimerin taudin hiirimallissa.....	6
<b>2. MENETELMÄT.....</b>	<b>7</b>
2.1. Eettinen lupa.....	7
2.2. Koe-eläimet.....	7
2.3. Leikkaus.....	8
2.4. EEG-mittaus.....	9
2.5 Silmäniskuehdollistaminen.....	9
2.6. Unimittaus.....	11
2.7. Tilastollinen analyysi.....	12
<b>3. TULOKSET.....</b>	<b>12</b>
3.1. Silmäniskuehdollistaminen.....	12
3.2. Unimittaus.....	15
Aktivaatiopurskeet.....	15
REM-unijaksot.....	17
<b>4. POHDINTA.....</b>	<b>20</b>
4.1. Silmäniskuehdollistaminen.....	20
4.2. Unenaikainen aivojen aktiivisuus.....	22
4.3. Tutkimuksen rajoitukset.....	23
4.4. Jatkotutkimustarpeet.....	24
<b>LÄHTEET.....</b>	<b>25</b>

## 1. JOHDANTO

Alzheimerin tauti on rappeuttava aivosairaus, joka edetessään johtaa laajaan kognitiiviseen heikentymiseen (Braak & Braak, 1997). Rappeutumista tapahtuu erityisesti isoivokuorella ja hippokampuksessa (Braak & Braak, 1997), mikä osaltaan selittää Alzheimerin taudissa tapahtuvaa hippokampuksesta riippuvan episodisen muistin heikkenemistä. Muistin lisäksi heikkenemistä tapahtuu kielellisissä kyvyissä, liikkeiden suorittamisessa, paikan ja ajan tajussa sekä monimutkaisessa päättelyssä (Holtz, 2010). Ennen kognitiivisten oireiden ilmaantumista voidaan Alzheimer-potilailla joissain tapauksissa nähdä unen häiriintymistä (Brzecka ym., 2018). Unen häiriintyminen voi olla osatekijä Alzheimerin taudille ominaisissa muistihäiriöissä, sillä unen häiriintyessä myös unen aikana tapahtuva muistiin painaminen häiriintyy (Rauchs, Harand, Bertran, Desgranges, & Eustache, 2010). Yhteydet Alzheimerin taudissa ilmenevien unihäiriöiden ja kognition oireiden välillä ovat kuitenkin monisuuntaisia eikä kausaalisuudesta ole selkeää tietämystä (Bubu ym., 2017). Alzheimer on tyypillisesti ikääntyneiden sairaus, mutta tautiin liittyviä neuraalisia muutoksia on mahdollista havaita jopa vuosikymmeniä ennen ensimmäisiä oireita (Bateman ym., 2012). Alzheimerin taudin taustalla olevia patologisia mekanismeja olisi tärkeä tunnistaa, jotta niitä voitaisiin hyödyntää hoidossa ja diagnostiikassa ennen taudille ominaisten kognition muutosten tapahtumista.

### 1.1. Alzheimerin taudin etiologia

Nykytiedon valossa vaikuttaa siltä, että Alzheimerin taudin pääasiallinen tautimekanismi liittyy beeta-amyloidin ( $A\beta$ ) epätavallisen korkeaan pitoisuuteen aivokudoksessa. Sairaudelle tyypillisten kognitiivisten oireiden ajatellaan syntyvän  $A\beta$ :n kertymisen saadessa aikaan toiminnallisia ja rakenteellisia muutoksia aivoissa hermosolu- ja synapsitasolla. (Selkoe & Hardy, 2016). Havainto  $A\beta$ :n roolista Alzheimerin taudissa ei ole uusi – Alzheimer-potilaiden aivoista löytyvät amyloidikertymät kuvattiin ensimmäisen kerran jo vuonna 1906 (Hippius & Neundörfer, 2003). Amyloidikertymien määrä ei kuitenkaan korreloi vahvasti kognitiivisten oireiden vakavuuteen, mikä on aiheuttanut epäilystä  $A\beta$ :n osuudesta Alzheimerin taudin kulussa (Hardy & Selkoe, 2002).

Uudemman tutkimuksen perusteella A $\beta$  on rappeutumisen käynnistävä tekijä, mutta amyloidikertymien sijaan liukoiset A $\beta$ -oligomeerit saavat aikaan aivoissa tapahtuvat haitalliset muutokset (Mucke & Selkoe, 2012). Amyloidikertymät sen sijaan saattavat olla inaktiivisia varastoja, jotka pitävät sisällään toksisia A $\beta$ -oligomeereja. Tämä ajatus on saanut tukea Alzheimerin taudin hAPP-hiirimallissa, jossa hiirillä on  $\beta$ -amyloidin syntymistä edistävä mutaatio. Mallissa nähdään synapsien toiminnan häiriintymistä ja kognitiivista heikkenemistä jo ennen kuin amyloidikertymiä voidaan havaita. (Mucke & Selkoe, 2012). A $\beta$ -oligomeerit häiritsevät synapsien toimintaa, kuten oppimiselle merkityksellistä kestokorostumista, sekä vaurioittavat solujen dendriittejä (Selkoe & Hardy, 2016).

## 1.2. Uni ja hippokampuksesta riippuva muisti

Uni koostuu erilaisista vaiheista, jotka ovat eri tavoin merkityksellisiä muistin toiminnan kannalta (Stickgold & Walker, 2007). Nisäkkäiden unessa esiintyy NREM- ja REM -jaksoja, jotka voidaan erottaa toisistaan aivoissa tapahtuvan sähköisen aktiivisuuden perusteella. NREM-uni jaetaan ihmisellä edelleen univaiheisiin 1-4. (Stickgold & Walker, 2007). Hippokampuksesta riippuvan muistin toiminnan kannalta tärkeinä on pidetty etenkin univaiheita 3-4, joita kutsutaan myös hidasaaltouneksi (Rauchs ym., 2010). Hidasaaltounelle ominaista aktiivisuutta ovat hitaat (0.25-4 Hz), suuriamplitudiset delta-aallot (Petit, Gagnon, Fantini, Ferini-Strambi, & Montplaisir, 2004). Hidasaaltounen aikana esiintyy lisäksi tiettyjä neuraalisia tapahtumia, joiden ajatellaan liittyvän muistiin painamiseen (Buzsáki, 1989). Näitä muistiin painamiseen liittyviä tapahtumia ovat hippokampuksen aktivaatiopurskeet sekä pykäläpiikit.

Eläintutkimuksessa löydetyt aktivaatiopurskeet (*engl. sharp-wave ripple*) ovat hippokampuksen CA1-alueen pyramidikerroksessa nähtäviä nopeita värähtelyitä, joita syntyy CA3-alueelta tulevan eksitaation seurauksena. Niitä esiintyy kaikista eniten hidasaaltounen aikana, kun hippokampusta inhiboivat, aivokuoren alaiset nousevat yhteydet hellittävät hippokampusta vaimentavaa vaikutustaan. (Buzsáki, 2015). Aktivaatiopurskeiden on ehdotettu olevan osa kaksivaiheista muistiin painamisen prosessia, jossa hippokampuksen yhteydet muovautuvat kestokorostumisen seurauksena (Buzsáki, 1989). Kestokorostuminen on synaptisen muovautuvuuden mekanismi, joka syntyy voimakkaan ja korkeataajuisen aktivaation vaikutuksesta ja johtaa korostuneiden hermosolujen parempaan laukeamisvalmiuteen. Muistiin painamisen kaksivaiheisen mallin mukaan kestokorostumista tapahtuu ensiksi CA1-CA3-alueelle syötettä antavassa

pykäläpoimussa ja myöhemmin CA1-alueella. Pykäläpoimussa kestokorostumista tapahtuu todennäköisimmin valvetilassa toimintojen suorittamiseen liittyvän theetarytmin aikana, sillä alueen jyväissolut ovat tällöin aktiivisimmillaan. CA1-alueella tilanne on päinvastainen: pyramidisolujen aktiivisuus on voimakkainta theetarytmin hävitessä, etenkin hidasaaltouen aikana, jolloin alueella esiintyy aktivaatiopurskeita. Kaksivaiheisessa mallissa muistiin painamisen ensimmäinen vaihe tapahtuu pykäläpoimussa, jossa luodaan alustava muistijälki valvetilassa tapahtuvan kestokorostumisen aikana. Tämä muistijälki painetaan muistiin pysyvästi hidasaaltouen aikana, kun aktivaatiopurskeet laukaisevat CA1-alueella kestokorostumista. (Buzsaki, 1989).

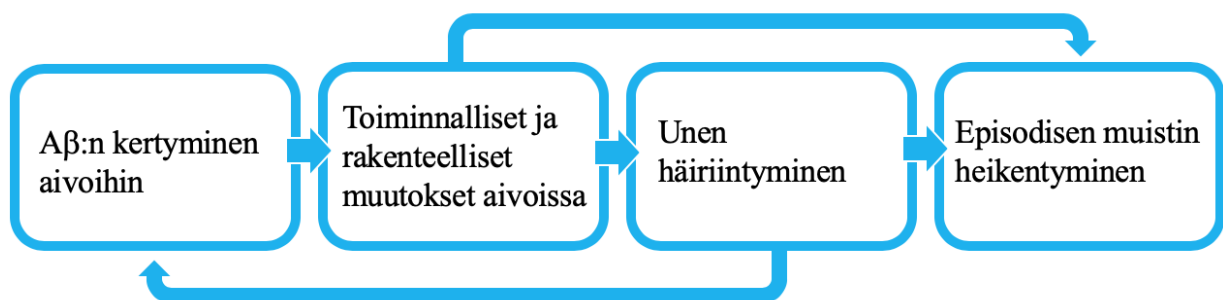
Aktivaatiopurskeiden lisäksi hidasaaltouen aikana esiintyy nk. pykäläpiikkejä (*engl. dentate spike*). Pykäläpiikit ovat suuriamplitudisia, nopeita heilahduksia, joita nähdään mitattaessa kenttäpotentiaalia hippokampuksen pykäläpoimun hiluksesta (Bragin, Jando, Nadasdy, van Landeghem, & Buzsaki, 1995). Aktivaatiopurskeiden ja pykäläpiikkien esiintyminen on vuorovaikutteista: pykäläpiikkien aikana CA3-alueen pyramidisolujen laukeaminen harvenee ja aktivaatiopurskeiden määrä laskee, kun taas pykäläpiikkien poistaminen aiheuttaa aktivaatiopurskeiden määrän moninkertaistumisen. Pykäläpiikkien tehtävä saattaakin olla hippokampuksen CA1-CA3-yhteyden vaimentaminen. (Bragin ym., 1995). Pykäläpiikkien merkitystä hippokampuksen toiminnalle on tutkittu aktivaatiopurskeita vähemmän, mutta ne näyttävät niin ikään liittyvän hippokampuksesta riippuvan muistin toimintaan: eläinten oppiminen pelkoehdollistamistehtävässä estyy, kun pykäläpiikkeihin kohdistetaan häiriö (Nokia, Gureviciene, Waselius, Tanila, & Penttonen, 2017).

Muistin ja unen välistä yhteyttä koskeva tutkimus on viime vuosikymmeninä keskittynyt NREM- ja hidasaaltoueen, jonka seurauksena REM-unen merkitys muistiin painamiselle on jäänyt vähemmän tunnetuksi (Rasch & Born, 2015). REM-unen aikana aivojen sähköinen aktiivisuus pään pinnalta mitattuna on nopeaa ja matala-amplitudista, muistuttaen valvetilan aikana nähtävää aktiivisuutta (Peever & Fuller, 2016). Hippokampuksesta mitattuna vallitseva rytmi REM-unen aikana on theetavärähtely (4-12 Hz) (Li ym., 2017). Kokeellisissa asetelmissä REM-unen määrän ja eheyden on havaittu liittyvän kognitiiviseen suoriutumiseen, mikä viittaisi myös REM-unen olevan merkityksellistä muistin toiminnan kannalta (Barsky ym., 2015; Lee ym., 2016). Toistaiseksi ei kuitenkaan tiedetä, mikä REM-unen rooli muistiin painamisessa on tarkalleen (Rasch & Born, 2015).

### 1.3. Unen patologia Alzheimerin taudissa

Terveellä aikuisella univaiheet vaihtelevat noin 90 minuutin mittaisissa sykleissä noudattaen ennustettavaa rakennetta (Stickgold & Walker, 2007). Normaaliin ikääntymiseen kuuluu unen rakenteen muuttuminen niin, että unen kokonaismäärä ja hidasaaltouneen suhteellinen määrä vähenevät ja kevyen unen suhteellinen määrä kasvaa (Peter-Derex, Yamine, Bastuji, & Croisile, 2015). Alzheimerin tautiin liittyy unen muutoksia, jotka ovat osin samankaltaisia kuin normaalin ikääntymisen myötä tapahtuvat muutokset: unen kesto lyhenee, hidasaaltouneen määrä vähenee ja kevyen unen määrä lisääntyy (Petit ym., 2004). Alzheimerin taudissa nämä muutokset ovat normaalia ikääntymistä voimakkaampia. Lisäksi Alzheimerin tautiin liittyy REM-unen kokonaismäärän väheneminen, mikä ei selkeästi liity normaaliin ikääntymiseen. REM-unijaksoja esiintyy Alzheimer-potilailla ja verrokeilla yhtä usein, mutta ne ovat Alzheimer-potilailla keskimäärin lyhyempiä kuin verrokeilla. (Petit ym., 2004).

Alzheimerin taudin ja siihen liittyvän unen häiriintymisen välinen yhteys on kaksisuuntainen (Holth, Patel, & Holtzman, 2017). Aivojen rappeutuminen todennäköisesti vaurioittaa unesta vastaavia aivorakenteita ja ratoja, mikä häiritsee unta, kun taas unen häiriintyminen lisää sekä liukoisen A $\beta$ :n että A $\beta$ -kertymien määrää aivoissa. (Holth, Patel, & Holtzman, 2017). Unen häiriintyminen puolestaan pahentaa Alzheimerin taudin kognitiivisia oireita (Bubu ym., 2017). Unihäiriöiden yhteys kognition heikentymiseen voi liittyä unen aikana tapahtuvaan muistiin painamiseen (Rauchs ym., 2010): unen patologiset muutokset todennäköisesti häiritsevät muistin kannalta olennaisia neuraalisia tapahtumia, kuten hidasaaltouneen aikaisia aktivaatiopurskeita, jolloin normaalia muistiin painamista ei pääse tapahtumaan.



KUVIO 1. Alzheimerin taudin amyloidipatologiaan liittyvät aivojen muutokset aiheuttavat unen häiriintymistä, mikä vuorostaan kiihdyttää A $\beta$ :n kertymistä aivoihin. Yhdessä nämä johtavat episodisen muistin heikentymiseen.

#### **1.4. Alzheimerin taudin vaikutus kognitioon: oppimisen mallina silmäniskuehdollistaminen**

Alzheimerin tautiin liittyvän kognitiivisen heikentymisen tutkimuksessa hyödylliseksi malliksi on osoittautunut silmäniskuehdollistaminen (Woodruff-Pak & Papka, 1996). Tässä klassisen ehdollistamisen asetelmassa neutraaliin ehdolliseen ärsykkeeseen yhdistetään refleksiivisen silmänräpäytyksen aikaansaava, silmään kohdistettu ilmapuhallus. Asetelmassa oppiminen ilmenee ilmapuhallusta ennakoivana silmän sulkemisena. Silmäniskuehdollistaminen voidaan tehdä aikavälitai viiveasetelmana. Viive-ehdollistamisessa ehdoton ja ehdollinen ärsyke esitetään osittain päällekkäisesti siten, että ehdottoman vasteen aikaansaava ilmapuhallus esiintyy ehdollisen ärsykkeen vielä tapahtuessa. Viive-ehdollistamisen aivoperusta on hyvin tunnettu (Thompson & Steinmetz, 2009): Oppimisen kannalta olennaisia rakenteita ovat pikkuaivojen kuorikerros ja tumakkeet, sekä niiden yhteydet sensorisiin ja motorisiin tumakkeisiin. Aikaväliehdollistaminen eroaa viive-ehdollistamisesta ärsykkeiden esittämisen suhteen: ehdollista ja ehdotonta ärsykettä ei esitetä päällekkäisesti, vaan niitä erottaa lyhyt aikaväli. Tehtävän oppimisen aivoperusta on heikommin tunnettu (Thompson & Steinmetz, 2009). Kokeelliset havainnot viittaavat siihen, että aikaväliehdollistamisen oppimiseen tarvitaan pikkuaivojen lisäksi hippokampuksen aktiivisuutta (Takehara, Kawahara, Takatsuki, & Kirino, 2002; Tseng, Guan, Disterhoft, & Weiss, 2004). Hippokampuksen vaurioittaminen heti aikaväliehdollistamisen opetuksen jälkeen poistaa opitut vasteet hiirillä (Takehara ym., 2002), ja kaneilla, joiden hippokampus on vaurioitunut, oppiminen aikaväliehdollistamisessa on verrokkeja huonompaa (Weiss & Disterhoft, 2015).

Kishimoto ja kollegat (2012) vertailivat aikaväli- ja viiveasetelman silmäniskuehdollistamista Alzheimerin taudin Tg2576-hiirimallissa (Kishimoto, Oku, Nishigawa, Nishimoto, & Kirino, 2012). Tg2576-hiirillä on mutaatio, joka aiheuttaa amyloidiproteiinin esiasteen amyloidiprekursoriproteiinin (APP) liikatuotantoa. Tämä johtaa amyloidikertymien kehittymiseen eläinten ikääntyessä. (Hsiao ym., 1996). Ennen amyloidikertymien syntymistä, noin 6 kuukauden iästä alkaen, liukoisen beeta-amyloidin määrä Tg-2576-hiirten aivoissa kasvaa (Lesné ym., 2006). Kishimoton ja kollegoiden (2012) tutkimuksessa aikaväliehdollistamisen oppiminen oli selvästi heikompaa Tg2576-hiirillä verrattuna ei-transgeenisiin hiiriin 6 kuukauden iässä. Ryhmien välistä eroa ei nähty enää eläinten ollessa 12 kuukauden ikäisiä – suoriutuminen heikkeni ikääntymisen myötä molemmissa ryhmissä. Viive-ehdollistamisessa ei havaittu eroa ryhmien välillä missään vaiheessa. (Kishimoto ym., 2012).

Alzheimer-potilailla tehdyt havainnot silmäniskuehdollistamisessa eivät ole täysin samansuuntaisia eläintutkimuksen kanssa: Alzheimer-diagnoosin saaneet koehenkilöt oppivat viive-ehdollistamisen verrokkeja huonommin kun tarkastellaan ensimmäistä opetuskertaa (Solomon ym.,



1995). Woodruff-Pakin ja Papkan (1996) tutkimuksessa viive-ehdollistaminen lisäksi erotteli aikaväliehdollistamista paremmin todennäköiset Alzheimer-potilaat saman ikäisistä verrokeista: viive-ehdollistamisen perusteella tunnistettiin 95% Alzheimer-ryhmän koehenkilöistä kun aikaväliehdollistamisen perusteella tunnistettiin 54%. Kuitenkin myös aikaväliehdollistamisen oppimisessa oli eroa Alzheimer- ja verrokkiryhmien välillä. Alzheimer-ryhmän koehenkilöt oppivat tuottamaan ehdollistuneen vasteen keskimäärin 27.6% kokeen toistoista, kun vastaava luku verrokkiryhmässä oli 42.6%. (Woodruff-Pak & Papka, 1996). Eläin- ja ihmistutkimuksen tulosten epäyhteneväisyydestä huolimatta aikaväliehdollistaminen näyttäisi siis toimivan hippokampuksen toimintaan perustuvan oppimisen mallina.

### **1.5. Silmäniskuehdollistamisen oppiminen ja uni Alzheimerin taudin hiirimallissa**

Tässä tutkimuksessa selvitetään, onko Alzheimerin tautia mallintavilla transgeenisilla APP/PS1 -hiirillä ja ei-transgeenisilla hiirillä eroja silmäniskuehdollistamisen oppimisessa. Hiirten silmäniskuehdollistamiseen ei ole saatavilla kaupallista laitteistoa, joten tutkimuksen ensimmäisenä tavoitteena on pystyttää järjestelmä ehdollistamiseen. Silmäniskuehdollistaminen toteutetaan aikaväliasetelmana, joka on hippokampuksen toiminnasta riippuva tehtävä (Tseng ym., 2004). Tutkimuksen toisena tavoitteena on tarkastella eroja ei-transgeenisten hiirten ja transgeenisten hiirten unenaikaisessa aivojen aktiivisuudessa. Eläinten unesta tutkitaan hippokampuksen CA1-alueen aktivaatiopurskeita. Transgeenisilla hiirillä tapahtuvan aivokuoren rappeutumisen odotetaan vaikuttavan aktivaatiopurskeiden esiintymiseen, sillä entorinaaliaivokuoren tuhoamisen on aiemmin havaittu johtavan aktivaatiopurskeiden lisääntymiseen ja pykäläpiikkien vähenemiseen (Bragin ym., 1995). Transgeenisilla hiirillä oletetaan nähtävän enemmän aktivaatiopurskeita kuin ei-transgeenisilla hiirillä. Eläinten unesta tarkastellaan lisäksi REM-unijaksojen pituutta. Oletuksena on, että transgeenisilla hiirillä esiintyy lyhyempinä REM-unijaksoina verrattuna ei-transgeenisiin hiiriin, sillä yksi Alzheimerin tautiin liittyvä unen patologinen piirre on REM-unijaksojen lyhentyminen (Petit ym., 2004).

## **2. MENETELMÄT**

### **2.1. Eettinen lupa**

Kaikki kokeet tehtiin Suomen eläinlääkärilaitoksen luvalla (UEF/Tanila/Lipponen/ESAVI-9282-04.10.07-2015) ja noudattaen Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiiviä 2010/63/EU tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta.

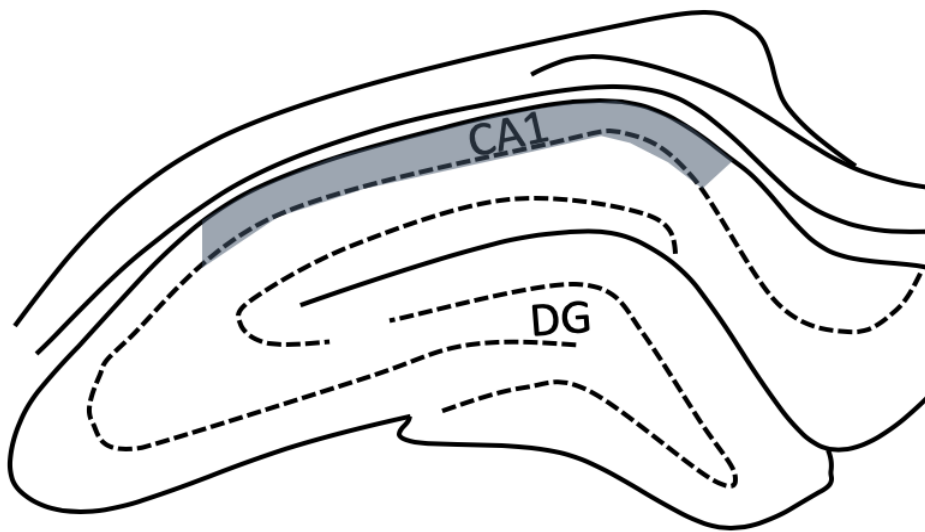
### **2.2. Koe-eläimet**

Koe-eläiminä käytettiin 3 C57BL/6 hiirtä (UEF, Kuopio), jotka olivat samasta poikueesta. Niistä 1 oli transgeeninen APP/PS1 -hiiri ja 2 ei-transgeenisia hiiriä. Transgeeniset APP/PS1-hiiret ilmentävät amyloidiprekursoriproteiinin (APP) ja preseniliini 1-proteiinin (PS1) mutatoituneita muotoja, jotka aiheuttavat A $\beta$ -proteiinin kertymistä aivoihin. APP/PS1-hiirille kehittyy amyloidikertymiä 6 kuukauden ikään mennessä (Jankowsky ym., 2004). 9 kuukauden iässä amyloidikertymiä nähdään runsaasti aivokuorella ja hippokampusessa (Jankowsky ym., 2004). APP/PS1 -hiirillä on havaittu heikentymistä erilaisissa kognitiota mittaavissa käyttäytymistehtävissä. Ne suoriutuvat ei-transgeenisia hiiriä heikommin pelkoehdollistamistehtävässä 8 ja 13 kuukauden iässä (Janus, Flores, Xu, & Borchelt, 2015), sekä 12 kuukauden iässä Morrisin vesisokkelotehtävän osatehtävässä, jossa eläimen tulee löytää veteen piilotettu taso (Lalonde, Kim, Maxwell, & Fukuchi, 2005).

Koe-eläimiä pidettiin Jyväskylän yliopiston eläintutkimusyksikön tiloissa tutkimuksen keston ajan. Ennen kokeiden aloittamista hiiret asuivat häkeissä ryhmittäin. Implantoinnin jälkeen kukin hiiri siirrettiin asumaan omaan häkkiinsä. Häkkien pohjalla oli puulastuja (Tapvei, Kaavi, Suomi) sekä pehmopaperia (Kimtech Science Precision Wipes, KCP, USA) pesämateriaalina. Eläinten saatavilla oli ruokaa ja vettä rajoittamattomasti. Huoneen lämpötila oli  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  ja ilmankosteus  $50 \pm 10\%$ . Eläinten vuorokausirytmistä pidettiin 12 tunnin valoisa/pimeä -jaksoja, joissa valoisa jakso alkoi kello 8 aamulla. Kokeet suoritettiin valoisan jakson aikana. Eläinten koulutus aloitettiin niiden ollessa 10-11 kuukauden ikäisiä. Eläimet painoivat 33-39 grammaa lopetettaessa.

### 2.3. Leikkaus

Hiiret nukutettiin isofluraanilla (0.9 l/min) ja kiinnitettiin stereotaktiseen laitteeseen (Kopf, USA). Nukutusta pidettiin yllä 0.4-0.8 l/min isofluraanivirtauksella. Ennen leikkauksen alkua hiirille annettiin intraperitoneaali-injektiona deksametasonia (0.2 mg/kg, 0.1 ml/10 g) estämään mahdollista aivoturvotusta sekä kivun poistoon karpforeeniliuosta (5mg / kg, 0.01 ml/10 g). Leikkaus aloitettiin poistamalla karvat pään alueelta. Seuraavaksi kallo paljastettiin tekemällä viilto päänahkaan. Kalloon porattiin 4 reikää, joihin kiinnitettiin ruuvielektrodit. Sitten kalloon tehtiin avanne 2.1 mm posteriorisesti ja 0.8-2.8 mm lateraalisesti bregmasta, josta hippokampukseen laskettiin 15 tetrodia (ks. Kuva 1). Tämän jälkeen päähän rakennettiin implantti kylmäakryylista (Selectaplast, Denstply, USA). Implantin takaosaan kiinnitettiin nylonista valmistettu ruuvi, jonka avulla hiiri pystyttiin myöhemmin kiinnittämään mittauslaitteistoon silmäniskuehdollistamisen ajaksi. Leikkauksen jälkeen hiirten häkkien pohjalle annettiin ruokaa ja vettä. Hiiret toipuivat leikkauksesta noin viikon ajan, jonka jälkeen aloitettiin mittauslaitteistoon totutus.



**Bregma -3.8 mm**

KUVA 1. Hippokampukseen implantoitiin 15 tetrodia, joilla mitattiin sähköfysiologisia vasteita CA1-alueelta.

## 2.4. EEG-mittaus

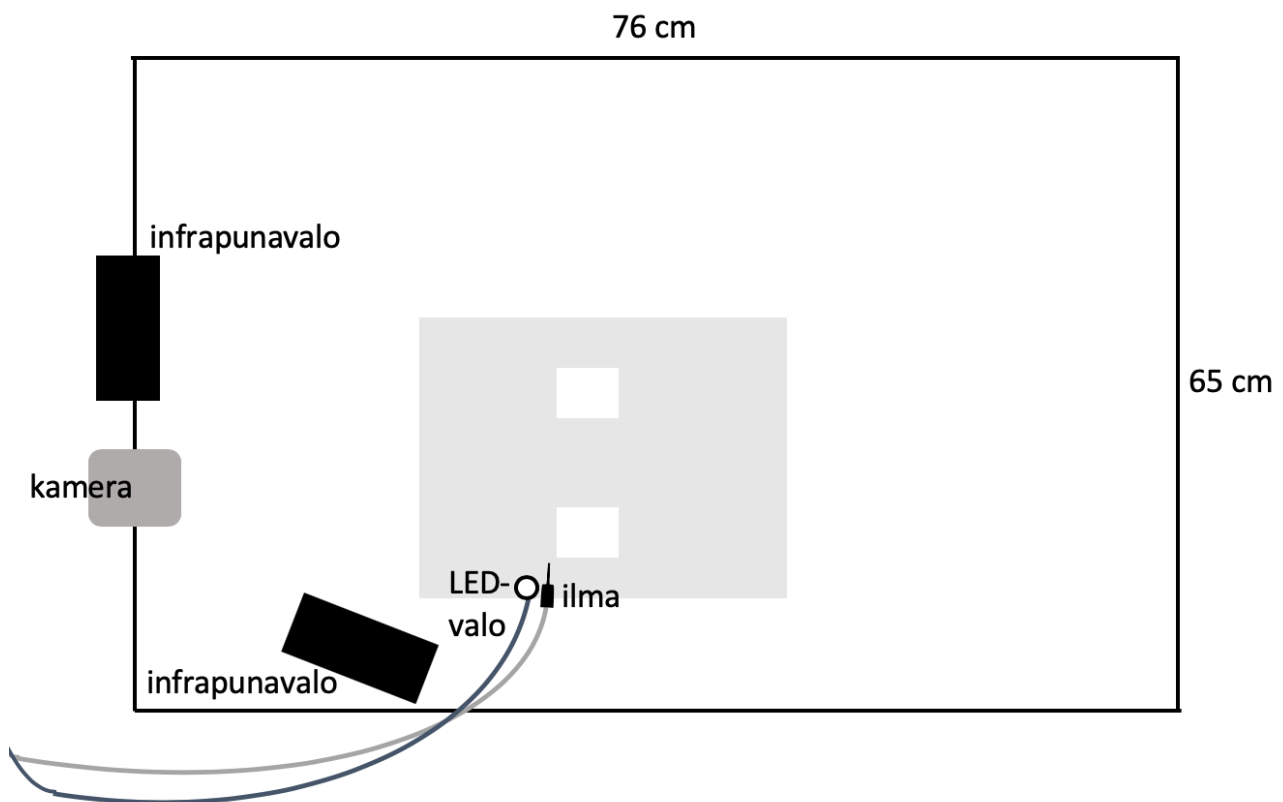
Sähköfysiologinen data kerättiin kroonisesti implantoiduilla tetrodeilla, jotka oli liitetty 16-paikkaiseen flexDrive -tetrodikuljettimeen (Voigts, Siegle, Pritchett, & Moore, 2013). Tetrodit tehtiin HML-eristetyistä, halkaisijaltaan 30 µm volframilangasta (Tungsten 99.95% CS, California Fine Wire Company, USA) Tetrode Spinner 2.0 -laitteella (Neuralynx, USA). Yksi tetrodeista korvattiin 4 ruuvielektrodilla (DIN 84 A2 M1X2, Screwsandmore, Saksa). Ruuvielektrodeihin oli juotettu halkaisijaltaan 200 µm kuparinen eristetty käämilanka (Elfa, Suomi), jolla ne liitettiin tetrodikuljettimeen.

EEG-mittauksessa flexDrive kytkettiin kahteen 32-kanavaiseen A/D-muunnin-vahvistimeen (RHD2132, Intan Technologies, USA). Kummassakin vahvistimessa oli 3 kiihtyvyyssanturia. Signaali johdettiin tiedonkeruuyksikköön (Open Ephys) ja tallennettiin Open Ephys GUI-ohjelmalla käyttäen 30 kHz keräystaajuutta. Ohjelma tallensi samalla analogiset merkkipulssit ilmapuhallusta säätävästä solenoidista, LED valosta ja kameran sulkimesta. Kokeenohjaukseen käytettiin Arduino Nano -prosessoria ja arduino-cc-experiment-controller -ohjelmaa (<https://github.com/lauritk/arduino-cc-experiment-controller/blob/master/cc-experiment-controller/cc-experiment-controller.ino>).

## 2.5. Silmäniskuehdollistaminen

Ehdollistaminen tehtiin 76x84x65 cm metallikehikkoon rakennetulla areenalla. Kehikon vasemmassa kulmassa oli lasinen alusta, jossa oli eläimen päähän implantoituun ruuviin sopivat tapit. Tappien avulla eläin kiinnitettiin alustaan siten, ettei se pystynyt liikuttamaan päätään koulutuksen aikana. Ehdottomana ärsykkeenä käytettiin vasempaan silmään 20 G metalliputken kautta kohdistettua paineilmapuhallusta. Ilmavirran antava metalliputki kohdistettiin kunkin koulutuskerran alussa eläimen silmään niin, että ilmapuhallus sai aikaan silmän täyden sulkemisen. Ilmapuhallusta säädeltiin solenoidilla (121K01 P14 A, Parker Lucifer, Sveitsi). Ehdollisena ärsykkeenä käytettiin sinistä LED valoa, joka sijaitsi 3-5 cm päässä eläimen vasemman silmän edestä. LED-valo oli alun perin sijoitettu eläimen pään eteen, kiinni lasialustaan. Valo siirrettiin vasemman silmän eteen, sillä alustaan kiinnitettynä valo ei tuottanut herätevastetta näköaivokuorella ja eläimet eivät oppineet asetelmassa. LED-valon siirtämisen jälkeen varmistettiin, että valo sai aikaan herätevasteen näköaivokuoren lähellä (ks. kuva 2).

Silmänräpäytysten havaitsemiseksi eläimen silmää kuvattiin USB-kameralla (Basler acA640-750um, Basler, Saksa), jossa oli 1:1.6/35mm objektiivi (HF35HA-1B, Fujifilm, Kiina). Kameran kuvan valaisemiseen käytettiin kahta infrapunavaloa (RM25-120, Raytec Ltd, Yhdistynyt kuningaskunta), joista toinen oli asetettu alustan yläpuolelle, kehikon vasempaan sivuun ja toinen alustan viereen. Koulutuksen ajaksi kehikko peitettiin kankaalla sen edestä sekä vasemmalta sivulta. Koulutus tehtiin hämärässä huoneessa. Areena ja siihen kuuluva laitteisto on esitetty kuviossa 2.



KUVIO 2. Silmäniskuehdollistaminen tehtiin areenalla, jossa oli eläimen kiinnittämiseen käytettävä alusta, silmään kohdistettu LED-valo, ilmapuhalluksen lähde, kaksi infrapunavaloa ja kamera, jolla kuvattiin eläimen silmää.

Ennen koulutuksen aloitusta eläimet totutettiin kiinnitettynä olemiseen kerran päivässä, 3 päivän ajan. Totutuksessa eläin kiinnitettiin alustaan kuten koulustilanteessa, mutta ärsykeitä ei esitetty. Eläimelle annettiin tipoittain juotavaksi ajoittain makeaa nestettä (Mantelijuoma Original, Alpro, Belgia) sen rauhoittamiseksi. Totutuksen jälkeen suoritettiin yksi mittauskerta, jonka aikana esitettiin ainoastaan ehdollista ärsykettä. Tästä mitattiin valoärsykkeen itsenäinen vaikutus silmänräpyttelyyn.

Koulutuskerrassa oli yhteensä 60 toistoa. Yhdessä toistossa eläimelle esitettiin ensiksi 50 ms pituinen sininen valonvälähdys ja 250 ms intervalliajan jälkeen 100 ms ilmapuhallus. Toistojen

välissä oli 15-30 sekunnin mittainen satunnaisesti määräytyvä tauko. Eläimet koulutettiin kerran päivässä siihen asti, ettei niiden oppimistulos enää parantunut, kuitenkin enintään 15 päivän ajan. Oppimisen kriteeriksi määriteltiin ehdollistuneen vasteen esiintyminen vähintään puolessa (50%) koulutuskerran toistoista. Ehdollistunut vaste on silmänräpäytyksen alkaminen ehdollisen ärsykkeen esittämisen jälkeen, ennen ehdottoman ärsykkeen alkua (esimerkki ehdollistuneesta vasteesta kuvassa 3 B).

Silmäniskuehdollistamisen oppimista tarkasteltiin ehdollistuneiden vasteiden esiintymisestä. Silmänräpäytykset määritettiin koulutuskerrasta kuvatusta videosta, joka rajattiin kuvaamaan koulutettua silmää. Video analysoitiin ensiksi kustomoidulla ohjelmalla (Blinky), jolla muunnettiin videokuvan pikselit joko mustiksi (iho) tai valkoisiksi (silmä) (<https://github.com/lauritk/blinky>). Sen jälkeen laskettiin valkoisten pikseleiden määrä suhteessa taustaan, josta saatiin tietää, kuinka suuri osuus silmästä oli silmäluomen peitossa. Silmäniskut etsittiin MatLab:lla määrittämällä silmän avoimuuden perustaso ja etsimällä kohdat, joissa silmän avoimuus poikkesi perustasosta vähintään 5 keskihajonnan verran. Tuloksena saatu tiedosto synkronoitiin sähköfysiologiseen mittaukseen, jonka jälkeen tarkasteltiin silmänräpäytysten esiintymistä intervalliajan viimeisen 125 ms aikana (ehdollistuneet vasteet). Analyysistä poistettiin toistot, joissa eläin liikkui silmäluomea juuri ennen toiston alkua. Tällä pyrittiin minimoimaan oppimistulosta sekoittavien toistojen vaikutus analyysiin.

Ei-transgeenisen hiiren silmäniskuehdollistamisen mittaustiedoista 5 ensimmäistä oli viallisia, minkä vuoksi niitä ei voitu analysoida. Hiireltä on dataa 7 viimeiseltä koulutuskerralta.

## 2.6. Unimittaus

Unimittauksessa eläin asetettiin kotihäkkiin, jossa se sai liikkua vapaasti ja nukahtaa spontaanisti. Aivojen sähköistä aktiivisuutta mitattiin samoin kuin silmäniskuehdollistamisen aikana. Eläintä kuvattiin mittauksen ajan häkin yläpuolelle sijoitetulla kameralla. Mittaus tehtiin valoisassa huoneessa.

Unimittauksista määritettiin ensiksi aika, jonka eläin pysyi liikkumatta kiihtyvyyssantureista saadun signaalin perusteella. Tästä ajasta tarkasteltiin aktivaatiopurskeiden sekä REM-unijaksojen esiintymistä. REM-unijaksot etsittiin MatLab:lla theta-aktiivisuuteen (4-12 Hz) perustuen. Kullekin mittaukselle laskettiin keskimääräinen REM-unijakson pituus sekä REM-unen osuus unen kokonaismäärästä. Aktivaatiopurskeet etsittiin MatLab:lla suodattamalla signaali 150-250 Hz taajuudella (Zhurakovskaya ym., 2019) ja etsimällä kohdat, joissa signaali poikkesi 7 keskihajontaa

keskiarvosta. Löydetyistä aktivaatiopurskeista laskettiin niiden keskimääräinen esiintyminen mitattua minuuttia kohti.

## **2.7. Tilastollinen analyysi**

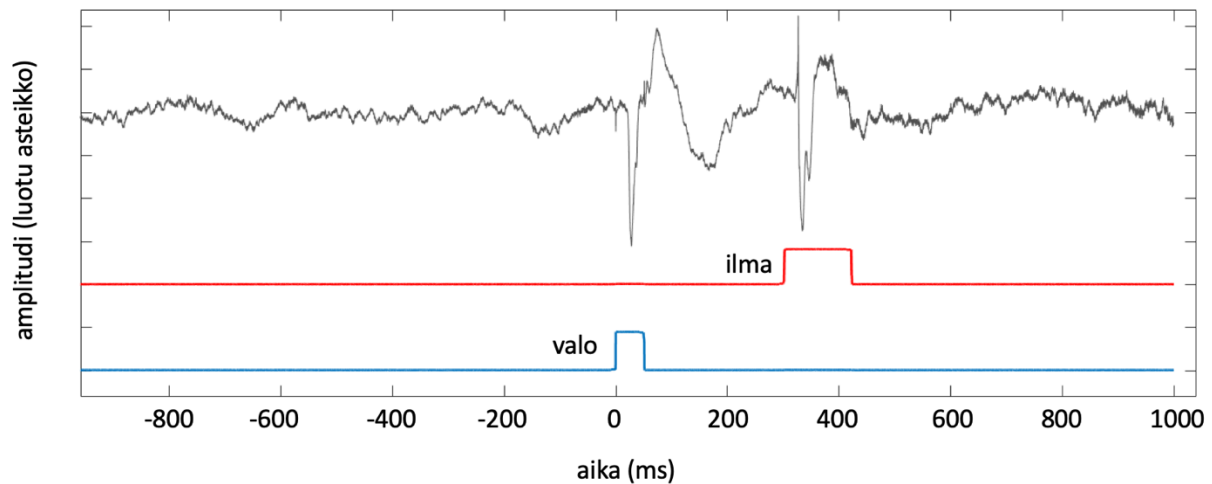
Hiirten 1, 2 ja 3 välisiä eroja aktivaatiopurskeiden esiintymisessä ja REM-jaksojen pituudessa testattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Varianssianalyysissä luokittelevaksi tekijäksi valittiin hiiren tunnus ja riippuviksi muuttujiksi aktivaatiopurskeiden esiintyminen minuutissa sekä REM-unijaksojen pituus. Ei-transgeenisten hiirten (hiiret 1 ja 2) ja transgeenisen hiiren (hiiri 3) välisiä eroja aktivaatiopurskeiden esiintymisessä ja REM-jaksojen pituudessa testattiin riippumattomien otosten t-testillä. Tilastollisten testien merkitsevyystasoksi asetettiin 0,05. T-testeille määritettiin efektikoot laskurilla (<https://www.socscistatistics.com/effectsize/default3.aspx>).

## **3. TULOKSET**

### **3.1. Silmäniskuehdollistaminen**

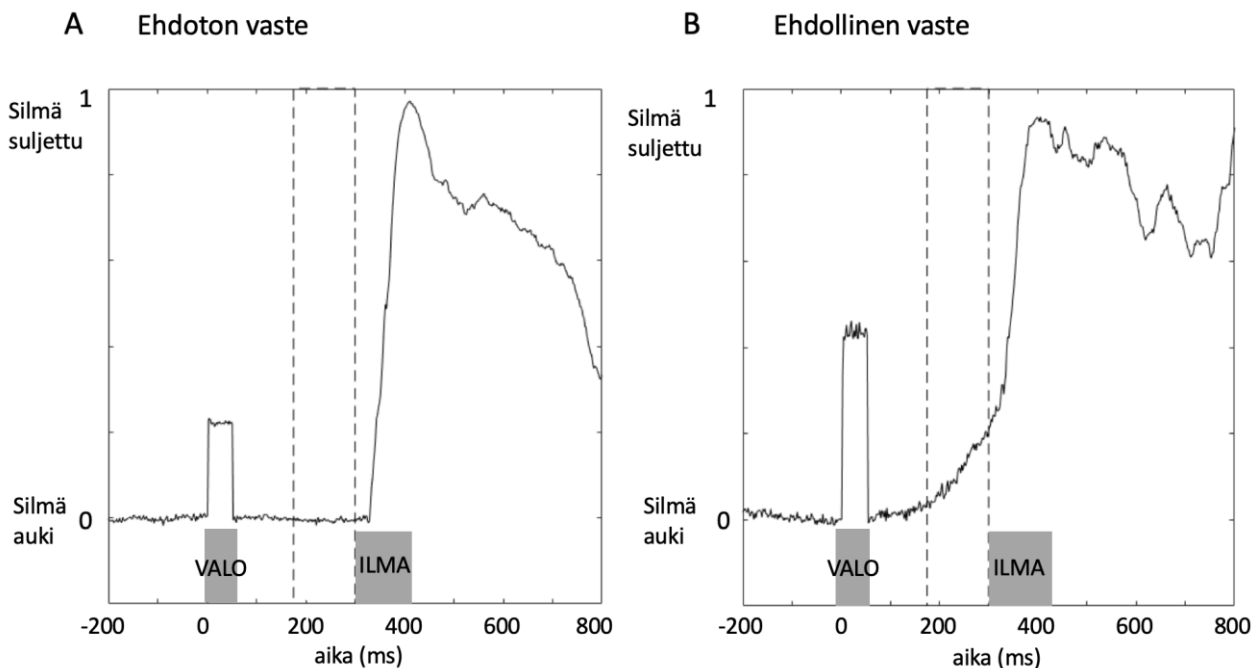
Silmäniskuehdollistamisessa koulutettiin kaksi hiirtä. Niistä toinen oli ei-transgeeninen ja toinen transgeeninen hiiri. Toista ei-transgeenisistä hiiristä ei pystytty kouluttamaan, sillä ilmapuhallus aiheutti sen silmässä ärsytystä ja silmän vuotamista.

Koulutettavilta hiiriltä tarkasteltiin ensiksi herätevasteita ehdolliseen valoärsykkeeseen, jotta voitiin varmistaa niiden havaitsevan ärsykkeen. Valoärsykkeen aikaiset vasteet keskiarvoistettiin näköaivokuoren lähelle implantoidulla ruuvielektrodille mitatusta signaalista. Molemmilla hiirillä nähtiin vaste valoärsykkeeseen. Myös ilmapuhalluksen havaittiin aiheuttavan vasteen. Kuvassa 2 on esimerkki yhden koulutuskerran toistoista keskiarvoistetusta herätevasteesta valoärsykkeeseen ja ilmapuhallukseen.



KUVA 2. Herätevasteet valoärsykkeeseen ja ilmapuhallukseen mitattuna näköaivokuoren lähellä sijaitsevalla ruuvielektrodilla. Valoärsyke on kuvattu sinisellä viivalla, ilmapuhallus punaisella.

Hiiret ehdollistettiin kerran päivässä, ei-transgeeninen hiiri yhteensä 12 kertaa ja transgeeninen hiiri yhteensä 14 kertaa. Esimerkit ehdottomasta ja ehdollisesta silmäniskuvasteesta on esitetty kuvassa 3.

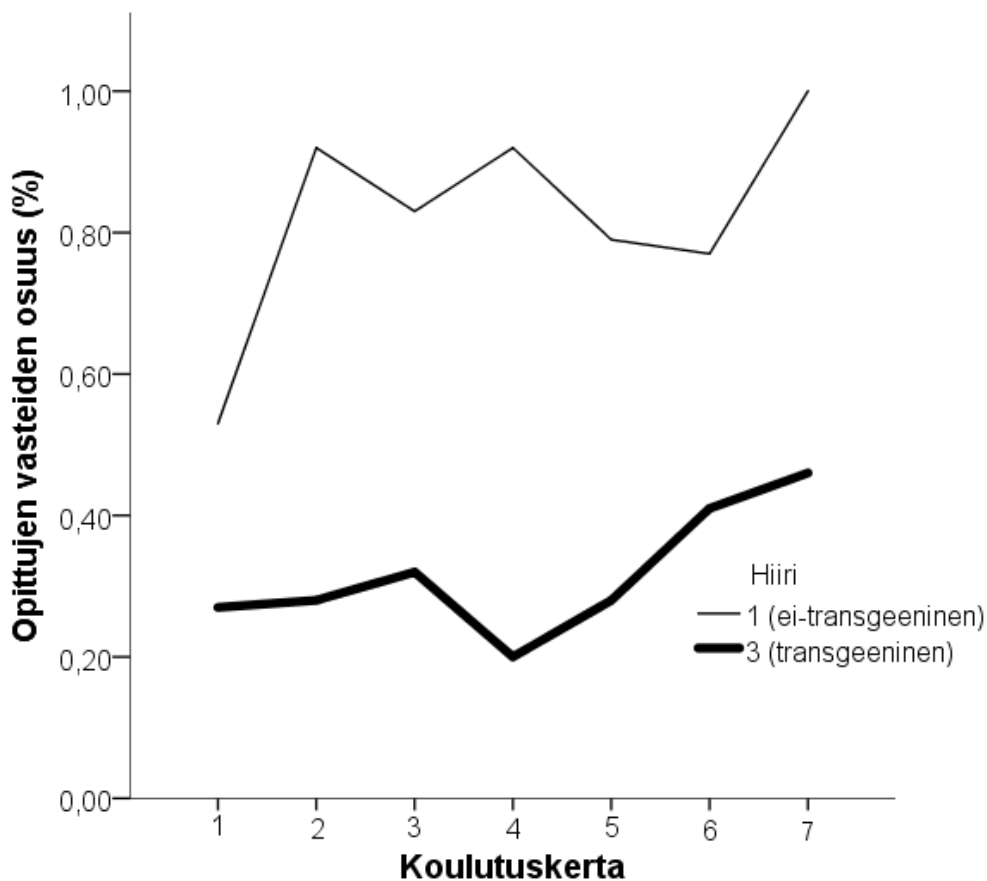


KUVA 3. Ehdoton ja ehdollinen silmäniskuvaste ajoittuvat eri tavoin suhteessa ehdolliseen ja ehdottomaan ärsykkeeseen. A) Ehdoton silmänisku, joka alkaa heti ilmapuhalluksen esittämisen jälkeen. B) Ehdollistunut silmänisku, jossa silmä alkaa sulkeutua valoärsyksen jälkeen ärsykkeiden välisen tauon aikana, ilmapuhallusta ennakoivasti. Valoärsyksen ja ilmapuhalluksen ajoitukset on merkitty kuviin palkkeina. Katkoviivalla on rajattu ärsykkeiden välisen tauon viimeinen 125 ms, josta etsittiin ehdollistunutta vastetta. X-akseli kuvaa aikaa millisekunteina ja Y-akselilla on luotu asteikko,



joka kuvaa silmän sulkeutumista: silmä on auki asteikon kohdassa 0 ja maksimaalisesti suljettu asteikon kohdassa 1. Valoärsyksen kohdalla signaalissa on häiriöpulssi, sillä valonvälähdykset tallentuivat videokuvaan.

Ei-transgeeninen hiiri saavutti ennalta määritetyn oppimiskriteerin (ehdollinen vaste vähintään 50% koulutuskerran toistoista). Se antoi ehdollisen vasteen 100% koulutuskerran analyysiin sisällytetyistä toistoista 12. koulutuskerralla, jonka jälkeen koulutus lopetettiin. Ei-transgeenisen hiiren kolmesta viimeisestä koulutuskerrasta laskettu lopullinen oppimistulos oli 85%. Transgeeninen hiiri ei saavuttanut oppimiskriteeriä. Sen lopullisena oppimistuloksena oli ehdollinen vaste 38% toistoista. Ei-transgeenisen ja transgeenisen hiiren 7 viimeiseltä koulutuskerralta koostetut oppimiskäyrät on esitetty kuviossa 3.



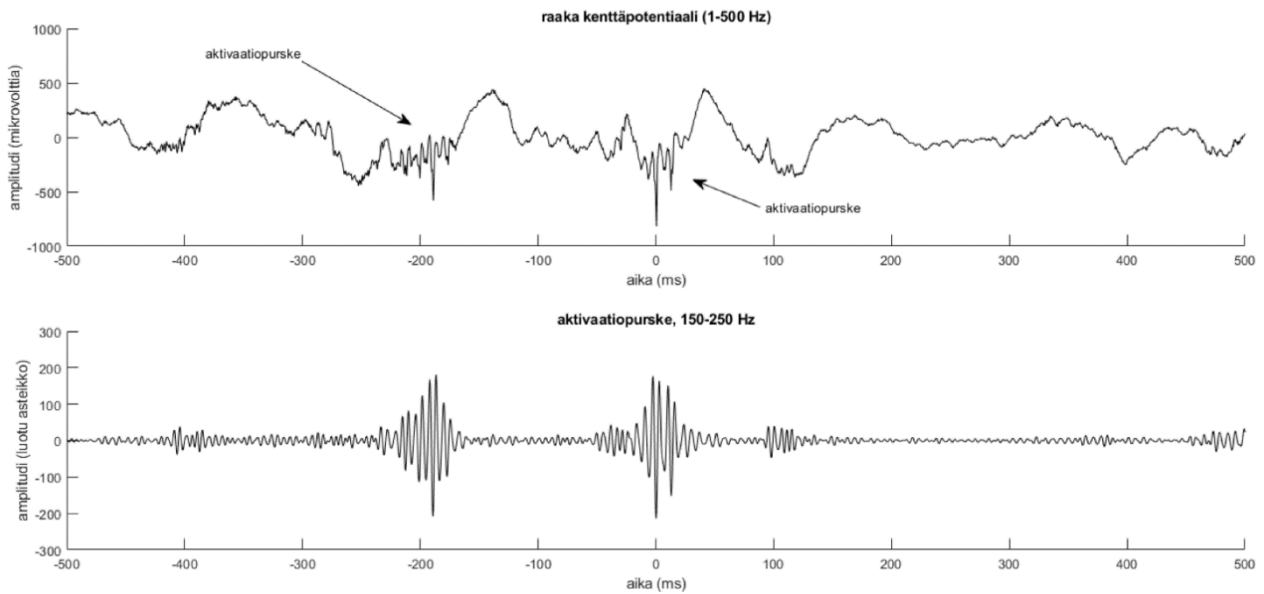
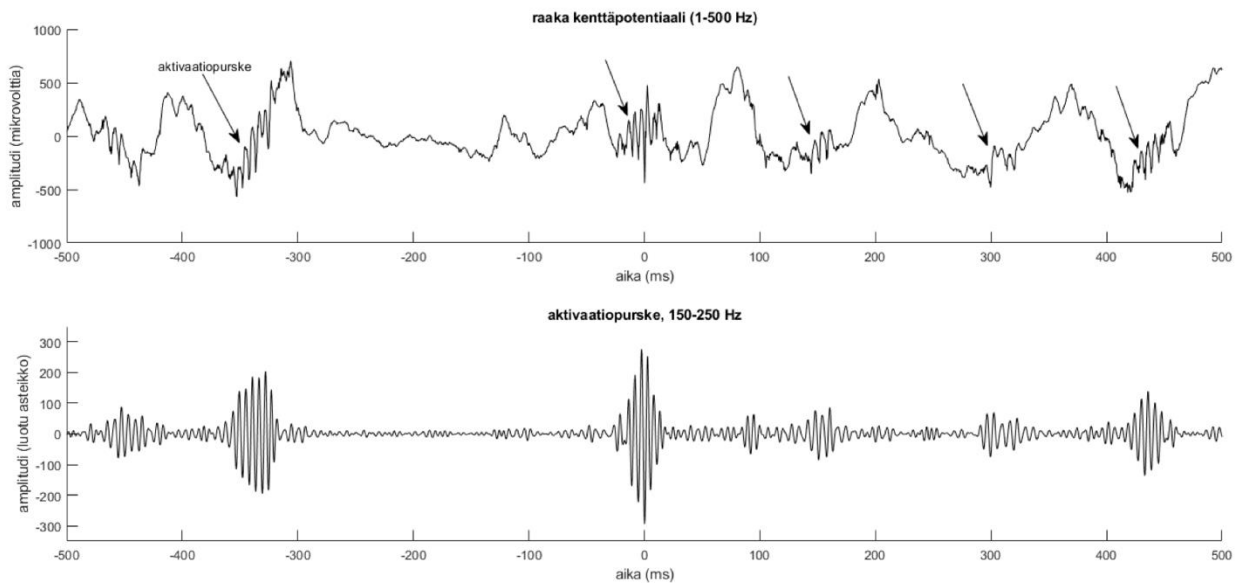
KUVIO 3. Ehdollistettujen hiirten oppimiskäyrät 7 viimeiseltä koulutuskerralta. Ohut viiva kuvaa ei-transgeenisen hiiren (1) oppimista ja paksu viiva transgeenisen hiiren (3) oppimista. Tarkastelussa on molempien hiirten 7 viimeistä koulutuskertaa siksi, että ei-transgeenisen hiiren ensimmäisiä koulutuskertoja ei pystytty analysoimaan mittaustiedostojen viallisuuden vuoksi.

### **3.2. Unimittaukset**

Unta mitattiin kolmelta eläimeltä, joista kaksi oli ei-transgeenisiä hiiriä ja yksi transgeeninen hiiri. Kaikilta eläimiltä analysoitiin 10 mittausta. Mittauksista analysoitiin aktivaatiopurskeiden kesto, ja niiden keskimääräinen esiintyminen minuutissa sekä REM-unijaksojen kesto ja REM-unen osuus kokonaisunen määrästä.

#### **Aktivaatiopurskeet**

Hiirellä 1 (ei-transgeeninen) esiintyi aktivaatiopurskeita keskimäärin 13,4 minuutissa. Sen aktivaatiopurskeen keskimääräinen kesto oli 80,4 millisekuntia. Hiirellä 2 (ei-transgeeninen) esiintyi keskimäärin 18,8 aktivaatiopursketta minuutissa, ja niiden kesto oli keskimäärin 78,1 millisekuntia. Transgeenisellä hiirellä (hiiri 3) esiintyi keskimäärin 19,1 aktivaatiopursketta minuutissa. Aktivaatiopurskeen kesto oli transgeenisellä hiirellä keskimäärin 87,4 millisekuntia. Kuvassa 4 on esimerkit ei-transgeenisen hiiren ja transgeenisen hiiren aktivaatiopurskeista.

**A****B**

KUVA 4. Kuvissa on esimerkit ei-transgeenisen hiiren ja transgeenisen hiiren unen aikaisista aktivaatiopurskeista. A) Ei-transgeenisen hiiren aktivaatiopurskeita. B) Transgeenisen hiiren aktivaatiopurskeita. Yläkuvissa on esitetty raaka kenttäpotentiaali: X-akseli kuvaa aikaa millisekunneissa ja Y-akseli signaalin amplitudia mikrovoltteissa. Aktivaatiopurskeet on merkitty kuvaan nuolilla. Alakuvissa on suodatettu signaali: X-akselilla on aika millisekunneissa, Y-akselilla signaalin amplitudi luodulla asteikolla. Suodatetussa signaalissa aktivaatiopurske näkyy perustasosta poikkeavana korkeataajuisena värähtelynä.

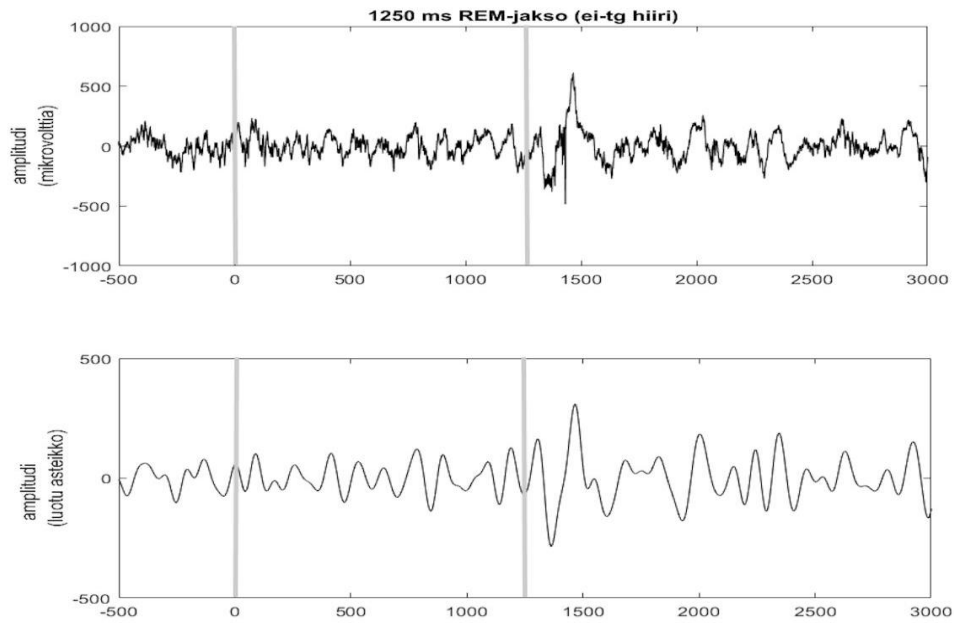
Hiirten 1, 2 ja 3 välisiä eroja aktivaatiopurskeiden esiintymisessä tarkasteltiin ensiksi yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Varianssianalyysin tuloksena oli, että hiirten välillä oli eroa aktivaatiopurskeiden esiintymisessä ( $F [ 2, 27 ] = 13,536, p < 0,001$ ). Post Hoc -testit osoittivat, että hiirellä 1 (ei-transgeeninen) esiintyi vähemmän aktivaatiopurskeita minuutissa kuin hiirillä 2 (ei-transgeeninen) ja 3 (transgeeninen) ( $p < 0,001$ ). Varianssianalyysin tulos on esitetty taulukossa 1.

Ei-transgeenisten hiirten ja transgeenisen hiiren aktivaatiopurskeiden esiintymisen eroa testattiin riippumattomien otosten t-testillä. Riippumattomien otosten t-testin tuloksen mukaan transgeenisen ja ei-transgeenisten hiirten välillä oli eroa aktivaatiopurskeiden esiintymisessä ( $t [28] = 2,165, p = 0,039$ ). T-testille laskettu efektikoko (*Cohen's d*) oli 0,09.

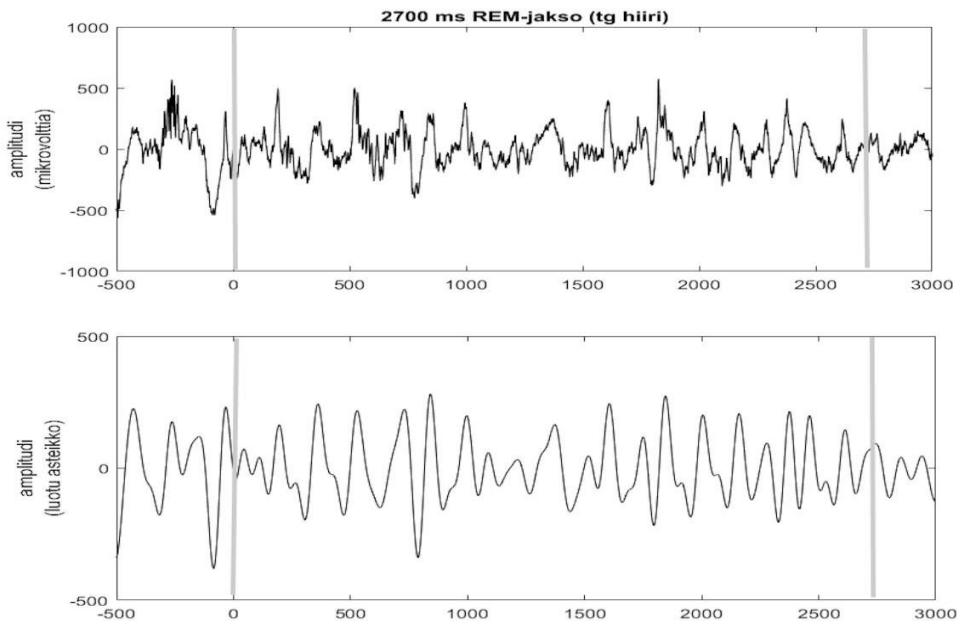
### **REM-unijaksot**

Ei-transgeenisten hiirten (hiiret 1 ja 2) REM-jaksot kestivät keskimäärin 2,16 ja 2,05 sekuntia. Niiden REM-unen osuudet unen kokonaismäärästä olivat keskimäärin 47,0% ja 41,6% (hiiri 1; hiiri 2). Transgeenisen hiiren (hiiri 3) REM-jaksojen keskimääräinen kesto oli 1,73 sekuntia. Sen unesta REM-unta oli keskimäärin 20,3%. Esimerkit ei-transgeenisen hiiren ja transgeenisen hiiren REM-unijaksoista on esitetty kuvassa 5.

A



B



KUVA 5. REM-unijaksot etsittiin unidatasta theeta-aktiivisuuteen perustuen. A) Ei-transgeenisen hiiren REM-unijakso. B) Transgeenisen hiiren REM-unijakso. Ylemmissä kuvissa näkyy raakasignaali, alemmissä kuvissa on theetataajuudelle (4-12 Hz) suodatettu signaali. X-akselit kuvaavat aikaa millisekunneissa. REM-jaksot on rajattu kuviin pystyviivoin.

Hiirten välisiä eroja REM-jaksojen pituudessa tutkittiin ensin yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Varianssianalyysin tuloksen mukaan hiirten välillä oli eroa REM-jaksojen pituudessa ( $F [2,27] =$

7,091,  $p = 0,003$ ). Post Hoc -testit osoittivat, että transgeenisen hiiren (hiiri 3) REM-jaksot olivat kestoiltaan lyhyempiä kuin ei-transgeenisten hiirten (hiiret 1 ja 2) REM-jaksot ( $p = 0,004$ ;  $p = 0,032$ ). Varianssianalyysin tulos on esitetty taulukossa 1.

Ei-transgeenisten hiirten (hiiret 1 ja 2) ja transgeenisen hiiren (hiiri 3) REM-jaksojen pituuksien eroa tarkasteltiin lisäksi riippumattomien otosten t-testillä. Riippumattomien otosten t-testin tuloksen mukaan transgeenisen (hiiri 3) ja ei-transgeenisten hiirten (hiiret 1 ja 2) välillä oli eroa REM-jaksojen pituudessa ( $t [27,998] = 4,554$ ,  $p < 0,001$ ). Efektikoon suuruus (*Cohen's d*) oli 0,157.

	Hiiri 1 (ei-tg)	Hiiri 2 (ei-tg)	Hiiri 3 (tg)	F-arvo	Efektikoko (Partial eta squared)	Parivertailut (Post Hoc -testit)
Aktivaatiopurskeet/ minuutti	13,4 (2,52)	18,8 (3,22)	19,1 (2,45)	13,536***	0,501	1 < 2, 3***
REM-jakson pituus (sekunteja)	2,16 (0,30)	2,05 (0,32)	1,73 (0,15)	7,091**	0,344	3 < 1 ** 3 < 2 *

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

TAULUKKO 1. Taulukossa on hiirten 1, 2 (ei-transgeeniset hiiret) ja 3 (transgeeninen hiiri) aktivaatiopurskeiden esiintymisen ja REM-jaksojen pituuksien keskiarvot ja keskihajonnat sekä varianssianalyysien F-arvot, efektikoot ja parivertailujen tulokset.

## 4. POHDINTA

Tutkimuksen tavoitteena oli pystyttää järjestelmä hiiren silmäniskuehdollistamiseen sekä vertailla transgeenisten APP/PS1 -hiirten oppimista ei-transgeenisten hiirten oppimiseen silmäniskuehdollistamisen aikaväliasetelmassa. Silmäniskuehdollistamisessa koulutettiin lopulta 1 transgeeninen ja 1 ei-transgeeninen hiiri. Transgeeninen hiiri ei oppinut tehtävää ennalta määritetyn oppimiskriteerin (ehdollisten vasteiden osuus vähintään 50%) mukaisesti. Koulutuksen lopussa se antoi opitun vasteen 38% toistoista. Ei-transgeeninen hiiri taas oppi tehtävän tuottaen ehdollisen vasteen 85% toistoista koulutuksen lopussa. Oppimisen lisäksi tavoitteena oli tutkia transgeenisen ja ei-transgeenisten hiirten mahdollisia eroja unen aikana esiintyvissä aktivaatiopurskeissa sekä unessa esiintyvien REM-jaksojen pituudessa. Hiirillä oli keskinäisiä eroja aktivaatiopurskeiden esiintymisessä. Toisella ei-transgeenisista hiiristä esiintyi vähemmän aktivaatiopurskeita minuutissa kuin kahdella muulla hiirellä. Hiirillä oli keskinäisiä eroja myös REM-jaksojen pituuksissa: transgeenisella hiirellä oli lyhyempiä REM-jaksoja kuin ei-transgeenisilla hiirillä. Vertailtaessa transgeenista hiirtä kahteen ei-transgeeniseen hiireen nähtiin, että transgeenisen ja ei-transgeenisten hiirten välillä oli eroja aktivaatiopurskeiden esiintymisessä ja REM-jaksojen pituudessa.

### 4.1. Silmäniskuehdollistaminen

Transgeenisen APP/PS1-hiiren suoriutuminen silmäniskutehtävässä oli tässä tutkimuksessa selvästi heikompaa kuin ei-transgeenisen hiiren. Aiemmissa tutkimuksissa amyloidipatologiaa ilmentävien transgeenisten hiirten oppimisen ei ole havaittu eroavan ei-transgeenisista hiiristä silmäniskuehdollistamisen aikaväliasetelmassa eläinten ollessa 12 kuukauden ikäisiä (Kishimoto ym., 2012; Ewers, Morgan, Gordon & Woodruff-Pak, 2006). Aiempien tutkimusten tulokset poikkeavat tämän tutkimuksen tuloksista, mutta ovat myös keskenään erisuuntaisia. Ewersin ja kollegoiden (2006) tutkimuksessa sekä verrokkiihiiret että transgeeniset hiiret oppivat tehtävän hyvin – ehdollisten vasteiden osuus oli keskimäärin 68% ei-transgeenisilla ja 73% transgeenisilla hiirillä – kun taas Kishimoton ja kollegoiden (2012) tutkimuksessa oppiminen oli huonoa sekä verrokkiihiirten että transgeenisten hiirten ryhmissä. Toisistaan eroavia tuloksia voivat selittää erot silmäniskuehdollistamisen menetelmissä.

Tässä tutkimuksessa silmäniskuehdollistaminen toteutettiin 50-250 -aikaväliasetelmana, jossa esitettiin ensiksi 50 ms ehdollinen valoärsyke, seuraavaksi 250 ms aikaväli ja viimeisenä ehdottomana ärsykkeenä toimiva ilmapuhallus. Edellä mainitut tutkimukset eroavat tästä ensinnäkin siinä, että niissä ehdollinen ärsyke oli merkkiääni (Kishimoto ym., 2012; Ewers, Morgan, Gordon & Woodruff-Pak, 2006). Merkkiäänen käyttö voi saada aikaan säikähdyksirefleksin hiirissä, mikä puolestaan voi tehdä oppimisesta nopeampaa (Siegel ym., 2015). Useissa tutkimuksissa, joissa ehdollisena ärsykkeenä on käytetty merkkiääntä, hiiret ovat oppineet nopeasti aikaväliehdollistamisen 50-250 -asetelmassa (Siegel ym., 2015). Näin oli myös Ewersin ja kollegoiden (2006) tutkimuksessa, jossa 12 kuukauden ikäiset transgeeniset ja ei-transgeeniset hiiret oppivat tehtävän 3 koulutuskerrassa (Ewers ym., 2006). Tutkimuksissa, joissa ehdottomana ärsykkeenä on käytetty valoa, hiirten oppiminen silmäniskuehdollistamisessa on ollut hitaampaa (Heiney, Wohl, Chettih, Ruffolo, & Medina, 2014; Siegel ym., 2015). Toiseksi, molemmissa tutkimuksissa ehdottomana ärsykkeenä toimi ilmapuhalluksen sijasta silmän sähköstimulaatio. Tämä voi myös johtaa nopeampaan oppimiseen verrattuna asetelmaan, jossa ehdoton ärsyke on ilmapuhallus (Oswald, Knuckley, Mahan, Sanders, & Powell, 2006). Sähköstimulaation oppimista tehostava vaikutus voi liittyä siihen, että se on ärsykkeenä voimakkaampi kuin ilmapuhallus. (Oswald ym., 2006).

Kishimoton ja kollegoiden (2012) tutkimuksessa 12 kuukauden ikäiset hiiret eivät päässeet hyvään oppimistulokseen, vaikka ärsykkeet olivat laadultaan samanlaisia kuin Ewersin ja kollegoiden (2006) käyttämät. Heikkoja oppimistuloksia voi selittää se, että koe-eläiminä käytetyillä C57BL/6 -hiirillä esiintyy kuulon heikentymistä ikääntymisen myötä (Galvez, Cua, & Disterhoft, 2011). Toinen mahdollisesti vaikuttava tekijä on tutkimuksessa käytetty 500 ms aikaväli ehdollisen ja ehdottoman ärsykeen välissä. Pidempi aikaväli tekee tehtävästä vaikeamman oppia: 3-4 kk ikäisistä hiiristä 75% oppii silmäniskuehdollistamisessa aikavälin ollessa 250 ms, mutta vain kolme kahdeksasta hiirestä oppii 450 ms aikaväliä käytettäessä (Siegel ym., 2015). Oppiminen aikaväliehdollistamisessa heikkenee ikääntymisen myötä (esim. Graves & Solomon, 1985; Galvez ym., 2011), joten 500 ms aikaväli voi tehdä tehtävästä liian haastavan 12 kuukauden ikäisille hiirille.

Tässä tutkimuksessa käytetty silmäniskuehdollistamisen asetelma voi tehdä näkyväksi transgeenisen hiiren kognitiivisen heikentymisen verrattuna samanikäiseen ei-transgeeniseen hiireen. Ehdollista ja ehdotonta ärsykettä erottavan aikavälin ollessa 250 ms tavallisesti ikääntyvillä hiirillä ei näy heikentymistä assosiaation muodostamisessa 6-12 kuukauden iässä (Galvez ym., 2011). Käytetyt ärsykkeet voivat kuitenkin vaikeuttaa tehtävää niin, että transgeenisen hiiren oppimistulos jää heikoksi. Sähköstimulaatio sekä ääniärsykkeen aiheuttamat säikähdyksirefleksit voivat tehostaa



oppimista silmäniskuehdollistamisessa (Oswald ym., 2006; Siegel ym., 2015), ja nämä tekijät puuttuivat tässä tutkimuksessa käytetystä asetelmasta.

## 4.2. Unenaikainen aivojen aktiivisuus

Unen osalta ensimmäinen oletus oli, että transgeenisella hiirellä esiintyisi enemmän aktivaatiopurskeita verrattuna ei-transgeenisiin hiiriin amyloidipatologiaan liittyvän entorinaaliaivokuoren rappeutumisen vuoksi. Varianssianalyysi osoitti transgeenisella hiirellä esiintyvän enemmän aktivaatiopurskeita kuin toisella ei-transgeenisistä hiiristä. Eroa toiseen ei-transgeeniseen hiireen sen sijaan ei havaittu. Hiiren tunnus selitti 50,1% vaihtelusta aktivaatiopurskeiden esiintymisessä (*partial eta squared* = 0,501). Transgeenisen hiiren aktivaatiopurskeiden esiintymistä verrattiin vielä kahteen ei-transgeeniseen hiireen t-testillä, jonka tuloksen mukaan transgeenisen ja ei-transgeenisten hiirten välillä oli eroa aktivaatiopurskeiden esiintymisessä. T-testille laskettu efektikoko oli kuitenkin hyvin pieni ( $d = 0,09$ ). Vastikään julkaistussa tutkimuksessa (Zhurakovskaya ym., 2019) 4 transgeenisen APP/PS1 -hiiren ja 5 ei-transgeenisen hiiren välillä ei havaittu eroa aktivaatiopurskeiden esiintymisessä. Tutkimuksessa käytetyt eläimet olivat 5-6 kuukauden iässä, joten niiden amyloidipatologia ei ollut täysin kehittynyt (Zhurakovskaya ym., 2019). Kaikkiaan näiden tulosten perusteella ei ole selvää, vaikuttaako amyloidipatologia aktivaatiopurskeiden esiintymiseen.

Toinen oletus oli, että transgeenisen hiiren REM-unijaksot olisivat keskimäärin lyhyempiä verrattuna ei-transgeenisten hiirten REM-jaksoihin. REM-jaksojen pituuksissa havaittiin oletusten mukaiset erot sekä varianssianalyysissä että t-testissä. Varianssianalyysin efektikoko oli 0,304 (*partial eta squared*) ja t-testin 0,157 (*cohen's d*). Tiedossamme ei ole, että aiemmissa tutkimuksissa olisi tutkittu REM-unijaksojen kestoa Alzheimerin taudin hiirimalleissa. REM-unen määrää sen sijaan on tutkittu amyloidipatologiaa ilmentävillä hiirillä. Eräässä tuoreessa tutkimuksessa 8-10 kuukauden ikäisillä APP/PS1-hiirillä tai 12 kuukauden ikäisillä Tg2576-hiirillä ei havaittu eroa REM-unen määrässä verrattuna kontrollieläimiin (Kent, Strittmatter, & Nygaard, 2018). On kuitenkin olemassa aiempia tutkimustuloksia APP/PS1 -hiirten (Roh ym., 2012) ja Tg-2576 -hiirten (Zhang ym., 2005) vähentyneestä REM-unen määrästä verrattuna kontrolleihin.

REM-unijaksojen lyhentymisen tiedetään liittyvän Alzheimerin tautiin (Petit ym., 2004), mutta ei ole selvää, mikä vaikutus REM-unen häiriintymisellä on kognitioon (Scullin & Bliwise, 2015). Unijaksojen lyhentymistä voidaan kuitenkin pitää merkinä unen fragmentoitumisesta eli

katkonaisuudesta (Wimmer ym., 2013), joka puolestaan on yhteydessä kognitiiviseen heikentymiseen (Saper ym., 2012). Unijaksojen lyhentymisen yhteydestä kognitiiviseen heikentymiseen on myös kokeellista näyttöä. Eräässä tutkimuksessa (Lee ym., 2016) rottien vuorokausirytmien häiritseminen johti niiden unessa esiintyvien REM- ja NREM-jaksojen lyhentymiseen ilman unen kokonaismäärän vähentymistä. Molempien univaiheiden lyhentymisen taas oli yhteydessä huonompaan oppimiseen hippokampuksesta riippuvassa käyttäytymistehtävässä. (Lee ym., 2016). Samalla tavoin tässä tutkimuksessa transgeenisellä hiirellä oli lyhyempiä REM-unijaksoja kuin ei-transgeenisillä hiirillä, ja sen suoriutuminen oppimistehtävässä oli heikompaa kuin ei-transgeenisellä hiirellä.

### **4.3. Tutkimuksen rajoitukset**

Tutkimukseen liittyy myös joitain rajoituksia. Näistä huomattavin on koe-eläinten pieni määrä. Transgeenisia eläimiä oli tutkimuksessa vain yksi, mikä heikentää luotettavuutta arvioidessa amyloidipatologian vaikutusta tutkittaviin muuttujiin. Lisäksi silmäniskuehdollistamisessa pystyttiin kouluttamaan lopulta vain kaksi eläintä, mikä tekee koulutettujen eläinten keskinäisestä vertailusta epäluotettavaa. Silmäniskuehdollistamisen oppimisessa on keskinäisiä eroja myös ei-transgeenisten hiirten välillä – eläinten oppimisnopeus on vaihtelevaa (Heiney, Wohl, Chettih, Ruffolo, & Medina, 2014), ja osa eläimistä ei opi tehtävää koskaan (esim. Siegel ym., 2015). Tämän tutkimuksen kohdalla ei voida sulkea pois mahdollisuutta, että transgeenisen ja ei-transgeenisen hiiren erot oppimisessa johtuisivat muista tekijöistä kuin transgeenisen hiiren amyloidipatologian aiheuttamista aivojen muutoksista.

Koulutetut hiiret saivat osittain eri käsittelyn, sillä ei-transgeenista hiirtä koulutettiin aluksi järjestelmässä, jossa ehdollisena ärsykkeenä toimiva valo oli sijoitettu hiiren eteen ja sen pään alapuolelle. Hiiri ei alkanut antaa ehdollisia vasteita asetelmassa, jolloin tutkittiin valon aiheuttamat herätevasteet näköaivokuoren lähelle implantoidulla ruuvielektrodilla kerätystä signaalista. Valon ei havaittu aiheuttavan herätevastetta, mistä tulkittiin ärsykkeen olevan intensiteetiltään liian heikko. Tämän jälkeen valoärsyke kohdistettiin koulutettavaa silmään, jolloin valo sai aikaan herätevasteen näköaivokuoren läheltä mitattuna. Kun valonlähteen paikka muutettiin, ei-transgeeninen hiiri alkoi myös oppia asetelmassa. Transgeeninen hiiri koulutettiin alusta asti järjestelmässä, jossa valoärsyke kohdistettiin koulutettavaan silmään. Ei-transgeeninen hiiri oli siten kaikkiaan useamman kerran kiinnitetty koulutuslaitteistoon kuin transgeeninen hiiri. Ei ole todennäköistä, että ei-transgeeninen

olisi oppinut koulutuskerroilla, joissa valo oli kiinnitetty alustaan, koska sillä ei tällöin esiintynyt ehdollistuneita vasteita eikä herätevastetta valoärsykkeeseen. On kuitenkin mahdollista, että ei-transgeeninen hiiri oli paremmin tottunut kiinnitettynä olemiseen koulutuksen alkaessa.

#### **4.4. Jatkotutkimustarpeet**

Tässä tutkimuksessa nähtiin ero transgeenisen ja ei-transgeenisen hiiren oppimisessa ehdollistamisasetelmassa, jossa ehdoton ärsyke oli ilmapuhallus, ehdollinen ärsyke valo ja ärsykkeiden välinen aika 250 ms. Asetelma voi paljastaa erot kognitiivisessa suoriutumisessa transgeenisten APP/PS1 -hiirten ja ei-transgeenisten hiirten välillä eläinten ollessa noin 11 kuukauden ikäisiä. Tämä mahdollinen ero tulisi varmistaa suuremmalla määrällä koe-eläimiä, ja jatkotutkimukset ovat juuri käynnissä.

Löydetyt erot aktivaatiopurskeiden esiintymisessä ja REM-unijaksojen pituudessa tulisi varmentaa tutkimalla useampia transgeenisia APP/PS1-hiiriä ja ei-transgeenisia hiiriä. Aktivaatiopurskeiden lisäksi mahdollinen tutkimuskohde ovat hippokampuksen pykäläpiikit, joiden esiintyminen on vuorovaikutteista aktivaatiopurskeiden kanssa (Bragin ym., 1995). Unen patologisten piirteiden yhteyttä silmäniskutehtävässä suoriutumiseen olisi hyödyllistä tutkia tulevaisuudessa. Yksi APP/PS1 -hiirillä havaittu aivotoiminnan poikkeavuus on aivokuorella nähtävä yliaktiivisuus (Gurevicius, Lipponen, & Tanila, 2012), ja tämän piirteen yhteys oppimistehtävässä suoriutumiseen olisi niin ikään kiinnostava tutkimuskohde.

## LÄHTEET

- Barsky, M. M., Tucker, M. A., & Stickgold, R. (2015). REM sleep enhancement of probabilistic classification learning is sensitive to subsequent interference. *Neurobiology of Learning and Memory*, 122, 63–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.02.015>
- Bateman, R. J., Xiong, C., Benzinger, T. L. S., Fagan, A. M., Goate, A., Fox, N. C., ... Morris, J. C. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 367(9), 795–804. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202753>
- Braak, H., & Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of Aging*, 18(4), 351–357. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00056-0)
- Bragin, A., Jando, G., Nadasdy, Z., van Landeghem, M., & Buzsáki, G. (1995). Dentate EEG spikes and associated interneuronal population bursts in the hippocampal hilar region of the rat. *Journal of Neurophysiology*, 73(4), 1691–1705. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.4.1691>
- Brzecka, A., Leszek, J., Ashraf, G. M., Ejma, M., Ávila-Rodríguez, M. F., Yarla, N. S., ... Aliev, G. (2018). Sleep disorders associated with Alzheimer's disease: A perspective. *Frontiers in Neuroscience*, 12(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00330>
- Bubu, O. M., Brannick, M., Mortimer, J., Umasabor-bubu, O., Sebastião, Y. V., Wen, Y., ... Anderson, W. M. (n.d.). Sleep , Cognitive impairment, and Alzheimer's disease : A Systematic Review and Meta-Analysis.
- Buzsáki, G. (1989). Two-Stage Model of Memory Trace Formation: A Role for “Noisy” Brain States, 551–570.
- Buzsáki, G. (2015). Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, 25(10), 1073–1188. <https://doi.org/10.1002/hipo.22488>  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.01.002>
- Ewers, M., Morgan, D. G., Gordon, M. N., & Woodruff-Pak, D. S. (2006). Associative and motor learning in 12-month-old transgenic APP+PS1 mice. *Neurobiology of Aging*, 27(8), 1118–1128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.019>
- Galvez, R., Cua, S., & Disterhoft, J. F. (2011). Age-related deficits in a forebrain-dependent task, trace-eyeblick conditioning. *Neurobiology of Aging*, 32(10), 1915–1922. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.014>
- Gurevicius, K., Lipponen, A., & Tanila, H. (2012). Increased Cortical and Thalamic Excitability in Freely Moving APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> Mice Modeling Epileptic Activity Associated with Alzheimer's Disease. *Cerebral Cortex*, 23(5), 1148–1158.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Heiney, S. A., Wohl, M. P., Chettih, S. N., Ruffolo, L. I., & Medina, J. F. (2014). Cerebellar-dependent expression of motor learning during eyeblink conditioning in head-fixed mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(45), 14845–14853. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2820-14.2014>
- Hippius, H., & Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 5(1), 101–108. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1026558>
- Holth, J. K., Patel, T. K., & Holtzman, D. M. (2017). Sleep in Alzheimer's Disease—Beyond Amyloid. *Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms*, 2, 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2016.08.002>
- Holtz, J. L. (2010). *Applied Clinical Neuropsychology : An Introduction*. New York, UNITED STATES: Springer Publishing Company. Retrieved from

- <http://ebookcentral.proquest.com/lib/jyvaskyla-ebooks/detail.action?docID=760081>
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., ... Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, A beta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274(5284), 99–102. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.99>
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., ... Borchelt, D. R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Human Molecular Genetics*, 13(2), 159–170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
- Janus, C., Flores, A. Y., Xu, G., & Borchelt, D. R. (2015). Behavioral abnormalities in APP<inf>Swe</inf>/PS1<sup>ΔE9</sup> mouse model of AD-like pathology: Comparative analysis across multiple behavioral domains. *Neurobiology of Aging*, 36(9), 2519–2532. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.010>
- Kent, B. A., Strittmatter, S. M., & Nygaard, H. B. (2018). Sleep and EEG Power Spectral Analysis in Three Transgenic Mouse Models of Alzheimer’s Disease: APP/PS1, 3xTgAD, and Tg2576. *Journal of Alzheimer’s Disease : JAD*, 64(4), 1325–1336. <https://doi.org/10.3233/JAD-180260>
- Kishimoto, Y., Oku, I., Nishigawa, A., Nishimoto, A., & Kirino, Y. (2012). Impaired long-trace eyeblink conditioning in a Tg2576 mouse model of Alzheimer’s disease. *Neuroscience Letters*, 506(1), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.10.071>
- Lalonde, R., Kim, H. D., Maxwell, J. A., & Fukuchi, K. (2005). Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP695SWE/co + PS1/ΔE9 mice with amyloid plaques. *Neuroscience Letters*, 390(2), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.028>
- Lee, M. L., Katsuyama, A. M., Duge, L. S., Sriram, C., Krushelnytskyy, M., Kim, J. J., & de la Iglesia, H. O. (2016). Fragmentation of Rapid Eye Movement and Nonrapid Eye Movement Sleep without Total Sleep Loss Impairs Hippocampus-Dependent Fear Memory Consolidation. *Sleep*, 39(11), 2021–2031. <https://doi.org/10.5665/sleep.6236>
- Li, S., Xu, J., Chen, G., Lin, L., Zhou, D., & Cai, D. (2017). The characterization of hippocampal theta-driving neurons - a time-delayed mutual information approach. *Scientific Reports*, 7(1), 5637. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05527-2>
- Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., ... Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid-β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440, 352. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature04533>
- Mucke, L., & Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of Amyloid β -Protein : Synaptic and Network Dysfunction Neurotoxicity of Amyloid b -Protein : <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006338>
- Nokia, M. S., Gureviciene, I., Waselius, T., Tanila, H., & Penttonen, M. (2017). Hippocampal electrical stimulation disrupts associative learning when targeted at dentate spikes. *Journal of Physiology*, 595(14), 4961–4971. <https://doi.org/10.1113/JP274023>
- Oswald, B., Knuckley, B., Mahan, K., Sanders, C., & Powell, D. A. (2006). Prefrontal control of trace versus delay eyeblink conditioning: Role of the unconditioned stimulus in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Behavioral Neuroscience*, 120(5), 1033–1042. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.5.1033>
- Peever, J., & Fuller, P. M. (2016). Neuroscience: A Distributed Neural Network Controls REM Sleep. *Current Biology : CB*, 26(1), R34–R35. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.011>
- Peter-Derex, L., Yammine, P., Bastuji, H., & Croisile, B. (2015). Sleep and Alzheimer’s disease. *Sleep Medicine Reviews*, 19, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2014.03.007>
- Petit, D., Gagnon, J. F., Fantini, M. L., Ferini-Strambi, L., & Montplaisir, J. (2004). Sleep and quantitative EEG in neurodegenerative disorders. *Journal of Psychosomatic Research*, 56(5), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2004.02.001>
- Rasch, B., & Born, J. (2015). In search of a role of REM sleep in memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 122, 1–3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.04.012>

- Rauchs, G., Harand, C., Bertran, F., Desgranges, B., & Eustache, F. (2010). Sleep and episodic memory: a review of the literature in young healthy subjects and potential links between sleep changes and memory impairment observed during aging and Alzheimer's disease. *Revue neurologique*, *166*(11), 873–881. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2010.03.021>
- Roh, J. H., Huang, Y., Bero, A. W., Kasten, T., Stewart, F. R., Bateman, R. J., & Holtzman, D. M. (2012). Disruption of the Sleep-Wake Cycle and Diurnal Fluctuation of  $\beta$ -Amyloid in Mice with Alzheimer's Disease Pathology. *Science Translational Medicine*, *4*(150), 150ra122 LP-150ra122. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004291>
- Saper, C. B., Lim, A. S. P., Buchman, A. S., Bennett, D. A., Yu, L., Leurgans, S. E., & Costa, M. D. (2012). Increased Fragmentation of Rest-Activity Patterns Is Associated With a Characteristic Pattern of Cognitive Impairment in Older Individuals. *Sleep*, *35*(5), 633–640. <https://doi.org/10.5665/sleep.1820>
- Scullin, M. K., & Bliwise, D. L. (2015). Is cognitive aging associated with levels of REM sleep or slow wave sleep? *Sleep*, *38*(3), 335–336. <https://doi.org/10.5665/sleep.4482>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, *8*(6), 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Siegel, J. J., Taylor, W., Gray, R., Kalmbach, B., Zemelman, B. V., Desai, N. S., ... Chitwood, R. A. (2015). Trace Eyeblink Conditioning in Mice Is Dependent upon the Dorsal Medial Prefrontal Cortex, Cerebellum, and Amygdala: Behavioral Characterization and Functional Circuitry. *ENeuro*, *2*(4), 1–29. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0051-14.2015>
- Solomon, P. R., Brett, M., Groccia-Ellison, M. E., Oyler, C., Tomasi, M., & Pendlebury, W. W. (1995). Classical conditioning in patients with Alzheimer's disease: a multiday study. *Psychology and Aging*, *10*(2), 248–254.
- Stickgold, R., & Walker, M. P. (2007). Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation. *Sleep Medicine*, *8*(4), 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2007.03.011>
- Takehara, K., Kawahara, S., Takatsuki, K., & Kirino, Y. (2002). Time-limited role of the hippocampus in the memory for trace eyeblink conditioning in mice. *951*, 183–190.
- Thompson, R. F., & Steinmetz, J. E. (2009). The role of the cerebellum in classical conditioning of discrete behavioral responses. *Neuroscience*, *162*(3), 732–755. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.041>
- Tseng, W., Guan, R., Disterhoft, J. F., & Weiss, C. (2004). Trace Eyeblink Conditioning Is Hippocampally Dependent in Mice. *65*, 58–65. <https://doi.org/10.1002/hipo.10157>
- Voigts, J., Siegle, J. H., Pritchett, D. L., & Moore, C. I. (2013). The flexDrive: an ultra-light implant for optical control and highly parallel chronic recording of neuronal ensembles in freely moving mice. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *7*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00008>
- Weiss, C., & Disterhoft, J. F. (2015). The impact of hippocampal lesions on trace-eyeblink conditioning and forebrain-cerebellar interactions. *Behavioral Neuroscience*, *129*(4), 512–522. <https://doi.org/10.1037/bne0000061>
- Wimmer, M. E., Rising, J., Galante, R. J., Wyner, A., Pack, A. I., & Abel, T. (2013). Aging in Mice Reduces the Ability to Sustain Sleep/Wake States. *PLOS ONE*, *8*(12), e81880. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081880>
- Woodruff-Pak, D. S., & Papka, M. (1996). Alzheimer's disease and eyeblink conditioning: 750 ms trace vs. 400 ms delay paradigm. *Neurobiology of Aging*, *17*(3), 397–404. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(96\)00022-X](https://doi.org/10.1016/0197-4580(96)00022-X)
- Zhang, B., Veasey, S. C., Wood, M. A., Leng, L. Z., Kaminski, C., Leight, S., ... Trojanowski, J. Q. (2005). Impaired Rapid Eye Movement Sleep in the Tg2576 APP Murine Model of Alzheimer's Disease with Injury to Pedunculopontine Cholinergic Neurons. *The American Journal of Pathology*, *167*(5), 1361–1369. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61223-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61223-0)

Zhurakovskaya, E., Ishchenko, I., Gureviciene, I., Aliev, R., Gröhn, O., & Tanila, H. (2019). Impaired hippocampal-cortical coupling but preserved local synchrony during sleep in APP / PS1 mice modeling Alzheimer ' s disease, (March), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41851-5>