

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE



Ulrika Beitnere

**MILDRONĀTA UN AP-12 IETEKME UZ
UZVEDĪBU UN SMADZEŅU PROTEĪNU EKSPRESIJU
NEIRODEĢENERĀCIJAS MODEĻOS**

Promocijas darbs

Farmācijas zinātņu doktora grāda iegūšanai
Farmaceutiskās farmakoloģijas apakšnozarē

Rīga, 2015

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē, Farmakoloģijas katedrā un Alabamas universitātē Birmingemā, ASV.



Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā «Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē».

Darbs sastāv no 104 lappusēm, nodaļām: publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu, ievads, literatūras apskats, materiāli un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, aizstāvētās tēzes, pateicības, literatūras saraksts, 2. tabulām un 39 attēliem.

Darba forma: disertācija farmācijas nozarē, farmaceitiskās farmakoloģijas apakšnozarē.

Darba zinātniskā vadītāja: Dr.habil.med., profesore Vija Kluša

Darba recenzenti:

Prof., Dr. med., **Ago Rinke**, Tartu universitāte

Prof., Dr. habil.biol. **Nikolajs Sjakste**, Latvijas universitāte

Dr. biol., **Inese Čakstiņa**, Rīga Stradiņa universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Latvijas Universitātes Medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares Promocijas padomes atklātā sēdē 2015. gada 30. novembrī plkst.14.00 Latvijas Universitātes Muzeja zālē, Raiņa bulvārī 19.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

LU Medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs: _____/Dr. med., profesors Valdis Pīrāgs

Promocijas padomes sekretāre: _____/Dr.pharm., docente Kristīne Saleniece

© University of Latvia, 2015

© Ulrika Beitnere, 2015

ANOTĀCIJA

Pieaugošā neurodeģeneratīvo slimību izplatība un ar šīm slimībām saistīto atmiņas un dzīves kvalitātes pasliktināšanās joprojām aktualizē jaunu farmakoterapijas stratēģiju un zāļu vielu meklējumus. Alzheimerā slimība, Pārkinsona slimība ir visbiežāk sastopamās neurodeģeneratīvās slimības, kuras rada nopietnas sociālas un ekonomiskas problēmas.

Molekulārajā līmenī ir noskaidrots, ka neurodeģeneratīvajos procesos ir izmainīta vairāku sinaptiskās plasticitātes proteīnu ekspresija. Promocijas darba mērķis bija noskaidrot, vai mazās molekulas – mildronāts un jauns 1,4-dihidropiridīna (DHP) savienojums AP-12 spēj iedarboties uz vairākiem šūnas regulējošajiem proteīniem, lai aktivētu reģeneratīvos procesus centrālajā nervu sistēmā, un tādējādi aizsargātu no atmiņu traucējumu attīstības.

Promocijas darba ietvaros parādīta mildronāta efektivitāte normalizēt smadzeņu proteīnu ekspresijas, kas izmainītas Alzheimerā un Pārkinsona slimības modeļos, kā arī stresa un haloperidola modeļos, kas galvenokārt skar sinaptisko plasticitāti un šūnas dzīvotspēju. Apmācības modelī mildronāts veicināja šūnas proliferāciju hipokampā un ietekmēja sinaptiskajā plasticitātē iesaistītos proteīnus. DHP atvasinājums AP-12 tika pārbaudīts Alzheimerā slimības modelī, kur tas uzrādīja spēju uzlabot telpisko atmiņu un ietekmēt proteīnu ekspresiju hipokampā, kas ir galvenā atmiņas veidošanās struktūra.

Darbā iegūtie dati ļauj secināt, ka mildronāts un AP-12 ar uzlādētiem struktūras elementiem var tikt uzskatīti kā prototipi jauna tipa neuroprotektīvo zāļu vielu dizainā, lai regulētu intracelulāros procesus jau agrīnās neurodeģenerācijas fāzes, tai skaitā, novēršot atmiņas traucējumus.

Atslēgvārdi: mildronāts, dihidropiridīna savienojums AP-12, centrālā nervu sistēma, neurodeģenerācija, sinaptiskā plasticitāte, proteīnu ekspresija

ANNOTATION

The growing prevalence of neurodegenerative diseases and diseases involving memory impairment and the associated deterioration in quality of life for these patients continues to be the main impetus behind the search for new drugs and new strategies in pharmacotherapy. Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease constitute a serious and enduring socio-economic problem. On the molecular level it has been shown that neurodegenerative processes have altered protein expressions for the proteins involved in synaptic plasticity.

The aim of this thesis was to ascertain whether mildronate and the new dihydropyridine compound AP-12 are able to act on a number of cell regulatory proteins to activate regenerative processes in the central nervous system, and thus protect against the development of memory disorders.

The thesis sought to demonstrate mildronate's efficiency in normalizing brain protein expression in Alzheimer's and Parkinson's disease models, as well as stress and haloperidol models. These proteins mainly affect synaptic plasticity and cell viability. In the training model, mildronate promoted cell proliferation in the hippocampus and affected its flexibility involved in synaptic proteins. The new dihydropyridine AP-12 was tested for Alzheimer's disease model where it showed an ability to improve spatial memory and affect protein expression in the hippocampus, a key memory formation structure.

The data obtained suggest that mildronate and AP-12 can be used in protection against the onset of neurodegenerative diseases and in their treatment.

Keywords: mildronate, dihydropyridine compound AP-12, the central nervous system, neurodegeneration, synaptic plasticity, protein expression

SATURS

ANOTĀCIJA.....	3
ANNOTATION.....	4
SAĪSINĀJUMI.....	7
PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PROMOCIJAS DARBA TĒMU	9
IEVADS	12
Darba mērķis.....	13
Darba uzdevumi	13
Darba hipotēze	14
Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes.....	14
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	15
1.1. Neurodeģeneratīvo slimību izplatība.....	15
1.2. Neurodeģeneratīvie procesi smadzenēs	16
1.2.1. Mitohondriālie bojājumi.....	17
1.2.2. Neuroiekaisuma nozīme	18
1.2.3. Proteīnu agregācija un akumulācija smadzeņu šūnās.....	19
1.2.4. Ubikvitīna-proteosomas sistēmas un molekulāro čaperonu nozīme	22
1.3. Sinaptiskā plasticitāte	23
1.3.1. Enzīmu AChE un GAD67 nozīme sinaptiskajā plasticitātē.....	24
1.3.2. Adhēzijas molekulas.....	24
1.3.3. Neurotrofie faktori.....	25
1.3.4. Transkripcijas faktori.....	26
1.4. Neurodeģeneratīvo slimību modelēšana.....	26
1.4.1. PD modelis	27
1.4.2. AD modelis.....	29
1.4.3. Stresa modelis	30
1.4.4. Haloperidola amnēzijas modelis	31
1.4.5. Apmācības modelis	32
2.2. Jaunas farmakoterapeitiskās stratēģijas	32
1.6. Pētīto vielu izvēles pamatojums	33
1.6.1. Mildronāts	33
1.6.2. Dihidropiridīna atvasinājums AP-12.....	35
3. MATERIĀLI UN METODES	37
2.1. Eksperimentālie dzīvnieki.....	37
2.2. Materiāli.....	37
2.3. Metodes.....	39
2.3.1. Modeļu izveide ar ķīmisko vielu palīdzību	39
2.3.2. Modeļu izveide bez ķīmiskām vielām	39
2.3.3. Eksperimentu plānojums modeļdzīvniekiem.....	40
2.3.4. Dzīvnieku uzvedības testi.....	42
2.3.5. Biomarkieru mērījumi	45
2.3.6. HPLC/masas spektrometrija AP-12 detektēšanai smadzenēs	48
2.4. Statistiskā datu apstrāde.....	49
3. REZULTĀTI.....	50
3.1. Mildronāta ietekme uz proteīnu ekspresiju striatumā un <i>substantia nigra</i> PD modeļžurkām	50
3.1.1. Modeļa validēšana un mildronāta ietekme uz apomorfīna-inducētajām rotācijām 50	
3.1.2. Mildronāta ietekme uz TH ekspresiju	51

3.1.3.	Mildronāta ietekme uz ubikvitīna, Notch-3, GFAP, iNOS un Iba-1 PD modeļžurkām.....	52
3.2.	Mildronāta ietekme uz HSP70, GDNF un NCAM ekspresiju striatumā un <i>substantia nigra</i> PD modeļžurkām.....	57
3.3.	Mildronāta ietekme uz Tg-APP _{SwDI} peļu uzvedību un hipokampa proteīnu ekspresiju	59
3.3.1.	Mildronāta ietekme uz lokomotoro aktivitāti un bailēm atvērtā lauka un nulles labirinta testā	59
3.3.2.	Mildronāta ietekme uz sociālās atpazīšanas testu.....	60
3.3.3.	Mildronāta ietekme uz telpisko atmiņu ūdens labirintā.....	60
3.3.4.	Mildronāta ietekme uz Aβ peptīdu akumulāciju hipokampā	61
3.4.	Mildronāta ietekme uz imobilizācijas stresa inducēto amnēziju žurkām	63
3.4.1.	Mildronāta ietekme uz atmiņu pasīvās izvairīšanās testā.....	63
3.4.2.	Mildronāta ietekme uz BDNF, AChE un GAD67 ekspresiju hipokampā stresa inducētā amnēzijas modelī	64
3.5.	Mildronāta ietekme uz haloperidolu amnēzijas modelī	66
3.5.1.	Mildronāta ietekme uz atmiņu Barnes labirinta testā haloperidola amnēzijas modelī	66
3.5.2.	Mildronāta ietekme uz proteīnu ekspresiju hipokampā haloperidola amnēzijas modelī	67
3.6.	Mildronāta ietekme uz mācīšanos un atmiņu apmācības modeļžurkām.....	67
3.6.1.	Mildronāta ietekme uz atmiņu aktīvās izvairīšanās testā	67
3.6.2.	Mildronāta ietekme uz BrdU/nestīnu apmācības modeļžurkām	68
3.6.3.	Mildronāta ietekme uz GAD65/67 apmācības modeļžurkās.....	69
3.6.4.	Mildronāta ietekme uz GAP-43 hipokampā apmācības modeļžurkām.....	71
3.6.5.	Mildronāta ietekme uz c-jun/AP-1 hipokampā apmācības modeļžurkām.....	72
3.7.	Dihidropiridīna atvasinājums AP-12 ietekme uz atmiņu un proteīnu ekspresiju smadzenēs C57BL/6J pelēs un transgēnajās APP _{SwDI} pelēs.....	72
3.7.3.	AP-12 ietekme uz telpisko atmiņu C57BL/6J pelēs.....	72
3.7.4.	AP-12 šķērso hematoencefālisko barjeru C57BL/6J pelēs.....	73
3.7.5.	AP-12 uzrāda anksiolītiskas un atmiņu uzlabojošas īpašības Tg-APP _{SwDI} pelēs	74
3.7.6.	AP-12 paaugstina GAD67 ekspresiju smadzenēs arī Tg-APP _{SwDI} pelēs.....	75
4.	DISKUSIJA.....	76
4.1.	Mildronāts regulē smadzeņu proteīnu ekspresiju PD modeļdzīvniekiem	76
4.2.	Mildronāts uzlabo atmiņu, samazina Aβ uzkrājumus un regulē smadzeņu proteīnu ekspresiju hipokampā Tg-APP _{SwDI} pelēs	79
4.3.	Mildronāts aizsargā atmiņu un sinaptisko proteīnu ekspresiju imobilizācijas stresa un haloperidola amnēzijas modeļžurkām	82
4.4.	Mildronāta pozitīvie efekti apmācības modelī.....	85
4.5.	AP-12 šķērso hematoencefālisko barjeru, noņem bailes, uzlabo telpisko atmiņu un stimulē glutamaterģisko signālceļu hipokampā Tg-APP _{SwDI} un C57BL/6J pelēs.....	86
5.	SECINĀJUMI.....	89
8.	PATEICĪBAS.....	90
9.	LITERATŪRAS SARAKSTS	91

SAĪSINĀJUMI

A β	amiloīda beta peptīds (<i>amyloid-beta peptide</i>)
AChE	acetilholīnesterāze (<i>acetylcholinesterase</i>)
aCSF	mākslīgais cerebrospīnālais šķīdums (<i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
AD	Alcheimera slimība (<i>Alzheimer's disease</i>)
α -TUB	alfa-tubulīns (<i>alpha-tubulin</i>)
ANOVA	dispersijas analīze (<i>analysis of variance</i>)
APP	amiloīda prekursora proteīns (<i>amyloid precursor protein</i>)
AP-12	1-dodecil-3'-5'-bis-etoksikarbonil-2'-6'-dimetil-1',4'-dihidro-[3,4']bipiridinil-1-ium bromīds
ATF	adenozīna trifosfāts
BDNF	smadzeņu neirotrofais faktors (<i>brain derived neurotrophic factor</i>)
BrdU	bromodeoksiuridīns (<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i>)
CAA	cerebrālā amiloīdu angiopātija (<i>cerebral amyloid angiopathy</i>)
CAR	aktīvās izvairīšanās tests (<i>conditioned avoidance response</i>)
CNS	centrālā nervu sistēma
CREB	cAMP atbildes elementu saistošais proteīns (<i>cAMP response element-binding protein</i>)
DHP	dihidropiridīns
D2	dopamīna 2 receptors
GABA	γ -aminosviestskābe (<i>γ-Aminobutyric acid</i>)
GAD 67	glutamāta dekarboksilāze 67 (<i>glutamate decarboxylase 67</i>)
GAP-43	ar augšanu asociētais proteīns 43 (<i>growth associated protein 43</i>)
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
GBB	γ -butirobetaīns
GDNF	gliju šūnu neirotrofais faktors (<i>glial derived neurotrophic factor</i>)
GFAP	gliju fibrilārais skābais proteīns (<i>glial fibrillar acidic protein</i>)
Hal	haloperidols
HPLC	augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HSP70	karstuma šoka proteīns 70 (<i>heat shock protein 70</i>)
Iba-1	jonizētā kalcija saistošā adaptora molekula 1 (<i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>)
i.p.	intraperitonāli (intraperitoneally)

IHC	imūnhistoķīmija
iNOS	inducējamā slāpekļa oksīda sintāze (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
LTP	ilgtermiņa stimulēšana (<i>long-term potentiation</i>)
MTPT	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridīns (<i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i>)
mRNS	mesendžera ribonukleīnskābe
NADH	nikotīnamīda adenīdinukleotīds
NCAM	neirālo šūnu adhēzijas molekula (<i>neural cell adhesion molecule</i>)
PAR	pasīvās izvairīšanās tests (<i>passive avoidance response</i>)
PD	Pārkinsona slimība (<i>Parkinson's disease</i>)
SAL	fizioloģiskais šķīdums (<i>saline</i>)
S.E.M.	vidējās aritmētiskās vērtības standartkļūda (<i>standard error of the mean</i>)
SDS	nātrija dodecilsulfāts (<i>sodium dodecylsulphate</i>)
SN	<i>substantia nigra</i>
STR	striatums (<i>striatum</i>)
SYN	sinaptofizīns
TEMED	N, N, N',N'- tetrametiletilēndiamīns (<i>N, N, N',N'- tetrametylenediamine</i>)
Tg	transgēns
TH	tirozīna hidroksilāze (<i>tyrosine hydroxylase</i>)
6-OHDA	6-hidroksidopamīns (<i>6-hydroxydopamine</i>)

PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PROMOCIJAS DARBA TĒMU

Publikācijas

I. Jansone B, Kadish I, van Groen T, **Beitnere U**, Moore D R, Plotniece A, Pajuste K, Klusa V. A novel 1,4-dihydropyridine derivative improves spatial learning and memory and modifies brain protein expression in wild type and transgenic APP. *PLoS One*. 2015 Jun 4;10(6):e0127686. doi: 10.1371/journal.pone.0127686. eCollection 2015.

II. **Beitnere U**, Dzirkale Z, Isajevs S, Rumaks J, Svirskis S, Klusa V. Carnitine congener mildronate protects against stress - and haloperidol-induced impairment in memory and brain protein expression in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2014 Dec 15;745:76-83. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.014. Epub 2014 Oct 17

III. **Beitnere U**, van Groen T, Kumar A, Jansone B, Klusa V, Kadish I. Mildronate improves cognition and reduces amyloid- β pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci Res.* 2014 Mar; 92(3):338-46. doi: 10.1002/jnr.23315.

IV. Klusa V, **Beitnere U**, Pupure J, Isajevs S, Rumaks J, Svirskis S, Dzirkale Z, Kalvinsh I. Mildronate and its neuroregulatory mechanisms: targeting the mitochondria, neuroinflammation, and protein expression. Review. *Medicina (Kaunas)*. 2013; 49 (7):301-9.

V. Klusa V, Muceniece R, Isajevs S, Isajeva D, **Beitnere U**, Mandrika I, Pupure J, Rumaks J, Jansone B, Kalvinsh I, Vinters HV. Mildronate enhances learning/memory and changes hippocampal protein expression in trained rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013 May; 106:68-76. doi: 10.1016/j.pbb.2013.03.012. Epub 2013 Mar 26.

VI. Isajevs S, Isajeva D, **Beitnere U**, Jansone B, Kalvinsh I, Klusa V. Mildronate as a regulator of protein expression in a rat model of Parkinson's disease. *Medicina (Kaunas)*. 2011; 47 (10):552-9.

VII. Klusa V, Isajevs S, Svirina D, Pupure J, **Beitnere U**, Rumaks J, Svirskis S, Jansone B, Dzirkale Z, Muceniece R, Kalvinsh I, Vinters HV. Neuroprotective properties of mildronate, a small molecule, in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci.* 2010 Nov 9; 11 (11):4465-87. doi: 10.3390/ijms11114465.

Ziņojumi

Starptautiskās konferencēs

1. Jansone B, Kadish I, van Groen T, **Beitnere U**, Plotniece A, Moore D R, Pajuste K, Klusa V. Cognitive-enhancing effect of the novel 1,4-dihydropyridine derivative in

male C57Bl/6Jmice. World Congress on NeuroTherapeutics (DDDn) Dilemmas, Debates, Discussions. September 4th – 7th, 2014, Basel, Switzerland.

2. **Beitnere U**, Dzirkale Z, Isajevs S, Timšāne S, Svirskis S, Klusa V. Effect Carnitine-mimicking drug mildronate protects against haloperidol-induced disturbances in memory and brain protein expression. Neuronus 2014 IBRO & IRUN Neuroscience Forum. April 25th – 27th, 2014, Krakow, Poland.

3. **Beitnere U**, Mandrika I, Isajevs S, Isajeva D, Pupure J, Švarcbahs R, Rumaks J, Svirskis Š, Jansone B, Muceniece R, Kluša V. Influence of Mildronate, an azabutYRObetaine analogue, on the expression of trained-rat hippocampal proteins. 7th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair. May 2nd - 5th 2012, Potsdam, Germany. Abstract-XCD, PIII-33.

4. **Beitnere U**, Isajevs S, Svirina D, Sausa S, Rostoka E, Klusa V. Neurorestorative properties of mildronate in the rat model of Parkinson's disease. 24th European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress. September 3rd-7th, 2011, Paris, France. Abstract, J. European College of Neuropsychopharmacology, 2011, vol.21, Suppl. 3, S268-S269.

5. Paskevica A, Isajevs S, Svirina D, Pupure J, Rumaks J, Svirskis Š, Dzirkale Z, **Beitnere U**, Jansone B, Klusa V. Long-term effects of mildronate on the protein expression in a rat model of Parkinson's disease. 10th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, March 9th-13th, 2011, Barcelona, Spain. Poster presentations NR 502. S. Karger, Medical and Scientific Publishers, 1067 pp.

6. Isajevs S, Svirina D, Pupure J, Rumaks J, Svirskis Š, Jansone B, **Beitnere U**, Sauša S, Kluša V. Mildronate's neuroprotective action mechanisms in Parkinson's diseases model. United Latvian World III congress. October 24th – 27th, 2011, Riga, Latvia. Abstract book Nr 29

7. Klusa V, Pupure J, Isajevs S, Svirina D, **Beitnere U**, Jansone B, Rumaks J, Svirskis S, Vilskersts R, Kalvinsh I. Neuroprotective effect of mildronate, a mitochondria-targeted drug, in Parkinson's disease model in rats. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology „Bridging Basic and Clinical Pharmacology”, Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, July 17th-23rd, 2010, Copenhagen, Denmark. 107 (Suppl.1), Paper No. 1746, 1465 pp.

8. Klusa V, Isajevs S, Pupure J, Svirina D, Rumaks J, Svirskis S, Jansone B, Muceniece R, Dzirkale Z, **Beitnere U**, Kalvinsh I. Neuroprotective activity of small molecule mildronate in Parkinson's disease rat model: focus on neuronal and glial markers.

10th International Neuroimmunology Congress, October 25th-30th, 2010, Barcelona (Sitges), Spain. Poster presentations 106; Journal of Neuroimmunology (2010), vol 228/1-2: 176.

Vietējās konferencēs

1. Folkmane E, **Beitnere U**, Timšāne S, Dzirkale Z, Kluša V. Regulation of Hippocampal BDNF expression by mildronate in haloperidol-amnesia test in rats. Latvijas Universitātes 72. Zinātniskās konferences Medicīnas sekcija. 14. februāris, 2014. Tēžu apkopojums, 26. lpp.

2. **Beitnere U**, Mandrika I, Isajevs S, Isajeva D, Švarcbahs R, Rumaks J, Svirskis Š, Jansone B, Muceniece R, Kluša V. Proteīnu ekspresijas modifikācijas trenētām žurkām. Latvijas Universitātes 70. Zinātniskās konferences Medicīnas sekcija. 2. februāris, 2012. gads. Tēžu apkopojums, 26. lpp

IEVADS

Pieaugošā neurodeģeneratīvo slimību izplatība un ar šīm slimībām saistītā kognitīvo spēju un dzīves kvalitātes pasliktināšanās joprojām aktualizē jautājumus par jaunu neuroprotektantu meklējumiem.

Neurodeģeneratīvās slimības - Alcheimera slimība, Pārkinsona slimība u.c., kas izraisa smagus kognitīvos traucējumus līdz pat demencei, ir problēma visā pasaulē ne vien slimniekam un tuviniekiem, bet visai sabiedrībai (Wimo et al., 2013). Zāļu vielu meklējumi, kas spētu aizsargāt neironus un sinapses no bojājumiem, kas savukārt ietekmē atmiņas procesus, vēl joprojām ir 21. gadsimta izaicinājums zinātnē. Ir zināms, ka līdzīgi no atmiņas traucējumiem cieš pacienti pēc insulta, šizofrēnijas slimnieki, lietojot spēcīgus neiroleptiskus, kā arī pēc hroniska stresa.

Līdz šim lietotie medikamenti spēj tikai īslaicīgi aizkavēt redzamos neurodeģeneratīvo slimību simptomus, kamēr neironi progresīvi turpina iet bojā, pasliktinot kognitīvās spējas. Piemēram, Pārkinsona slimības farmakoterapijā visizmantotākā zāļu viela levodopa tikai uz laiku var aizvietot iztrūkstošo dopamīnu, bet daudzās blaknes, īpaši diskinēzijas, kā arī nespēja apturēt dopamīna producējošo šūnu bojāeju (Poewe et al., 2010), liek apšaubīt šādu zāļu vielu plašu pielietošanu.

Mūsdienu skatījumā ir liela nepieciešamība radīt tādas zāļu vielas, kas spētu iedarboties uz vairākiem smadzeņu šūnas regulējošiem proteīniem, lai aktivētu endogēnos neiroģenerācijas procesus, un kavētu atmiņas traucējumu attīstību. Būtu jāmeklē vielas, kas regulētu intracelulāros procesus jau agrīno neurodeģeneratīvo procesu attīstībā, fokusējot uz bioķīmiskām kaskādēm, kas iesaistītas neuroiekaisumā, mitohondriju funkcionēšanā, proteīnu konformācijas regulācijā, sinaptiskās plasticitātes nodrošināšanā. Tādējādi galvenais zāļu vielu uzdevums ir atrast regulēt šūnas mērķus (*targets*), kas ir paši būtiskākie, lai saglabātu šūnas dzīvotspēju.

Cilvēka genoma pētījumi rāda, ka ir iespējami vismaz 3000 līdz 5000 jaunu zāļu vielu mērķvietu organismā. Tie ir receptori, enzīmi, tajā skaitā proteāzes, kināzes un fosfatāzes, augšanas faktori, hemokīni, neironu struktūrproteīni, glija, un daudzi citi (World Health Organization Report, 2002). Jaunus šūnas mērķus var atrast arī ar jau zināmiem preparātiem, pielietojot tās citai slimībai (Ashburn and Thor, 2004, Corbett et al., 2012). Tāpēc arī šajā darbā liela pētījuma daļa veltīta Latvijā sintezētajam kardioprotektīvās darbības preparātam

mildronātam. Kaut arī bija zināmas norādes par tā labvēlīgo ietekmi uz cerebrālās asinsrites saslimšanām un centrālās nervu sistēmas (CNS) funkcijām (Sjakste et al., 2005), mildronāta spēja regulēt smadzeņu darbību, un vēl jo vairāk, regulēt mērķa proteīnus līdz šim bija nezināms un neizpētīts lauks. Mūsu darbā pētījām arī jaunu dihidropiridīna (DHP) atvasinājumu AP-12, kas iepriekš *in vitro* bija uzrādījis kalcija kanālu antagonizējošu efektu.

Mildronāta un AP-12 ietekmi uz CNS pētījām dažādos neurodeģenerācijas modeļos laboratorijas dzīvniekiem, nosakot to uzvedību, atmiņas veidošanos un biomarkieru ekspresiju smadzeņu struktūrās. Darbā galvenokārt fokusējamies uz biomarkieriem, kas liecina par sinaptisko plasticitāti, neurotransmiteru atslēgenzīmiem, neuroiekaisumu.

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedrā un Alabamas universitātes Birmingemā, Šūnu attīstības un integratīvās bioloģijas katedrā (ASV).

Darba mērķis

Noskaidrot divu modeļvielu – mildronāta un jauna DHP atvasinājuma AP-12 ietekmi uz neurodeģenerācijas un neiroreģenerācijas procesos iesaistīto biomarkieru proteīnu ekspresijas izmaiņām modeļdzīvnieku smadzenēs, saistot tos ar uzvedības izmaiņām, lai identificētu svarīgākos šūnas mērķus jaunām farmakoterapijas stratēģijām neurodeģeneratīvo slimību protekcijā un ārstēšanā.

Darba uzdevumi

Noteikt pētāmo vielu – mazo molekulu mildronāta un DHP atvasinājuma AP-12 ietekmi uz dzīvnieku CNS funkcijām modeļdzīvniekiem

1. *In vivo*: uzvedību (atmiņu, aktivitāti, bailēm):
 - 1.1. Pārkinsona slimības modelī žurkām (6-OHDA intrastriatāli);
 - 1.2. Alcheimera slimības transgēno APP_{SwDI} peļu modelī;
 - 1.3. Imobilizācijas stresa modelī žurkām;
 - 1.4. Haloperidola amnēzijas modelī žurkām.
2. *Ex vivo*: smadzeņu biomarkieru proteīnu ekspresijas, kas ietverti:
 - 2.1. Sinaptiskajā plasticitātē – ar augšanu saistīto proteīnu **43 GAP-43**, **sinaptofizīnu**, **Homer-1**, smadzeņu neirotrofo faktoru **BDNF**; gliju šūnu neirotrofo faktoru **GDNF**;

- 2.2. Neuroiekaisumā – inducējamā slāpekļa oksīda sintāzi **iNOS**, mikroglijas aktivācijas marķieri **Iba-1**, astroglijai specifisko – glijas fibrillāro skābo proteīnu **GFAP**, neirālo šūnu adhēzijas molekulu **NCAM**;
- 2.3. Čaperonu un ubikvitīna-proteosomas sistēmā – karstuma šoka proteīnu 70 **HSP70**, regulējošo proteīnu ubikvitīna-proteosomu degradācijas sistēmā – **ubikvitīnu**;
- 2.4. Enzīmu ekspresiju – tirozīna hidroksilāzi **TH**, glutamāta dekarboksilāzi 67 **GAD67**, acetilholīnesterāzi **AChE**;
- 2.5. Transkripcijas faktoru – c-jun/aktivizējošo proteīnu-1 **AP-1**;
- 2.6. Šūnas proliferāciju biomarķieri – bromodeoksiuridīnu **BrdU/nestīns** un **Notch-3**;
- 2.7. Alzheimeras slimības patoloģijas marķieri – β -amiloīdu peptīdu $A\beta_{4-10}$ **W0-1**.

Darba hipotēze

Mildronāts un DHP atvasinājums AP-12 ir mazās molekulas, kuru struktūras determinantes (uzlādētie elementi, kā arī lipofilā daļā AP-12 savienojuma gadījumā) ir būtiskas, lai aizsargātu šūnu pret neurodeģeneratīviem procesiem un stimulētu neiroreģenerāciju.

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

1. Mildronāts mazākās devās (10 – 50 mg/kg) nekā tās, ko izmanto kardioprotekcijā, spēj regulēt smadzenēs sinaptiskā plasticitātē iesaistīto proteīnu ekspresiju un tādējādi aizsargāt no neurodeģeneratīviem procesiem un atmiņas traucējumiem dažādos neurodeģerācijas modeļos.
2. Mildronāta izraisītā apmācību procesu paātrināšana žurkām lielā mērā pamatojas uz savienojuma spēju modulēt/stimulēt neiroreģenerācijas proteīnu ekspresiju smadzeņu struktūrā hipokampā.
3. DHP atvasinājums AP-12, šķērsojot hematoencefālisko barjeru, nodrošina smadzeņu sinaptiskā plasticitātē iesaistīto proteīnu ekspresiju un tādējādi aizsargā no atmiņas traucējumiem transgēnajā Alzheimeras slimības modelī pelēm.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Neurodeģeneratīvo slimību izplatība

Cilvēku skaits, kuri cieš no kādas neiroloģiskas saslimšanas Eiropā ir milzīgs. Ņemot vērā visas vecumu grupas Eiropas dalībvalstīs, tie ir 38% no populācijas jeb 164,8 miljoni gadā (Wittchen et al., 2011). Līdz ar dzīvildzes pagarināšanos sevišķi pieaug neurodeģeneratīvo slimību gadījumi, kas skar 1-2 % no populācijas, skaitļiem strauji pieaugot pēc 65 gadu vecuma. Kopējās izmaksas, kas ir saistītas ar neiroloģiskajām saslimšanām Eiropā, pēc aptuvenām aplēsēm, 2010. gadā bija 798 miljardi EUR. Izmaksām pieaugot, veidojas nopietns ekonomisks slogs visai sabiedrībai (Olesen et al., 2012). Kā zināms, visizplatītākās neurodeģeneratīvās slimības – Alcheimera slimības (turpmāk tekstā starptautiski pieņemtais saīsinājums no angļu valodas AD, *Alzheimer's disease*) kopējais slimnieku skaits pasaulē jau 2020. gadā varētu būt ap 42,3 miljoni, bet vēl pēc 20 gadiem tas varētu sasniegt pat 81,1 miljonu (Ferri et al., 2005). AD pieder pie neurodeģeneratīvajām slimībām, kas biežāk sastopama gados vecākiem cilvēkiem pēc 65 gadiem, lai gan arvien vairāk atklāj arī agrīno formu (*early-onset*), kas skar cilvēkus jau pēc 40 gadiem. AD agrīnie simptomi ir ožas un īstermiņa atmiņas pasliktināšanās, aizmāršība, paaugstināta uzbudināmība, depresija un bezmiegs, līdz atmiņas pasliktināšanās pāris gadu laikā pilnībā izmaina cilvēka spēju dzīvot patstāvīgi. Atmiņas pasliktināšanās pieder arī pie normālas novecošanās pazīmēm, tomēr AD gadījumā tās būtiski atšķiras tieši straujās un neatgriezeniskās progresēšanas dēļ.

Pārkinsona slimība (turpmāk tekstā starptautiski pieņemtais saīsinājums no angļu valodas PD, *Parkinson's disease*) ir otra izplatītākā neurodeģeneratīvā slimība, kas raksturojas ar progresīvu dopamīnerģisko neironu bojāeju smadzeņu struktūrā *substantia nigra* (SN) un neurotransmitera dopamīna izsīkumu struktūrā *corpus striatum* (Moore et al., 2005). PD raksturīgie simptomi ir traucējumi motorajā sistēmā, kas sākas ar ekstremitāšu un/vai žokļa trīci, muskuļu stīvumu (rigitāti), un tālāk progresē kā kustības traucējumi no bradkinēzijas līdz akinēzijai, stājas un līdzsvara nestabilitātei. Novērojamas arī rokraksta izmaiņas, neskaidra runa. Kā slimības pirmie simptomi novērojami miega traucējumi, seksuālā disfunkcija, vispārējs nogurums, ožas traucējumi, trauksme un depresija. PD līdzīgi kā AD gadījumā tiek biežāk diagnosticēta gados vecākiem cilvēkiem pēc 60 gadiem, retākos gadījumos saslimšana piemeklē arī jaunākus cilvēkus ap 40 gadiem (*early onset PD*).

Gan AD, gan PD patoloģija attīstās krietni pirms to simptomu manifestācijas. Slimības progresēšanu var iedalīt presimptomātiskajā un simptomātiskajā fāzē, kur pēdējā fāze ir kā redzamā aisberga virsotne, kur liela daļa sinapšu un neironu ir jau aizgājuši bojā (Braak et al., 2005). Tas ir straujš kritiens, kad no viegliem atmiņas traucējumiem (*mild cognitive impairment*) tie pārvēršās jau daudz nopietnākos, neļaujot atcerēties zināmo informāciju, un izveidot jaunu atmiņu. Tikai agrīna farmakoterapija, pie pirmo simptomu parādīšanās, vieš cerību, ka slimības tālāku progresēšanu var aizkavēt.

1.2. Neurodeģeneratīvie procesi smadzenēs

Neurodeģenerācija ir termins, kas aptver progresējošu neironu struktūras un funkciju zudumu, tajā skaitā sinapšu bojāeju. Šie procesi ir kopīgi visām pēc simptomiem ļoti atšķirīgām neurodeģeneratīvām slimībām. Tradicionāli sporādiskās neurodeģeneratīvās slimības rašanos skaidro ar kādu no neurotransmiteru sistēmas defektiem (PD galvenokārt ar dopamīnerģisko, AD ar holīnerģisko sistēmu), uz ko tad pamatojās līdzšinējā farmakoterapija. Uz kādu laiku daļai pacientu šī terapija mazina slimības simptomus, bet tā neapstādina slimības progresēšanu, toties zāļu vielu ilgstoša lietošana nes līdzīgu veselumu virkni smagu blakusefektu.

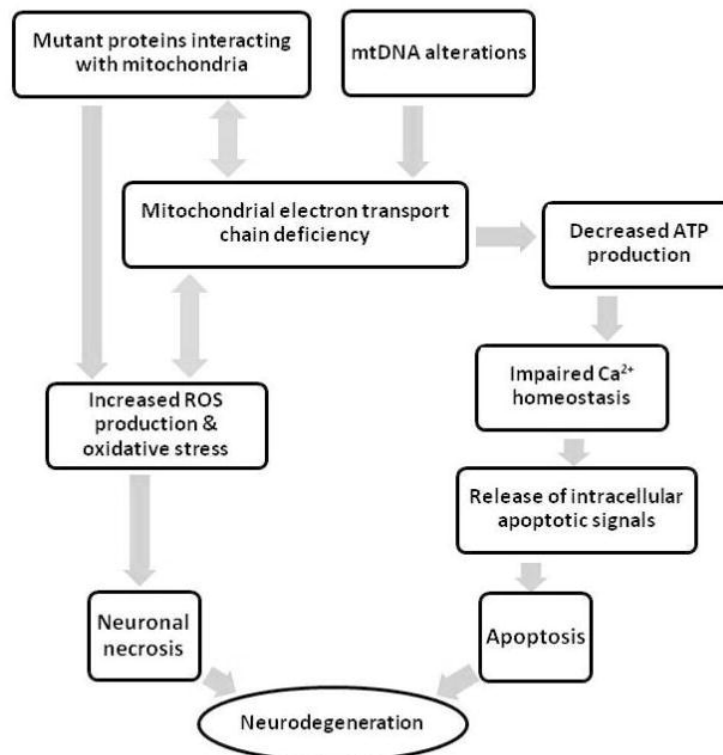
Mūsdienu neirozinātņu skatījumā terapija būtu jāvērs uz šūnas intracelulārajiem procesiem, kas ietver daudzas signālceļu kaskādes, kas nodrošina šūnas sarežģītos integritātes procesus. Izejot no ierindas kaut vienam no kaskādes posmiem, rodas būtisks disbalanss, kas var novest līdz šūnas patoloģijai un bojāejai. Šie patoloģiskie procesi ir: 1) mitohondriju disfunkcija un ar to saistītais oksidatīvais stress, 2) neuroiekaisums, kur lielu lomu spēlē hroniska mikroglijas aktivizācija, 3) atsevišķu proteīnu nepareizas konformācijas veidošanās un agregācija šūnā, 4) ubikvitīna-proteosomas sistēmas disfunkcija (proteīnu nepietiekoša aizvākšana un degradācija) un molekulāro čaperonu ekspresijas izmaiņas, 5) transportproteīnu defekti, 6) sinaptiskajā plasticitātē iesaistīto proteīnu ekspresijas izmaiņas, 7) neirodeģeneratīvo procesu samazināšanās.

Līdz šim vēl nav noskaidrots, ar ko un kad tieši sākas neirodeģeneratīvo procesu kaskāde. Tikai slimības agrīno formu (*early-onset*) gadījumā ir atklāts, ka tā cēlonis ir konkrētu gēnu mutācijas. Lielākā daļa neirodeģeneratīvo slimību ir multifaktorālas, un tām ir raksturīgas poliproteīnu patoloģijas.

Visu minēto procesu regulācija un balansa nodrošināšana šūnā ir mērķis, uz ko fokusēt farmakoterapiju, lai mazinātu simptomus un apstādinātu tālāku slimības progresēšanu.

1.2.1. Mitohondriālie bojājumi

Mitohondriji nodrošina ne vien enerģiju, bet arī regulē šūnas ciklus – proliferāciju un apoptozi. Mitohondriji ir organellas, kas spēlē centrālo lomu bioķīmiskās enerģijas piegādē, producējot adenozintrifostāta (ATF) molekulas, un ir svarīgs brīvo radikāļu un signālmolekulu (t.sk., kaspāžu enzīmu aktivācijā, kuri regulē apoptozi, nekrozi un iekaisumus) avots (Cadenas, 2004). Ir zināms, ka daudzas neirodeģeneratīvās slimības (1. attēls) uzrāda patoloģisku mitohondriju morfoloģiju un bioķīmisku disfunkciju (Lezi and Swerdlow, 2012).



1. attēls. Mitohondriju saistība ar neirodeģeneratīviem procesiem

(Lezi and Swerdlow, 2012)

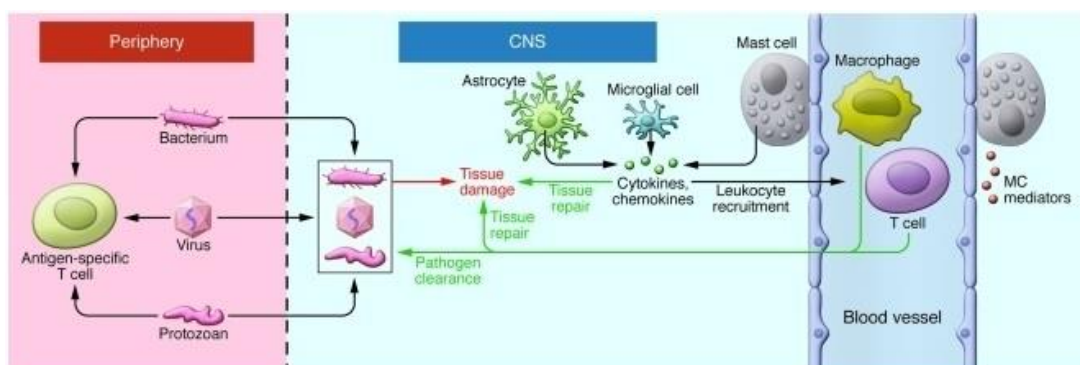
Pēdējo divu desmitgadu laikā ir izvirzīta AD mitohondriālās kaskādes hipotēze, kuras pamatā ir dati par mitohondriju disfunkciju un to ciešo saistību ar mātes ģenētisko materiālu (Swerdlow et al., 2010). PD pacientiem, kā arī PD dzīvnieku modeļiem ir atrasta mitohondriālā disfunkcija. Tā parādās agri gan sporādiskajā, gan ar iedzimtību saistītajā PD patoģenezē (Bueller, 2009). Pētījumos ir atrasts, ka PD pacientu *post mortem* audos ir pazemināta aktivitāte specifiskai mitohondriālā NADH ubikvitīna reduktāzei, kas norāda uz kompleksa I disfunkciju elektronu transportu ķēdē un tam sekojošu nepietiekamu ATF sintēzi.

Mitochondriju disfunkcija rada šūnas oksidatīvo stresu. Skābekļa reaktīvie savienojumi (*reactive oxygen species*; ROS) tiek producēti mitohondriju elektronu transporta ķēdes bojājuma gadījumā un tie bojā lipīdus, proteīnus un DNS (Zhang et al., 1999).

Visu šo problēmu dēļ ir būtiski runāt par farmakoterapiju, kas vērsta uz mitohondriju funkciju regulēšanu un aizsargāšanu (DiMauro and Mancuso, 2007).

1.2.2. Neuroiekaisuma nozīme

Neurodeģeneratīvās slimības saistās ar hronisku neuroiekaisumu un paaugstinātu iekaisuma mediatoru ekspresijas līmeņi (Nagatsu and Sawada, 2006). Akūtas neiromūnās atbildes laikā ir raksturīga mikroglijas aktivācija, kas maina mikrogliju uz fagocītveidīgu fenotipu, kas izdala pastiprināti citokīnus un hemokīnus (Block and Hong, 2005). Īslaicīgs neuroiekaisums iniciē neuroprotektīvu darbību, jo iekaisuma mediatori sekmē neironālo izdzīvošanu (Cherry et al., 2014), tad ilgstošs jeb hronisks iekaisums rada pārmērīgu aktivāciju citokīnu izdali (2.attēls), kas paaugstina oksidatīvo stresu un ir traumējoši



apkārtējām šūnām (Ransohoff and Brown, 2012). Tātad kritisks ir neuroiekaisuma ilgums smadzenēs.

2.attēls. Glijas funkcijas CNSā

(Ransohoff and Brown, 2012)

Pēdējos gados ir pastiprināta interese par mikrogliju izpēti, kas ir ļoti plastiskas imūnās sistēmas šūnas, un, lai gan to aktivācija aizsargā audus un palīdz tos sadziedēt, tomēr ilgstoša aktivācija tiek saistīta ar neurodeģeneratīvajām slimībām (Lull and Block, 2010). Mikroglijas aktivācijas noteikšanai audos izmanto jonizēto kalcija pievienojošo adaptera molekulu jeb Iba-1 kā marķieri, kas ir specifisks šīm šūnām (Sasaki et al., 2001). Otra tikpat nozīmīga glijas šūna ir astrocīti jeb astroglija, kas ir visbiežāk izplatītās gliju šūnas zīdītāju smadzenēs.

Tās kalpo kā homeostāzes uzturētājas, baro nervu šūnas ar nepieciešamajām uzturvielām, un kopā ar endotēlija šūnām stiprina hematoencefālisko barjeru (Nedergaard et al., 2003). Traumu gadījumā astroglia palīdz atjaunoties audiem, veidojot arī t.s. gliju rētaudus (*glial scar*), kas ir astrocītu skaita palielināšanās CNS neironu bojāejas dēļ. Tomēr arī astroglia, kad tā ir pāraktivēta, izdala lielu skaitu citokīnu un hemokīnu, kas var veicināt neuroiekaisumu un tālāk arī neurodeģeneratīvas slimības, kā AD (Li et al., 2011, Verkhratsky et al., 2013). Gliju fibrilārais skābais proteīns (GFAP) ekspresija reprezentē astroglijas aktivāciju un gliozī neurodeģeneratīvos procesos (Eng and Ghirnikar, 1994).

Nav pierādījumu, ka neuroiekaisumā kāds konkrēts citokīns spētu veicināt, vai pat radīt neurodeģeneratīvās slimības, tomēr citokīnu mediēts iekaisums un radītā neirotoksicitāte spēj ietekmēt slimības progresēšanu veselā virknē neurodeģeneratīvo saslimšanu (Mrak and Griffin, 2005). Tajā pat laikā ir arī daudz datu par glijas ietekmi uz toksisko proteīna agregātu aizvākšanu (Marinova-Mutafchieva et al., 2009). Šo proteīnu marķieru noteikšana neurodeģeneratīvos procesos, meklējot iespējamo zāļu vielu, palīdz izprast ietekmi uz neuroiekaisuma apmēru un to korelēšanu ar toksisko proteīna daudzumu.

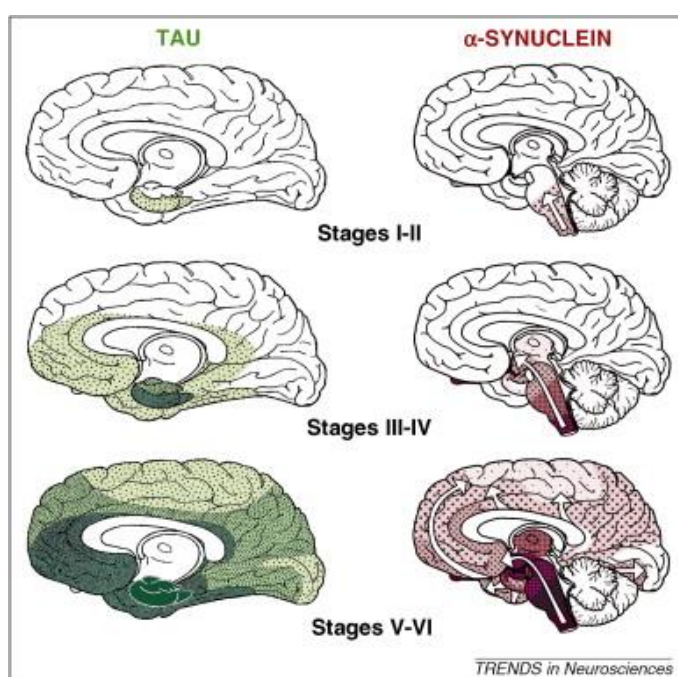
1.2.3. Proteīnu agregācija un akumulācija smadzeņu šūnās

Neurodeģeneratīvās slimības ir poliproteīnu patoloģijas, jo nepareizas konformācijas jeb misfoldētu proteīnu un vai peptīdu agregācija un uzkrāšanās smadzeņu šūnās ir atrasta gan AD, gan PD un vēl daudzu citu neurodeģeneratīvo slimību gadījumā.

Tau, β -amiloīds un α -sinukleīns ir visbiežāk sastopamie misfoldētie proteīni (Goedert and Spillantini, 2006). Ilgus gadus zinātnieku vidū ir dominējusi t.s. amiloīdoģenēzes hipotēze, kurā β -amiloīds ir galvenais proteīns, kas rada AD raksturīgo toksicitāti un atmiņas traucējumus (Hardy and Higgins, 1992). β -amiloīdu ir normāli šūnā esoši peptīdi, kuri rodas no amiloīda prekursora proteīna (APP) secīgas proteolītiskas enzīmu – β - un γ -sekretāzes šķelšanās ceļā. Šis šķelšanas process rezultējas ar vairāku dažāda izmēra A β peptīdu produkciju, kur A β 40 ir visizplatītākā forma, bet A β 42 ir vistoksiskākā (Duyckaerts et al., 2009). APP un A β fizioloģiskā funkcija ir komplicēta, un ļoti neliels balansa traucējums var mainīt tā funkcija (Hiltunen et al., 2009). Ir zināms, ka A β piedalās holesterolā transportā (Yao and Papadopoulos, 2002). Daudz ir pētīta apolipoproteīna E gēna saistīšanās ar amiloīdu (Wisniewski and Frangione, 1992). Izoformas ApoE4 divu alēļu nēsētājiem ir atklāta par 10 - 30 % lielākā varbūtība saslimt ar AD vecumā pēc 75 gadiem (Corder et al., 1993).

A β peptīdi spēj agregēties šķīstošos oligomēros, kuriem mēdz būt vairākas formas. Šie oligomēri spēj veidot nepareizas konformācijas, akumulēties šūnā un izplatīties smadzenēs. Šobrīd daļa zinātnieku atgriežas pie vecākām hipotēzēm, kas postulē, ka noteiktas formas misfoldētie oligomēri inducē arī citus A β oligomērus izveidot nepareizo konformāciju (Jucker and Walker, 2011). Tas savukārt pieņem, ka toksiskais A β ir prioniem līdzīga molekula (Harper and Lansbury, 1997).

Otra izplatītākais patoloģijas marķieris AD gadījumos - *tau* proteīns, kas normāli funkcionē, stabilizējot mikrocaurulītes. *Tau* ir plaši izplatīts CNS neironos, bet AD gadījumā ir hiperfosforilētā formā (3. attēls), kas agregējas neurofibrilāros samezgļojumos un izplatās smadzeņu struktūrās (Braak and Braak, 1991).



3.attēls. Agregēto proteīnu izplatība AD un PD smadzenēs 6 stadijās (I-VI)

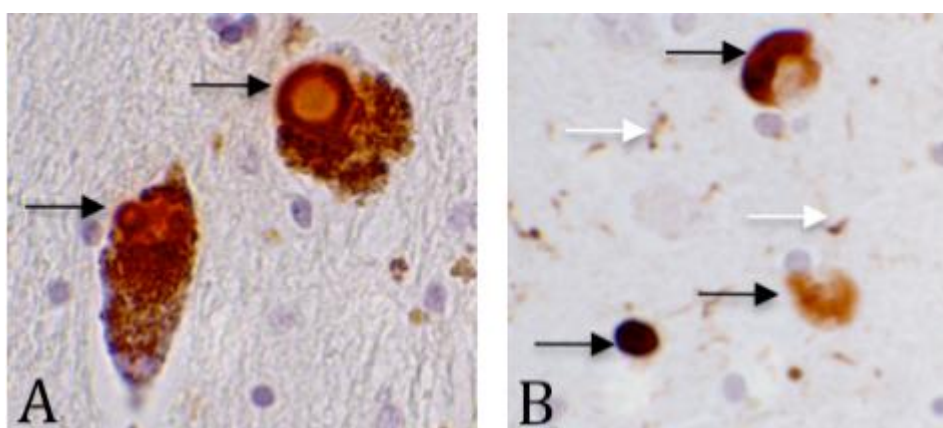
Pa kreisi - *tau* AD (pa kreisi) un α -sinukleīna PD izplatība smadzenēs (pa labi) (Braak et al., 2003).

Iekššūnu ieslēgumu transports proteīniem *tau*, α -sinukleīnam un hantingtīnam ir līdzīgs prionu izplatībai nervu sistēmā (Goedert et al., 2010), taču ir arī būtiskas atšķirības starp prionu slimībām un pārējām misfoldēto proteīnu slimībām. Prioni uzvedas kā infekciozi aģenti, kas var tikt pārnesti starp indivīdiem un pat starp atšķirīgām sugām, radot epidēmijas, un tie spēj izplatīties no perifēriem audiem uz CNS, kur izraisa postošus bojājumus (Collinge and Clarke, 2007). Izplatītāko neurodeģeneratīvo slimību gadījumos, kā AD, PD un citu, infekcioza slimības izplatība nav atrasta.

Pēdējo gadu pētījumi par AD uzrāda, ka pirmie simptomi, kā atmiņas pasliktināšanās, manifestējas krietni pirms pamanāmas proteīnu uzkrāšanās smadzenēs. Izmantojot AD peļu līniju, kurām ir AD raksturīgie sinapšu un kognitīvie bojājumi, pētniekiem no Stenfordas Universitātes ir izdevies atklāt, ka peles, kurām neekspresējās sinapšu virsmas proteīns PirB, bija rezistentas pret sinapšu bojājumiem un atmiņas traucējumiem (Kim et al., 2013). Pirmo reizi tika parādīts, ka šis PirB receptors ar augstu afinitāti piesaista β -amiloīda agregātus, aktivizējot bioķīmisku procesu kaskādi, kas savukārt noved pie sinapšu destrukcijas. Tātad β -amiloīds sāk iznīcināt sinapses vēl pirms tas agregējas plātnītēs.

Klīniskajos pētījumos pārbaudot vairāk nekā 3500 AD slimnieku smadzenes, apstiprināja, ka tieši *tau* proteīns ir saistīts ar atmiņas pasliktināšanās procesiem. Atklājums par *tau* nozīmi kognīcijas traucējumos (Murray et al., 2015), varētu palīdzēt izskaidrot, kāpēc farmakoterapija/ā, kuras stratēģija ir izšķīdināt β -amiloīda peptīdu ar monoklonālu antivielu sauktu par bapineuzumab (vai saīsināti par bapi) klīniskajos pētījumos neuzrādīja kognitīvus uzlabojumus AD pacientiem (Salloway et al., 2014).

Sporādiski izplatītajās neurodeģeneratīvajās slimībās, piemēram, PD neuropatoloģijā, ir raksturīgi α -sinukleīna proteīna agregācija t.s. Levi ķermenīšos (*Lewy body*) un Levi neirītos (4. attēls). Šo proteīnu detektēšana smadzenēs ir nepieciešama diagnozes apstiprināšanai. Šobrīd tas pacientiem iespējams vien *post mortem* audos, bet magnētiskās rezonanses attēlveidošanas (*functional magnetic resonance imaging, fMRI*) sistēmas iespējas strauji attīstās, pieļaujot arī šo proteīnu detektēšanu *in vivo* (Baltes et al., 2011), kas ļaus monitorēt slimības progresēšanu un farmakoterapijas iedarbību uz proteīnu uzkrāšanos.



3. attēls . Levi ķermenīši (melnā bulta) un Levi neirīti (baltā bulta) pozitīvi iekrāsoti pret α -sinukleīna proteīnu PD

A: *substantia nigra*, B: *garoza (cingulate gyrus)*. Attēls no: <http://www.ucl.ac.uk/ukpdc/research-groups/molecular-neuropathology-group>

1.2.4. Ubikvitīna-proteosomas sistēmas un molekulāro čaperonu nozīme

Kopīgā pazīme sporādiskajās neurodeģeneratīvajās slimībās – akumulēt toksiskus proteīnu savienojumus rada jautājumu, vai šo proteīnu aizvākšanas problēmu nevar atrisināt ar pašas šūnas iekšējiem procesiem, tos selektīvi aktivizējot?

Autofāģija ir šūnas galvenais process, kas proteīnu agregātus un bojātās organellas izolē no pārējām šūnām ar dubultmembrānas vezīkulu, sauktu par autofagosomu, un nodrošina to saplūšanu kopā ar lizosomu, kur notiek proteīnu degradācija (Nixon, 2013). Daudzi pētījumi pēdējo 10 gadu laikā rāda, ka autofāģija ir efektīgs mehānisms, kas var palīdzēt selektīvi aizvākt agregētos proteīnus neurodeģeneratīvajos procesos. Vairākas farmakoloģiskas un ģenētiskas stratēģijas ir attīstītas, lai palielinātu autofāģiju šūnās (Menzies et al., 2011). Autofāģiju kontrolē komplekss signalizēšanas mehānisms, kuru globāli var klasificēt kā mTOR-atkarīgu (*Mammalian Target Of Rapamycin*) vai mTOR-neatkarīgu signālceļu. Lai gan mTOR-neatkarīgais signālceļš ir vēl vāji izpētīts molekulārajā līmenī, vairākas zāļu vielas – valprojskābe (antiepileptiska viela), verapamils (antihipertenzīva viela), karbamazepīns (arī antiepileptiska viela), rasveratrols (dabiskais fenols, kas tiek sintezēts vairākos augos), spermidīns (dabisks poliamīna savienojums) un rapamicīns (imūnosupresants, ko izdala augsnes baktērija), ir uzrādījušas spēju pastiprināt autofāģiju, radot neuroprotekciju dažādos slimību modeļos (Sarkar et al., 2009).

Ubikvitīna-proteosomas sistēma (UPS) ir šūnas būtiskākais signālceļš proteīnu degradācijā, kas nodrošina šūnas homeostāzi. Uz UPS nozīmīgumu norāda arī šīs sistēmas komponentu skaits šūnā, kas ir ap 1000, un genomā 5% no visa ģenētiskā materiāla ekspresē proteīnus saistītus ar UPS (Finley, 2009). Lai nerastos uzkrāšanās ar nevajadzīgiem vai nepareizas konformācijas proteīniem, visos eikariotu šūnu kodolos un citoplazmā ir sastopama UPS, kas degradē liekos proteīnus ar proteāžu palīdzību proteolīzes ceļā. Lai nošķirtu vajadzīgos proteīnus no tiem, kurus degradēt proteolīzē, ubikvitīna ligāze pievieno mazu proteīnu ubikvitīnu, kas kalpo kā atpazīšanas zīme. Tas, ka UPS ir atbildīga par lielāko daļu šūnas proteīnu degradāciju, ir papildus apstiprinājums tam, ka UPS traucējumi tiek saistīti ar neurodeģeneratīvajām slimībām (Bingol and Sheng, 2011).

Vēl viens šūnas iekšējais aizsargmehānisms pret nepareizas konformācijas proteīnu veidošanos tiek nodrošināts ar molekulāro čaperonu palīdzību. Tie ir proteīni, kas nosaka, vai proteīna konformācijas kļūdas tiks izlabotas, vai arī nepareizās konformācijas proteīnus novirzīs uz šķelšanu ar UPS palīdzību. No šīs proteīnu grupas visizpētītākie ir karstuma šoka proteīni (*heat-shock proteins*, HSPs). Paaugstināta HSPs ekspresija šūnā ir uzrādījusi

samazinātu proteīnu agregāciju un akumulāciju, un ir uzlabojusi neironu fenotipu peļu modeļos (Adachi et al., 2009). HSPs kopā ar UPS viennozīmīgi norāda uz vēl vienu būtisku farmakoterapeitisko mērķi neurodeģeneratīvo slimību novēršanā.

1.3. Sinaptiskā plasticitāte

Visām neurodeģeneratīvajām slimībām ir raksturīga sinapšu atrofija un attiecīgi ar sinaptisko plasticitāti saistīto proteīnu ekspresijas izmaiņas. Termins “plasticitāte” attiecas uz nervu sistēmas spēju reorganizēt savu saistību ar šūnām funkcionāli un strukturāli. Sinaptiskā plasticitāte ir pamats nervu sistēmas adaptīvajā attīstībā un ir viena no visintriģējošākajām smadzenes īpašībām. Sinapses nav statiskas, tās ir dinamiskas struktūras starp neironiem, kas nepārtraukti mainās atkarībā no neironālās aktivitātes un citām ietekmēm. Ir zināms, ka hronisks stress inducē strukturālas un funkcionālas izmaiņas īpaši smadzeņu struktūrā hipokampā, kas ir galvenā ilglaicīgās atmiņas veidošanās vieta (Cooke and Bliss, 2006). Eksperimentālos modeļos un slimniekiem ar AD, PD, arī Hantigtona slimību vai šizofrēniju ir atklāta sinapšu atrofija (Mesulam, 1999, Pilato et al., 2012). Pētījumā ar pacientiem atklāts, ka 90% gadījumu demences smaguma pakāpe korelē ar pre-sinaptisko termināļu blīvuma samazināšanos vidus frontālajā garozā (Terry R. D. et al., 1991).

Ir pierādījumi par atsevišķiem proteīniem, kas paaugstināti ekspresējas neironālās attīstības laikā, aksonālajā reģenerācijā un piedalās neirītu izaugumu veidošanā, un spēju aizsargāt no neurodeģenerācijas. Piemēram, presinaptiskais vezīkulu proteīns sinaptofizīns, kas nepieciešams neurotransmiteru izdalē no sinapses (Daly et al., 2000). Tā ekspresētais daudzums korelē ar sinapšu blīvumu smadzenēs (Reddy et al., 2005). Cits būtisks proteīns ir sinapšu membrānas proteīns – ar augšanu saistītais proteīns 43 (*growth associated protein 43*, GAP-43). AD gadījumā šo proteīnu ekspresija ir samazināta (de la Monte et al., 1995, Reddy et al., 2005).

Vēl viena intriģējoša proteīnu saime ir t.s. Notch proteīni. No tiem Notch-1 un Notch-3 pastiprināti ekspresējas *dentate gyrus* hipokampā, kas ir viena no retajām neuroģenēzes vietām pieaugušo smadzenēs (Irvin et al., 2001), un par kuriem pēdējos gadus ir bijusi pastiprināta interese, pētot CNS attīstību, kā arī neurodeģeneratīvās slimības (Yoon et al., 2015).

1.3.1. Enzīmu AChE un GAD67 nozīme sinaptiskajā plasticitātē

Holīnērgiskā transmisija un muskarīna tipa acetilholīna receptori ir iesaistīti mācīšanās un atmiņas veidošanas procesos, un transmisijas aktivitātes zudums, kas ir saistīts ar sinapšu bojāeju, ir iemesls atmiņas zudumiem neurodeģeneratīvajās slimībās (Levey, 1996). Acetilholīnam piemīt aktivējoša ietekme sevišķi mācību un atmiņu veidošanās procesā hipokampā un priekšējā garozā, kas tiek saistīts ar samazinātu acetilholīna esterāzes (AChE) aktivitāti (Hasselmo, 2006). AChE hidrolizē acetilholīnu to inaktivējot, tādējādi mazinot acetilholīna receptoru aktivitāti. Agrīnajā attīstībā AChE piedalās neirītu izaugumu veidošanā, ekspresējoties lielos daudzumos fibroblastos un astrocītos (Anderson et al., 2008). AD gadījumā ir novērots kopējā AChE zudums smadzenēs (Berson et al., 2008), bet agrīnajos β -amiloida deponēšanās vietās ir izteikti paaugstināta AChE aktivitāte, kas iespējams, ir skaidrojams ar kalcija homeostāzes traucējumiem (Sberna et al., 1997, Ulrich et al., 1990). Arī apoptozes procesos ir novērota paaugstināta AChE ekspresija (Jing et al., 2008).

Pēdējo gadu pētījumi norāda, ka glutamāts – galvenais aktivējošais neurotransmiters zīdītāju CNS, kas regulē kalcija plūsmu šūnā un tādējādi aktivējot sinapses, piedalās neuroģenēzē, sinaptoģenēzē un neironālajā izdzīvošanā. Glutamāts regulē arī apoptozi, iedarbojoties uz NMDA receptoriem (Kwon and Sabatini, 2011, Suzuki et al., 2006). Sinaptiskajā plasticitātē ne vien neurotransmitterim, bet visai glutamāterģiskai sistēmai ir nozīme, īpaši šīs sistēmas atslēgenzīmam – glutamāta dekarboksilāzei 67 (GAD67), kas pārvērš glutamātu par inhibējošo γ -aminosviestskābi (GABA). Tādējādi GAD67 tiek izmantots kā marķieris, lai noteiktu inhibējošo neironu aktivitāti. Jo vairāk GAD67 ir ekspresējies, jo vairāk sintezējās GABA un izpaužās inhibējošais efekts uz sinapsēm (Fukuda et al., 1998). Ir novērots, ka līdz ar novecošanos arī GAD67 ekspresija CA1 reģionā hipokampā samazinās (Hwang et al., 2008).

1.3.2. Adhēzijas molekulas

Sinaptisko komunikāciju nosaka arī šūnas adhēzijas molekulu ekspresija uz šūnas membrānas. NCAM (*neural cell adhesion molecule*) ir glikoproteīns gan neironos, glijā, muskuļšūnās, gan dabiskajās galētājšūnās (*natural killer cells*). NCAM ir nozīmīgs dažādos smadzeņu attīstības posmos, kas norāda uz to nozīmīgumu šūnu migrēšanā, neirītu izaugumu veidošanā un sinaptiskajā plasticitātē. Ir atklāts, ka atmiņas traucējumus var radīt neirālo šūnu adhēzijas molekulu nepietiekoša ekspresija hipokampā. Piemēram, pelēm ar izslēgtu NCAM

gēnu bija statistiski ticami sliktāki rezultāti ūdens labirinta testā (Bisaz et al., 2011). PD gadījumā NCAM uzrāda tiešu efektu uz gliju šūnu neirotrofisko faktoru (*glial derived neurotrophic factor*; GDNF) un neirītu izaugumu veidošanos dopamīnerģiskajos neironos (Cao et al., 2008). Interesanti ir arī tas, ka GAP-43 savukārt spēj regulēt NCAM (Korshunova et al., 2007, Meiri et al., 1998).

1.3.3. Neurotrofie faktori

Neurotrofini nodrošina sinaptisko plasticitāti, kā arī neironu augšanu, dzīvotspēju un diferenciāciju centrālajā un perifērajā nervu sistēmā. Šajā molekulu saimē ietilpst nervu augšanas faktors, smadzeņu neirotrofais faktors (BDNF), kā arī neirotrofīns 3 un 4 (Deister and Schmidt, 2006). Tieši BDNF vislabāk raksturo neirotrofo faktoru lomu sinaptiskajā plasticitātē, kā arī potenciālo lomu slimību patoloģijā (Duman and Monteggia, 2006). BDNF spēlē īpaši svarīgu lomu atmiņas procesu veidošanā, jo tas lielā daudzumā ekspresējas hipokampā (Hofer et al., 1990), taču šī proteīna ekspresija līdž ar vecumu samazinās hipokampa CA1 reģiona neironos (Hwang et al., 2006). Izslēdzot BDNF gēnu, novēroja samazinātu ilglaicīgu potencēšanos (*long-term potentiation, LTP*) hipokampa CA1 reģionā (Korte et al., 1995), un vājinātu telpisko atmiņu pelēm (Linnarsson et al., 1997). Tas liecina, ka BDNF ir labs biomarkieris, lai noteiktu neironu dzīvotspēju.

BDNF ir dimērisks proteīns, kas nepieciešams dopamīnerģisko, GABAerģisko, holīnerģisko un serotonīnerģisko neironu augšanai un dzīvotspējai. Izmainīta BDNF ekspresija ir atklāta patoloģiskos traucējumos, piemēram, depresijā un šizofrēnijā (Pillai et al., 2008). Šis neirotrofīns ir sastopams smadzenēs, jo īpaši hipokampā un smadzeņu garozā, tāpēc domājams, ka tas kontrolē garastāvokli, emocijas un kognitīvās funkcijas (Deister and Schmidt, 2006). BDNF darbojas, saistoties ar divu veidu plazmas membrānu receptoriem – tirozīnkināzes receptoru B (TrkB) un nervu augšanas faktora receptoru p75 (p75^{NTR}) (Duman and Monteggia, 2006).

Svarīgs ir arī gliju šūnu neirotrofiskais faktors (*glial derived neurotrophic factor*; GDNF), kas nepieciešami neironu attīstībai un izdzīvošanai. AD pacientu smadzenēs ir atrasts samazināts GDNF un tā receptoru GFR α 1 ekspresija (Konishi et al., 2014), taču visvairāk GDNF saista ar spēju aizsargāt dopamīnerģiskos neironus (Gharib et al., 2013).

1.3.4. Transkripcijas faktori

Pētot proteīnus, kuriem piemīt regulējoša loma sinaptiskajā plasticitātē, tiek pētīti arī transkripcijas faktori, kuru galvenā nozīme ir saistīšanās pie DNS, tādējādi ietekmējot ģenētiskās informācijas transkripciju no DNS uz mRNS.

Proteīns CREB, kas ir cAMP atbildes elementa saistproteīns un transkripcijas faktors, darbojas paralēli Fas II, stiprinot sinapses ilgumu (Davis G. W. et al., 1996). Arī transkripcijas faktori, kas iesaistīti neuroģenēzes procesos – Pax6, Neurog2, Ascl1 un Hes1, ir ar lielu nozīmi šūnas atjaunošanās procesos (Sansom et al., 2009).

Noskaidrots, ka Jun un Fos proteīnus aktivē visi fizioloģiskie un patofizioloģiskie smadzeņu stimuli. Aktivētais c-Jun ietekmē apoptotiskās funkcijas hipokampā, nigrālos un primāri audzētos neironus, kam seko eksicitotoksiska stimulācija un neirona-mērķproteīna ass destrukcija, tai skaitā neurotrofo faktoru samazināšanās. Ir norādes, ka JNKs signālceļā inhibīcija varētu veikt arī neuroprotekciju ar c-Jun aktivācijas apstādīšanu, jo c-Jun/AP-1 var bojāt nervu sistēmu, pastiprināti aktivējot mikrogliju. Tātad mikroglijai ir uzrādīta arī regulējošā nozīme ne tikai neuroiekaisuma procesos, bet arī sinaptiskajā plasticitātē (Morris et al., 2013).

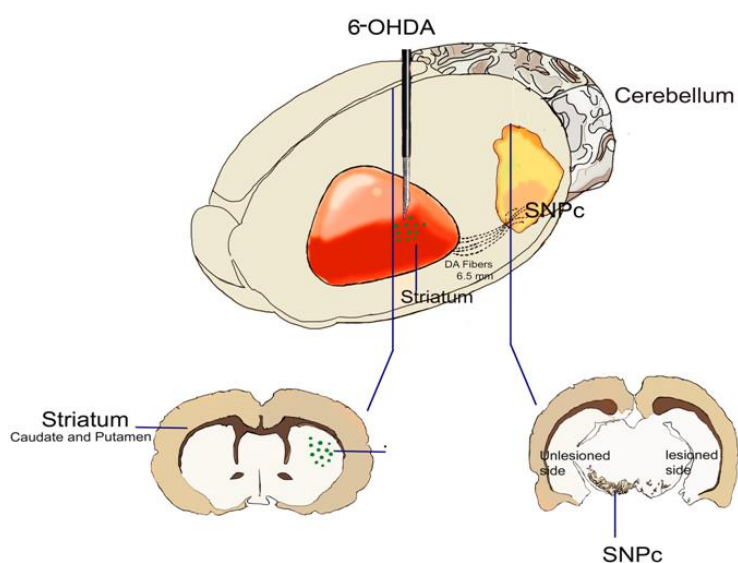
Interesanti dati ir par Homer-1 ekspresijas līmeņa hipokampā saistību ar mācīšanos, kas tika pārbaudīti ar Homer-1 *knock-out* un pastiprinātas Homer-1 ekspresijas pelēm. Atklājās, ka Homer-1 delēcija izraisīja dzīvniekos nespēju mācīties. Savukārt pārekspressija neizraisīja nekādus traucējumus mācīšanās procesā (Wagner et al., 2014).

1.4. Neurodeģeneratīvo slimību modelēšana

Eksperimentālie dzīvnieku modeļi ļauj analizēt slimības izraisītās bioķīmiskās un morfoloģiskās izmaiņas dzīvnieka organismā *in vivo*, ļauj noteikt zāļu vielu ietekmes un mehānismus, kā arī analizēt audus *ex vivo*. Dzīvnieku modelēšana ir zinātnieku mēģinājumi ietvert vairākas raksturīgās slimības iezīmes (Phillips et al., 2009). Šai stratēģijai ir lielas priekšrocības, tomēr nedrīkst aizmirst, ka neviens dzīvnieku modelis nav identisks cilvēka patofizioloģiskajiem mehānismiem.

1.4.1. PD modelis

PD modeli var veiksmīgi izraisīt ar 6-OHDA (6-hidroksidopamīna) intrastriatālu ievadišanu. Šis ir viens no visbiežāk izmantotajiem PD modeļiem, jo izraisa dopamīna producējošo šūnu bojāeju nigrostriatālajā sistēmā, ko uzskata par PD rašanās iemeslu. 6-OHDA pats par sevi endogēnā dopamīna metabolīts. Neirotoksīns 6-OHDA nešķērso hematoencefālisko barjeru, tādēļ to injicē smadzeņu struktūrā. Neironi iet bojā no superoksīda radikāļiem, kas rodas kā blakusprodukti. 6-OHDA vietā var izmantot arī MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridīns). Abi toksīni izraisa dopamīnu producējošo neironu bojāeju (Jackson-Lewis et al., 2012).



6.attēls. Neirotoksīna 6-OHDA intrastriatāla ievadišana

Striatums ir aksonāli savienots ar smadzeņu struktūru *substantia nigra*, kas ir galvenā dopamīnerģisko neironu bojāejas vieta PD gadījumā.

PD modeļa izveidē būtiska ir injekcijas vietas izvēle smadzenēs. Injekciju ar 6-OHDA zinātnieki veic arī tieši *substantia nigra* struktūrā, bet ir atklāts, ka injekcija striatumā var imitēt labāk PD agrīnās vai progresējošās stadijas (Deumens et al., 2002). Kā pārbaudi dopamīnerģisko neironu bojāejai izmanto tirozīna hidroksilāzes (TH) ekspresijas noteikšanu. TH iekrāsoto šūnu skaits ir tiešs pierādījums dopamīnerģisko neironu dzīvotspējai, jo TH ir atslēgas enzīms, kas pārvērš aminoskābi tirozīnu dopamīna prekursorā L-DOPA (Daubner et al., 2011).

Daļa PD pētnieku savukārt uzskata, ka atklātais papildus riska faktors saslimšanai – toksiskā iedarbība no pesticīdiem un herbicīdiem, ir labs iemesls šo vielu izmantošanai PD

slimības modelēšanā. Visbiežāk izmantotās vielas no šī klāsta ir rotenons un parakvats, jo abi uzrādījuši spēju izveidot smadzenēs slimībai raksturīgos Levi ķermenīšus ar α -sinukleīnu tajos, bet strīdīgi rezultāti ir iegūti par šo abu vielu spēju ietekmēt dopamīnu nigrostriatālajā sistēmā (Greenamyre et al., 2010, Thiruchelvam et al., 2000, Wu and Johnson, 2011).

Ilgu laiku PD uzskatīja par izteikti sporādisku slimību, kur maz saistība ir ar gēniem un iedzimtību. Tomēr tagad ir zināma vesela virkne gēnu un aptuveni 10% PD gadījumi ir pierādāmi ar konkrētām gēnu mutācijām. Tāpēc jaunākās tendences slimības pētīšanā ir PD ģenētiskie modeļi. PD modelēšanas iespējas apkopotas 1. tabulā, par pamatu izmantojot Jackson-Lewis et al., 2012 apskata rakstu.

1. tabula. **PD dzīvnieku modelēšanas iespējas**

Ķīmiska viela vai gēni	Modeļa raksturojums	
	Priekšrocība	Trūkumi
6-OHDA	6-OHDA ir produkts no endogēnā dopamīna metabolisma; Mijiedarbojas ar α -sinukleīnu proteīnu.	Neizraisa Levi ķermenīšu veidošanos.
MPTP	Izveido oksidatīvo stresu, reaktīvos skābekļa savienojumus; bloķē mitohondriju kompleksu I.	Neizraisa Levi ķermenīšu veidošanos; Šķērso hematoencefālisko barjeru.
Rotenons	Veido Levi ķermenīšus un alfa-sinukleīna uzkrāšanos.	Nesamazina dopamīnu nigrostriatālajā sistēmā šķērso hematoencefālisko barjeru.
Parakvats	Uzrāda alfa-sinukleīna pastiprinātu ekspresiju <i>substantia nigra</i> ; pastiprina Levi ķermenīšu veidošanos.	Neskaidra ietekme uz dopamīna producējošo neironu deģenerācija.
Metamfetamīns lielā devā	No devas atkarīga neirotoksicitāte.	Nestabils modelis.
Transgēnie PD peļņu	Palīdz precīzāk noskaidrot slimībā.	Neviens no gēniem nav.

modeļi: α -sinukleīns un LRRK2, autosomāli dominantais PD, un PINK1/Parkin un DJ- 1, autosomāli recesīvais PD	iesaistītos proteīnus; Palīdz precīzāk atrast potenciālos mērķproteīnus farmakoterapijai.	pārlietu daudz ekspresēties vai pilnībā nefunkcionējošs; Ļoti atšķirīgi efekti uz dopamīna producējošo neironu.
--	---	--

1.4.2. AD modelis

Visplašāk izmanto transgēno peļu modeļus AD pētījumos, kaut gan neviens no transgēnajiem modeļiem pilnībā neatspoguļo cilvēka AD smadzenes un atmiņas traucējumus. Transgēnais AD modelis balstās uz amiloīdu peptīdu A β akumulāciju, kas veidojas no amiloīdu prekursora proteīna (APP) enzimatiskas šķelšanas ceļā. Uzska, ka konkrētas mutācijas APP gēnā izraisa agrīno iedzimtās formas AD (Hardy and Selkoe, 2002). A β agregācija ir devusi pamatu hipotēzei (Hardy and Higgins, 1992) un transgēno modeļu izveidei pelēs, kur APP gēnā (un arī citos gēnos, kā presenelīnā) ir mutācijas, kas jau agrīni dzīvniekiem izraisa A β peptīdu uzkrāšanos un atmiņas traucējumus. Pētījumu rezultāti ar APP23 pelēm, kurām A β agregāti uzkrājas gan parenhimā, gan ap asinsvadiem (cerebrālā amiloīda angiopātija; CAA) bija pirmais pierādījums, ka APP un A β ekspresijas izmaiņas ir pietiekošas, lai izraisītu cerebrovaskulāro neurodeģenerāciju (Calhoun et al., 1999). Šiem AD modeļiem ir gan raksturīgās neuropatoloģiskas izmaiņas, gan arī telpiskās atmiņas deficīts, ko nosaka ūdens labirintā (*Moris water maze*). Telpiskās atmiņas izmaiņas var novērot arī AD pacientiem un, tās sākas ar bojājumu hipokampa smadzeņu struktūrā. Tā ir pirmā smadzeņu struktūra, kas tiek skarta gan AD pacientiem, gan arī transgēnajām AD pelēm (West, 1993). Lielo transgēno AD peļu daudzveidība apskatāmā 2. tabulā.

2. tabula. Transgēno AD peļu modeļi un to salīdzinājums savā starpā

Ar sarkanu apvilīts darbā izmantotais modelis – Tg-APP_{SwDI}, kas uzrāda ekstracelulārus Aβ plāksņveida uzkrājumus, kā arī Aβ uzkrājumus ap asinsvadiem.

Mouse model	Gene (mutation)	Intraneuronal Aβ	Parenchymal Aβ plaques	Hyperphosphorylated Tau	Neurofibrillary tangles	Neuronal loss	Synaptic loss	CAA	Primary reference
PDAPP	APP (V717F)	-	Yes	Yes	No	No	Yes	-	Games et al. 1991
Tg2576	APP (K670N/M671L)	Yes	Yes	-	-	No	No	-	Hsiao et al. 1996
TgCRND8	APP (K670N/M671L, V717F)	-	Yes	-	No	No	-	-	Chishti et al. 2004
APP/PS1	APP (K670N/M671L), PS1 (M146L)	-	Yes	-	-	-	-	-	Holcomb et al. 1998
APP23	APP (K670N/M671L)	-	Yes	Yes	No	Little	Yes	Yes	Sturchler-Pierrat et al. 1997
Tg-SwDI	APP (E693Q, D694N)	-	Yes	-	-	-	-	Yes	Davis et al. 2004
APPDutch	APP (E693Q)	-	Little	-	-	-	-	Yes	Herzig et al. 2004
APPDutch/PS1	APP (E693Q), PS1 (G384A)	-	Yes	-	-	-	-	Little	Herzig et al. 2004
hAPP-Arc	APP (E693G, K670N/M671L, V717F)	-	Yes	-	-	-	-	Little	Cheng et al. 2004
Tg-ArcSwe	APP (E693G, K670N/M671L)	Yes	Yes	-	-	-	-	Yes	Lord et al. 2006
APPArc	APP (E693G)	-	Yes	-	-	-	-	Yes	Knobloch et al. 2007
TAPP	APP (K670N/M671L), Tau (P301L)	-	Yes	-	Yes	-	-	-	Rönnbäck et al. 2011
3xTg-AD	APP (K670N/M671L), Tau (P301L), PS1 (M146V)	Yes	Yes	Yes	Yes	-	No	-	Lewis et al. 2001
APP _{SL} /PS1	APP (K670N/M671L, V717I), PS1 (M146L)	Yes	Yes	-	-	Yes	Yes	-	Oddo et al. 2003
APP/PS1KI	APP (K670N/M671L, V717I), PS1 (M233T/L235P)	Yes	Yes	-	-	Yes	Yes	-	Wirhns et al. 2002
5xFAD	APP (K670N/M671L, I716V, V717I), PS1 (M146L/L286V)	Yes	Yes	-	-	Yes	Yes	-	Casas et al. 2004
									Oakley et al. 2006

CAA = cerebral amyloid angiopathy; Dash (-) = not reported.

Neirodeģeneratīvus procesus var modelēt arī ar hronisku stresu vai zāļu vielām, par kurām ir zināms, ka tās pasliktina atmiņu.

1.4.3. Stresa modelis

Stress ir organisma atbildes reakcija uz vides apstākļiem vai emocionāliem kairinājumiem, kas izjauc normālu organisma līdzsvaru jeb homeostāzi, ko precīzi noformulēja “stresa teorijas tēvs” Hans Selje. Stresa inducētie procesi organismā ir kompleksi un ietver dažādus procesus - modulējot steroīdu (glikokortikoīdu), kateholamīnu, peptīdu un opioīdu sistēmas. Stresa procesā iesaistās gan CNS, īpaši mezolimbiskā sistēma, imūnsistēma, kardiovaskulārā un gastrointestinālā trakts (Sutanto and de Kloet, 1994). Ilgstoša stresa iedarbība rada distresu un palielina risku saslimt ar depresiju, kā arī neirodeģeneratīvajām slimībām, (Finsterwald and Alberini, 2014), kā arī izmaina proteīnu ekspresiju, kas iesaistīta sinaptiskajā plasticitātē (Yuen et al., 2011). Hipokampā ilgtermiņa stimulēšana ir ievērojami samazinājusies pēc ilgstoša viegla stresa vai hroniskas kortikosteroīdu iedarbības (Alfarez et

al., 2003), tātad tas būtiski pasliktina atmiņu gan dzīvniekiem, gan cilvēkiem (Lupien et al., 2007). Ilgstoša stresa iedarbība izraisa pārmērīgu kortikosteroīdu sintēzi un izdalīšanos, kas savukārt nomāc glutamāterģisko sinaptisko pārraidi prefrontālajā garozā, samazinot glutamāta receptoru ekspresiju. Glutamāts, saistoties pie NMDA receptoriem, palielina intracelulāro kalcija līmeni un tādējādi inducē šūnas bojāeju. Izzudot kalcija homeostāzei šūnā, pastiprināti degradējas ubikvitīna/proteosomas un NMDA receptoru un AMPA receptori (Yuen et al., 2012). Laboratorijas dzīvnieku pielietojums un modelēšana ir būtiski ietekmējuši progresu stresa pētījumos. Ir izveidotas gan speciālas žurku līnijas ar paaugstinātu asins spiedienu (Pinto et al., 1998), apomorfīna uzņēmīgās APO-SUS un apomorfīna neuzņēmīgās žurkas APO-UNSUS (Kavelaars et al., 1997), t.s. *Roman* augstas izvairīšanās sliekšņa un zemas izvairīšanās sliekšņa žurkas (Lopez-Aumatell et al., 2009), izmanto arī *Wistar* līnijas žurkas, kas tiek pakļautas akūtiem un hroniskiem stresiem, piemēram, piespiedu peldēšanai (*forced swim test*), neizbēgamam astes šokam (*inescapable tailshock*), aukstumam, akūtam ētera stresam vai imobilizācijai (Sutanto and de Kloet, 1994). Imobilizācijas stress ir plaši izmantots stresa modelis, kas ietekmē dzīvnieku agresiju, emocionalitāti, palielina bailes un būtiski ietekmē atmiņu (Wood et al., 2008).

1.4.4. Haloperidola amnēzijas modelis

Plaši tiek pielietots amnēzijas modeļi ar zāļu vielām, piemēram, haloperidola amnēzijas modelis. Haloperidols ir viens no tipiskajiem antipsihotiskajiem līdzekļiem, kas šizofrēnijas gadījumā novērš halucinācijas, mānijas un hiperaktivitāti, antagonizējot dopamīna 2 (D2) receptoru. D2 receptoru blokāde nigrostriatālajā sistēmā ir atbildīga par šī medikamenta nevēlamajiem blakusefektiem – ekstrapirimidālajiem efektiem un diskinēziju (Gerlach and Casey, 1990). Hroniska haloperidola lietošana veselos brīvprātīgajos uzrāda atmiņas pasliktināšanos (Lustig and Meck, 2005). Arī preklīniskā pētījumā ar žurkām un pelēm haloperidola ietekmē novēro īstermiņa atmiņas pasliktināšanos un oksidatīvā stresa palielināšanos hipokampā un citos smadzeņu reģionos (Dubrovina and Loskutova, 2002, Schroder et al., 2005).

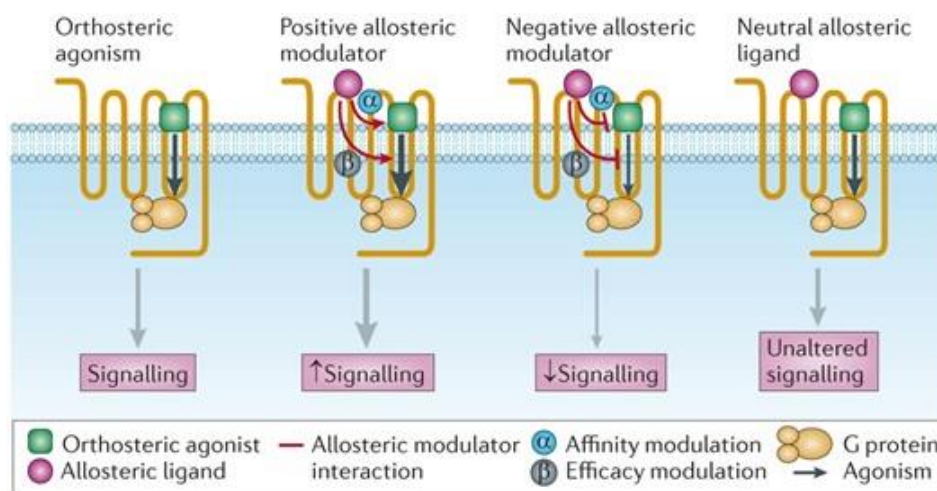
1.4.5. Apmācības modelis

Apmācību pielieto kā reģeneratīvo procesu modeli. Ir zināms, ka apmācība ir t.s. pozitīvais stress, kura pamatā ir sinaptisko signālceļu nostiprināšana (Khan and Muly, 2011). Tas ir arī viens no veicinošajiem faktoriem, kas inducē neironus pieaugušo smadzeņu hipokampā (Gould and Tanapat, 1999). Apmācības pamatā ir atmiņas veidošanās, kas notiek galvenokārt hipokampā, kur pieaugušo smadzenēs ir novērota jaunu neironu rašanās (Balu and Lucki, 2009). Modelēšanai parasti izmanto žurkas.

2.2. Jaunas farmakoterapeitiskās stratēģijas

Ņemot vērā neurodeģenerācijā iesaistītos procesus un proteīnu daudzveidību, ir skaidrs, ka zāļu vielai, kas multivalenti spēj iedarboties uz vairākiem proteīniem, ir vairākas priekšrocības, sākot jau ar mazāk izteiktām blaknēm. Šobrīd pieejamās zāļu vielas var iedalīt divās lielās kategorijās pēc to iedarbības uz proteīniem – ortostēriskās, kur zāļu viela saistās pie proteīna aktīvās saistīšanās vietas, un allostēriskās zāļu vielas, kas piesaistās kādā citā vietā uz proteīna virsmas un allostēriski izmaina konformāciju proteīna saistīšanās vietai (Nussinov and Tsai, 2012).

Tieši allostēriskās zāļu vielas kļūst arvien populārāka farmakoterapijas stratēģija, jo šādas allostēriskās vielas spēj pastiprināt vai pamazināt šūnas proteīnu komplicētās savstarpējās mijiedarbības un tām ir raksturīgi mazāk blakusefektu (Nussinov et al., 2011). Šīs zāļu vielas iedarbojas uz vairākiem proteīnu receptoriem (7. attēls), kā arī vairākiem proteīniem šūnā. Šīs zāļu vielas brīvi pārvietojas, mainot enerģijas pieejamību. Ietekme uz vairāku proteīnu ekspresiju sasauca arī ar galveno mērķi – neurodeģeneratīvajos procesos veikt agrīnu šūnas aizsardzību pirms deģeneratīvie procesi ir izraisījuši būtiskus bojājumus smadzenēs. Pirmējie dati no pētījumu meta-analīzēm rāda, ka preventatīvi pret AD iedarbojas antioksidanti – pārtika, kur ir daudz C un D vitamīna, nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi (sevišķi aspirīns), estrogēni, ilgstošas iedarbības dihidropiridīni un dažos pētījumos arī kontrolēta statīnu lietošana, kas aizsargā no endotēliju bojājumiem (Standridge, 2004).



7. attēls. Ortostērisko un allosterisko zāļu vielu saistība ar receptoru proteīniem

Allostēriskās zāļu vielas spēj iedarboties gan pozitīvi, pastiprinot signālu, gan negatīvi samazinot signālu, kā arī neitrāli iedarboties uz šūnu (Wootten et al., 2013).

Pēdējā laikā sevišķi uzmanību velta mazām molekulām, kas spētu veicināt reģeneratīvos procesus un palīdzētu AD ārstēšanā (Petrik et al., 2012, Rishton, 2008, Schneider et al., 2012). Uzska, ka mazas molekulas ar lādētiem struktūras elementiem (piemēram, četrvērtīgo slāpekli), spēj saistīties pie pretēji uzlādētām aminoskābēm proteīnos un ietekmēt proteīnu savstarpējo mijiedarbību, uzlabot molekulas spēju šķērsot šūnas membrānas. Tā ir jaunā paradigma farmakoloģijā. Nenoliedzami, ka šādu zāļu vielu pielietojamam, no svara ir arī spēja uzlabot kognitīvās spējas neirodeģeneratīvo slimību pacientiem (Standridge, 2004).

1.6. Pētīto vielu izvēles pamatojums

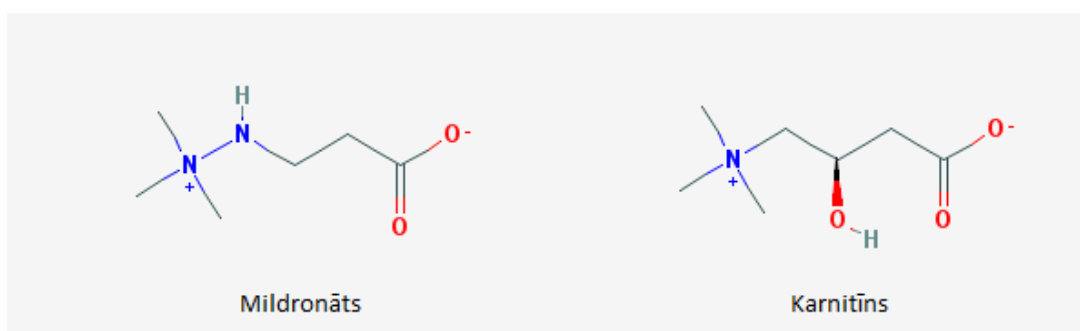
1.6.1. Mildronāts

Mildronāts (3-(2,2,2-trimetilhidrazīna) propionāta dihidrāts (jeb meldonijs) ir plaši pazīstams kardioprotektīvs līdzeklis, ko lieto sirds-asinsvadu sistēmas slimību, galvenokārt sirds išēmijas patoloģiju gadījumos, bet arvien biežāk arī pie pārslodzēm sportā un darba dzīvē. Šo preparātu pirms 30 gadiem Latvijas Organiskās sintēzes institūtā pirmo reizi izstrādāja profesora I. Kalviņa laboratorijā. Tas bija iecerēts kā gamma-butirobetaīna jeb GBB analogs ar spēju ietekmēt karnitīna biosintēzi.

Tradicionāli mildronāta darbības mehānisms bija izskaidrots ar to, ka inhibējot gamma-butirobetaīna hidroksilāzi, samazinās karnitīna biosintēze miokardā, kā arī uzkrājas karnitīna

prekursors GBB (Dambrova et al., 2002, Simkhovich et al., 1988). Mildronāta pozitīvos efektus sirdī skaidro ar to, ka samazinoties karnitīnam, samazinās arī enerģijas patērējošā taukskābju oksidācija un tiek efektīvāk patērēta glikoze un palielināta ATF produkcija. Tas savukārt, ir pretrunā ar labi zināmo karnitīna lomu enerģijas producēšanā šūnā, un tā deficīts diabētā, sepsē, kardiomiopātijā, cirozē, endokrīnās saslimšanās un vecumā ir labi aprakstīts (Flanagan et al., 2010). Jāatzīmē, ka karnitīna metabolīts acetil-L-karnitīns ir uzrādījis spēju mazināt uzmanības deficītu AD pacientiem pēc ilgtermiņa lietošanas, kuriem acetilholīnesterāzes inhibitori nav uzrādījuši vēlamo efektu (Bianchetti et al., 2003). Iepriekš ir ziņots arī par acetil-L-karnitīna spēju mazināt progresēšanās ātrumu AD pacientiem, to lietojot ilgtermiņā – vienu gadu (Spagnoli et al., 1991), kā arī pie vieglas formas AD tas ir uzrādījis atmiņas uzlabojumus (Montgomery et al., 2003). Karnitīns ir uzrādījis neiroprotekciju mitohondriālās disfunkcijas modelī (Binienda et al., 2005), un acetil-L-karnitīns ir aizsargājis dopamīnerģiskās šūnas PD modelī (Zaitone et al., 2012).

Mūsu koncepcija atšķiras no tradicionālā mildronāta darbības mehānisma skaidrojuma. Mildronātam piemīt acīmredzama struktūras līdzība ar karnitīnu, un tādējādi mildronātu var uzskatīt par karnitīna “līdzinieka” molekulu (*carnitine congener*) jeb “neīsto karnitīnu” (8. attēls). Mildronātam piemīt gan pozitīvi lādētais slāpekklis, gan negatīvi lādētais skābeklis.



8.attēls. **Mildronāta un endogēni sintezētā karnitīna struktūras un to līdzība**

Struktūras attēli no <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nevar noliegt arī to, ka mildronāta struktūra ir līdzīga vēl vienai dabas vielai betaīnam, kam tāpat kā karnitīnam (ASV Patents Nr. WO 2002048190A1) piemīt molekulārā čaperona īpašības stabilizēt proteīnu konformāciju. Šajā kontekstā mildronātu var uzskatīt arī par ķīmisko čaperonu. Šūnai jāsaņem pietiekoša karnitīna koncentrācija, lai nodrošinātu mitohondrijos enerģijas veidošanās procesus. Taču tā pārslodze noved pie negatīvās atgriezeniskās saites izveides un kompensējoša karnitīna samazinājuma šūnās. Viens no nozīmīgākajiem argumentiem šādam uzskatam ir dati par devas atkarīgu mildronāta palielināšanos un attiecīgu karnitīna līmeņa samazināšanos žurkas smadzeņu audos (Svalbe et

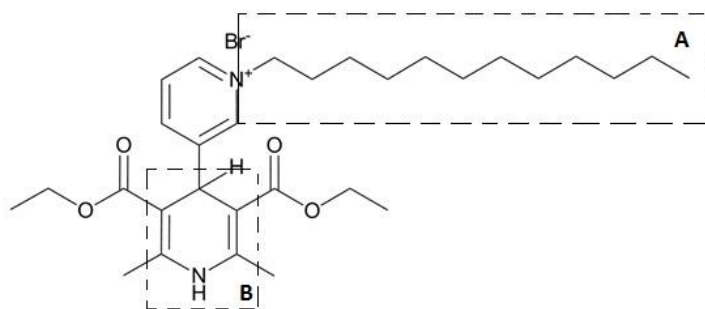
al., 2011). Līdzīgu pierādījumu šādam uzskatam sniedz arī pētījums, kurā mildronāta kardioprotekcijas efekts pazūd pēc L-karnitīna lietošanas (Kuka et al., 2012). Līdz ar to varam secināt, ka karnitīns vai tā derivāts mildronats jāievada tādās devās, kas spēj kompensēt dažādu aversīvu stāvokļu (stress, neurodeģenerācija) izraisīto karnitīna deficītu.

Iepriekšējie Farmakoloģijas katedras pētījumi norāda uz mildronāta spēju stabilizēt proteīna ekspresiju smadzenēs un sirdī neirotoksicitātes modelī, kas tika inducēts ar mitohondriju toksīnu azidotimidīnu (Pupure J. et al., 2010). Tomēr mildronāta ietekme uz smadzeņu procesiem tikpat kā nav izziņāta, nemaz nerunājot par to iedarbību uz smadzeņu proteīnu ekspresiju PD un AD modeļos.

1.6.2. Dihidropiridīna atvasinājums AP-12

Dihidropiridīna atvasinājums (DHP) AP-12 (1-dodecil-3'-5'-bis-etoksikarbonil-2'-6'-dimetil-1',4'-dihidro-[3,4']bipiridinil-1-ium bromīds) ir Latvijas Organiskās Sintēzes institūta ķīmiķes A. Plotnieces grupas 2010. gadā sintezēts savienojums. Interese par DHP un to spēju mazās devās uzlabot atmiņas procesus jau tika parādīta pagājušā gadsimta 90. gados, pētot netipisku DHP derivātu cerebrokrastu, kas neironālajos audos neuzrādīja kalcija antagonista īpašības (Klusa, 1995). Interese pētīt šos savienojumus neurodeģeneratīvos procesos radās tāpēc, ka daudzi no DHP savienojumiem uzrādīja spēju šķērsot hematoencefālisko barjeru un mazināt risku attīstīt PD un AD (Anekonda and Quinn, 2011, Simon et al., 2010).

Nesenos pētījumos AP-12 uzrādīja kalcija antagonista īpašības neiroblastomas šūnu līnijā SH-SY5Y (inhibējošā koncentrācija $IC_{50} = 5$ ($0,8 \mu M$) un vaskulāro gludo muskuļšūnu līnijā A7r5 ($IC_{50} = 0,7$ ($0,3 \mu M$), kas ierindo šo savienojumu kalcija regulējošo DHP klasē (Rucins et al., 2014). Savienojuma struktūrā vērību pelna divas nozīmīgas grupas – dodecilgrupa, kas uzlabo lipofilitāti, un DHP grupa kā nesējmolekula, kuru struktūrā ir pozitīvi lādēts slāpekļa elements (9. attēls).



9. attēls. AP-12 struktūra

A: dodecilgrupa; B: dihidropiridīna daļa kā nesēj molekula.

Līdz šim nav veikti pētījumi ar DHP savienojumiem, kas liecinātu par to spēju ietekmēt smadzeņu proteīnu ekspresiju. Vienīgi ir atrastas DHP savienojumu spēja ietekmēt kalcija kanālu ekspresijas izmaiņas (Sinnegger-Brauns et al., 2009) un azidotimidīna neirotoksicitātes modelī DHP regulējošo ietekmi uz paaugstināto NF-kappaBp65 un kaspāzes-3 ekspresiju (Pupure et al., 2008).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

Promocijas darbam izvēlētās vielas – mildronātu un dihidropiridīna atvasinājumu AP-12 pārbaudījām dažādos neurodeģeneratīvo slimību modeļos uz laboratorijas dzīvniekiem – žurkām un pelēm. Noteicām dzīvnieku uzvedību, kā arī noteicām biomarkķieru ekspresijas izmaiņas smadzenēs *ex vivo* ar *Western* blota un imūnhistoķīmijas metodi, kā arī pārbaudījām AP-12 spēju šķērsot hematoencefālisko barjeru ar HPLC metodi.

2.1. Eksperimentālie dzīvnieki

Wistar žurkas tēviņi tika iegādāti no Rīgas Stradiņa Universitātes Eksperimentālās dzīvnieku laboratorijas (Rīga, Latvija), transģenā AD peļu līnija – Tg-APP_{swDI} tika iegūtas no Dr. Van Nostrand laboratorijas (*SUNY Stony Brook*, ASV), peļu līnija C57BL/6J no *The Jackson Laboratory* (ASV). Peļu kolonija tika uzturēta Alabamas Universitātē Birmingemā, ASV. Peles izmitināja plastikāta būros standarta apstākļos, pa 5 pelēm katrā.

Pirms eksperimentiem peles un žurkas adaptēja plastikāta būros, izmitinot tos standarta apstākļos: istabas temperatūrā $22 \pm 1^\circ \text{C}$, gaisa mitrums 50 – 60 %, gaismas/tumsas cikls 12 h/12 h, sausā barība (R-70, *Lantmannen*, Zviedrija) un ūdens *ad libitum*.

Visas eksperimenta procedūras veiktas ar iespējami mazāku dzīvnieku skaitu, mazinot iespējamās dzīvnieku ciešanas vai diskomfortu. Pētījumos tika ievērota Eiropas Savienības konvencijas direktīvas 2010/63/EU vadlīnijas. Pētījumu protokolus par laboratorijas dzīvnieku izmantošanu biomedicīnas eksperimentos akceptēja LR Pārtikas un Veterinārā Dienesta Dzīvnieku aizsardzības Ētikas komiteja. Pētījumam ASV tika ievērota vietējā – institucionālās dzīvnieku uzraudzības un izmantošanas komitejas vadlīnijas (*Institutional Animal Care and Use Committee*; IACUC).

2.2. Materiāli

Pētāmās vielas

Mildronāts [3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija) propionāta dihidrāts] tika iegūts no A/S „Grindeks” (Rīga, Latvija). Mildronāts tika izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, izgatavojot 1%

pamatkoncentrāciju, to attiecīgi atšķaidot un injicējot intraperitoneāli (i.p.) devās 10, 20, 50 un 100 mg/kg (pētītās devas atšķīrās pētījumos).

DHP derivāts AP-12 (1-dodecil-3'-5'-bis-etoksikarbonil-2'-6'-dimetil-1',4'-dihidro-[3,4']bipiridinil-1-ium bromīds) tika iegūts no Latvijas Organiskā sintēzes institūta. To izšķīdināja fizioloģiskajā šķīdumā ar 0,1% *Tween*-20, lai palielinātu vielas šķīdību, un ievadīja devās 0,1 mg/kg un 1 mg/kg i.p.

Vielu izšķīdināšanai izmantojām NaCl fizioloģiskais šķīdums 0,9 % no *Fresenius Kabi* (Polija).

Western blota metodē izmantotie reaģenti

RIPA buferis (R0278, *Sigma-Aldrich*, ASV), proteāžu inhibitoru kokteilis (P2714, *Sigma-Aldrich*, ASV), poliakrilamīda gēla elektroforēzei izmantots proteīna molekulārā svara standarts – *Spectra Multicolor Broad Range Ladder* (26634, *Piercenet*, ASV). Bloķēšanai izmantots 5% sausais piens un 0,05% *Tween*-20 (sc-2333, *Santa Cruz Biotechnology*, ASV). Izmantotās primārās antivielas mainījās atkarībā no pētījuma, bet visbiežāk izmantotās antivielas bija pret GAD 67 (sc-28376, *Santa Cruz Biotechnology*, ASV), GAP-43 (sc-10786, *Santa Cruz Biotechnology*, ASV), AChE (sc-11409, *Santa Cruz Biotechnology*, ASV), GFAP (G3893, klons G-A-5, *Sigma*, ASV), BDNF (sc-20981, *Santa Cruz Biotechnology*, ASV), sinaptofizīnu (S5768; *Sigma*, ASV).

β -aktīns (ab8224, *Abcam*, Lielbritānija) un α -tubulīns (T5168, *Sigma*, ASV) tika izmantots kā pozitīvo paraugu ievadīšanas kontrole. Izmantotās sekundārās antivielas: peroksidāzes konjugētā kazas anti-truša IgG (A9169, *Sigma-Aldrich*, ASV) un peroksidāzes konjugēta peļu sekundārā (sc-2005, *Santa-Cruz Technology*). Detektēšanai tika izmantoti hemiluminescences *ECL Advance* šķīdumi A un B (RPN2135, *Amersham GE Healthcare*, ASV).

Imūnhistoķīmijā izmantotās vielas

Primārās antivielas (te uzskaitītas tikai AD modelī izmantotās antivielas, kuras procedūru doktorante pati ir veikusi): peļu anti-cilvēku W0-2 anti-Ab4-10; 1:5,000; *Millipore*, ASV), peļu GFAP (mouse anti-GFAP; 1:1,000; clone G-A-5; *Sigma*, ASV), Iba-1 (rabbit anti-Iba1; ab5076; *Wako*, ASV), and GAD67 (mouse anti-GAD67; 1:1000; MAB5406; *Millipore*, ASV). Sekundārās antivielas: ar biotīnu konjugēta kazas anti-peļu (*Sigma*, ASV) vai ar biotīnu kazu anti-trušu anti-Ab4-10 (*Millipore*, ASV).

2.3. Metodes

2.3.1. Modeļu izveide ar ķīmisko vielu palīdzību

PD modeļa izveidei žurkās izmantojām 6-hidroksidopamīnu (6-OHDA) no *Sigma-Aldrich* (ASV), to izšķīdinot 0.2% askorbīnskābes šķīdumā. Šī modeļa izveide notika 2 nedēļas pēc mildronāta vai kontroles grupai – fizioloģiskā šķīduma ievadīšanas. Pusstundu pirms anestēzijas žurkām injicēja i.p. imipramīnu 20 mg/kg, lai aizsargātu adrenerģiskos neironus no 6-OHDA bojājumiem (Breese and Traylor, 1971). Žurkas anestezēja ar ketamīnu 75 mg/kg un ksilazīnu 10 mg/kg un ievietoja stereotakses sistēmā (*Stoelting Inc.*, ASV). Toksīnu 6-OHDA injicēja 20 µg/ 3 µL koncentrācijā ar *Stoelting* mikroinjektoru ar ātrumu 1 µl/min intrastriatāli ar koordinātēm pēc *Paxinos & Watson*: AP + 1,2; LM +2,5; DV – 5.0 mm no bregmas.

Dopamīna receptora agonistu apomorfīnu (*Sigma-Aldrich*, ASV) izšķīdināja 0,1% askorbīnskābes šķīdumā. Apomorfīnu ievadīja subkutāni devā 0,2 mg/kg, lai noteiktu modeļa funkcionēšanu. Ja dopamīnerģiskie neironi ir bojāti, var novērot kontralaterālas rotācijas.

Apmācīto žurku pētījumā izmantojām sintētisko timidīna analogu bromodeoksiuridīnu (BrdU) no *Sigma-Aldrich* (ASV), izveidojot pamatkoncentrāciju 10 mg/ml un ievadot devā 75 mg/kg. BrdU spēj inkorporēties DNS molekulā timidīna vietā mitozes S-fāzē, un ļauj antivielai piesaistīties pie tā. BrdU izmantošana ir kļuvusi par plaši izmantotu analīzes līdzekli neironālo cilmes šūnu pētniecībā, lai iezīmētu un iekartētu dalošās šūnas (Drapeau et al., 2003, McDonald and Wojtowicz, 2005).

Haloperidola modelī žurkām izmantojām haloperidolu no *GedeonRichter* (Ungārija) no 5mg/ml ampulas, ievadot to devā 1 mg/kg.

2.3.2. Modeļu izveide bez ķīmiskām vielām

Imobilizācijas stresa modelis

Šis modelis iepriekš aprakstīts Nooshinfa et al., 2011. Imobilizācijas stresa ietekmē atmiņu, un tādējādi, piemēram, var novērtēt atmiņas traucējumu attīstību.

Stresa modelī žurkas 2 h immobilizēja, katru žurku atsevišķi ievietojot, mazā plastikas būrī. Ar plastikāta būra pārvietojamo durvju palīdzību būra garums tika pielāgots attiecīgi katras žurkas izmēriem. Visa testa laiku žurka bija pilnībā imobilizētas, bez kustībām. 30 min

pēc imobilizācijas stresa testa žurkām tika veikts pasīvās izvairīšanās tests, kas aprakstīts pie uzvedības testiem.

Alcheimera slimības modelis

Šajā modelī transgēnās peles ekspresē cilvēku amiloīda prekursora proteīnu (APP) ar t.s. zviedru, nīderlandiešu un Aiovas (*Swedish, Dutch, and Iowa*) mutācijām uz C57BL/6 peļu genoma fona, tāpēc arī nosaukums Tg-APP_{SwDI}. Šis peļu modelis attīsta agrīnu smagu β amiloīda peptīdu akumulāciju smadzenēs, kas saistās arī pie smadzeņu asinsvadiem. Šīs peles agrīni, jau sasniedzot 3 mēnešu vecumu, uzrāda kognitīvos traucējumus (Davis J. et al., 2004).

2.3.3. Eksperimentu plānojums modeļdzīvniekiem

PD pētījumā bija divi atsevišķi eksperimenti, kur pirmā eksperimentā žurkas sadalīja astoņās grupās (katrā pa 8 dzīvniekiem) un mildronāta devas bija 10, 20 un 50 mg/kg, savukārt otrā eksperimentā žurkas sadalīja sešās grupās (katrā pa 8 dzīvniekiem) un devas bija 50 mg/kg un 100 mg/kg. Vielas katru dienu pagatavojām no jauna. Mildronāts vai fizioloģiskais šķīdums (kontrolē) tika sagatavots tilpumā 1 ml/kg, intraperitonālai (i.p.) vielas ievadīšanai katru dienu 14 dienas pēc kārtas. Nākamajā dienā (15. dienā) neirotoksīns 6-OHDA tika ievadīts labajā striatumā koncentrācijā 20 $\mu\text{g}/3 \mu\text{L}$. Kontroles grupai ievadīja mākslīgo cerebrospinalo šķīdumu (aCSF).

Dzīvnieka grupas pirmajā eksperimentā:

1. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p. 14 dienas, kam sekoja aCSF intrastriatāli;
2. grupa: mildronāts, 10 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja aCSF intrastriatāli;
3. grupa: mildronāts, 20 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja aCSF intrastriatāli;
4. grupa: mildronāts, 50 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja aCSF intrastriatāli;
5. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p. 14 dienas, kam sekoja 6-OHDA intrastriatāli;
6. grupa: mildronāts, 10 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja 6-OHDA intrastriatāli;
7. grupa: mildronāts, 20 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja 6-OHDA intrastriatāli;
8. grupa: mildronāts, 50 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja 6-OHDA intrastriatāli.

Dzīvnieka grupas otrajā eksperimentā:

1. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p. 14 dienas, kam sekoja aCSF intrastriatāli;
2. grupa: mildronāts, 50 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja aCSF intrastriatāli;
3. grupa: mildronāts, 100 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja aCSF intrastriatāli;
4. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p. 14 dienas, kam sekoja 6-OHDA intrastriatāli;
5. grupa: mildronāts, 50 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja 6-OHDA intrastriatāli;
6. grupa: mildronāts, 100 mg/kg i.p. 14 dienas, kam sekoja 6-OHDA intrastriatāli.

AD modeli transgēnajām APP pelēm (Tg-APP_{SweDI}), lai pārbaudītu mildronāta ietekmi izmantoja 36 peles, kuras sadalīja 3 grupās, un kurām 28 dienu pēc kārtas ievadīja fizioloģisko šķīdumu vai mildronātu. Peļu vecums, uzsākot pētījumu, bija 4 mēneši.

Dzīvnieku eksperimentālās grupas:

1. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p. 28 dienas,
2. grupa: mildronāts, 50 mg/kg i.p. 28 dienas,
3. grupa: mildronāts, 100 mg/kg i.p. 28 dienas.

AD modeli transgēnajām APP pelēm (Tg-APP_{SweDI}), lai pārbaudītu AP-12 izmantoja 16 peles, kuras sadalīja 2 grupās, un kurām 21 dienu pēc kārtas ievadīja fizioloģisko vai AP-12. Peļu vecums, uzsākot pētījumu, bija 3 mēneši.

Eksperimenta grupas:

1. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p. 21 dienu;
2. grupa: AP-12 1 mg/kg i.p. 21 dienu.

AP-12 savienojums tika pārbaudīts arī uz C57BL/6J peļu tēviņiem, kas ir peļu līnija, uz kuras bāzes izveidoja TgAPP_{SweDI} AD peles. Šajā testā izmantoja 30 pele, kuras sadalīja 3 grupās. Peļu vecums, uzsākot pētījumu, bija 3 mēneši.

Dzīvnieku eksperimentālās grupas:

1. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p. 21 dienu;
2. grupa: AP-12 0,1 mg/kg i.p. 21 dienu;
3. grupa: AP-12 1 mg/kg i.p. 21 dienu.

Imobilizācijas stresa modeli izmantoja 40 žurkas, kuras sadalīja 4 grupās, un kurām 14 dienas pēc kārtas ievadīja fizioloģisko šķīdumu vai mildronātu devā 50 mg/kg. Pēc 14 dienām pusi žurku pakļāva imobilizācijas stresam.

Dzīvnieku eksperimentālās grupas:

1. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p.;
2. grupa: mildronāts 50 mg/kg i.p.;
3. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p., kam sekoja imobilizācijas stress;
4. grupa: mildronāts 50 mg/kg i.p., kam sekoja imobilizācijas stress.

Haloperidola modeli žurkas sadalīja četrās grupās, katrā pa 8-10 dzīvniekiem. Mildronāts (Grindeks, Latvija) devās 50 un 100 mg/kg tika pagatavots no pulvera, haloperidols 1mg/kg (Hal) (*GedeonRichter*, Ungārija) tika pagatavots no injekciju šķīduma 5mg/ml ampulas. Abas vielas ievadījām (i.p.) tilpumā 1 ml/kg 21 dienu pēc kārtas.

Dzīvnieku eksperimentālās grupas:

1. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p.;
2. grupa: haloperidols 1mg/kg i.p. + fizioloģiskais šķīdums;
3. grupa: haloperidols 1mg/kg i.p. + mildronāts 50 mg/kg i.p.;
4. grupa: fizioloģiskais šķīdums i.p.+ mildronāts 50 mg/kg i.p.

Apmācību modeli žurkas sadalīja četrās grupās, katrā pa 8 žurkām. Mildronātu (50 mg/kg i.p.) vai fizioloģisko šķīdumu ievadīja septiņas dienas, nākošās septiņas dienas žurkas saņēma BrdU devā 75 mg/kg i.p., un tās apmācīja aktīvās izvairīšanās testa (CAR) aparātā (Panlab, Spānija). Divas kontroles grupas saņēma vielas, bet tās neapmācīja.

Dzīvnieku eksperimentālās grupas:

1. grupa (kontrolē): fizioloģiskais šķīdums 7 dienas, kam sekoja BrdU 75 mg/kg i.p. 7 dienas;
2. grupa: mildronāts, 50 mg/kg, 7 dienas, kam sekoja BrdU 75 mg/kg i.p. 7 dienas;
3. grupa: fizioloģiskais šķīdums, 7 dienas, kam sekoja BrdU 75 mg/kg i.p. un CAR treniņš 7 dienas;
4. grupa: mildronāts, 50 mg/kg, 7 dienas, kam sekoja BrdU 75 mg/kg i.p. un CAR treniņš 7 dienas.

2.3.4. Dzīvnieku uzvedības testi

Rotāciju skaitīšana PD modeli

Lai pārbaudītu PD modeļa bojājumu smadzenēs, 14., 21. un 28. dienā pēc 6-OHDA ievadīšanās smadzenēs, subkutāni ievadījām dopamīna receptora agonistu apomorfīnu devā 0,2 mg/kg un 30 min novērojām un skaitījām asimetriskās (kontralaterālās) rotācijas žurkām.

Uzvedības testi AD modeli

AD modeli divas nedēļas pēc mildronāta (vai fizioloģiskā šķīduma) ievadīšanas transgēnās pelēm pārbaudīja lokomotoro aktivitāti un baiļu līmeni divos uzvedības testos – atvērtā lauka testā (*open field*) un nulles labirintā (*zero maze*). Nākamā nedēļā dzīvnieki tika testēti divos atmiņas testos – sociālās atpazīšanas tests (*social recognition*) un Moris ūdens labirintā (*Morris water maze*), lai noteiktu spēju atcerēties jaunu dzīvnieku, kā arī atrast platformu, uz kuras var nostāties sausumā.

Atvērtā lauka testā peli ievietoja atklāta tipa arēnas jeb lauka (50 x 50 x 20 cm) centrā un novērota ar *Ethovision* videonovērošanas sistēmu. Tā 5 min laikā tiek novērtēta dzīvnieka pārvietošanās aktivitāte jeb horizontālā lokomocija, kas tika izteikta kā kopējā noietā distance centimetros.

Nulles labirintā peli ievietoja paaugstināta apļveida platformā ar divām pretējām noslēgtiem kvadrantiem un diviem atvērtiem, un 5 minūšu laikā novērtē dzīvnieka pārvietošanās aktivitāti no noslēgtajiem kvadrantiem uz atvērtajiem un kopējo noieto distanci un ātrumu.

Sociālo atpazīšanu dzīvniekiem pārbaudīja taisnstūrveida, caurspīdīgas plastmasas kastē ar trīs nodalījumiem, kur malējos nodalījumos zem režģa ievietojām katrā pa C57BL/6J līnijas pelei, kuras eksperimentālās peles nekad iepriekš nebija sastapušas. Pirmajā dienā eksperimentālo peli ievietoja vidējā nodalījumā un saskaitīja 10 min periodā peles pārvietošanos no viena nodalījuma uz otru, kā arī pavadīto laiku katrā no nodalījumiem un pavadīto laiku pie režģiem, zem kuriem atrodas nezināmās peles. Otrajā dienā vienā no malējiem nodalījumiem nomainīja vienu no pelēm pret citu, kuru eksperimentālā pele nekad iepriekš nav sastapusi. Tāpat kā pirmajā dienā, saskaitīja 4 min pārvietošanos un uzturēšanos laiku, kā arī pavadīto laiku pie režģa. Ir teikts, ka dzīvnieks atceras un pavada par 80% vairāk laika otrā dienā pie peles režģa, kur ievietota pele, kuru dzīvnieks vēl nebija sastapis.

Ūdens labirints bija tumši zils apļveida peldbaseins ar diametru 120 cm un augstumu 40 cm, kas tika piepildīts ar tīru ūdeni, kura temperatūra ir $23 \pm 1^\circ \text{C}$. Peles trenēja četras reizes pa 60 s katru dienu 5 dienas pēc kārtas ar mērķi iemācīt pelēm atrast peldbaseinā platformu vienā no peldbaseina kvadrantiem, uz kuras pele var uzrāpties un atpūsties. Platforma, lai būtu grūtāk nedaudz atrodas zem ūdens (0,5 cm). Ja dzīvnieks neatrod 60 s laikā platformu, tad tas tiek uzlikts uz tās uz 10 s. Starptreniņu laiks bija 1 min. Latentais periods līdz tiek atrasta platforma tika reģistrēts, kā arī peļu mērotā distance un ātrums. Pēdējā dienā veic testa pārbaudi, kur izņem platformu, un ļauj peldēt 60 s, lai novērotu, vai peles peld tajā kvadrantā visvairāk, kurā atradās platforma.

AD modelī ar AP-12, divas nedēļas pēc vielu ievades sākuma (13. dienā), dzīvnieki tika testēti – paaugstinātajā plusa labirintā (*elevated plus maze*) un, sākot ar 17. dienu - piecas dienas ūdens labirintā.

Paaugstinātais plusa labirints ir klasisks baiļu tests dzīvniekiem, kurš sastāv no divām atvērtajām platformām (31 cm x 5 cm) un divām aizvērtajām platformām (31 cm x 5 cm x 15 cm), kas ir pagarinājums no centrālās platformas (5 cm x 5 cm), un ir pacelta 40 cm virs galda. Tests tiek uzsākts, uzliekot 13. dienā peli centrālajā platformā, ar skatu uz kādu no atvērtajām platformām. Pelēm ļāva izpētīt labirintu 4 min, un tad tās tika atliktas patstāvīgajā būrī, kur tās uzturas. Eksperimentā tiek uzņemts laiks, ko pele pavada atvērtajos plecos, kā arī reizes, cik bieži pele tajos ieiet. Pagarināts laiks no normas, ko pele pavada atvērtajā plecā,

norāda uz aksiolītisku jeb uz baiļu noņemošu efektu no zāļu vielas. Visus uzvedības testus AD modeļa pētījumā veicam 3 h pēc pēdējās vielu ievades, starp plkst. 11 un 14.

Pasīvās izvairīšanās tests imobilizācijas stresotām modeļžurkām

Pasīvās izvairīšanās testā izmantojam žurkas no imobilizācijas stresa un salīdzinājam ar nestresotājām žurkām. To veica taisnstūra veida aparātā (*Rat Shuttle Box*, modeļa nr. LE916, Panlab, Spānija), kas sastāv no diviem vienāda izmēra nodalījumiem – gaišā un tumšā. Tos vienu no otra atdala siena ar automātiski atveramām durvīm. Katra nodalījuma grīdā ir ievietots metāla režģis. Eksperimenta pirmajā dienā žurkas ievietoja gaišajā nodalījumā. Tās tur atrodas noteiktu laika periodu, kura ilgums pirmajā dienā bija 120 s. Pēc noteiktā adaptēšanās perioda gaišajā nodalījumā atveras automātiskās durvis, un 300 s laikā žurka var pāriet no gaišā nodalījuma uz tumšo. Ieejot tumšajā nodalījumā (kas grauzējiem parasti ir patīkamāks nekā gaiša vide), automātiskās durvis uzreiz aizveras, un žurka caur grīdā esošo metāla režģi saņem 0,2 mA stipru un 2 s ilgu strāvas sitienu (*foot shock*). Pēc 24 h, testa otrajā jeb atbildes saglabāšanas (*retention*) dienā, žurku atkal ievieto gaišajā nodalījumā, kur tā 30 sekundes adaptējas līdz durvju atvēršanai. Pēc durvju atvēršanās reģistrē latento periodu (maksimāli līdz 300 s), ko žurka pavada līdz ieešanai tumšajā nodalījumā. Ja, salīdzinot ar pirmo testa dienu, otrajā dienā (*retention test*), latentais periods pagarinās, tas liecina, ka žurka atceras elektrošoku, ko saņēma pirmajā testa dienā, ieejot tumšajā nodalījumā. Rezultātu analīzei tiek rēķināta latento perioda starpība, kas tiek iegūta no otrās dienas, atņemot pirmās dienas latento periodu. Ja žurka pirmajā eksperimenta dienā 300 s laikā nepāriet no gaišā nodalījuma uz tumšo un nesaņem strāvas sitienu, tā tiek izslēgta no turpmākajiem eksperimentiem. Šis tests ļauj spriest par labākām mācīšanās spējām un atmiņu.

Telpiskās atmiņas noteikšana haloperidola amnēzijas žurkām

Haloperidola amnēzijas modelī divas dienas pēc 3 nedēļu vielu ievadīšanas tika uzsākts **Barnes labirinta** (*Barnes maze*) tests, kurš ilga 5 dienas, lai novērtētu dzīvnieka mācīšanās spējas un telpisko atmiņu. Katru žurku novietoja uz apļa veida galda, kura diametrs ir 1 m un kur pa perimetru ar vienādiem attālumiem ir izvietotas 18 bedrītes, kur tikai viena no bedrītēm bija atvērta (pārējās bija noslēgtas). Bedrīte kalpo kā slēptuve grauzējiem, kuriem ir raksturīgi izvēlēties tumšas, šauras vietas. Treniņsesijai sākoties tika ieslēgta spoža gaisma un ventilators, lai mudinātu dzīvnieku pamest galda centru un atrast bedrīti (maksimālais meklēšanas laiks bija 180 s). Pēc bedrītes atrašanas gaisma un ventilators tika izslēgti un dzīvniekam ļāva 30 s netraucēti atrasties bedrītē-slēptuvē. Katru dzīvnieku tādējādi trenēja trīs

reizes dienā ar 15 minūšu intervālu, kura laikā žurkas atradās savos standarta uzturēšanās būros, četras dienas pēc kārtas. Piektajā dienā labirintā aizsedza slēptuves bedrīti, lai noskaidrotu, vai žurka atceras bedrītes atrašanās vietu. Šajā testā 90 s ilgi tika skaitītas nepareizi apmeklētās bedrītes, kas tika definētas kā kļūdas.

Aktīvās izvairīšanās tests apmācības modeļžurkām

Apmācības modelī žurkas pēc mildronāta vai fizioloģiskā šķīduma ievadīšanas 8. dienā trenējām **aktīvās izvairīšanās testā**, ko veicām taisnstūrveida aparātā ar diviem nodalījumiem (*Panlab*, Spānija). Katru žurku ievietoja nodalījumā un tiklīdz atvērās durvis žurkas izdzirdēja 1 s ilgu un 70 dB, 670 Hz skaļu signālu. Pēc 10 s žurka caur grīdā esošo metāla režģi saņēma 0,5 mA stipru un 2 s ilgu strāvas sitienu. Ja žurka pārskrēja uz otru nodalījumu, 30 s ilgs starpperiods testā sākās. Ja žurka nepārskrēja, žurka pēc 10 s saņēma atkārtotu strāvas sitienu, maksimāli 3 reizes. Katra žurka trenējām 7 reizes dienā 7 dienas pēc kārtas. Pēc durvju atvēršanās reģistrējām latento periodu līdz strāvai, kā arī pareizo atbilžu skaitu.

Visus parametrus reģistrējām ar *Ethovision* videonovērošanas programmu. Pēc uzvedības testa beigām nākamajā dienā dzīvniekus anestezējām un perfuzējām ar fizioloģisko šķīdumu. Tas padarīja smadzeņu audus piemērotus tālākai analīzei gan IHC, gan ar *Western* blota metodi. Daļu no C57BL/6J peļu perfuzētajām smadzenēm no AP-12 savienojuma pētījuma saglabājām pie - 80° C, lai vēlāk noteiktu ar HPLC/masas spektrometrijas analīzes palīdzību šī savienojuma spēju šķērsot hematocencefālisko barjeru pie i.p. ievadīšanas.

2.3.5. Biomarkieru mērījumi

Katrā no modeļiem noteicām vairāku proteīnu biomarkierus – ar *Western* blota un IHC palīdzību.

PD modeļžurkām pirmajā pētījumā imūnhistoķīmiski noteicām marķieru ekspresiju struktūrās *substantia nigra* un *corpus striatum*: specifisko neirālo marķieri TH, ubikvitīnu, Notch-3, astrogliju GFAP, neuroiekaisuma marķieri iNOS, mikroglijas marķieri Iba-1. Otrā PD pētījumā noteicām: molekulārā šaperona – karstuma šoka proteīna HSP70, gliju neirotrofo faktoru GDNF un neirālo šūnu adhēzijas molekulu NCAM ekspresiju.

AD modelī transgēno peļu hipokampā noteica: amiloīda β peptīdu W0-1, Iba-1, GFAP, AChE, GAD67, sinaptiskās plasticitātes marķierus: ar augšanu asociēto proteīnu GAP-43, sinaptofizīnu, Homer-1.

Imobilizācijas stresa modeli žurkām hipokampā noteica: smadzeņu neirotrofo faktoru BDNF, acetilholīnesterāze AChE un glutamāta dekarboksilāzi GAD67.

Haloperidola amnēzijas modeļžurkām noteicām hipokampā: smadzeņu neirotrofisko faktoru BDNF, acetilholīnesterāze AChE un glutamāta dekarboksilāze GAD67.

Apmācības modeļžurkām ar BrdU ievadīšanu noteicām ekspresiju hipokampā: BrdU/nestīnam, glutamāta dekarboksilāzei GAD65/67, acetilholīnesterāzei AChE, GAP-43, transkripcijas factoram c-jun, BDNF, HSP70.

2.3.5.1. Biomarkieru ekspresijas noteikšana ar *Western* blota metodi

Proteīnu ekspresijas kvantitatīvai noteikšanai peļu vai žurku smadzeņu audos izmantojām *Western* blotu, kas ir metode ar vairākām daļām – audu parauga sagatavošana, gēla elektroforēze, pussausā pārnese, bloķēšana, blotēšana ar antivielām, membrānas attīstīšana, datu apstrāde un analīzes.

Audu paraugu sagatavošana

No sasaldētām smadzenēm izolējām smadzeņu struktūru un tam pievienojām attiecīgo daudzumu (žurkas hipokampam 200 - 300 μ L) atdzēsētu RIPA lizējošo buferi ar 1% proteāžu inhibitoru kokteili, kas pasargā paraugos esošo proteīnu no degradēšanās. Procedūras laikā paraugi tika nepārtraukti turēti uz ledu. Paraugus homogenizēja ar audu homogenizētāju. Ieguva proteīnu maisījumu, no kura koncentrācijas noteikšanai paņēma 20 μ L. Proteīna koncentrācijas noteikšanai izmantoja BCA pārbaudi (kits QPBCA, *Sigma-Aldrich*, ASV), kuras pamatā ir vara-proteīna kompleksa veidošanās bāziskos apstākļos, un vara reducēšanās. Reducēšanās ir proporcionāla ar proteīna daudzumu paraugā, un absorbcijas izmaiņas nosaka ar spektrofotometru (*Tecan infinite M200PRO*) 562 nm viļņu garumā. Šajā procesā izveidoja standarta līkni ar zināma proteīna atšķaidījumiem (vērša seruma albumīnu). Nomērot absorbcijas zināmajām proteīna koncentrācijām, no standarta līknes izrēķinājām kopējo proteīnu koncentrāciju paraugos. Paraugiem pirms elektroforēzes pievieno Laemmli buferi. Tad paraugus denaturēja 5 min 96° C grādos. Paraugus pēc denaturēšanas atdzēsēja uz ledu. Tos var lietot uzreiz vai arī uzglabāt 4° C grādos.

Gēla elektroforēze un pussausā pārnese

Proteīnu paraugus sadalīja pēc to molekulārā svara, izmantojot 15 % SDS poliakrilamīda gēlu pie 70 – 80 V sprieguma aptuveni 2 h, izmantojot elektroforēzes pamatprincipu, ka negatīvi lādētas daļiņas virzās uz pozitīvo lādēto elektrodu elektrolītu vidē

(izmanto tris-glicīna-nātrija dodecilsulfāta buferi), kur mazāki proteīni virzīsies ātrāk nekā lielie. Vienā no gēla bedrītēm pievienoja molekulārā svara marķieri, kā arī pozitīvo kontroli. Kopējais proteīnu daudzums paraugos tika pielāgots, lietojot antivielu (20 – 40 μg). Pēc gēla elektroforēzes, proteīni tika pārnesti uz nitrocelulozes membrānas, izmantojot to pašu elektroforēzes principu – negatīvi lādētie proteīni virzās uz pozitīvi lādēto anodi. Nitrocelulozes membrāna, vatmaņa loksnes un arī pats gēls tika samitrināts, iepriekš atdzesētā transfēra buferī, kam pievienots arī metanols labākai pārnesei. Strāvas stiprums pārnesei tika pielāgots pēc gēla laukuma. Ja gēlam bija 40 cm liels laukums, tika iestādīta 40 mA liela strāva un pārnese notika 45 – 60 min.

Bloķēšana un blotēšana

Lai novērstu membrānas savstarpējo reakciju ar antivielu, membrānu bloķē ar 5% sauso pienu un TBS buferi un 0,05% *Tween-20* 30 min istabas temperatūrā, lai izvairītos no nespecifisko antivielu piesaistes.

Membrānu inkubēja diennakti ar primāro antivielu pie 4° C ar ieteicamo antivielas atšķaidījumu TBS-T buferī ar sauso pienu. Pēc tam membrānu skaloja ar TBS buferi un 0,05% *Tween-20* istabas temperatūrā 3 reizes pa 15 minūtēm. Tad blots tika inkubēts ar sekundāro antivielu istabas temperatūrā 1 h ar ieteicamo antivielas atšķaidījumu. Membrānu skaloja vēlreiz ar TBS buferi un 0,05% *Tween-20* istabas temperatūrā 3 reizes pa 15 minūtēm.

Membrānas attīstīšana

Proteīnu ekspresijas noteikšanai izmantoja hemiluminescences reaģentus (šķīdumus A un B sajauc 1:1), kurus vienmērīgi uzklāja uz membrānas un inkubēja 1 min. Membrānu uzmanīgi noslaucīja no liekā šķidrums. Gaismas signālu detektēja ar CDD kameru (*UVP Bioimaging System*), kur iestatīja ekspozīcijas laiku. Ekspozīcijas laiku var variēt, vidēji 2 min.

Western blota datu apstrāde

Attēlu analīzei izmantojām *Image J* programmu. Proteīna ekspresiju izsaka skaitļos kā absolūto intensitāti, kas ir iezīmētā laukuma un tajā vidējo pikseļu skaita reizinājums. Eksperimentālo grupu, kurai ievadīja tikai fizioloģisko šķīdumu, izmantoja kā kontroli, piešķirot vērtību 1. Tālāk aprēķinājām pārējo grupu relatīvo intensitāti (kontrolē/katras grupas absolūto intensitāti). Proteīnus β-aktīna vai α-tubulīna ekspresiju noteikšanu izmantojām kā kontroli precīzai parauga ievadei gēlā (ekspresijai jābūt vienāgai starp paraugiem).

2.3.5.2. Imūnhistoķīmija

Labās smadzeņu puslodes koronāli sagriezām 30 µm biezumā uz ledus auksta mikrotoma. Brīvi peldošos griezumus krāsojām ar primārajām antivielām (minētas pie IHC izmantotajiem reaģentiem). Griezumi pārnesām uz šķīdumu, kas satur atšķaidītu antivielu TBS buferī ar Triton X-100. Pēc diennakts inkubācijas uz šeikera istabas temperatūrā griezumus skalojām 3 reizes TBS-T buferī ar pH 7,4, un pārnesām uz šķīdumu ar attiecīgo sekundāro antivielu: kazas anti-peļu biotīnu vai kazas anti-trušu biotīnu (*Millipore*, ASV). Pēc 2 h griezumus skalojām 3 reizes TBS-T buferī un pārnesām uz šķīdumu, kas saturēja peļu ExtrAvidin (*Sigma*, ASV) un inkubējām uz 2 h. Pēc skalošanas griezumus inkubējām 3 min niķeļa saturošā diaminobenzidīna šķīdumā. Visi iekrāsotos griezumus pārnesām uz želatīna klātiem priekšmetstikliņiem un noklājām ar segstikliņu.

IHC datu analīze

Interesējošās dorsālā hipokampa struktūras digitalizējām, lietojot Olympus DP70 digitālo kameru. Lai izvairītos no apgaismojuma izmaiņām, kas varētu ietekmēt datu analīzi, visus mērījumus veicām vienā reizē ar vienādiem kameras iestatījumiem. Vienaicīgi, lai novērstu atšķirības krāsošanas blīvumos starp krāsojumiem, mērījumi tika veikti tikai tiem griezumiem, kas bija imūnhistoķīmiski apstrādāti tai pašā reizē. Lai noteiktu procentuāli imūnpozitīvo laukumu hipokampa struktūrās *stratum oriens* CA1 šūnām un *dentate gyrus* laukumus mērījām ar *Scion Image programmu* (van Groen et al., 2006). Visi mērījumi tika veikti ar šifrētām dzīvnieku smadzenēm.

2.3.6. HPLC/masas spektrometrija AP-12 detektēšanai smadzenēs

AP-12 detektēšanai smadzenēs ar masas spektrometru izmantojām smadzenes no C57BL/6J pelēm, kurām injicēja AP-12 devā 1 mg/kg 21 dienu. Paraugu homogenizēšanu veicām ar mehānisku homogenizatoru, kam sekoja 10 min ilga ultrasonifikācija ledus vannā. Priekš savienojuma AP-12 ekstrakcijas no homogenizētajām smadzenēm (0,2 ml) lizātu ievietojām 13x100 mm stikla mēģenēs un ekstrahēja ar 1,2 ml hloroforma. Visas mēģenes tika aizvērtas, vorteksētas un uzliktas uz 2 h uz rotējošā kratītāja 37° C temperatūrā. Katra mēģene tika atdalīta no rotējošā kratītāja un nocentrifugēta pie 3200 rpm apgriezieniem 5 min 4° C temperatūrā (*Jouan CR3 bench-top centrifuge*). Pēc ūdens slāņa noņemšanas hloroforma fāze bija aptuveni 1 ml. Hloroforma fāzi pārlikām uz jaunu stikla mēģeni, kur tai ļāva izgarot

zem slāpekļa gāzes. Sausos paraugus sajaucām ar 0,2 ml 50% ūdens, 50% acetonitrils, 0,1% skudrskābes. Lai noteiktu AP-12 ekstrakcijas daudzumu smadzenēs no eksperimentālajām peļu smadzenēm, tika sagatavoti arī kontroles smadzeņu audi bez AP-12, kuriem pievienoja AP-12 (0,1 µg/ml) pirms un pēc ekstrakcijas procesa.

Analīzei izmantojām masas spektrometru *Applied Biosystems/Sciex API 4000 Q-TRAP triple-quadrupole* (Kanāda). Turbo jonu avots tika vadīts ar pozitīvo elektronu klīdumu 650° C temperatūrā. Izmantotā gāze bija slāpekļis. Deklasterojošais potenciāls (*declustering potential*), kolīzijas izejas potenciāls (*collision exit potential*) un kolīzijas enerģija (*collision energy*) tika optimizēta (priekš) AP-12 analīzei. Kvantitatīvajai analīzei izmantoja *Shimadzu Class VP HPLC* sistēmu. Šķidrums hromatogrāfijai izmantoja *Phenomenex (ASV) Luna Phenyl-Hexyl 3* mikronu 2 x 30 mm HPLC kolonnu 50° C temperatūrā. Injekcijas tilpums bija 5 µl un plūsmas ātrums 1,0 ml/min. Šķīdinātājs A bija 0,1% skudrskābe ūdenī un šķīdinātājs B bija acetonitrils ar 0,1% skudrskābi. Laiks pilnam gradientam bija 10 min.

2.4. Statistiskā datu apstrāde

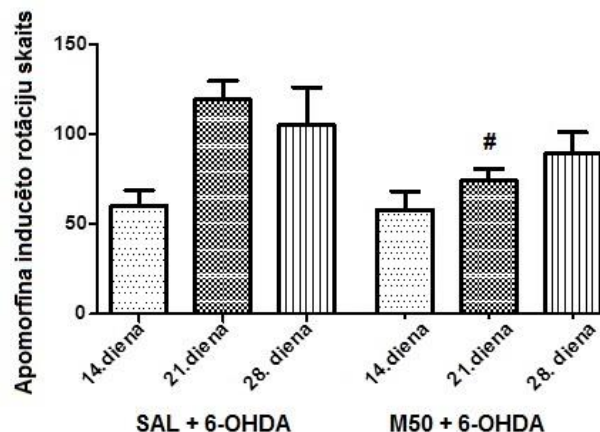
Visi iegūtie dati apstrādāti ar programmu *GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc.*, izmantojot parametriskos un neparametriskos kritērijus: nesapāroto *t*-testu, *Mann-Whitney* testu un Bonferoni multiplās salīdzināšanas testu. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski ticamiem pie $p < 0,05$. Visas vērtības ir izteiktas kā vidējās aritmētiskās (vidējā standartkļūda; S.E.M.).

3. REZULTĀTI

3.1. Mildronāta ietekme uz proteīnu ekspresiju striatumā un *substantia nigra* PD modeļžurkām

3.1.1. Modeļa validēšana un mildronāta ietekme uz apomorfīna-inducētajām rotācijām

Intrastriatāli ievadīto (labajā pusē) 6-OHDA izraisīto PD modeli novērtējām ar subkutāni ievadītu apomorfīnu (0,2 mg/kg), kas, ja modelis strādā, izraisa kontralaterālas rotācijas. Kontroles un mildronāta grupā (50 un 100 mg/kg) bez 6-OHDA bojājuma, apomorfīns neradīja rotācijas (dati nav attēloti), taču ievērojamas apomorfīna-inducētas rotācijas bija novērojamas 6-OHDA grupā 14., 21. un 28. dienā pēc 6-OHDA ievadīšanas, kas sevišķi izpaudās 21. dienā (10. attēls).



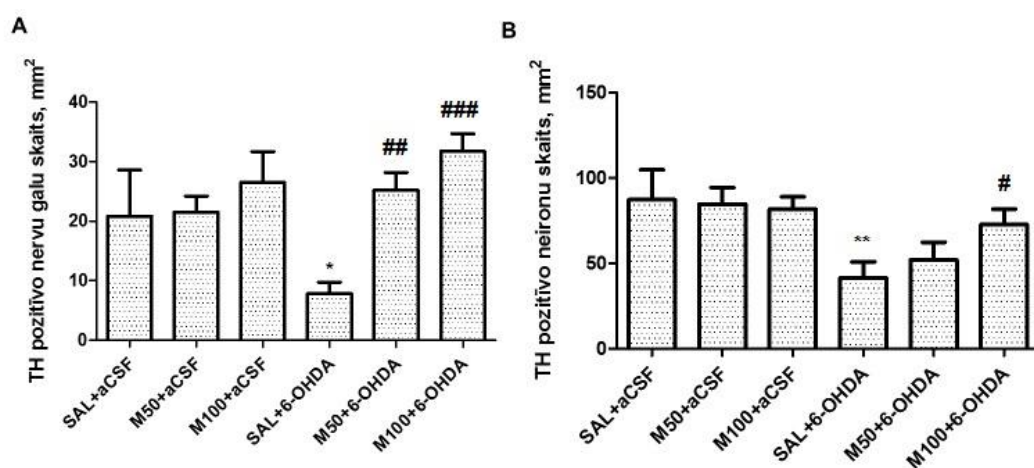
10.attēls. Mildronāta (50 mg/kg i.p. 14 dienas) ietekme uz apomorfīna inducētajām kontralaterālajām rotācijām PD modeļžurkām

$p = 0,003$ M50+6-OHDA vs. SAL+ 6-OHDA, nesapārotais t-tests ($n = 8$).

Mildronāts devā 50 mg/kg statistiski ticami samazināja 6-OHDA injekciju saņēmējām žurkām apomorfīna-inducētās rotācijas 21. dienā pēc ķirurģiskās iejaukšanās (78,8 (13,5) vs. 147 (20,9); $p = 0,003$), salīdzinot ar 6-OHDA grupas attiecīgajām rotācijām. Tendence samazināt rotāciju skaitu salīdzinājumā ar 6-OHDA grupu saglabājās arī 28. dienā. Mildronāta deva 100 mg/kg uzrādīja līdzīgu efektu uz rotāciju skaitu (dati nav attēloti).

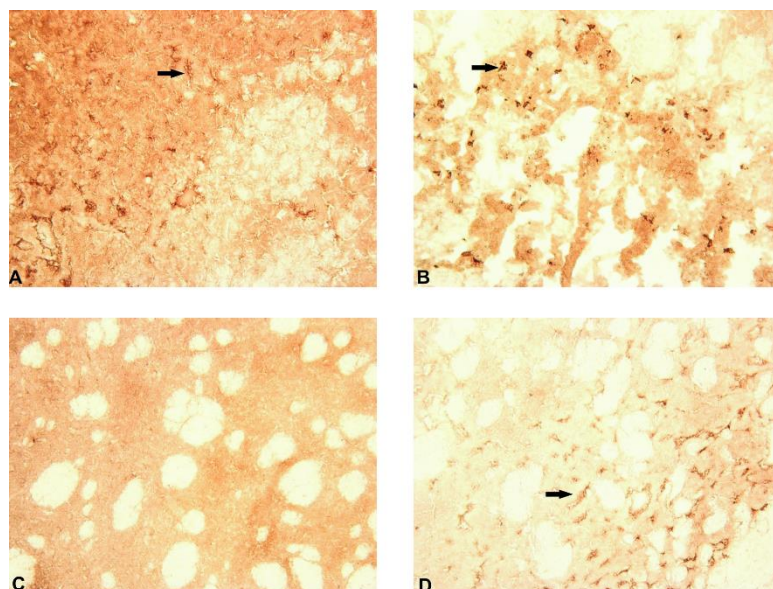
3.1.2. Mildronāta ietekme uz TH ekspresiju

Pēc modeļa pārbaudes dzīvniekus smadzeņu audos – striatumā un *substantia nigra* imūnhistoķīmiski noteicām enzīma TH ekspresiju. Striatumā TH saskaitījām pozitīvi iekrāsotos nervu galus, savukārt *substantia nigra* pozitīvi iekrāsotās neironu šūnas. Dati uzrāda, ka 6-OHDA (SAL+ 6-OHDA) izraisīja izteiktus (aptuveni 5-kārtīgu) TH samazinājumu bojātajā striatumā salīdzinājumā ar kontroles grupu: 5 (2) vs. 21 (10) nervu gali/mm², $p = 0,03$; 11. A attēls. Mildronāts pats par sevi devās 50 un 100 mg/kg neietekmēja TH ekspresijas blīvumu nervu galos. Mildronāta 14 dienu ilga ievadīšana, pirms 6-OHDA ievadīšanas, pasargāja no 6-OHDA toksicitātes striatumā. M50: 25 (4) vs. 5 (2) nervu šķiedras/mm², $p = 0,001$ un M100: 31 (3) vs. 5 (2) nervu šķiedras/mm², $p = 0,0002$; 11. A attēls. Taču *substantia nigra* stuktūrā neirotoksīns 6-OHDA izraisīja aptuveni 2,5-kārtīgu TH ekspresijas samazinājumu salīdzinājumā ar kontroles grupu: 44 (14) vs. 95 (30) neironi/mm², $p = 0,01$. Mildronāts 100 mg/kg aizsargāja no 6-OHDA toksicitātes: 78 (16) vs. 44 (14) neironi/mm², 11. B attēls.



11. attēls. Mildronāta (50 un 100 mg/kg i.p., 14 dienas) ietekme uz TH ekspresiju striatumā (A) un *substantia nigra* (B) PD modeļžurkām

A: * $p = 0,03$ SAL + 6-OHDA vs. SAL+aCSF, ## $p = 0,001$ M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, ### $p < 0,001$ M100+6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA; B: * $p < 0,05$ SAL + 6-OHDA vs. SAL+aCSF, # $p < 0,05$ M100+6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, nesapārotais t-tests ($n = 8$).

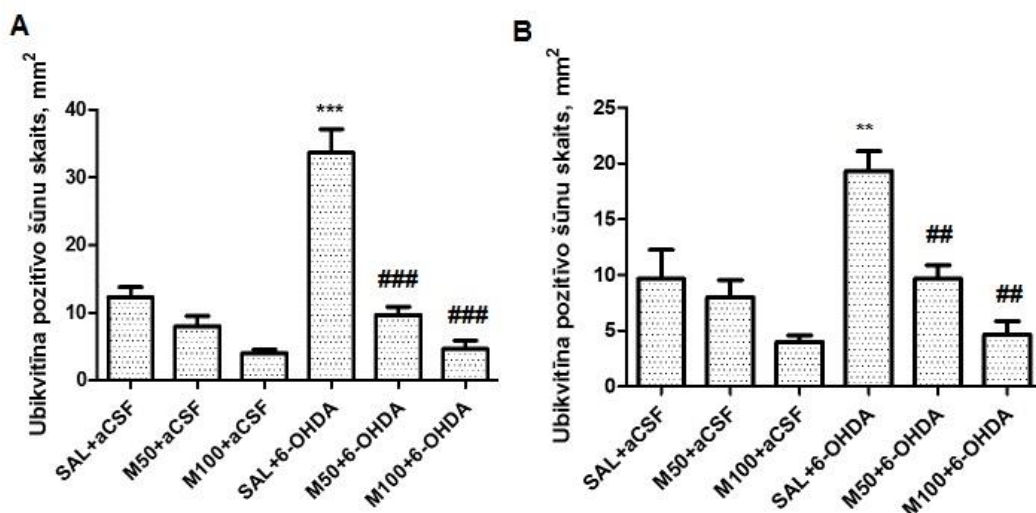


12. attēls. Fotomikrogrāfijas, kas rāda mildronāta ietekmi uz TH pozitīvo nervu galu skaitu striatumā 6-OHDA izraisītā PD modeļžurkās

A: SAL+ aCSF; B: M50 mg/kg+aCSF; C: SAL+6-OHDA; D: M50+6-OHDA. Attēli ir ar 400-kārtīgu palielinājumu.

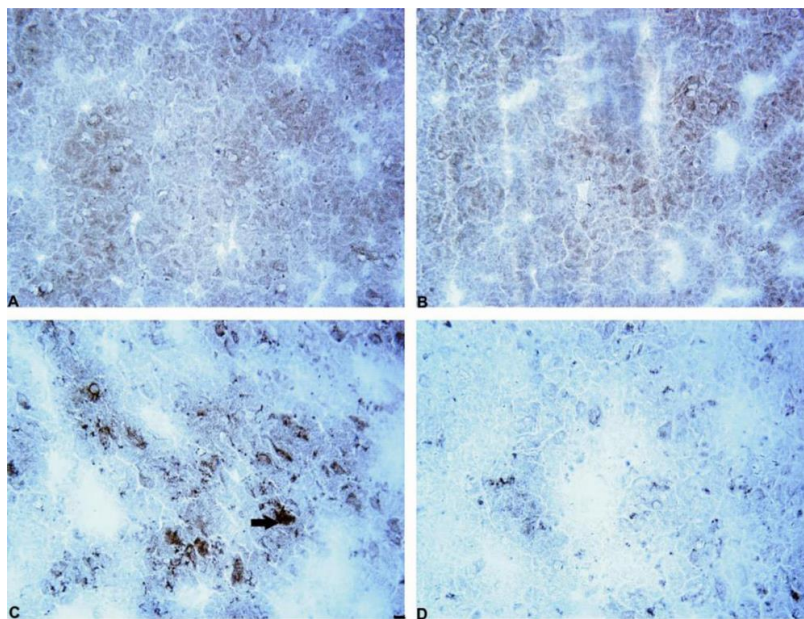
3.1.3. Mildronāta ietekme uz ubikvitīna, Notch-3, GFAP, iNOS un Iba-1 PD modeļžurkām

Kontroles grupas striatumā bija novērojama vāja ubikvitīna proteīna ekspresija (šajā grupā nebija daudz pozitīvu iekrāsoto šūnu). Toties 6-OHDA grupā tika novērots 3-kārtīgs pozitīvo šūnu skaita palielinājums salīdzinājumā ar kontroli: 35 (4) *vs.* 12 (2) šūnas/mm², $p = 0,001$; 13. A attēls. Mildronāts *per se* devā 50 mg/kg neietekmēja ubikvitīna proteīna ekspresijas daudzumu šūnās, bet devā 100 mg/kg novēroja tendenci samazināt ubikvitīna daudzumu. Mildronāts abās devās samazināja ubikvitīna proteīna ekspresiju 6-OHDA bojātajās smadzenēs, normalizējot to līdz kontroles līmenim: 11 (3) *vs.* 35 (4) šūnas/mm², $p = 0,001$ un 6 (2) *vs.* 35 (4) šūnas/mm², $p < 0,001$; 13. A attēls. Līdzīgi rezultāti tika iegūti arī *substantia nigra* struktūrā (13. B attēls).



13.attēls. Mildronāta ietekme (50 un 100 mg/kg i.p., 14 dienas) uz ubikvitīna pozitīvo šūnu skaitu PD modeļžurku striatumā (A) un *substantia nigra* (B) struktūrās

A: * $p = 0,001$ SAL + 6-OHDA vs. SAL + aCSF, ### $p = 0,001$ M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, ### $p < 0,001$ M100+6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA; B: ** $p < 0,01$ SAL + 6-OHDA vs. SAL + aCSF, ## $p < 0,01$ M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, # $p < 0,01$ M100 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, nesapārotais t-tests ($n = 8$).

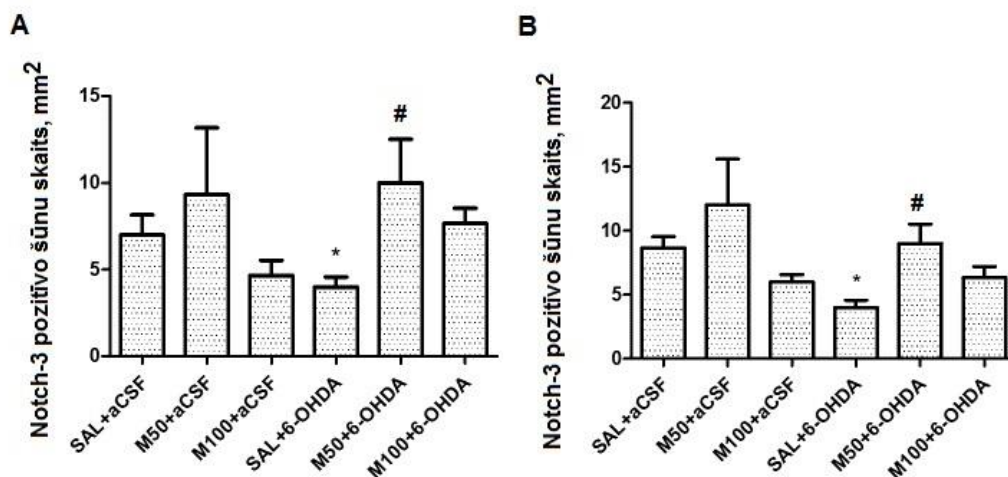


14. attēls. Fotomikrogrāfijas, kas rāda mildronāta ietekmi uz ubikvitīna pozitīvo šūnu skaitu striatumā 6-OHDA izraisītā PD modeļžurkām

A: SAL+ aCSF; B: SAL + M50; C: SAL+6-OHDA; D: M50+6-OHDA. Ar bultu atzīmēta pozitīvi iekrāsota šūna. Attēli ir ar 400-kārtīgu palielinājumu.

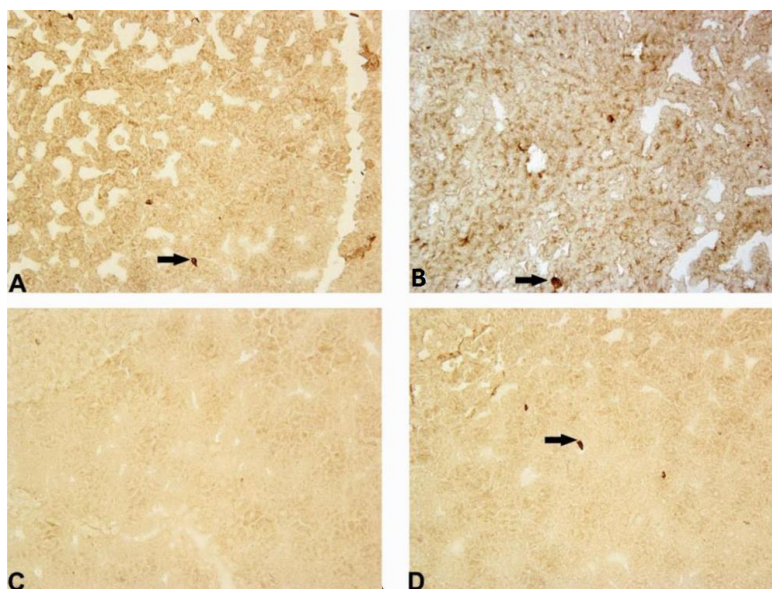
Neirotoksīna ievadīšana statistiski būtiski samazināja Notch-3 proteīna ekspresijas daudzumu šūnās žurku striatumā salīdzinājumā ar kontroli: 3 (1) vs. 6 (1) šūnas/mm², $p =$

0,04; 15. A attēls. Mildronāts *per se* devā 50 mg/kg uzrādīja tendenci palielināt, bet devā 100 mg/kg samazināt ubikvitīna ekspresiju abās struktūrās. Toties PD modeļdzīvnieku abās struktūrās mildronāta ievadīšana devā 50 mg/kg samazināja Notch-3 pozitīvo šūnu skaitu salīdzinājumā ar 6-OHDA grupu: 9 (3) vs. 3 (1) šūnas/mm², p = 0,045. Mildronāta deva 50 mg/kg uzrādīja tendenci palielināt Notch-3 pozitīvo šūnu skaitu abās struktūrās (15.attēls).



15. attēls. Mildronāta (50 un 100 mg/kg i.p., 14 dienas) ietekme uz Notch-3 ekspresiju striatumā (A) un *substantia nigra* (B) 6-OHDA izraisītā PD modeļžurkām

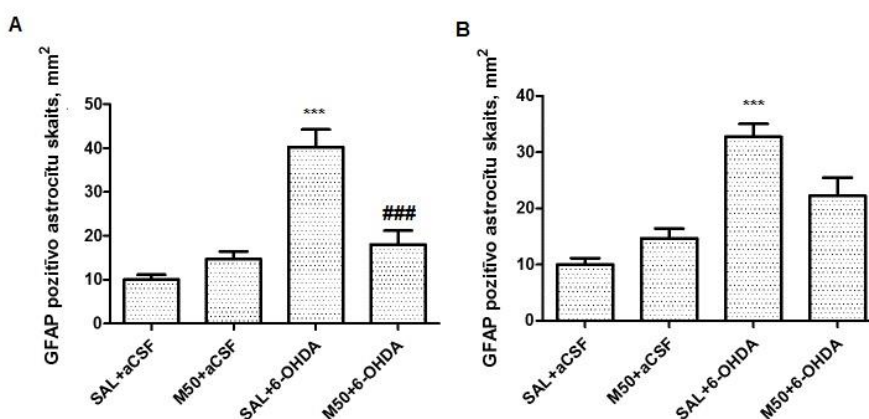
A: *p < 0,05 SAL + 6-OHDA vs. SAL + aCSF, #p < 0,05 M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA; B: *p < 0,05 SAL + 6-OHDA vs. SAL + aCSF, # p < 0,05 M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, nesapārotais t-tests (n = 8).



16. attēls. Fotomikrogāfija, kas rāda mildronāta ietekmi uz Notch-3 pozitīvo šūnām striatumā 6-OHDA izraisītā PD modeļžurkām

A: SAL; B: M50; C: 6-OHDA; D: M50+6-OHDA. Ar bultu atzīmēta pozitīvi iekrāsota šūna. Attēliem ir x400 palielinājums.

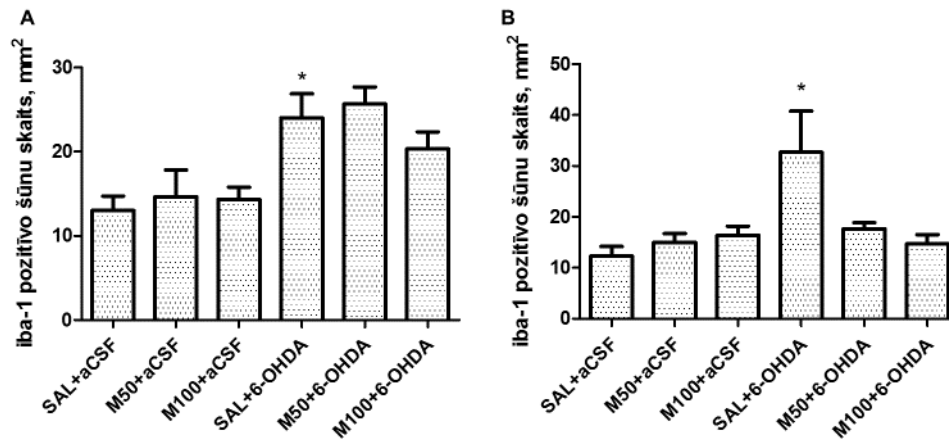
Saskaitot GFAP pozitīvās šūnas, tika konstatēts 4-kārtīgs GFAP proteīna ekspresijas palielinājums 6-OHDA grupā, salīdzinot ar kontroles grupu abās struktūrās: 42 (6) vs. 11 (3) šūnas/mm², p = 0,001; 17. attēls. Mildronāts *per se* devā 50 neietekmēja GFAP ekspresiju, taču PD modeļžurku striatumā mildronāts būtiski samazināja 6-OHDA izraisīto GFAP ekspresijas palielinājumu to mazinot aptuveni 2-kārtīgi: 20 (4) vs. 42 (6) šūnas/mm², p = 0,001, 17. A attēls. Arī *substantia nigra* struktūrā 6-OHDA palielināja GFAP proteīna ekspresiju salīdzinājumā ar kontroli: 35 (5) vs. 11 (3) šūnas/mm², p = 0,002 (17. B attēls), bet mildronāts uzrādīja tendenci samazināt 6-OHDA aktivēto GFAP ekspresiju.



17. attēls. Mildronāta (50 mg/kg i.p., 14 dienas) ietekme uz GFAP ekspresiju striatumā (A) un *substantia nigra* (B) 6-OHDA izraisītā PD modeļžurkām

A: ***p < 0,001 SAL + 6-OHDA vs. SAL + aCSF, ###p = 0,001 M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, B: ***p < 0,001 SAL + 6-OHDA vs. SAL + aCSF, nesapārotais t-tests (n = 8).

Šajā pētījumā tika noteikts arī aktivētās mikroglijas proteīns Iba-1, nosakot pozitīvo šūnu skaitu striatumā un *substantia nigra*. Neurotoksīns 6-OHDA statistiski ticami paaugstināja Iba-1 ekspresiju salīdzinājumā ar kontroles grupu (A: 23 (3) vs. 12 (2) šūnas/mm², p = 0,03; B: 32 (8) vs. 11 (2) šūnas/mm², p = 0,04; 18. attēls).

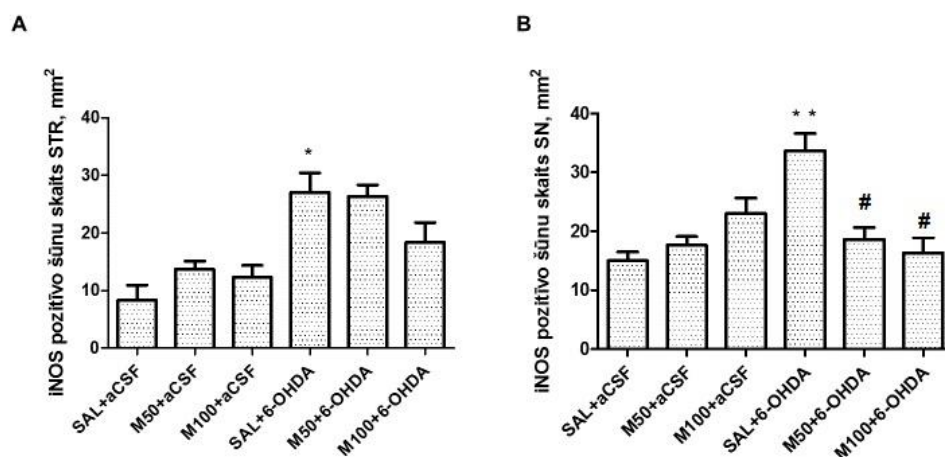


18. attēls. Mildronāta (50 un 100 mg/kg i.p., 14 dienas) ietekme uz Iba-1 ekspresiju 6-OHDA izraisītajā PD modeļžurkām striatumā (A) un *substantia nigra* (B) struktūrās

A: *p = 0,03 SAL+6-OHDA vs. SAL+aCSF; B: SAL+6-OHDA vs. SAL+aCSF *p = 0,04, nesapārotais t-tests (n = 8).

Mildronāts devās 50 un 100 mg/kg neietekmēja Iba-1 ekspresiju salīdzinājumā ar kontroles grupu. Mildronāta vienlaicīga ievadīšana ar 6-OHDA grupā nedaudz pat palielināja Iba-1 ekspresiju. Savukārt mildronāta devai 100 mg/kg bija tendence samazināt Iba-1 ekspresiju abās pētītajās smadzeņu struktūrās.

Abās smadzeņu struktūrās tika noteikta arī enzīma iNOS ekspresija. Abās struktūrās 6-OHDA grupā tika novērota paaugstināta iNOS ekspresija salīdzinājumā ar kontroles grupu (19. attēls).



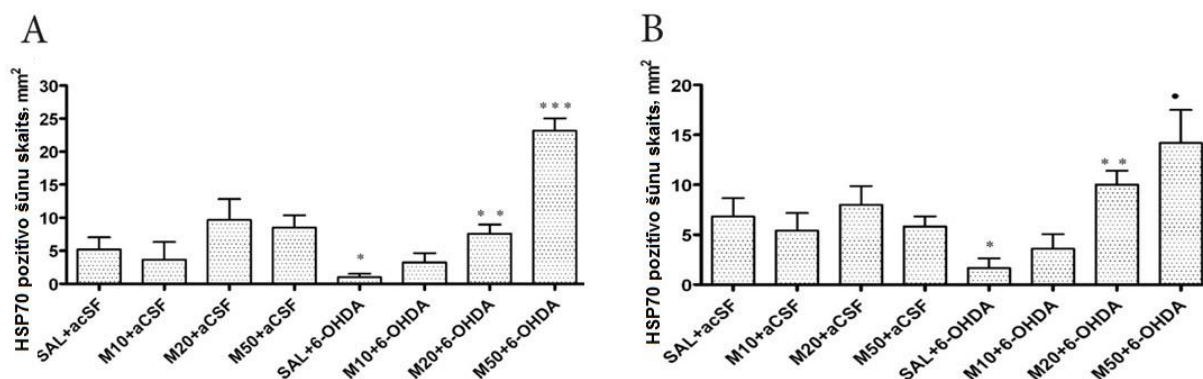
19. attēls. Mildronāta (50 un 100 mg/kg i.p., 14 dienas) ietekme uz iNOS pozitīvo šūnu skaitu striatumā (A) un *substantia nigra* (B) 6-OHDA izraisītā PD modeļžurkām

A: *p = 0,02 SAL + 6-OHDA vs. SAL+ aCSF STR, B: **p = 0,007 SAL + 6-OHDA vs. SAL + aCSF, #p = 0,045 M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA un #p= 0,046 M100 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, nesapārotais t-tests (n = 8).

Mildronāts *per se* neietekmēja iNOS ekspresiju ne striatumā, ne *substantia nigra* salīdzinājumā ar kontroli. Toties *substantia nigra* struktūrā mildronāta ievadīšana devās 50 un 100 mg/kg samazināja iNOS ekspresiju, normalizējot to līdz kontroles līmenim (M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, p = 0,045; M100 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, attiecīgi).

3.2. Mildronāta ietekme uz HSP70, GDNF un NCAM ekspresiju striatumā un *substantia nigra* PD modeļžurkām

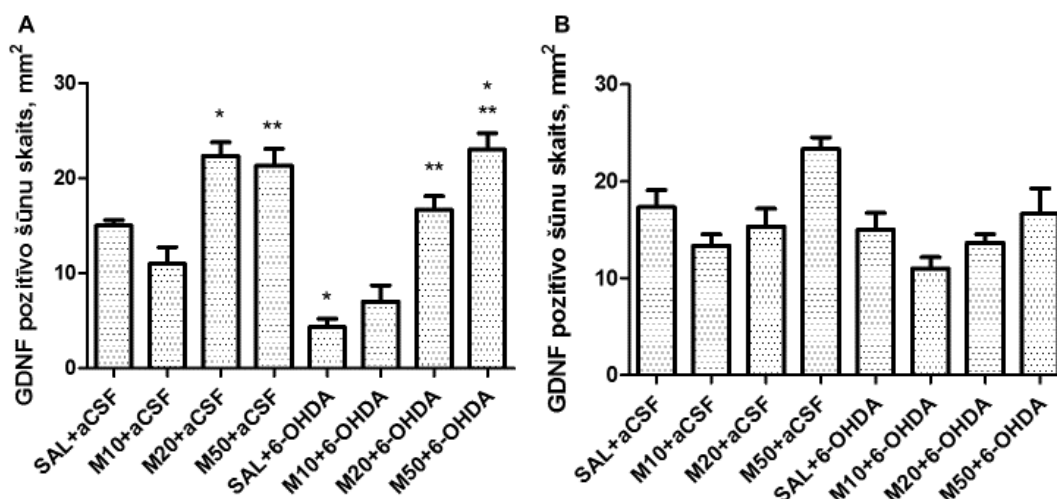
6-OHDA izraisītā PD modelī pētījām arī mazākas mildronāta devas 10, 20 un 50 mg/kg un to ietekmi uz proteīnu HSP70, GDNF un NCAM ekspresiju striatumā un *substantia nigra*. 6-OHDA samazināja HSP70 pozitīvi iekrāsoto šūnu skaitu striatumā salīdzinājumā ar kontroli: 2 (1) vs. 7 (2) šūnas/mm², p = 0,03; 20. A attēls). Mildronāts *per se* devās 10, 20 un 50 mg/kg neietekmēja HSP70 ekspresiju, bet mildronāta premedikācija palielināja pozitīvi iekrāsoto HSP70 šūnu skaitu 6-OHDA bojātajā striatumā salīdzinājumā ar 6-OHDA grupu: 8 (2) vs. 2 (1), p = 0,0009; 23 (2) vs. 2 (1) šūnas/mm², p < 0,0001). Līdzīgi rezultāti tika iegūti arī ar *Western* blota analīzi.



20. attēls. Mildronāta (10, 20 un 50 mg/kg i.p., 14 dienas) ietekme uz HSP70 pozitīvo šūnu skaitu striatumā (A) un *substantia nigra* (B) 6-OHDA izraisītā PD modeļžurkām A: *p = 0,04 SAL+6-OHDA vs. SAL +aCSF, **p = 0,0009 M20 + 6-OHDA vs. SAL+6-OHDA; ***p < 0,0002 M50 + 6-OHDA vs. SAL+6-OHDA; B: *p = 0,03 SAL+6-OHDA vs. SAL + aCSF, **p = 0,0007 M20 + 6-OHDA vs. SAL+6-OHDA, ***p = 0,003 M50 + 6-OHDA vs. SAL+6-OHDA.

Dati liecina, ka 6-OHDA samazināja *substantia nigra* HSP70 pozitīvi piekrāsoto šūnu skaitu, salīdzinot ar kontroli: 2 (1) vs. 7 (2) šūnas/mm², p = 0,03. Līdzīgi kā striatumā, mildronāts *per se* devās 10, 20 un 50 mg/kg neietekmēja HSP70 ekspresiju, bet mildronāta premedikācija devā 20 mg/kg un 50 mg/kg palielināja pozitīvi iekrāsoto HSP70 šūnu skaitu 6-OHDA bojātajā *substantia nigra*: 10 (2) vs. 2 (1), p = 0,0007 un 14 (4) vs. 2 (1) šūnas/mm², p = 0,003 (20. B attēls).

Neirotoksīna 6-OHDA injekcija būtiski samazināja GDNF pozitīvi iekrāsoto šūnu skaitu žurkas striatumā, salīdzinot ar kontroles grupu: 5 (2) vs. 16 (1) šūnas/mm², p = 0,0004. Mildronāts *per se* devā 10 mg/kg neietekmēja GDNF ekspresiju, bet devās 20 un 50 mg/kg tās nedaudz palielināja GDNF pozitīvi iekrāsoto šūnu skaitu: 23 (2) vs. 16 (1), p = 0,005, un 21 (2) vs. 2 (1) šūnas/mm², p = 0,01 (21. attēls).

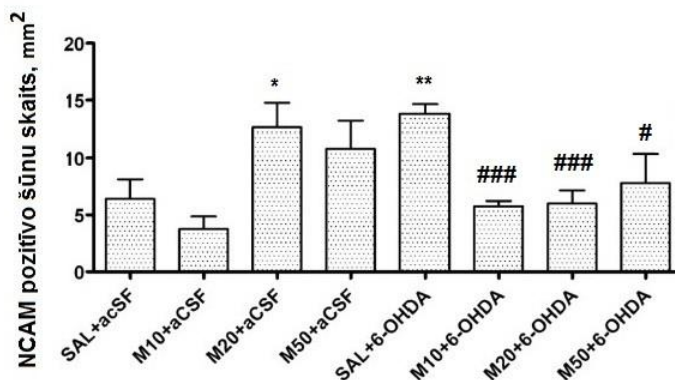


21.attēls. Mildronāta (10, 20 un 50 mg/kg i.p., 14 dienas) ietekme uz GDNF pozitīvo šūnu skaitu striatumā (A) un *substantia nigra* (B) struktūrā 6-OHDA izraisītā PD modeļžurkām A: #p = 0,05 M20 + aCSF vs. SAL + aCSF, ##p = 0,01 M50 + aCSF, *p < 0,004 SAL + 6-OHDA vs. SAL + aCSF, **p = 0,001 M20 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, ***p = 0,0001 M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA

Līdzīgu tendenci uzrādīja arī *Western bloti*. Mildronāts devās 20 un 50 mg/kg palielināja GDNF pozitīvo šūnu skaitu 6-OHDA bojātajā striatumā salīdzinājumā ar 6-OHDA grupu: 18 (2) vs. 5 (2), p = 0,001; un 24 (3) vs. 5 (2) šūnas/mm², p = 0,0001. *Substantia nigra* struktūrā GDNF ekspresija būtiski neatšķiras starp grupām.

6-OHDA ievadīšana striatumā samazināja ar NCAM pozitīvo šūnu skaitu, salīdzinot ar kontroles grupu: 3 (2) vs. 9 (3) šūnas/mm², p = 0,049 (dati nav attēloti). Mildronāts *per se* devā 10 mg/kg uzrādīja tendenci samazināt NCAM ekspresiju, bet lielākās devās – 20 un 50

mg/kg tas neietekmēja NCAM ekspresiju. Mildronāta ievadīšana 50 mg/kg 2 nedēļas pirms 6-OHDA injekcijas palielināja NCAM-pozitīvo šūnu daudzumu: 17 (5) vs. 3 (2) šūnas/mm², p = 0,008. Struktūrā *substantia nigra* 6-OHDA ievadīšana palielināja NCAM pozitīvās šūnas salīdzinājumā ar kontroles grupu: 14 (2) vs. 7 (2) šūnas/mm², p = 0,005 (22. attēls).



22.attēls. Mildronāta (10, 20 un 50 mg/kg i.p., 14 dienas) ietekme uz NCAM pozitīvo šūnu skaitu *substantia nigra* 6-OHDA izraisītā PD modeļžurkām

*p = 0,05 M20 + aCSF vs. SAL + aCSF, **p = 0,005 SAL + 6-OHDA vs. SAL + aCSF, ###p = 0,0001 M10 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, ###p = 0,001 M20 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA, #p = 0,05 M50 + 6-OHDA vs. SAL + 6-OHDA.

Mildronāts *per se* 10 mg/kg un 50 mg/kg neietekmēja NCAM ekspresiju *substantia nigra*, toties devā 20 mg/kg tas palielināja NCAM ekspresiju salīdzinājumā ar kontroles grupu: 12 (2) vs. 7 (2) šūnas/mm², p = 0,049 (22. attēls). Premedikācija ar mildronātu devās 10, 20 un 50 mg/kg samazināja NCAM pozitīvo šūnu skaitu salīdzinājumā ar 6-OHDA grupu, tuvinot to kontroles līmenim.

3.3. Mildronāta ietekme uz Tg-APP_{S_WDI} peļu uzvedību un hipokampa proteīnu ekspresiju

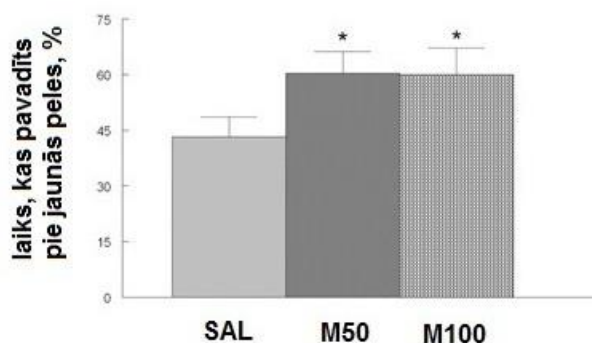
3.3.1. Mildronāta ietekme uz lokomotoro aktivitāti un bailēm atvērtā lauka un nulles labirinta testā

Pēc 2 nedēļu mildronāta premedikācijas peles tika pārbaudītas atvērtā lauka testā un nulles labirintā, lai noteiktu lokomotoro aktivitāti un baiļu līmeni. Netika atklātas atšķirības starp grupām: SAL 5,3 (1,5); M50 4,5 (1,4); M100 3,7 (0,9), kā arī nebija atšķirības nulles labirintā starp grupām: SAL 82,8 (10,6); M50 68,5 (5,9); M100 77,9 (8,0) (dati nav attēloti).

Tādējādi var teikt, ka visiem dzīvniekiem bija līdzīga motorā aktivitāte un līdzīgs baiļu līmenis.

3.3.2. Mildronāta ietekme uz sociālās atpazīšanas testu

Sociālās atpazīšanas testā mildronāts devās 50 un 100 mg/kg statistiski ticami pavadīja ilgāku laiku pie jaunās peles otrajā dienā: M50 60,4 (5,8) vs. SAL 43,2 (5,3) $p < 0,05$; M100 60,0 (7,2) vs. SAL, $p < 0,05$; 23. attēls).



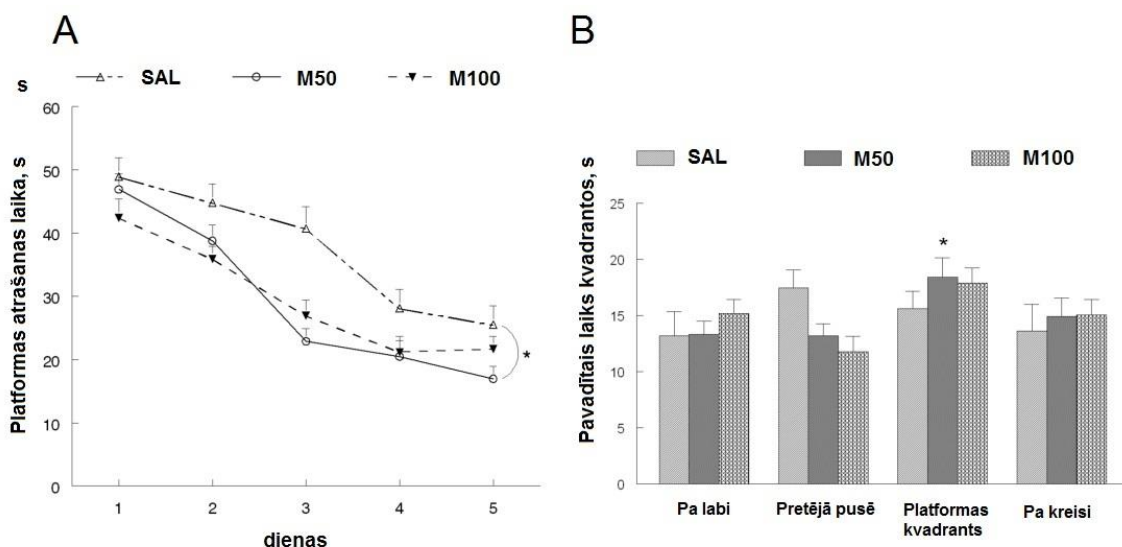
23. attēls. **Mildronāta ietekme uz TgAPP_{SwdI} pelēm sociālās atpazīšanā otrajā testa dienā**

Vidējie aritmētiski pavadītais laiks izteikts % no kopējā, ko peles pavadīja pie jaunās peles. * $p < 0,05$ M50 vs. SAL, * $p < 0,05$ M100 vs. SAL.

3.3.3. Mildronāta ietekme uz telpisko atmiņu ūdens labirintā

Ūdens labirinta testā visas grupas uzlaboja platformas atrašanas laiku 5 dienu laikā. Vidējais aritmētiskais laiks, kas bija nepieciešams pelei, lai atrastu platformu, piektajā dienā bija grupām: SAL 25,5 (7,2); M50 16,9 (2,5); M100 21,7 (3,4) s. Lai gan ir tendence, ka abas mildronāta grupas iemācījās ātrāk atrast platformu, statistiski ticama atšķirība tika atrasta tikai starp mildronāta 50 mg/kg grupu un kontroles grupu piektajā dienā.

Netika atrastas statistiski ticamas atšķirības starp peldēšanas ātrumiem: SAL 18,8 (0,8) cm/s; M50 19,0 (0,8) cm/s; M100 19,1 (0,6) cm/s.



24. attēls. Mildronāta ietekme uz mācīšanos un telpisko atmiņu ūdens labirinta testā

A: Platformas atrašanas laiks 5 dienu laikā starp grupām; B: pavadītais laiks peldbaseina kvadrantā, kurā atradās platforma.

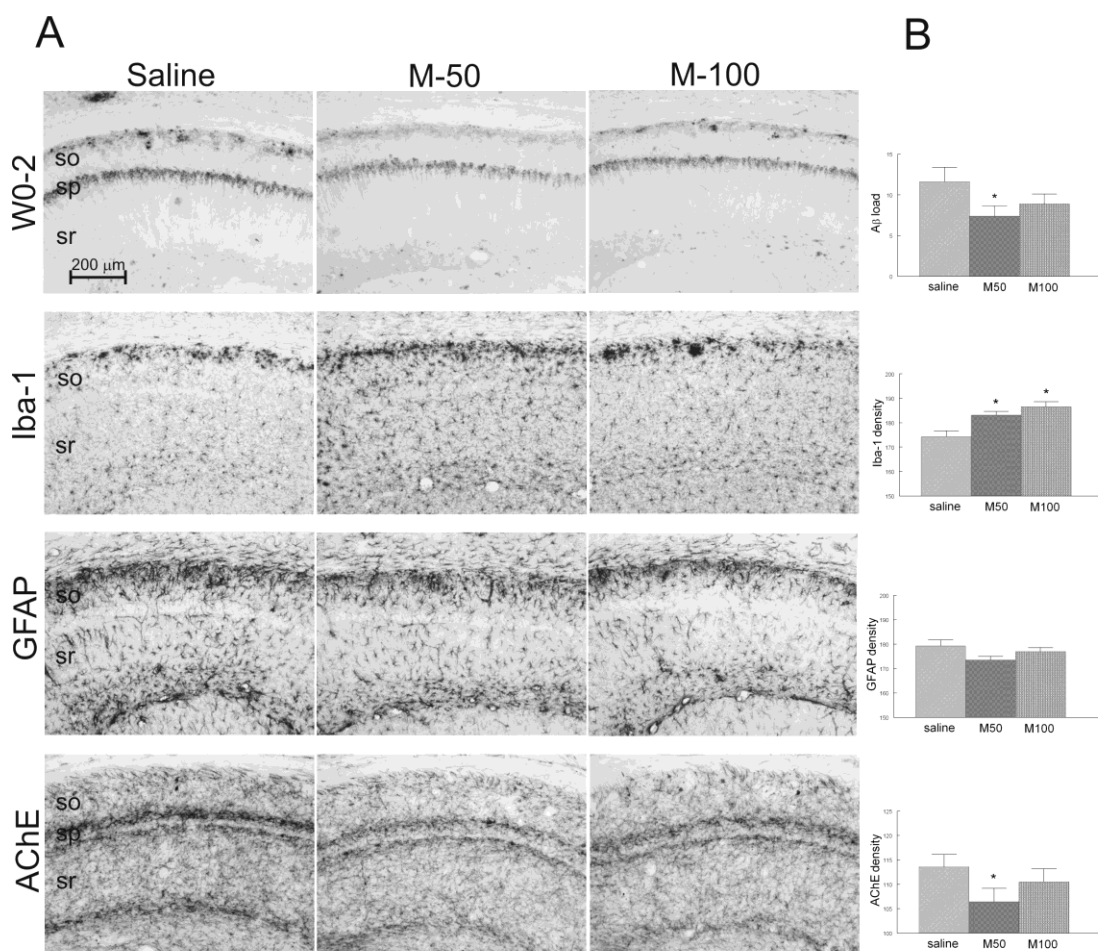
3.3.4. Mildronāta ietekme uz Aβ peptīdu akumulāciju hipokampā

AD patoloģijas noteikšanai noteica Aβ peptīdu uzkrāšanās daudzumu konkrētos hipokampa reģionos - *stratum oriens CA1*, *stratum pyramidale* un *stratum radiatum*. Tika atrasts, ka Aβ proteīnu uzkrājumi statistiski ticami bija mazāk mildronāta 50 mg/kg grupā salīdzinājumā ar kontroli (M50 vs. SAL, $p < 0.05$) un tendence samazināt Aβ *stratum oriens* reģionā arī mildronāta 100 mg/kg grupā. (SAL 1,34 (0,24); M50 0,59 (0,23); M100 0,79 (0,23); W0 biomarkieris, 25. attēls).

Ar mikroglijas marķieri Iba-1 tika atrasts, ka abās mildronāta grupās mikroglija bija aktivētāka salīdzinājumā ar kontroli. Vidējie krāsojuma blīvuma mērījumi grupās bija SAL 174,4 (2,3); M50 183,2 (1,5); M100 186,6 (1,9) ar statistiski ticamu atšķirību abām mildronāta grupām salīdzinājumā ar kontroli. Astroglijas noteikšanai izmantoja GFAP marķieri, bet netika atrastas atšķirības starp grupām. Vidējie krāsojuma blīvuma mērījumi grupās bija SAL 179,3 (2,4); M50 173,5 (1,6); M100 176,9 (1,6).

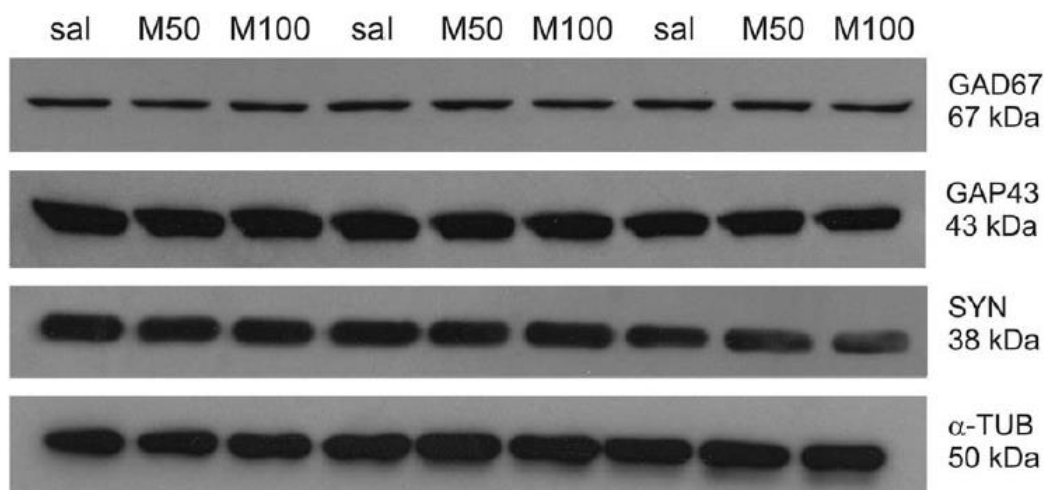
Ar imūnhistoķīmijas metodi noteica arī AChE ekspresiju hipokampa reģionos un starp vidējiem rādītājiem nebija statistiski ticamas atšķirības hipokampā: SAL 174,5 (2,0); M50

165,7 (3,9); M100 169,5 (3,4). Tomēr vidējie rādītāji priekš AChE blīvumam *stratum pyramidale* bija statistiski ticami samazināts mildronāta 50 mg/kg grupā salīdzinājumā ar kontroli: SAL 113,6 (2,5); M50 106,5 (2,7); M100 110,5 (2,6) (25. attēls).



25. attēls. Fotomikrogrāfijas (A) no smadzeņu struktūras hipokampa starp pētījuma grupām: SAL, M50 un M100, kas krāsotas ar antivielām pret Aβ (W0-1), Iba-1, GFAP un AChE un vidējie aritmētiskie blīvuma mērījumi diagrammās (B).

Lai labāk saprastu molekulāro pamatu, kas uzlaboja atmiņu TgAPP pelēm, papildus veica *Western* blota analīzi priekš GAD67, sinaptofizīna un GAP-43 proteīniem hipokampā, taču izvēlētie marķieri neuzrādīja nekādas izmaiņas starp grupām (26. attēls).



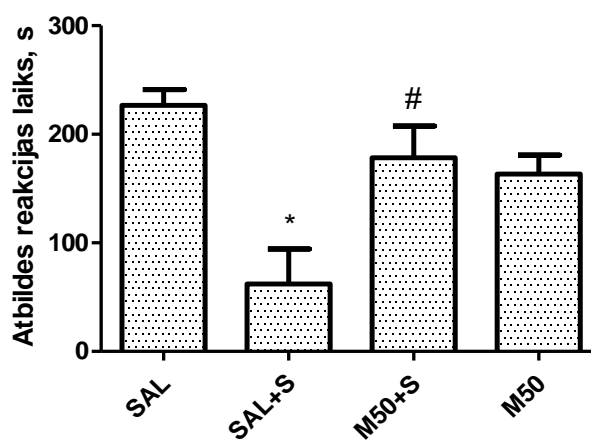
26.attēls. Reprezentatīvie *Western* blota attēli no hipokampa homogenātiem SAL, M50 un M100 grupās GAD67, GAP-43 un sinaptofizīnam (SYN).

α -tubulīns (α -TUB) tika pārbaudīts kā kopējā proteīna daudzuma kontrole gēlā. Netika konstatētas atšķirības starp grupām šiem marķieriem.

3.4. Mildronāta ietekme uz imobilizācijas stresa inducēto amnēziju žurkām

3.4.1. Mildronāta ietekme uz atmiņu pasīvās izvairīšanās testā

Eksperimentālās žurkas, kuras imobilizēja 2 h, bija ar izteiktu atmiņas pasliktinājumu pasīvās izvairīšanās testā. Tas salīdzinājumā ar kontroli par trešdaļu sliktāk atcerējās piedzīvoto elektrošoku ($p = 0,0146$; 27. attēls). Pagarinoties latentajam periodam, var spriest, ka žurka atceras iepriekš piedzīvoto no iepriekšējās dienas.



27. attēls. Pasīvās izvairīšanās testa reakcijas laiks starp žurkām ar imobilizācijas stresu (S) un bez (SAL).

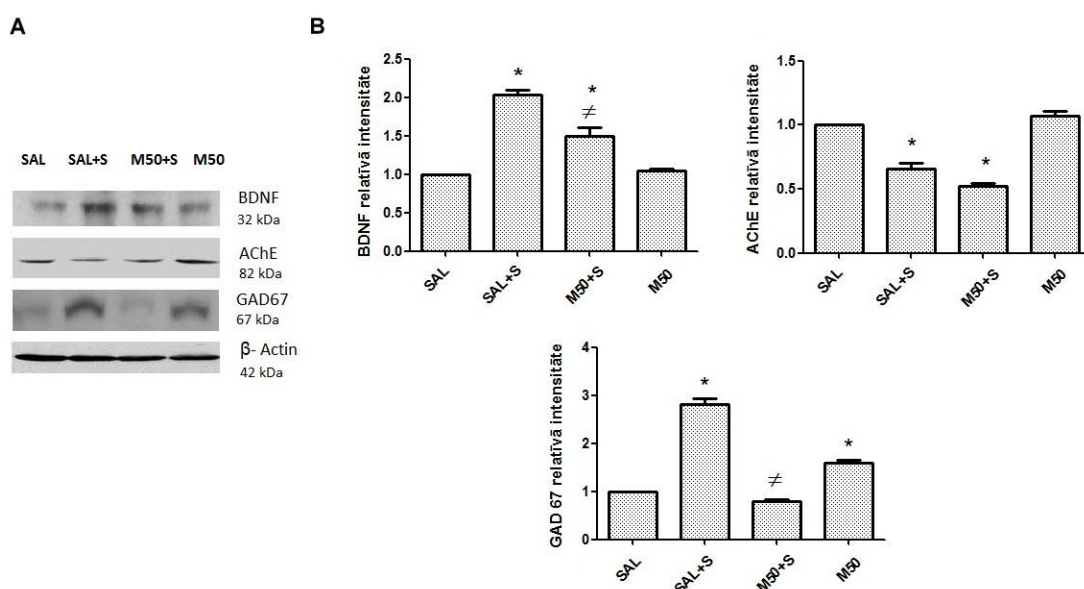
* $p < 0.05$ SAL + S vs. SAL un # $p < 0,05$ M50 + S vs. SAL + S; dispersijas analīze ar Bonferoni salīdzināšanas pētēstu.

Mildronāta premedikācija uzlaboja stresa inducēto atmiņas pasliktinājumu, un atbildes reakcijas laiks tika normalizēts līdz kontroles grupai.

3.4.2. Mildronāta ietekme uz BDNF, AChE un GAD67 ekspresiju hipokampā stresa inducētā amnēzijas modelī

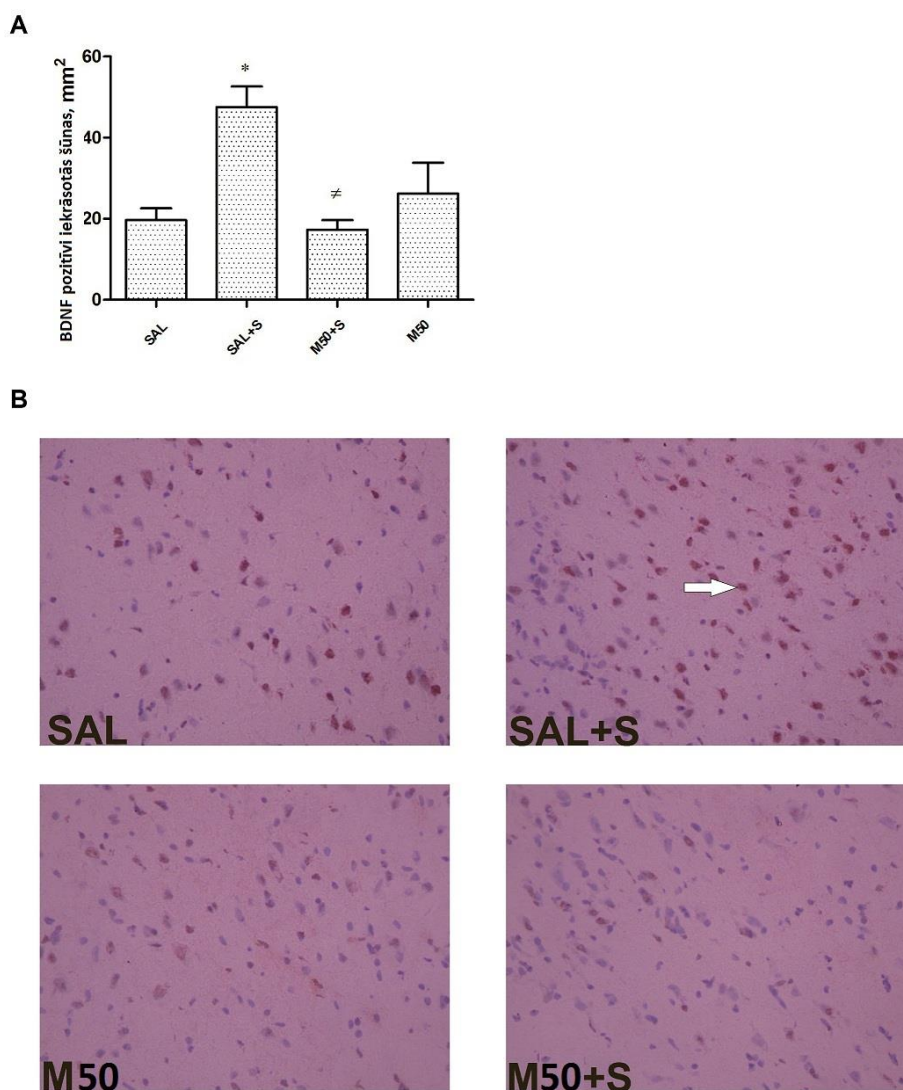
Western blota analīze uzrādīja 2-kārtīgu BDNF ekspresijas palielinājumu stresa grupas hipokampā salīdzinājumā ar kontroles grupu. Savukārt mildronāts noregulēja stresa inducēto BDNF ekspresijas palielinājumu. Pats mildronāts par sevi neietekmēja BDNF ekspresiju hipokampā. Imūnhistoķīmijas dati uzrāda, ka stress palielināja 2,5-kārtīgi BDNF ekspresiju salīdzinājumā ar kontroles grupu: 48 (12) vs. 20 (5) šūnas/mm², $p = 0,03$. Mildronāta premedikācija normalizēja BDNF ekspresiju līdz kontroles grupas līmenim: 18 (4) vs. 48 (12) šūnas/mm²; $p = 0,03$; 28. B attēls.

Western blota analīze uzrādīja, ka stress izraisīja hipokampā samazinātu AChE ekspresiju un GAD67 palielinājumu, savukārt mildronāts noregulēja GAD67 ekspresiju stresētajiem dzīvniekiem līdz kontroles grupai. AChE ekspresijas gadījumā mildronāts neizmainīja stresa izraisīto AChE samazinājumu (28. attēls)



28. attēls. Rezentatīvie Western bloti BDNF, AChE un GAD67 un β-aktīnam (A) un relatīvās intensitātes starp grupām SAL, SAL+S, M50+S un M50 (B)

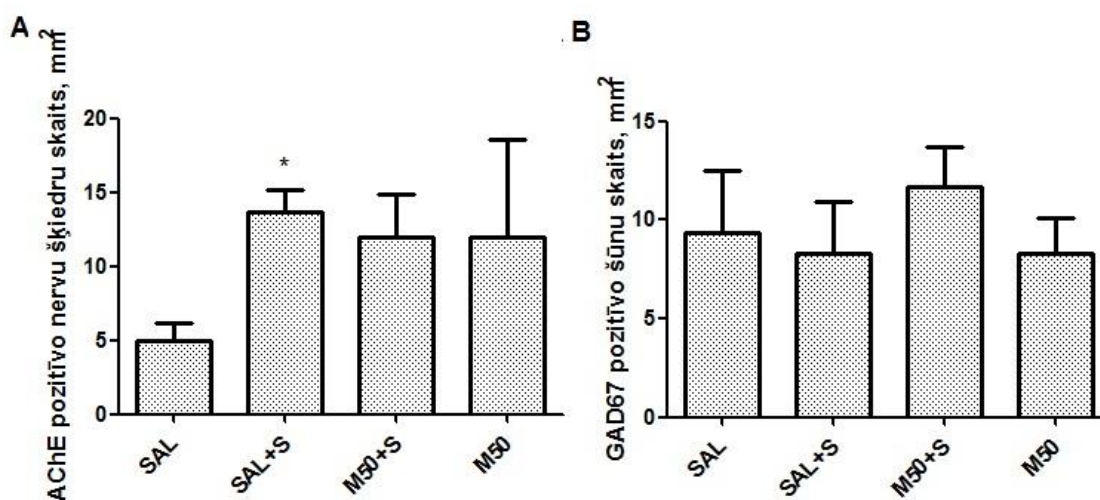
* $p < 0,05$ SAL + S vs. SAL; # $p < 0,05$ M50 + S vs. SAL + S, $\neq p < 0,05$ M50 vs. SAL + S, dispersijas analīze ar Bonferoni pēctestu (n = 3).



29. attēls. **Mildronāta ietekme uz BDNF pozitīvo šūnu skaitu striatumā**

A: Starpgrupu BDNF pozitīvo šūnu salīdzinājums, * $p < 0,05$ SAL + S vs. SAL # $p < 0,05$ M50 + S vs. SAL + S; B: Reprerzentatīvās fotomikrogrāfijas. Ar balto bultu norādīta BDNF pozitīvi iekrāsota šūna. Attēliem ir 400-kārtīgs palielinājums.

Stress palielināja AChE pozitīvās nervu šķiedras salīdzinājumā ar kontroli: 15 (5) vs. 4 (3), $p = 0,01$; 30. A attēls. Mildronāts neietekmēja ekspresijas palielinājumu. Striatumā GAD67 imunopozitīvo šūnu skaits nebija ietekmēts no stresa, ne arī no mildronāta (30. B attēls).



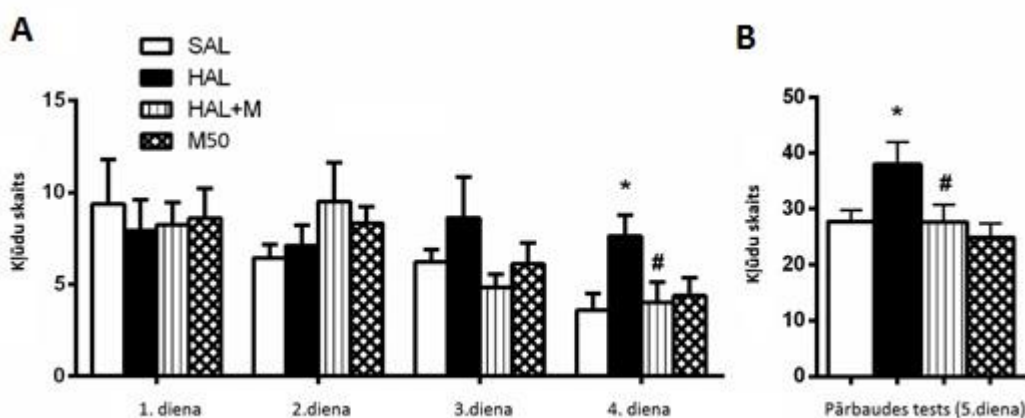
30. attēls. Mildronāta (50 mg/kg i.p., 14 dienas) ietekme uz AChE pozitīvo nervu šķiedru skaitu (A) un GAD67 pozitīvo šūnu skaitu (B) striatumā

* $p < 0,05$ SAL +S vs. SAL, dispersijas analīze ar Bonferoni pēttestu.

3.5. Mildronāta ietekme uz haloperidolu amnēzijas modelī

3.5.1. Mildronāta ietekme uz atmiņu Barnes labirinta testā haloperidola amnēzijas modelī

Barnes labirinta testā haloperidola 3 nedēļu ilgstošā premedikācija pasliktināja telpisko atmiņu un mācīšanos, ko uzrādīja palielinātais kļūdu skaits, līdz žurka atrada slēpņa bedri 4. treniņa dienā salīdzinājumā ar kontroles grupu ($p = 0,00409$; 30. A attēls). Mildronāts pasargāja no haloperidola efekta pasliktināt telpisko atmiņu.

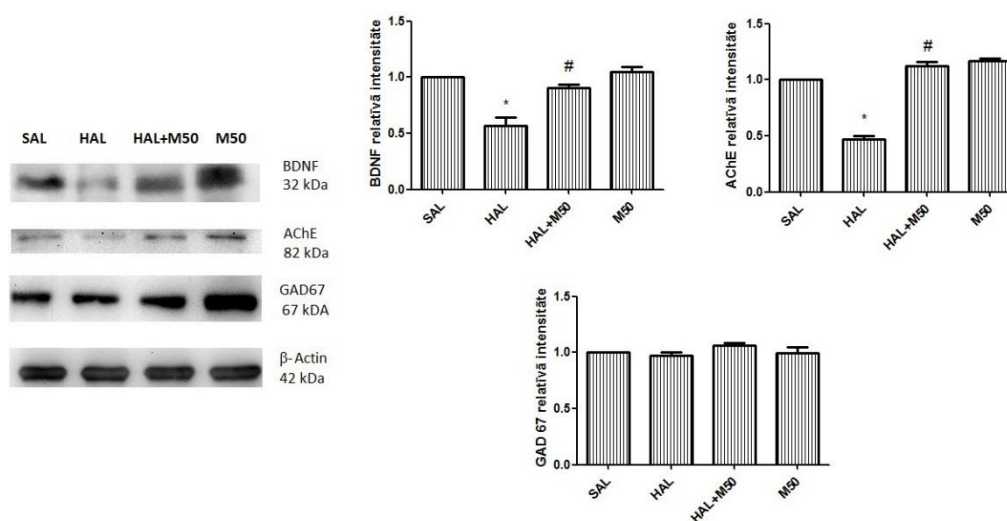


30. attēls. Kļūdu skaits treniņa dienās Barnes labirinta testā 4 treniņu dienu laikā un pārbaudes 5.dienā

Līdzīgi testa piektajā dienā, kurā slēpnis tika nobloķēts, haloperidola grupā bija vairāk kļūdu nekā kontroles grupā, bet mildronāts turpināja pasargāt no telpiskās atmiņas bojājuma, samazinot kļūdīšanās skaitu līdz kontroles līmenim ($p = 0,0195$; 30. B attēls). Mildronāta grupa uzrādīja līdzīgu rezultātu kā kontroles grupa.

3.5.2. Mildronāta ietekme uz proteīnu ekspresiju hipokampā haloperidola amnēzijas modelī

Western blots uzrādīja, ka haloperidols samazināja BDNF un AChE ekspresiju hipokampā. Savukārt mildronāts normalizēja to līdz kontroles grupas līmenim (31. attēls).



31.attēls. **A:** Rezentatīvie *Western* bloti BDNF, AChE un GAD67 un β -aktīnam.

B: relatīvās intensitātes starp grupām

* $p < 0,05$ vs. SAL; # $p < 0,05$ vs. HAL, dispersijas analīze ar Bonferoni pēctestu ($n = 3$).

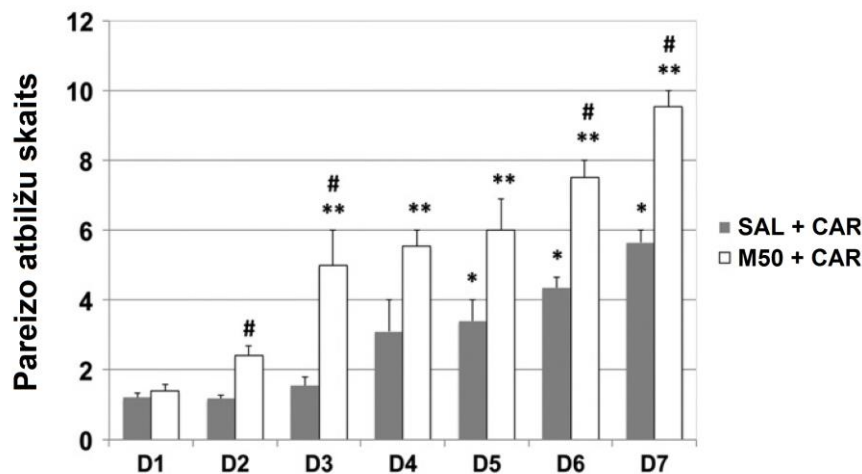
Haloperidols neietekmēja GAD67 ekspresiju, tāpat arī ne mildronāts.

3.6. Mildronāta ietekme uz mācīšanos un atmiņu apmācības modelžurkām

3.6.1. Mildronāta ietekme uz atmiņu aktīvās izvairīšanās testā

Mildronāta grupas žurkas iemācījās ātrāk un sniedza vairāk pareizo atbilžu, sākot ar otro apmācības dienu, aktīvās izvairīšanās testā ($p < 0,05$; D2, 32. attēls), savukārt kontroles

grupas žurkas (SAL+CAR) statistiski ticami uzlaboja sniegumu, sākot ar piekto dienu. Apmācības dienās – 2, 3, 6 un 7 mildronāta grupas žurkām bija vairāk pareizo atbilžu nekā kontroles žurkām. Mildronāts arī samazināja laiku līdz žurka aizskrēju uz otru nodalījumu (dati nav attēloti).

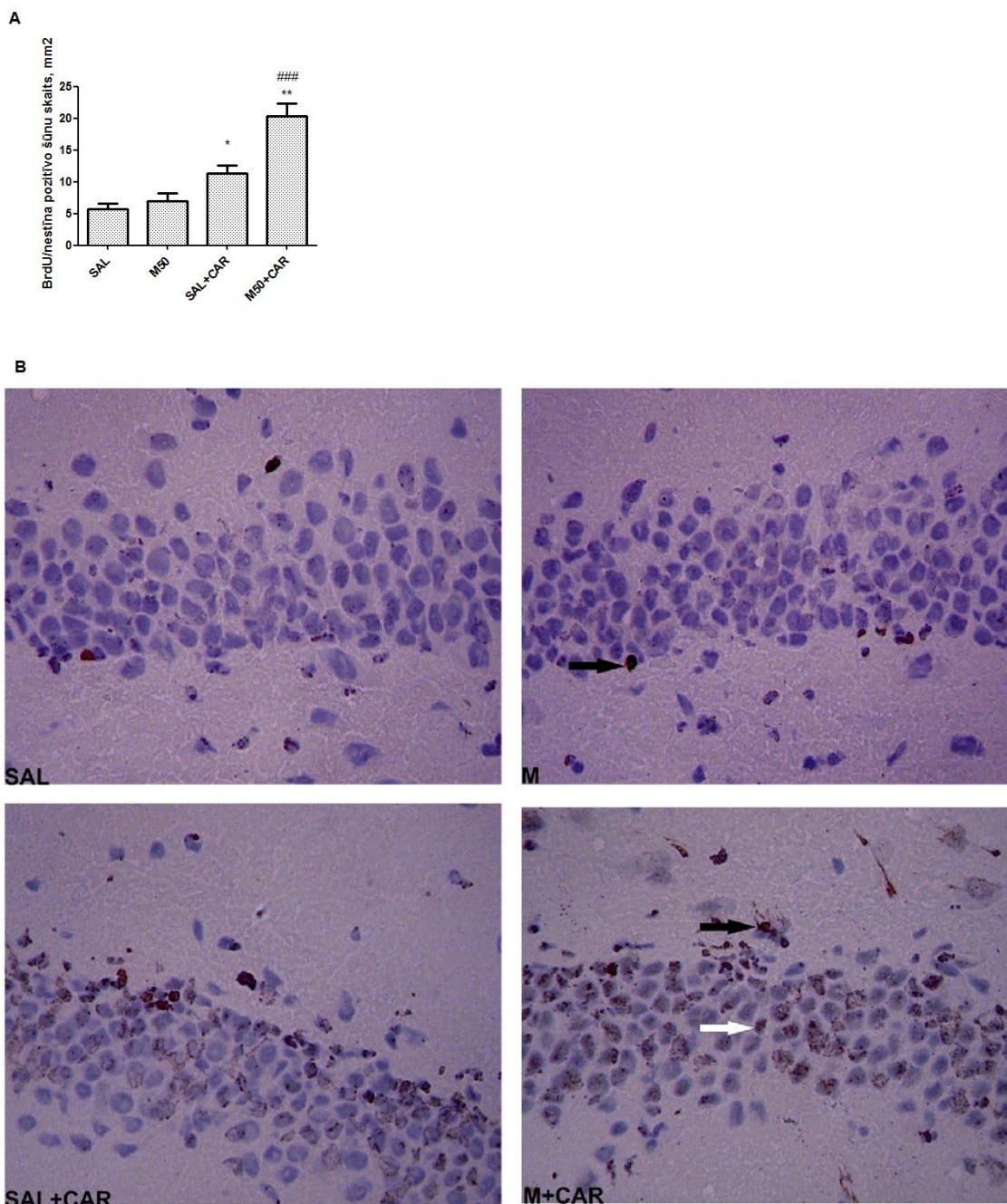


32. attēls. Mildronāta ietekme uz pareizo atbilžu skaitu aktīvās izvairīšanās testā

* $p < 0,05$ vs. SAL + CAR (D1), # $p < 0,05$ vs. SAL + CAR (D1), ** $p < 0,01$ vs. M50+CAR (D1)

3.6.2. Mildronāta ietekme uz BrdU/nestīnu apmācības modeļžurkām

Abās kontroles grupās, kas netika trenētas (SAL un M50), bija ļoti neliels pozitīvo BrdU/nestīna šūnu skaits hipokampā (33. B attēls). Aktīvās izvairīšanās apmācība palielināja BrdU/nestīna šūnu skaitu aptuveni 2-kārtīgi kontroles žurku hipokampā: 10 (3) vs. 5 (1) šūnas/mm², $p = 0,03$; 33. A attēls. Mildronāts apmācības grupā (M50+ CAR) palielināja BrdU/nestīna pozitīvo šūnu skaitu aptuveni 4-kārtīgi, salīdzinot ar kontroles grupas neapmācītajām žurkām: 21 (6) vs. 5 (2) šūnas/ mm², $p = 0,008$ un līdzīgi arī, salīdzinot ar neapmācīto mildronāta grupu: 21 (6) vs. 7 (2) šūnas/ mm², $p = 0,008$; 32. A attēls. BrdU/nestīna pozitīvo šūnu skaits mildronāta apmācības grupā bija aptuveni divkārtš, salīdzinot kontroles apmācības grupu.



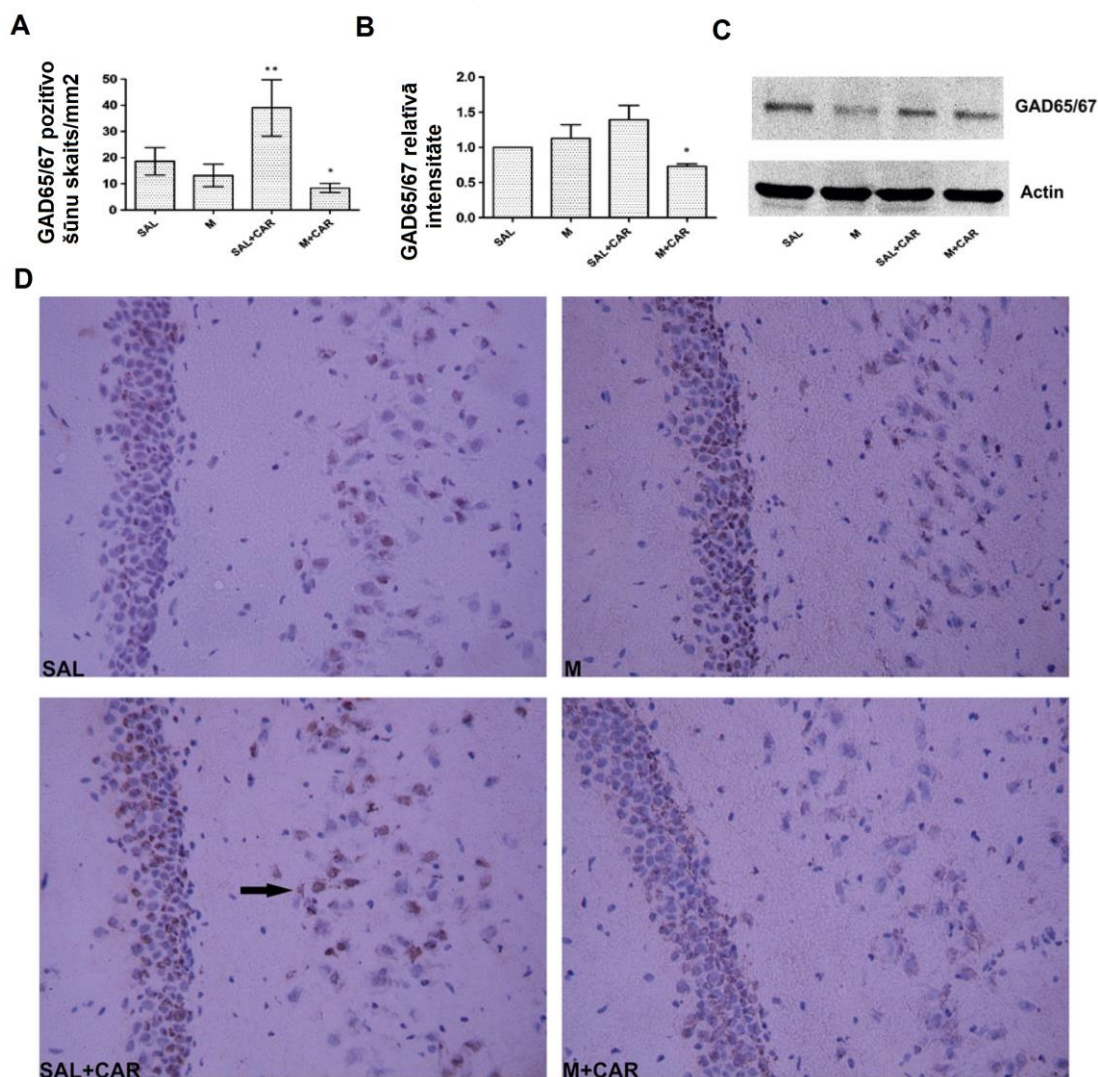
32. attēls. Mildronāta ietekme (50 mg/kg) uz BrdU/nestīna pozitīvo šūnu skaitu hipokampā (A) un reprezentatīvās fotomikrogrāfijas (B)

Ar melnu bultu atzīmēta pozitīvi iekrāsota BrdU šūna un ar balto bultu – nestīns.

3.6.3. Mildronāta ietekme uz GAD65/67 apmācības modeļžurkās

Apmācība palielināja GAD65/67 pozitīvi iekrāsoto šūnu skaitu kontroles žurkām (SAL+CAR), salīdzinot ar neapmācītajām kontroles žurkām ($p = 0,01$). Mildronāts (50 mg/kg) samazināja GAD65/67 apmācības modeļžurkām, salīdzinot ar apmācības kontroles

žurkām: 8 (2) vs. 39 (11) šūnas/mm², p = 0,02 (33. A attēls). To apstiprina arī *Western blots* (33. B, C attēls).

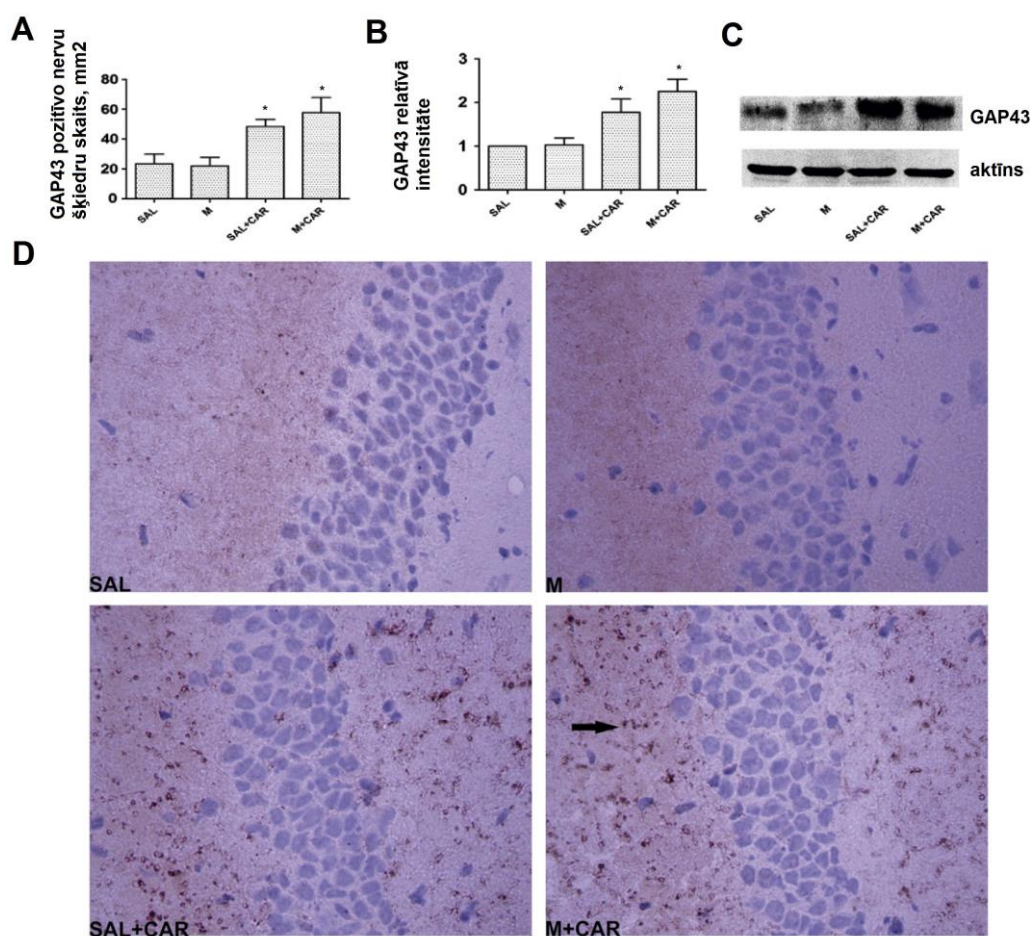


33. attēls. **Mildronāta (50 mg/kg, 14 dienas i.p.) ietekme uz GAD65/67 pozitīvo šūnu skaitu apmācības modeļžurku hipokampā, kas noteikta ar IHC (A, D) un ar Western blota metodi (B, C)**

Apmācītajām žurkām bija tendence samazināt AChE pozitīvo nervu šķiedru skaitu, salīdzinot ar netrenētajām: 14 (3) vs. 28 (6) nervu šķiedras/mm², p = 0,08 (dati nav attēloti). Mildronāts kopā ar apmācību samazināja AChE pozitīvo nervu šķiedru skaitu, salīdzinot ar netrenēto žurku grupu: 8 (3) vs. 28 (6) nervu šķiedras/mm², p = 0,02 (dati nav attēloti).

3.6.4. Mildronāta ietekme uz GAP-43 hipokampā apmācības modelžurkām

Apmācība izraisīja 2-kārtīgu GAP-43 pozitīvo nervu šķiedru pieaugumu hipokampā, salīdzinot ar kontroles žurkām (49 (5) vs. 23 (6) nervu šķiedras/mm², p = 0,02; 34. A Attēls) un ar mildronāta grupu bez apmācības (p = 0,01). Mildronāts kombinācijā ar apmācību palielināja GAP-43 pozitīvo nervu šķiedru, salīdzinot ar kontroles (58 (10) vs. 23 (6) nervu šķiedras/mm², p = 0,03) un mildronāta neapmācīto grupu (vs. 22 (5) nervu šķiedras/mm², p = 0,02). Tomēr mildronāta apmācības kombinācija un apmācības grupas iegūtie dati savā starpā būtiski neatšķīrās. *Western* blots apstiprināja IHC iegūtos datus.

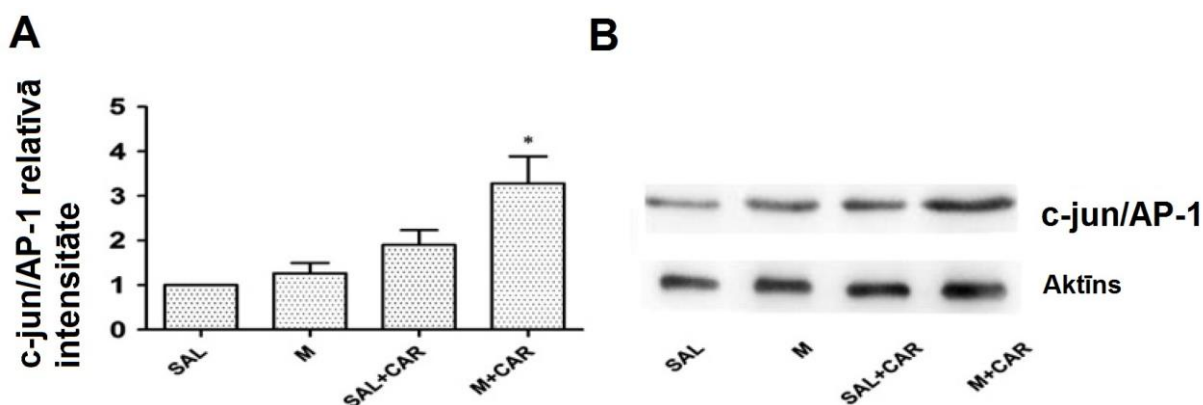


34. attēls. Mildronāta (50 mg/kg, 14 dienas i.p.) ietekme uz GAP-43 pozitīvo šūnu skaitu apmācības modelžurku hipokampā, kas noteikta ar IHC (A, D) un ar *Western* blota metodi (B,C)

A: *p = 0,02 SAL +CAR vs. SAL; *p = 0,02 M + CAR vs. SAL, dispersijas analīze ar Bonferoni pēctestu. B: relatīvās intensitātes GAP-43 ekspresijai (n = 3) *Western* blotos C: *Western* blots GAP-43; D: Reprerzentatīvā fotomikrogrāfija GAP-43 no IHC, palielinājums x400.

3.6.5. Mildronāta ietekme uz c-jun/AP-1 hipokampā apmācības modeļžurkām

Mildronāts kombinācijā ar apmācību palielināja c-jun/AP1 pozitīvo šūnu skaitu hipokampā, salīdzinot ar neapmācīto kontroli: 10 (1) vs. 2 (1) šūnas/mm², $p < 0,001$ (dati nav attēloti), kā arī, salīdzinot ar apmācīto kontroli un mildronāta grupu bez apmācības ($p = 0,01$ un $p = 0,03$). *Western* blots uzrādīja līdzīgu ainu, bet statistiska ticamība tika sasniegta vien mildronāta grupā ar apmācību, salīdzinot ar neapmācīto kontroli (35. attēls).



35. attēls. Mildronāta (50 mg/kg, 14 dienas i.p.) ietekme uz c-jun/AP-1 ekspresiju hipokampā

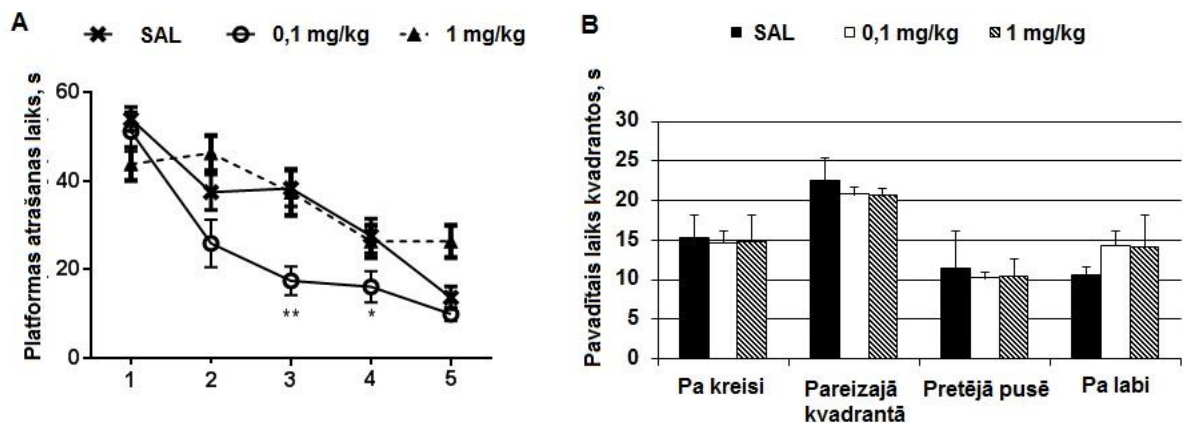
A: relatīvā intensitāte ($n = 3$), $*p < 0,05$ M+CAR vs. SAL; B: c-jun/AP-1 reprezentatīvais *Western* blots ar aktīna kontroli

3.7. Dihidropiridīna atvasinājums AP-12 ietekme uz atmiņu un proteīnu ekspresiju smadzenēs C57BL/6J pelēs un transgēnajās APP_{SwDI} pelēs

3.7.3. AP-12 ietekme uz telpisko atmiņu C57BL/6J pelēs

AP-12 ievadīšana devās 0,1 un 1 mg/kg vai fizioloģiskā šķīduma ievadīšana i.p. 13 dienas pēc kārtas C57BL/6J pelēm paaugstinātajā plus labirintā neuzrādīja statistiski būtiskas izmaiņas starp grupām laikā, kas pavadīts atvērtajās platformās ($p = 0,08$; 36. attēls) un arī pēc skaita, kurā iegāja arī atvērtajās platformās (dati nav uzrādīti).

Eksperimenta 17. dienā tika uzsākts ūdens labirinta tests, lai noteiktu, vai AP-12 ir ietekme uz peļu telpisko atmiņu. AP-12 devā 0,1 mg/kg statistiski ticami saīsināja laiku līdz platformas atrašanai salīdzinājumā ar kontroles grupu 3. dienā ($p = 0,009$) un 4. dienā ($p = 0,04$; 36. A attēls). AP-12 grupas pelēm 2. un 5. dienā bija tikai tendence atrast ātrāk salīdzinājumā ar kontroles grupu. Atmiņas testa pārbaudes reizē netika konstatētas statistiskas atšķirības starp grupām (36. B attēls).



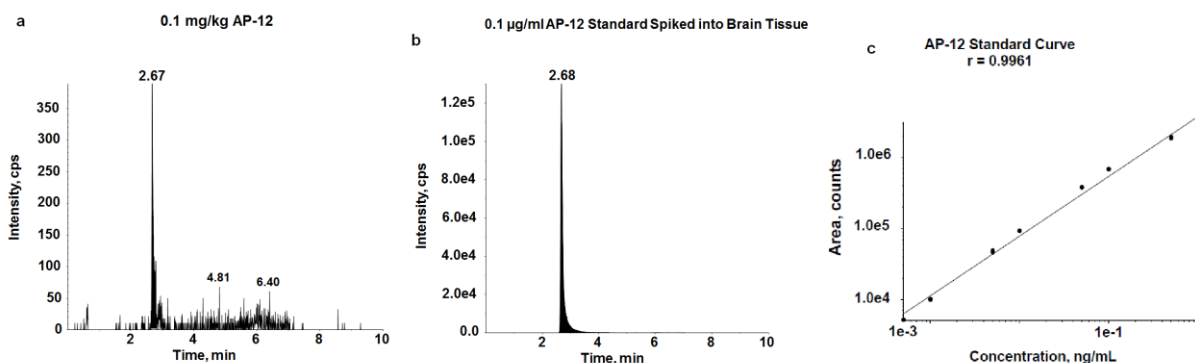
36. attēls. AP-12 ietekme uz C57BL/6J pelēm ūdens labirinta testā piecās treniņa dienās (A) un pavadītais laiks kvadrantos ārbaudes testa dienā (B)

**p < 0,01 trešajā dienā AP-12 (0,1 mg/kg) vs. 3.diena SAL; *p < 0,05 ceturtnā dienā AP-12 (0,1 mg/kg) vs. 4.diena SAL

Netika atrastas statistikas atšķirības starp peldēšanas ātrumiem starp grupām ar AP-12 un kontroli (SAL: 15,3 (1,4) cm/s; AP-12 (0,1 mg/kg): 17,8 (1,9) cm/s; AP-12 (1 mg/kg): 13,9 (1,2) cm/s.

3.7.4. AP-12 šķērso hematoencefālisko barjeru C57BL/6J pelēs

Pēc iegūtajiem datiem no masas spektrometra var secināt, ka AP-12 spēj šķērsot hematoencefālisko barjeru. Hromatogramma 37. A attēlā uzrāda, ka AP-12 masa ir detektēta smadzeņu homogenātā no peles, kurai tika ievadīts AP-12.



37. attēls. Masas spektrometra hromatogrammas ar AP-12

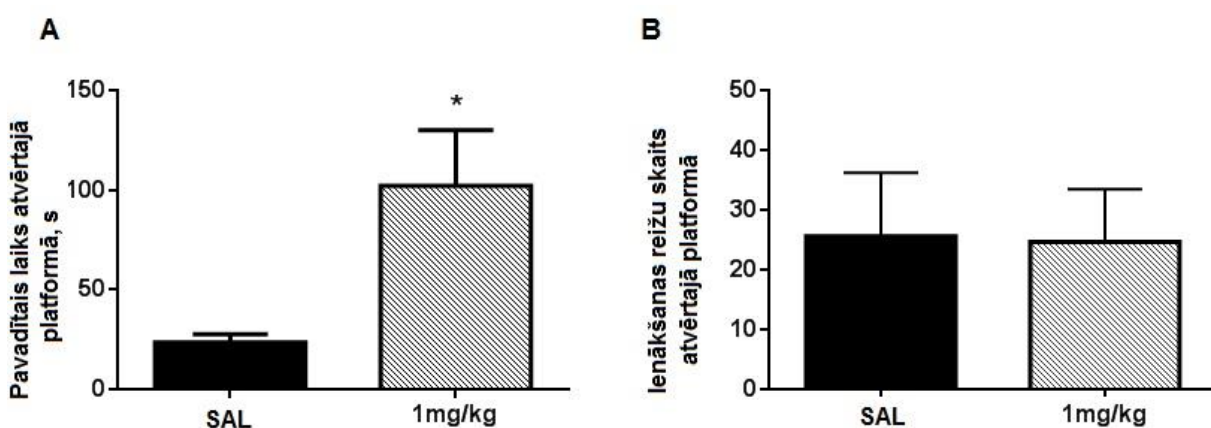
A: detektētais AP-12 smadzeņu homogenātā no pētījuma peles, kurai ievadīja AP-12 devā 1mg/kg; B: attīrītā forma no smadzeņu homogenāta, kam pievienoja AP-12 koncentrācijā 0,1 μg/ml, C: AP-12 koncentrācijas ng/ml standartlīkne I

Pīķis, kas atbilst AP-12 iznāca no kolonnas 2,68 minūtē (37. Attēls) un izrēķinātā koncentrācija detektētajā smadzeņu homogenātā no devas 1 mg/kg bija 0,084 ng/ml. Šajā eksperimentā masas pāreja, lai kvantificētu bija $501,6 > 80,1$.

Tīrais standarts priekš AP-12 attēlā bija ar tādu pašu aiztures laiku kā pīķim 37. A attēlā. Endogēns pīķis tika atrasts tai pašā aiztures laikā nepiesātinātajā paraugos, kuri bija evivalenti aptuveni 18% no nomērītā pīķa AP-18 piesātinātajos paraugos. Reprezentatīva standarta līkne ar AP-12 koncentrāciju no 1,0 līdz 100 ng/ml ($r = 0,9989$) ir attēlota 37. C attēlā.

3.7.5. AP-12 uzrāda anksiolītiskas un atmiņu uzlabojošas īpašības Tg-APP_{SwDI} pelēs

Tos pašus uzvedības testus ar C57BL/6J pelēm, veica arī ar transgēnajām Alcheimera (Tg-APP_{SwDI}) pelēm, lai pārbaudītu, vai AP-12 spēj arī slimības modelī ar atmiņu deficītu ietekmēt atmiņu un mācīšanos. AP-12 ievadīšana devā 1 mg/kg i.p. statistiski nozīmīgi paildzināja laiku, ko peles pavadīja atvērta platformā paaugstinātajā plusa labirintā salīdzinājumā ar kontroles grupas pelēm ($p = 0,023$; 38. A attēls). Nekādas statistikas atšķirības ienākšanas reizēs atvērta platformā netika atrastas starp grupām (38. B attēls).



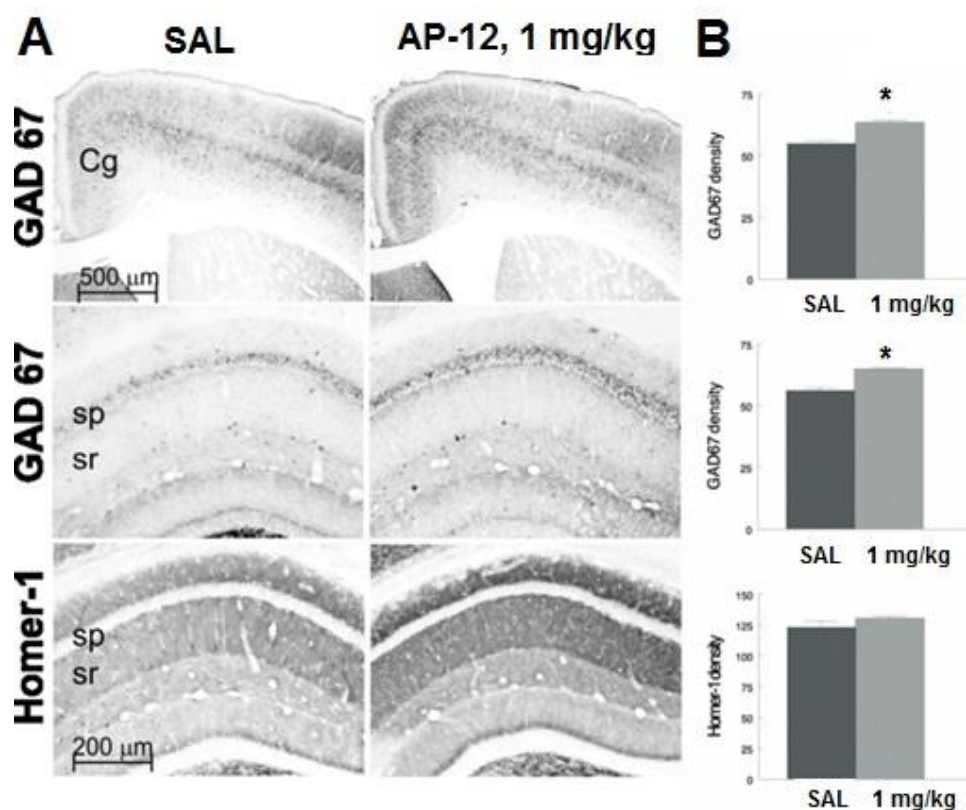
38. attēls. AP-12 ietekme uz Tg-APP_{SwDI} peļu baiļu līmeni paaugstinātajā plusa labirintā – pavadītais laiks atvērta platformā (A) un ienākšanas reižu skaits atvērta platformā (B)

* $p < 0,05$ AP-12, 1 mg/kg vs. SAL

AP-12 ievadīšana uzlaboja telpisko atmiņu ūdens labirinta testā, samazinot laiku, līdz peles atrada paslēpto platformu, salīdzinājumā ar kontroles grupu, sākot ar 3. līdz 5. treniņa dienai (attiecīgi, $p = 0,02$; $p = 0,01$ un $p = 0,04$; 39. attēls). Pārbaudes testā netika atrasts statistiski ticamas atšķirības starp grupām (39. attēls). Nebija atšķirības peldēšanas ātrumos starp grupām (SAL: 12,7 (1,8) cm/s un AP-12: 14,2 (0,9) cm/s).

3.7.6. AP-12 paaugstina GAD67 ekspresiju smadzenēs arī Tg-APP_{SwDI} pelēs

Imūnhistoķīmijas dati uzrāda, ka AP-12 devā 1 mg/kg statistiski ticami paaugstināja GAD67 ekspresiju limbiskajā garozā: *cingulate cortex* 64,9 (0,6) vs. 56,0 (1,3); $p < 0,05$) un hipokampā: 63,5 (0,9) vs. 54,9 (1,1); $p < 0,05$ salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem.



39. attēls. **Reprezentatīvās fotomikrogrāfijas GAD 67 un Homer-1 ekspresijai hipokampā (A) un vidējo aritmētisko diagrammas proteīnu GAD67 un Home-1 ekspresijai hipokampā (B)**

Netika atrastas nekādas atšķirības amiloīda β proteīna ekspresijas izmaiņām starp grupām. Tāpat netika atrastas atšķirības AChE ekspresijas mērījumos limbiskajā garozā, kā arī nekādas atšķirības nebija Homer-1 ekspresijā.

4. DISKUSIJA

Promocijas darbā pirmo reizi pētīta mazo molekulu mildronāta un dihidropiridīna atvasinājuma AP-12 ietekme uz atmiņu un smadzeņu proteīnu ekspresiju. Lai noskaidrotu šo zāļu vielu potenciālu neurodeģeneratīvo slimību ārstēšanā vai protekcijā un noskaidrotu vairāk par iespējamajiem darbības mehānismiem smadzenēs, darbā izmantoti vairāki proteīnu biomarkķieri, uzsvāru liekot uz proteīniem, kas spēlē būtisku lomu sinaptiskajā plasticitātē un tādējādi ir fundamentāli svarīgi atmiņas veidošanās procesos. Tāpat ir pārbaudīta proteīnu ekspresija, kas norāda uz neurodeģeneratīvo procesiem, lai noskaidrotu, vai mildronāts un AP-12 spēj tos ietekmēt.

4.1. Mildronāts regulē smadzeņu proteīnu ekspresiju PD modeldzīvniekiem

Šajā pētījumā PD tika modulēts, intrastriatāli ievadot žurkām 6-OHDA, kas destruē dopamīnerģiskās šūnas *substantia nigra* un neironu projekcijas striatumā.

Lai noskaidrotu dopamīnerģisko šūnu dzīvotspēju, ar imūnhistoķīmijas palīdzību pārbaudījām tirozīna hidroksilāzes (TH) ekspresiju abās struktūrās, ņemot vērā, ka TH ir atslēgas enzīms, kas piedalās dopamīna sintēzē. Mūsu dati sakrīt arī ar citu autoru pētījumiem, ka 6-OHDA statistiski ticami samazina TH ekspresiju (Debeir et al., 2005, Marinova-Mutafchieva et al., 2009). Mildronāts abās devās (50 mg/kg un 100 mg/kg) spēja normalizēt TH ekspresiju striatumā, un devā 100 mg/kg arī normalizēja TH ekspresiju *substantia nigra*. No šiem datiem radās nākamais jautājums, kā mildronāts spēj aizsargāt dopamīnerģiskās šūnas no bojāejas 6-OHDA toksiskajos apstākļos?

Pētījums norāda, ka jābūt kādam/kādiem aizsargājošajiem endogēniem mehānismiem, kas ļauj šūnai saglabāt dzīvotspēju. Mūsu koncepts postulē mildronātu kā mazu molekulu ar diviem uzlādētajiem elementiem (pozitīvo 4-vērtīgo slāpekli un negatīvo skābekli) multivalento spēju regulēt proteīnu ekspresiju, kas piedalās reģenerācijā, iekaisuma reakcijās un sinaptiskajā plasticitātē. Tamdēļ mums bija liela interese noteikt ubikvitīna, Notch-3, GFAP, iNOS un Ib1 ekspresiju striatumā un *substantia nigra*. Šeit iegūtie dati uzrādīja, ka 6-OHDA būtiski palielināja ekspresiju ubikvitīnam abās pētītajās smadzeņu struktūrās (12.attēls). Par ubikvitīna paaugstinātu ekspresiju striatumā PD modelī žurkām iepriekš arī ziņojuši citi pētnieki (Pierson et al., 2005). Šīs izmaiņas ubikvitīna-proteosomas signālceļos ir uzrādītas arī PD pacientiem, sevišķi ar gēnu mutācijām saistītajos saslimšanas gadījumos

(Betarbet et al., 2005). Mildronāts abās devās spēja ubikvitīna pārmērīgo ekspresiju normalizēt līdz kontroles grupas līmenim. Izskaidrojums šādai mildronāta ietekmei varētu slēpties jau agrāk uzrādītājā mildronāta spējā aizsargāt šūnas mitohondriālos procesus (Pupure et al., 2008). Izmaiņas un bojājumi mitohondriju līmenī ir atkarīgi no oksidatīvā stresa līmeņa un ar tiem saistītajiem traucējumiem glikolīzē un mitohondriju respirācijā (Mazzio et al., 2004).

Šajā pētījumā atklājām arī transmembrāna proteīna Notch-3 izmaiņas 6-OHDA ietekmē. Notch receptori un ligandi spēlē būtisku lomu šūnu izdzīvošanā, un to aktivācija ir svarīga CNS attīstībā, sevišķi glioģenēzē (Irvin et al., 2001). Notch-3 no Notch proteīnu saimes ir marķieris progenitorajām šūnām un savieno Notch signālceļu ar šūnas augšanas regulāciju (Campos et al., 2002). Progenitoro šūnu stimulēšana pieaugušās zīdītāju smadzenēs tiek uzskatīta kā iespējama alternatīva līdzšinējai PD ārstēšanai (Aponso et al., 2008). Mūsu eksperimentos Notch-3 ekspresija abās smadzeņu struktūrās bija statistiski ticami samazināta, salīdzinājumā ar kontroli. Mildronāta 2 nedēļu ievadīšana devā 50 mg/kg pirms 6-OHDA injekcijas aizsargāja no Notch-3 samazinājuma, un tā ekspresija normalizējās līdz kontroles līmenim. Mēs pieļaujam, ka mildronāts, ietekmējot Notch-3 ekspresijas palielināšanos, stimulē pieauguša organisma progenitoro šūnu populāciju.

Astrocītu marķiera GFAP proteīna ekspresija bija palielināta 6-OHDA grupā abās pētītajās smadzeņu struktūrās (17. attēls). Šie dati sakrīt ar citu pētījumiem 6-OHDA modeļos ar žurkām (Aponso et al., 2008). Mildronāta ievadīšana 50 mg/kg samazināja GFAP pozitīvo šūnu skaitu līdz kontroles grupas līmenim. Līdzīgi normalizēšanas efekti ir arī redzēti ar citiem savienojumiem – anti-konvulsantam zonisamīdam (Yano et al., 2009), nātrija kanālu blokatora vielai riluzolei (Araki et al., 2001), kuriem piemīt spēja mazināt neirotoksicitāti PD modelī ar MPTP pelēm. PD modeļos ar 6-OHDA šādas īpašības aizsargāt ir atrastas Briljanta Zilajam G savienojumam, kas ir purinergiskā P2X7 receptoru antagonists (Carmo et al., 2014), dabiskajam fenolam un antioksidantam katehīnam (Teixeira et al., 2013), kā arī Gingko biloba ekstraktam (Ahmad et al., 2005), kurai piemīt devas-atkarīga spēja aizsargāt no 6-OHDA izraisītās PD žurkās.

Pastāv vairākas teorijas par astrocītu aktivēšanās ietekmi smadzenēs un nozīmi slimības attīstībā (Cabezas et al., 2013, Rappold and Tieu, 2010). Saskaņā ar vienu no tām, astrocītu aktivācija spēj stimulēt mikrogliju, kas savukārt inducē dopamīnerģisko šūnu rašanos ar neitrofo faktoru sintēzes palīdzību (Batchelor et al., 1999). Savukārt otras teoriju grupas pārstāvji norāda, ka astroglīozei var būt pasliktinoši efekti uz smadzenēm, kas ir uzrādītas vairākās neirodeģeneratīvās slimībās (Sofroniew, 2009).

Promocijas darbā noteicām arī mikroglijas biomarķiera Iba-1 ekspresiju, kas ir specifiski ekspresēts aktivētajās mikroglijās (Depino et al., 2003, Fukui et al., 2012). Atradām, ka Iba-1 ekspresija bija aptuveni divas reizes lielākā 6-OHDA grupā striatumā un aptuveni divarpus lielāka *substantia nigra* salīdzinājumā ar kontroles grupu (18. attēls). Tas sakrīt ar atrastajiem datiem literatūrā, kas uzrāda, ka 6-OHDA izraisa neuroiekaisumu un mikroglijas aktivāciju (Rodriguez-Pallares et al., 2007). Ir dati, kas apstiprina, ka 6-OHDA bojātā *substantia nigra* mikroglijas aktivācija pastiprina neironu bojāeju (Liu et al., 2003). Šajā pētījumā mildronāts neietekmēja Iba-1 ekspresiju striatumā salīdzinājumā ar kontroli, bet *substantia nigra* uzrādīja spēju mazināt Iba-1 ekspresiju. Ņemot vērā TH un Notch-3 palielinājumu mildronāta ietekmē 6-OHDA grupā, tad var spriest, ka mikroglijas aktivācijai ir bijusi labvēlīga ietekme uz šūnas izdzīvošanu. Uz neuroprotektīvu mikroglijas darbību kā terapeitisku stratēģiju norāda arī citi autori (Giunti et al., 2014).

Iekaisuma marķieris iNOS bija ar palielinātu ekspresiju 6-OHDA grupā striatumā un *substantia nigra*, kas kopā ar astrocītu un mikroglijas aktivitāti apstiprina neuroiekaisumu šajās smadzeņu struktūrās. Paaugstināta iNOS ekspresija ir uzrādīta jau iepriekš 6-OHDA modelī (Singh et al., 2005), kas norāda, ka iNOS spēlē būtisku lomu sākotnējā neurodeģenerācijas fāzē.

PD modelī ar 6-OHDA injekciju pārbaudījām arī zemākas mildronāta devas – 10, 20 un 50 mg/kg un proteīnu biomarķierus – kartsuma šoka proteīnu HSP-70, gliju neirotrofo faktoru GDNF un adhēzijas molekulu NCAM. Mildronāts arī mazākās devās spēja regulēt proteīnu ekspresiju šo proteīnu ekspresiju, kas ir atbildīgi par neironu adaptēšanos, izdzīvošanu un neironu-glijas komunikāciju. Neirotoksīns 6-OHDA būtiski samazināja HSP70 ekspresiju striatumā un *substantia nigra* (20. attēls). Tas sakrīt ar pētījumiem, kas norāda, ka HSP70 aktivitātes zudums ir saistāms ar neurodeģenerāciju, jo misfoldētu proteīnu neizlabošana un agregācija šūnā tiek saistīta arī ar nepietiekamu molekulāro čaperonu darbību (Auluck et al., 2002). Ir bijuši pētījumi, kuri uzrādīja arī citu karstuma šoka proteīnu saimes izoformu spēju inhibēt 6-OHDA inducēto citohroma c atbrīvošanu un apoptozes procesu uzsākumu PC12 šūnu kultūrā (Gorman et al., 2005). Arī pētījumi no klīnikas ar PD pacientu smadzenēm atklāj, ka karstuma šoka kognāta proteīnam 70 (*heat shock cognate*; hsc70) un ar lizosomām asociētais membrānas proteīns 2A (*lysosomal-associated membrane protein 2A*; LAMP2A) bija statistiski būtiski samazināts *substantia nigra* struktūrā PD pacientiem, kas tiek izskaidrots ar čaperonu mediētu autofāģijas aktivitāti PD pacientu smadzenēs (Alvarez-Erviti et al., 2010). Tomēr ir arī atrodami arī pretēji dati. Tā peļu modelī ar alfa-sinukleīnopātiju HSP70 nespēja samazināt alfa-sinukleīna izraisītos motoros traucējumus (Shimshek et al., 2010).

Mildronāta ievadīšana devās 20 mg/kg un 50 mg/kg 2 nedēļas palielināja HSP70 pozitīvo šūnu skaitu 6-OHDA grupā salīdzinājumā ar 6-OHDA grupu bez mildronāta. Šādā kontekstā varam spriest, ka mildronāts spēj neurodeģeneratīvos apstākļos regulēt molekulārā čaperona HSP70 ekspresiju. Tas ir svarīgi, jo karstuma šoka proteīnu kopā ar UPS regulēšanu piedāvā kā iespējamo PD terapiju (Luo et al., 2007). Šo mildronāta ietekmi uz HSP70 varētu izskaidrot kopā ar tā spēju regulēt ubikvitīna-proteosomas signālceļu, kas aplūkots iepriekšējā PD pētījumā un publicēts (Klusa et al., 2010).

Mūsu pētījumā 6-OHDA samazināja GDNF ekspresiju STR, bet mildronāta devas 20 un 50 mg/kg, ievadītas pirms 6-OHDA injekcijas, spēja GDNF ekspresiju noregulēt līdz kontroles līmenim (21. attēls). Interesanti ir arī tas, ka mildronāts *per se* šajās devās spēja palielināt GDNF ekspresiju. Ir zināms, ka GDNF, kas tiek producēts gliju šūnās, ir proteīns, kas stimulē dopamīna neironu izdzīvošanu un diferenciāciju (Krieglstein, 2004, Yasuda and Mochizuki, 2010). Pētījumos ir atklāts, ka hroniska GDNF infūzija spēja pasargāt no 6-OHDA inducētajiem deficītiem PD modelī žurkās (Voutilainen et al., 2011). Vēl jo vairāk, GDNF infūzija uzrādīja dopamīntrofisku efektu (TH ekspresijas izdzīvojošos nigrālajos neironos (Gonzalez-Aparicio et al., 2010). Mildronāta spēja palielināt GDNF ekspresiju ir drošāka nekā GDNF infūzija, jo GDNF ir milzīga molekula, kas rada papildus antigenitātes risku; savukārt mildronāts ir maza molekula bez antigenitātes riska.

Mūsu pētījumā uzrādījām, ka mildronāts 20 un 50 mg/kg normalizē NCAM ekspresiju līdz kontroles līmenim 6-OHDA grupā striatumā (22.attēls). Žurkas *substantia nigra*, kur 6-OHDA palielināja NCAM ekspresiju salīdzinājumā ar kontroli, mildronāts to normalizēja NCAM ekspresiju tuvu līdz kontroles līmenim. Jāatzīmē, ka mildronāts *per se* devā 20 mg/kg palielināja NCAM ekspresiju *substantia nigra* salīdzinājumā ar kontroles grupu. Mūsu dati sakrīt ar pētījumu, kurā parādīts, ka NCAM ir ekspresējies pastiprināti 6-OHDA bojātā *substantia nigra* (Nomura et al., 2000). Šis mildronāta efekts 6-OHDA bojātās smadzenēs arī ir būtisks, ņemot vērā NCAM lomu šūnu adhēzijā, sinaptiskajā plasticitātē un mācīšanās un atmiņu veidošanās procesos (Stoenica et al., 2006).

4.2. Mildronāts uzlabo atmiņu, samazina A β uzkrājumus un regulē smadzeņu proteīnu ekspresiju hipokampā Tg-APP_{SwDI} pelēs

Viens no galvenajiem mērķiem šajā pētījumā bija noteikt, vai mildronāta 28 dienu ilga ievadīšana devās 50 un 100 mg/kg spēj ietekmēt atmiņas procesus Tg-APP_{SwDI} pelēm, kā arī,

vai mildronāts ietekmē to smadzeņu patoloģiju. Mildronāts neietekmēja peļu motoro aktivitāti, kā arī baiļu līmeni atvērtā lauka testā un nulles labirintā. Mildronāts abās devās uzlaboja sociālo atpazīšanu Tg-APP_{SwDI} pelēm salīdzinājumā ar kontroli – Tg-APP_{SwDI} pelēm, kurām ievadīja fizioloģisko šķīdumu. Šis tests pārbauda spēju atpazīt svešus dzīvniekus sociālās grupās, un šāda veida atpazīšana ir saistīta ar hipokampa procesiem grauzējos (Maaswinkel et al., 1996). Izmainīta socializēšanās un nespēja atpazīt citus indivīdus ir raksturīga iezīme AD gadījumā (Alvarez et al., 2003), bet tas raksturīgs arī citām neiroloģiskām saslimšanām kā autismam un šizofrēnijai (Abdi and Sharma, 2004). Tāpat sociālās atmiņas deficīti un izmaiņas sociālajā uzvedībā ir cieši saistītas ar depresiju (Szanto et al., 2012). Tāpēc zāļu vielas, kas spēj uzlabot sociālo atpazīšanu var tikt uzskatītas par labvēlīgu neurodeģeneratīvo slimību terapiju.

Ūdens labirinta testā mildronāts tikai devā 50 mg/kg spēja uzlabot atmiņu, tomēr nevar izslēgt, ka lielākā deva 100 mg/kg bija ietekmēta no tā, ka labi iemācījās un atcerējās platformu piecu dienu laikā arī kontroles grupa. Vēl viens būtisks atradums bija tas, ka mildronāts devā 50 mg/kg samazināja Aβ peptīda uzkrājumus hipokampā. Arī lielākā deva – 100 mg/kg uzrādīja līdzīgu tendenci. Mūsu izmantotais transgēnais peļu modelī attīstās Aβ uzkrājumi gan parenhimā, gan ap asinsvadiem, ko sauc par cerebrālo amiloīdu angiopātiju (CAA). Mēs veicām mērījumus gan *stratum oriens* CA1 hipokampā, kur tur ir gan CAA, gan parenhīmālie Aβ uzkrājumi sastopami un *dentate gyrus*, kur sastopami tikai parenhīmālie Aβ uzkrājumi. Mildronāts 50 mg/kg statistiski ticami samazināja Aβ abos skatītajos hipokampa reģionos. Mildronāts 100 mg/kg nesamazināja Aβ uzkrājumus.

Interesanti ir arī tas, ka mildronāts abās devās palielināja mikroglijas proteīna Iba-1 ekspresiju. Tas varētu būt viens no mehānismiem, kas ļāva mildronāta ietekmē samazināt Aβ uzkrājumus hipokampā. Zāļu vielas, kas spēj uzlabot atmiņas deficītus, samazinot Aβ uzkrājumus un palielinot mikroglijas aktivitāti, ir iepriekš aprakstītas (Xue et al., 2012). Jauns, pretiekaisumu īpašības uzrādījis, savienojums NCX-2216 samazināja Aβ uzkrājumus un palielināja mikroglijas aktivāciju (Jantzen et al., 2002). Attiecība starp mikrogliju un Aβ agregātus aizvākšanu tomēr ir strīdīga – daži pētījumi ar nesteroīda pretiekaisuma līdzekļiem, piemēram, ibuprofēnu uzrādīja būtisku mikroglijas aktivācijas samazinājumu (CD11b un CD45 ekspresiju) kopā ar Aβ agregātu samazinājumu transgēnajās APP-PS1 pelēs (Lim et al., 2000). Līdzīgi, pētījumā ar flurbiprofēna slāpekļa donoranalogu HCT-1026 mikroglijas aktivācija tika samazināta (samazināta MAC1 ekspresija) kopā ar Aβ agregātiem (van Groen and Kadish, 2005, van Groen et al., 2011).

Viena no hipotēzēm par A β agregātu rašanos ir, ka mikroglija aktivācija ir visciešāk saistīta ar AD saistīto neuroiekaisumu un piedalās tieši pasliktinot slimības progresu (McGeer E. G. and McGeer, 1999, McGeer P. L. and McGeer, 2004). Jāatceras, ka neuroiekaisumam ir divējāda daba (Eikelenboom and van Gool, 2004) – mikroglijas aktivācija un iekaisums var arī fagocitozes procesam palīdzēt aizvēkt A β uzkrājumus (D'Andrea et al., 2004, Matsuoka et al., 2001).

Transģenajā peļu modelī, kas pastiprināti ekspresē APP, pēc ibuprofēna hroniskas ievadīšanas, samazinājās gan A β agregātu daudzums, gan neuroiekaisuma marķieru ekspresija – IL-1 β un GFAP (Lim et al., 2000). Šajā pētījumā mildronāts neietekmēja GFAP ekspresiju, bet iespējams, ka lielās variācijas grupas ietvaros, neļāva atrast atšķirības.

Mildronāts neizmainīja nevienu no pārbaudītajiem sinaptiskās plasticitātes marķieriem – GAP-43, sinaptofizīnu un GAD67. Visticamāk nekādas atšķirības neatradām, jo *Western* blota analīze tika veikta visā hipokampā, kur imūnhistoķīmijas metodē atšķirības bija novērojamas konkrētās hipokampa lokācijās, piemēram, *stratum oriens* CA1 vai *stratum* piramidālajos CA1 neironos.

Holinerģiskā disregulācija ir agrīna AD pazīme un ir pamatojuma ar holinerģisko neironu bojāeju, kas iet bojā no A β agregātu uzkrāšanās hipokampā (Craig et al., 2011). Enzīms AChE ir atbildīgs par acetilholīna hidrolīzi sinapsē un spēlē būtisku lomu sinaptiskajā signāla transdukcijā. Šī enzīma bloķēšana bija viena no pirmajām stratēģijām uzlabot atmiņas traucējumus AD pacientos (Martorana et al., 2010). Mūsu pētījumā mildronāts 50 mg/kg, bet ne mildronāta 100 mg/kg grupā, samazināja AChE ekspresiju CA1 hipokampā. Tas korelē ar atmiņas uzlabojumiem mildronāta 50 mg/kg grupā salīdzinājumā ar mildronāta 100 mg/kg grupu. AChE ekspresijas samazinājums CA1 neironu reģionā hipokampā nozīmē augstāku acetilholīna līmeni sinapsē un šūnu aktivēšanu, kas iespējami bija par iemeslu labākam rezultātam ūdens labirintā mildronāta 50 mg/kg grupā. Līdzīgi – samazinātu AChE pozitīvo nervu šķiedru skaitu atrada žurkām, kurām ievadīja mildronātu devā 50 mg/kg un, tā ir grupa, kurai bija labāks rezultāts aktīvās izvairīšanās testā (Klusa et al., 2013).

Otrs izskaidrojums, kāpēc mildronāts spēj uzlabot reakcijas sociālās atpazīšanas un ūdens labirintā, ir tas, ka mildronāts spēj uzlabot asinsriti smadzenēs un tādējādi uzlabo šķīstošā A β agregātu aizplūšanu no smadzenēm. Šādu iespēju pieļauj Sjakstes et al. (2005) apskata rakstā – ka mildronāta CNS efekti ir regulēti ar NO produkciju vaskulārājā endotēlijā, modificējot γ -butirobetaīnu un tā estera daļas.

Iespējams, ka mildronāts spēj ietekmēt t.s. vitagēnu mijiedarbības. Nesenos pētījumos atklāja, ka L-karnitīns un tā metabolīts acetil-L-karnitīns uzrāda neiroprotekciju ar hormētisko

signālceļu aktivāciju. Tai skaitā caur vitagēniem – gēniem, kuri iesaistīti šūnas homeostāzes uzturēšanā, stresa apstākļos, kā, piemēram, gēni, kas atbild par molekulārajiem čaperoniem, t. sk., karstuma šoka proteīni (Calabrese et al., 2012). Nevar ignorēt, ka mildronātam piemīt strukturālas līdzības, kas ļauj tos saukt par karnitīna analogu. Papildus jānorāda, ka mildronāts spēja stimulēt HSP70 ekspresiju 6-OHDA bojātajā striatumā un *substantia nigra* struktūrā (Isajevs et al., 2011). Mums nav datu, vai un kā mildronāts ietekmē HSP sistēmu AD modelī. Ņemot vērā efektus ar acetil-L-karnitīnu, varam sagaidīt līdzīgus efektus – HSP sistēmas stimulēšanu un garozas neironu aizsargāšanu no Aβ42-mediēta oksidatīvā stresa un neurotoksicitātes (Abdul and Butterfield, 2007).

Šajā pētījumā apstiprinās, ka mildronāts devā 50 mg/kg uzrāda visefektīvāko atmiņas uzlabošanu un Aβ agregātu aizvākšanu AD modelī ar Tg-APP_{SwDI} pelēm. Lielākajā daļā testu mildronāts 50 mg/kg uzrādīja labākus rezultātus, kas norāda uz to, ka mildronāta deva 100 mg/kg ir par lielu. Šie efekti varētu būt atkarīgi no sugas, jo žurkās mildronāta deva 200 mg/kg ir ar aizsargājošu efektu (Svalbe et al., 2011).

Kopsummā iegūtie dati ar Tg-APP_{SwDI} uzrāda, ka mildronātam piemīt vairāki pozitīvi efekti šajā AD modelī. Mildronāts spēja uzlabot sociālo atpazīšanu, telpisko mācīšanos ūdens labirintā un samazināja Aβ peptīdu agregantu daudzumu hipokampā. Mikroglijas aktivēšana un AChE ekspresijas samazināšana CA1 reģionā hipokampā, liecina, ka mildronātam varētu piemist terapijas lietderība kā slimības modificējošai zāļu vielai AD pacientiem. Tg-APP_{SwDI} pelēm 3 – 4 mēnešu vecumā nepiemīt *tau* proteīna patoloģija, tāpēc nākotnes pētījumos būtu vērts aplūkot, vai mildronātam uz *tau* proteīnu varētu būt līdzīgs efekts kā uz Aβ. Nākotnes preklīniski pētījumi ir nepieciešami, lai saprastu precīzāk molekulāros mehānismus, ar kuriem mildronāts spēj uzlabot atmiņu un mazināt AD patoloģiju.

4.3. Mildronāts aizsargā atmiņu un sinaptisko proteīnu ekspresiju immobilizācijas stresa un haloperidola amnēzijas modelžurkām

Šajā pētījumā pārbaudījām, vai mildronāts spēj ietekmēt immobilizācijas stresa un haloperidola radītus atmiņas traucējumus žurkām un, kā atmiņa korelē ar biomarkieru ekspresiju smadzenēs BDNF, AChE un GAD67, kas ir proteīni kas spēlē būtisku lomu sinaptiskajā plasticitātē. Saistība starp šiem diviem modeļiem nosaka apstākļus, ka hroniska antipsihotisku zāļu vielu lietošana ir arī stress organismam (Lipska et al., 2001). Proteīna ekspresijas pārbaudītas hipokampā un striatumā, kas ir pret stresu jūtīgākās smadzeņu struktūras (Giachero et al., 2013, Nooshin et al., 2011, Robinson et al., 2013). Mildronāta

deva šajā pētījumā bija 50 mg/kg, jo tā bija uzrādījusi visefektīvākos rezultātus iepriekšējos pētījumos.

Iegūtie dati ar mildronātu amnēzijas modeļos ar stresu un haloperidolu uzrāda, ka mildronātam piemīt spēja aizsargāt atmiņu. Imobilizācijas stress, kas ilga 2 h izraisīja traucējumus žurkas atmiņā, tika pārbaudīts pasīvās izvairīšanās testā. Tas sakrita ar BDNF ekspresijas pieaugumu gan hipokampā, gan striatumā. Šie dati sakrīt arī ar citu autoru pētījumiem (Marais et al., 2009, Nooshinfar et al., 2011). Mildronāts reversēja atmiņas traucējumus stresētajiem dzīvniekiem un normalizēja BDNF ekspresiju līdz kontroles līmenim hipokampā un striatumā.

Zināms, ka hronisks stress ar paaugstinātu glutikortikoīdu daudzumu asinīs spēj veicināt neironu bojāeju, sevišķi hipokampā (McEwen and Sapolsky, 1995). Nesenāki dati uzrāda, ka kopā ar stresu un atmiņas pasliktināšanos samazinās šūnas adhēzijas molekulas nektīna-3 (Wang X. D. et al., 2013), sinaptofizīna (Jin et al., 2013) ekspresija. Ļoti daudzi pētījumi norāda tieši uz BDNF ekspresijas izmaiņām (Licinio and Wong, 2002, Smith et al., 1995). BDNF ir ļoti svarīgs neirotrofiskais faktors šūnas izdzīvošanas procesos, tai skaitā tas ietekmē transkripciju, iekššūnas transportu, sekrēciju, proteolītisko procesos un receptoru signāla transdukciju. Tas viss padara BDNF par atslēgas molekulu aktivitātes atkarīgajā sinaptiskajā plasticitātē (Sakata and Duke, 2014). Atkarībā no stresa stimula intensitātes ir mainīta BDNF ekspresija: hronisks stress samazina BDNF ekspresiju, kā piemēram 8 h ilgs imobilizācijas stress (Smith et al., 1995, Ueyama et al., 1997), bet akūts jeb īsa laika stress (līdz 60 minūtēm), izraisa ievērojamu BDNF ekspresijas palielināšanos žurku hipokampā, taču ilgāks stress (vismaz 180 minūtes) – BDNF ekspresijas samazināšanos (Marmigere et al., 2003). BDNF mRNS ir paaugstināts arī mācīšanās/treniņa procesos un īstermiņa vai ilgtermiņa atmiņas veidošanās laikā (Huang et al., 2006, Mizuno et al., 2003), un ar samazinātu BDNF daudzumu smadzenēs ir sliktāki rezultāti mācīšanās un atmiņas testos pieaugušām žurkām (Mu et al., 1999).

Mūsu stresa eksperimentā mildronāts noregulēja līdz kontroles līmenim arī GAD67 ekspresiju hipokampā, kas bija būtiski paaugstināts stresētajos dzīvniekos. Paaugstināta GAD67 ekspresija hipokampā un citos smadzeņu reģionos stresa apstākļos ir parādīta arī iepriekšējos pētījumos (Bowers et al., 1998). Nekādas GAD67 izmaiņas gan netika konstatētas striatumā, un arī mildronāts neietekmēja tā ekspresiju šajā smadzeņu struktūrā.

Citos pētījumos ir uzrādīts, ka akūts stress izmaina holinerģisko metabolismu caur transkripcijas faktoru c-Fos (Kaufer et al., 1998). Mēs savā pētījumā konstatējām AChE

ekspresijai stresa apstākļos pretējus rezultātus: palielinājumu striatumā, bet samazināšanos hipokampā. Mildronāts pats ar sevi neietekmēja AChE ekspresiju salīdzinājumā ar kontroli.

Savukārt haloperidola amnēzijas pētījumā, kur haloperidolu žurkām ievadījām 3 nedēļas, BDNF un AChE ekspresija bija samazināta hipokampā, salīdzinot ar kontroli. Mildronāts normalizēja BDNF un AChE ekspresiju līdz kontroles līmenim, kas korelēja ar uzlabojumu Barnes labirinta testā salīdzinājumā ar haloperidola grupas žurkām bez mildronāta. Haloperidola ievadīšana neietekmēja GAD67 ekspresiju hipokampā, kā arī ne mildronāta ievadīšana.

BDNF ekspresijas samazināšanās haloperidola ietekmē ir aprakstīta jau iepriekš (Lipska et al., 2001, Nandra and Agius, 2012), lai gan ir arī pētījumi, kur haloperidols BDNF ekspresiju neietekmē (Valvassori et al., 2008). Izmaiņas holīnerģiskajā aktivitātē no haloperidola ilgstošas lietošanas ir labi aprakstītas arī citu pētījumos (Mahadik et al., 1988, Terry et al., 2007a, Terry et al., 2007b).

Iegūtie rezultāti ar AChE ekspresijas samazināšanos haloperidola ietekmē varētu būt izskaidrojami ar haloperidola specifisko antagonismu uz dopamīna receptoriem, kas tādējādi apstādina dopamīnerģisko signāla transdukciju šūnā. Samazinoties dopamīnerģiskai aktivitātei, tiek noņemta inhibējošā ietekme uz holīnerģisko sistēmu un tā var aktivēties. Savukārt aktivēta holīnerģiskā sistēma ir atkarīga arī no samazinātas AChE ekspresijas, jo AChE, kā zināms, inaktivē acetilholīnu. Cilvēkos šāds disbalanss starp dopamīnu un acetilholīnu ir atrodams PD pacientos. Žurkās atmiņas pasliktināšanās no haloperidola hroniskas lietošanas ir saskaņā ar atmiņas traucējumiem šizofrēnijas pacientiem, kas arī pastiprinās no haloperidola hroniskas lietošanas (Desamericq et al., 2014).

Mildronāts šajā gadījumā spēja balansēt dopamīnerģisko un holīnerģisko sistēmu. Šī mildronāta īpašība var papildus līdzēt ekstrapirimidālu simptomu mazināšanai, kas rodas no dopamīna receptoru antagonistu ilgstošas lietošanas.

Promocijas pētījums atklāj un apstiprina mildronāta spēju aizsargāt no stresa un haloperidola izraisītiem atmiņas traucējumiem un, šīs izmaiņas korelēja ar proteīnu ekspresijas regulāciju, kas ir iesaistīti sinaptiskajā plasticitātē un līdz ar to palīdz atmiņas veidošanās procesos. Lai gan stress un haloperidols izraisīja atšķirīgu efektu uz BDNF ekspresiju, tomēr mildronāts abos gadījumos spēja to noregulēt līdz kontroles līmenim. BDNF ir svarīgs mērķproteīns, sevišķi tāpēc, ka neironiem nepieciešama balansēta BDNF ekspresija. Palielināta BDNF ekspresija pasliktina atmiņu (Nooshinfa et al., 2011).

4.4. Mildronāta pozitīvie efekti apmācības modelī

Mildronāta jau 7 dienu ilga ievadīšana devā 50 mg/kg pirms aktīvās izvairīšanās testa apmācības palielināja pareizo atbilžu skaitu, kā arī samazināja latento periodu. Šie dati korelē ar palielinātu BrdU/nestīna pozitīvo šūnu skaitu hipokampā. BrdU iekļūšana DNS proliferējošajās hipokampa šūnās ir laba metode jaunu neironu noteikšanai, kas var liecināt arī par aktīviem kognitīviem procesiem smadzenēs (Sahay et al., 2011). Mildronāts kombinācijā ar apmācību palielināja BrdU/nestīna pozitīvo šūnu skaitu aptuveni 4-kārtīgi, salīdzinot ar netrenētajām kontroles žurkām un netrenēto mildronāta grupu, un 2-kārtīgi, salīdzinot ar trenēto kontroles grupu. Šajā kontekstā ir vērts pieminēt iepriekš iegūtos rezultātu, kurā mildronāts spēja palielināt pieaugušu žurku striatumā progenitoro šūnu populācijas biomarķieri Notch-3 un palielināt gliju neirotrofo faktoru GDNF 6-OHDA izraisītā PD modelī.

Lai vairāk noskaidrotu par mildronāta iespējamiem molekulārajiem mehānismiem, kas uzlaboja atmiņu, noteicām dažādu biomarķieru ekspresiju – GAD65/67, AChE, GAP-43 un c-jun/AP-1 hipokampā, jo atmiņas veidošanā notiek vesela virkne sinaptisko proteīnu aktivācija un pastiprināta ekspresija. Lielā vairumā gadījumu šo proteīnu aktivēšana sākas ar glutamātu un tā mijiedarbību ar dažādiem glutamāta receptoriem, kam seko proteīnu kināžu aktivācija, CREB aktivācija, izmaiņas gēnu transkripcijā, noslēdzoties ar *de novo* proteīnu ekspresiju (Wang H. et al., 2006). Glutamāterģiskie signāļceļi spēlē būtisku lomu sinaptiskajā plasticitātē, kas ir tieši saistīta ar mācīšanos un atmiņu veidošanos (Riedel et al., 2003).

Šajā pētījumā atklājām 2-kārtīgu GAD65/67 ekspresijas palielinājumu hipokampā apmācības kontroles žurkās, salīdzinot ar netrenētajām kontroles žurkām. Savukārt mildronāts apmācības grupā ir samazinājis GAD65/67 ekspresiju hipokampā aptuveni 4-kārtīgi, salīdzinot ar apmācības kontroles grupu. Var diskutēt, vai mildronāts spēj pastiprināt glutamāterģisko signāļceļus šajā apmācības modelī, mazinot enzīma GAD65/67 iespēju pārvērst glutamātu inhibējošajā GABA.

Holīnerģiskās sistēmas stimulēšana arī varētu būt iemesls atmiņas uzlabošanai, jo mildronāta ievadīšana samazināja enzīma AChE pozitīvo nervu šķiedru skaitu hipokampā apmācības grupā, salīdzinot ar kontroles netrenēto grupu. Holīnerģiskā sistēma kopā ar glutamāterģisko ir tieši saistītas ar sinaptisko plasticitāti, kā arī kritiski atmiņas traucējumos, kas ir manāmi neurodeģeneratīvajās slimībās (Conner et al., 2005, Origlia et al., 2008). AChE inaktīvā neirotransmiteri acetilholīnu, un šī enzīma inhibīcijas zāļu vielas ir jau plaši izmantotas atmiņu traucējumiem Alcheimera slimības pacientiem (Shioda et al., 2011). AChE

mazinošu efektu mildronāts uzrādīja arī Tg-APP_{SwDI} peļu modelī, kur arī atradām atmiņu uzlabojošu efektu pelēm sociālās atpazīšanas testā un ūdens labirintā.

Sinaptiskajā plasticitātē ir iesaistīts arī GAP-43 proteīns, kas ekspresējas hipokampā un piedalās pieredzes radītajā sinaptiskajā plasticitātē (Benowitz and Routtenberg, 1997). GAP-43 mRNS izplatība nervu terminālēs norāda uz aksonālo augšanu un jaunu sinapšu veidošanos (Casoli et al., 2002). Šajā apmācības modelī GAP-43 ekspresija palielinājās hipokampā apmācītajām žurkām, salīdzinot ar neapmācīto žurku grupas hipokampiem kontroli un neapmācīto žurku mildronāta grupai.

Pārbaudot transkripcijas faktora c-jun/AP-1 ekspresiju hipokampā un atklājām, ka apmācības modelī bija tendence uz palielinātu ekspresiju, bet mildronāts kombinācijā ar apmācību palielināja c-jun/AP-1 ekspresiju hipokampā, salīdzinot ar neapmācīto kontroli.

Iegūtie dati norāda uz mildronāta pozitīvo efektu stimulēt jaunu iemaņu iemācīšanos un atmiņas apjoma palielināšanos apmācītām žurkām, un tā mehānismi saistāmi ar sinaptisko proteīnu ekspresiju stimulēšanu un glutamāterģiskās un holīnerģiskās sistēmas atslēgēzīmu regulāciju.

4.5. AP-12 šķērso hematoencefālisko barjeru, noņem bailes, uzlabo telpisko atmiņu un stimulē glutamāterģisko signālceļu hipokampā Tg-APP_{SwDI} un C57BL/6J pelēs

Iepriekšējie pētījumi ar DHP derivātu cerebrokrastu devās 0,05 – 1 mg/kg i.p. uzrādīja atmiņu stimulējošu efektu dažādos neurodeficīta modeļos (Klusa, 1995, Rumaks et al., 2012), pretiekaisuma (Klegeris et al., 2002, Pupure et al., 2008b) un mitohondrijus aizsargājošu darbību (Klimaviciusa et al., 2007). Šie rezultāti ļauj spriest, ka DHP derivāti ne vien mijiedarbojas ar dažādiem receptoriem un jonu kanāliem (Triggle, 2003), bet var arī ietekmēt smadzeņu proteīnu ekspresiju.

Šajā pētījumā iegūtie dati uzrādīja, ka hroniska AP-12 ievadīšana C57BL/6J pelēm devā 0,1 mg/kg uzlaboja telpisko atmiņu trešajā un ceturtajā treniņa dienā ūdens labirintā. Atšķirības nenovēroja piektajā dienā, kas, iespējams, ir no tā, ka arī kontroles grupā tika sasniegts mācīšanās efekts. Uzlabojums ūdens labirintā sakrita ar enzīma GAD67 un Homer-1 proteīna ekspresijas palielināšanos hipokampā. Atšķirībā no ūdens labirinta, izmaiņas GAD67 un Homer-1 ekspresijā tika detektētas abās 0,1 and 1 mg/kg devās, kas norāda uz to, ka proteīnu ekspresija ir jutīgāks rādītājs AP-12 ietekmei smadzenēs nekā uzvedības izmaiņas.

Uzvedības izmaiņas rodas no kopējās smadzeņu mijiedarbības starp struktūram, un tāpēc mazāk pakļaujas izmaiņām nekā proteīnu ekspresijas izmaiņas.

Enzīma GAD67 ekspresijas palielināšanās hipokampā norāda, ka AP-12 iespējams veicina neurotransmiteru GABA sintēzi. AP-12 spēja uzlabot telpisko atmiņu C57BL/6J pelēs ir daļēji izskaidrojama ar GABAerģisko signālceļu aktivitāti, jo jau iepriekš ir atklāta šo neironu ietekme atmiņas nostiprināšanā (Lecourtier et al., 2011, Makkar et al., 2010). GABAerģisko procesu loma ir uzrādīta arī atmiņu uzlabojošam DHP derivātam – cerebrokrastam (Klusa, 1995).

Transgēnajās APP_{SweDI} pelēs pārbaudīja tikai vienu devu 1 mg/kg pieņemot, ka transgēnajiem dzīvniekiem ar AD patoloģiju nepieciešama augstāka deva. Arī Tg-APP_{SweDI} pelēs AP-12 uzlaboja telpisko atmiņu ūdens labirinatā, kas bija redzams, sākot ar trešo līdz piektai treniņa dienai.

Līdzīgi kā C57BL/6J pelēm, transgēnās pēc AP-12 devā 1 mg/kg ievadīšanas uzrādīja paaugstinātu GAD67 ekspresiju hipokampā. Tomēr C57BL/6J pelēm tika uzrādīta tikai tendence pavadīt ilgāku laiku atvērtajā platformā, bet Tg-APP_{SweDI} pelēs AP-12 uzrādīja anksiolītisku efektu, pavadot vairāk laika atvērtajā platformā nekā kontroles dzīvnieki. Šī GABAerģiskā aktivācija ir svarīga, jo GABA signāla transdukcija ir samazināta AD pacientu smadzenēs (Limon et al., 2012). Ir zināms, ka atmiņas progresējošā pasliktināšanās, bailes un depresija ir ļoti raksturīgi AD agrīnie simptomi (Horning et al., 2014) un vajadzība tos mazināt ir ļoti sarežģīts terapijas uzdevums (Rosenberg et al., 2013). Tāpēc AP-12 atrastās anksiolītiskās un atmiņu uzlabojošas īpašības Tg-APP_{SweDI} pelēm ir laba kombinācija kā mazināt raksturīgos AD uzvedības traucējumus.

C57BL/6J pelēs AP-12 izmainīja ekspresiju vēl vienam būtiskam proteīnam Homer-1, bet tādas atšķirības netika atrastas Tg-APP_{SweDI} pelēs. Nebija izmaiņas ekspresijā starp grupām arī AChE ekspresijai. Iegūtie dati norāda, ka GAD67 paaugstināta ekspresija ir bijis kā galvenais iemesls uzlabojumiem telpiskajā atmiņā, kā arī anksiolītiskajam efektam.

Tg-APP_{SweDI} peļu hipokampā AP-12 neietekmēja Aβ uzkrājumu daudzumu. Jāpiemin, ka hipokamps ir struktūra, kurā agrīni uzkrājas toksiskie Aβ peptīdi AD (Braak and Braak, 1998). Tādā nozīmē jautājums, kura no DHP savienojuma struktūrām spēj samazināt Aβ agregātu daudzumu, paliek atvērts nākotnes pētījumiem. Tā piemēram, no jau labi zināmajiem DHP savienojumiem, kā nilvadipīns, amlodipīns and nifedipīns, kuriem visiem piemīt spēja šķērsot hematoencefālisko barjeru, un, kuriem piemīt antihipertensīvas īpašības un spēja uzlabot atmiņu, tikai nilvadipīns ir uzrādījis spēju samazināt Aβ agregātu daudzumu AD modelī (Paris et al., 2011). Šī īpašība DHP-tipa zāļu vielām ir uzrādīta, kā ļoti būtiska atmiņas

uzlabošanā PD (Becker et al., 2008, Ritz et al., 2010, Simon et al., 2010) un AD gadījumos (Anekonda and Quinn, 2011).

Mūsu iegūtie dati no masas spektrometra uzrāda, ka C57BL/6J peļu smadzenēs ir detektējams AP-12 savienojums pēc AP-12 i.p. ievadīšanas devā 1 mg/kg, un norāda, ka AP-12 šķērso hematoencefālisko barjeru. AP-12 bija detektējams smadzeņu homogenātā zemā koncentrācijā 0,084 ng/ml.

Var spriest, ka AP-12 struktūras un fizikāli ķīmiskās īpašības ir būtiskas šī savienojama spējai šķērsot hematoencefālisko barjeru: lipofilā 4-(N-dodecil) piridīna grupa un DHP gredzens kā nesējmolekula, kas dod iespēju secināt, ka AP-12 deva ir bijusi pietiekama, lai izmainītu proteīnu ekspresiju un uzlabotu mācīšanos un atmiņu dzīvniekos.

Nevar izslēgt, ka AP-12 pozitīvie efekti, iespējams, notiek ar cerebrovaskulārās dilatēšanas palīdzību, jo AP-12 ir uzrādījis kalcija kanālu bloķēšanas aktivitāti vaskulārajā šūnu līnijā (Rucins et al., 2014). AP-12 var tikt uzskatīts kā mazas molekulas prototips jaunu zāļu vielu radīšanā, kas spējīgas apstādināt neurodeģenerācijas klīniskos simptomus (bailes un atmiņu traucējumus).

5. SECINĀJUMI

1. Pārkinsona slimības modelī žurkām karnitīna atvasinājums (*carnitine congener*) mildronāts spēja aizsargāt dopamīna producējošo šūnu bojāeju (TH kā biomarķieris) un regulēt to proteīnu ekspresiju striatumā un *substantia nigra*, kas iesaistīti šūnas izdzīvošanas procesos: proliferācijā iesaistīto Notch-3, astroglijas GFAP, iekaisuma iNOS, mikroglijas Iba-1, molekulāro čaperonu HSP70, ubikvitīnu, neirotrofo faktoru GDNF un adhēzijas molekulu NCAM. Neuroprotektējošās mildronāta devas ir ievērojami mazākas (20 - 50 mg/kg) nekā iepriekš aprakstītās devas kardioprotekcijai (100 – 200 mg/kg).
2. Alzheimer slimības modelī Tg-APP_{S_WDI} mildronāts (50 mg/kg) uzlaboja sociālo atpazīšanu un telpisko atmiņu ūdens labirintā. Mildronāts samazināja Aβ peptīdu uzkrājumus hipokampā, kā arī palielināja mikroglijas aktivitāti (Iba-1 palielināta ekspresija) un samazināja enzīma AChE ekspresiju hipokampā.
3. Imobilizācijas stresa apstākļos mildronāts aizsargāja pret atmiņas pasliktināšanos pasīvās izvairīšanās testā un normalizēja BDNF, AChE un GAD67 ekspresiju hipokampā.
4. Hroniskas neiroleptiskās vielas haloperidola izraisītajā amnēzijas modelī žurkām mildronāts novērsa telpiskās atmiņas deficītu un normalizēja BDNF un AChE ekspresiju hipokampā.
5. Mildronāts stimulēja žurku apmācības un atmiņas procesu veidošanos aktīvās izvairīšanās testā, kas korelēja ar BrdU/nesfīna pozitīvo šūnu skaitu pieaugumu hipokampā, kā arī regulēja GAD65/67 ekspresiju, palielināja ar augšanu asociētā proteīna GAP-43 un palielināja transkripcijas faktora c-jun/AP-1 ekspresiju.
6. Jaunais dihidropiridīna atvasinājums AP-12 spēj šķērsot hematoencefālisko barjeru. AP-12 ievadīšana (0,1 un 1 mg/kg) samazināja bailes un uzlaboja atmiņu Tg-APP_{S_WDI} pelēm, kā arī stimulēja GAD67 un Homer-1 ekspresiju hipokampā.
7. Mazās molekulas mildronāts un AP-12 ar uzlādētiem struktūras elementiem var tikt uzskatīti kā prototipi jauna tipa neuroprotektīvo zāļu vielu dizainā, lai regulētu intracelulāros procesus jau agrīnās neurodeģenerācijas fāzes, tai skaitā, novēršot atmiņas traucējumus.

8. PATEICĪBAS

Visdziļāko pateicību izsaku savai darba vadītājai profesorei Vijai Klušai. Vija Klušā pieņēma mani savā pētniecības grupā, sākot jau ar bakalaura noslēguma darbu, pēcāk uzticēja tēmu maģistra darba izpildei, kas bija svarīgs vadmotīvs turpināt studijas doktorantūrā. Tā ir liela veiksmē sastapt tādu darba vadītāju, esmu daudz iemācījusies no profesores un augusi gan kā zinātniece, gan kā cilvēks.

Vēlos pateikties saviem lieliskajiem kolēģiem – LU Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedras kolektīvam: Dr. Baibai Jansonei, Dr. Zanei Dzirkalei, Dr. Jolantai Pupurei, Dr. Šimonim Svirskim, pētniekiem Kasparam Jēkabsonam un Jurim Rumakam, doktorantam Vladimiram Piļipenko par palīdzību un praktiskiem padomiem pētniecībā.

Pateicos par sadarbību pētniekiem Dr. Ingai Kadišai, Dr. Tomasam van Groenam (*Thomas van Groen*). Paldies par iespēju izpildīt pētījumu par mildronātu un DHP derivātu AP-12 viņu vadītajā laboratorijā Alabamas Universitātē Birmingemā. Paldies tehniskajam darbiniekam Ašišam Kumāram (*Ashish Kumar*), kurš deva daudzus praktiskus padomus eksperimentu izpildē.

Pateicos arī LU Medicīnas fakultātes patologam Dr. Sergejam Isajevam par Pārkinsona slimības pētījuma imūnhistoķīmijas datiem un stimulu pašai apgūt šo metodi.

Promocijas darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta “Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē” finansiālu atbalstu.

Neizsakāma ir pateicība ģimenei – īpaši mammai, kura vienmēr ir ticējusi, ka varu sasniegt visu, ko vēlos un manam vīram Natanielam par atbalstu ikdienā.

9. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abdi Z, Sharma T. (2004). Social cognition and its neural correlates in schizophrenia and autism. *CNS Spectr*, 9: 335-343.
2. Abdul HM, Butterfield DA. (2007). Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 42: 371-384.
3. Adachi H, Katsuno M, Waza M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G. (2009). Heat shock proteins in neurodegenerative diseases: pathogenic roles and therapeutic implications. *Int J Hyperthermia*, 25: 647-654.
4. Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, Ishrat T, Chaturvedi RK, Agrawal AK, Islam F. (2005). Ginkgo biloba affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. *J Neurochem*, 93: 94-104.
5. Alfarez DN, Joels M, Krugers HJ. (2003). Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus in vitro. *Eur J Neurosci*, 17: 1928-1934.
6. Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, Schapira AH. (2010). Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol*, 67: 1464-1472.
7. Anderson AA, Ushakov DS, Ferenczi MA, Mori R, Martin P, Saffell JL. (2008). Morphoregulation by acetylcholinesterase in fibroblasts and astrocytes. *J Cell Physiol*, 215: 82-100.
8. Anekonda TS, Quinn JF. (2011). Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine. *Biochim Biophys Acta*, 1812: 1584-1590.
9. Aponso PM, Faull RL, Connor B. (2008). Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 151: 1142-1153.
10. Araki T, Muramatsu Y, Tanaka K, Matsubara M, Imai Y. (2001). Riluzole (2-amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole) attenuates MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in mice. *Neurosci Lett*, 312: 50-54.
11. Ashburn TT, Thor KB. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 673-683.
12. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM. (2002). Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science*, 295: 865-868.
13. Baltes C, Princz-Kranz F, Rudin M, Mueggler T. (2011). Detecting amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease. *Methods Mol Biol*, 711: 511-533.
14. Balu DT, Lucki I. (2009). Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev*, 33: 232-252.
15. Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW. (1999). Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, 19: 1708-1716.

16. Becker C, Jick SS, Meier CR. (2008). Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology*, 70: 1438-1444.
17. Benowitz LI, Routtenberg A. (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*, 20: 84-91.
18. Berson A, et al. (2008). Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain*, 131: 109-119.
19. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. (2005). Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Exp Neurol*, 191 Suppl 1: S17-27.
20. Bianchetti A, Rozzini R, Trabucchi M. (2003). Effects of acetyl-L-carnitine in Alzheimer's disease patients unresponsive to acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Med Res Opin*, 19: 350-353.
21. Bingol B, Sheng M. (2011). Deconstruction for reconstruction: the role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron*, 69: 22-32.
22. Binienda Z, Przybyla-Zawislak B, Virmani A, Schmued L. (2005). L-carnitine and neuroprotection in the animal model of mitochondrial dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*, 1053: 174-182.
23. Bisaz R, Schachner M, Sandi C. (2011). Causal evidence for the involvement of the neural cell adhesion molecule, NCAM, in chronic stress-induced cognitive impairments. *Hippocampus*, 21: 56-71.
24. Block ML, Hong JS. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*, 76: 77-98.
25. Bowers G, Cullinan WE, Herman JP. (1998). Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci*, 18: 5938-5947.
26. Braak H, Braak E. (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, 1: 213-216.
27. —. (1998). Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*, 53: 127-140.
28. Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm*, 110: 517-536.
29. Braak H, Rub U, Jansen Steur EN, Del Tredici K, de Vos RA. (2005). Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. *Neurology*, 64: 1404-1410.
30. Breese GR, Traylor TD. (1971). Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *Br J Pharmacol*, 42: 88-99.
31. Bueler H. (2009). Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 218: 235-246.
32. Cabezas R, Avila MF, Torrente D, El-Bachá RS, Morales L, Gonzalez J, Barreto GE. 2013. Astrocytes Role in Parkinson: A Double-Edged Sword.
33. Cadenas E. (2004). Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med*, 25: 17-26.
34. Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Iavicoli I, Di Paola R, Koverech A, Cuzzocrea S, Rizzarelli E, Calabrese EJ. (2012). Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta*, 1822: 753-783.
35. Calhoun ME, et al. (1999). Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 14088-14093.

36. Campos AH, Wang W, Pollman MJ, Gibbons GH. (2002). Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: implications in cell-cycle regulation. *Circ Res*, 91: 999-1006.
37. Cao JP, Wang HJ, Yu JK, Yang H, Xiao CH, Gao DS. (2008). Involvement of NCAM in the effects of GDNF on the neurite outgrowth in the dopamine neurons. *Neurosci Res*, 61: 390-397.
38. Carmo MR, Menezes AP, Nunes AC, Pliassova A, Rolo AP, Palmeira CM, Cunha RA, Canas PM, Andrade GM. (2014). The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. *Neuropharmacology*, 81: 142-152.
39. Casoli T, Di Stefano G, Fattoretti P, Delfino A, Solazzi M, Bertoni-Freddari C. (2002). Effects of ethanol on GAP-43 levels in hippocampus and cerebellum of aged rats. *Ann N Y Acad Sci*, 973: 313-316.
40. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*, 11: 98.
41. Collinge J, Clarke AR. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, 318: 930-936.
42. Conner JM, Chiba AA, Tuszynski MH. (2005). The basal forebrain cholinergic system is essential for cortical plasticity and functional recovery following brain injury. *Neuron*, 46: 173-179.
43. Cooke SF, Bliss TV. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, 129: 1659-1673.
44. Corbett A, et al. (2012). Drug repositioning for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov*, 11: 833-846.
45. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261: 921-923.
46. Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 35: 1397-1409.
47. D'Andrea MR, Cole GM, Ard MD. (2004). The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging*, 25: 675-683.
48. Daly C, Sugimori M, Moreira JE, Ziff EB, Llinas R. (2000). Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 6120-6125.
49. Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. (2002). Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med*, 12: 275-279.
50. Daubner SC, Le T, Wang S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 508: 1-12.
51. Davis GW, Schuster CM, Goodman CS. (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron*, 17: 669-679.
52. Davis J, Xu F, Deane R, Romanov G, Previti ML, Zeigler K, Zlokovic BV, Van Nostrand WE. (2004). Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem*, 279: 20296-20306.
53. de la Monte SM, Ng SC, Hsu DW. (1995). Aberrant GAP-43 gene expression in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 147: 934-946.

54. Debeir T, Ginestet L, Francois C, Laurens S, Martel JC, Chopin P, Marien M, Colpaert F, Raisman-Vozari R. (2005). Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Exp Neurol*, 193: 444-454.
55. Deister C, Schmidt CE. (2006). Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth. *J Neural Eng*, 3: 172-179.
56. Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi FJ, Oertel WH. (2003). Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, 18: 2731-2742.
57. Desamericq G, Schurhoff F, Meary A, Szoke A, Macquin-Mavier I, Bachoud-Levi AC, Maison P. (2014). Long-term neurocognitive effects of antipsychotics in schizophrenia: a network meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*, 70: 127-134.
58. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, 175: 303-317.
59. DiMauro S, Mancuso M. (2007). Mitochondrial diseases: therapeutic approaches. *Biosci Rep*, 27: 125-137.
60. Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 14385-14390.
61. Dubrovina NI, Loskutova LV. (2002). [Effect of haloperidol on development of amnesia in aggressive and submissive mice]. *Eksp Klin Farmakol*, 65: 3-5.
62. Duman RS, Monteggia LM. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 59: 1116-1127.
63. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, 118: 5-36.
64. Eikelenboom P, van Gool WA. (2004). Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 111: 281-294.
65. Eng LF, Ghirnikar RS. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*, 4: 229-237.
66. Ferri CP, et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366: 2112-2117.
67. Finley D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*, 78: 477-513.
68. Finsterwald C, Alberini CM. (2014). Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiol Learn Mem*, 112: 17-29.
69. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. (2010). Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond)*, 7: 30.
70. Fukuda T, Aika Y, Heizmann CW, Kosaka T. (1998). GABAergic axon terminals at perisomatic and dendritic inhibitory sites show different immunoreactivities against two GAD isoforms, GAD67 and GAD65, in the mouse hippocampus: a digitized quantitative analysis. *J Comp Neurol*, 395: 177-194.
71. Fukui M, Tanaka M, Toda H, Asano M, Yamazaki M, Hasegawa G, Imai S, Fujinami A, Ohta M, Nakamura N. (2012). The serum concentration of allograft inflammatory factor-1 is correlated with metabolic parameters in healthy subjects. *Metabolism*, 61: 1021-1025.
72. Gerlach J, Casey DE. (1990). Remoxipride, a new selective D2 antagonist, and haloperidol in cebus monkeys. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 14: 103-112.
73. Gharib E, Gardaneh M, Shojaei S. (2013). Upregulation of glutathione peroxidase-1 expression and activity by glial cell line-derived neurotrophic factor promotes high-

- level protection of PC12 cells against 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities. *Rejuvenation Res*, 16: 185-199.
74. Giachero M, Calfa GD, Molina VA. (2013). Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. *Learn Mem*, 20: 611-616.
 75. Giunti D, Parodi B, Cordano C, Uccelli A, Kerlero de Rosbo N. (2014). Can we switch microglia's phenotype to foster neuroprotection? Focus on multiple sclerosis. *Immunology*, 141: 328-339.
 76. Goedert M, Spillantini MG. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science*, 314: 777-781.
 77. Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M. (2010). The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, 33: 317-325.
 78. Gonzalez-Aparicio R, Flores JA, Fernandez-Espejo E. (2010). Antiparkinsonian trophic action of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor beta1 is enhanced after co-infusion in rats. *Exp Neurol*, 226: 136-147.
 79. Gorman AM, Szegezdi E, Quigney DJ, Samali A. (2005). Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome c release and apoptosis in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 327: 801-810.
 80. Gould E, Tanapat P. (1999). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*, 46: 1472-1479.
 81. Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG. (2010). Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 31: 141-142; author reply 142-143.
 82. Hardy, Higgins GA. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256: 184-185.
 83. Hardy, Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297: 353-356.
 84. Harper JD, Lansbury PT, Jr. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem*, 66: 385-407.
 85. Hasselmo ME. (2006). The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. *Curr Opin Neurobiol*, 16: 710-715.
 86. Hiltunen M, van Groen T, Jolkkonen J. (2009). Functional roles of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta peptides: evidence from experimental studies. *J Alzheimers Dis*, 18: 401-412.
 87. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*, 9: 2459-2464.
 88. Horning SM, Melrose R, Sultzer D. (2014). Insight in Alzheimer's disease and its relation to psychiatric and behavioral disturbances. *Int J Geriatr Psychiatry*, 29: 77-84.
 89. Huang AM, Jen CJ, Chen HF, Yu L, Kuo YM, Chen HI. (2006). Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neural Transm*, 113: 803-811.
 90. Hwang IK, Yoo KY, Jung BK, Cho JH, Kim DH, Kang TC, Kwon YG, Kim YS, Won MH. (2006). Correlations between neuronal loss, decrease of memory, and decrease expression of brain-derived neurotrophic factor in the gerbil hippocampus during normal aging. *Exp Neurol*, 201: 75-83.
 91. Hwang IK, et al. (2008). Comparison of glutamic acid decarboxylase 67 immunoreactive neurons in the hippocampal CA1 region at various age stages in dogs. *Neurosci Lett*, 431: 251-255.

92. Irvin DK, Zurcher SD, Nguyen T, Weinmaster G, Kornblum HI. (2001). Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J Comp Neurol*, 436: 167-181.
93. Isajevs S, Isajeva D, Beitnere U, Jansone B, Kalvinsh I, Klusa V. (2011). Mildronate as a regulator of protein expression in a rat model of Parkinson's disease. *Medicina (Kaunas)*, 47: 552-559.
94. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1: S183-185.
95. Jantzen PT, Connor KE, DiCarlo G, Wenk GL, Wallace JL, Rojiani AM, Coppola D, Morgan D, Gordon MN. (2002). Microglial activation and beta -amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci*, 22: 2246-2254.
96. Jin F, Li L, Shi M, Li Z, Zhou J, Chen L. (2013). The longitudinal study of rat hippocampus influenced by stress: early adverse experience enhances hippocampal vulnerability and working memory deficit in adult rats. *Behav Brain Res*, 246: 116-124.
97. Jing P, Jin Q, Wu J, Zhang XJ. (2008). GSK3beta mediates the induced expression of synaptic acetylcholinesterase during apoptosis. *J Neurochem*, 104: 409-419.
98. Jucker M, Walker LC. (2011). Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol*, 70: 532-540.
99. Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H. (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, 393: 373-377.
100. Kavelaars A, Heijnen CJ, Ellenbroek B, van Loveren H, Cools A. (1997). Apomorphine-susceptible and apomorphine-unsusceptible Wistar rats differ in their susceptibility to inflammatory and infectious diseases: a study on rats with group-specific differences in structure and reactivity of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurosci*, 17: 2580-2584.
101. Khan ZU, Muly EC. (2011). Molecular mechanisms of working memory. *Behav Brain Res*, 219: 329-341.
102. Kim T, Vidal GS, Djurisic M, William CM, Birnbaum ME, Garcia KC, Hyman BT, Shatz CJ. (2013). Human LILRB2 is a beta-amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. *Science*, 341: 1399-1404.
103. Klegeris A, Liutkevicius E, Mikalauskiene G, Duburs G, McGeer PL, Klusa V. (2002). Anti-inflammatory effects of cerebrocrast in a model of rat paw edema and on mononuclear THP-1 cells. *Eur J Pharmacol*, 441: 203-208.
104. Klimaviciusa L, Klusa V, Duburs G, Kaasik A, Kalda A, Zharkovsky A. (2007). Distinct effects of atypical 1,4-dihydropyridines on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity. *Cell Biochem Funct*, 25: 15-21.
105. Klusa V. (1995a). Cerebrocrast. Neuroprotectant, cognition enhancer. *Drugs Fut*, 20: 135-138.
106. —. (1995b). Cerebrocrast. Neuroprotectant, cognition enhancer. *Drugs Fut*, 20: 135-138.
107. Klusa VZ, et al. (2010). Neuroprotective properties of mildronate, a small molecule, in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*, 11: 4465-4487.
108. Konishi Y, Yang LB, He P, Lindholm K, Lu B, Li R, Shen Y. (2014). Deficiency of GDNF Receptor GFRalpha1 in Alzheimer's Neurons Results in Neuronal Death. *J Neurosci*, 34: 13127-13138.

109. Korshunova I, et al. (2007). GAP-43 regulates NCAM-180-mediated neurite outgrowth. *J Neurochem*, 100: 1599-1612.
110. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8856-8860.
111. Kriegstein K. (2004). Factors promoting survival of mesencephalic dopaminergic neurons. *Cell Tissue Res*, 318: 73-80.
112. Kuka J, Vilskersts R, Cirule H, Makreka M, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M, Liepinsh E. (2012). The cardioprotective effect of mildronate is diminished after co-treatment with L-carnitine. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 17: 215-222.
113. Kwon HB, Sabatini BL. (2011). Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature*, 474: 100-104.
114. Lecourtier L, de Vasconcelos AP, Leroux E, Cosquer B, Geiger K, Lithfous S, Cassel JC. (2011). Septohippocampal pathways contribute to system consolidation of a spatial memory: sequential implication of GABAergic and cholinergic neurons. *Hippocampus*, 21: 1277-1289.
115. Levey. (1996). Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 13541-13546.
116. Lezi E, Swerdlow RH. (2012). Mitochondria in neurodegeneration. *Adv Exp Med Biol*, 942: 269-286.
117. Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, Chui D, Hoi Yu AC. (2011). Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 8: 67-80.
118. Licinio J, Wong M. (2002). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in stress and affective disorders. *Mol Psychiatry*, 7: 519.
119. Lim GP, et al. (2000). Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 20: 5709-5714.
120. Limon A, Reyes-Ruiz JM, Miledi R. (2012). Loss of functional GABA(A) receptors in the Alzheimer diseased brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 10071-10076.
121. Linnarsson S, Bjorklund A, Ernfors P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci*, 9: 2581-2587.
122. Lipska BK, Khaing ZZ, Weickert CS, Weinberger DR. (2001). BDNF mRNA expression in rat hippocampus and prefrontal cortex: effects of neonatal ventral hippocampal damage and antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci*, 14: 135-144.
123. Liu B, Gao HM, Hong JS. (2003). Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect*, 111: 1065-1073.
124. Lopez-Aumatell R, Blazquez G, Gil L, Aguilar R, Canete T, Gimenez-Llort L, Tobena A, Fernandez-Teruel A. (2009). The Roman High- and Low-Avoidance rat strains differ in fear-potentiated startle and classical aversive conditioning. *Psicothema*, 21: 27-32.
125. Lull ME, Block ML. (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics*, 7: 354-365.
126. Luo GR, Chen S, Le WD. (2007). Are heat shock proteins therapeutic target for Parkinson's disease? *Int J Biol Sci*, 3: 20-26.
127. Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. (2007). The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn*, 65: 209-237.

128. Lustig C, Meck WH. (2005). Chronic treatment with haloperidol induces deficits in working memory and feedback effects of interval timing. *Brain Cogn*, 58: 9-16.
129. Maaswinkel H, Baars AM, Gispen WH, Spruijt BM. (1996). Roles of the basolateral amygdala and hippocampus in social recognition in rats. *Physiol Behav*, 60: 55-63.
130. Mahadik SP, Laev H, Korenovsky A, Karpiak SE. (1988). Haloperidol alters rat CNS cholinergic system: enzymatic and morphological analyses. *Biol Psychiatry*, 24: 199-217.
131. Makkar SR, Zhang SQ, Cranney J. (2010). Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology*, 35: 1625-1652.
132. Marais L, Stein DJ, Daniels WM. (2009). Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. *Metab Brain Dis*, 24: 587-597.
133. Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Broom L, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. (2009). Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 110: 966-975.
134. Marmigere F, Givalois L, Rage F, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. (2003). Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus*, 13: 646-655.
135. Martorana A, Esposito Z, Koch G. (2010). Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease? *CNS Neurosci Ther*, 16: 235-245.
136. Matsuoka Y, et al. (2001). Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 158: 1345-1354.
137. Mazzi EA, Reams RR, Soliman KF. (2004). The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. *Brain Res*, 1004: 29-44.
138. McDonald HY, Wojtowicz JM. (2005). Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett*, 385: 70-75.
139. McEwen BS, Sapolsky RM. (1995). Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol*, 5: 205-216.
140. McGeer EG, McGeer PL. (1999). Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications. *Curr Pharm Des*, 5: 821-836.
141. McGeer PL, McGeer EG. (2004). Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1035: 104-116.
142. Meiri KF, Saffell JL, Walsh FS, Doherty P. (1998). Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J Neurosci*, 18: 10429-10437.
143. Menzies FM, Moreau K, Rubinsztein DC. (2011). Protein misfolding disorders and macroautophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 23: 190-197.
144. Mesulam MM. (1999). Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. *Neuron*, 24: 521-529.
145. Mizuno M, Yamada K, Takei N, Tran MH, He J, Nakajima A, Nawa H, Nabeshima T. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. *Mol Psychiatry*, 8: 217-224.
146. Montgomery SA, Thal LJ, Amrein R. (2003). Meta-analysis of double blind randomized controlled clinical trials of acetyl-L-carnitine versus placebo in the

- treatment of mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Int Clin Psychopharmacol*, 18: 61-71.
147. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 28: 57-87.
 148. Morris GP, Clark IA, Zinn R, Vissel B. (2013). Microglia: A new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. *Neurobiology of Learning and Memory*, 105: 40-53.
 149. Mrak RE, Griffin WS. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging*, 26: 349-354.
 150. Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF. (1999). Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res*, 835: 259-265.
 151. Murray ME, et al. (2015). Clinicopathologic and 11C-Pittsburgh compound B implications of Thal amyloid phase across the Alzheimer's disease spectrum. *Brain*.
 152. Nagatsu T, Sawada M. (2006). Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines. *Cell Mol Neurobiol*, 26: 781-802.
 153. Nandra KS, Agius M. (2012). The differences between typical and atypical antipsychotics: the effects on neurogenesis. *Psychiatr Danub*, 24 Suppl 1: S95-99.
 154. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*, 26: 523-530.
 155. Nixon RA. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 19: 983-997.
 156. Nomura T, Yabe T, Rosenthal ES, Krzan M, Schwartz JP. (2000). PSA-NCAM distinguishes reactive astrocytes in 6-OHDA-lesioned substantia nigra from those in the striatal terminal fields. *J Neurosci Res*, 61: 588-596.
 157. Nooshinfar E, Akbarzadeh-Baghban A, Meisami E. (2011). Effects of increasing durations of immobilization stress on plasma corticosterone level, learning and memory and hippocampal BDNF gene expression in rats. *Neurosci Lett*, 500: 63-66.
 158. Nussinov R, Tsai CJ. (2012). The different ways through which specificity works in orthosteric and allosteric drugs. *Curr Pharm Des*, 18: 1311-1316.
 159. Nussinov R, Tsai CJ, Csermely P. (2011). Allo-network drugs: harnessing allostery in cellular networks. *Trends Pharmacol Sci*, 32: 686-693.
 160. Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jonsson B. (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol*, 19: 155-162.
 161. Origlia N, Kuczewski N, Pesavento E, Aztiria E, Domenici L. (2008). The role of cholinergic system in neuronal plasticity: focus on visual cortex and muscarinic receptors. *Arch Ital Biol*, 146: 165-188.
 162. Paris D, et al. (2011). Selective antihypertensive dihydropyridines lower Abeta accumulation by targeting both the production and the clearance of Abeta across the blood-brain barrier. *Mol Med*, 17: 149-162.
 163. Petrik D, Jiang Y, Birnbaum SG, Powell CM, Kim MS, Hsieh J, Eisch AJ. (2012). Functional and mechanistic exploration of an adult neurogenesis-promoting small molecule. *FASEB J*, 26: 3148-3162.
 164. Phillips W, Michell A, Pruess H, Barker RA. (2009). Animal models of neurodegenerative diseases. *Methods Mol Biol*, 549: 137-155.
 165. Pierson J, Svenningsson P, Caprioli RM, Andren PE. (2005). Increased levels of ubiquitin in the 6-OHDA-lesioned striatum of rats. *J Proteome Res*, 4: 223-226.

166. Pilato F, Profice P, Ranieri F, Capone F, Di Iorio R, Florio L, Di Lazzaro V. (2012). Synaptic plasticity in neurodegenerative diseases evaluated and modulated by in vivo neurophysiological techniques. *Mol Neurobiol*, 46: 563-571.
167. Pillai A, Dhandapani KM, Pillai BA, Terry AV, Jr., Mahadik SP. (2008). Erythropoietin prevents haloperidol treatment-induced neuronal apoptosis through regulation of BDNF. *Neuropsychopharmacology*, 33: 1942-1951.
168. Pinto YM, Paul M, Ganten D. (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*, 39: 77-88.
169. Poewe W, Antonini A, Zijlmans JC, Burkhard PR, Vingerhoets F. (2010). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. *Clin Interv Aging*, 5: 229-238.
170. Pupure, Fernandes MAS, Santos MS, Moreno AJM, Kalvinsh I, Klusa V, Oliveira CR. (2008a). Mitochondria as the target for mildronate's protective effects in azidothymidine (AZT)-induced toxicity of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biochemistry and Function*, 26: 620-631.
171. Pupure J, Isajevs S, Skapare E, Rumaks J, Svirskis S, Svirina D, Kalvinsh I, Klusa V. (2010). Neuroprotective properties of mildronate, a mitochondria-targeted small molecule. *Neurosci Lett*, 470: 100-105.
172. Pupure J, et al. (2008b). Distinct influence of atypical 1,4-dihydropyridine compounds in azidothymidine-induced neuro- and cardiotoxicity in mice ex vivo. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103: 401-406.
173. Ransohoff RM, Brown MA. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*, 122: 1164-1171.
174. Rappold PM, Tieu K. (2010). Astrocytes and Therapeutics for Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics*, 7: 413-423.
175. Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell W, Jr., Kaye J, Manczak M. (2005). Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis*, 7: 103-117; discussion 173-180.
176. Riedel G, Platt B, Micheau J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res*, 140: 1-47.
177. Rishton GM. (2008). Small molecules that promote neurogenesis in vitro. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 3: 200-208.
178. Ritz B, Rhodes SL, Qian L, Schernhammer E, Olsen JH, Friis S. (2010). L-type calcium channel blockers and Parkinson disease in Denmark. *Ann Neurol*, 67: 600-606.
179. Robinson OJ, Overstreet C, Charney DR, Vytal K, Grillon C. (2013). Stress increases aversive prediction error signal in the ventral striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 4129-4133.
180. Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Munoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem*, 103: 145-156.
181. Rosenberg PB, Mielke MM, Appleby BS, Oh ES, Geda YE, Lyketsos CG. (2013). The association of neuropsychiatric symptoms in MCI with incident dementia and Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*, 21: 685-695.
182. Rucins M, Kaldre D, Klimaviciusa L, Fernandes MAS, Vicente JAF, et al. (2014). Synthesis and studies of structure-activity relationships of novel 4-pyridinium and/or 1-propargyl substituted 1,4-dihydropyridine derivatives. *Comptes Rendus Chimie*, 17: 69-80.

183. Rumaks J, Pupure J, Svirskis S, Isajevs S, Duburs G, Kalvinsh I, Klusa V. (2012). Search for stroke-protecting agents in endothelin-1-induced ischemic stroke model in rats. *Medicina (Kaunas)*, 48: 525-531.
184. Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472: 466-470.
185. Sakata K, Duke SM. (2014). Lack of BDNF expression through promoter IV disturbs expression of monoamine genes in the frontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 260: 265-275.
186. Salloway S, et al. (2014). Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 370: 322-333.
187. Sansom SN, Griffiths DS, Faedo A, Kleinjan DJ, Ruan Y, Smith J, van Heyningen V, Rubenstein JL, Livesey FJ. (2009). The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet*, 5: e1000511.
188. Sarkar S, Ravikumar B, Floto RA, Rubinsztein DC. (2009). Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ*, 16: 46-56.
189. Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y. (2001). Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Commun*, 286: 292-297.
190. Sberna G, Saez-Valero J, Beyreuther K, Masters CL, Small DH. (1997). The amyloid beta-protein of Alzheimer's disease increases acetylcholinesterase expression by increasing intracellular calcium in embryonal carcinoma P19 cells. *J Neurochem*, 69: 1177-1184.
191. Schneider JW, Goetsch SC, Leng X, Ludwig SM, Russell JL, Yang CP, Zhang QJ. (2012). Coupling hippocampal neurogenesis to brain pH through proneurogenic small molecules that regulate proton sensing G protein-coupled receptors. *ACS Chem Neurosci*, 3: 557-568.
192. Schroder N, de Lima MN, Quevedo J, Dal Pizzol F, Roesler R. (2005). Impairing effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on recognition memory: possible relation to oxidative stress. *Schizophr Res*, 73: 377-378.
193. Shimshek DR, Mueller M, Wiessner C, Schweizer T, van der Putten PH. (2010). The HSP70 molecular chaperone is not beneficial in a mouse model of alpha-synucleinopathy. *PLoS One*, 5: e10014.
194. Shioda N, Yamamoto Y, Han F, Moriguchi S, Fukunaga K. (2011). [Neurochemical mechanisms of a novel Alzheimer's disease therapeutics on improvement of cognition and depressive behavior]. *Yakugaku Zasshi*, 131: 505-511.
195. Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV, Khagi KB, Mezapuke RJ, Molodchina TN, Kalvins IJ, Lukevics E. (1988). 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol*, 37: 195-202.
196. Simon KC, Gao X, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. (2010). Calcium channel blocker use and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 25: 1818-1822.
197. Singh S, Das T, Ravindran A, Chaturvedi RK, Shukla Y, Agarwal AK, Dikshit M. (2005). Involvement of nitric oxide in neurodegeneration: a study on the experimental models of Parkinson's disease. *Redox Rep*, 10: 103-109.
198. Sinnegger-Brauns MJ, Huber IG, Koschak A, Wild C, Obermair GJ, Einzinger U, Hoda JC, Sartori SB, Striessnig J. (2009). Expression and 1,4-dihydropyridine-binding properties of brain L-type calcium channel isoforms. *Mol Pharmacol*, 75: 407-414.

199. Sjakste N, Gutcaits A, Kalvinsh I. (2005). Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications. *CNS Drug Rev*, 11: 151-168.
200. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. (1995). Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann NY Acad Sci*, 771: 234-239.
201. Spagnoli A, et al. (1991). Long-term acetyl-L-carnitine treatment in Alzheimer's disease. *Neurology*, 41: 1726-1732.
202. Standridge JB. (2004). Pharmacotherapeutic approaches to the prevention of Alzheimer's disease. *Am J Geriatr Pharmacother*, 2: 119-132.
203. Stoenica L, Senkov O, Gerardy-Schahn R, Weinhold B, Schachner M, Dityatev A. (2006). In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid. *Eur J Neurosci*, 23: 2255-2264.
204. Sutanto W, de Kloet ER. (1994). The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena. *Lab Anim*, 28: 293-306.
205. Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. (2006). Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci*, 24: 645-653.
206. Svalbe B, Zvejniece L, Vavers E, Pugovics O, Muceniece R, Liepinsh E, Dambrova M. (2011). Mildronate treatment improves functional recovery following middle cerebral artery occlusion in rats. *Behav Brain Res*, 222: 26-32.
207. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. (2010). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2: S265-279.
208. Szanto K, Dombrovski AY, Sahakian BJ, Mulsant BH, Houck PR, Reynolds CF, 3rd, Clark L. (2012). Social emotion recognition, social functioning, and attempted suicide in late-life depression. *Am J Geriatr Psychiatry*, 20: 257-265.
209. Teixeira MD, Souza CM, Menezes AP, Carmo MR, Fonteles AA, Gurgel JP, Lima FA, Viana GS, Andrade GM. (2013). Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 110: 1-7.
210. Terry, Gearhart DA, Warner S, Hohnadel EJ, Middlemore ML, Zhang G, Bartlett MG, Mahadik SP. (2007a). Protracted effects of chronic oral haloperidol and risperidone on nerve growth factor, cholinergic neurons, and spatial reference learning in rats. *Neuroscience*, 150: 413-424.
211. Terry, Gearhart DA, Warner SE, Zhang G, Bartlett MG, Middlemore ML, Beck WD, Jr., Mahadik SP, Waller JL. (2007b). Oral haloperidol or risperidone treatment in rats: temporal effects on nerve growth factor receptors, cholinergic neurons, and memory performance. *Neuroscience*, 146: 1316-1332.
212. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30: 572-580.
213. Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. (2000). Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res*, 873: 225-234.
214. Triggle DJ. (2003). 1,4-Dihydropyridines as calcium channel ligands and privileged structures. *Cell Mol Neurobiol*, 23: 293-303.
215. Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, Sekimoto M, Tone S, Senba E. (1997). Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci Res*, 28: 103-110.
216. Ulrich J, Meier-Ruge W, Probst A, Meier E, Ipsen S. (1990). Senile plaques: staining for acetylcholinesterase and A4 protein: a comparative study in the hippocampus and entorhinal cortex. *Acta Neuropathol*, 80: 624-628.

217. Valvassori SS, Stertz L, Andrezza AC, Rosa MI, Kapczinski F, Streck EL, Quevedo J. (2008). Lack of effect of antipsychotics on BDNF and NGF levels in hippocampus of Wistar rats. *Metab Brain Dis*, 23: 213-219.
218. van Groen T, Kadish I. (2005). Transgenic AD model mice, effects of potential anti-AD treatments on inflammation and pathology. *Brain Res Brain Res Rev*, 48: 370-378.
219. van Groen T, Miettinen P, Kadish I. (2011). Transgenic AD model mice, effects of potential anti-AD treatments on inflammation, and pathology. *J Alzheimers Dis*, 24: 301-313.
220. Verkhratsky A, Rodriguez JJ, Parpura V. (2013). Astroglia in neurological diseases. *Future Neurol*, 8: 149-158.
221. Voutilainen MH, Back S, Peranen J, Lindholm P, Raasmaja A, Mannisto PT, Saarma M, Tuominen RK. (2011). Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 228: 99-108.
222. Wagner KV, Hausl AS, Pohlmann ML, Hartmann J, Labermaier C, Muller MB, Schmidt MV. (2014). Hippocampal Homer1 levels influence motivational behavior in an operant conditioning task. *PLoS One*, 9: e85975.
223. Wang H, Hu Y, Tsien JZ. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol*, 79: 123-135.
224. Wang XD, et al. (2013). Nectin-3 links CRHR1 signaling to stress-induced memory deficits and spine loss. *Nat Neurosci*, 16: 706-713.
225. West MJ. (1993). Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging*, 14: 287-293.
226. Wimo A, Jonsson L, Bond J, Prince M, Winblad B. (2013). The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimers Dement*, 9: 1-11 e13.
227. Wisniewski T, Frangione B. (1992). Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*, 135: 235-238.
228. Wittchen HU, et al. (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, 21: 655-679.
229. Wood GE, Norris EH, Waters E, Stoldt JT, McEwen BS. (2008). Chronic immobilization stress alters aspects of emotionality and associative learning in the rat. *Behav Neurosci*, 122: 282-292.
230. Wootten D, Christopoulos A, Sexton PM. (2013). Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 12: 630-644.
231. Wu YN, Johnson SW. (2011). Dopamine oxidation facilitates rotenone-dependent potentiation of N-methyl-D-aspartate currents in rat substantia nigra dopamine neurons. *Neuroscience*, 195: 138-144.
232. Xue D, Zhao M, Wang YJ, Wang L, Yang Y, Wang SW, Zhang R, Zhao Y, Liu RT. (2012). A multifunctional peptide rescues memory deficits in Alzheimer's disease transgenic mice by inhibiting A β 24-induced cytotoxicity and increasing microglial phagocytosis. *Neurobiol Dis*, 46: 701-709.
233. Yano R, Yokoyama H, Kuroiwa H, Kato H, Araki T. (2009). A novel anti-Parkinsonian agent, zonisamide, attenuates MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Mol Neurosci*, 39: 211-219.
234. Yao ZX, Papadopoulos V. (2002). Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J*, 16: 1677-1679.
235. Yasuda T, Mochizuki H. (2010). Use of growth factors for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*, 10: 915-924.

236. Yoon CW, Kim YE, Seo SW, Ki CS, Choi SH, Kim JW, Na DL. (2015). NOTCH3 variants in patients with subcortical vascular cognitive impairment: a comparison with typical CADASIL patients. *Neurobiol Aging*.
237. Yuen EY, Wei J, Liu W, Zhong P, Li X, Yan Z. (2012). Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron*, 73: 962-977.
238. Yuen EY, Liu W, Karatsoreos IN, Ren Y, Feng J, McEwen BS, Yan Z. (2011). Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Mol Psychiatry*, 16: 156-170.
239. Zaitone SA, Abo-Elmatty DM, Shaalan AA. (2012). Acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid affect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain, implication for Parkinson's disease therapy. *Pharmacol Biochem Behav*, 100: 347-360.
240. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ. (1999). Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol*, 154: 1423-1429.