

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

MEDICĪNAS FAKULTĀTE

FARMĀCIJAS BAKALaura STUDIJU PROGRAMMA

**GABA_A AGONISTA MUSCIMOLA
IETEKME UZ ŽURKU ATMIŅU
ALCHEIMERA SLIMĪBAS TIPĀ MODELĪ**

BAKALaura DARBS

Autors: Dāvis Cibuļskis

Studenta apliecības Nr.: dc12017

Darba vadītājs: Mag. pharm. Vladimirs Piļipenko

RĪGA 2015

ANOTĀCIJA

Darba mērķis bija noskaidrot GABA_A agonista muscimola mazo devu ietekmi uz žurku atmiņu icv STZ AD tipa modelī. Lai noteiktu žurku iemācīšanos un atmiņu, tika veikti ūdens labirinta treniņtesti un fināla tests. Rezultāti rāda, ka icv STZ ievade žurkām izraisīja telpiskās atmiņas traucējumus. Muscimols abās devās (0,01 un 0,05 mg/kg) aizsargāja žurkas no STZ izraisītiem efektiem ūdens labirinta testā, uzlabojot to telpisko atmiņu, iemācīšanos un lokomotoro aktivitāti. Iegūtie dati ļauj secināt, ka muscimola mazo devu potenciāls ir intriģējošs jauno anti-AD terapiju izpētē un, ka būtu nepieciešama muscimola hronisko efektu izpēte minētajā modelī.

Atslēgvārdi: Alzheimerera slimība, GABA, muscimols, streptozocīns, ūdens labirinta tests

ANNOTATION

The aim of this work was to detect GABA_A agonist muscimol low dose effects on rat memory in icv STZ AD-type model. To determine rat learning and memory, Morris water maze test has been implemented. Results showed that icv administration of STZ impaired spatial memory in rats in training tests and memory in probe trial. Administration of muscimol at both doses (0.01 mg/kg and 0.05 mg/kg) protected against the STZ-induced effects in main training tests and probe trial, improving rat spatial memory, learning and locomotor activity. Obtained data suggest the great potential and necessity of muscimol research in anti-AD therapies and the need for a study of muscimol effects after chronic administration in the current model.

Keywords: Alzheimer's disease, GABA, muscimol, streptozocin, Morris water maze

SATURA RĀDĪTĀJS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS.....	4
IEVADS	5
1. LITERATŪRAS APSKATS	6
1.1. Alzheimer slimība un tās etioloģija	6
1.2. Alzheimer slimības patoģenēze	7
1.2.1. Amiloīda-beta peptīdu nogulsnešanos.....	7
1.2.2. <i>Tau</i> proteīna fosforilēšanas traucējumi.....	8
1.2.3. Beta- un gamma- sekretāzes	9
1.2.4. Oksidatīvais stress	9
1.2.5. Glutamaterģiskā sistēma un ekscitotoksicitāte	11
1.2.6. Izmaiņas GABAerģiskajā sistēmā	12
1.2.7. Insulīna un glikozes metabolisms smadzenēs.....	14
1.3. Alzheimer slimības terapija	15
1.3.1. Antioksidanti	15
1.3.2. Aktivējošās sistēmas darbības regulēšana un holīnerģiskie līdzekļi	17
1.3.3. Uz multimeriem CNS šūnās orientētie ligandi	18
1.3.4. GABA _A agonists muscimols.....	19
1.4. In vivo pētījumu modeļi.....	20
1.4.1. Transģeno peļu modeļi	20
1.4.2. STZ modelis	22
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	20
2.1. Dzīvnieki	25
2.2. Šķīdumi.....	25
2.3. Eksperimenta dizains	25
2.4. Intracerebroventrikulārā (icv) vielu ievade.....	26
2.5. Ūdens labirinta (<i>Morris water maze</i>) tests.....	26
2.6. Statistika	27
3. REZULTĀTI	28
3.1. Izbēgšanas latence	28
3.2. Fināla tests	29
3.2.1. Pavadītais laiks kvadrantā, kurā iepriekš bija platforma	29
3.2.2. Platformas zonas šķērsošana	30
3.2.3. Peldēšanas ātrums.....	31
4. DISKUSIJA	32
5. SECINĀJUMI.....	34
PATEICĪBAS.....	35
IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI.....	36
DOKUMENTĀRĀ LAPA	48

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

τ	tau proteīns
2TCD	otrā tipa cukura diabēts
A β	amiloīda- β peptīds
ACh	acetilholīns
AChE	acetilholīnesterāze
ACI	acetilholīnesterāzes inhibitori
aCSF	mākslīgs cerebrospinālais šķīdums (artificial cerebrospinal fluid)
AD	Alcheimera slimība (Alzheimer's disease)
APP	amiloīda prekursora proteīns
ATF	adenozīntrifosfāts
Ca ²⁺	kalcija joni
ChAT	holīnacetiltransferāze
Cl ⁻	hlora joni
GABA	γ -amino-sviestskābe (γ -Aminobutyric acid)
GAPDH	gliceraldehīd-3-fosfāta dehidrogenāze
icv	intracerebroventrikulāri
i.p.	intraperitoneāli
IGF	insulīnam līdzīgais augšanas faktors (insulin-like growth factor)
Mg ²⁺	magnija joni
MWM	ūdens labirinta tests (Morris water maze)
MTDL	uz multimērķiem CNSšūnās orientētie ligandi
NFT	neirofibrilāri mezgli (<i>Neurofibrillary tangles</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartāts
PSEN1	presenilīns 1
PSEN2	presenilīns 2
ROS	reaktīvās skābekļa formas (<i>reactive oxygen species</i>)
STZ	streptozocīns

IEVADS

AD ir lēni progresējoša slimība, kas ar katru gadu kļūst arvien izplatītāka. Visā pasaulē apmēram 36 miljoniem cilvēku ir demence, kā arī katru gadu tiek diagnosticēts vidēji 4,6 miljonu pacientu ar AD. Tā ir neirodeģeneratīva slimība, kas visbiežāk parādās gados vecākiem cilvēkiem. Galvenokārt tā izpaužas kā atmiņas traucējumi, izmaiņas uzvedībā un nespēja pašam par sevi parūpēties. Tādējādi cilvēkiem ar AD arvien vairāk izmainās viņu ikdienu līdz viņi kļūst atkarīgi no citiem. AD ir ļoti liela ietekme ne tikai uz slimnieku, bet arī uz tā aprūpētājiem. Bieži vien tie ir slimnieku radi, draugi vai ģimenes locekļi, kuriem tas ir ļoti nogurdinošs un emocionāli smags slogs.

Uz doto brīdi AD nevar izārstēt vai apturēt tās progresēšanu, taču ir iespējama simptomu mazināšana. Tāpēc visā pasaulē notiek pētījumi un tiek meklētas arvien jaunas metodes, kuras spētu apturēt AD, atjaunot smadzeņu šūnas vai novērst šīs slimības rašanos.

Tā kā ir zināms, ka pie AD notiek glutamāterģiskās sistēmas pārlietu liela aktivācija, kura veicina neuroiekaisumu un neirodeģenerāciju, tad visas līdzšinējās terapijas ir mērķētas uz aktivējošo sistēmu. Tomēr pēdējā laikā arvien vairāk tiek runāts par GABA lomu AD un inhibitorās sistēmas regulāciju.

Šī darba **mērķis** bija noskaidrot $GABA_A$ agonista muscimola ietekmi uz žurku atmiņu AD tipa modelī, kuru izraisīja intracerebroventrikulāra (icv) streptozocīna (STZ) ievadīšana.

Lai varētu sasniegt doto mērķi tika izvirzīti šādi **darba uzdevumi**:

1. Izveidot AD tipa modeli žurkām, ievadot tām icv STZ;
2. Optimizējot nosacījumus, pielietot ūdens labirinta testu;
3. Iegūt treniņu dienās datus par žurku izbēgšanas latenci un fināla testā - žurku pavadīto laiku kvadrantā, kurā iepriekš bija platforma, platformas zonas šķērsošanas skaitu un peldēšanas ātrumu.
4. Veikt iegūto datu analīzi.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Alcheimera slimība un tās etioloģija

Demence ir iegūts sindroms, ko raksturo atmiņas zudums vai tās pasliktināšanās, kā arī traucējumi citās kognitīvajās funkcijās. Tā parāda personas intelektuālo funkciju pasliktināšanos, kas ir pietiekami, lai traucētu indivīda ikdienas darbaspējas. Vislielākais demences cēlonis ir Alcheimera slimība (*Alzheimer's disease, AD*), jo uzskata, ka tā ir iesaistīta apmēram 60 – 70% gadījumos (Barker et al., 2002).

Klīniski AD simptomi parasti parādās pēc 65 gadiem un pacientiem kļūstot vecākiem, to biežums pieaug. Šie AD gadījumi bieži tiek apzīmēti kā „sporādiski” vai „vēlīni”. AD iedala divās formās: sporādiskā vai vēlīnā un iedzimtajā. Sporādiskā AD ir saistīta ar >99% gadījumu. Arī ģenētiskie faktori veicina sporādiskā AD attīstības risku. Iedzimtā AD forma sastāda ap 1% no visiem AD gadījumiem un tiek pārmantots autosomāli dominantā veidā. Šajā AD formā klīniskie simptomi iestājas jau 30 – 40 gados (Levy et al., 1990; Van Broeckhoven et al., 1990; Goate et al., 1991). Ap 75 gadiem 25 – 30% indivīdu jau uzrāda būtiskus Alcheimera tipa smadzeņu bojājumus (Price et al., 2009).

Lai varētu diagnosticēt AD, ir jābūt klīniskiem pierādījumiem, ka pacientam ir atmiņas zudums un pasliktināšanās vismaz vienā citā kognitīvajā funkcijā, kā arī traucējumiem sociālajās vai darba funkcijās. AD jābūt diferencētam no citiem demences cēloņiem: Vaskulārā demence, demence ar Levi ķermenīšiem, Parkinsona slimība ar demenci, frontotemporālā demence un atgriezeniskās demences. Atkarībā no tā, kāda vieta smadzenēs ir skarta, sākuma klīniskajā ainā var sagaidīt ievērojamu mainīgumu (Braak et al., 2006).

Diemžēl īsta AD ir nerimstoši progresīva, par spīti visām pieejamām terapijām. Sākuma mēnešos atmiņas pasliktināšanās vairāku mēnešu un gadu laikā pārvēršas par dezorientāciju, personības un saprāta disfunkciju, runas anomālijām, un apraksijām, kā arī citiem simptomiem (Castellani et al., 2010).

Būtiska AD iezīme, indivīda kognitīvo spēju pasliktināšanās, ir ar mēnešu sākumu vairāku mēnešu laikā, kam seko pakāpeniska, taču nerimstoša attīstība līdz smagai demencei. AD demences laiks ir apmēram 7 – 10 gadi, līdz slimība nenovēršami beidzas ar indivīda nāvi. Traucēta nesena atmiņa parasti ir AD sākuma simptoms, taču citi kognitīvie defekti, tādi kā pārmaiņas uzmanībā un problēmu risināšanas spējās, arī parasti ir klātesoši. Demencei attīstoties bieži ir novērojami valodas traucējumi, vizualizācijas grūtības, izpratnes zudums, un personības pārmaiņas (darbības pārtraukšana, samazināta iniciatīva, dažreiz arī depresija).

Lai gan tuvi piederīgie un draugi zina, ka skartā indivīda kognitīvās funkcijas ir pasliktinājušās, viņš bieži vien turpina aktivitātes sabiedrībā (arī mehāniska transportlīdzekļa vadīšanu) un var pats par sevi parūpēties, taču vairs ne tik labi kā agrāk. Tāpēc šī persona nepazīstamiem cilvēkiem var likties „normāla”. Šī viegli izteiktā AD demences agrīnā stadija parasti ilgst 2 – 5 gadus. Mērenā stadija raksturojas ar acīmredzamām atmiņas grūtībām (ieskaitot ilgtermiņa atmiņu) un citām kognitīvajām funkcijām, ieskaitot nespēju patstāvīgi strādāt sabiedrībā. Traucētas ir arī spējas veikt dažādus mājas darbus, tāpēc pat parastām ikdienas darbībām (apģērbšanās, mazgāšanās, kopšana) ir vajadzīga uzraudzība vai palīdzība. Pie smagās stadijas Alcheimera demences indivīdi ir pilnībā atkarīgi no aprūpētājiem visās ikdienas dzīves darbībās, kā arī pie progresējošas slimības bieži kļūst mēmi, nespējīgi staigāt, un nespēj norīt vai kontrolēt sava urīnpūšļa un zarnu funkcijas. Tāpēc AD ir liels ekonomisks un sociāls slogs pacientu tuviniekiem un aprūpētājiem (Holtzman et al., 2011).

1.2. Alcheimera slimības patoģenēze

1.2.1. Amiloīda-beta peptīdu nogulsņēšanās

Lai gan precīzi AD attīstības mehānismi nav zināmi, raksturojot slimības patoloģisko procesu, makroskopiskā līmenī ir novērojama liela smadzeņu atrofija. Mikroskopiskā līmenī, raksturīgākās šīs slimības iezīmes ir amiloīda plātnītes un neirofibrilārie mezgli (divas klasiskās iezīmes), kā arī plašs neironu zudums. Amiloīda plātnītes ir molekulu uzkrājumi smadzeņu ārpusšūnu telpā (Fischer, 2009). Šo plātnīšu galvenais proteīnu komponents ir amiloīda-β peptīds (Aβ), 38 – 43 aminoskābju garš peptīds, kas rodas no daudz lielāka proteīna – amiloīda prekursora proteīna (APP), kura izoformas var būt 695 – 770 aminoskābju garas (Golde et al., 2000; Hardy, Selkoe, 2002). Lai gan APP funkcijas normālā organismā uz doto brīdi vēl nav skaidras, pētījumos ir noskaidrots kā veidojas Aβ. APP tiek sašķelts noteikta garuma sekvencēs, ko veic divas ar membrānu saistītas endoproteāzes – β- un γ-sekretāze (Selkoe, 2001). Ārpusšūnu Aβ plātnītes atrodas lielākajā daļā AD indivīdu smadzenēs un veicina neironu zudumu tādās vietās, kā smadzeņu garoza un hipokamps (Braak, Braak, 1998). Papildus tam Aβ plātnītes izraisa paaugstinātu oksidatīvo stresu (Mattson, 2004), izmaiņas kalcija jonu homeostāzē (Alberdi et al., 2010) un ekscitotoksicitāti, kura veicina gan no apoptozes atkarīgus, gan neatkarīgus šūnu nāves mehānismus (Hynd et al., 2004). Iekšā plātnītēs pats Aβ atrodas nešķīstošu šķiedru un oligomēru veidā (Kayed et al., 2003). Šīs „neirītiskās” plātnītes izvietojas apkārt pietūkušiem, deģenerējušiem aksoniem un dendrītiem. Vietās, kas apņem neirītiskās plātnītes, notiek arī glijas iekaisums jeb glioze ar hipertrofiju un izmaiņām morfoloģijā, kā arī astrocītu un mikroglijas (centrālās nervu sistēmas

imūnās šūnas) proliferācija. Ir zināms, ka glijas šūnas veic aizsardzības funkciju smadzenēs, taču aktivētie astrocīti arī spēj norobežot neuroiekaisuma perēkli, tā veicinot divejādo darbību - ne tikai veicinot smadzeņu bojājumus, bet arī apturot to izplatīšanos (McGeer, McGeer, 1995; Lucin, Wyss-Coray, 2009).

Jaunākajos pētījumos ir atklāts, ka A β ierosina traucējumus arī GABAerģiskās sistēmas darbībā. (Krantic et al., 2012)

1.2.2. *Tau* proteīna fosforilēšanās traucējumi

Otra klasiska AD iezīme ir hiperfosforilēta proteīna *tau* (τ) intracelulāro formu deponēšanās neironos. Nervu šūnu ķermenīšos, kā arī to izaugumu specifiskos smadzeņu rajonos tās attīstās neurofibrilāro mezglu (*Neurofibrillary tangles*, NFT) un neiropila pavedienu veidā, izraisot neirītisko distrofiju (Braak, Braak, 1997). Neironu šūnu ķermeņi un neiropila pavedieni (neironu izaugumos) ir intracelulāras struktūras, kuras pārsvarā sastāv no hiperfosforilēta (sakopota), mikrocaurulīšu saistoša τ proteīna (Goedert et al., 1988; Grundke-Iqbal et al., 1986). *Tau* tiek sintezēts un ražots visos neironos un tiek atrasts arī glijā. Normālā organismā τ darbojas saistoties ar tubulīnu (proteīns, kas veido citoskeleta mikrocaurulītes tādējādi uzturot šūnas struktūru) un stabilizējot mikrocaurulītes. Tomēr AD τ tiek hiperfosforilēts, tad šī τ forma spēj atdalīties no mikrocaurulītēm un pašagregēties, veidojot šūnu ķermenīšos NFT un distrofiskus neirītus. Šajos agregantos ir augsts A β plātnīšu saturs (Kidd, 1963; Lee et al., 1991). Dati ierosina, ka neurofibrilārā patoloģija veicina neironālo disfunkciju un korelē ar AD klīnisko attīstību. Ģenētiskie, bioķīmiskie un neirobioloģiskie pētījumi ierosina, ka tieši agregācijai, konformācijas maiņai un A β dažādo formu veidošanai ir galvenā loma AD patoģenēzes ierosināšanā, kā arī tieši bojājot smadzenes, tiek veicināta kognitīvā pasliktināšanās un demences attīstība (taču, iespējams, ka ir arī citas papildus pārmaiņas, kuras var būt gan saistītas, gan neatkarīgas no A β). Ir pierādījumi, ka τ patoloģija veicina AD klīnisko attīstību; tas ir visticamāk daļēji saistīts ar A β darbības mehānismu, taču pie AD droši vien ir arī τ saistīti smadzeņu bojājumi, kas ir neatkarīgi no A β (Small, Duff, 2008).

1.2.3. Beta un gamma sekretāzes

No amiloīda prekursora proteīna sašķelšanas ar β - un γ -sekretāzēm rodas β -amiloīda peptīds. Uzskata, ka tas izraisa neironu nāvi un demenci AD. β - un γ -sekretāžu daudzumi palielinās jūtīgās smadzeņu vietās pie AD, taču šī procesa darbības mehānisms nav zināms (Pluta et al., 2013).

β -Sekretāze sašķeļ amiloīda prekursora proteīnu pie β -amiloīda peptīda N-gala. Šī proteāze izpaužas neironu un glijas šūnās. Individīdiem ar AD β -sekretāzes daudzums, aktivitāte un tās produkti plātnītēs ir palielināti (Colciaghi et al., 2004). Papildus, pārmaiņas β -sekretāzes ekspresijā un aktivitātē norāda uz transkripcijas un/vai translācijas kontroli pār β -sekretāzes ekspresiju smadzenēs (Rossner et al., 2006). β -Sekretāze un amiloīda prekursora proteīni izmanto līdzīgus pārvietošanās ceļus un atrodas endosomās, tādējādi nodrošinot optimālu β -sekretāzes aktivitāti. Tam visam seko ievērojama iekššūnu β -amiloīda peptīda palielināšanās, kā arī funkcionālas un morfoloģiskas apoptotiskas neironu nāves pazīmes (Tabaton, Tamagno, 2007).

γ -Sekretāze ir iekšmembrānu proteāzes komplekss, kas sastāv no četriem būtiskiem membrānas proteīniem – *anterior pharynx-defective 1* (aph-1), presenilīna pastiprinātājs 2 (*presenilin enhancer 2*, pen-2), nikastrīns un presenilīns. Aph-1, pen-2 un nikastrīns darbojas kā γ -sekretāzes transportieri, un tie identificē proteāzes substrātus. Presenilīns kompleksā ir kā katalītiski aktīva γ -sekretāzes sastāvdaļa. γ -Sekretāze sašķeļ daudzus 1. tipa membrānas proteīnus, ieskaitot Notch receptoru (Arumugam et al., 2006), amiloīda prekursora proteīnu (Tabaton, Tamagno, 2007) un zema blīvuma lipoproteīnu receptora saistītu proteīnu (Polavarapu et al., 2008). γ -Sekretāze ir svarīga ar to, ka šis enzimatiskais komplekss atbild par amiloīda prekursora proteīna sašķelšanu, no kā, savukārt, veidojas β -amiloīda peptīds – viens no galvenajiem amiloīdo plātnišu komponentiem AD (Heneka, O'Banion, 2007). Presenilīns ir iesaistīts dažādos procesos, ieskaitot, ietekmi uz kalcija un glutamāta homeostāzi un šūnas nāvi (Pluta et al., 2009). Jaunākie dati rāda, ka mikroglijas šūnas un astrocīti uzrādīja pārmērīgu presenilīna un nikastrīna ekspresiju pēc smadzeņu bojājumiem (Nadler et al., 2008).

1.2.4. Oksidatīvais stress

Oksidatīvais stress un tāda veida bojājumi, kā proteīnu, lipīdu un DNS oksidēšanās, ir cieši saistīti ar AD veidošanos (Nunomura et al., 2006). Par oksidatīvo stresu uzskata izmaiņas līdzsvarā starp reaktīvo skābekļa radikāļu (ROS) veidošanos un antioksidatīvo

aizsargspēju, kas atbild par ROS aizvākšanu no organisma. Uzskata, ka tam ir milzu loma ar vecumu saistītā neirodeģenerācijas procesā un kognitīvo funkciju panīkumā (Harman, 1981). ROS un reaktīvie slāpekļa radikāļi (RNS), ieskaitot superoksīda radikāli ($O_2^{\cdot-}$), ūdeņraža peroksīdu (H_2O_2), hidroksilradikāli ($\cdot OH$), un citus, veicina dažādu cilvēka deģeneratīvu slimību patoģenēzi (Jung et al., 2009). Atsevišķi antioksidanti spēj konvertēt brīvos radikāļus par mazāk toksiskiem savienojumiem, tomēr, kad ROS pārsniedz organisma antioksidatīvo spēju kapacitāti patoloģijas, novecošanas vai metabolisku vajadzību dēļ, rodas oksidatīvais stress un izraisa organisma bioloģisku disfunkciju (Yu, 1994)

Lipīdu peroksidācijai ir svarīga loma AD patoģenēzē. A β izraisa membrānu lipīdu peroksidāciju veidojot lipīdu peroksidācijas produktus. ROS pārveido lipīdus un AD pacientu smadzenēs ir ļoti stipras korelācijas starp lipīdu peroksīdu formām, antioksidantu enzīmiem, vecuma plātnītēm un NFT. Ir pierādīts, ka lipīdu peroksidācija ir viens no iemesliem membrānu sarūkšanai AD, jo tās sastāvā ir fosfolipīdi (Markesbery, 1997).

DNS bāzes arī pakļaujas oksidatīvajam stresam un ir pierādīts, ka AD smadzenēs ROS inducē kalcija jonu ieplūšanu caur glutamāta receptoriem, kas ir sākums ekscitotoksicitātes pirmajam solim un noved pie šūnu nāves. DNS un RNS oksidēšanās laikā paaugstinās 8-hidroksi-2-dezoksiguanozīna un 8-hidroksiguanozīna līmeņi. Tie ir DNS oksidēšanās produkti, kuri pārsvarā atrodas A β plātnītēs un NFT, kā arī kalpo par oksidatīvā stresa marķieriem. Paaugstinātie DNS pavedienu pārrāvumu daudzumi AD smadzenēs agrāk tika uzskatīti par apoptozes procesa beigu produktiem, taču arvien vairāk tiek pierādīts, ka pie vainas ir oksidatīvais stress un tas saskan ar brīvo karbonilgrupu pieaugumu neironu kodolos un glijā AD (Nunomura et al., 2001).

Galvenais iemesls, kāpēc mitohondriālie traucējumi ietekmē AD attīstību, ir to spēja aizsākt divus kaitīgus procesus: brīvo radikāļu veidošanos un enerģijas resursu samazināšanos. Galvenā ROS veidošanās vieta ir mitohondriji (Castellani et al., 2002). Pastāvīgi mitohondriju traucējumi AD iekļauj traucējumus elektronu transporta ķēdē, kuri piedalās brīvo radikāļu veidošanā un vairāku oksidatīvā metabolisma enzīmu iztrūkumus. Šie enzīmi ir α -ketoglutarāta dehidrogenāzes komplekss un piruvāta dehidrogenāzes komplekss. Tie ir iesaistīti Krebsa cikla un citohroma oksidāzes procesos. Citohroma oksidāze ir termināla enzīms mitohondriju elpošanas ķēdē un tas atbild par molekulārā skābekļa reducēšanu (Cottrell et al., 2001). Ir ziņots, ka pēc nāves citohroma-c oksidāzes aktivitāte ir zemāka nekā normāli smadzeņu garozā, hipokampā un plātnītēs AD smadzenēs (Mutisya et al., 1994). Tas ir saistīts ar samazinātu mesendžera RNS (mRNS) molekulu ekspresiju AD pacientu smadzenēs (Parker, Parks, 1995). Mitohondriju funkcionālās anomālijas ir cēlonis ROS veidošanai. Pazemināta vaskulārā asins plūsma, A β un amiloīda- β proteīna prekursora

(A β PP) darbība arī ir iesaistīta pie AD veidošanās (Manczak et al., 2006). A β PP ir iesaistīts pie mitohondriju ieplūdes kanāla un potenciāli inhibē mitohondriālo transportu, kas bojā mitohondriālo enerģijas metabolismu un izraisa mitohondriju traucējumus (Reddy et al., 2004).

1.2.5. Glutamāterģiskā sistēma un ekscitotoksicitāte

Neskaitot plātnītes un mezglus, citas neiropatoloģiski un neuroķīmiski raksturīgākās AD iezīmes ietver sinapšu zudumu un selektīvu neironu šūnu nāvi, kā arī noteiktu neurotransmiteru marķieru mazināšanos. Neironi, kas visvairāk tiek pakļauti bojāejai pie AD, ietver tos, kuri atrodas entorinālajā smadzeņu garozā, hipokampa piramidālajos slāņos, kā arī temporālajā, parietālajā un frontālajā garozā. Lai gan lielākā daļa neaizsargāto neironu izmanto glutamātu (smadzeņu galvenais neurotransmiters), ir novēroti arī bazālo priekšējo smadzeņu holīnerģisko neironu un noradrenerģisko neironu (*locus coeruleus*) bojāeja. Holīnerģisko neironu, kuri ir iesaistīti uzmanības un atmiņas procesos, disfunkcija ir pamats „holīnerģiskās terapijas” pielietošanai pie AD (Coyle et al., 1983; Davies, Maloney, 1976). Centrālās darbības zāles, kuras nomāc holīnesterāzi (enzīms, kas sašķeļ neurotransmiteru acetilholīnu), nodrošina nelielu simptomu mazināšanos indivīdiem ar AD (Farlow et al., 2008).

Ir svarīgi atzīmēt, ka cēlonis AD kognitīvajai disfunkcijai pārsvarā nav viena neurotransmitera zudums, bet gan drīzāk tīklojuma savienojuma izjukšana starp vairākiem svarīgiem smadzeņu rajoniem limbiskajā sistēmā un noteiktās vietās *neocortex* rajonā. Viens tāds tīklojums vispirms skarts agrīnā AD ir nosaukts „noklusējuma veida tīkls” (Buckner et al., 2005; Greicius et al., 2004; Sperling et al., 2009). A β nogulsnesāšanās tieši šajā tīklā varētu būt saistīta ar to, ka tam ir augstākā bazālo neironu aktivitāte miera stāvoklī un tas, ka šajā tīklā A β līmeņus regulē neironu aktivitāte (Cirrito et al., 2005; Kamenetz et al., 2003). Vēl ir arī tipiska τ patoloģijas attīstība specifiskos smadzeņu tīklos pie normālas novecošanās un pie AD, kas vispirms sākas tādās vietās kā iegarenās smadzenes un transentorinālais rajons, un pēc tam izplatās viscaur limbiskajai sistēmai un citiem *neocortex* rajoniem (Braak, Braak, 1997) (Braak, Del Tredici, 2011). Lai gan A β un τ patoloģiju atrašanās vietas tikai daļēji sakrīt, ir skaidri redzama mijiedarbība starp A β un τ darbības mehānismiem. Papildus vēl ir jauni pierādījumi no modeļu sistēmām, ka A β un τ veidotie sakopojumi var izplatīties no smadzeņu rajona uz smadzeņu rajonu un no šūnas uz šūnu līdzīgi prioniem (Frost, Diamond, 2010). Piemēram, injicējot cilvēka AD smadzeņu vai peles smadzeņu lizātus, kuri satur cilvēka A β agregātus, ģenētiski modificētas peles smadzenēs, lai attīstītos A β saturošas

amiloīda plāksnītes, rezultātā beidzas ar to, ka A β saistīta patoloģijas iestāšanās notiek daudz ātrāk nekā parasti (Meyer-Luehmann, 2006). Papildus, A β agregāti, kas nogulsņējas, aizgūst morfoloģiskās īpašības gan no injicētā A β , gan no saimnieka A β . *Tau* gadījumā, injicējot smadzeņu izvilkumus no ģenētiski modificētām pelēm, kuras satur τ agregātus, tādu peļu smadzenēs, kuras uzrāda mežonīga tipa cilvēka τ , kurš citos gadījumos neveidotu τ agregātus, rezultātā beidzas ar mežonīgā tipa τ sakopšanos pavedienos un patoloģijas izplatīšanos no injekcijas vietas uz tuvākajiem smadzeņu rajoniem (Clavaguera et al., 2009). Jaunākie šūnu bioloģijas pētījumi ar τ tieši parāda, ka τ agregāti, kuri veidojas vienā šūnā, var pārvietoties uz tuvākajām šūnām un izraisīt saimnieka šūnu τ agregāciju. Šai sfērai izaicinājums ir noskaidrot, vai šim proteīnu agregācijas izplatīšanās mehānismam ir nozīmīga loma slimības attīstībā (Frost, Diamond, 2010).

1.2.6. Izmaiņas GABAergiskajā sistēmā

Galvenais inhibējošais neurotransmitters mugurkaulnieku smadzenēs ir γ -amino sviestskābe (*gamma-Aminobutyric acid*, GABA). GABA spēlē galveno lomu muskuļu tonusa inhibīcijas modulēšanā. Tas balstās uz novērojumu, ka vairumā gadījumu hlora jonu (Cl⁻) elektroķīmiskais potenciāls neironos ir zems salīdzinot ar ārpusšūnu vidi. Kad GABA saistās ar GABA_A receptoru, notiek Cl⁻ kanālu atvēršana un tiek veicināta Cl⁻ ieplūšanu neironos. Tādējādi GABA izraisa neironu membrānas hiperpolarizāciju un palielina šūnas reaģētspējas sliekšni uz aktivējošajiem neurotransmiteriem. Tomēr, ja Cl⁻ elektroķīmiskais potenciāls neironos ir augstāks nekā ārpusšūnu vidē, tad elektroķīmiskais gradients izstumj Cl⁻ ārā no šūnas, kā rezultātā notiek membrānas potenciāla depolarizācija. Šajā gadījumā GABA var darboties kā aktivējošais neurotransmitters. Līdz ar to GABAi ir duāla loma cilvēku smadzenēs, jo tās pārlietu liela aktivācija izraisa pretējus efektus (Watanabe et al., 2002).

GABA_A receptoriem ir milzu loma smadzeņu uzbudināmības regulēšanā, kā arī to dažādība nodrošina elastīgu signālu transdukcijā. GABA_A receptori satur saistīšanās vietas dažādām klīniski svarīgām zālēm, piemēram, benzodiazepīniem, barbiturātiem un neurosteroīdiem. GABA_B ir metabotropie receptori, tāpēc tie atšķiras no GABA_A receptoriem gan farmakoloģiski, gan elektrofizioloģiski. (Watanabe et al., 2002).

Ir pierādīts, ka GABA ir iesaistīta darba atmiņas procesos, kā arī, iespējams, ka GABA aktivācija varētu uzlabot atmiņu (Katz, Liebler, 1978). GABA sarūkšana smadzeņu garozā pērtiķiem izraisa uzdevumu veikspējas pasliktināšanos (Michaels et al, 2012). Vēl ir pierādījumi, ka GABAergiskie interneironi ir iesaistīti informācijas šifrēšanā un saglabāšanā darba atmiņā (Fuster, 2001). Tika veikts pētījums, kurš parādīja, ka *in vivo* GABA ievadīšana

žurkām ir saistīta gan ar ilgtermiņa atmiņas saglabāšanu objektu atpazīšanas testā, gan ar darba atmiņu. Iespējams, ka tas tiek panākts, jo GABA sekmē proteīnu sintēzi smadzeņu rajonos, kuri piedalās mācīšanās un atpazīšanas atmiņu procesos, tādējādi ietekmējot augšanas hormona līmeni (Thanapreedawat et al., 2013).

AD tiek saistīta ar plaši izplatītu sinapšu blīvuma zudumu un nepārtrauktu holīnerģisko un glutamāterģisko sistēmu deģenerāciju. Ir zināms, ka pie AD notiek glutamāterģiskās sistēmas pārlieku liela aktivācija, kura veicina neuroiekaisumu un neurodeģenerāciju (Selkoe, 2002). Ilgu laiku tika uzskatīts, ka GABAerģiskā sistēma pie AD netiek aizskarta. Taču pēdējo gadu pētījumi ar pieaugošu pārliecību uzsver, ka arī GABAerģiskā neurotransmisija cieš AD progresēšanas rezultātā (Rissman, Mobley, 2011).

Agrākie pētījumi ar mirušu AD pacientu GABA receptoriem, kuri tika transplantēti uz varžu olšūnu plazmātisko membrānu, parādīja GABAerģiskās toniskās inhibīcijas amplitūdas samazināšanos smadzeņu garozā (Miledi et al., 2004). Tas norāda uz to, ka GABAerģiskie signālceļi AD smadzenēs tiek pārveidoti. Papildus ir atklāts, ka GABA inhibīcijas svārstības samazinās ar vecumu (65 – 90 gadi), ar vecumu samazinoties arī GABA enzīma daudzumam. Smadzeņu garozas atrofija, hipometabolisms un kognitīvo funkciju pasliktināšanās lielākā mērā notiek pacientiem ar agrīno AD, nekā tiem, kuriem AD attīstās vēlīni. Interesanti, ka samazinātos GABA strāvumus pie AD nevar izskaidrot ar lielāku GABA_A receptoru nolietošanos, izmaiņām to līdzsvarā ar citiem GABA receptoriem vai GABA_A desensitizācijas palielināšanos. Lielais GABA_A receptoru zudums AD laikā notiek kopējo GABAerģisko un glutamāterģisko termināļu zuduma rezultātā smadzeņu garozas neironos. GABA signālceļu samazināšanās un pārveidošanās AD laikā daļēji izskaidro signālu nenomākšanu vairākās AD smadzeņu daļās, kas izraisa pārmērīgu uzbudināmību (Limon et al., 2012).

Papildus progresīvam šūnu zudumam un demencei, AD pacientiem vēl ir paaugstināts lēkmju biežums, kas norāda uz izmaiņām smadzeņu garozas un hipokampa aktivācijā. Epileptisko lēkmju risks ir īpaši paaugstināts AD pacientiem pie agrīnās slimībasiestāšanās un tās sākuma stadijās (Amatniek et al., 2006). Paaugstinātais lēkmju biežums tiek saistīts ar paaugstinātu neironu tīklojuma uzbudināmību, ko izraisa paaugstināta glutamāterģiskā transmisija un/vai arī pazemināta GABAerģiskā transmisija. Hipokampa aktivitāte pārsvarā tiek koordinēta caur GABAerģiskajiem neironiem un dažas lēkmes tiek saistītas ar neironu nāvi, īpaši GABAerģisko neironu (Mann, Paulsen, 2007; Fujikawa, 2005; Liu et al., 2009). Tāpēc, visticamāk, Aβ izraisīti agri funkcionāli bojājumi vai GABAerģisko neironu zudums ir saistīts ar tīklojuma pārlieku lielu uzbudināmību, kas noved pie lēkmēm (Palop, Mucke, 2009). Lai gan agrākie pētījumi ziņoja, ka GABAerģiskajie neironi ir rezistenti pret Aβ

toksicitāti, jaunākie pētījumi norāda uz GABAerģisko neironu iesaistīšanos AD laikā (Ramos et al., 2006; Baglietto-Vargas et al., 2010; Takahashi et al., 2010).

Nesenā pētījumā tika pētīts A β toksiskums uz hipokampa GABAerģiskajiem neironiem gan *in vivo*, gan *in vitro* modeļos. AD transgēnās peles modelī tika atklāta ievērojama hipokampa neironu daudzuma samazināšanās, kuros atrodas ir glutamāta dekarboksilāze 67 (GAD67) – enzīms, kas sintezē GABA. Šī samazināšanās tika novērota sešu mēnešu garumā, kas ir ilgs laiks pēc šķīstošā A β_{42} pārprodukcēšanās (starp diviem līdz četriem mēnešiem) un nešķīstošā A β uzkrāšanās amiloīda plātnītēs (starp četriem līdz sešiem mēnešiem). *In vitro* neirotoksicitāte tika novērota primārajās hipokampa kultūrās 72 stundas pēc A β_{42} šķīdumu pievienošanas. Pētījuma rezultāti ierosina, ka, kad sagatavoti un pakļauti A β *in vitro*, GABAerģiskie neironi ir jūtīgi pret A β_{42} neirotoksiskumu. Tomēr transgēnajās pelēs GABAerģisko neironu skaits netiek izmainīts līdz sešiem mēnešiem, par spīti masīvajam A β daudzumam. Ņemot vērā iepriekš ziņoto paaugstināto jutību pret lēkmēm, ko novēroja jaunākās (1,5 – 2 mēnešus vecās) transgēnajās pelēs, visticamāk A β toksiskums noved pie GABAerģisko neironu disfunkcijas pirms to zuduma vēlākās stadijās (Krantic et al., 2012).

1.2.7. Insulīna un glikozes metabolisms smadzenēs

Pašlaik ir daudz literatūras avotu, kuri norāda uz insulīna trūkumu un rezistenci kā AD tipa neurodeģenerācijas mediatoriem, taču šai informācijai ir vairākas nesaskaņas un neskaidrības saistībā ar 2. tipa cukura diabēta (*Type 2 diabetes mellitus*, T2DM), metaboliskā sindroma, un tukluma ietekmi uz AD patoģenēzi. Ir pierādīts, ka T2DM izraisa smadzeņu insulīna rezistenci, oksidatīvo stresu, un kognitīvo pasliktināšanos, bet tā kopējie efekti nerasniedz AD līmeni. Traucējumi smadzeņu insulīnā un insulīnam līdzīgo augšanas faktoru (*Insulin-like growth factor*, IGF) signālmehānismos parāda agras un progresīvas anomālijas, un varētu būt iemesls vairumam molekulāro, bioķīmisko un histopatoloģisko bojājumu AD gadījumā. Eksperimentāli izraisīts smadzeņu diabēts, ko izraisa intracerebroventrikulāra (icv) streptozocīna (STZ) ievadīšana, uzrāda vairākas AD pazīmes, piemēram, kognitīvā pasliktināšanās un glikozes utilizācijas traucējumi (de la Monte, Wands, 2008).

Arvien vairāk ir pierādījumu uzskatam, ka AD būtībā ir metaboliska slimība, kurā smadzeņu glikozes utilizācija un enerģijas ražošana ir traucēta (Hoyer, 2004). Metaboliskās anomālijas smadzenēs saistās ar smadzeņu insulīna un IGF rezistenci, kas sagrauj signālceļus, kuri savukārt regulē neironu izdzīvošanu, enerģijas ražošanu, gēnu ekspresiju un neiroplasticitāti (Frolich et al., 1998). Šūnu līmenī insulīna/IGF signālceļu nomākšana veicina AD tipa neurodeģenerāciju paaugstinot: 1) kināžu aktivitāti, kuras nenormāli fosforilē τ ; 2)

A β PP ekspresiju un A β uzkrāšanos; 3) oksidatīvā stresa un endoplazmātiskā tīkla stresa līmeņus; 4) reaktīvo skābekļa un reaktīvo slāpekļa savienojumu rašanos, kuri bojā proteīnus, RNS, DNS un lipīdus; 5) mitohondriju disfunkciju; un 6) iekaisuma un nāves kaskāžu aktivēšanos. Funkcionālā līmenī insulīna/IGF rezistence izraisa mērķa gēnu darbības nomākumu, kuri ir nepieciešami holīnerģiskai homeostāzei, kā arī tā apstādina sistēmas, kuras mediē neironu plastiskumu, atmiņu un kognīciju (Rivera et al., 2005; Steen et al., 2005).

Ir pierādīts, ka AD smadzeņu glikozes utilizācijas progresīva samazināšana un insulīna signālceļu/atbildes gēnu ekspresijas deficīti pasliktinās slimībai kļūstot smagākai. Insulīna/IGF regulētie gēni, ieskaitot holīna acetiltransferāzi, tau, un gliceraldehīd-3-fosfāta dehidrogenāzi (GAPDH), kuri mediē holīnerģiskās/kognitīvās, neironu citoskeleta un metaboliskās funkcijas, ir nomākti pie AD (Rivera et al., 2005). Insulīna rezistences mediēti traucējumi enerģijas metabolismā noved pie oksidatīvā stresa, reaktīvo skābekļa radikāļu (ROS) veidošanās, DNS bojājumiem un mitohondriju disfunkcijas. Tas viss iedarbina apoptozes, iekaisuma un A β kaskādes. Eksperimentāli dzīvnieki, kuriem smadzeņu insulīna receptoru ekspresija un funkcijas tika nomāktas, uzrādīja kognitīvo funkciju pasliktināšanos un neurodeģenerācijas iezīmes, kuras daļēji sakrīt ar AD novērotajām (Grunblatt et al., 2007; Hoyer et al., 2009;).

AD smadzenēs insulīna/IGF signālu deficīts ir no insulīna/IGF rezistences un trūkuma. Insulīna/IGF rezistence izpaužas kā pazemināta insulīna/IGF receptoru saistīšanās un atbilde uz insulīna/IGF stimulāciju. Trofisko faktoru trūkums saistās ar pazeminātu insulīna polipeptīdu daudzumu un gēnu ekspresiju smadzenēs un cerebrospinālā šķidrumā. AD var tikt uzskatīta kā smadzeņu diabēta forma, kura apvieno gan insulīna rezistenci, gan insulīna trūkumu, tāpēc to var saukt par „3. tipa diabētu” (Rivera et al., 2005; Steen et al., 2005). Termins „3. tipa diabēts” precīzi atspoguļo faktu, ka AD parāda diabēta formu, kas selektīvi ir saistīta ar smadzenēm un, ka tai ir molekulāras un bioķīmiskas pazīmes, kuras daļēji sakrīt ar 1. tipa cukura diabētu un T2DM (de la Monte, Wands, 2008).

1.3. Alcheimera slimības terapija

1.3.1. Antioksidanti

Ir vairāki pierādījumi tam, ka oksidatīvais stress ir būtisks patogēnais process, kas saistīts ar novecošanos un AD, kur to saista ar plātnīšu un NFT veidošanos (Castellani et al., 2001; Nunomura et al., 1999). Tādējādi antioksidanti, kuri darbojas uz šo procesu apstādīšanu, var kavēt AD kognitīvo pasliktināšanos vai arī palēnināt slimības attīstīšanos (Perrig et al., 1997).

Eksogēnie antioksidanti E vitamīns (α -tokoferols), C vitamīns un β -karotīns samazina brīvo radikāļu mediētus bojājumus neironu šūnās un palīdz nomākt neurodeģenerācijas attīstību zīdītāju šūnās. E vitamīns ir spēcīgs, taukos šķīstošs antioksidants, kas atrodams lipīdu membrānās, cirkulējošos lipoproteīnos un zema blīvuma lipoproteīnu daļiņās (Foy et al., 1999). Eksperimentālos pētījumos E vitamīns mazināja β -amiloīda toksiskos efektus un uzlaboja kognitīvās funkcijas grauzējos (Montiel et al., 2006). C vitamīns ir hidrofilais antioksidants un spēcīgs lipīdu peroksidācijas inhibitors. Tas spēj aizsargāt pret brīvo radikāļu ietekmi visās ķermeņa šūnās. Pastāvīga C vitamīna uzņemšana *in vivo* samazināja oksidatīvo stresu, uzlaboja NO biopieejamību un normalizēja sistēmisko asinsspiedienu metionīna diētas ierosinātās hiperhomocisteinēmijas žurkās (Bagi et al., 2003). Karotinoīdi ir citi taukos šķīstoši antioksidanti, kuri spēj mazināt lipīdu peroksidāciju (Uprichard et al., 2003). Visvairāk pētītais karotenoīds ir β -karotīns, kas ir spēcīgs antioksidants, spējīgs strauji apspiest brīvos radikāļus. Tomēr nav pilnīgi noteikts, vai šāda terapija ir efektīva AD ārstēšanā (di Mascio et al., 1991). Dati norāda, ka E vitamīns nepazemina plazmas oksidatīvo stresu apmēram pusei AD pacientu (Lloret et al., 2009), un citu pētījumu rezultāti ierosina, ka šo antioksidantu uzņemšana nesamazina AD risku (Kamat et al., 2008). Tas norāda uz to, ka antioksidantu terapija ir izrādījusies veiksmīga preklīniskos testos dzīvnieku modeļos, bet ne cilvēku klīniskajos pētījumos (Kamat et al., 2008). Vairāki pētījumi norāda, ka B₁₂ vitamīna lietošana paaugstināja holīna acetiltransferāzes aktivitāti holīnerģiskos neironos kaķos (Nadeau, Roberge, 1988) un uzlaboja kognitīvās funkcijas AD pacientos (Ikeda et al., 1992).

Preventīvie antioksidanti, kā metālu helatori, glutaciona peroksidāzes, un superoksīda dismutāzes enzīmi, labojošos enzīmus kā lipāzes, proteāzes un DNS labojošos enzīmus, ir uzrādījuši, ka tie ir būtiski neironu izdzīvošanai un neironu aizsardzībai pret oksidatīviem bojājumiem (Marcus et al., 1998; Gonzalez-Zulueta et al., 1998). Tādējādi tos var lietot, lai ārstētu kognitīvos un uzvedības simptomus AD (Nunomura et al., 2006).

Arī citi uztura bagātinātāji ir uzrādījuši pozitīvus rezultātus pie AD, piemēram, omega-3 polinepiesātinātās taukskābes, kofeīns un kurkumīns (Nunomura et al., 2006). Kofeīns, epigallokatehīna-gallātu esteri no zaļās tējas un sarkanais vīns spēja nomākt amiloidozi un A β veidošanos gan šūnu kultūrās, gan dzīvnieku modeļos (Rezai-Zadeh et al., 2005).

Pētījumi rāda, ka antioksidants melatonīns varētu nomākt A β inducētu toksicitāti (Zhou et al., 2008) un pavājināt *tau* hiperfosforilāciju (Deng et al., 2005). *In vivo* melatonīns uzlaboja mācīšanās un atmiņas funkcijas APP695 transgēno peļu modelī, kā arī *in vitro* melatonīns pavājināja A β inducētu apoptozi AD šūnu modeļos (Feng, Zhang, 2004).

Liposkābe, papildus tam, ka tā ir mitohondriju piruvāta un α -ketoglutarāta dehidrogenāzes kompleksu koenzīms, uzrāda veselīgas antioksidanta īpašības (Moreira et al.,

2009). Daži klīniskie pētījumi ir parādījuši, ka AD pacientiem pēc liposkābes uzņemšanas ir lēnāka kognitīvo spēju samazināšanās, taču šie atklājumi vēl pagaidām nav atkārtoti plašos pētījumos (Hager et al., 2007).

Antioksidantu izmantošanu AD ārstēšanā ierobežo hematoencefaliskās barjeras limitēta šķērsošanas spēja vai arī to nespēja sasniegt mitohondrijus (Manczak et al., 2010). Lai uzlabotu zāļu mērķu sasniegšanu, tika izveidoti uz mitohondrijiem mērķēti antioksidanti. No tiem visizpētītākais ir MitoQ, savienojums, kas strauji šķērso hematoencefalisko barjeru un brīvi piekļūst neironu mitohondrijiem (McManus et al., 2011). Dzīvnieku modeļos MitoQ efektīvi samazināja A β inducētu oksidatīvo stresu un A β toksicitāti neironu kultūrās, kur tas veicināja neiřītu izaugumus un sinaptisko savienojamību (Manczak et al., 2010; McManus et al., 2011).

Vēl viena pieeja, lai uzlabotu mitohondriju oksidatīvo fosforilēšanos, ir izmantot ketonvielas, piemēram, β -hidroksibutirātu. Pēc uzbūves tas ir β -hidroksiskābe, kas tiek sintezēta aknās no acetilkoenzīma A bada laikā (Swerdlow et al., 1989). Šī pieeja balstās uz novērojumiem, ka AD slimnieku smadzenēs glikozes izmantošana ir samazināta un ketonvielas izveido alternatīvu oglekļa avotu, kas tiek izmantots oksidatīvajā fosforilēšanā (Swerdlow, 2011).

1.3.2. Aktivējošās sistēmas darbības regulēšana un holīnērgiskie līdzekļi

Acetilholīnesterāze ir iesaistīta impulsu pārvadīšanas izbeigšanā, kas notiek strauji hidrolizējot neurotransmiteru acetilholīnu vairākos holīnērgiskos procesos centrālajā un perifērajā nervu sistēmā. Šī enzīma inhibīcija izraisa acetilholīna uzkrāšanos, nikotīna un muskarīna receptoru hiperstimulāciju, kā arī neurotransmisijas traucējumus. Acetilholīnesterāzes inhibitori (ACI), bloķējot holīnesterāzes enzīmu, paaugstina acetilholīna neurotransmitera darbības stiprumu un ilgumu (Colovic et al., 2013).

Holīnērgisko funkciju zudums ir cieši saistīts ar kognitīvo disfunkciju. Ir pētīti vairāki terapeitiskie līdzekļi, kuru darbība ir mērķēta uz holīnesterāzes inhibīciju, holīna prekursoriem, postsinaptisko holīnērgisko stimulāciju ar muskarīna tipa receptoru agonistiem, un presinaptisko holīnērgisko stimulāciju ar nikotīna tipa receptoru agonistiem. Šīs zāles stabilizē kognitīvās funkcijas apmēram uz 3 – 6 mēnešiem, tomēr nekādas slimības ilguma vai attīstības izmaiņas nav panāktas (Farlow, Evans, 1998).

ACI uz doto brīdi ir vislabāk attīstītā un pielietotā terapija, un to izmanto vieglas līdz mērenas AD ārstēšanā. Uzskata, ka ACI darbības mehānisms, kurā tie palēlina slimības

attīstību, notiek samazinot A β PP līmeņus, kā arī A β un citu amiloīda savienojumu veidošanos (Giacobini et al., 1996). Takrīns bija pirmais plaši izmantotais ACI. 30 nedēļu ilgs randomizēts kontroles klīniskais pētījums parādīja ievērojamu devas atkarīgu kognitīvo funkciju uzlabošanos (Knapp et al., 1994). Tomēr nākamo pētījumu rezultāti vairs nebija tik iespaidīgi. Tāpēc zāļu meklējumi tika virzīti tālāk, un noveda līdz otrās paaudzes holīnerģisko līdzekļu (donepezils, galantamīns un rivastigmīns) atklāšanas. Šiem medikamentiem ir mazāk blakusefektu, ilgāki pussabrukšanas periodi un labāka efektivitāte, taču tie tikai apstādina simptomus (Trinh et al., 2003).

Glutamāts ir pamata uzbudinošais neurotransmiters smadzeņu garozas un hipokampa neironos. Glutamīna sintēze tiek oksidēta AD indivīdu smadzenēs, kas izraisa glutamāta pārpalikumu. Pārmērīga NMDA receptoru aktivēšana ar glutamātu palielina CNS neironu ievainojamību, kas noved pie to deģenerācijas. Memantīns (pirmās izvēles AD medikaments) bloķē glutamāta NMDA kanālus, tādējādi bloķējot patoloģisko glutamāterģiskās sistēmas aktivēšanos un saglabājot to normālā līmenī. Salīdzinot ar holīnesterāzes inhibitoriem, kurus var lietot tikai slimības agrīnās un mērenās stadijas laikā, memantīna uzlabojošā darbība ir novērojama arī pie smagām AD stadijām (Kornhuber et al., 1989).

Dati par memantīna lietošanu ir divdomīgi. Randomizētā klīniskā pētījumā 252 pacientiem memantīns ievērojami uzlaboja klīnisko ainu pie mērenas līdz smagas AD, kurā daži pacienti varēja patstāvīgi apģērbties, apmazgāties, izmantot tualeti, kā arī uzlabojās pacientu savaldība (Reisberg et al., 2003). Taču citā, dubultaklā, placebo kontrolētā pētījumā memantīns neuzrādīja statistiski ievērojamus uzlabojumus 350 pacientiem pēc 24 nedēļu ilgas lietošanas (van Dyck et al., 2007). Ir pierādījumi, ka memantīna kombinētā terapija ar donepezilu varētu dot labākus rezultātus uz kognitīvo procesu, dienišķās aktivitātes un uzvedības procesiem, nekā monoterapija (Tariot et al., 2004).

1.3.3. Uz multimērķiem CNS šūnās orientētie ligandi

Saistībā ar AD sarežģīto patofizioloģiju un vairāku potenciālo mērķobjektu noskaidrošanu, lai atrastu jaunas, uzlabotas zāles, tika ieviesta metode, ko sauc Uz multimērķiem CNS šūnās orientētie ligandi multi-target directed ligands (MTDL) (Youdim, Buccafusco, 2005). Šī stratēģija ir īpaši piemērota sarežģītām slimībām ar vairākiem patogēnajiem faktoriem, piemēram, neurodeģeneratīvie traucējumi, audzēji un kardiovaskulārās slimības. Mērķis ir izveidot vienu molekulu, kas varētu darboties selektīvi uz vairākiem mērķobjektiem un sniegt terapeitisko efektu (Morphy, Rankovic, 2009). Pēdējo gadu laikā ir attīstījušies jaunu MTDL ka potenciālu AD zāļu pētījumi un atklājumi.

Ladostigils – daudzfunkcionāls līdzeklis, kas ir sasniedzis 2. fāzes klīniskos pētījumus – ir veiksmīgs šīs stratēģijas piemērs. Tā struktūra tika izveidota savienojot rasagilīna, monoamīnoksidāzes (MAO-B) inhibitora, molekulas daļu kopā ar farmakoforo rivastigmīna, acetilholīnesterāzes inhibitora, daļu. Ladostigils ir divkāršs acetilholīnesterāzes/butirilholīnesterāzes un smadzeņu selektīvas monoamīnoksidāzes inhibitors ar *in vivo* neiroprotektīvām īpašībām (Weinreb et al., 2009).

Ladostigila efekti tika pētīti neiroblastomas šūnu apoptozes modelī. Pētījuma rezultātā ladostigils būtiski samazināja šūnu nāvi. Tas ievērojami samazināja APP inducētus apoptozes efektus, neizmainot APP un mRNS līmeņus. Papildus tas vēl paaugstināja fosforilētās proteīnkināzes C līmeņus un stimulēja α -sekretāzes proteolītisko signālceļu izdalīšanos. Tādējādi ladostigils uzrāda neiroprotektīvas īpašības un regulē APP apstrādi (Yogev-Falach et al., 2006).

Ir vairākas MTDL grupas, kuras iegūst kombinējot strukturāli aktīvus farmakoforus, kuri savukārt mijiedarbojas ar dažādām mērķmolekulām. Tos raksturo paaugstināta spēja darboties pretī acetilholīnesterāzes un A β plātnīšu veidošanai, uzrādot antioksidantu spējas, neiroprotektīvas un voltāžas atkarīgo kalcija kanālu antagonistu īpašības, inhibējošā aktivitāte pret glutamāta ierosinātu uzbudinājumu, histamīna H₃ receptoru antagonisms, kannabinoīdu CB₁ receptoru antagonisms un β -sekretāzes APP šķeļošā enzīma 1 - BACE1 - inhibēšana. MTDL veidošanas stratēģija ir saistoša pieeja jaunu AD zāļu radīšanā un šobrīd tiek pētītas jaunas vielas. (Bajda et al., 2011).

1.3.4. GABA_A agonists muscimols

Muscimols (toksīns, kas ietilpst sēnes *Amanita muscaria* sastāvā) ir psihoaktīvs savienojums, kas aktivizē visus GABA_A receptora apakštipus un tiek dēvēts par GABA_A receptoru agonistu (Chandra et al., 2010).

Uz doto brīdi tiek atbalstīta teorija, ka pārlieta glutamāterģiskā aktivizācija ir saistīta ar A β toksiskumu. Lai gan precīzs darbības mehānisms nav zināms, glutamāta receptoru pārlieta aktivizācija izraisa pārmērīgu neironālo nātrija un kalcija jonu ieplūšanu, hronisku neironu depolarizāciju, kalcija homeostāzes izjaukšanu un, visbeidzot, šūnu nāvi (Paula-Lima et al., 2005).

Tika veikts *in vitro* pētījums žurku hipokampa un smadzeņu garozas neironos, lai noteiktu GABA_A receptoru ietekmi uz A β toksiskumu. Pētījuma rezultāti parādīja, ka GABA receptoru aktivēšana mazina A β toksiskumu centrālajos neironos. Papildus tam, 3 μ M koncentrācijā GABA pievienošana bloķēja A β inducētu toksiskumu smadzeņu garozas

neironos, kā arī pikrotoksīns bloķēja šīs neiroprotektīvās īpašības. Lai labāk izprastu GABA receptoru neiroprotektīvo ietekmi, tika pētītas GABA_A receptoru agonista muscimola īpašības uz Aβ toksiskumu. Rezultātā 1 μM muscimola pilnīgi bloķēja neironu nāvi, ko izraisīja Aβ hipokampa šūnu kultūrās, kā arī nekādi papildu efekti netika novēroti pie augstākām muscimola koncentrācijām. Ievadot muscimolu, smadzeņu garozas šūnu kultūras arī tika izglābtas no Aβ izraisītas neurodeģenerācijas, tādējādi apstiprinot priekšstatu, ka GABA_A receptoru aktivēšana novērš Aβ toksiskumu hipokampā un smadzeņu garozas neironos (Paula-Lima et al., 2005).

1.4. *In vivo* pētījumu modeļi

1.4.1. Transgēno peļu modeļi

Ņemot vērā AD izplatību un neprognozējamību, augsta prioritāte uz doto brīdi ir dzīvnieku modeļu attīstībai. No mugurkaulniekiem visvairāk izmantotie modeļorganismi ir peles. Transgēnā modelēšana pelēs ir salīdzinoši lēta. Tām ir arī salīdzinoši īss dzīves mūžs, kā arī ģenētisko modifikāciju metodes tajās ir labi attīstītas. Transgēnu tehnoloģiju izmanto arī uz žurkām, taču tā nav tik plaši pielietota kā uz pelēm (Elder et al., 2010). Taču žurku modeļiem ir raksturīgas priekšrocības salīdzinot ar peļu modeļiem. Tās ir fizioloģiski, ģenētiski un morfoloģiski līdzīgākas cilvēkam. Tādējādi AD žurku modeļiem būtu jābūt daudz precīzākiem patoloģijas raksturojumā un šobrīd aktīvi notiek to dizainēšana (do Carmo, Cuello, 2013).

Transgēnie organismi tiek radīti izmantojot vienu no divām stratēģijām. Pirmajā stratēģijā ģenētiskā modifikācija tiek ieviesta pa virsu jau eksistējošam organisma ģenētiskajam sastāvam. Otrajā stratēģijā interesējošais homologais gēns tiek selektīvi modificēts tā normālajā hromosomu pozīcijā; šo procesu sauc par gēnu mērķēšanu (Elder et al., 2010).

Pelēs abas pieejas ir labi attīstītas. Pirmajā pieejā vienas šūnas embrijs pirmskodola stadijā tiek injicēts ar transgēnu. Transgēns satur kodējošo rajonu, kas bieži vien ir interesējošā proteīna komplementāras DNS veidā, un tas ir saistīts ar ekspresiju veicinošu promoteru. Injicētais transgēns integrējas nejaušā vietā, parasti vairākās kopijās vienā vietā. Izvēlētie heterologie promoteri parasti ir stabili, tāpēc transgēnais proteīns bieži vien ekspresējas augstākos līmeņos nekā tas būtu dabiski. Vēl pelei parasti ir pašai sava endogēnā gēna versija, tāpēc transgēns lielākoties ekspresējas papildus peles endogēnā gēna ekspresijai, kas noved pie pārmērīgas ekspresijas (Elder et al., 2010).

Gēnu mērķēšanā, tā vietā, lai iesaistītu svešu transgēnu, pelē tiek modificēts endogēnais gēns. Sākotnēji modificēšana tiek veikta specializētās peļu embrionālās cilmes šūnās. Šajās šūnās interesējošais gēns tiek modificēts iesaistot mērķējošu vektoru, kas sastāv no endogēnā gēna modificētas versijas. Embrionālajās cilmes šūnās vektors rekombinējas ar homologo endogēno gēnu un tādējādi aizsāk ģenētisko modifikāciju. Veiksmīga embrionālo cilmes šūnu integrācija embrija šūnu kultūrā ļauj ģenētiskajai modifikācijai iekļauties peles genomā un radīt stabilas transgēnās kultūras (Elder et al., 2010).

Pirmais AD transgēnās peles modelis – plātnīšu atvasināta augšanas faktora (PDGF) promoters ekspresē amiloīda prekursora proteīnu (PDAPP) – tika iegūts 1995. gadā. Tas uzrāda paaugstinātus cilvēka A β ₁₋₄₀ un A β ₁₋₄₂ daudzumus, kuri ir 5 – 14 reizes vairāk nekā endogēni peles A β (Games et al., 1995). PDGF virzīts cilvēka amiloīda prekursors pelēs uzrāda sinapšu zudumu, hipokampa un lielā smadzeņu saiķļa izmēru samazināšanos, kā arī atmiņas zudumu, kas līdzinās cilvēku AD pacientiem (Kobayashi, Chen, 2005).

Neilgi pēc PDAPP peles tika iegūta Tg2576 pele. Šīs peles līdzīgi PDAPP pelēm uzrāda piecas reizes vairāk murīna APP smadzenēs un pēc tam tām attīstās plātnīšu tipa A β nogulsņējumi. Atšķirībā no PDAPP pelēm viņas neuzrāda ievērojamu sinaptisko zudumu vai hipokampa izmēru samazinājumus (Hsiao et al., 1996).

Tau transgēno peļu modeļi ir izstrādāti, lai modelētu NFT patoloģiju, ko bieži novēro pie AD. Transgēno peļu modeļi, kas agri pārekspresē *tau*, uzrāda kustību traucējumus un šūnu zudumu muguras smadzenēs; taču tajos neattīstās „īsti” NFT. Taču nesen tika iegūta jauna *tau* transgēnā pele P301S, kura uzrāda progresīvu NFT veidošanos un neironu zudumu, kā arī NFT veidošanās ir atrasta muguras smadzenēs, iegarenajās smadzenēs, smadzenītēs un starpsmadzenēs (Gotz et al., 2001).

Lai precīzi izprastu AD transgēno peļu uzvedību un sasprastu to saistību ar AD kognitīvajiem defektiem, tiek pielietoti dažādi uzvedības testi (Bryan et al., 2009).

Objektu atpazīšanas (*novel object recognition*) tests balstās uz graužēju dabisko tieksmi pētīt nevis jau pazīstamu, bet gan jaunu objektu, kā arī uz viņu iekšējo tieksmi atsākt izpēti, kad viņi tiek ievietoti jaunā vidē. Izvēle pētīt jaunu objektu, kā arī atsākt izpēti pēc objektu pārvietošanas, attēlo mācīšanās un atpazīšanas atmiņas spēju izmantošanu. Pieejamajos objektu atpazīšanas uzdevumos, lai varētu testēt graužēju kognīciju, izmanto dažādus pieejamo objektu daudzumus un vides, kurās viņus testēt. Viens objektu atpazīšanas tests ir sevišķi piemērots AD līdzīgu traucējumu pētīšanai. Šajā testā graužējs tiek ievietots apaļā atklātā laukā uz sešām minūtēm un šis lauks ir aizpildīts ar dažādiem objektiem. Pēc vairākiem izmēģinājumiem, kuru laikā dzīvnieks jau ir pieradis pie objektu izvietojuma un īpašībām, daži objekti tiek samainīti no vienas vietas uz citu. Pēc tam daži objekti tiek

samainīti pret jauniem, lai novērtētu jaunu objektu atpazīšanas spējas. Testā tiek aprēķināts atklātā lauka izpētē pavadītais laiks (kustīgums/nekustīgums), kā arī cik reižu un cik ilgs laiks bija nepieciešams katra objekta izpētei dažādu izmēģinājumu laikā (Bryan et al., 2009).

Atklātā lauka (*open field*) pārvietošanās tests galvenokārt tiek izmantots, lai pētītu kustību funkcijas, novērtējot spontāno aktivitāti atklātā laukā. Apaļi vai kvadrātveida atklātie lauki ir ar dažādiem izmēriem atkarībā no eksperimenta, kā arī tie tiek dalīti noteiktos kvadrantos jeb sekcijās. Dzīvnieks tiek ievietots atklātā laukā un viņa kustība tiek vai nu nofilmēta vai monitorēta ar automatizētām datorprogrammām. Pacelšanās uz pakājkājām, līniju šķērsošana, tīrīšanās, vispārīgs kustīgums, šķērsoto līniju skaits, priekšroka noteiktām sekcijām un/vai fēču izdalīšana var tikt izmantoti, lai novērtētu uzvedību un/vai nemieru (Bryan et al., 2009).

Ūdens labirinta tests (*Morris water maze*, MWM) ir īpaši jutīgs tests, lai pētītu ar vecumu saistītus/AD līdzīgustraucējumus, jo tas ir specifisks hipokampa (viens no pirmajiem un visvairāk skartajiem smadzeņu rajoniem AD) funkciju pētīšanai. Tāpēc MWM tests ir viens no biežākajiem uzvedības testiem, kuru izmanto, lai noteiktu hipokampa telpiskās atmiņas traucējumus. Testa būtība ir ievietot grauzēju apaļā vannā, kas piepildīta ar ūdeni, tādējādi motivējot dzīvnieku izbēgt no ūdens, uzpeldot uz platformas, kas atrodas noteiktajā vietā baseinā tieši zem ūdens virsmas. Pēc vairākām treniņu dienām grauzējs iemācās atrast platformu, izmantojot telpiskus pavedienus, piemēram, plakātus vai citus pielīmētus objektus, kuri ir stratēģiski izvietoti pie sienām ārpus ūdens vannas. Nopeldētā distance, platformas sasniegšanas ātrums un peldēšanas ātrums, ko visbiežāk nofilmē, ir šī testa ierastie mērījumi. Dzīvnieka spējas atgūt un atcerēties iemācīto informāciju vai arī spējas iemācīties jaunas stratēģijas var noskaidrot izmantojot fināla testu (*probe trial*) un reverso testu (*reversal trial*). Fināla testā platforma tiek izņemta ārā no baseina un dzīvniekiem ļauj tajā peldēt noteiktu laiku. Tiek mērīti pavadītais laiks vietā, kur pirms tam bija platforma, platformas atrašanās vietas šķērsošana, un laiks, kurā tiek sasniegta platformas vieta. Reversais tests ir identisks treniņu izmēģinājumiem, taču šajā gadījumā platforma tiek pārvietota uz pretējo vannas vietu, tādējādi pārbaudot dzīvnieka kognitīvo elastīgumu, kas nepieciešams jaunu vietu atklāšanai (Bryan et al., 2009).

1.4.2. STZ modelis

Streptozocīns (STZ) ir diabētu izraisošs savienojums un to parasti ievada dzīvniekiem perifērijā, lai izraisītu diabēta modeli, jo tā darbība bojā aizkuņģa dziedzera β šūnas un izraisa insulīna rezistenci. No intracerebroventrikulāras streptozocīna (STZ-icv) ievadīšanas pelēm

un žurkām novēro smadzeņu insulīna rezistenci, samazinātu smadzeņu glikozes metabolismu, holīnerģiskus bojājumus, A β un *tau* uzkrāšanos, oksidatīvo stresu, gliozī, kā arī mācīšanās un atmiņas traucējumus (Chen et al., 2013).

STZ metabolītu alkilējošās īpašības rada reaktīvos skābekļa savienojumus un izraisa oksidatīvo stresu (Lester-Coll et al., 2006). Attiecīgi STZ-icv modeļi tiek izmantoti, lai varētu noteikt dažādu zāļu terapeitiskos potenciālus, kā arī citas ar zālēm nesaistītas terapeitiskās stratēģijas (Hoyer, 2004). Papildus tam, STZ izraisīti mācīšanās un atmiņas traucējumi tiek saistīti ar oksidatīvo stresu dzīvnieku modeļos. Tādējādi, lai mazinātu neironu šūnu nāvi, ko izraisa vairākas neirodeģeneratīvas slimības, kā potenciāli ārstēšanas līdzekļi AD līdzīgām neirodeģeneratīvām slimībām ir izcelti antioksidanti (Ahmad et al., 2005; Ansari et al., 2004).

Agmatīns (Agm) ir endogēns peptīds, ko sintezē arginīna dekarboksilāze un tas atrodas glijā un neironu šūnās. Agm kā NMDA receptoru antagonistam ir svarīga loma slāpekļa oksīda (NO) ražošanas regulēšanā. Tā kā NO var uzlabot šūnu izdzīvošanas iespējas pie oksidatīvā stresa, tad Agm var arī pasargāt šūnas no bojāšanās pie oksidatīvā stresa. STZ-icv AD tipa modelī Agm uzlabo kognitīvo pasliktināšanos samazinot A β uzkrāšanos un uzlabo insulīna signāla transdukciju. Vēl Agm pasargā šūnas no bojāšanās, aktivējot Nrf2 mediētu antioksidantu signāltransdukciju. Tāpēc Agm ir daudzsolšs terapeitiskais līdzeklis AD neironu šūnu apoptozes un kognitīvās pasliktināšanās mazināšanā (Song et al., 2014).

Alfa-liposkābe (ALA) ir spēcīga brīvo radikāļu „medniece” – spēcīgs antioksidants, kas arī ir metālu helātors, samazina iekaisumu un paaugstina acetilholīna līmeņus. Diemžēl tikai augstākās ALA devas ievērojami uzlabo STZ-icv izraisītus kognitīvos traucējumus (Wollen, 2010).

Acetil-L-karnitīns (ALCAR) iedarbojas sinerģiski ar ALA, lai transportētu acetilgrupas un taukskābes uz mitohondrijiem, tādējādi ražojot enerģiju. Papildus tas vēl veicina acetilholīna sintēzi un mitohondriju attīrīšanu no toksiskajiem taukskābju metabolītiem, uzrādot vairākas neiroprotektīvas īpašības (Wollen, 2010).

Dažādos STZ-icv AD dzīvnieku modeļos ir arī atrasti holīnerģiskie traucējumi. Testētie acetilholīnesterāzes inhibitori ir izrādījušies veiksmīgi uzlabojot/novēršot atmiņas traucējumus STZ-icv sporādiskas AD tipa modeļos. Pastāvīga orāla donepezila ievadīšana pieaugušās STZ-icv žurkās inhibēja acetilholīnesterāzes aktivitāti un uzlaboja kognitīvos traucējumus atmiņas testos. Pastāvīga orāla ladostigila ievadīšana gandrīz pilnībā novērš STZ-icv izraisītus atmiņas traucējumus žurkās un papildus samazina neironu bojājumus (Weinstock et al., 2001).

Kopumā ņemot uz STZ-icv dzīvnieku modeļiem testētās terapeitiskās stratēģijas, visvairāk tiek izmantotas vielas ar galvenokārt antioksidatīvām īpašībām. Daudzu STZ-icv

modeļu terapeitisko stratēģiju efektivitātes ir testētas arī AD pacientos un ir atrasti daudzi līdzīgi rezultāti (Salkovic-Petrisic et al., 2013).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Dzīvnieki

Pētījuma īstenošanai Rīgas Stradiņa Universitātes vivārijā iegādāti žurku *Wistar* tēviņi ar svaru 280 ± 20 g. Žurkas tika turētas LU BF eksperimentālajā telpā speciāli domātos ventilācijas būros un apgādātas ar standarta granulētu laboratorijas barību un dzeramo ūdeni *ad libitum*. Telpā nodrošināts tumsas/gaismas 12h cikls, kā arī konstanta temperatūra (21–23°C) un darbojās ventilēšanas iekārta.

Visas dotā eksperimenta procedūras ir veiktas saskaņā ar Eiropas Savienības konvencijas direktīvu 2010/63/EU vadlīnijām un tās tika saskaņotas ar Latvijas Pārtikas un veterinārā dienesta Dzīvnieku aizsardzības ētikas komisiju. PVD izmēģinājuma projekta atļauja Nr. 59 dzīvnieka izmantošanai procedūrā (saņēmējs LU MF Farmakoloģijas katedra, PVD reģ. nr. 051902).

2.2. Šķīdumi

No Sigma-Aldrich (ASV) tika iegādāts muscimols (pulvera veida) un ketamīna/ksilazīna šķīdumi. Muscimols tika izšķīdināts 0,9% NaCl šķīdumā. Ketamīns un ksilazīns tika sajaukti kopā šļircē pirms ievadīšanas. Streptozocīna tika izšķīdināts mākslīga cerebrospinalā šķīduma (*artificial cerebrospinal fluid*, aCSF).

2.3. Eksperimenta dizains

Eksperimentālās žurkas tika iedalītas 6 grupās (vienā grupā no 6 līdz 7 žurkām):

- 1) Kontroles grupa (fizioloģiskais šķīdums un aCSF);
- 2) Bojājuma grupa (fizioloģiskais šķīdums un STZ);
- 3) Muscimols devā 0,01 mg/kg un aCSF (M 0,01 mg/kg + aCSF);
- 4) Muscimols devā 0,01 mg/kg un STZ (M 0,01 mg/kg + STZ);
- 5) Muscimols devā 0,05 mg/kg un aCSF (M 0,05 mg/kg + aCSF);
- 6) Muscimols devā 0,05 mg/kg un STZ (M 0,05 mg/kg + STZ).

Eksperimenta sākumā (D1-D3), žurkām tika intraperitoneāli (i.p.) ievadīts fizioloģiskais šķīdums (1 ml/kg) vai muscimols (0,01 mg/kg vai 0,05 mg/kg). Ceturtajā dienā (D4) žurkām

icv tika ievadīts STZ (100 µg/µl, 5 µl uz smadzeņu ventrikuli) vai aCSF (5 µl uz smadzeņu ventrikuli, 10 µl uz vienu žurku).

2.4. Intracerebroventrikulārā (icv) vielu ievade

Priekš icv vielu ievades 4. dienā (D4), žurkām veikta anestēzija, i.p. ievadot ketamīna/ksilazīna maisījumu (100 mg/ml un 10 mg/ml, attiecīgi). Pielietojot stereotakses iekārtu (Stoelting Inc., ASV), anestezētajiem dzīvniekiem izveidoti *Burr* caurumi smadzeņu labajā un kreisajā ventrikuļos pēc sekojošām koordinātēm: anteroposterior (AP) – 0,72, mediolateral (ML) – 1,7, dorsoventricular (DV) -4. Pēc caurumu izurbšanas bilaterāli tika ievadīts STZ (100 µg/µl, 5 µl uz ventrikuli) vai aCSF (5 µl uz ventrikuli). Operācijām beidzoties, žurkas tika ievietotas individuālos būros ar barību un ūdeni sniegtiem *ad libitum* līdz nākamajiem eksperimentiem. D14-D18 dzīvniekiem veica ūdens labirinta (MWM) testus.

2.5. Ūdens labirinta (*Morris water maze*) tests

Eksperimenta 14.-17. dienās (D14-D17) žurkām tika veikti MWM treniņtesti un 18. dienā (D18) - fināla tests. Ūdens baseina (Ugo Basile, Italy) iekārta iekļauj vannu (d=180 cm, h=75 cm), caurspīdīgas apaļās platformas (d=10 cm, h=30 cm) un kanalizācijas sistēmas.

Peldēšanas testi tika reģistrēti, izmantojot *EthoVision XT9* videonovērošanas iekārtu (Noldus IT, Nīderlande). Treniņu dienu laikā (D14-D17) žurkām, atkarībā no piederības grupai, i.p. injicēja fizioloģisko šķīdumu devā 1 ml/kg vai muscimola šķīdumu (0,01 un 0,05 mg/kg). Ūdens baseinā (ar ūdens temperatūru $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$) 1-2 cm zem ūdens līmeņa tika paslēpta platforma un ūdens iekrāsots ar tumši brūnu pārtikas krāsvielu (Gemoss, LV), lai notiktu efektīvāka dzīvnieka atpazīšana videoreģistrēšanas programmā. Platforma tika ievietota vienā no četriem kvadrantiem un tur arī palika visu treniņdienu laikā. Katram dzīvniekam tika piemēroti četri mēģinājumi katrā dienā, liekot to atšķirīgā kvadrantā (bet ne platformas) pēc sajauktās kārtības. Divu minuši ilgs laiks tika uzskatīts par maksimālo izbēgšanas latenci; ja dzīvniekam atrodot platformu, uz tās bija jāpaliek 15 sekundes. Platformas neatrašanas gadījumā dzīvnieks tika maigi virzīts uz to, līdz tas patvaļīgi uzrāpās un palika tur uz 15 sekundēm. *EthoVision* programma reģistrēja laiku līdz platformas atrašanai (izbēgšanas latence). Treniņtesti notika dienas rīta pusē, kad dzīvniekiem novērojama lielāka aktivitāte.

Eksperimenta 18. dienā (D18) tika veikts fināla tests, kura laikā platforma tika izņemta no baseina un dzīvniekam ļauts peldēt 2 minūtes, reģistrējot sekojošos parametrus: a) skaitu zonas, kur iepriekš tika iegremdēta platforma, šķersošānai, b) kopējo laiku, kas pavadīts kvadrantā, kurā iepriekš tika ielikta platforma. Eksperimenta 19. dienā (D19), anestezējot žurkas ar ketamīna/ksilazīna maisījumu (100 mg/ml un 10 mg/ml, attiecīgi) un uztaisot perfuziju, tika iegūtas to smadzenes priekš imūnhistoķīmijas un western blot analīzēm (kas ir ārpus šī bakalaura darba ietvariem).

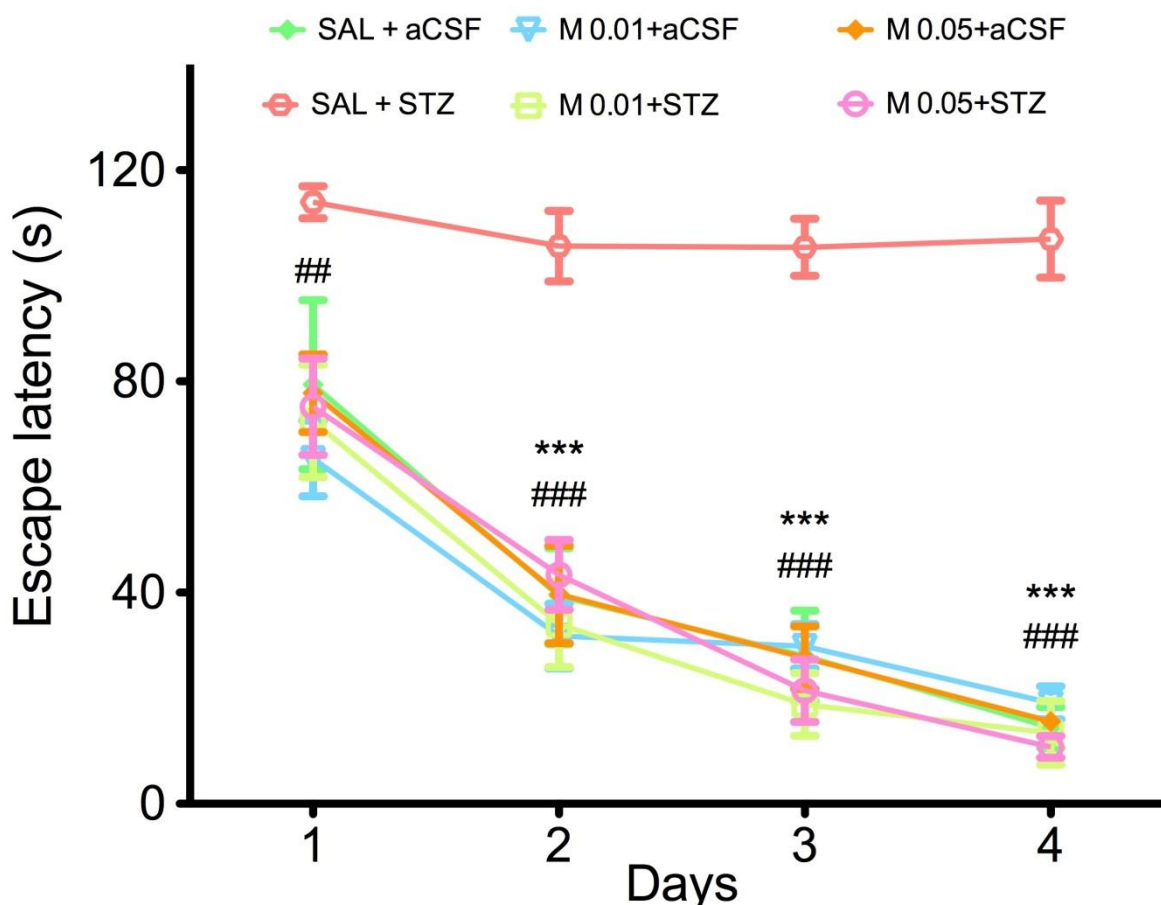
2.6. Statistika

Datu apstrādi veica, izmantojot *EthoVision XT 9* (Noldus IT, NL), kā arī *MS Office Excel* (Microsoft, ASV) un *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software Inc., ASV), pielietojot nesapāroto t-testu. Statistiski ticamas vērtības bija rezultātiem ar p vērtībām mazākam par 0,05 ($p < 0,05$).

3. REZULTĀTI

3.1. Izbēgšanas latence

Ūdens labirinta tests tika veikts 14.-17. dienā pēc vielu icv ievadīšanas. Katram dzīvniekam tika doti četri peldēšanas mēģinājumi viena treniņa ietvaros dienā četras dienas pēc kārtas (3.1. attēls). Lai noteiktu iemācīšanos, tika reģistrēta izbēgšanas latence (*escape latency*) – laiks, pēc kura dzīvnieks atrod paslēpto platformu. Treniņu dienu dinamika visām grupām norāda uz būtisko izbēgšanas latences samazināšanos. Tikai bojājuma (SAL+STZ) grupa neuzrādīja izbēgšanas latences samazināšanos, rādītājiem paliekot relatīvi nemainīgiem visās treniņu dienās. Tādejādi, salīdzinot ar bojājuma grupu, kontroles grupā izbēgšanas latence būtiski samazinājās no 2. dienas līdz 4. dienai. Statistiski ticamas atšķirības izbēgšanas latencē starp M 0.01+aCSF un M 0.05+aCSF vs. kontroles grupām netika novērotas. Muscimola ievadīšana ievērojami samazināja izbēgšanas latenci 2.-4. dienās M 0.01+STZ un M 0.05+STZ grupās, salīdzinot ar bojājuma grupu ($p < 0,0001$).



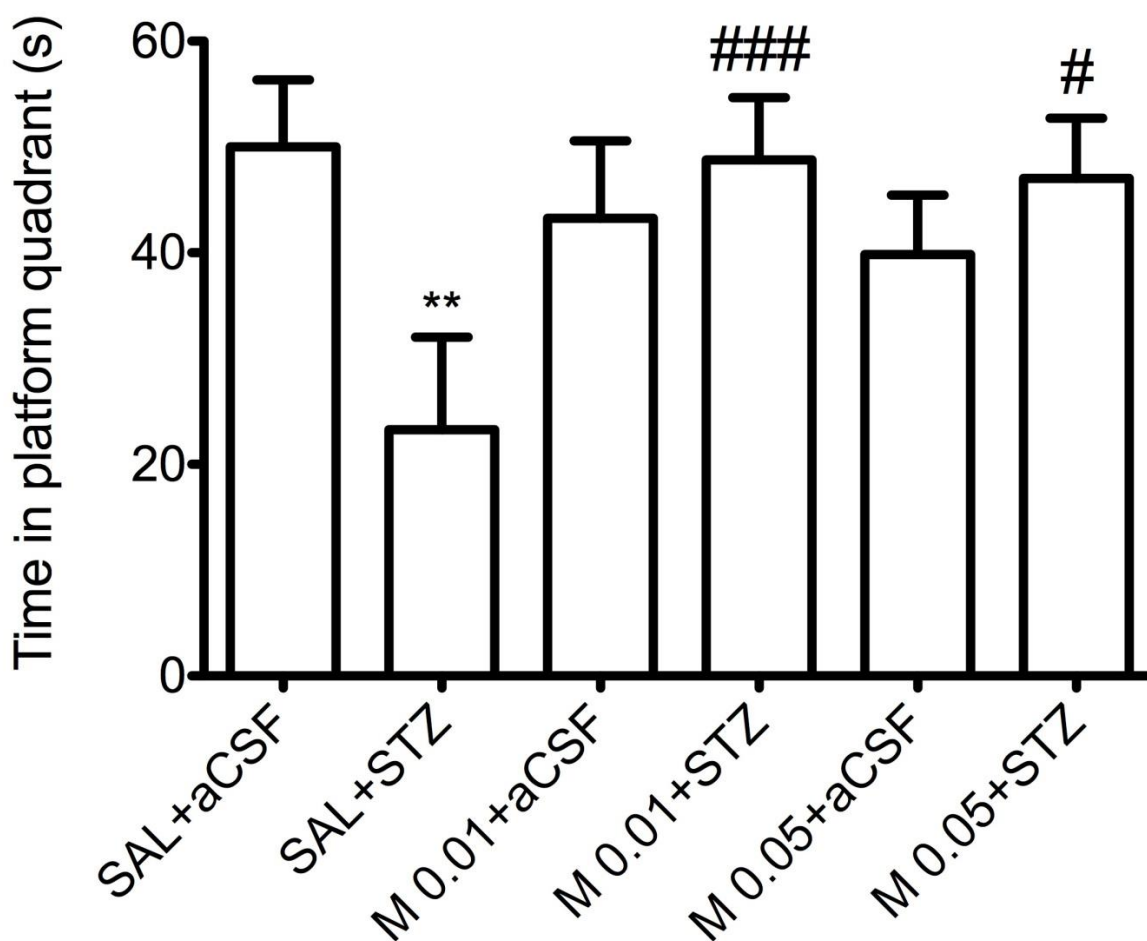
3.1. attēls. Izbēgšanas latences (s) dinamika visās četrās treniņu dienās

Laiks, pēc kura dzīvnieki atrada paslēpto platformu, reģistrēts secīgi eksperimenta 14.-17. dienās. Rezultāti parādīti kā vidējās vērtības \pm SEM. *** $p < 0,0001$ vs. SAL + aCSF; ** $p < 0,01$ vs. SAL+STZ; ### $p < 0,0001$ vs. SAL+STZ. Nesapārotais t-tests.

3.2. Fināla tests

3.2.1. Pavadītais laiks kvadrantā, kurā iepriekš bija platforma

Eksperimenta 18. dienā tika veikts fināla tests. Pirmais parametrs, ko tajā noteica, bija žurku pavadītais laiks kvadrantā, kurā iepriekš atradās platforma (3.2.1. attēls). Ar muscimolu ārstētas veselas žurkas (M 0.01+aCSF un M 0.05+aCSF) neuzrādīja būtiskas atšķirības uzturēšanas laikā platformas kvadranta zonā, salīdzinot ar kontroli. Bojājuma grupas žurkas zīmīgi mažāk laika pavadīja platformas kvadrantā ($p < 0,05$). Savukārt M 0,01 + STZ un M 0,05 + STZ grupu žurkas ievērojami vairāk laika pavadīja tieši platformas kvadrantā, salīdzinot ar bojājuma grupu ($p < 0,05$).

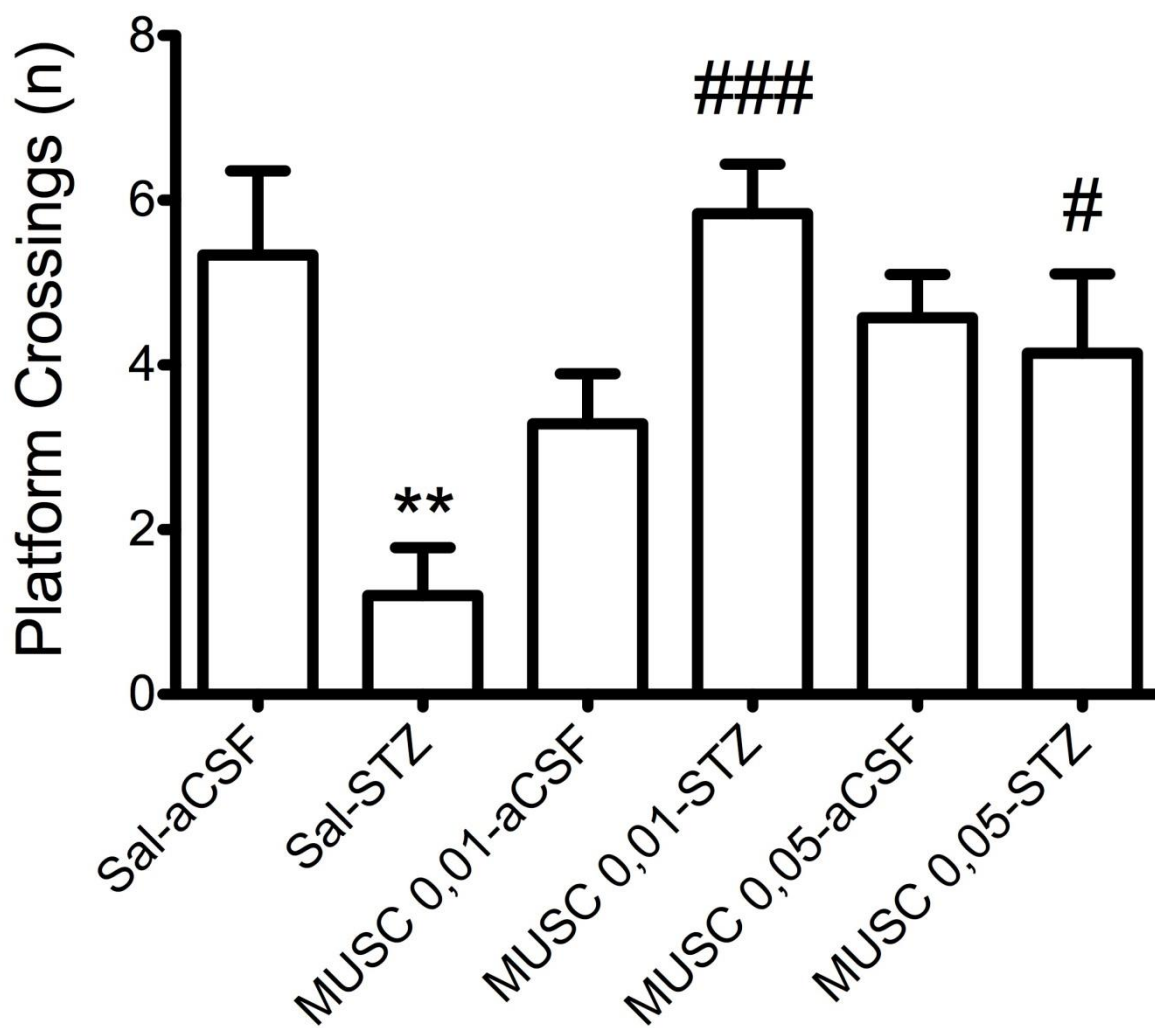


3.2.1. attēls. Katras grupas vidējais pavadītais laiks kvadrantā, kurā iepriekš bija platforma

Laiks pavadīts kvadrantā, kurā iepriekš tika ievietota platforma, tika noteikts 2 minūšu laikā fināla testā. Rezultāti parādīti kā vidējas vērtības \pm SEM. ** $p < 0,01$ vs. SAL+aCSF; # $p < 0,05$ vs. SAL+STZ; ### $p < 0,0001$ vs. SAL+STZ. Nesapārotais t-tests.

3.2.2. Platformas zonas šķērsošana

Otrais fināla testā noteiktais parametrs bija zonas, kur iepriekš tika iegremdēta platforma, šķērsojumu skaits (3.2.2. attēls). Bojājuma grupā platformas zonas šķērsošanu skaits bijis zīmīgi mazāks vs kontroles grupā ($p < 0,01$). Gan M 0,01+aCSF, gan M 0,05+aCSF grupu platformas zonu šķērsošanu skaits būtiski neatšķirās no kontroles rādītājiem. M 0,01+STZ grupas žurkas šķērsoja platformas zonu ievērojami vairāk, salīdzinot ar bojājuma grupu ($p < 0,01$). M 0,05+STZ grupas žurkas arī zīmīgi vairāk šķērsoja platformas zonu, salīdzinot ar bojājuma grupu ($p < 0,05$).

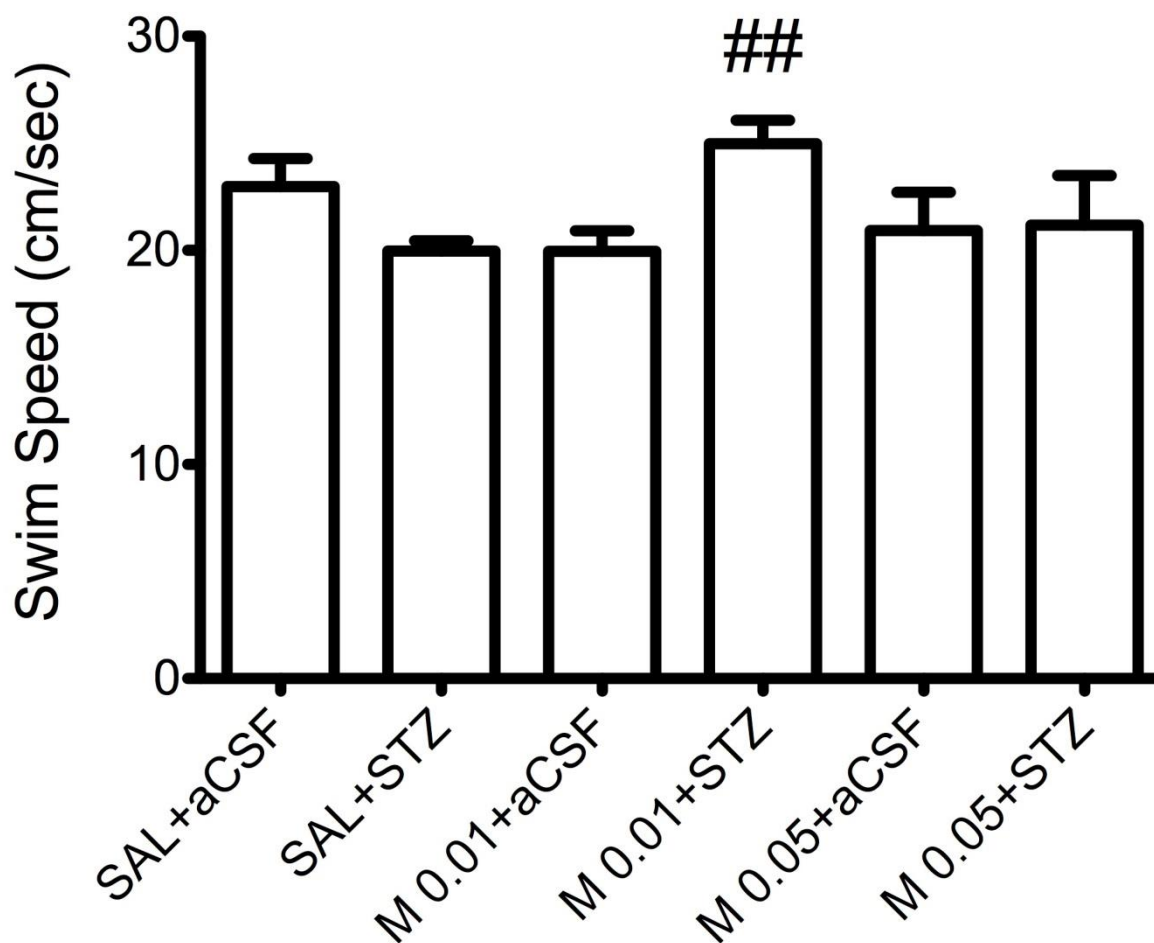


3.2.2. attēls. Platformas zonas šķērsošanas reizes

Platformas zonu šķērsojumu skaits tika noteikts 2 minūšu laikā fināla testā. Rezultāti parādīti kā vidējas vērtības \pm SEM. ** $p < 0,01$ vs. SAL + aCSF; # $p < 0,05$ vs. SAL+STZ; ### $p < 0,0001$ vs. SAL+STZ. Nesapārotais t-tests.

3.2.3. Peldēšanas ātrums

Trešais fināla testā noteiktais parametrs bija žurku peldēšanas ātrums (3.2.3. attēls). Zīmīgas atšķirības peldēšanas ātrumā starp M 0.01+aCSF un M 0.05+aCSF pret kontroles grupu netika novērotas. Bojājuma grupas peldēšanas ātrums arī būtiski neatšķiras no kontroles grupas. M 0.01+STZ grupā žurkas statistiski ticami ātrāk peldēja fināla testā, salīdzinot ar bojājuma grupu ($p < 0,01$).



3.2.3. attēls. Katras grupas vidējais peldēšanas ātrums cm/sekundē

Peldēšanas ātrums (cm/s) tika noteikts 2 minūšu laikā fināla testā. Rezultāti parādīti kā vidējas vērtības \pm SEM. ## $p < 0,01$ vs. SAL+STZ. Nesapārotais t-tests.

4. DISKUSIJA

Dotais pētījums tika veikts, lai noteiktu GABA_A agonista muscimola ietekmi uz žurku atmiņu AD tipa modelī. Jau iepriekš tika pierādīts, ka STZ icv ievadīšana žurkām izraisa „3. tipa diabēta” izmaiņas, kas līdzinās AD patoloģijai raksturīgiem kognitīviem traucējumiem un neurodeģeneratīvām izmaiņām (Chen et al., 2013). Lai novērotu žurku atmiņas un mācīšanās traucējumus, kurus izraisīja STZ icv ievadīšana, tika veikts MWM tests, kas ir labs ar vecumu saistītu/AD līdzīgu traucējumu izpētei. Pie tam, tas arī ir viens no biežākajiem uzvedības testiem, kuru izmanto, lai noteiktu hipokampa telpiskās atmiņas traucējumus (Bryan et al., 2009).

Būtiskākais MWM testā mērāmais parametrs ir izbēgšanas latence jeb laiks līdz platformas atrašanai, jo pēc tā var secināt, vai žurkai ir telpiskās atmiņas traucējumi un ir izmaiņas iemācīšanas procesā. Dzīvnieki ar normālu atmiņu parasti iemācās un atceras platformas atrašanās vietu, tādējādi treniņu testu dienās izbēgšanas latence pakāpeniski samazinās. Atmiņas traucējumu gadījumā, savukārt, izbēgšanas latence paliek relatīvi nemainīga, jo dzīvnieks vairs nespēj iemācīties platformas atrašanās vietu, pat iepriekšējos mēģinājumos to atradot. Kā parādīja šī pētījuma rezultāti, bojājuma grupas izbēgšanas latence ir relatīvi nemainīga visās treniņu dienās. Līdz ar to, var secināt, ka STZ icv ievadīšana žurkām izraisīja telpiskās atmiņas traucējumus. Turpretī kontroles grupā izbēgšanas latence pakāpeniski samazinājās, norādot uz iemācīšanos normālo, netraucēto žurku atmiņā. Muscimola i.p. ievadīšana abās devās (0,01 mg/kg un 0,05 mg/kg) ievērojami samazināja žurku izbēgšanas latenci bojājuma grupās, salīdzinot ar tīrā bojājuma grupu ($p < 0,0001$). Visām ar muscimolu ārstētām veselām žurkām tika novērota izbēgšanas latences pakāpeniska samazināšanās treniņu dienās. Tas liecina par to, ka muscimols neietekmē atmiņu un iemācīšanos veselos modeļdzīvniekos.

Piektajā dienā tika veikts fināla tests, kura laikā platforma tika izņemta no baseina un dzīvniekam ļauts peldēt 2 minūtes, reģistrējot: a) cik reizes tika šķērsota zona, kurā iepriekš atradās platforma; b) cik daudz laika pavadīts kvadrantā, kurā iepriekš atradās platforma un c) peldēšanas ātrums. Fināla testā žurku pavadītais laiks kvadrantā, kurā iepriekš atradās platforma, ir vēl viens informatīvs parametrs, pēc kura var novērtēt žurku telpisko atmiņu un tās traucējumus. Ja žurku atmiņas procesi nav traucēti, tās atcerēsies platformas kvadranta atrašanās vietu un uzturēsies tur ilgāk, arī bieži šķērsojot platformas atrašanās zonu. Ja atmiņa ir traucēta, dzīvnieki nepavadīs vairāk laika ne platformas, ne citos kvadrantos, bet peldēs relatīvi vienmērīgi pa visu baseinu. Eksperimenta dati ļoti labi parāda, ka bojājuma grupas žurku uzturēšanās laiks platformas kvadrantā bijis zīmīgi īsāks, salīdzinot ar kontroli ($p <$

0,01). Muscimola 0,01 un M 0,05 + STZ grupu žurkas platformas kvadrantā pavadīja ievērojami ilgāku laiku, salīdzinot ar bojājuma grupu ($p < 0,0001$ un $p < 0,05$, attiecīgi).

Platformas zonas šķērsojumu skaits sniedz ieskatu par to, vai dzīvnieks atceras, kur tieši platformas kvadrantā atradās platforma. Dzīvnieki, kuriem tika icv ievadīts STZ, šķērsoja platformas zonu zīmīgi mazāk salīdzinājumā ar kontroles grupu ($p < 0,01$). Muscimola 0,01 + STZ un M 0,05 + STZ grupu žurkas, salīdzinot ar bojājuma grupu, šķērsoja platformas zonu ievērojami biežāk ($p < 0,0001$ un $p < 0,05$, attiecīgi), kas arī apliecina muscimola potenciāli neiroprotektīvās īpašības. Interesanti ir tas, ka no visām grupām tieši M 0,01 + STZ grupas žurkas šķērso platformas zonu biežāk, ko varētu saistīt ar no devas atkarīgo potenciāli atmiņu uzlabojošo efektu.

Žurku peldēšanas ātruma ziņā būtiskas atšķirības novērotas tikai M 0,01 + STZ grupas žurkām, salīdzinot pret bojājuma grupas žurkām ($p < 0,01$). Citos darbos, kuros tika ievadīts STZ icv un pielietots MWM tests, atšķirības peldēšanas ātrumā starp ārstēto grupu un bojājumu grupu netika novērotas (Chen et al., 2013; Naghizadeh et al., 2013; Shingo et al., 2013; Du et al., 2014; Santos et al., 2014). Varētu teoretizēt, ka muscimola ievadīšana 0,01 mg/kg devā pie STZ icv ievades ne tikai uzlabo žurku telpisko atmiņu, bet arī būtiski paaugstina lokomotoro aktivitāti salīdzinājumā pret bojājuma grupu ($p < 0,01$).

Ir zināms, ka pie AD notiek glutamāterģiskās sistēmas pārlietu liela aktivācija, kura veicina neuroiekaisumu un neurodeģenerāciju (Limon et al., 2012) un, ka GABA_A receptoru aktivēšana novērš Aβ toksiskumu hipokampā un smadzeņu garozas neironos (Paula-Lima et al., 2005). Dotais pētījums parāda, ka muscimola ievadīšana mazās devās novērš STZ-icv izraisītus AD tipa atmiņas traucējumus, un muscimola kā GABA_A agonista terapeitiskais efekts notiek caur GABA_Aerģiskajiem receptoriem. No tā var pieņemt, ka GABA aktivācija uzlabo atmiņu. Dotais pētījums ļauj secināt, ka GABA_Aerģiskās sistēmas veikta regulācija ir stipri ietekmēta AD gadījumā un tai ir zināms potenciāls AD agrīno kognitīvo traucējumu apturēšanā, neiroprotekcijā un, iespējams, arī neiroreģenerācijā. Tas pierāda, ka, pirmkārt, muscimola ievadīšana mazās devās iedarbojas neiroprotektīvi un, otrkārt, ka šis efekts tiek realizēts caur GABA_Aerģiskās sistēmas aktivitātes palielināšanos, t.i., inhibitora toņa pastiprināšanos.

Taču dotais pētījums parāda muscimola iedarbības efektus uz STZ izraisītiem kognitīviem traucējumiem tikai to sākumstadijā – 14. dienas pēc AD tipa bojājuma inducēšanas. Līdz ar to, tālākos pētījumos būtu nepieciešams pārbaudīt muscimola terapeitisko iedarbību ilgākā laika periodā.

SECINĀJUMI

1. STZ icv ievadīšana žurkām izraisa telpiskās atmiņas traucējumus gan treniņu dienās, gan fināla testā.
2. Muscimola i.p. ievadīšana abās devās (0,01 mg/kg un 0,05 mg/kg) aizsargā pret STZ izraisītiem efektiem treniņtestos un fināla testā, uzlabojot žurku telpisko atmiņu un iemācīšanos.
3. Muscimola izpēte AD tipa patoloģijā ir nepieciešama un tālākos pētījumos ar muscimolu varētu skatīties mazo devu ietekmi pie hroniskas vadīšanas.

PATEICĪBAS

Par palīdzību darba tapšanā, konsultācijām un ierosinājumiem izsaku vislielāko pateicību laborantam, Mag. Pharm. Vladimiram Piļipenko.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI

A. Lloret, M. C. Badía, N. J. Mora, et al. “Vitamin e paradox in alzheimer's disease: it does not prevent loss of cognition and may even be detrimental,” *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 17, no. 1, pp. 143–149, 2009.

A. Nadeau and A. G. Roberge. “Effects of vitamin B12 supplementation on choline acetyltransferase activity in cat brain,” *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, vol. 58, no. 4, pp. 402–406, 1988.

A. Nunomura, G. Perry, G. Aliev, et al. “Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease,” *J Neuropathol Exper Neurol*, vol. 60, no. 8, pp. 759–767, 2001.

A. Nunomura, R. J. Castellani, X. Zhu, et al. “Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease,” *J Neuropathol Exper Neurol*, vol. 65, no. 7, pp. 631–641, 2006.

Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, et al. Ginkgo biloba affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. *J Neurochem*, 93:94-104, 2005.

Alberdi E, Sanchez-Gomez MV, Cavaliere F, et al. Amyloid β oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*. 2010;47:264–72.

Amatniek JC, Hauser WA, DelCastillo-Castaneda C. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia* 47, 867-872, 2006.

Ansari MA, Ahmad AS, Ahmad M, et al. Selenium protects cerebral ischemia in rat brain mitochondria. *Biol Trace Elem Res*, 101:73-86, 2004.

Arumugam TV, Chan SL, Jo DG, et al. Gamma secretase-mediated Notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke. *Nat Med*, 12:621–623, 2006.

B. P. Yu. “Cellular defenses against damage from reactive oxygen species,” *Physiological Reviews*, vol. 74, no. 1, pp. 139–162, 1994.

Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, et al. (2010) Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis* 21, 119-132.

Bajda M., Guzior N., Ignasik M., Malawska B. Multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease treatment. *Curr. Med.Chem.* 2011;18:4949–4975.

Barker WW, Luis CA, Kashuba A, et al. Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2002;16:203–212.

Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging*. 1997;18:351–357.

Braak H, Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*. 1998;53:127–40.

Braak H, Rub U, Schultz C, Del Tredici K. Vulnerability of cortical neurons to Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Alzheimers Dis*. 2006;9:35–44.

Braak H, Del Tredici K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol*. 2011;121:171–181.

Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, et al. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci*. 2005;25:7709–7717.

C. D. Kamat, S. Gadai, M. Mhatre, et al. “Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges,” *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 15, no. 3, pp. 473–493, 2008.

C. J. Foy, A. P. Passmore, M. D. Vahidassr, et al. “Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease,” *An International Journal of Medicine*, vol. 92, no. 1, pp. 39–45, 1999.

Castellani RJ, Harris PL, Sayre LM, et al. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:175–180.

Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer Disease. *Disease-a-Month* 56: 484–546

Chandra D., Halonen L. M., Linden A. M., Procaccini C., Hellsten K., Homanics G. E., et al. (2010). Prototypic GABA(A) receptor agonist muscimol acts preferentially through forebrain high-affinity binding sites. *Neuropsychopharmacology* 35, 999–1007. doi:10.1038/npp.2009.203

Chen YLZ, Blanchard J, Dai CL, et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ Mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD Mouse) *Mol Neurobiol*. 2013;47(2):711–25.

Chen, Y., Liang, Z., Blanchard, J., et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Mol Neurobiol*, 2013; 47(2): 711-725.

Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, et al. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*. 2005;48:913–922.

Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 2009;11:909–913.

Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 1983;219:1184–1190.

Colciaghi F, Marcello E, Borroni B, et al. Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. *Neurology.*2004;62:498–501.

Colovic M.B., Krstic D.Z., Lazarevic-Pasti T.D., et al. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* 2013;11:315–335.

D. A. Cottrell, E. L. Blakely, M. A. Johnson, et al. “Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD,” *Neurology*, vol. 57, no. 2, pp. 260–264, 2001.

D. Harman. “The aging process,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 11, pp. 7124–7128, 1981.

D. L. Marcus, C. Thomas, C. Rodriguez et al. “Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease,” *Experimental Neurology*, vol. 150, no. 1, pp. 40–44, 1998.

Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.*1976;2:1403.

de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes – evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol.* 2008;2:1101–1101.

Do Carmo S., Cuello A. (2013). Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol. Neurodegener.* 8:37. 10.1186/1750-1326-8-37

Du LL, Chai DM, Zhao LN, et al. AMPK Activation Ameliorates Alzheimer's Disease-Like Pathology and Spatial Memory Impairment in a Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease Model in Rats. *J Alzheimer's Dis*, 2014; 43(3):775-84.

E. M. Mutisya, A. C. Bowling, and M. F. Beal, “Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 63, no. 6, pp. 2179–2184, 1994.

Elder G. A., Gama Sosa M. A., de Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine.* 2010;77(1):69–81.

Farlow MR, Evans RM. Pharmacologic treatment of cognition in Alzheimer's dementia. *Neurology.*1998;51:S36–S44. discussion S65–S67.

Farlow MR, Miller ML, Pejovic V. Treatment options in Alzheimer's disease: maximizing benefit, managing expectations. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008;25:408–422.

Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 1998;105(4-5):423–438.

Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:155–159.

Fujikawa DG. (2005) Prolonged seizures and cellular injury: Understanding the connection. *Epilepsy Behav* 7(Suppl 3), S3-S11.

Fuster JM. The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron.* 2001;30(2):319-33.

Games D, Adams D, Alessandrini R, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature.* 1995;373:523–527.

Giacobini E, Mori F, Lai CC. The effect of cholinesterase inhibitors on the secretion of APPS from rat brain cortex. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;777:393–398.

Goate A, Chartier-Harlon MC, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991;349:704–706.

Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:4051–4055.

Goedert M. Oskar Fischer and the study of dementia. *Brain.* 2009;132:1102–1111.

Golde TE, Eckman CB, Younkin SG. Biochemical detection of Ab isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1502:172–187.

Gotz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM. Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem.* 2001;276:529–534.

Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V. Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:4637–4642.

Grunblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, et al. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem.* 2007;101(3):757–770.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:4913–4917.

H. A. Jung, B. S. Min, T. Yokozawa, J et al. “Anti-Alzheimer and antioxidant activities of coptidis rhizoma alkaloids,” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 32, no. 8, pp. 1433–1438, 2009.

Hager K, Kenklies M, McAfoose J, et al. Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer’s disease--a 48 months follow-up analysis. *J Neural Transm Suppl.* 2007;(72):189–193.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297:353–356.

Heneka MT, O’Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer’s disease. *J Neuroimmunol.*2007;184:69–91.

Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer’s disease. *Neurochem Int.* 2004;45:583–95.

Hoyer S, Lee SK, Loffler T, Schliebs R. Inhibition of the neuronal insulin receptor. An *in vivo* model for sporadic Alzheimer disease? *Ann N Y Acad Sci.* 2009;920:256–258.

Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol* 2004;490:115-25.

Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine* 2011;3: 77sr71–77sr71.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996;274:99–102.

Y. Q. Deng, G. G. Xu, P. Duan, et al. “Effects of melatonin on wortmannin-induced tau hyperphosphorylation,” *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 26, no. 5, pp. 519–526, 2005.

Yogev-Falach M, Bar-Am O, Amit T, et al. A multifunctional, neuroprotective drug, ladostigil (TV3326), regulates holo-APP translation and processing. *FASEB J.* 2006;20(12):2177–2179.

Youdim, M.B.; Buccafusco, J.J. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2005, 26, 27-35.

J. E. Upritchard, C. R. W. C. Schuurman, A. Wiersma et al., “Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, nonsmoking adults,” *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, no. 5, pp. 985–992, 2003.

J. Zhou, S. Zhang, X. Zhao, T. Wei, “Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid- β 1-42,” *Journal of Pineal Research*, vol. 45, no. 2, pp. 157–165, 2008.

Juhyun Song; Bo Eun Hur; Bokara, Kiran Kumar; et al. Agmatine Improves Cognitive Dysfunction and Prevents Cell Death in a Streptozotocin-Induced Alzheimer Rat Model. *Yonsei Medical Journal*; May 2014, Vol. 55 Issue 3, p689.

K. Rezai-Zadeh, D. Shytle, N. Sun et al. “Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice,” *Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 38, pp. 8807–8814, 2005.

Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*. 2003;300:486–489.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 2003;37:925–937.

Kathryn J. Bryan, Hyoung-gon Lee, George Perry, et al. Chapter 1 Transgenic Mouse Models of Alzheimer’s Disease: Behavioral Testing and Considerations. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. (2009).

Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer’s disease. *Nature*. 1963;197:192–193.

Knapp MJ, Knopman DS, Solomon PR, et al. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer’s disease. The Tacrine Study Group. *JAMA*. 1994;271:985–991.

Kobayashi DT, Chen KS. Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer’s disease. *Genes, Brain, and Behavior*. 2005;4:173–196.

Kornhuber J, Bormann J, Retz W, et al. Memantine displaces [3H]MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol*. 1989;166:589–590.

Krantic S., Isorce N., Mechawar N., et al. (2012). Hippocampal GABAergic neurons are susceptible to amyloid-beta toxicity in vitro and are decreased in number in the Alzheimer’s disease TgCRND8 mouse model. *J. Alzheimers Dis*. 29, 293–308. 10.3233/JAD-2011-110830

Krantic S., Isorce N., Mechawar N., et al. (2012). Hippocampal GABAergic neurons are susceptible to amyloid-beta toxicity in vitro and are decreased in number in the Alzheimer’s disease TgCRND8 mouse model. *J. Alzheimers Dis*. 29, 293–308.

Lee VM-Y, Balin BJ, Otvos L, Trojanowski JQ. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science*. 1991;251:675–678.

Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis* 2006;9:13-33.

Levy E, Carman MD, Fernandez MIJ, et al. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 1990;248:1124–1126.

Limon A., Reyes-Ruiz J. M., Miledi R. Loss of functional GABA(A) receptors in the Alzheimer diseased brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 10071–10076 (2012).

Liu YH, Wang L, Wei LC, et al. (2009) Up-regulation of D-serine might induce GABAergic neuronal degeneration in the cerebral cortex and hippocampus in the mouse pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Res* 34, 1209-1218.

Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*. 2009;64:110–122.

M. Gonzalez-Zulueta, L. M. Ensz, G. Mukhina et al. “Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated neurotoxicity,” *Journal of Neuroscience*, vol. 18, no. 6, pp. 2040–2055, 1998.

M. Manczak, T. S. Anekonda, E. Henson, et al. “Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression,” *Human Molecular Genetics*, vol. 15, no. 9, pp. 1437–1449, 2006.

Manczak M, Mao P, Calkins MJ, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons. *J Alzheimers Dis.*2010;20(Suppl 2):S609–631.

Mann EO, Paulsen O. (2007) Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci* 30, 343-349.

Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 2004;430:631–9.

McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 1995;21:195–218.

McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011;31(44):15703–15715.

Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, et al. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*. 2006;313:1781–1784.

Michels L, Martin E, Klaver P, et al. Frontal GABA levels change during working memory. *PloS ONE* 2012;7(4):1-8.

Miledi R, Dueñas Z, Martínez-Torres A, et al. Microtransplantation of functional receptors and channels from the Alzheimer's brain to frog oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*.2004;101:1760–1763.

Moreira PI, Cardoso SM, Pereira CM, et al. Mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease and diabetes. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009;8(6):492–511.

Morphy, R.; Rankovic, Z. Designing multiple ligands-medicinal chemistry strategies and challenges. *Curr. Pharm. Design*, 2009, 15, 587-600.

Nadler Y, Alexandrovich A, Grigoriadis N, et al. Increased expression of the γ -secretase components presenilin-1 and nicastrin in activated astrocytes and microglia following traumatic brain injury. *Glia*. 2008;56:552–567.

Naghizadeh, B., Mansouri, M.T., Ghorbanzadeh, B., et al. Protective effects of oral crocin against intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory deficit and oxidative stress in rats. *Phytomedicine*, 2013; 20(6): 537-542.

Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, et al. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1999;19:1959–1964.

P. Di Mascio, M. E. Murphy, and H. Sies. “Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols,” *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 53, no. 1, pp. 194S–200S, 1991.

P. H. Reddy, S. McWeeney, B. S. Park et al. “Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease,” *Human Molecular Genetics*, vol. 13, no. 12, pp. 1225–1240, 2004.

Palop JJ, Mucke L. (2009) Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 66, 435-440.

Paula-Lima A. C., De Felice F. G., Brito-Moreira J., Ferreira S. T. Activation of GABA(A) receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology* 49, 1140–1148 (2005).

Perrig WJ, Perrig P, Stahelin HB. The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old. *J Am Geriatr Soc*. 1997;45:718–724.

Pluta R, Furmaga-Jabłońska W, Maciejewski R, et al. Brain ischemia activates beta- and gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein: significance in sporadic Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2013;47(1):425–434.

Pluta R, Ulamek M, Jabłoński M. Alzheimer's mechanisms in ischemic brain degeneration. *Anat Rec*.2009;292:1863–1881.

Polavarapu R, An J, Zhang C, Yepes M. Regulated intramembrane proteolysis of the low-density lipoprotein receptor-related protein mediates ischemic cell death. *Am J Pathol.* 2008;172:1355–1362.

Price JL, McKeel DW, Jr, Buckles VD, et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 2009;30:1026–1036.

R. Castellani, K. Hirai, G. Aliev et al., “Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease,” *Journal of Neuroscience Research*, vol. 70, no. 3, pp. 357–360, 2002.

R. J. Katz, L. Liebler. GABA involvement in memory consolidation: Evidence from posttrial amino-oxyacetic acid. *Psychopharmacology* 1978 Mar 1;56(2):191-3.

Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, et al. (2006) Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1×APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27, 1658-1672.

Reisberg B, Doody R, Stoffler A, et al. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2003;348:1333–1341.

Rissman RA, Mobley WC. Implications for treatment: GABA_A receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2011;117:613–622.

Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis.* 2005;8(3):247–268.

Rossner S, Sastre M, Bourne K, Lichtenthaler SF. Transcriptional and translational regulation of BACE 1 expression—implications for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2006;79:95–111.

Salkovic-Petrisic M., Knezovic A., Hoyer S., Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J. Neural Transm.* 2013;120:233–252.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 2002;298:789–791.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001;81:741–766.

Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron.* 2008;60:534–542.

Sperling RA, Laviolette PS, O'Keefe K, et al. Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron.* 2009;63:178–188.

Steen E, Terry BM, Rivera EJ, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis.* 2005;7(1):63–80.

Swerdlow R, Marcus DM, Landman J, et al. Brain glucose and ketone body metabolism in patients with Alzheimer's disease. *Clin Res.* 1989;37(2):461A.

Swerdlow RH. Role and treatment of mitochondrial DNA-related mitochondrial dysfunction in sporadic neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des.* 2011c;17(31):3356–3373.

T. Ikeda, K. Yamamoto, K. Takahashi et al. “Treatment of Alzheimer-type dementia with intravenous mecobalamin,” *Clinical Therapeutics*, vol. 14, no. 3, pp. 426–437, 1992.

T. Montiel, R. Quiroz-Baez, L. Massieu, C. Arias. “Role of oxidative stress on β -amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants,” *Experimental Neurology*, vol. 200, no. 2, pp. 496–508, 2006.

Tabaton M, Tamagno E. The molecular link between β - and γ -secretase activity on the amyloid β precursor protein. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64:2211–2218.

Takahashi H, Brasnjevic I, Rutten BP, et al. (2010) Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 214, 145-160.

Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, et al. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004;291:317–324.

Thanapreedawat P, Kobayashi H, Inui N, et al. GABA affects novel object recognition memory and working memory in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology.* 2013;59(2):152-7.

Trinh NH, Hoblyn J, Mohanty S, Yaffe K. Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA.*2003;289:210–216.

Van Broeckhoven C, Haan J, Bakker E, et al. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch) *Science.* 1990;248:1120–1122.

van Dyck CH, Tariot PN, Meyers B, Malca Resnick E. A 24-week randomized, controlled trial of memantine in patients with moderate-to-severe Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*2007;21:136–143.

W. D. Parker and J. K. Parks. “Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: purification and characterization,” *Neurology*, vol. 45, no. 3, pp. 482–486, 1995.

W. R. Markesbery. “Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 23, no. 1, pp. 134–147, 1997.

Watanabe M., Maemura K., Kanbara K., et al. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.* 213, 1–47.

Weinreb, O.; Mandel, S.; Bar-Am, O.; et al. Multifunctional neuroprotective derivatives of rasagiline as anti-Alzheimer's disease drugs. *Neurotherapeutics.*, 2009, 6(1), 163-74.

Weinstock M, Kirschbaum-Slager N, Lazarovici P, et al. (2001) Neuroprotective effects of novel cholinesterase inhibitors derived from rasagiline as potential anti-Alzheimer drugs. *Ann N Y Acad Sci* 939:148–161.

Wollen KA (2010) Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Altern Med Rev* 15:223–244.

Z. Bagi, C. Csekó, E. Tóth, and A. Koller. “Oxidative stress-induced dysregulation of arteriolar wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment,” *American Journal of Physiology*, vol. 285, no. 6, pp. H2277–H2283, 2003.

Z. Feng and J. T. Zhang. “Protective effect of melatonin on β -amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 37, no. 11, pp. 1790–1801, 2004.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs „GABA_A AGONISTA MUSCIMOLA IETEKME UZ ŽURKU ATMIŅU ALCHEIMERA SLIMĪBAS TIPA MODELĪ” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē, Farmakoloģijas katedrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Dāvis Cibulskis

(vārds, uzvārds)

(paraksts)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: laborants, Mg. pharm. Vladimirs Piļipenko _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Recenzents: pētnieks Juris Rumaks _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____

(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____

(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2015., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)