

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS BAKALĀURA STUDIJU PROGRAMMA

**DIAZEPAMA DIVU DEVU (0,05 UN 1 MG/KG) IETEKME UZ
NEIROIEKAISUMU UN GABA SINTĒZI STREPTOZOCĪNA
IZRAISĪTĀ ALCHEIMERA SLIMĪBAS ŽURKU MODELĪ**

BAKALĀURA DARBS

Autors: Jeļizaveta Krasilnikova

Studenta apl. Nr.: jk12238

Darba vadītājs: Mg. pharm. Karīna Narbutė

RĪGA 2018

Anotācija

Alcheimera slimība ir viena no biežākām neurodeģeratīvām slimībām mūsdienu sabiedrībā, kuras slimnieku skaits katru gadu pieaug. Šobrīd pieejamā terapija ir vērsta tikai uz simptomu mazināšanu, kad slimība jau ir skārusi slimnieka smadzenes, izraisot neuroiekaisumu un demenci. Balstoties uz iepriekšējiem pētījumiem par GABA agonistu neiroprotektīvām īpašībām, šajā pētījumā tika aplūkota GABA_A receptora agonista, benzodiazepīnu klases zāļu vielas diazepama divu devu ietekme uz neuroiekaisumu un GABA sintēzi toksīna streptozocīna (STZ) izraisītā Alcheimera slimības žurku modelī.

Darba mērķis bija noteikt diazepama mazās (0,05 mg/kg) un vidējās (1 mg/kg) devas iedarbību uz neuroiekaisumu, izmantojot marķieri: astroglijas specifisku marķieri (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) un GABA sintēzi, izmantojot GABA sintēzes specifisku marķieri (glutamātdekarboksilāze 67, GAD67) hipokampa un garozas reģionā STZ izraisītā Alcheimera slimības žurku modelī.

Divas nedēļas pēc toksīna vai mākslīgā cerebrospinalā šķidrums icv ievadīšanas pieaugušiem dzīvniekiem tika veikti uzvedības testi, lai pārbaudītu atmiņu, iemācīšanas spējas un uzvedību. Vēlāk tika ievāktas dzīvnieku smadzenes un, pielietojot imūnhistoķīmijas analīzi, tika pētītas konkrēto marķieru ekspresijas izmaiņas noteiktos smadzeņu apgabalos.

Pētījuma rezultātā tika noskaidrots, ka STZ spēj izraisīt AS līdzīgus patofizioloģiskus procesus. Diazepama abas devas spēj samazināt GFAP ekspresiju garozā un hipokampā, tādā veidā novēršot astrocītu hiperaktivāciju un neuroiekaisumu, kā arī palielināt GAD67 ekspresiju tajās pašās smadzeņu struktūrās, tādā veidā veicinot GABA sintēzi un normalizējot GABAergiskās sistēmas neurotransmisiju. Kopumā var spriest par diazepama spēju mazā un vidējā devā mazināt toksīna STZ izraisīto neuroiekaisumu un GABAergiskās sistēmas disbalansu AS žurku modelī.

Atslēgas vārdi: Alcheimera slimība; demence; neuroiekaisums; astroglija; GABA; diazepams.

Abstract

Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative diseases in today's society, with an increasing number of patients every year. Currently available therapy is aimed only at reducing symptoms, when the disease has already affected the patient's brain, causing neuroinflammation and dementia. Based on previous studies of neuroprotective properties of GABA agonists, this study examined the effects of two doses of GABA_A agonist, benzodiazepine class drug diazepam on neuroinflammation and GABA synthesis in toxin streptozocin (STZ)-induced Alzheimer's disease rat model.

The aim of the BA thesis was to determine the effect of diazepam in low (0,05 mg/kg) and moderate (1 mg/kg) doses on the neuroinflammation-specific-biomarker: astroglial (glial fibrillary acidic protein, GFAP) and GABA synthesis (glutamate decarboxylase 67, GAD67) in the hippocampus and cortex in STZ-induced Alzheimer's disease rat model.

Two weeks after administration of toxin or artificial cerebrospinal fluid icv, adult animals were involved in behavioral tests to examine memory, learning ability and behavior. Subsequently, the animal brain was collected and, using an immunohistochemistry assay, the expression of biomarkers in various brain regions was studied.

The study's results showed that STZ can cause pathophysiological processes similar to AD. Both diazepam doses are able to reduce GFAP expression in cortex and hippocampus, thus reducing astrocytes hyperactivation and neuroinflammation, and also increase GAD67 expression in the same brain regions, thus promoting GABA synthesis and normalizing GABAergic system neurotransmission. Overall, we can conclude that both low and moderate diazepam doses are able to reduce STZ-induced neuroinflammation and GABAergic system disbalance in AD rat model.

Key words: Alzheimer's disease; dementia; neuroinflammation; astroglia; GABA; diazepam.

Saturs

Apzīmējumu saraksts	5
Ievads	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Alzheimer slimība	9
1.2. Alzheimer slimības patoģenēze	10
1.2.1. Amiloīda beta teorija un hiperfosforilēts tau proteīns	10
1.2.2. Holīnērgiskā hipotēze	13
1.2.3. Citi Alzheimer slimības attīstību ietekmējošie faktori	14
1.3. Neuroiekaisums	17
1.3.1. Mikroglijas aktivācija	17
1.3.2. Astroglijas aktivācija	18
1.4. GABAērgiskā sistēma un tās loma Alzheimer slimības patoģenēzē	23
1.5. Streptozocīna neuroiekaisuma modelis	27
2. MATERIĀLI UN METODES	29
2.1. Dzīvnieki	29
2.2. Vielas	29
2.3. Antivielas	29
2.4. Eksperimenta dizains	30
2.5. Paraugu sagatavošana	30
2.6. Antivielu imūnhistoķīmiskā analīze	30
2.7. Mikroskopēšana un attēlu uzņemšana	31
2.8. Statistiskā analīze	31
3. REZULTĀTI	32
3.1. Diazepama devu ietekme uz GFAP blīvumu garozā un hipokampā	32
3.2. Diazepama devu ietekme uz GAD67 blīvumu garozā un hipokampā	35
4. DISKUSIJA	37
5. SECINĀJUMI	39
Pateicības	40
Literatūras saraksts	41

Apzīmējumu saraksts

Ach – acetilholīns
AchE - acetilholīnesterāze
AchEi – acetilholīnesterāzes inhibitori
aCSF – mākslīgais cerebrospīnālais šķidrums (*artificial cerebrospinal fluid*)
APOE – apolipoproteīns E
APP – amiloīda prekursora proteīns (*amyloid precursor protein*)
A β – amiloīds beta
BACE1 – β -sekretāze (*β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*)
BDNF – smadzeņu neirotrofiskais faktors (*brain-derived neurotrophic factor*)
BZD – benzodiazepīni
ChAT – holīnacetiltransferāze (*choline acetyltransferase*)
CNS- centrālā nervu sistēma
CSF – cerebrospīnālais šķidrums (*cerebrospinal fluid*)
EAE - eksperimentālais autoimūnais encefalomiēlīts
GABA – gamma-aminosviestskābe (*gamma-aminobutyric acid*)
GAD - glutamātdēkarboksilāze
GFAP - gliālais fibrilārais skābais proteīns (*glial fibrillary acidic protein*)
GLUT2 - glikozes transportieris 2 (*glucose transporter type 2*)
H₂O₂ – ūdeņraža peroksīds
HEB – hematoencefāliskā barjera
icv – intracerebroventrikulāri
IF – starppavedieni (*intermediate filaments*)
IFN γ – interferons gamma
ip – intraperitoneāli
IRS – insulīna receptoru substrāts
JNK – c-Jun N-termināla kināze
LPS – lipopolisaharīds
NFT – neirofibrilārie mezgli (*neurofibrillary tangles*)
NMDA – N-metil-D-aspartāts
OS – oksidatīvais stress
PNS – perifērā nervu sistēma
ROS – reaktīvie skābekļa savienojumi (*reactive oxygen species*)
STZ - streptozocīns

T2DM – 2.tipa cukura diabēts (*type 2 diabetes mellitus*)

TNF- α – audzēja nekrozes faktors alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

τ – tau proteīns

Ievads

Mūsdienās Alcheimera slimība ir kļuvusi par vienu no lielākajām ar veselību saistītām problēmām pacientu vidū pēc 65 gadiem. Kā viens no pirmajiem simptomiem ir epizodiska atmiņas pasliktināšanās, vēlāk novēro kognitīvo funkciju pavājināšanos, kas pamatīgi ietekmē pacientu dzīves kvalitāti. Ir zināms, ka svarīga loma Alcheimera slimības patoģenēzē ir amiloīda beta peptīdam un hiperfosforilētā tau proteīna intracelulārajiem agregātiem, neurotransmiteru sistēmu disbalansam, neuroiekaisumam, oksidatīvajam stresam un citām orgānu sistēmu saslimšanām. Neuroiekaisumā visvairāk ir iesaistītas glijas šūnas, kas dažādu stimulu iedarbībā tiek aktivētas un izdala proteīnus (GFAP, Iba1, S100B u.c.). Neurotransmiteru sistēmas, proti, holīnērgiskā, dopamīnērgiskā un GABAērgiskā sistēma, arī ir plaši iesaistītas Alcheimera slimības attīstības gaitā.

Vēl aizvien nav atrasta efektīva terapija, kas būtu vērsta uz Alcheimera slimības preventēšanu, nevis tikai simptomu uzlabošanu vēlākās stadijās, tāpēc vairākos pētījumos tiek meklētas iedarbīgas zāļu vielas, kas varētu ne tikai uzlabot pacienta dzīves kvalitāti pie jau esošas neurodeģenerācijas, bet arī preventēt to un kavēt tās attīstību. Līdz šim ir izpētīts, ka GABA_A agonistiem piemīt neiroprotektīvas īpašības - tie spēj uzlabot kognitīvās funkcijas, kā arī samazināt neuroiekaisumu Alcheimera slimības dzīvnieku modeļos [Lee et al., 2005; Marcade et al., 2008; Drott et al., 2010; Pilipenko et al., 2018]. Balstoties uz iepriekšējiem pētījumiem, radās interese izpētīt klasiskā GABA_A agonista, benzodiazepīna diazepama, ietekmi uz neuroiekaisumu un GABAērgiskās sistēmas aktivitāti Alcheimera slimības žurku modelī.

Darba mērķis:

Noteikt diazepama mazas (0,05 mg/kg) un vidējas (1 mg/kg) devas ietekmi uz iekaisuma marķieri: astroglija (*glial fibrillary acid protein*, GFAP) un gamma-aminosviestskābes sintēzi (glutamātdekarboksilāze 67, GAD67) toksīna streptozocīna izraisītā Alcheimera slimības žurku modelī.

Izvirzītie darba uzdevumi mērķa sasniegšanai:

1. Apkopot un aprakstīt jaunāko literatūru par Alcheimera slimību un tās patoģenēzi, iesaistītajām neurotransmiteru sistēmām, neuroiekaisumu, tā marķieriem un streptozocīna neuroiekaisuma modeli.
2. Izmanojot imūnhistoķīmijas analīzi, noteikt sekojošu biomarķieru ekspresiju žurku smadzeņu garozā un hipokampā:

- a) astrocītu (gliālais fibrillārais skābais proteīns, GFAP);
 - b) GABA sintēzes enzīma (glutamātdekarboksilāze 67, GAD67);
3. Analizēt iegūtos datus attēlapstrādes programmā *Image J*;
 4. Veikt statistiko analīzi iegūtajiem rezultātiem;
 5. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, izdarīt secinājumus.

Darbs tika izstrādāts Latvijas Universitātes Dabaszinātņu akadēmiskajā centrā (Jelgavas iela 1, Rīga) Farmakoloģijas katedras laboratorijā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Alcheimera slimība

21. gadsimtā Alcheimera slimība (AS) ir viens no galvenajiem demences cēloņiem cilvēkiem pēc 65 gadu vecuma. 2015. gadā gandrīz 44 miljoniem cilvēku bija novērota AS demence [Van Cauwenberghe, 2016]. 10 % no cilvēku populācijas virs 65 gadiem slimo ar AS [Alzheimer's Association, 2017]. Slimības izplatība palielinās divas reizes katrus piecus gadus iedzīvotāju grupā virs 65 gadiem. Uz doto brīdi AS ir sestais biežākais nāves cēlonis ASV pat pirms krūts un prostatas vēža. Pārsvarā saslimšanas gadījumi ir sporādiski, kur vecums ir galvenais ar ģenētiku nesaistītais riska faktors, taču AS nav tikai ar vecumu saistīta diagnoze. Apmēram 200 000 Amerikas iedzīvotājiem, kas jaunāki par 65 gadiem, novēro AS simptomus, kas nozīme, ka ir vairāki faktori, kas var ietekmēt slimības attīstību [Kumar and Singh, 2015]. Dzīvesstils, anamnēze un dzimums arī ir svarīgi AS riska faktori. Ir zināms, ka sievietes ir vairāk pakļautas AS attīstības riskam [Biasibetti et al., 2017]. Pēc Alcheimera Asociācijas datiem un prognozēm slimnieku skaits līdz 2050. gadam varētu sasniegt 16 miljonus. Mūsdienās tā ir liela ar veselības aprūpi saistīta problēma.

Latvijā Garīgās veselības valsts aģentūrā 2005. gadā bija reģistrēti apmēram 4 000 iedzīvotāji ar demenci. Patiesībā pacientu skaits varētu būt daudz lielāks, jo bieži geriatriskiem pacientiem netiek veikti vajadzīgie izmeklējumi un atmiņas pavājināšanās un garīgās aktivitātes pasliktināšanās netiek dokumentēta, tāpēc nav pieejama pilna uzskaitē par demences pacientiem.

Demences simptomi pie AS attīstās pakāpeniski. Pie pirmajām slimības izpausmēm var pieskaitīt epizodisku atmiņas zudumu. Cilvēki mēdz aizmirst notikumus vai nesen iegūto informāciju - tas var izpausties kā datumu un skaitļu aizmirstāšana. Cilvēkiem novēro grūtības ikdienas problēmu risināšanā, darba organizēšanā un plānošanā, paliek sarežģītāk koncentrēties uz konkrētām lietām. Slimnieki ne tik labi spēj orientēties laikā un telpā, nespēj momentāni reaģēt uz vides kairinātājiem, ikdienas nodarbības sagādā grūtības. AS attīstoties, parādās rakstīšanas un runāšanas problēmas, kļūst grūti identificēt lietas. Cilvēki nespēj pieņemt adekvātus lēmumus, novērtēt situāciju. Notiek izmaiņas gan raksturā, gan uzvedībā. Cilvēki cenšas izvairīties no sabiedrības, noslēdzas sevī [Mayeux, 2010].

Visi iepriekšminēti simptomi ir saistīti ar izmaiņām smadzenēs, proti, noteiktos smadzeņu apgabalos. 20. gadsimta 70. gados vācu zinātnieki atrada un pierādīja sakarību starp demencei raksturīgām kognitīvām izmaiņām un morfoloģiskiem pārveidojumiem dažādos smadzeņu

reģionos. Tika izpētīts un uzsverts tas, ka AS gadījumā smadzeņu tilpums var samazināties līdz pat 13-18 %. Būtiskākās izmaiņas tiek novērotas hipokampā, kur neironu skaits var samazināties pat uz pusi. Hipokamps kā daļa no limbiskās sistēmas ir atbildīgs par mācīšanās spējām un atmiņas (īslaicīgas un ilgstošas) nodrošināšanu, kā arī ir iesaistīts telpiskās atmiņas veidošanā [Postle, 2016], tāpēc neironu skaita samazināšanās šajā smadzeņu struktūrā var sekmēt atmiņas pasliktināšanos. *Nucleus basalis*, kas ir ar acetilholīnu (Ach) un Ach sintēzes enzīma holīnacetiltransferāzi (ChAT) bagāts reģions, arī novēro neironu zudumu tāpat kā hipokampā, tāpēc rezultātā var rasties holīnērgiskās sistēmas disbalanss. Kopējais sinapšu skaits var samazināties par 45 – 55 %. Tomēr svarīgi zināt, ka arī dabiskā novecošanās procesā novēro smadzeņu baltās un pelēkās vielas, neironu un sinapšu zudumu [Schliebs and Arendt, 2011]. Veicot magnētiskās rezonanses izmeklējumus, ir iespēja iegūt pēc iespējas pilnīgāku ainu par procesiem, kas notiek smadzenēs un konstatēt vairāku struktūru morfoloģiskās izmaiņas, kas varētu norādīt uz demenci.

1.2. Alcheimera slimības patoģenēze

Eksistē vairākas teorijas par to, kāpēc slimība veidojas un progresē, tomēr īstais cēlonis joprojām nav skaidrs. No histopatoloģijas skatupunkta AS attīstība ir saistīta ar vairākām izmaiņām: ekstracelulāro amiloīda beta ($A\beta$) plākšņu akumulāciju, intracelulārajiem neurofibrilārajiem tau proteīna (τ) sakopojumiem jeb mezgliem (*neurofibrillary tangles*, NFT), neironu zudumu, sinaptisko deģenerāciju, kā arī oksidatīvo stresu (OS), mitohondriju strukturālām un funkcionālām izmaiņām, iekaisumu, hormonālo disbalansu un šūnas cikla izmaiņām. Pārmaiņas pārsvarā notiek neogarozā, hipokampā un citos zemgarozas apgabalos, kas ir atbildīgi par augstākajām nervu funkcijām, un parasti parādās vairākus gadus pirms klīniskām izpausmēm [Kandimalla and Reddy, 2017].

1.2.1. Amiloīda beta teorija un hiperfosforilēts tau proteīns

$A\beta$ deponēšanās smadzeņu audos viennozīmīgi ir riska faktors agrīnai AS attīstībai [Findeis, 2017]. Neskatoties uz to, ka $A\beta$ tiek producēts arī veselu cilvēku smadzenēs, noteiktos apstākļos šī molekula var sākt uzkrāties un izmainīt smadzeņu struktūras. Balstoties uz amiloīdo hipotēzi, $A\beta$ produkcija smadzenēs iniciē procesu kaskādi, kas noved pie AS demences [Golde, 2005].

$A\beta_{40}$ un $A\beta_{42}$ ir nozīmīgākās izoformas, kuras parasti tiek minētas kontekstā ar $A\beta$. $A\beta_{40}$ ir peptīds, kam nav raksturīgas patoģēnas īpašības, un tas pārsvarā tiek atrasts cerebrālos

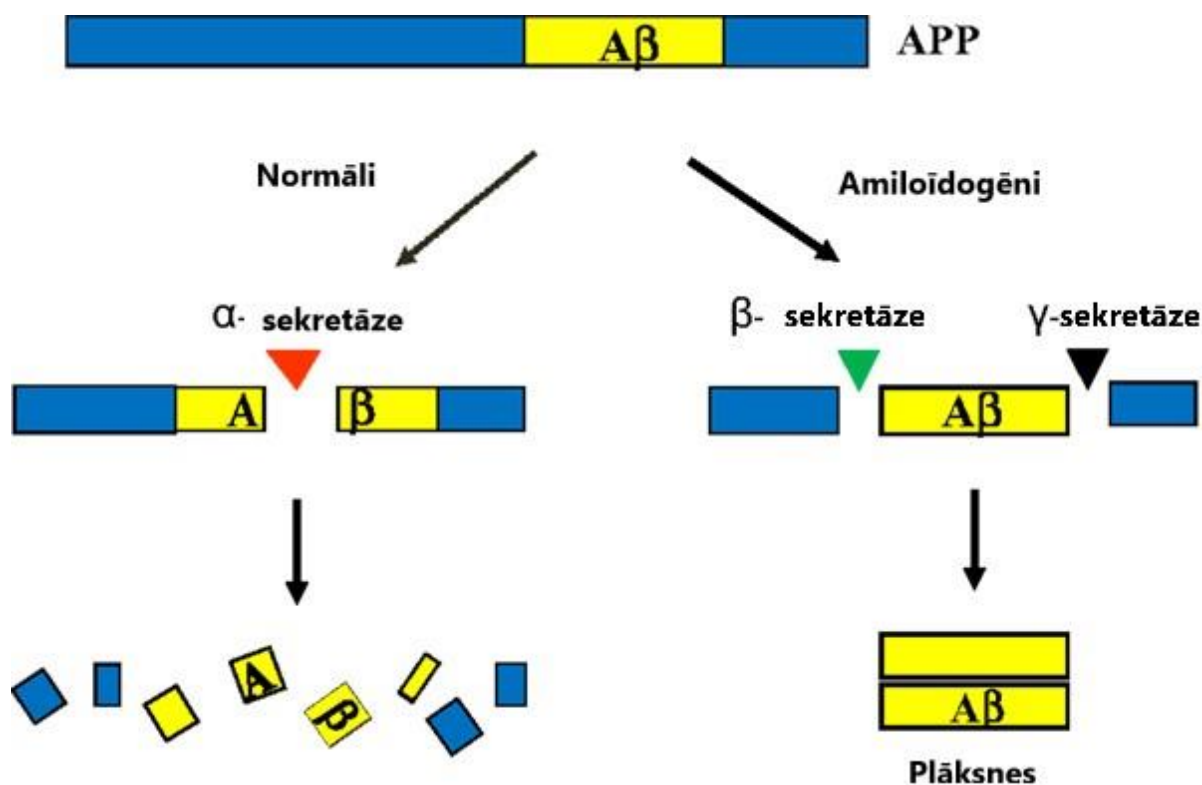
asinsvados kā daļa no cerebrālās amiloīda angiopātijas. Savukārt A β 42 ir šķīstošs peptīds, un tam piemīt īpašība apkopoties fibrillās, kas kļūst par galveno amiloīdo plākšņu sastāvdaļu. Tā ir dominējošā forma, kura ir atrasta AS slimnieku smadzeņu parenhīmā. A β piemīt tendence veidot oligomēru sakopojumus, kam piemīt neirotoksicitāte un kas uzsāk amiloīdo kaskādi. Pie kaskādes pazīmēm pieskaita vietējo iekaisumu, oksidēšanos, ekscitoksicitāti (šūnu bojājumu vai nāvi, ko izraisa pārmērīgs glutamāta vai līdzīgu substanču daudzums) un τ hiperfosforilēšanos, kas rezultējas ar τ salocīšanos intraneironiskajos mazgļos (*intraneuronic tangles*) un nervu šūnu nāvi. Progresīvā neironu iznīcināšana noved pie dažādu neurotransmiteru (Ach, dopamīna, serotonīna) deficīta un disbalansa, kā arī pie kognitīvās disfunkcijas, kuras novēro AS gadījumā [Cummings, 2008].

τ proteīns jeb mikrotubuļu asociētais proteīns tau ir zināms kā mikrotubuļus stabilizējošs proteīns. Tā gēna alternatīvais splaisings nodrošina 6 proteīna izoformu veidošanos organismā. τ proteīns ir plaši sastopams centrālās nervu sistēmas (CNS) neironos, tomēr diezgan vāji ekspresējas astrocītos un oligodendrocītos. Dažādos patoloģiskos stāvokļos proteīns spēj apkopoties nešķīstošos sakopojumos, tādā veidā pārstājot stabilizēt mikrotubuļus, kā arī izraisot sinaptisko disfunkciju un šūnu bojāeju [Guo et al., 2017].

Neskatoties uz to, ka A β tiek novērots lielā daudzumā pie patoloģiskiem stāvokļiem, mazos daudzumos tas ir atrodams arī veselu cilvēku smadzenēs, īpaši sinaptiskās aktivitātes laikā. Ilgu laiku amiloīda prekursora proteīna (*amyloid precursor protein, APP*) un A β loma organismā nebija skaidra, lielākoties tādēļ, ka A β bija APP katabolisma nejaušs blakusprodukts, kam nebija noteiktas fizioloģiskas lomas. APP ir integrālais membrānas proteīns, kas ir izplatīts gandrīz visos audos. Ir zināms, ka APP ir iesaistīts smadzeņu neiroloģisko ceļu attīstībā, ir nepieciešams neironu augšanai, tas piedalās arī sinaptoģenēzē un šūnu adhēzijā. Augstās koncentrācijās (no nanomoliem līdz makromoliem) A β ir neirotoksisks un izraisa šūnu nāvi, savukārt zemās koncentrācijās (pikomolos) tas varētu darboties kā trofiskais signāls un sinaptiskās aktivitātes modulātors, kas spēj ietekmēt atmiņu un mācīšanas spējas. Nelieli A β daudzumi var veikt antioksidanta funkcijas, pateicoties tā spējai piesaistīt oksidēšanās-reducēšanās metālus (Cu, Fe, Zn u.c.) un tādējādi novērst to iesaistīšanos oksidēšanās-reducēšanās ciklā kopā ar citiem ligandiem [Cárdenas-Aguayo et al., 2014].

Organismā A β veidojas no A β prekursora - APP. APP sastāv no 695-770 aminoskābju atlikumiem. APP proteolīzi, kuras rezultātā var veidoties A β , secīgi veic β -sekretāze jeb BACE1 (*β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*) un γ -sekretāze [Wilquet and De Strooper, 2004]. β -sekretāze nogriež APP pie plazmas membrānas iekšpusē. γ -sekretāze nogriež APP tranmembrānas rajonā ar plašu pārtraukšanas vietas daudzveidību, kā rezultātā rodas vairāki peptīdi ar ķēdes garumu 30-51 aminoskābes [Olsson et al., 2014]. Peptīdi spēj

nokļūt asins plazmā, cerebrospinālajā šķidrumsā (*cerebrospinal fluid*, CSF) un citos starpšūnu šķidrumsos. To nozīme organismā joprojām nav pilnībā izskaidrota. Ir zināms, ka enzīmi endopeptidāzes spēj šķelt A β . Smadzenēs svarīga loma A β līdzsvara uzturēšanā ir neprilisīnam – Zn-atkarīgai metāloendopeptidāzei, kas atbild par A β peptīdu klīrensu. Vecumā neprilisīna līmenis samazinās, kā rezultātā samazinās A β klīrenss un paaugstinās AS progresēšanas risks [Liu et al., 2010].



1. att. A β plākšņu veidošanās no APP

Normāli, neamiloīdogeni, APP tiek sašķelts ar α -sekretāzi un tālāk tiek degradēts. APP sašķelšana ar β -sekretāzi un γ -sekretāzi rezultējas ar A β peptīda atbrīvošanos, kas deponējas kā amiloīda plāksnes [Chen, 2015].

Ņemot vērā A β teoriju, tika pētītas jaunas ārstēšanas iespējas AS slimniekiem, kas būtu merķētas uz A β agregācijas inhibēšanu un A β plākšņu šķīdināšanu. Solanezumabs (LY2062430, *Eli Lilly and Company*) – monoklonālā anti viela, kas tika pētīta kā neiroprotektīvā zāļu viela pie AS. Salanezumabs saistās ar A β vidusdaļu un palielina monomēru klīrensu. Potenciālā zāļu viela izgāja 3 klīnisko pētījumu fāzes, tomēr 3. fāzē, neraugoties uz lielām cerībām par tās efektivitāti, solanezumabs neuzrādīja nekādus pozitīvos efektus un tālākie pētījumi tika apstādināti [van Dyck, 2018].

1.2.2. Holīnērgiskā hipotēze

Par vecāko AS patoģenēzes teoriju tiek uzskatīta holīnērgiskā hipotēze. Ach – organiskā ķīmiskā viela smadzenēs un ķermenī, ko izdala nervu šūnas kā signālu citām šūnām. Ach ir svarīgas funkcijas gan CNS, gan perifērajā nervu sistēmā (PNS). Smadzenēs Ach ir neurotransmitera un neiromodulātorā loma. CNS holīnērgisko signālu pārvade no bazālajām priekšsmadzenēm uz cerebrālo garozu un hipokampu nodrošina kognitīvās funkcijas šajos apgabalos, kā arī piedalās pamošanās, uzmanības, atmiņas un motivācijas veidošanas procesā. PNS Ach aktivē muskuļus un ir viens no galvenajiem neurotransmiteriem autonomajā nervu sistēmā. Ir zināms, ka Ach regulē ne tikai kognitīvās funkcijas un muskuļu saraušanos, bet arī iekaisumu. Neurotransmitera nomākšana rezultējas kā iekaisuma palielināšanās. Antiholīnērgiskā aktivitāte vēlāk izpaužas kā endogēnā citokīnu produkcija un Ach samazināšanās sinapsēs [Konishi et al., 2015].

AS pacientu smadzeņu sistemātiskie bioķīmiskie izmeklējumi norāda uz ChAT un Ach aktivitātes samazināšanos cerebrālajā garozā, salīdzinot ar veselu indivīdu smadzenēm. Demence AS gadījumā ir saistīta ar holīnērgisko neironu deģenerāciju un Ach samazināšanos cerebrālajā garozā un citos smadzeņu reģionos [H Ferreira-Vieira et al., 2016].

Balstoties uz šo teoriju, vairākas terapeitiskās stratēģijas tika izstrādātas un pielietotas, lai uzlabotu holīnērgisko neurotransmisiju [Barage and Sonawane, 2015]. Klīniskie ieguvumi no šobrīd pieejamās AS farmakoloģiskās ārstēšanas ar pret demences zālēm, proti, Ach šķeļoša enzīma acetilholīnesterāzes inhibitoriem (AchEi) un N-metil-D-aspartāta (NMDA) receptoru antagonistu memantīnu, ir neapšaubāmi, lai gan tie attiecas tikai uz pagaidu kognitīvo un citu simptomu mazināšanu. Tāpēc pēdējo desmit gadu laikā tiek atbalstīti un finansēti pētījumi, lai meklētu un attīstītu jaunus farmaceitiskos līdzekļus ar slimību modificējošām īpašībām [Arahamian et al., 2013].

Kā zāļu vielas pret AS tika plaši pētīti AchEi, holīna prekursori un presinaptiskā/postsinaptiskā stimulēšana ar muskarīna un nikotīna receptoru agonistiem. Tomēr klīnisko pētījumu rezultāti parādīja, ka prekursoru izmantošana presinaptiskajai izdalīšanai un muskarīna receptora agonistu lietošana nav lietderīga to efektivitātes nepietiekamības un blakusefektu (bradikardijas, hipotensijas, hipersalivācijas, krampju, caurejas, galvassāpju, gastrointestinālā trakta hiperaktivitātes) dēļ. Citi pētījumi parādīja labvēlīgus AchEi efektus uz kognitīvajiem, funkcionālajiem un uzvedības simptomiem. Pārtikas un zāļu administrācija (*Food and Drug Administration*) ASV apstiprināja 4 zāļu vielas vieglai un vidējai AS formas ārstēšanai - takrīnu, donepezilu, rivastigmīnu un galantamīnu. Takrīns bija pirmais plaši izmantotais AchEi, tomēr vēlāk tā lietošana tika aizliegta īsa pusizvadīšanas perioda,

hepatotoksicitātes un holīnerģisko blakusefektu dēļ. Šobrīd 2. paaudzes AchEi (donepezilam, rivastigmīnam un galantamīnam) ir mazāk blakņu, garāks pusizvadīšanas periods un augstāka efektivitāte [Mehta and Sabbagh, 2012]. Balstoties uz vairākiem pētījumiem ar ilgtermiņa ievadīšanu, tika izsecināts, ka AchEi lietošana pacientiem ar viegliem kognitīviem traucējumiem nesamazina risku vai neaizkavē AS attīstību. Turklāt šīs zāļu vielu grupas blakusesfeki, kas saistīti ar gastrointestināliem, kardiovaskulāriem un neiromuskulāriem riskiem, nav nenozīmīgi. Tāpēc joprojām tiek meklētas zāļu terapijas alternatīvas ar augstu efektivitāti un mazāku blakusefektu skaitu.

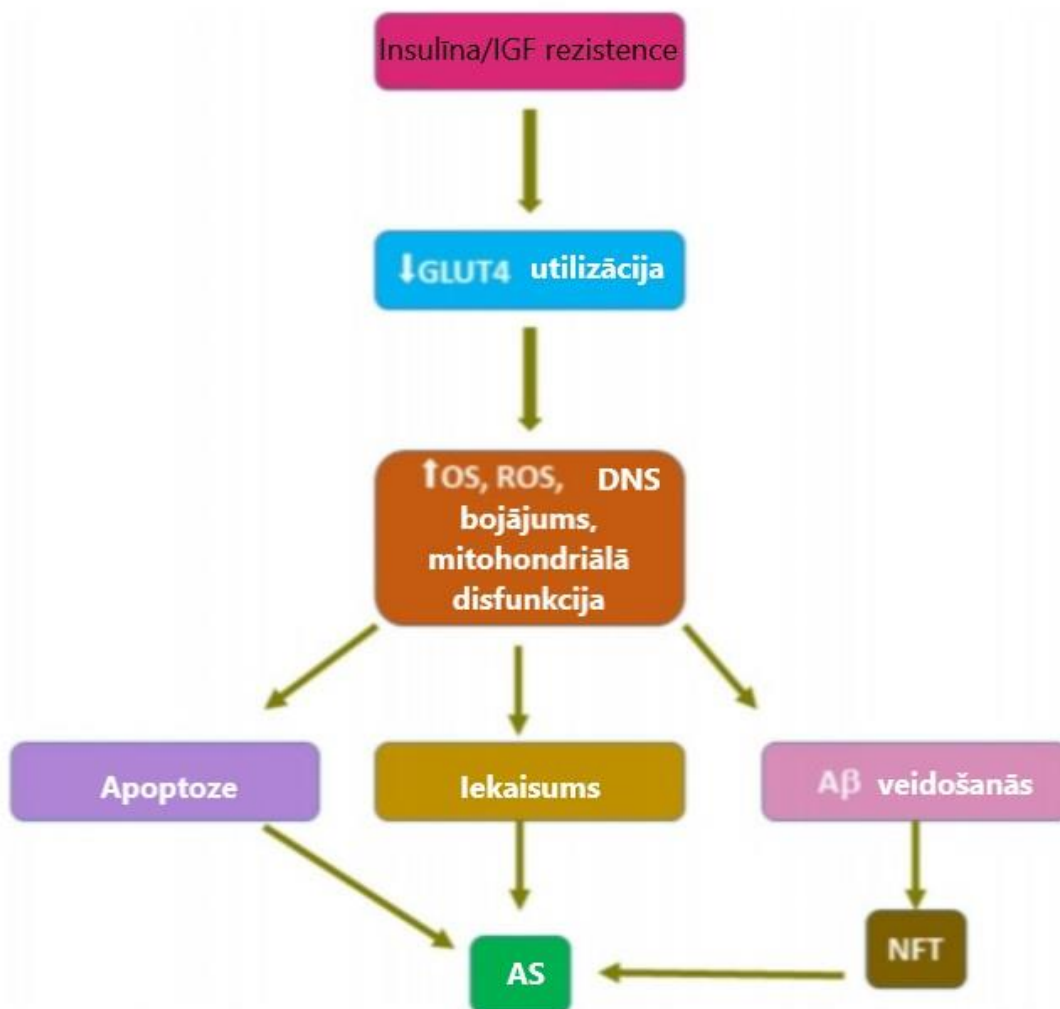
1.2.3. Citi Alcheimera slimības attīstību ietekmējošie faktori

Joprojām nav iespējams viennozīmīgi pateikt, vai cilvēkam vecumā pēc 65 gadiem attīstīsies AS. Vairāki faktori spēj ietekmēt slimības attīstības gaitu. Lai varētu prognozēt, jāņem vērā ģenētiskie faktori, dzīvesstils un kaitīgie ieradumi, tādi kā smēķēšana un mazkustīgs dzīvesveids, ka arī apkārtējās vides faktori un citas saslimšanas (ateroskleroze, 2. tipa cukura diabēts, Dauna sindroms).

Ģimenes anamnēzei un ģenētiskai predispozīcijai ir būtiska loma AS attīstībā. Cilvēkiem, kuriem vecāki vai tuvi radnieki slimo ar AS, ar lielu varbūtību var attīstīties slimība. Risks palielinās, ja vairāk nekā viens tuvs radnieks ir AS slimnieks. Zinātnieki ir izpētījuši gēnus, kas ir iesaistīti AS attīstības procesā. Pastāv divi gēnu veidi, kas var būtiski ietekmēt faktu, ka cilvēkam attīstīsies slimība - riska gēni un determinējošie gēni. Alcheimera gēni atrodami abās šīs gēnu grupās. Riska gēni palielina slimības attīstības risku, taču nevar pārlicināti apgalvot, ka tas tā notiks. Uz doto brīdi zinātnieki atklāja dažus riska gēnus, kas ir iesaistīti AS patoģenēzē. Svarīgākais riska gēns ir apolipoproteīns E-e4 (APOE-e4). Pētījumi rāda, ka APOE-e4 varētu būt riska faktors 20-25 % AS gadījumā. APOE-e4 ir viena no trim izplatītākām APOE gēna formām, pārējās divas formas ir APOE-e2 un APOE-e3. Katrs cilvēks saņem kādu APOE formas kopiju no abiem vecākiem. Tiem indivīdiem, kuri saņem APOE-e4 formu no viena vecāka, ir palielināts AS risks. Tiem, kas saņem APOE-e4 no abiem vecākiem, ir vēl lielāks risks saslimt ar AS. Zinātniekiem joprojām nav skaidrs, kādā veidā APOE-e4 spēj palielināt saslimšanas risku ar AS. Papildus riska palielināšanai APOE-e4 var izraisīt AS simptomu parādīšanos jaunākā vecumā nekā parasti. Atšķirībā no riska gēniem determinējošie gēni tieši spēj izraisīt slimību, garantējot, ka ikvienam, kurš tos manto, var attīstīties traucējumi. Zinātnieki ir atklājuši variācijas, kas tieši izraisa AS gēnos, kuri kodē trīs proteīnus: APP, presenilīnu-1 un presenilīnu-2. Ja slimību izraisa šīs determinējošās variācijas, to sauc par autosomāli dominanto AS vai ģimenes AS, un tas ietekmē vairākus ģimenes locekļus paaudzēs.

Simptomi gandrīz vienmēr attīstās pirms 60 gadu vecuma - tie var parādīties jau 30-40 gados. Determinējošās AS variācijas ir atklātas tikai dažās ģimenēs visā pasaulē. Tāda AS sastāda mazāk par 1 % gadījumu [Van Cauwenberghe et al., 2016].

2.tipa cukura diabētam (*type 2 diabetes mellitus*, T2DM) arī ir pierādīta ietekme uz AS patoģenēzi. Liels pētījumu skaits liecina, ka insulīna rezistencei un tā deficītam kā T2DM marķierim ir nozīmīga loma AS. Molekulārajā līmenī pirmie pierādījumi par to, ka smadzenes var kļūt insulīna rezistentas AS gadījumā, parādījās, izpētot, ka A β oligomēri piesaistās pie hipokampa neironiem un sekmē dendritisko insulīna receptoru substrātu (IRS) "dzēšanu" no plazmas membrānas. Zemāki insulīna, insulīnam līdzīgā augšanas faktora un IRS līmenis un jutība tika novērota AS neiropatoloģijā. Palielināts perifērālā insulīna rezistences biomarķieru skaits nediabēta AS pacientu smadzeņu hipokampā arī izraisīja insulīna rezistenci AS gadījumā. Pie T2DM audzēja nekrozes faktora (TNF)- α signalizācija aktivē c-Jun N-termināla kināzi (JNK) un rezultātā arī IRS1 serīna fosforilēšanu un perifēro insulīna rezistenci. Līdzīgi A β oligomēri izraisa patoloģisku TNF- α /JNK ceļa aktivāciju un IRS1 inhibēšanu kultivētos hipokampa neironos *in vitro*. Pastāv viedoklis, ka AS varētu uzskatīt par "insulīnrezistentu smadzeņu stāvokli" vai 3. tipa diabētu. Neironi T2DM smadzenēs varētu būt vairāk neaizsargāti pret A β toksicitāti insulīna rezistences un tā deficīta dēļ. Insulīna rezistence un nepietiekamība var rezultēties arī kā paaugstināta A β produkcija un A β izraisītais oksidatīvais mitohondriju bojājums. Tādēļ šobrīd ir domāts, ka insulīna rezistence un deficīts varētu būt izšķirošs faktors, kas veicina A β produkcijas stimulēšanu sporādiskās AS attīstības laikā [Li and Leng, 2015].



2.att. Insulīna rezistence un traucēts glikozes metabolisms sekmē mitohondriālo disfunkciju, DNS bojājumu un ROS veidošanos. Šīs izmaiņas ir iesaistītas Aβ plākšņu veidošanās procesā [Kandimalla et al., 2017].

IGF – insulīnam līdzīgais augšanas faktors (*insulin-like growth factor*); **GLUT4** – glikozes transportieris 4 (*glucose transporter type 4*); **OS** – oksidatīvais stress; **ROS** – reaktīvie skābekļa savienojumi (*reactive oxygen species*); **DNS** – dezoksiribonukleīnskābe; **NFT** – neurofibrillārie mezgli (*neurofibrillary tangles*); **AS** – Alcheimera slimība

1.3. Neuroiekaisums

AS raksturojas ar izteiktu hronisku neuroiekaisumu. Pārsvarā tiek novērota mikroglijas un astroglijas aktivācija [Serrano-Pozo et al., 2013]. Pētījumos ar dzīvnieku modeļiem, kam novērota A β pārekspresija, ap A β plāksnem novēroti aktivēti astrocīti un mikroglijas šūnas. Palielinoties plākšņu daudzumam, gliozes smaguma pakāpe pieaug [Jo et al., 2014]. Ir izpētīts, ka gliozes pakāpe ir cieši saistīta ar slimības stadiju [Simpson et al., 2010].

AS un citās neurodeģeneratīvajās slimībās (Parkinsona slimībā, Hantingtona slimībā, multiplajā sklerozē) neuroiekaisumam ir izšķiroša loma, un tas ir saistīts ar augstu iekaisuma citokīnu līmeni. Papildus tiešai neirotoksiskai iedarbībai aktivētā mikroglija un astrocīti var veicināt A β nogulsnešanos. Vairāki pētījumi ar peļu modeļiem ir parādījuši, ka amiloīda deponēšanos iekaisuma apstākļos palielinās. Pie tām arī citokīni spēj izmainīt BACE1 mRNS proteīna un enzimatisko regulāciju. BACE1 transkripcija arī tiek palielināta TNF- α -aktivētā nukleārā faktora kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF- κ B) signāla iedarbībā, kas rezultējas kā paaugstināta A β produkcija [Calsolaro and Edison, 2016].

1.3.1. Mikroglijas aktivācija

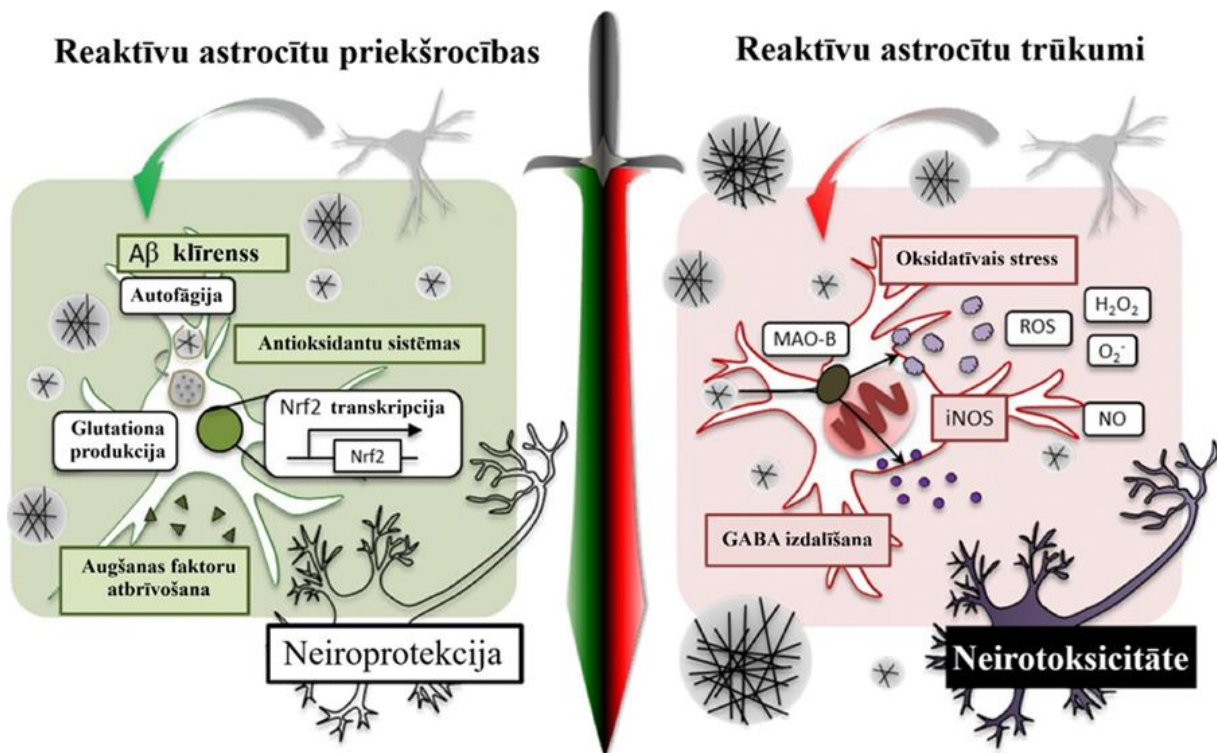
CNS sastāv no diviem šūnu veidiem – neironiem un glijas šūnām. Pie glijas šūnām pieder astrocīti, oligodendrocīti un mikroglija. Mikroglijas šūnas sastāda apmēram 5-12 % no visām smadzenēs atrodamām glijas šūnām. Tās ir pirmās šūnas, kas dod imūno atbildes reakciju, kā arī nodrošina plātnīšu, bojātu neironu, sinapšu un infekciozo aģentu pastāvīgu noārdīšanu un iznīcināšanu CNS. Normālos fizioloģiskos apstākļos mikroglijas ir inaktivētas, tomēr pat tādā stāvoklī tās spēj pildīt savas funkcijas, sekojot izmaiņām smadzenēs. Attīstoties smadzeņu patoloģijām, neurodeģeneratīvajām slimībām, kā arī pie neironālajiem bojājumiem neirotoksisku faktoru izdalīšanās dēļ un pēc insulta, mikroglijas tiek aktivētas. Atkarībā no aktivācijas pakāpes un patoloģiskā stāvokļa mikroglijas spēj darboties gan neirotoksiski, gan neiroprotektīvi [Lucin and Wyss-Coray, 2009]. Pēdējā laikā liela uzmanība tika pievērsta mikroglijas aktivācijas mehānismam kā atbildes reakcijai uz neiropatoloģiskiem stāvokļiem. *In vitro* pētījumos mikroglijas šūnas tiek aktivētas tādu faktoru ietekmē, kā lipopolisaharīds (LPS), A β , interferons (IFN) γ , trombīns un daži proiekaisuma citokīni. Aktivētās mikroglijas iekaisuma atbildes reakcija ir konsekventa, neskatoties uz atšķirīgu stimulu dabu [Thameem Dheen et al., 2007].

LPS, IFN- γ vai TNF- α aktivētā mikroglija tiek definēta kā M1 jeb klasiski aktivēta mikroglijas forma. M1 aktivācijai ir būtiska loma cīņā pret patogēniem un audzēja šūnām,

izdalot proiekaisuma citokīnus (interleikīnu 1 β , 6, 12, 23; TNF- α ; transkripcijas signāla pārveidotāju un aktivatoru 3 jeb STAT3) un brīvos radikāļus. Turklāt šis mikroglijas veids tiek saistīts arī ar neironu zudumu. Alternatīvs M2 pretiekaisuma fenotips nodrošina audu atjaunošanu un anģioģenēzi, izdalot pretiekaisuma citokīnus (interleikīnu 4, 10, 13 un transformācijas augšanas faktoru beta jeb TGF- β) lielos daudzumos un proinflatamos citokīnus mazākos daudzumos [Wang et al., 2015]. Ir izpētīts, ka mikroglija spēj arī pārslēgties no M2 uz M1 fenotipu slimības gaitā, piemēram, *Jimenez et al.* pētījumā tika novērota mikroglijas M2 fenotipa pārēja uz M1 fenotipu vecu žurku hipokampā [Calsolaro and Edison, 2016].

1.3.2. Astroglijas aktivācija

Astrocīti jeb astroglijas ir nervu sistēmas glijas šūnas, kas ir atrodamas galvas un muguras smadzenēs. Viena no astrocītu izpētītajām lomām ir *house-keeping* funkcijas, kas palīdz saglabāt dzīvotspējīgu nervu sistēmas vidi neironiem. Tas ietver kālija un neurotransmiteru pārpalikumu buferizāciju, tādā veidā nodrošinot uzturvielu un strukturālo atbalstu ap sinapsēm, kā arī veicinot hematoencefāliskās barjeras (HEB) caurlaidību. Astrocītiem piemīt svarīga neiroprotektīvā funkcija, kas tiek īstenota, producējot antioksidantus, piemēram, glutationu. Tie arī izdala antioksidantu molekulas pret OS un aizsargā neironus, kas ir pakļauti ūdeņraža peroksīda (H₂O₂) toksiskai ietekmei. No otras puses, astrocīti paši izdala H₂O₂ kā atbildes reakciju cīņā pret A β plāksnēm. Astrogliozes rezultātā tiek paaugstināta reaktīvu skābekļa savienojumu (*reactive oxygen species*, ROS) daudzums, un tas var būt toksisks neironiem [Allaman et al., 2010]. Tādējādi, ņemot vērā iepriekšminēto, var secināt, ka reaktīvajiem astrocītiem ir gan labvēlīgas, gan kaitīgas funkcijas neironu dzīvotspējīguma nodrošināšanā toksiskā vidē atkarībā no ROS produkcijas (skat.3.att.).



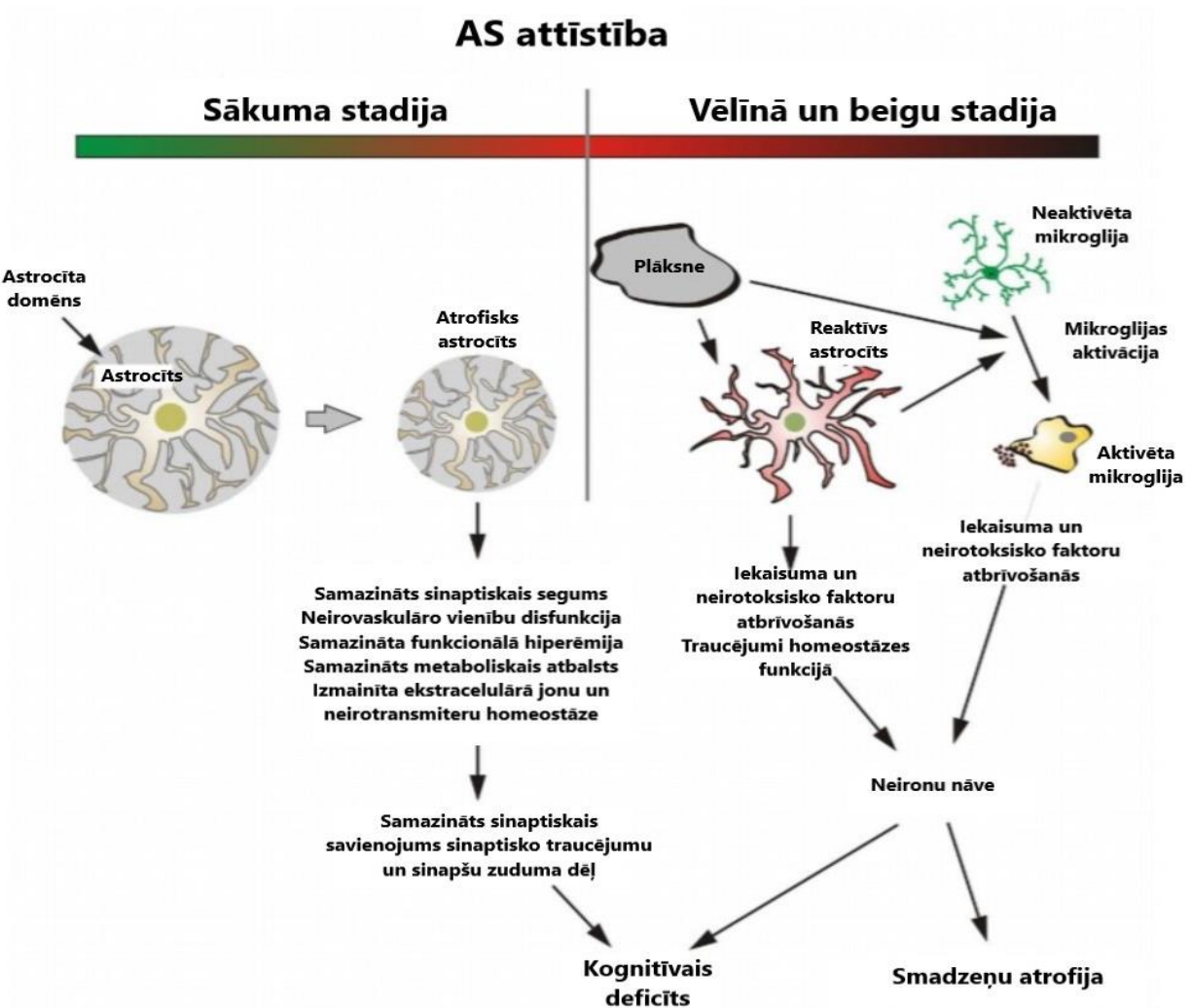
3.att. Reaktīvu astrocītu labvēlīgā un kaitīgā ietekme AS gadījumā [Chun and Lee, 2018]
Aβ – amiloīds beta; **Nrf2** – nukleārais faktors (*nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2*); **MAO-B** - monoamīnoksidāze B; **iNOS** – inducējamā slāpekļa oksīda sintāze (*inducible nitric oxide synthase*); **ROS** – reaktīvie skābekļa savienojumi (*reactive oxygen species*); **GABA** – gamma-aminosviestskābe (*γ-aminobutyric acid*)

Līdzīgi mikroglijām, astrocīti tiek aktivēti kā atbildes reakcija uz dažādām CNS patoloģijām, piemēram, insults, kā arī traumas, ilgstošs perifērs iekaisums, vīrusu saslimšanas, audzēji un neurodeģeneratīvas slimības. Kopā ar mikrogliju, astrocītiem ir svarīga loma neuroiekaisuma procesos. Reaktīvi astrocīti pēc aktivizēšanas uzrāda plašu reaktivitātes spektru, kā arī ir ļoti dažādi no morfoloģijas, gēnu ekspresijas un funkciju skatu punkta [Anderson et al., 2014]. Aktivizējoties astrocīti spēj izraisīt izmaiņas apkārtējā vidē vai nopietnus audu bojājumus. Histopatoloģiski reaktīvi astrocīti iziet plašu izmaiņu spektru no hipertrofijas un palielinātas GFAP ekspresijas līdz astrocītu domēnu proliferācijai un pārklāšanai, kas galu galā rezultējas kā rētu veidošanās [Sofroniew and Vinters, 2010].

GFAP ir galvenais astrocītu šūnas starppavedienu (*intermediate filaments, IF*) proteīns, kas parasti kalpo kā astrocītu marķieris un palielinātā daudzumā tiek izdalīts no šūnām bojājuma un CNS deģenerācijas laikā. Uz doto brīdi ir atklātas vairākas proteīna izoformas, kas ekspresējas dažādās astrocītu apakšgrupās un spēj mainīt IF tīkla īpašības. GFAP pārsvarā ir atbildīgs par šūnu formas un to mehāniskās izturības nodrošināšanu, tomēr jaunākajos pētījumos ir izpētīts, ka GFAP funkciju spektrs ir daudz plašāks par atbalsta sniegšanu neironu

šūnām. Ir izpētīts, ka proteīns ir iesaistīts HEB regulēšanā, neironu aizsargāšanā pret neurotransmiteru pārmērīga daudzuma, sinaptiskās plasticitātes veicināšanā, neironālās aktivitātes koordinēšanā caur tiešu komunikāciju ar neironiem, kā arī ir neironālās cilmes šūnas pieaugušo smadzenēs. AS gadījumā ir pierādīta tieša saikne starp slimības smaguma pakāpi, reaktīvo astrocītu blīvumu un GFAP ekspresijas palielināšanos gan audos, gan CSF [Middeldorp and Hol, 2011].

Astrocītu patoloģiskās izmaiņas pie AS bija konstatējis vēl pats Alois Alheimers 1910. gadā, novērojot glijas šūnas, kas cieši aptvēra A β plāksnes. Reaktīvā astroglioze vēlāk tika apstiprināta kā netipiska, AS morfoloģiskā īpašība, kas tiek novērota gan slimnieku, gan modeļdzīvnieku audos. Šobrīd kopā ar citām AS patoģenēzes teorijām eksistē arī astroglijas hipotēze, kas parāda astroglijas izmaiņas un lomu AS sākuma un vēlīnā stadijā (skat. 4.att.). Sākuma traucējumi smadzeņu savienojamībā un sinaptiskajā transmisijā var rasties no vispārējas astrocītu atrofijas. Astroglijas atrofija var izraisīt samazinātu sinaptisko pārklājumu, ietekmēt jonu un neurotransmiteru homeostāzi, mainīt neirovaskulāro vienību darbību un samazināt vielmaiņas atbalstu neironiem. Šie faktori var veicināt sinaptiskās darbības traucējumus un sinapšu zudumu, tādējādi izraisot agrīnu kognitīvo deficītu. AS vēlīnās stadijās plākšņu parādīšanās rada spēcīgu proglotisko signālu, kas stimulē gan mikroglijas, gan astroglijas aktivāciju. Reaktīvi astrocīti turpina samazināt sinaptisko atbalstu un var pastiprināt mikroglijas aktivāciju. Reaktīvās glijas šūnas izdala iekaisuma un neirotoksiskus faktorus, kas izraisa neironu nāvi un smadzeņu atrofiju, beigās rezultējoties kā smaga demence [Verkhatsky et al., 2010].



4.att. AS astroglijas hipotēze [Verkhatsky et al., 2010]

Ir zināms, ka astrocīti izdala vairākus gliotransmiterus, tajā skaitā glutamātu, gamma-aminosviestskābi (*gamma-aminobutyric acid*, GABA), adenozintrifosfātu un D-serīnu. Kad astrocīti tiek aktivēti, tiek izmainīts arī izdalīto gliotransmiteru daudzums, kas turpmāk ietekmē neironālo aktivitāti. Ne tik sen tika izpētīts, ka astrocīti, kuri apņēm amiloīda plāksnes, izdala GABA palielinātā daudzumā (skat. 5.att.). GABA tiek sintezēta no putrescīna (poliamīna veida) monoamīnoksidāzes B aktivācijas rezultātā. Kad aktivācijas līmenis pieaug, GABA tiek pastiprināti izdalīta ekstracelulārajā telpā, līdz ar to inhibējot neironālo aktivitāti. Ir izpētīts, ka tas spēj arī uzlabot atmiņu AS peļu modeļos [Jo et al., 2014].



5. att. GABA izdalīšanās no reaktīvajiem astrocītiem AS dzīvnieku modelī [Chun and Lee, 2018]

Aβ – amiloīds beta; **GABA** – gamma-aminosviestskābe (γ -aminobutyric acid); **GABAR** – GABA receptors; **GABAAR** – GABAA receptors; **GABABR** – GABAB receptors; **NMDAR** – NMDA (N-metil-D-aspartāta) receptors; **AMPAR** – AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionskābes) receptors; **MAOB** – monoamīnoksidāze B; **BEST1** – bestrofīns 1

1.4. GABAerģiskā sistēma un tās loma Alcheimera slimības patoģenēzē

GABA ir galvenais inhibējošais neurotransmiters zīdītāju smadzenēs. Tās galvenā loma ir neironu uzbudināmības mazināšana nervu sistēmā, holīnerģisko un glutamāterģisko neironu inervācijas nodrošināšana, pateicoties GABAerģiskiem neironiem [Solas et al., 2015], kā arī GABA ir tieši atbildīga par muskuļu tonusa regulēšanu. GABA funkcijas organismā tiek nodrošinātas ar triju subvienību starpniecību: GABA_A, GABA_B un GABA_C receptoriem. GABA_A un GABA_C receptori ir ligandatkarīgie hlora jonu kanāli, savukārt GABA_B receptori ir ar G-proteīnu saistīti metabotropie receptori. Zīdītāju smadzenēs visvairāk ir izplatīti GABA_A receptori, kas sastāv no α , β un γ subvienības. GABA_C receptori sastāv no ρ 1-3 subvienības, veidojot homomeriskus vai heteromeriskus kanālus, padarot tos atšķirīgus no GABA_A receptoriem to farmakoloģijā un funkcijās. GABA_A receptori ir plaši ekspresēti visā CNS, savukārt GABA_C visvairāk atrodami acs tīklenē. GABA_B, kas ir metabotropiskie ar G proteīnu saistīti receptori, regulē neironu aktivitāti, atverot kālija jonu kanālus vai inhibējot kalcija jonu kanālus caur G proteīna atkarīgo signalizācijas kaskādi [Li et al., 2016].

GABA sintēze notiek l-glutamāta α -dekarboksilācijas reakcijas gaitā, kuru katalizē enzīms glutamātskābes dekarboksilāze (*glutamic acid decarboxylase*, GAD). Tā ir viensoļa, neatgriezeniska reakcija, kura ir atkarīga no kofaktora piridoksāl-5'-fosfāta (vitamīna B₆ vitamēra) pieejamības. Eksistē 2 galvenās GAD izoformas: GAD65 un GAD67. GAD65 ir galvenā GAD izoforma, kas ir plaši ekspresēta zīdītāju smadzenēs un kas lokalizējas galvenokārt sinaptosomu aksonu terminālos un spēj viegli mijiedarboties ar plazmas membrānu, savukārt GAD67 ir vairāk sastopama šūnu citosolā [Govindpani et al., 2017]. Ir izpētīts, ka intracerebrālā GAD autoantivielu ievadīšana dzīvniekiem pastiprina motoneironu uzbudināmību un samazina NO produkciju, savukārt NO ir molekula, kas ir iesaistīta mācīšanas procesā [Manto et al., 2011]. Samazināts GABA līmenis sekmē glutamāta līmeņa paaugstināšanos GABA receptora subtipu vajākas inhibēšanas dēļ. Augstāks glutamāta līmenis aktivē mikrogliju, un xc(-) (cistīna/glutamāta apmaiņas sistēmas) aktivācija palielina ekstracelulārā glutamāta izdalīšanos [Mitoma et al., 2017].

Iepriekšējos pētījumos lielāka uzmanība tika pievērsta glutamāterģiskās un holīnerģiskās neurotransmiteru sistēmas disfunkcijai AS gadījumā, tomēr šobrīd parādās arvien vairāk pierādījumu, ka arī GABAerģiskai sistēmai ir svarīga loma AS patoģenēzē. Ņemot vērā GABAerģiskās sistēmas nozīmi neironālā funkcijā un homeostāzē, uzbudinoša/inhibējoša līdzsvara nodrošināšanā un uzturēšanā, kā arī mācīšanās un atmiņas procesos, izmaiņas

GABAergicās sistēmas darbībā varētu būt nozīmīgs faktors gan agrīnās, gan vēlākajās slimības stadijās.

Ir izpētīts, ka GABA_A un GABA_B receptoriem ir būtiska loma mācīšanās un atmiņas procesos [LaSarge et al., 2009; Mizoguchi and Yamada, 2011]. Farmakoloģiskie pētījumi liecina, ka GABA α5 subvienība ir izplatīta hipokampā lielos daudzumos un tai ir svarīga loma kognitīvo procesu norisē [Ballard et al., 2009]. Pētījumos ir noskaidrots, ka AS gadījumā ne tikai samazinās GABA sintēze un daudzums, bet arī funkcionālo GABA_A receptoru skaits un jutība pret pašu GABA. Ir konstatēts, ka GABA plūsmā AS smadzenēs ir daudz lielākā tieksme uz desensitizāciju nekā ne-AS smadzenēs. GABA plūsmas samazināšanās AS smadzenēs ir saistīta ar GABA receptora pamatsubvienības mRNS un proteīna daudzuma samazināšanos, kas parasti ekspresējas temporālajā garozā [Limon et al., 2012].

Ņemot vērā, ka AS ārstēšana, kas tika balstīta uz glutamaterģiskās un holīnerģiskās sistēmas farmakoloģiju, neuzrādīja augstu efektivitāti, jo uz doto brīdi pieejama terapija spēj tikai palēnināt simptomu progresēšanu, bet nespēj mainīt vai apturēt slimības gaitu, terapija, kas ietver GABAergicās sistēmas modulātorus, varētu būt efektīva AS ārstēšanā un demences novēršanā. GABA_A receptoru agonisti kā jauna AD terapija pirmo reizi tika piedāvāta 11. Acheimera slimības zāļu atklāšanas starptautiskajā konferencē (*11th Alzheimer's Disease Drug Discovery International Conference*), tomēr konkrēti mehānismi nebija detalizēti aprakstīti. Daži GABA receptoru modulātori tika pētīti sakarā ar AS preklīniskajos un klīniskajos pētījumos (skat. 1.tab.) [Li et al., 2016].

1.tabula

GABAergicā vielu iedarbība AS modeļos

Viela	Tips	Iedarbība	Atsauce
Etazolāts (EHT-0202)	GABA _A receptora agonists	Aizsargā neironus pret Aβ izraisīto toksicitāti, palielina šķīstošā amiloīda prekursora proteīna alfa (<i>soluble amyloid precursor protein alfa</i> , sAPPα) proteīna līmeni, uzrāda pretiekaisuma efektu pēc smadzeņu traumas, uzlabo kognitīvās spējas peļu modelī	Marcade et al., 2008; Drott et al., 2010; Vellas et al., 2011; Siopi et al., 2013

Muscimols	GABA _A receptora agonists	Inhibē Aβ ₂₅₋₃₅ izraisīto neironu apoptisko nāvi, ļoti mazās devās uzlabo atmiņu, samazina neuroiekaisumu, normalizē acetilholīnesterāzes (AChE) un GABA ekspresiju STZ izraisītā AS žurku modelī	Lee et al., 2005; Pilipenko et al., 2018
Propofols	GABA _A receptora agonists	Samazina Aβ veidošanās un paātrina Aβ degradāciju, samazina Aβ ₄₀ un Aβ ₄₂ koncentrāciju peļu smadzenēs, uzlabo kognitīvās funkcijas AS peļu modelī	Shao et al., 2011; Zhang et al., 2014
MRK-016, α5IA, α5IA-II	GABA _A receptora α5 subvienības inversais agonists	Uzlabo kognitīvās spējas dzīvnieku modeļos	Dawson et al., 2006; Atack et al., 2009; Atack, 2010; Guerrini et al., 2013
CGS9896	GABA _A receptora α5 subvienības inversais agonists	Uzlabo peļu atmiņu testos	Guerrini et al., 2009
Ro-4938581, Ro-4882224	GABA _A receptora α5 subvienības inversais agonists	Samazina skopolamīna izraisītus traucējumus atmiņas darbībā	Knust et al., 2009
Baklofēns	GABA _B receptora agonists	Ļoti mazās devās uzlabo atmiņu, samazina neuroiekaisumu, normalizē AChE un GABA ekspresiju STZ izraisītā AS žurku modelī	Pilipenko et al., 2018
SGS742 (CGP36742)	GABA _B receptora antagonists	Uzlabo uzmanību un atmiņu dzīvnieku modeļos un pacientos ar vidējiem kognitīvajiem	Getova and Bowery, 2001; Froestl et al., 2009;

		traucējumiem, palielina nervu augšanas faktora (<i>nerve growth factor</i>) un smadzeņu neirotrofiskā faktora (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>) līmeni žurkās	Helm et al., 2005
CGP55845	GABA _B receptora antagonists	Uzlabo kognitīvās spējas žurku modelī	Cryan and Kaupmann, 2005; Lasarge et al., 2009

Tā kā daudzi GABA_A un GABA_B receptoru modulātori uzrādīja pozitīvo ietekmi uz vairākiem faktoriem AS dzīvnieku modeļos, zinātnieki pievērsa uzmanību klasiskajiem GABA_A agonistiem, proti, benzodiazepīniem, ko varētu pētīt kā potenciālus aģentus pret AS.

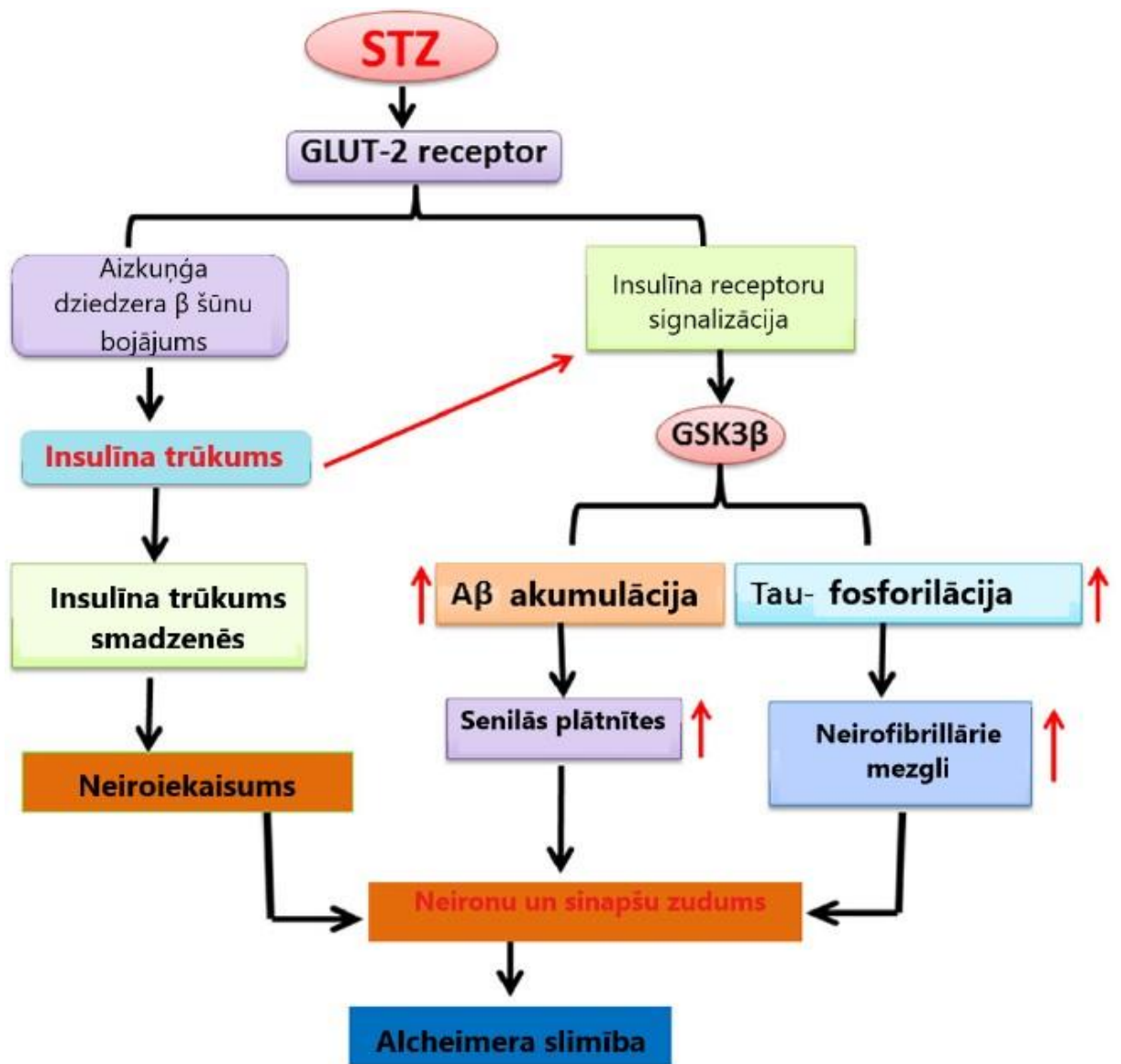
Benzodiazepīni (BZD), zināmi arī kā “mazie trankvilizatori”, ir zāļu vielu klase, kurai piemīt anksiolītiskās, sedatīvās, muskuļu atslābinošās un antikonvulsanta īpašības. Pie BZD indikācijām pieder bezmiegs, alkohola un narkotiku abstinence, izteikts nemiers, panika, krampji un epilepsija. Tā kā BZD strukturāli ir līdzīgi GABA, saistoties ar GABA_A receptoriem, notiek Cl⁻ jonu izdalīšanās sinapsēs, ar ko tiek nodrošināta neironu uzbudināmības samazināšana. Klasiskie BZD grupas pārstāvji ir alprazolams, klonazepams, lorazepams, midazolams un diazepam.

Pēdējā laikā BZD sāka plašāk pētīt sakarā ar AS kā potenciālās zāļu vielas. Neskatoties uz ticamiem datiem par GABA_A receptoru agonistu neuroprotektīvām īpašībām, plaši aprakstītas blakusparādības ierobežo to ilgtermiņa lietošanu [Lancôt et al., 2004]. Pastāv arī pierādījumi, ka benzodiazepīnu ilgstoša lietošana terapeitiskās devās ir saistīta ar paaugstinātu demences risku [Gallacher et al., 2012]. Tomēr ir dati, kas liecina, ka mazākās un vidējās devās tie spēj iedarboties neiroprotektīvi [Béracochéa et al., 2011; Bibolini et al., 2011; Umeda et al., 2017].

1.5. Streptozocīna neuroiekaisuma modelis

Streptozocīns (STZ) – toksīns, glikozamīna nitrosurīnvielas sastāvdaļa, kas ir izdalīts no baktērijām *Streptomyces achromogenes*. Klīniski lieto kā ķīmijterapijas līdzekli, lai ārstētu aizkuņģa dziedzera β šūnu karcinomu. STZ izraisa aizkuņģa dziedzera β šūnu bojājumus, kā rezultātā rodas hipoinsulinēmija un hiperglikēmija. Atkarībā no devas STZ var izraisīt cukura diabētu divos veidos. Pateicoties strukturālai līdzībai ar glikozi, STZ spēj saistīties ar glikozes transportiera 2 (GLUT2) receptoru un uzkrāties β šūnās. Lielās devās, parasti ievadot vienreizēji, STZ iznīcina β šūnas, alkilējot dezoksiribonukleīnskābi, savukārt mazās devās, ievadot vairākas reizes, STZ izraisa imūno un iekaisuma reakciju, kas, iespējams, ir saistīta ar GAD autoantigēnu izdalīšanos. Šajos apstākļos β šūnu destrukcija un hiperglikēmijas stāvokļa indukcija ir saistīta ar iekaisuma infiltrātiem, ieskaitot limfocītus aizkuņģa dziedzera Langerhansa saliņās. STZ piemīt izteiktas blakusparādības, tādas kā hepatotoksicitāte un nefrotoksicitāte [Graham et al., 2011]. STZ inhibē insulīna sekrēciju un izraisa insulīnatarīgo *diabetes mellitus*.

STZ spēj negatīvi ietekmēt ne tikai aizkuņģa dziedzera β šūnas, bet arī citus orgānus, kur ekspresējas GLUT2, piemēram, aknas un nieres. Smadzenes, savukārt, netiek ietekmētas, jo HEB nav atrodams šis transportproteīns. Tomēr vienreizējā vai dubultā intracerebroventrikulārā (icv) STZ injekcija hroniski samazina smadzeņu glikozes uzņemšanu un rada AS līdzīgus simptomus molekulārā, patoloģiskā un uzvedības līmenī. Ņemot verā to, ka samazināta glikozes vielmaiņa ir agrīna AS pazīme, icv STZ injekcijas tiek izmantotas, lai modelētu AS, kā arī preklīniskajos pētījumos dzīvniekos, testējot jaunas zāļu vielas pret AS [Grieb, 2016]. Pētījumos tika novērots, ka, ievadot STZ icv pieaugušām žurkām, dzīvniekiem pasliktinās atmiņa un mācīšanās spējas, konstatē izmaiņas uzvedībā. STZ injekcijas sekmē A β akumulāciju, τ fosforilāciju, palielina OS smadzeņu audos paaugstināta malondialdehīda līmeņa un pazemināta glutaciona līmeņa dēļ. Šo sporādisko AS modeli kopā ar izmaiņām glikozes metabolismā spilgti raksturo progresējošā kognitīvā disfunkcija, kas piemīt neurodeģeneratīvām slimībām (skat. 6.att.) [Ravelli et al., 2017].



6.att. STZ izraisītais AS modelis

STZ bojā aizkuņģa dziedzera β šūnas, kas rezultējas ar insulīna deficītu. STZ izraisa insulīna līmeņa pazemināšanos un insulīna receptoru darbības traucējumus smadzenēs, kas noved pie GSK3 β darbības izmaiņām. Tādēļ šīs izmaiņas stimulē paaugstinātu τ proteīna fosforilēšanos, NFT veidošanos un beigās neironu un sinapšu disfunkciju, kas arī izraisa AS slimībai līdzīgu patoloģisko stāvokli [Kamat, 2015].

A β – amiloīds beta; **GSK3 β** - glikogēna sintāzes kināze

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Dzīvnieki

Tika izmantoti *Wistar* žurku tēviņi (280 ± 20 g) no Dzīvnieku laboratorijas centra (Tartu Universitāte, Igaunija). Visi eksperimenti tika veikti saskaņā ar ES Direktīvu 2010/63/EU “*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes*” (2010), vietējiem likumiem un politiku, kas attiecināma uz zinātniskajiem mērķiem izmantoto dzīvnieku aizsardzību. Dzīvnieku protokolus šim pētījumam apstiprināja Pārtikas un veterinārā dienesta Dzīvnieku ētikas komiteja (Rīga, Latvija). Dzīvnieki tika turēti polipropilēna būros (5 žurkas vienā būrī) ar pārtiku (R70, Lantmännen, Zviedrija) un ūdeni *ad libitum*. Dzīvnieki tika turēti kontrolētos laboratorijas apstākļos ar temperatūru $23 \pm 1^\circ$ C, mitrumu 55-60 %, ievērojot 12 stundu gaismas un tumsas ciklu.

2.2. Vielas

Mākslīgais cerebrospinālais šķidrums (*artificial cerebrospinal fluid*, aCSF) tika pagatavots *ex tempore*. Diazepamā šķīdums (5 mg/mL) tika iegādāts no AS “Grindeks” (Latvija). No *Sigma-Aldrich* (ASV) tika iegādāti sekojošie reaģenti: 3,3'-diaminobenzidīns (DAB, D5905) un STZ (S0130). Vara sulfāts (102790) un nātrija citrāts (106448) tika iegādāts no *Merck-Millipore* (ASV).

2.3. Antivielas

Tika izmantota anti-GFAP antiviela (G3893) (*Sigma-Aldrich*, ASV), anti-GAD67 antiviela (sc-28376) (*Santa Cruz Biotechnology*, ASV) un *ExtrAvidin* sekundārās peļu antivielas un peroksidāzes krāsošanas kits (EXTRA2-1KT).

2.4. Eksperimenta dizains

Žurkas tika randomizēti iedalītas vienā no sešām grupām un intraperitoneāli (ip) saņēma fizioloģiskā šķīduma (1 mL/kg) vai diazepama (0,05 un 1 mg/kg) injekcijas. Grupas bija sekojošas (viena grupa – 10 dzīvnieki):

1. ip fizioloģiskais šķīdums un icv aCSF (kontrolē);
2. ip fizioloģiskais šķīdums un icv STZ;
3. ip diazepams 0,05 mg/kg un icv aCSF;
4. ip diazepams 1 mg/kg un icv aCSF;
5. ip diazepams 0,05 mg/kg un icv STZ;
6. ip diazepams 1 mg/kg un icv STZ.

Fizioloģiskā šķīduma vai diazepama ievadīšana tika veikta 3 dienas pēc kārtas pirms icv fizioloģiskā šķīduma vai aCSF injekcijām, kā arī 5.-22. eksperimenta dienās.

2.5. Paraugu sagatavošana

Pirms smadzeņu griešanas tās izņem no antifrīza šķīduma (sukroze, etilēna glikols, nātrija fosfāta šķīdums) un vismaz 24h notur 30% sukrozes šķīdumā 4°C krioprotekcijas nodrošināšanai. Griešanai nepieciešamos smadzeņu audus pielīmē uz platformiņas, izmantojot *Jung Tissue Freezing Medium* audu līmi un griež kriostatā temperatūrā aptuveni -22°C 30 μm biezumā. Paraugus uzglabā 6 × 4 platītēs antifrīza šķīdumā, katrā bedrītē uzglabājot 3 secīgus griezumus.

2.6. Antivielu imūnhistoķīmiskā analīze

Audus skalo ar PBS-T buferi (aptuveni 20 ml uz vienu trauciņu) 3 reizes pa 15 min.

Lai atsegtu specifiskās antivielu saistīšanās vietas un uzlabotu paraugu iekrāsošanas kvalitāti, paraugus karsē 95° C ūdens vannā citrāta bufera šķīdumā (pH 6) 10 min, tad istabas temperatūrā atdzesē 20 min.

Bloķēšanu veic ar 5 % BSA (*Bovine albumine serum*) PBS-T buferi 30min istabas t°, lai novērstu nespecifisku antivielu saistīšanos.

Inkubē ar primāro antivielu ar atšķaidījumu 1:500 uz kratītāja (*Biosan PSU-10i*) istabas temperatūrā uz nakti. Veic paraugu inkubēšanu ar attiecīgo sekundāro antivielu atšķaidījumā 1:1000 2h istabas temperatūrā. Paraugus skalo ar *PBS-Triton* buferi 3x15 min.

Veic paraugu krāsošanu vispirms ar 3,3'-diaminobenzidīnu (DAB) 1-3 min.

Paraugu krāsošanu ar DAB veic 3 minūtes, tad paraugus skalo 20 ml 0,05 M nātrija fosfāta buferī.

Veic paraugu krāsošanu ar hemotoksilīnu 1 min, kas iekrāso paraugā esošo šūnu kodolus viegli violetā krāsā.

Paraugus vairākkārtīgi skalo 0,05 M nātrija fosfāta buferī.

Katram marķierim tika piemērots visprecīzākais imunohistoķīmiskās analīzes protokola veids, lai pēc iespējas uzlabotu interpretējamo rezultātu precizitāti un ticamību. Katram marķierim tika veikta arī negatīvā kontrole, lai pārlicinātos, ka eksperiments tika veikts precīzi un primārā antiViela ir specifiska.

2.7. Mikroskopēšana un attēlu uzņemšana

Attēli tika uzņemti, izmantojot skenējošo mikroskopu *Pannoramic Midi*. Priekšmetstikliņi tika šifrēti pie bildēšanas un visiem tika izmantots vienāds apgaismojums un kameras iestatījumi. Visi attēli tika uzņemti ar 200x palielinājumu. Attēli tika analizēti, izmantojot *Image J* programmu.

2.8. Statistiskā analīze

Statistiskai datu apstrādei tika izmantota *GraphPad Prism*® 6 programma (ASV). Kvantitatīvie imūnhistoķīmijas dati tika analizēti, izmantojot vienfaktora ANOVA testu ar Fišera LSD pēctestu. Rezultāti tika attēloti kā vidējās vērtības \pm standartkļūdas (*Mean* \pm *S.E.M.*). Rezultāti tika uzskatīti par statistiski ticamiem, ja P vērtība bija mazāka vai vienāda ar 0,05 ($P \leq 0,05$).

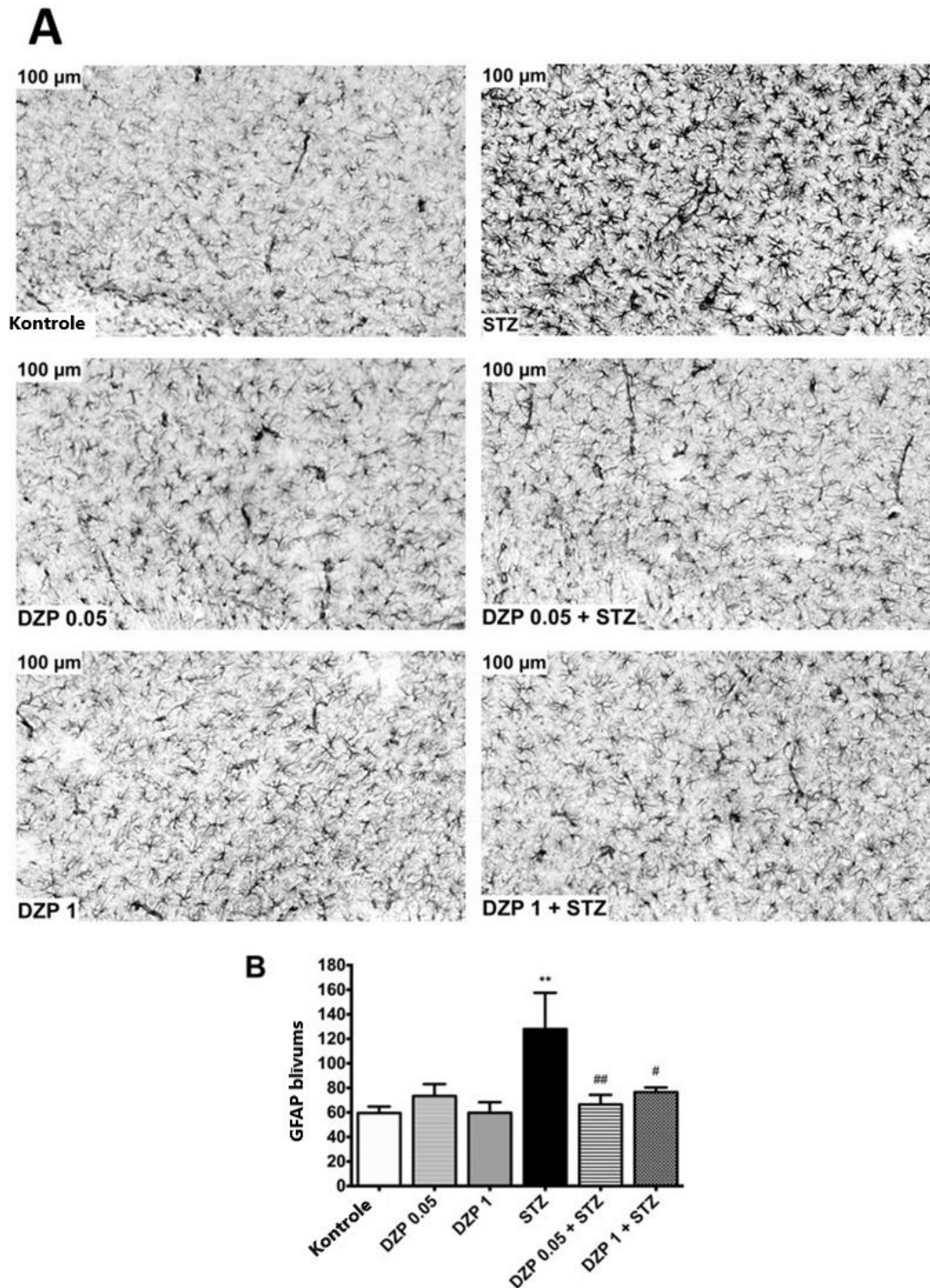
3. REZULTĀTI

Šajā darbā STZ izraisītajā AS modelī žurkām ar ip ievadītu selektīvu GABA_A agonista diazepama terapiju mazā (0,05mg/kg) un vidējā (0,1 mg/kg) devā mērķis bija noteikt divu marķieru ekspresiju *ex vivo* žurku smadzeņu hipokampā un garozā. Neuroiekaisuma pētīšanai tika noteikts astroglijas GFAP, savukārt, lai noskaidrotu GABAergiskās sistēmas stāvokli, tika noteikts GABA sintēzes enzīms GAD67.

Imūnhistoķīmijas analīzes gaitā tika ievēroti visi precizitātes priekšnoteikumi - tika ievērota personīgā un virsmu higiēna, buferšķīdumu un antivielu uzglabāšanas nosacījumi, tika veikta negatīvā kontrole visām antivielām, lai novērstu nespecifisku antivielu saistīšanos ar proteīnu. Eksperimenti ar paraugiem tika veikti vairākas reizes, lai pārliecinātos par rezultātu patiesumu.

3.1. Diazepama devu ietekme uz GFAP blīvumu garozā un hipokampā

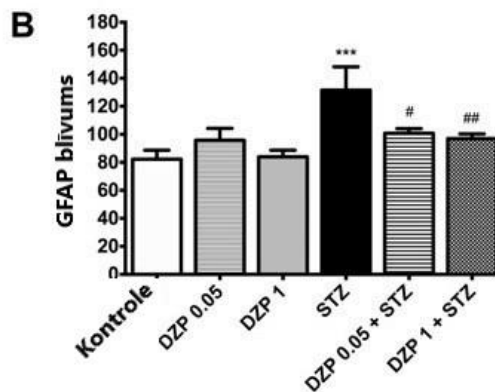
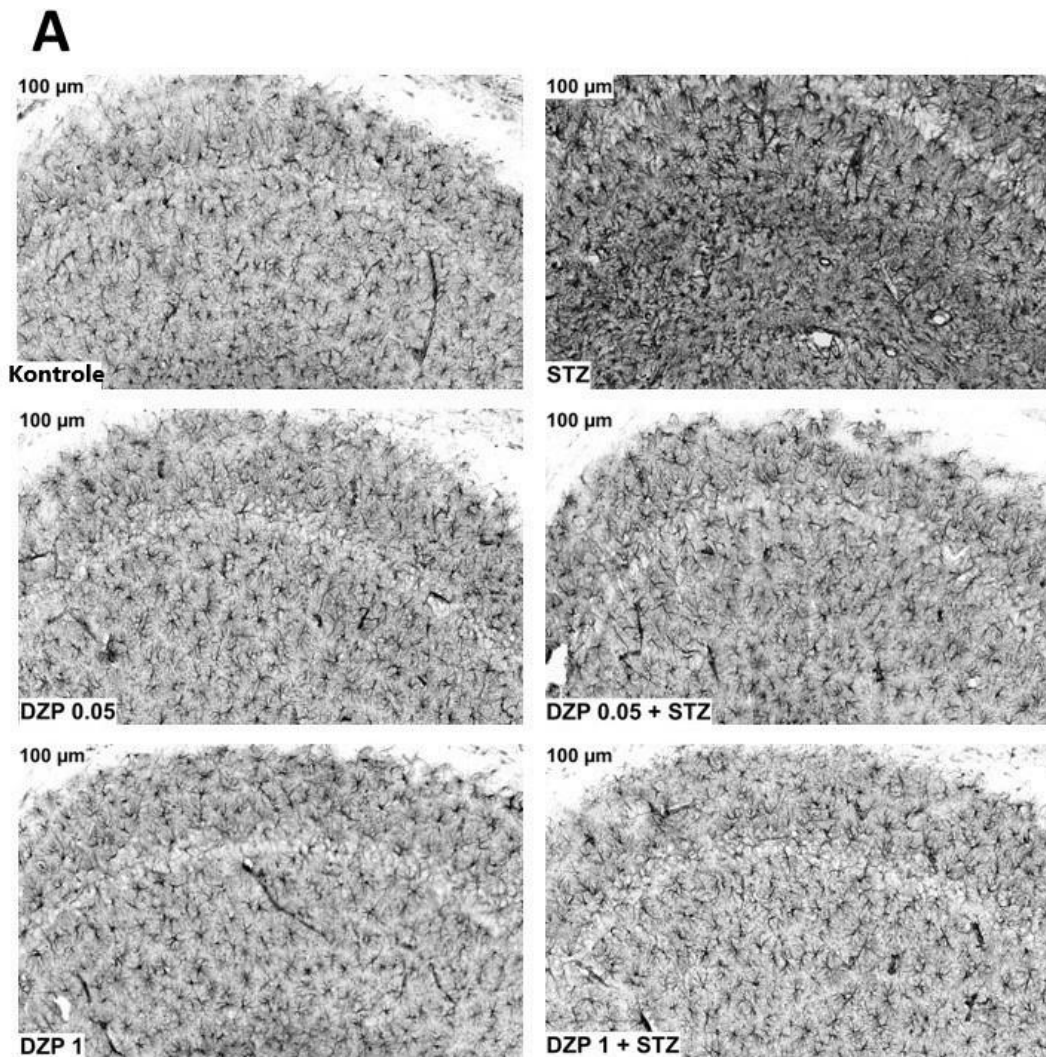
STZ būtiski ietekmēja astrocītus, sekmējot to aktivāciju, ko varēja novērot ar izteiktu GFAP ekspresijas pieaugumu garozā un hipokampā. Imūnhistoķīmiskās analīzes gaitā tika noteikts, ka diazepama abas devas (0,05 un 1 mg/kg) samazina GFAP ekspresiju garozā un hipokampā, salīdzinot ar slimības (STZ) grupu, kur astroglija bija aktivēta, mazinot neuroiekaisumu.



7.att. GFAP ekspresijas izmaiņas garozā

(A) Vizuāli ir redzams, ka slimības modeļa grupā (STZ) astrocīti ir aktivēti un vairāk izteikti nekā kontroles grupā.

(B) Ir novērojama statistiski ticama atšķirība starp kontroles un STZ grupu (** $P \leq 0,01$), kas norāda uz STZ spēju izraisīt neuroiekaisumu garozā. Ir novērojama statistiski ticama atšķirība arī starp grupām DZP 0,05 + STZ un DZP 1 + STZ salīdzinājumā ar STZ grupu (## $P \leq 0,01$ un # $P \leq 0,05$), kas norāda uz diazepama efektu mazināt neuroiekaisumu gan pie devas 0,05 mg/kg, gan pie devas 1 mg/kg. Izmantotais palielinājums attēliem 200x.



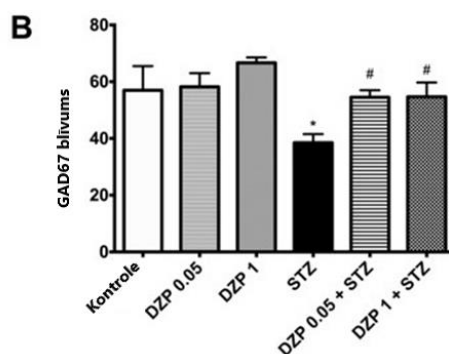
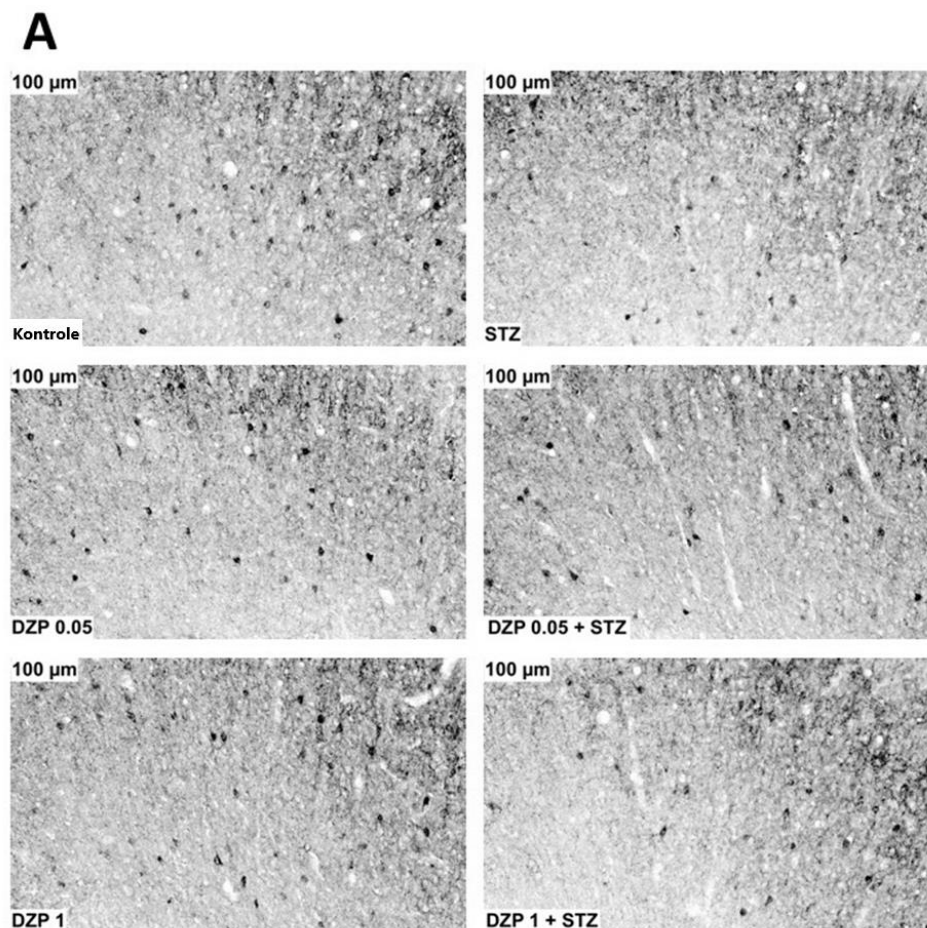
8.att. GFAP ekspresijas izmaiņas hipokampā (CA1 reģions)

(A) Līdzīgi astroglijas ekspresijai garozā, redzams, ka STZ grupā astrocīti ir aktivēti un vairāk izteikti nekā kontroles grupā.

(B) Ir novērojama statistiski ticama atšķirība starp kontroles un STZ grupu (***) $P \leq 0,001$), kas norāda uz STZ spēju izraisīt neiroiekaisumu arī hipokampā. Ir novērojama statistiski ticama atšķirība grupās DZP 0,05 + STZ un DZP 1 + STZ salīdzinājumā ar STZ grupu (#) $P \leq 0,05$ un ##) $P \leq 0,01$), kas norāda uz diazepama pozitīvo efektu neiroiekaisuma mazināšanā, lietojot abas devas. Izmantotais palielinājums attēliem 200x.

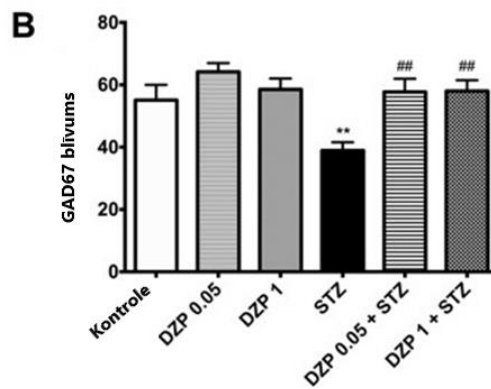
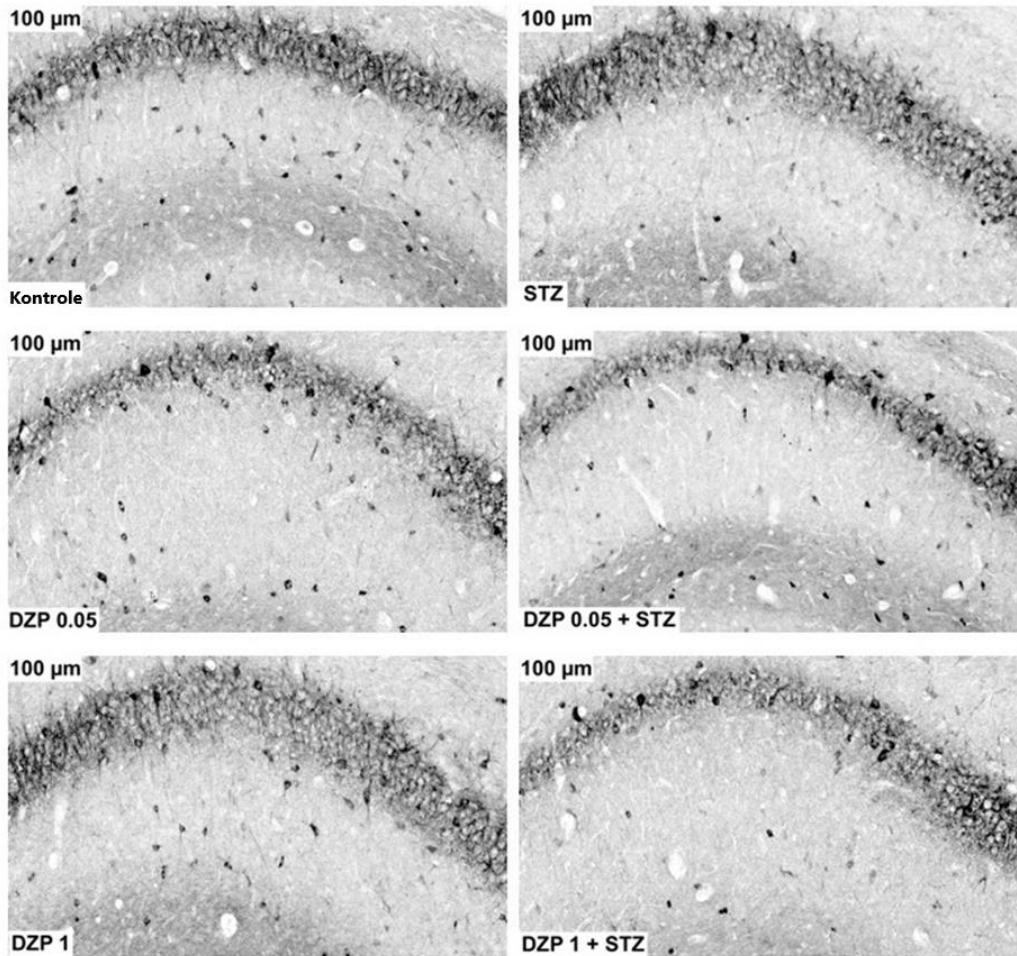
3.2. Diazepama devu ietekme uz GAD67 blīvumu garozā un hipokampā

STZ ietekmēja GAD67, samazinājot tās ekspresiju. Imūnhistoķīmiskās analīzes gaitā tika noteikts, ka diazepama abas devas (0,05 un 1 mg/kg) palielina GAD67 ekspresiju garozā un hipokampā, tādā veidā veicinot GABA sintēzi.



9.att. GAD67 ekspresijas izmaiņas garozā

(B) Ir novērojama statistiski ticama atšķirība starp kontroles un STZ grupu (* $P \leq 0,05$), kas norāda uz STZ spēju samazināt GAD67 ekspresiju garozā. Ir statistiski ticama atšķirība starp ārstēšanas grupām ar abām diazepama devām un STZ grupu (# $P \leq 0,05$ un # $P \leq 0,05$), kas nozīmē, ka abas diazepama devas spēj palielināt GAD67 blīvumu, tādā veidā veicinot GABA sintēzi. Izmantotais palielinājums attēliem 200x.

A

10.att. GAD67 ekspresijas izmaiņas hipokampā

(B) Ir novērojama statistiski ticama atšķirība starp kontroles un STZ grupu (** $P \leq 0,01$), kas norāda uz STZ spēju samazināt GAD67 ekspresiju hipokampā. Ir statistiski ticama atšķirība starp ārstēšanas grupām ar abām diazepama devām un STZ grupu ($\#\#P \leq 0,05$ un $\#\#P \leq 0,05$), kas nozīmē, ka abas diazepama devas spēj palielināt GAD67 blīvumu, tādā veidā veicinot GABA sintēzi.

4. DISKUSIJA

Vairākas AS ārstēšanas terapijas ir pētītas un pielietotas klīnikā. Šobrīd AS slimniekiem parasti tiek izrakstīts NMDA receptoru antagonists memantīns un AchEi (donepezils, galantamīns un rivastigmīns) monoterapijā vai kombinācijā, toties šie medikamenti tikai samazina simptomus, bet nespēj preventēt slimību un apturēt tās progresēšanu. Tāpēc dažādas zāļu vielas tiek pētītas, meklējot jaunu potenciālu terapiju, kas būtu vērsta ne tikai uz simptomātisku ārstēšanu, bet arī uz neuroiekaisuma mazināšanu, neurotransmiteru sistēmu disbalansa novēršanu un kopumā AS preventēšanu.

Vairākos pētījumos tika apskatīti BZD efekti. Retrospektīvo pētījumu rezultāti liecina, ka kumulatīva BZD lietošana ilgāk par 3 mēnešiem var palielināt demences risku, kā arī BZD ar ilgāku eliminācijas puslaiku varētu būt viskaitīgākā iedarbība, negatīvi ietekmējot kognitīvās spējas [Billioti de Gage et al., 2012]. Ilgstoša ārstēšana ar BZD veselīgiem cilvēkiem ir saistīta ar paaugstinātu atkarības un abstinences sindroma risku, savukārt demences pacientiem ir novēroti arī kognitīvie traucējumi un vairākas blakusparādības, piemēram, amnēzija, apjukums, sedācija, kā arī citas nevēlāmas zāļu blakusreakcijas [Defrancesco et al., 2015].

Diazepama efekti dzīvnieku modeļos pie dažādiem patoloģiskiem stāvokļiem ir apskatīti vairākos pētījumos. *Umeda et al.* pētījumā tika izveidoti jauni peļu modeļi, ievietojot (*knocking-in*) Osaka mutāciju, kas ir saistīta ar paaugstinātu A β oligomerizāciju, endogēnā peles APP. Izveidoti homozigoti, heterozigoti un netransgēni (*non-knockin*) metieni tika pētīti un salīdzināti atmiņas testos, neiropatoloģijā un sinaptiskajā plasticitātē. Homozigotiem novēroja atmiņas pasliktināšanos 4 mēnešu laikā, savukārt heterozigotiem tie neparādījās pat 8 mēnešu laikā. Imūnhistoķīmiskās un bioķīmiskās analīzes atklāja, ka tikai homozigotos pēc 8 mēnešiem parādījās A β oligomēru intraneironālā akumulācija, kam sekoja patoloģiska τ fosforilēšanās, sinapšu zudums, glijas aktivācija un neironu zudums. Tā kā APP tika pierādīta ietekme GABAerģisko sinapšu veidošanā, novērota GABAerģiskās sistēmas hipoaktivācija varētu būt saistīta ar APP funkciju traucējumiem, ko, iespējams ir izraisījusi Osaka mutācija. A β produkcija tika novērota atkarībā no neironālās aktivitātes, un, tā kā GABA ir inhibējošais neurotransmiters, tika izvirzīta hipotēze, ka GABAerģiskās sistēmas hipoaktivācija varētu izraisīt nenormālu neironālo aktivāciju un tādā veidā sekmēt A β veidošanos un akumulāciju. Tāpēc GABA agonisti varētu preventēt A β akumulāciju homozigotos. Lai pārbaudītu šo hipotēzi, diazepamam *per os* tika administrēts homozigotiem devā 2 μ g dienā no 6 mēnešu vecuma, un tālāk tika pārbaudīta to atmiņa, kā arī vēlāk A β patoloģija 8 mēnešu vecumā. Diazepama terapija uzlaboja atmiņu, inhibēja A β oligomēru uzkrāšanos un sinapšu zuduma procesu, bet neietekmēja parvalbumīna pozitīvos GABAerģiskos neironus *dentate gyrus*

homozigotos. Rezultāti liecina, ka A β uzkrāšanās pelēm ar Osaka mutāciju ir atkarīga no agrīnās GABAergiskās sistēmas hipoaktivācija un diazepams varētu uzrādīt pozitīvos efektus šajā modelī [Umeda et al., 2017].

Béracochéa et al. pētījuma mērķis bija pierādīt diazepama ietekmi uz hipokampa glikokortikoīdu koncentrāciju, kā arī hipokampa atkarīgo atmiņu vidēja vecuma pelēm pie akūta stresa. Atkarībā no diazepama devas (0,25-0,5 mg/kg) dzīvniekiem (28-35 g) tika novērota samazināta kortikosterona koncentrācija hipokampā un uzlabota hipokampa atkarīgā atmiņa. Savukārt vislielākā diazepama deva (1,0 mg/kg) izraisīja hipokampa kortikosterona koncentrācijas samazināšanos, kas bija lielāka, salīdzinot ar to, ko konstatēja, lietojot divas citas diazepama devas, toties samazināja hipokampa atkarīgās atmiņas efektivitāti. Kopumā šis pētījums parādīja diazepama spēju atjaunot hipokampa atkarīgo atbildi pret stresu, kas ir saistīta ar kortikosterona koncentrāciju, vidēja vecuma dzīvniekiem, kā arī nelielās devās uzlabot hipokampa atkarīgo atmiņu [Béracochéa et al., 2011].

Bibolini et al. pētījumā ar diazepamu tika pētīta tā ietekme uz eksperimentālā autoimūnā encefalomiēlīta (EAE) attīstību. Diazepama ievadīšana ip devās 0,05 vai 0,1 mg 6 dienu laikā 6. vai 11. dienā pēc EAE indukcijas izraisīja ievērojamu slimības biežuma un histoloģisko pazīmju samazināšanos. Tika novērota arī samazināta celulārā reaktivāte un antivielu atbildes reakcija pret encefalitogēno miēlīna pamatproteīnu. Papildus diazepama iedarbībai uz autoimūno un iekaisuma atbildes reakciju tika novērota pozitīva ietekme uz neurotransmisiju. Diazepama ārstēšanas terapija inhibēja glutamāta izdalīšanas samazinājumu priekšējās garozas sinaptosomās EAE dzīvniekiem. Pētījuma dati liecina par to, ka GABAergiskās sistēmas potencēšana ar diazepamu spēj uzlabot stāvokli pie EAE [Bibolini et al., 2011].

Šajā pētījumā tika pētīts diazepama mazās un vidējās devas ietekme uz neuroiekaisuma marķiera ekspresijas blīvumu un GABA sintēzes enzīma ekspresijas blīvumu hipokampā un garozā žurkām, kurām ar STZ tika nomodolēta AS. Gan 0,05, gan 1 mg/kg diazepama deva uzrādīja spēju mazināt astroglijas aktivāciju un neuroiekaisumu, kā arī palielināt GABA sintēzi. Kopumā no šī pētījuma var secināt par diazepama labvēlīgo ietekmi uz STZ izraisīto AS dzīvnieku modelī.

5. SECINĀJUMI

1. STZ var tikt veiksmīgi pielietots pētījumos AS modelēšanai dzīvniekos, jo tas spēj izraisīt AS līdzīgus patofizioloģiskus procesus, aktivējot astrogliju un veicinot neuroiekaisumu, kā arī samazinot GAD67 līmeni un GABA sintēzi smadzeņu struktūrās (hipokampā un garozā).
2. Diazepama divas devas (0,05 un 1 mg/kg) spēj samazināt GFAP ekspresiju garozā un hipokampā, tādā veidā novēršot astrocītu hiperaktivāciju un neuroiekaisumu.
3. Diazepams abās devās spēj palielināt GAD67 ekspresiju gan garozā, gan hipokampā, tādā veidā sekmējot GABA sintēzi un normalizējot GABAerģiskās sistēmas neurotransmisiju.
4. Kopumā no šī pētījuma var secināt par GABA_A agonista diazepama spēju mazā un vidējā devā mazināt toksīna STZ izraisīto neuroiekaisumu un GABAerģiskās sistēmas disbalansu, palielinot GABA sintēzi.

Pateicības

Patiess paldies darba vadītājam Mg. pharm. Karīnai Narbutei par ideju bakalaura darbam, par iespēju iepazīties un apgūt imūnhistoķīmijas metodi, iespēju piedalīties dzīvnieku uzvedības testos, kā arī par atbalstu visa bakalaura darba tapšanas laikā.

Literatūras saraksts

1. Allaman, Igor, et al. "Amyloid- β aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability." *Journal of Neuroscience* 30.9 (2010): 3326-3338.
2. Alzheimer's Association. "2017 Alzheimer's disease facts and figures." *Alzheimer's & Dementia* 13.4 (2017): 325-373.
3. Anderson, Mark A., Yan Ao, and Michael V. Sofroniew. "Heterogeneity of reactive astrocytes." *Neuroscience letters* 565 (2014): 23-29.
4. Aprahamian, Ivan, Florindo Stella, and Orestes V. Forlenza. "New treatment strategies for Alzheimer's disease: is there a hope?." *The Indian journal of medical research* 138.4 (2013): 449.
5. Atack, John R. "Preclinical and clinical pharmacology of the GABAA receptor $\alpha 5$ subtype-selective inverse agonist $\alpha 5$ IA." *Pharmacology & therapeutics* 125.1 (2010): 11-26.
6. Atack, John R., et al. "In vitro and in vivo properties of 3-tert-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1H-1, 2, 4-triazol-5-ylmethoxy)-pyrazolo [1, 5-d]-[1, 2, 4] triazine (MRK-016), a GABAA receptor $\alpha 5$ subtype-selective inverse agonist." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331.2 (2009): 470-484.
7. Ballard, Theresa M., et al. "RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABA A $\alpha 5$ subunit-containing receptors." *Psychopharmacology* 202.1-3 (2009): 207-223.
8. Barage, Sagar H., and Kailas D. Sonawane. "Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease." *Neuropeptides* 52 (2015): 1-18.
9. Béracochéa, Daniel, et al. "Interaction between diazepam and hippocampal corticosterone after acute stress: impact on memory in middle-aged mice." *Frontiers in behavioral neuroscience* 5 (2011): 14.
10. Biasibetti, Regina, et al. "Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex." *Behavioural brain research* 316 (2017): 205-214.
11. Bibolini, M. J., et al. "Inhibitory role of diazepam on autoimmune inflammation in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis." *Neuroscience* 199 (2011): 421-428.
12. Billioti de Gage, Sophie, et al. "Benzodiazepine use and risk of dementia: prospective population based study." *BMJ (Clinical research ed.)* 345 (2012): e6231.
13. Calsolaro, Valeria, and Paul Edison. "Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions." *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 12.6 (2016): 719-732.
14. Cárdenas-Aguayo, M. del C., et al. "Physiological role of amyloid beta in neural cells: the cellular trophic activity." *Neurochemistry*. InTech (2014): 257-281.

15. Chen, Ming. "The maze of APP processing in Alzheimer's disease: where did we go wrong in reasoning?." *Frontiers in cellular neuroscience* 9 (2015): 186.
16. Chun, Heejung, and C. Justin Lee. "Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: A double-edged sword." *Neuroscience research* 126 (2018): 44-52.
17. Cryan, John F., and Klemens Kaupmann. "Don't worry 'B'happy!: a role for GABAB receptors in anxiety and depression." *Trends in Pharmacological Sciences* 26.1 (2005): 36-43.
18. Cummings, Jeffrey L. "Optimizing phase II of drug development for disease-modifying compounds." *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 4.1 (2008): S15-S20.
19. Dawson, G. R., et al. "An inverse agonist selective for $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors enhances cognition." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316.3 (2006): 1335-1345.
20. Defrancesco, Michaela, et al. "Use of benzodiazepines in Alzheimer's disease: a systematic review of literature." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18.10 (2015).
21. Drott, Jason, et al. "Etazolate improves performance in a foraging and homing task in aged rats." *European journal of pharmacology* 634.1-3 (2010): 95-100.
22. Findeis, Mark A. "The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease." *Pharmacology & therapeutics* 116.2 (2007): 266-286.
23. Froestl, Wolfgang, et al. "SGS742: the first GABAB receptor antagonist in clinical trials." *Biochemical pharmacology* 68.8 (2004): 1479-1487.
24. Gallacher, John, et al. "Benzodiazepine use and risk of dementia: evidence from the Caerphilly Prospective Study (CaPS)." *Journal of Epidemiology and Community Health* 10 (2011): 869-873.
25. Getova, Damianka, and Norman Bowery. "Effects of high-affinity GABA B receptor antagonists on active and passive avoidance responding in rodents with gamma-hydroxybutyrolactone-induced absence syndrome." *Psychopharmacology* 157.1 (2001): 89-95.
26. Golde, Todd E. "The A β Hypothesis: Leading Us to Rationally-Designed Therapeutic Strategies for the Treatment or Prevention of Alzheimer Disease." *Brain Pathology* 15.1 (2005): 84-87.
27. Govindpani, Karan, et al. "Towards a Better understanding of GABAergic remodeling in Alzheimer's disease." *International Journal of Molecular Sciences* 18.8 (2017): 1813.

28. Graham, Melanie L., et al. "The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources." *Comparative medicine* 61.4 (2011): 356-360.
29. Grieb, Paweł. "Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism." *Molecular neurobiology* 53.3 (2016): 1741-1752.
30. Guerrini, Gabriella, et al. "Synthesis of novel cognition enhancers with pyrazolo [5, 1-c][1, 2, 4] benzotriazine core acting at γ -aminobutyric acid type A (GABA A) receptor." *Bioorganic & medicinal chemistry* 21.8 (2013): 2186-2198.
31. Guerrini, Gabriella, et al. "Synthesis, in vivo evaluation, and molecular modeling studies of new pyrazolo [5, 1-c][1, 2, 4] benzotriazine 5-oxide derivatives. Identification of a bifunctional hydrogen bond area related to the inverse agonism." *Journal of medicinal chemistry* 52.15 (2009): 4668-4682.
32. Guo, Tong, Wendy Noble, and Diane P. Hanger. "Roles of tau protein in health and disease." *Acta neuropathologica* 133.5 (2017): 665-704.
33. H Ferreira-Vieira, Talita, et al. "Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system." *Current neuropharmacology* 14.1 (2016): 101-115.
34. Helm, K. A., et al. "GABAB receptor antagonist SGS742 improves spatial memory and reduces protein binding to the cAMP response element (CRE) in the hippocampus." *Neuropharmacology* 48.7 (2005): 956-964.
35. Jo, Seonmi, et al. "GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease." *Nature medicine* 20.8 (2014): 886.
36. Kamat, Pradip Kumar. "Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism." *Neural regeneration research* 10.7 (2015): 1050.
37. Kandimalla, Ramesh, Vani Thirumala, and P. Hemachandra Reddy. "Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? A critical appraisal." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1863.5 (2017): 1078-1089.
38. Knust, Henner, et al. "The discovery and unique pharmacological profile of RO4938581 and RO4882224 as potent and selective GABA A α 5 inverse agonists for the treatment of cognitive dysfunction." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19.20 (2009): 5940-5944.
39. Konishi, Kimiko, et al. "Hypothesis of endogenous anticholinergic activity in Alzheimer's disease." *Neurodegenerative Diseases* 15.3 (2015): 149-156.
40. Kumar, Anil, and Arti Singh. "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update." *Pharmacological Reports* 67.2 (2015): 195-203.

41. Lanctôt, Krista L., et al. "GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia." *The Canadian Journal of Psychiatry* 49.7 (2004): 439-453.
42. LaSarge, Candi L., et al. "Blockade of GABA (B) receptors completely reverses age-related learning impairment." *Neuroscience* 164.3 (2009): 941-947.
43. Lee, Bo Young, Ju Yeon Ban, and Yeon Hee Seong. "Chronic stimulation of GABAA receptor with muscimol reduces amyloid β protein (25–35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical cells." *Neuroscience research* 52.4 (2005): 347-356.
44. Li, Yanfang, et al. "Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer's disease." *Frontiers in aging neuroscience* 8 (2016): 31.
45. Li, Xiaohua, Dalin Song, and Sean X. Leng. "Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment." *Clinical interventions in aging* 10 (2015): 549.
46. Limon, Agenor, Jorge Mauricio Reyes-Ruiz, and Ricardo Miledi. "Loss of functional GABAA receptors in the Alzheimer diseased brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.25 (2012): 10071-10076.
47. Liu, Yinxing, et al. "Circulating neprilysin clears brain amyloid." *Molecular and Cellular Neuroscience* 45.2 (2010): 101-107.
48. Lucin, Kurt M., and Tony Wyss-Coray. "Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little?." *Neuron* 64.1 (2009): 110-122.
49. Mayeux, Richard. "Early Alzheimer's disease." *New England Journal of Medicine* 362.23 (2010): 2194-2201.
50. Manto, Mario U., et al. "Respective implications of glutamate decarboxylase antibodies in stiff person syndrome and cerebellar ataxia." *Orphanet journal of rare diseases* 6.1 (2011): 3.
51. Marcade, Maryline, et al. "Etazolate, a neuroprotective drug linking GABAA receptor pharmacology to amyloid precursor protein processing." *Journal of neurochemistry* 106.1 (2008): 392-404.
52. Mehta, Mona, Abdu Adem, and Marwan Sabbagh. "New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease." *International Journal of Alzheimer's disease* 2012 (2012): 728983.
53. Middeldorp, Jinte, and E. M. Hol. "GFAP in health and disease." *Progress in neurobiology* 93.3 (2011): 421-443.

54. Mitoma, Hiroshi, Mario Manto, and Christiane S. Hampe. "Pathogenic roles of glutamic acid decarboxylase 65 autoantibodies in cerebellar ataxias." *Journal of immunology research* 2017 (2017): 2913297.
55. Mizoguchi, Hiroyuki, and Kiyofumi Yamada. "Pharmacologic treatment with gabab receptor agonist of methamphetamine-induced cognitive impairment in mice." *Current neuropharmacology* 9.1 (2011): 109-112.
56. Olsson, Fredrik, et al. "Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A β) production under near-native conditions." *Journal of Biological Chemistry* 289.3 (2014): 1540-1550.
57. Pilipenko, Vladimirs, et al. "Very low doses of muscimol and baclofen ameliorate cognitive deficits and regulate protein expression in the brain of a rat model of streptozocin-induced Alzheimer's disease." *European journal of pharmacology* 818 (2018): 381-399.
58. Postle, Bradley R. "The hippocampus, memory, and consciousness." *The Neurology of Conciousness* (Second Edition). 2016. 349-363.
59. Ravelli, Katherine Garcia, et al. "Intracerebroventricular Streptozotocin as a model of Alzheimer's disease: neurochemical and behavioral characterization in mice." *Neurotoxicity research* 31.3 (2017): 327-333.
60. Schliebs, Reinhard, and Thomas Arendt. "The cholinergic system in aging and neuronal degeneration." *Behavioural brain research* 221.2 (2011): 555-563.
61. Serrano-Pozo, Alberto, et al. "Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 72.6 (2013): 462-471.
62. Shao, Haijun, et al. "Chronic treatment with anesthetic propofol improves cognitive function and attenuates caspase activation in both aged and Alzheimer's disease transgenic mice." *Journal of Alzheimer's Disease* 41.2 (2014): 499-513.
63. Simpson, J. E., et al. "Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain." *Neurobiology of aging* 31.4 (2010): 578-590.
64. Siopi, Eleni, et al. "Etazolate, an α -secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice." *Neuropharmacology* 67 (2013): 183-192.
65. Sofroniew, Michael V., and Harry V. Vinters. "Astrocytes: biology and pathology." *Acta neuropathologica* 119.1 (2010): 7-35.
66. Solas, Maite, Elena Puerta, and Maria J Ramirez. "Treatment options in alzheimer s disease: The GABA story." *Current pharmaceutical design* 21.34 (2015): 4960-4971.

67. Thameem Dheen, S., Charanjit Kaur, and Eng-Ang Ling. "Microglial activation and its implications in the brain diseases." *Current medicinal chemistry* 14.11 (2007): 1189-1197.
68. Umeda, Tomohiro, et al. "Mutation-induced loss of APP function causes GABAergic depletion in recessive familial Alzheimer's disease: analysis of Osaka mutation-knockin mice." *Acta neuropathologica communications* 5.1 (2017): 59.
69. Van Cauwenberghe, Caroline, Christine Van Broeckhoven, and Kristel Sleegers. "The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives." *Genetics in Medicine* 18.5 (2016): 421.
70. van Dyck, Christopher H. "Anti-amyloid- β monoclonal antibodies for Alzheimer's disease: Pitfalls and promise." *Biological psychiatry* 83.4 (2018): 311-319.
71. Vellas, Bruno, et al. "EHT0202 in Alzheimer's disease: a 3-month, randomized, placebo-controlled, double-blind study." *Current Alzheimer Research* 8.2 (2011): 203-212.
72. Verkhratsky, Alexei, et al. "Astrocytes in Alzheimer's disease." *Neurotherapeutics* 7.4 (2010): 399-412.
73. Wang, Wen-Ying, et al. "Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease." *Annals of translational medicine* 3.10 (2015): 136.
74. Wilquet, Valérie, and Bart De Strooper. "Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration." *Current opinion in neurobiology* 14.5 (2004): 582-588.
75. Zhang, Yiying, et al. "Chronic treatment with anesthetic propofol attenuates β -amyloid protein levels in brain tissues of aged mice." *Translational neurodegeneration* 3.1 (2014): 8.