

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

**COX-2 EKSPRESIJAS INDUCĒŠANA LPS IEKAISUMA
MODELĪ NEIROBLASTOMAS SH-SY5Y ŠŪNU LĪNIJĀ**

MAĢISTRA DARBS

Autore: **Līva Surgovte**

Studenta apliecības Nr.: ls10104

Darba vadītāja: asoc. prof. Dr. Biol. Una Riekstiņa

RĪGA 2015

ANOTĀCIJA

COX-2 ir COX izoenzīms, kas atbild par arahidonskābes metabolismu, sintezējot bioloģiski aktīvus iekaisuma mediatorus – prostanoīdus. Perifērijā COX-2 ir inducējama izoforma, bet smadzenēs – konstitutīva.

Šī darba mērķis bija izpētīt LPS spēju inducēt COX-2 ekspresiju neiroblastomas SH-SY5Y šūnās. COX-2 ekspresijas noteikšanai tika izmantota imūnfluorescences metode. Rezultāti uzrādīja SH-SY5Y šūnu morfoloģijas izmaiņas dažādu LPS koncentrāciju (5 – 800 ng/ml) ietekmē. Pētījumā novēroja COX-2 ekspresiju kontroles šūnās normālos apstākļos, LPS koncentrācijā 5 ng/ml COX-2 ekspresijas indukciju, bet koncentrācijā 25 ng/ml un 50 ng/ml – supresiju. Statistiski ticamu rezultātu uzrādīja LPS koncentrācijā 50 ng/ml.

Atslēgvārdi: iekaisums, COX-2, LPS, SH-SY5Y šūnas, imūnfluorescence

ABSTRACT

COX-2 is the isoenzyme of COX that is responsible for synthesis of inflammatory mediators prostanoids in the arachidonic acid metabolic pathway. COX-2 is the inducible isoform in the peripheral tissues, but constitutive isoform in the brain.

The aim of this study was to investigate the ability of LPS to induce COX-2 expression in SH-SY5Y cell line. COX-2 expression was detected by immunofluorescence. The results showed that different concentrations of LPS (5 – 800 ng/ml) induce morphology changes in SH-SY5Y cells. The observations of this study were COX-2 expression in control cells under normal conditions, induction of COX-2 expression at LPS 5 ng/ml, but suppression – at LPS 25 ng/ml and 50 ng/ml. The statistically significant result was at LPS 50 ng/ml.

Keywords: inflammation, COX-2, LPS, SH-SY5Y cells, immunofluorescence

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	8
1. LITERATŪRAS APSKATS	10
1.1. Iekaisums	10
1.1.1. Iekaisuma mediatori	11
1.1.1.1. Vazoaktīvie un gludo muskuļu kontrakcijas mediatori	11
1.1.1.2. Enzīmi.....	12
1.1.1.3. Hemoatraktanti	13
1.1.1.4. Proteoglikāni.....	13
1.2. Arahidonskābes metabolisms un metabolīti	14
1.2.1. Ciklooksigenāzes (COX) ceļš	15
1.2.2. Lipoksigenāzes ceļš.....	17
1.2.3. Citohroma P-450 ceļš.....	18
1.3. COX raksturojums	18
1.3.1. COX inhibitori.....	20
1.4. Iekaisums neurodeģeneratīvās slimībās.....	21
1.4.1. COX izoformu ekspresija smadzenēs	22
1.4.2. COX izoenzīmu loma neuroiekaisumā	23
1.4.3. COX inhibitoru terapija.....	27
1.5. Neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnija	28
1.6. Lipopolisaharīda (LPS) iekaisuma modelis	30
1.7. Imūnfluorescences (IF) metode	33
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	36

2.1. Materiāli.....	36
2.2. Neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnija.....	36
2.2.1. Šūnu atkausēšana.....	37
2.2.2. Šūnu tripsinizēšana.....	37
2.2.3. Šūnu sasaldēšana.....	38
2.3. LPS iekaisuma modelis.....	39
2.4. COX-2 ekspresijas noteikšana.....	39
2.4.1. Inkubācija ar primāro antivielu.....	40
2.4.2. Sekundārās antivielas Alexa Fluor 488 konjugāta pievienošana.....	40
2.5. Konfokālā mikroskopēšana.....	40
2.6. IF rezultātu kvantitatīvā analīze.....	41
2.7. Datu analīze.....	41
3. REZULTĀTI.....	42
3.1. SH-SY5Y šūnu morfoloģija.....	42
3.2. SH-SY5Y šūnu morfoloģijas izmaiņas LPS ietekmē.....	42
3.3. LPS inducēta COX-2 ekspresijas noteikšana ar IF metodi.....	43
3.4. IF rezultātu kvantitatīvā analīze.....	46
3.5. Fluorescences intensitātes izmaiņas SH-SY5Y šūnās atkarībā no LPS koncentrācijas.....	47
4. DISKUSIJA.....	49
SECINĀJUMI.....	53
PATEICĪBAS.....	54
IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	55
DOKUMENTĀRĀ LAPA.....	62

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- A β – amiloīds β
ALS – amiotrofā laterālā skleroze
AS – arahidonskābe
BSA – liellopu seruma albumīns
CD – diferenciācijas klasteris
CNS – centrālā nervu sistēma
COX – ciklooksigenāze
CTCF – šūnu fluorescences intensitāte
CYP-450 – citohroms P-450
Cys-LT – cisteinilleikotriēni
DAPI – 4,6-diamino-2-fenilindols
DHET – *dihydroxyecosatrienoic acid*
DMSO – dimetilsulfoksīds
EDTA – etilēndiaminotetraacetilskābe
EET – *epoxyecosatrienoic acid*
EP – E prostanoīda receptors
FBS – fetālais vērša serums
FITC – fluorescīna izotiocianāts
FL – fosfolipāze
HETE – *hydroxyecosatetraenoic acid*
IF – imūnfluorescence
IL – interleikīns
LBP – lipopolisaharīda saistīšanās proteīns
LOX – lipoksigenāze
LPS – lipopolisaharīds
LT – leikotriēni
MAPK – mitogēnu – aktivētās proteīna kināzes
MEM – *Minimum Essential Medium*
MPP⁺ – 1-metil-4-fenilpiridīns
mRNS – matricas ribonukleīnskābe

MSR – makrofāgu *scavenger* receptors
NADH – adenīna dinukleotīda reducētā forma
NF-κB – kodola faktors – kappa B
NO – slāpekļa oksīds
NOD – nukleotīda-saistīšanās oligomerizācijas domēns
NPL – nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi
PBS – fosfāta buferēts sāļu šķīdums
PFA – paraformaldehīds
PG – prostaglandīni
TAF – trombocītu aktivējošais faktors
TLR – *Toll like* receptors
TNF – tumora nekrozes faktors
TRITC – tetrametilrodamīna izotiocianāts
TX – tromboksāns

IEVADS

Iekaisums ir dabiska organisma aizsardzības reakcija ar mērķi novērst vai neitralizēt kaitīgo stimulu un atjaunot audu integritāti (Minghetti, 2005), taču pārmērīgs un nekontrolēts iekaisuma process izraisa audu bojājumus (Ajmone-Cat et al., 2010). Neuroiekaisums ir iekaisuma process nervu audos (Gendelman, 2002), kas tiek raksturots ar glijas šūnu aktivāciju, iekaisuma mediatoru ekspresiju un neirotoksiskiem brīvajiem radikāļiem (Krause and Müller, 2010). Ir pierādīts, ka neuroiekaisums ir aktīvs process, kas ir konstatējams jau agrīnā neurodeģeneratīvo slimību stadijā (Figueiredo-Pereira et al., 2015), piemēram, Alcheimera slimībā, Parkinsona slimībā, Hantingtona slimībā un amiotrofā laterālā sklerozē (ALS) (Minghetti, 2004). Līdz ar to neuroiekaisumu uzskata par potenciālu terapeitisku mērķi neurodeģeneratīvo slimību ārstēšanā (Kluša, 2006).

Iekaisuma kaskādes procesus kontrolē dažādi iekaisuma mediatori (Terr, 1994). Ciklooksigenāze (COX) ir bifunkcionāls enzīms, kas atbild par arahidonskābes (AS) vienu no trim iespējamajiem metabolisma ceļiem, sintezējot iekaisuma mediatorus – prostanoīdus, kuriem ir būtiska loma dažādos bioloģiskos procesos (Frungeri et al., 2015; Terr, 1994; Zeldin, 2001). COX izoformas ir ekspresētas visos galvenajos orgānos, kā smadzenes, sirds, plaušas, dzemde un nieres (Smith et al., 2012). Tradicionāli tiek uzskatīts, ka COX-2 ir inducējama izoforma, ko dēvē arī par „iekaisīgo” enzīmu, jo tā ekspresija ir saistīta ar dažādiem fizioloģiskiem un patoloģiskiem procesiem (Frungeri et al., 2015). Nesen veiktie pētījumi uzrāda, ka smadzenēs COX-2 ir ekspresēta konstitutīvi (Krause and Müller, 2010). Šim COX izoenzīmam ir būtiska loma smadzeņu darbībā, jo COX-2 ir saistīta ar svarīgām fizioloģiskām funkcijām centrālajā nervu sistēmā (CNS), kā sinaptiskā aktivitāte, ilgtermiņa potencēšana, ilgtermiņa depresija, atmiņas konsolidācija un neirovaskulārā mijiedarbība hiperēmijas laikā (Aid and Bosetti, 2011).

Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmācijas bakalaura studiju programmas ietvaros iepriekš tika izstrādāti pētījumi – „1-4-dihidropiridīnu atvasinājuma AV-6-93, tā struktūras analoga un struktūras elementu darbības izpēte MPP⁺ toksicitātes modelī SH-SY5Y šūnās” (Surgovte, 2013) un „Lunasīna pretiekaisuma darbība cilvēku neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā” (Kozlovska, 2014). Balstoties uz šiem pētījumiem un literatūras datiem par neuroiekaisuma lomu neurodeģenerācijā, radās interese izveidot lipopolisaharīda (LPS) iekaisuma modeli un izpētīt tā inducētu COX-2 ekspresiju neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā. Jāuzsver,

ka, iespējams, līdz šim vēl nav veikts pētījums ar mērķi noskaidrot LPS spēju inducēt COX-2 ekspresiju SH-SY5Y šūnās.

Darba mērķis: izpētīt LPS spēju inducēt COX-2 ekspresiju neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā.

Darba uzdevumi:

- 1) Izveidot LPS iekaisuma modeli SH-SY5Y šūnās;
- 2) Apgūt imūnfluorescences (IF) metodi;
- 3) Noteikt inducētu COX-2 ekspresiju SH-SY5Y šūnās;
- 4) Veikt iegūto datu apstrādi un statistisko analīzi.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Iekaisums

Iekaisums ir nespecifiska organisma imūnreakcija jeb dzīvo audu atbildes reakcija uz bojājumu, ko var izraisīt mikroorganismi, ķīmiskas vielas vai fizikāli aģenti. Četras raksturīgākās iekaisuma pazīmes, ko jau pirmajā gadsimtā formulēja Celzs (*Celsus*), ir apsārtums (*rubor*), uztūkums (*tumor*), karstums (*calor*) un sāpes (*dolor*) (Doniņa, 2008). Vēlāk 1882. gadā patologs R. Virhovs (*R. Virchow*) papildināja iekaisuma raksturīgās pazīmes ar funkciju traucējumiem (*functio laesa*) (Purviņš un Purviņa, 2011). Iekaisuma sistemātiskie simptomi izpaužas kā drudzis, hipotalāma – hipofīzes – virsnieru regulatorās ass aktivācija, anoreksija, letarģija un hipersomnija (Narumiya and Furuyashiki, 2011).

Iekaisuma reakciju nodrošina izmaiņas audu asinsvados un šūnu inducētas reakcijas. Iekaisuma gadījumā apkārtējos audos dilatējas arteriolas, pieaug asins plūsma un palielinās venulu caurlaidība, kas ļauj asins plazmai izplūst no asinsvada un veidot iekaisuma eksudātu (Terr, 1994). Līdz ar to, šajos audos notiek cirkulējošo leikocītu, saistaudu šūnu, ekstracelulāro komponentu (kolagēna, elastīna), glikoproteīnu (fibronektīna, laminīna, proteoglikānu) infiltrācija (Doniņa, 2008). Iekaisuma procesā iesaistītās šūnas atrodas veselos audos vai asinsritē, kas iekļūst audos tikai iekaisuma reakcijas laikā. Svarīgākās iekaisuma šūnas ir neitrofili, makrofāgi un limfocīti, kā arī eozinofili, bazofili, trombocīti un tuklās šūnas (Terr, 1994).

Iekaisumu var iedalīt akūtā un hroniskā iekaisumā. Akūtu iekaisumu ierosina aktivētu neitrofilu infiltrācija audos, izraisot izmaiņas asinsvadu sienās un mikrovidē ap asinsvadiem: plazmas proteīnu un leikocītu ekstravazācija, migrācija uz bojājuma vietu un fagocitoze. Šī iekaisuma iznākums var būt procesa uzsūkšanās jeb izveseļošanās, fibroze vai hroniska iekaisuma izveide. Hronisks iekaisums ir ieilgusi iekaisuma reakcija, kad aktīvs iekaisums, audu destrukcija un bojāto audu atjaunošanās notiek vienlaicīgi. Hroniska iekaisuma perēklis raksturojas ar mononukleāro šūnu (makrofāgu, limfocītu, plazmas šūnu), nevis neitrofilu infiltrāciju. Iekaisuma perēklī notiek šūnu nekroze un bojātie audi hroniska procesa gadījumā angioģenēzes un fibrozes rezultātā tiek aizstāti ar saistaudiem (Doniņa, 2008).

Iekaisumam ir būtiska loma, jo tas tiek saistīts ar dažādām akūtām un hroniskām slimībām. Ar iekaisumu saistītas slimības ir, piemēram, infekcija, sepse, reimatoloģiskās slimības, kuņģa čūla, Krona slimība, pneimonija un astma, arī vēzis, cukura diabēts, Alcheimera slimība un aptaukošanās tiek saistīta ar neregulētu iekaisuma procesu (Vodovotz, 2013).

1.1.1. Iekaisuma mediatori

Iekaisuma kaskādes procesus kontrolē regulējamas molekulas, ko dēvē par iekaisuma mediatoriem. Iekaisuma mediatori ir savienojumi, kas tiek sekretēti aktivētās šūnās, un tie izraisa vai pastiprina iekaisuma raksturīgās pazīmes. Šos mediatorus iedala četrās grupās: vazoaktīvie un gludo muskuļu kontrakcijas mediatori, enzīmi, hemoatraktanti un proteoglikāni. Daži mediatori, daudzpusīgās darbības dēļ, tiek iedalīti vairākās grupās vienlaicīgi (Terr, 1994).

1.1.1.1. Vazoaktīvie un gludo muskuļu kontrakcijas mediatori

Pie vazoaktīviem un gludo muskuļu kontrakcijas mediatoriem pieder histamīns, AS metabolīti, trombocītu aktivējošais faktors (TAF), adenoziņš (Terr, 1994) un slāpekļa oksīds (NO) (Wallace, 2005).

Histamīns ir viens no svarīgākajiem mediatoriem, kas izraisa iekaisuma procesu. Tas visvairāk ir sastopams tuklajās šūnās un bazofilos. Histamīna fizioloģiskā iedarbība rodas, mijiedarbojoties ar kādu no trīs dažādiem mērķa šūnu receptoriem – H_1 , H_2 , H_3 . Iekaisuma procesā būtiska nozīme ir histamīna mijiedarbībai tieši ar H_1 receptoriem asinsvados, tādējādi palielinot venulu caurlaidību un izraisot bronhu, zarnu traktas, dzemdes gludo muskuļu kontrakciju (Terr, 1994). Histamīna stimulētā akūtā vaskulārā atbilde izpaužas kā audu pietūkums un apsārtums (Leach, 2004).

AS ir nepiesātināta taukskābe, kas ietilpst šūnu membrānas fosfolipīdu sastāvā. AS metabolisma produkti ir eikosanoīdi – prostaglandīni (PG) un leikotriēni (LT) (sk. 1.2.), kuri var izraisīt vazokonstrikciju, vazodilatāciju, asinsvadu caurlaidības palielināšanos un hemotaksi (Terr, 1994).

TAF ir lipofils organisks mediators, kas rodas no aktivētām tuklajām šūnām un trombocītiem, kā arī no citiem aktivētiem šūnu tipiem. TAF izraisa neitrofilu un eozinofilu degranulāciju, hemotaksi, leikocītu infiltrāciju un bronhokonstrikciju (Terr, 1994).

Adenozīns ir nukleozīds, kas tiek atbrīvots no tuklajām šūnām. Tas var saistīties ar adenozīna receptoriem, kuri atrodas vairākos šūnu tipos. Adenozīna saistīšanās ar receptoriem veicina bronhokonstrikciju un inducē sekrēciju no zarnu epitēlija šūnām (Terr, 1994).

NO ir spēcīgs vazodilatators, ko pārsvarā izdala endotēlija šūnas. NO dilatē asinsvadu gludos muskuļus, kā arī modulē asins plūsmu, leikocītu adhēziju pie asinsvadu endotēlija un dažādu enzīmu, kas ir iesaistīti iekaisuma atbildes reakcijā, aktivitāti (Wallace, 2005).

1.1.1.2. Enzīmi

Neskaitāmi enzīmi atrodas iekaisuma šūnu granulās un tiek atbrīvoti degranulācijas procesā. Daudzi no šiem enzīmiem ierosina komplementa, asinsreces vai kinīnu sistēmas kaskādi. Piemēram, tuklo šūnu triptāze sašķel komplementa sistēmas komponentu C3 līdz C3a, kā arī iedarbojas uz daudziem asinsreces proteīniem, bet citas tuklo šūnu proteāzes var proteolītiski aktivēt kalikreīnu vai kininogēnu, veidojot bradikinīnu (Terr, 1994).

Komplementa sistēma ir saistīta ar imunoloģisko atbildes reakciju, kas izveido membrānas agresīvo kompleksu (ang. val. *membrane attack complex*). Šis komplekss piesaistās baktērijām un iznīcina tās. Šajā procesā veidojas vairāki komplementa sistēmas komponenti, kas palielina asinsvadu caurlaidību, stimulē hemotaksi un veicina baktēriju osponizēšanu jeb iezīmēšanu. Funkcionāli visbūtiskākie komponenti ir C3 un C5. Komponenti C3a, C4 un C5 palielina asinsvadu caurlaidību un izraisa vazodilatāciju, netieši stimulējot histamīna izdalīšanos no tuklajām šūnām. Komponenti C5 veicina arī leikocītu adhēziju, stimulē hemotaksi un AS lipoksigenāzes (LOX) aktivēto metabolisma ceļu. Savukārt, komponents C3b saistās ar baktēriju šūnu apvalku un veicina tā osponizēšanu neitrofiliem un makrofāgiem (Leach, 2004).

Asinsreces sistēma pārveido fibrinogēnu līdz fibrīnam, kā rezultātā rodas fibrīna receklis. Asinsreces procesā tiek ģenerēti vairāki fibrinopeptīdi, kuriem ir būtiska loma asinsvadu caurlaidībā. Turklāt, enzīms trombīns, kas ir atbildīgs par fibrinogēna pārveidošanu fibrīnā, palielina leikocītu adhēziju un stimulē fibroblastus (Leach, 2004).

Kinīnu sistēma ir saistīta ar asinsreces sistēmu. Tā tiek aktivēta Hāgemana (XII asinsreces) faktora ietekmē, rezultātā veidojot bradikinīnu. Bradikinīns izraisa iekaisuma procesam raksturīgo gludo muskuļu kontrakciju, asinsvadu dilatāciju, kā arī sāpju sajūtu (Leach, 2004).

1.1.1.3. Hemoatraktanti

Par hemotaksi devē procesu, kurā šūnas migrē iekaisuma izraisošā ķīmiskā faktora virzienā. Hemoatraktanti ir hemotakses kairinātāji (Wiggins and Rappoport, 2010).

Citokīni pieder pie proteīnu grupas, kas regulē iekaisumu un imunoloģisko atbildi, kā arī ir atbildīgi par hemostāzes uzturēšanu. Citokīni var iedarboties uz šūnām, kas tos ir izdalījušas (autokrīns efekts), uz apkārtējām šūnām (parakrīns efekts), kā arī nonākt asinsritē un iedarboties uz tālāk esošām šūnām (endokrīnais efekts). Ir vairākas citokīnu ģimenes – interleikīni (IL), tumora nekrozes faktors (TNF), interferoni, hemokīni un audu augšanas faktors (Leach, 2004). Viens no svarīgākajiem hemoatraktantiem no citokīnu ģimenes ir hemokīni (Terr, 1994).

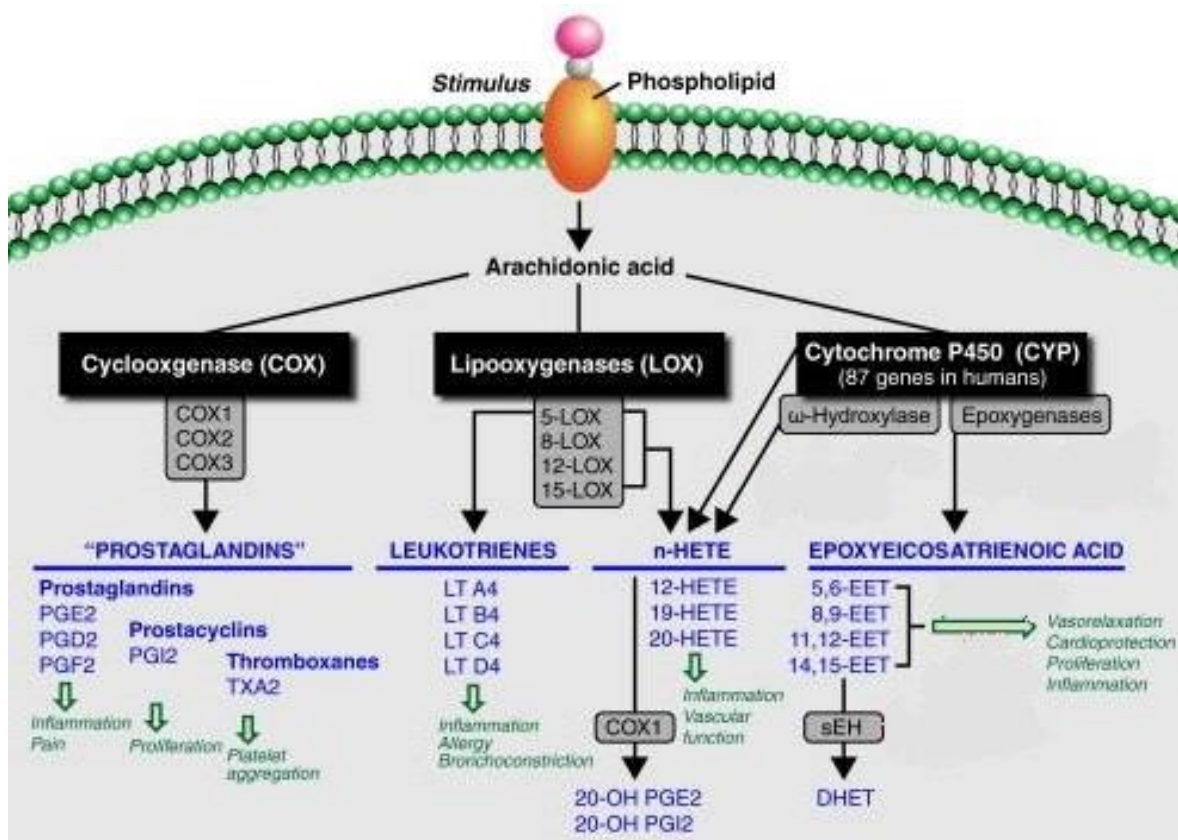
Vairāki ne-peptīdu iekaisuma mediatori arī uzrāda nozīmīgu hemoatraktantu aktivitāti, piemēram, TAF un LTB₄ kopā ar komponentu C5a ir spēcīgi neitrofilu hemoatraktanti. Savukārt, TAF ir spēcīgs arī eozinofilu hemoatraktants (Terr, 1994).

1.1.1.4. Proteoglikāni

Tuklo šūnu un bazofilu granulās atrodas proteīnu – polisaharīdu komplekss, ko sauc par proteoglikāniem. Tie veido lielāko daļu šo granulu strukturālo matricu un kalpo par saistīšanās vietu heparīnam un citiem mediatoriem. Proteoglikāniem piemīt arī būtiska regulatorā aktivitāte. Piemēram, viens no svarīgākajiem proteoglikāniem cilvēku tuklajās šūnās ir heparīns, kuram piemīt antikoagulanta darbība, kā arī tas spēj modulēt tuklo šūnu triptāzes aktivitāti (Terr, 1994).

1.2. Arahidonskābes metabolisms un metabolīti

AS ir 20 oglekļu atomu nepiesātināta taukskābe, kas ietilpst šūnu membrānas fosfolipīdu sastāvā (Williams et al., 1999). No membrānas fosfolipīdiem AS var tikt atbrīvota ar fosfolipāzes (FL) C secīgu iedarbību uz diacilglicerolu, vai FLA tiešu iedarbību uz membrānas fosfolipīdiem (Terr, 1994). FLA₂ tiek aktivēta ar palielinātu kalcija līmeni un fosforilāciju (Figueiredo-Pereira, 2015). Atbrīvotā AS tiek pakļauta oksidatīvam metabolismam ar vairākām enzīmu sistēmām – COX, LOX, citohromu P-450 (CYP-450) (sk. 1.1. att.) (Zeldin, 2001). AS metabolīti ir iesaistīti vairākos bioloģiskajos procesos, tostarp iekaisumā, ovulācijā, apaugļotās olšūnas implantācijā, angiogēnēzē, trombocītu agregācijā un imunoloģiskās funkcijās (Williams et al., 1999).

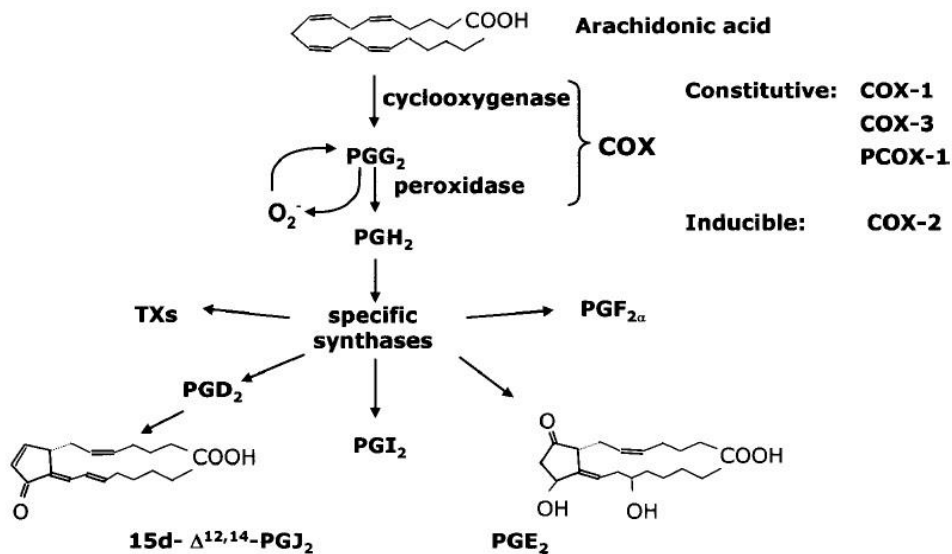


1.1. att. AS galvenie metabolisma ceļi un to metabolīti. Attēls ar izmaiņām no (Panigrahy et al., 2010) AS var tikt pakļauta trīs galvenajiem metabolisma ceļiem – COX, LOX un CYP-450 ceļam, kā rezultātā rodas attiecīgi AS metabolīti – eikosanoīdi (PG un LT), HETE un EET, kuriem ir būtiska loma vairākos bioloģiskajos procesos.

1.2.1. Ciklooksigenāzes (COX) ceļš

COX ceļš ir visplašāk pētīts no visiem AS metabolisma ceļiem (Williams et al., 1999). COX jeb prostaglandīnu endoperoksīda H sintāze ir enzīms, kas metabolizē AS par prostanoīdiem – PG un tromboksānu (TX) (Zeldin, 2001). COX aktivitāte ir atkarīga no diviem atšķirīgiem un savstarpēji neatkarīgiem enzīmiem – COX-1 un COX-2 (Smith, 2010). COX-1 metabolizē AS par PG, kuri ir iesaistīti asins recēšanas regulēšanā, homeostāzē un kuņģa – zarnu trakta aizsardzībā. Savukārt, COX-2 pārveido AS līdz PG, kuri izraisa iekaisumam raksturīgās reakcijas, kā arī sāpju sajūtu un drudzi (Shaveta et al., 2014).

COX ir bifunkcionāls enzīms, jo tam piemīt gan COX, gan peroksidāzes aktivitāte. COX metabolisma ceļā AS tiek metabolizēta vairāko etapos. Vispirms COX katalizē AS oksigenēšanu par nestabilu ciklisku endoperoksīdu PGG₂, kas ar peroksīdatīvu redukciju tiek pārveidots par PGH₂ (Baue et al., 2000; Brown and DuBois, 2005). Tālāk PGH₂, kas ir prostanoīdu prekursors, tiek pakļauts sintāzēm un ketoreduktāzēm, dehidratācijas reakcijai un neenzimātiskai izomerizācijai, izveidojot dažādus bioloģiski aktīvus PG (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂) un TXA₂ (sk. 1.2. att.) (Frungeri et al., 2015).



1.2. att. COX pakļautais AS metabolisma ceļš (Minghetti, 2004)

Dažādie PG izraisa visas galvenās iekaisuma pazīmes – paaugstinātu kapilāru caurlaidību, sāpes, paaugstinātu ķermeņa temperatūru, kā arī traucētas orgānu funkcijas. Pēdējo gadu dati liecina, ka PG darbības raksturs uz iekaisuma procesu ir atkarīgs no to koncentrācijas: mazās

koncentrācijās veicina iekaisuma procesa attīstību, bet lielās – uz atgriezeniskās saites pamata – darbojas pret iekaisumu (Purviņš un Purviņa, 2011).

PG ir bioloģiski aktīvas lipīdu vielas, kuras ražo gandrīz visas ar kodolu esošās šūnas, līdz ar to tie ir sastopami gandrīz visos audos un orgānos (Frungeri et al., 2015; Ricciotti and FitzGerald, 2011). Šīs bioloģiski aktīvās vielas pirmo reizi tika atklātas ap 1930. gadu un nosauktas tieši par PG, jo sākotnēji tika konstatētas prostatā. PG ir iesaistīti daudzās fizioloģiskās un patoloģiskās sistēmās, piemēram, iekaisuma regulācijā un imūnajā atbildē, šūnu augšanā, intraokulārajā spiedienā, kalcija pārvietošanā, asinsvadu gludo muskuļu šūnu kontrakcijā un relaksācijā, trombocītu agregācijā un nesalīpšanā, glomerulu filtrācijas ātrumu nierēs, neironu jutību sāpju gadījumos, ķermeņa temperatūras atbildes reakcijā pret drudzi un dzemdību laikā (Frungeri et al., 2015).

PGD₂ ir viens no svarīgākajiem eikosanoīdiem, kas tiek ražots aktivētās tuklajās šūnās (Ricciotti and FitzGerald, 2011). PGD₂ ir visizteiktāk ekspresēts smadzenēs no visiem PG (Figueiredo-Pereira, 2015). Tas ir nozīmīgs iekaisuma mediators, kas veicina lokālu asinsvadu dilatāciju, palielina asinsvadu caurlaidību, darbojas kā spēcīgs neitrofilu hemoatraktants (Terr, 1994), kā arī ir atbildīgs par miega regulēšanu un sāpju sajūtu (Ricciotti and FitzGerald, 2011).

PGE₂ piemīt daudzpusīga bioloģiskā aktivitāte un tas ir viens no visvairāk ražotajiem PG organismā. Iekaisuma gadījumā, tas izraisa iekaisumam raksturīgo apsārtumu un tūsku, palielinot asins plūsmu iekaisušos audos ar pastiprinātu artēriju dilatāciju un palielinātu mikrovaskulāro caurlaidību (Ricciotti and FitzGerald, 2011). PGE₂ aktivizē arī termoregulācijas centru hipotalāmā, kā arī izraisa sāpju sajūtu, iedarbojoties uz perifērās nervu sistēmas sensorajiem neironiem un CNS aktīvajām vietām (Baue et al., 2000; Ricciotti and FitzGerald, 2011).

PGF_{2α} izraisa gludo muskuļu kontrakciju un bronhokonstrikciju, kā arī ir atbildīgs par sāpju sajūtu rašanos (Purviņš un Purviņa, 2011; Ricciotti and FitzGerald, 2011).

PGI₂ jeb prostaciklīns ir viens no svarīgākajiem prostanoīdiem, kas regulē sirds un asinsvadu homeostāzi. Tas atrodas asinsvadu šūnās, piemēram, endotēlijā šūnās un gludo muskuļu asinsvadu šūnās. Prostaciklīns darbojas kā spēcīgs vazodilatators, kā arī inhibē trombocītu agregāciju, leikocītu adhēziju un asinsvadu gludo muskuļu šūnu proliferāciju (Ricciotti and FitzGerald, 2011).

TXA₂ galvenokārt veidojas trombocītos, bet to var ražot arī citi šūnu tipi, piemēram, makrofāgi. TXA₂ veicina trombocītu adhēziju un agregāciju, gludo muskuļu šūnu kontrakciju un

proliferāciju, kā arī endotēlija iekaisuma atbildes reakcijas aktivēšanu (Ricciotti and FitzGerald, 2011).

PG izraisītais efekts rodas, tiem saistoties ar septiņu transmembrāno domēno G proteīnu. Prostonoīdu receptoru apakšgrupu veido astoņi receptori – PGE receptora subtipi E prostanoīda receptors 1 (EP₁), EP₂, EP₃ un EP₄, PGD receptors (DP1), PGF receptors, prostaciklīna receptors un TX receptors (Ricciotti and FitzGerald, 2011).

1.2.2. Lipoksigenāzes ceļš

LOX ir oksidatīvo enzīmu grupa, kas ir iesaistīta iekaisuma atbildes reakcijas regulēšanā. AS metabolisma procesā var tikt pakļauta vairākām LOX: 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX, 15-LOX (sk. 1.1. att) (Wisastra and Dekker, 2014). LOX AS pārveido par nestabiliem *hydroperoxy* starpproduktiem, kuri, savukārt, izveidojas par LT, *hydroxyeicosatetraenoic acid* (HETE) un lipoksīniem (Zeldin, 2001).

Iekaisuma procesā visbūtiskākā nozīme ir 5-LOX, jo tā ir iesaistīta LT biosintēzē. LT savu nosaukumi ir ieguvuši, jo tie ir sastopami dažādu veidu leukocītos, piemēram, granulocītos, monocītos un tuklajās šūnās. Iekaisuma procesa stimulācija izraisa 5-LOX katalizētu AS oksidāciju līdz nestabilai *hydroxyperoxyeicosatetraenoic acid*, kas tiek pārvērsta par LTA₄. LTA₄ darbojas kā prekursors LTB₄ un LTC₄ izveidei. Savukārt, tālāk LTC₄ enzimatiski tiek pārveidots līdz LTD₄ un LTE₄ (Wisastra and Dekker, 2014).

Izdala divas LT klases – nepeptīdu LT (LTA₄, LTB₄) un cisteinilleikotriēni (Cys-LT) (LTC₄, LTE₄, LTD₄), kuru fizioloģiskā iedarbība ir atšķirīga (Bukovskis, 2004). LTB₄ ir nozīmīgs iekaisuma mediators, kas stimulē neitrofilu hemotaksi un aktivāciju, kā arī citokīnu ražošanu mononukleārās šūnās (Baue et al., 2000). Cys-LT izdalās no tuklajām šūnām un eozinofiliem. Tie izraisa spēcīgu bronhu un asinsvadu gludo muskuļu spazmu, palielina asinsvadu caurlaidību, pastiprina gļotu sekrēciju bronhu dziedzeros un eozinofilo leukocītu hemotaksi (Bukovskis, 2004). LTC₄, LTD₄ un LTE₄ tiek dēvēti par anafilakses lēni reaģējošām substancēm (ang. val. *slow – reacting substance of anaphylaxis*) (Terr, 1994).

1.2.3. Citohroma P-450 ceļš

AS tiek pakļauta CYP-450 metabolisma ceļam vairākos audos – aknu, nieru, sirds un asinsvadu sistēmas. Šajā metabolisma ceļā uz AS var iedarboties divi CYP enzīmi – ω -hidroksilāze un epoksigenāze (sk. 1.1. att.). ω -hidroksilāze AS pārveido līdz HETE. Būtiskākā no HETE izoformām ir 20-HETE, kas izraisa vazokonstrikciju. Savukārt, epoksigenāze AS pārveido par *epoxyeicosatrienoic acid* (EET), kas uzrāda vazodilatējošas īpašības. EET tālāk metabolizējas galvenokārt par šķīstošu epoksīda hidrolāzi, kas tiek pārveidota līdz *dihydroxyeicosatrienoic acids* (DHET). DHET piemīt mazāka aktivitāte nekā EET (Panigrahy et al., 2010).

1.3. COX raksturojums

COX ir svarīgs enzīms, kas atbild par prostanoīdu sintēzi, kuriem ir būtiska loma dažādos bioloģiskos procesos (Frungeri et al., 2015). Ir divas dominējošās COX izoformas – COX-1 un COX-2, kuras pilnībā atšķiras ar savām fizioloģiskām darbībām. Izoforma COX-1, ko uzskata par oriģinālo enzīmu, tika iegūta 1940-tajos gados un klonēta 1988. gadā. COX-2 tika identificēta balstoties uz COX-1 homologiju (Baue et al., 2000). Atkarībā no bioloģiskajiem procesiem COX izoenzīmi var darboties individuāli, vienoti vai kompensācijas veidā, ja viens no izoenzīmiem nav pieejams (Frungeri et al., 2015). Visos galvenajos orgānos, kā smadzenes, sirds, plaušas, dzemde un nieres, ir plaši ekspresētas abas COX izoformas (Smith et al., 2012).

COX-1 ir konstitutīvs enzīms, ko šūnas izdala normālos apstākļos. Šī COX izoforma ir atrodamā gandrīz visu šūnu endoplazmātiskajā tīklā un tā ir plaši ekspresēta kuņģī, nierēs, trombocītos, endotēlijā, dzemdē un smadzenēs (Baue et al., 2000). COX-1 veic „saimnieciskās” (ang. val. *housekeeping*) funkcijas šūnu fizioloģiskās procesos, tādējādi tā atbild par normālu homeostāzi un veic šūnās signālfunkcijas (Smith et al., 2012). Tā nodrošina gļotādu un bronhu normālu stāvokli, trombocītu funkcijas un nieru asinsriti (Biksone, 2008).

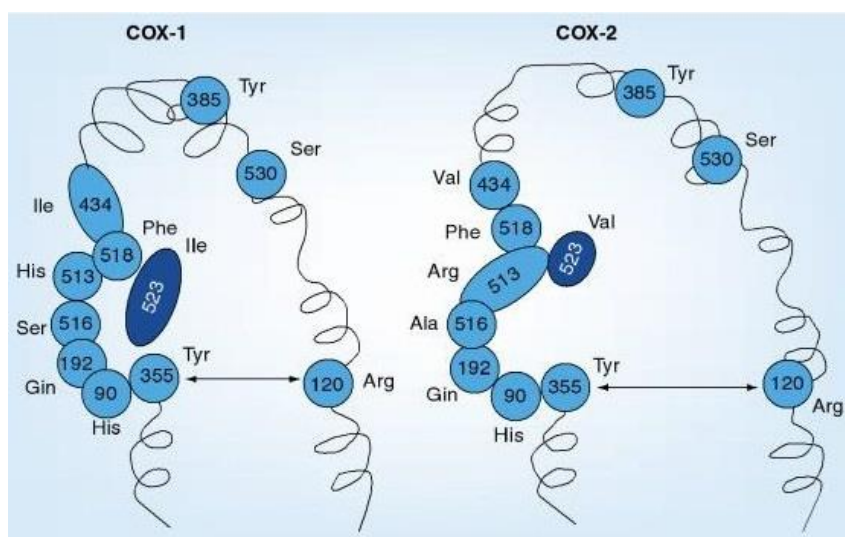
COX-2 ir inducējama izoforma, ko dēvē arī par „iekaisīgo” enzīmu, jo tā ekspresija ir saistīta ar dažādiem fizioloģiskiem un patoloģiskiem procesiem, kā iekaisums, angioģenēze, kaulu absorpcija, kuņģa čūla, nieru slimības, smadzeņu un sievietes reproduktīvās sistēmas traucējumiem. Turklāt, COX-2 pārāk izteikta ekspresija ir novērota dažādos vēža tipos – krūts, resnās zarnas, plaušu un prostatas vēzī. COX-2 ir ekspresēta tikai agrā šūnas diferenciācijas vai

replikācijas stadijā kā atbildes reakcija uz iekaisuma procesa stimulāciju (Frungieri et al., 2015). Tā ir ekspresēta šūnas endoplazmātiskajā tīklā un kodola apvalkā (Baue et al., 2000).

COX-2 ekspresiju var inducēt dažādi ekstracelulārie un intracelulārie stimuli, piemēram, LPS, forskolīns, IL-1, TNF, epidermālais augšanas faktors, transformējošais augšanas faktors alfa, intorferons gamma, retīnskābe, TAF, endotelīns un AS. COX-2 indukcija ir atgriezeniska pēc 24 – 48 h ārstēšanas terapijas (Williams et al., 1999).

Atšķirības starp divām dominējošām COX izoformām ir saistītas ar to unikālo struktūru (sk. 1.3. att). COX-1 un COX-2, attiecīgi satur 576 un 585 aminoskābes. Abi izoenzīmi ir homodimēri, kurā katrs monomērs satur trīs strukturāli dažādus domēnus: N-termināle, kas satur monomērus kopā ar hidrofobo mijiedarbību, ūdeņraža saitēm un sāļu tiltiem, membrānas saistošais domēns un C-termināles katalītiskais domēns, kas veido aptuveni 80% no proteīna jeb 480 aminoskābes un satur COX un peroksidāzes aktīvos saitus (Smith et al., 2012).

Viena no galvenajām izoformu struktūru atšķirībām ir tā, ka COX-2 var uzņemt lielākas ķīmiskās struktūras, jo 523. pozīcijā izoleicīns (Ile) ir aizstāts ar valīnu (Val) (sk. 1.3. att). Līdz ar to, COX-2 saistās ar lielākiem substrātiem (Knights et al., 2010).



1.3. att. COX-1 un COX-2 struktūras (Knights et al., 2010)

Ir atklātas arī citas COX izoformas – COX-3 un PCOX-1. Jāuzsver, ka šīs izoformas joprojām tiek pētītas (Frungieri et al., 2015). Tiek uzskatīts, ka COX-3 ir savienots COX-1 variants, tāpēc to dēvē arī par COX-1b (Smith et al., 2012). COX-3 piemīt mazāka aktivitāte PG sintēzē nekā COX-1, bet ir novērots, ka pretsāpju un pretdrudža līdzeklis paracetamols inhibē COX-3 aktivitāti. PCOX-1 (ang. val. *partial* COX-1) ir cits COX-1 savienots variants, kuram ir

divas izoformas – PCOX-1a un PCOX-1b. Ir zināms, ka PCOX-1 nav iesaistīts PG sintēzē (Simmons et al., 2004).

1.3.1. COX inhibitori

COX aktivitāti var ierobežot COX inhibitori, kas ir pazīstami kā nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi (NPL) (Smith et al., 2012). To galvenais darbības mehānisms ir konkurējoša abu COX izoenzīmu aktivitātes inhibīcija, samazinot PG produkciju (Krause and Müller, 2010). NPL inhibīcijas mehānismus iedala trīs kategorijās:

- 1) ātra konkurētspējīga un atgriezeniska COX-1 un COX-2 inhibīcija (ibuprofēns),
- 2) ātra, zemas afinitātes atgriezeniska saistīšanās seko laika atkarīga, augstas afinitātes, lēna atgriezeniska saistīšanās ar COX-1 un COX-2 (diklofenaks, flurbiprofēns, indometacīns),
- 3) ātra atgriezeniska saistīšanās, kas izraisa COX-1 un COX-2 kovalento modifikāciju (aspirīns) (Knights et al., 2010).

Visi šie medikamenti novērš ne tikai iekaisumu, bet arī sāpes un drudzi. NPL darbībā nozīmīgākais ir PG nomākums. PG izraisa drudzi un hiperalgēziju, kā arī veicina iekaisumu, tādēļ to sintēzes nomākšana izskaidro NPL terapeitisko darbību. Visi klasiskie NPL nomāc COX-2 un mazina iekaisuma simptomus, kā arī vienlaikus nomāc COX-1, ar ko skaidrojama NPL gastrotoksicitāte, nefrotoksicitāte un antitrombotiskā darbība (Biksone, 2008). Tāpēc perspektīvāki ir tie pretiekaisuma līdzekļi, kas spēj selektīvi kavēt COX-2, līdz ar to maz ietekmējot gremošanas trakta gļotādu un nieru funkcijas (Purviņš un Purviņa, 2011). Selektīvie COX-2 inhibitori (meloksikāms, nimesulīds) un koksību klases selektīvie COX-2 inhibitori (celekoksibs, etorikoksibs, rofekoksibs) vairāk vai mazāk bloķē COX-2, bet atstāj neskartu COX-1 (Biksone, 2008).

Arī glikokortikoīdi (deksametazons, prednizolons, hidrokortizons), kas tiek dēvēti par steroīdajiem pretiekaisuma līdzekļiem, jo to darbība ietekmē virsnieres, uzrāda COX-2 nomācošu ietekmi. COX-2 tiek kavēta pēc tās sintēzi nodrošinošo gēnu transkripcijas traucēšanas, kas notiek citoplazmatisko glikokortikoīdu receptoru aktivēšanas rezultātā (Purviņš un Purviņa, 2011).

1.4. Iekaisums neurodeģeneratīvās slimībās

Tāpat kā iekaisums perifērajos orgānos, neuroiekaisums ir dabiska aizsardzības reakcija ar mērķi likvidēt bojājuma stimulus un atjaunot audu integritāti, bet pārsniedzot kritisko sliekšni, tas veicina audu bojājumus (Ajmone-Cat et al., 2010). Iekaisums smadzenēs tiek raksturots ar glijas šūnu aktivāciju, galvenokārt mikroglijas un astrocītu, un iekaisuma mediatoru ekspresiju, kā arī ar neirotoksiskiem brīvajiem radikāļiem (Krause and Müller, 2010). Neuroiekaisums ir aktīvs process, kas ir konstatējams jau agrīnā neurodeģeneratīvo slimību stadijā (Figueiredo-Pereira et al., 2015). Savukārt, neurodeģenerācija ir progresīvs neirona struktūras un funkciju zudums, kas noved pie tā bojāejas. Neurodeģeneratīvās slimības ir hroniskas neurodeģenerācijas formas, un tās izpaužas kā Alcheimera slimība, Parkinsona slimība, Hantingtona slimība, ALS (Kluša, 2006).

Būtisks riska faktors neurodeģeneratīvo slimību attīstībai ir novecošanās. Akūtu neurodeģenerāciju novēro pēc insulta, galvas traumām, sirds apstāšanās, subarahnoidālas hemorāģijas, taču neironu nāves iemesli abos gadījumos - akūtā un hroniskā - ir vieni un tie paši. Tie ir kalcija jonu un brīvo radikāļu pārmērīga uzkrāšanās šūnā, oksidatīvais stress, mitohondriālā disfunkcija un metaboliskie traucējumi, kas rada acidozi. Rezultātā šūnas signalizācijas mehānismi, regulējot procesus no membrānas līdz kodolam un atpakaļ, ir pilnīgi traucēti. Līdz ar to tiek izjaukta šūnas homeostāze, šūnā uzkrājušies neirotoksiskie produkti izraisa nekrotisku vai apoptotisku šūnas bojāeju. Bojā gājušī šūna nespēj saņemt, pārraidīt un saglabāt informāciju, līdz ar to cilvēka kognitīvajās funkcijās rodas neurodeficīts (Kluša, 2006).

21. gadsimta sākumā zinātnieki Edīte un Patriks MakGīri (*McGeer*) atklāja neuroiekaisuma lomu Alcheimera slimības skartajos smadzeņu audos un ALS slimnieku muskuļu nervos. Tika parādīts, ka iekaisums šo slimību gadījumā saistās ar aktivētu mikrogliju un neirotoksisku iekaisuma molekulu - citokīnu, hemokīnu un pentraksīnu (C reaktīvā proteīna un amiloīda peptīda) - producēšanos. Ne mazāk intensīva tika uzrādīta arī citu iekaisuma mediatoru (PG, histamīna, bradikinīna) aktivācija. Pamatojoties uz to, izvirzīja hipotēzi, ka neuroiekaisums ir viens no galvenajiem neironu nāves iemesls, tāpēc tas jāuzskata par potenciālu terapeitisku mērķi neurodeģeneratīvo slimību ārstēšanā. Līdz ar to viena no neurodeģenerācijas protekcijas stratēģijām ir neuroiekaisums kā mērķis (Kluša, 2006).

1.4.1. COX izoformu ekspresija smadzenēs

Ir pierādīts, ka abas COX izoformas, COX-1 un COX-2, normālos fizioloģiskos apstākļos ir ekspresētas smadzenēs. Žurku smadzenēs ir konstatēta COX-1 un COX-2 imūnreaktivitāte (ang. val. *immunoreactivity*) dažādos rajonos smadzeņu garozas un hipokampa neironos. COX-1 imūnreaktivitāte dominē tādos smadzeņu rajonos kā vidussmadzenēs (*mesencephalon*), smadzeņu tiltā (*pons*) un iegarenajās smadzenēs (*medulla oblongata*). Līdzīgi arī COX-1 un COX-2 matricas ribonukleīnskābe (mRNS) ir sastopama cilvēka smadzeņu rajonos (Minghetti, 2004). COX-2 ir plaši sastopama postsinaptiskos dendrītos un „uzbudinošās” terminālēs (ang. val. *excitatory terminals*) (Aïd and Bosetti, 2011), it īpaši, dominējot hipokampā (Minghetti, 2004), kas ir iesaistīts būtiskās smadzeņu funkcijās, kā uzvedība, telpiskā orientēšanās un atmiņa (Jonas and Lisman, 2014).

COX-2 ir unikāla loma smadzenēs, salīdzinot ar perifēriju, jo smadzenēs COX-2 ir ekspresēta konstitutīvi (Krause and Müller, 2010). Šim COX izoenzīmam ir būtiska loma smadzeņu darbībā, jo COX-2 ir saistīta ar svarīgām fizioloģiskām funkcijām CNS, kā sinaptiskā aktivitāte, ilgtermiņa potencēšana, ilgtermiņa depresija, atmiņas konsolidācija un neurovaskulārā mijiedarbība hiperēmijas laikā (Aïd and Bosetti, 2011). COX-2 konstitutīvo lomu smadzenēs apstiprina vairāki pētījumi *in vivo* un *in vitro* (Minghetti, 2004).

COX-2 saistība sinaptiskajā aktivitātē tiek skaidrota ar izoenzīma imūnreaktivitāti distālajos dendrītos un dentrīta izaugumos, kas ir iesaistīti sinaptiskajā signāla pārraidē, un tās lokalizāciju „uzbudinošajos” glutamāterģiskajos neironos. COX-2 iesaistīšanās sinaptiskajā aktivitātē ir apstiprināta arī ar COX-2 ekspresijas attīstības profilu. Žurku smadzenēs COX-2 ekspresija seko attīstības gradientam un atbilst aktivitātes – atkarīgajai garozas attīstības kritiskajam periodam. Retta sindromā – neiroloģiski traucējumi, kas ir saistīti ar garīgo atpalcību, smadzeņu garozas neironu attīstības defektiem un dendrītu zarošanās anomālijām – smadzeņu garozas COX-2 imūnreaktivitāte ir traucēta, jo COX-2 pozitīvie neironi ir skaitliski samazinājušies un patvaļīgi sadalījušies (Minghetti, 2004).

Vairāki pētījumi *in vivo* uzrāda, ka COX-2 aktivitātei hipokampā ir būtiska loma atmiņā un telpiskajā orientēšanā. Piemēram, pieaugušas žurkas pakļautas selektīvai bazālo priekšējo smadzeņu (*proencephalon*) holīnerģisko neironu destrukcijai pirmajā postnatālajā nedēļā, uzrādīja samazinātu COX-2, bet ne COX-1 līmeni hipokampā. Šis novērojums tiek saistīts ar sociālās atmiņas traucējumiem, kas liecina par hipokampā holīnerģisko neironu zaudējumu

ietekmi uz COX-2 ekspresiju hipokampa neironos un PG funkcionālo lomu sinaptiskajā aktivitātē. Arī COX-2 inhibīcija, ar selektīvu COX-2 inhibitoru (celekoksibu), nevis COX-1 selektīva inhibīcija, uzrādīja pētījumā ar Morris ūdens labirinta testu (ang. val. *Morris water maze*) žurkām telpiskās atmiņas traucējumus (Minghetti, 2004).

Ņemot vērā COX-2 fizioloģisko lomu smadzeņu attīstībā un funkcijās, COX-2 *knockout* peļu smadzeņu anatomijā netika uzrādītas būtiskas novirzes. Tomēr šīm pelēm varēja novērot agrīnu un progresīvu nieru mazspēju, tāpēc netiek „izslēgts” COX-1, iespējams arī COX-3, nozīmīgais kompensācijas efekts (Minghetti, 2004).

1.4.2. COX izoenzīmu loma neuroiekaisumā

Jaunākie pētījumi uzrāda, ka COX-1 ir būtiska loma neuroiekaisuma un neurodeģenerācijas procesā. Savukārt, COX-2 atkarībā no stimula, šūnu tipa un eikosanoīdu sintēzes substrāta, piemīt pretiekaisuma vai neirotoksiska aktivitāte (Aid and Bosetti, 2011).

Ir pierādīts, ka COX-1 uztur iekaisuma procesus un veicina iekaisuma PG *upregulation* dažādos neuroiekaisuma modeļos. Neuroiekaisumā COX-1 ekspresija ir izteikta mikroglijas un perivaskulārās šūnās. Pateicoties COX-1 dominējošai lokalizācijai, COX-1 reakcijas ķēdes metabolīti ir svarīgi iekaisuma atbildes sākotnējās fāzes modulēšanā, kā arī izoenzīmam ir būtiska loma imūno – smadzeņu (ang. val. *immune-to-brain*) signāla mediēšanā. Pētījumi *in vivo* uzrāda, ka vecākām žurkām hipokampā ir palielināts COX-1 metabolīta TXB₂ līmenis un izteikta COX-1 ekspresija, kas var veicināt pastiprinātu smadzeņu jutību pret iekaisuma un neurodeģeneratīvajām slimībām. Kā arī COX-1 deficīta pelēm, pakļautas centrālajai LPS injekcijai, tika uzrādīta samazināta iekaisuma atbildes reakcija, leikocītu infiltrācija, oksidatīvais stress un neironu bojājumi. COX-1 ir būtiska ne vien akūtā, bet arī hroniskā neuroiekaisumā. Parkinsona slimības – raksturīga astroglioze, mikrogliju aktivācija, iekaisums un neurodeģenerācija – dzīvnieku modelis pelēs uzrāda pastiprinātu COX-1 ekspresiju un COX-1 inhibīcija uzlaboja peļu dzīvildzi (Aid and Bosetti, 2011).

Precīzi mehānismi, ar kuriem COX-1 ir iesaistīta neuroiekaisumā, tiek vēl pētīti. Tā kā COX-1 galvenokārt ir sastopama mikroglijās un perivaskulārās šūnās, tad ir izvirzīta hipotēze, ka enzīms var mobilizēties dažu sekunžu vai minūšu laikā pēc akūta ierosinājuma, tādējādi veicinot

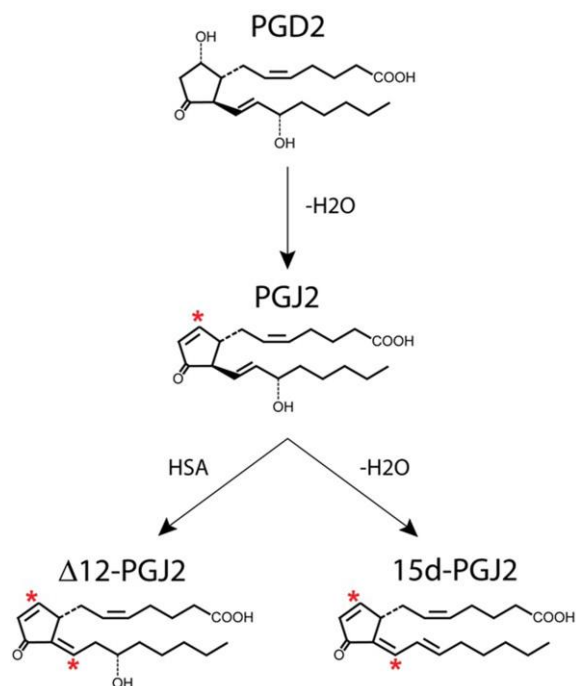
lokālu eikosanoīdu iekaisuma aktivāciju pirms COX-2 ekspresijas inducēšanas (Aid and Bosetti, 2011).

Ir divi galvenie aspekti, kuri būtu jāņem vērā nosakot COX-2 aktivitātes lomu smadzeņu slimībās. Pirmkārt, COX-2 ir ekspresēta fizioloģiskos apstākļos un veicina būtiskas smadzeņu funkcijas, kā sinaptiskā aktivitāte, atmiņas konsolidēšanās un funkcionālā hiperēmija. Otrkārt, neuroiekaisums ir daudz vairāk kontrolēta reakcija nekā iekaisums perifērajos audos (Minghetti, 2004).

Vairāki šūnu tipi, ieskaitot rezidentu šūnas (piemēram, neironi, glijas, endotēlija šūnas) un infiltrējošās asins šūnas, var ekspresēt COX-2 smadzenēs. Pārāk izteikta COX-2 ekspresija katrā no šajām šūnām var izraisīt atšķirīgas funkcionālās sekas un to iznākums ir atkarīgs no dominējošā COX-2 produkta aktivitātes, ieskaitot PG ar dažādām funkcijām un brīvos radikāļus. Neironi ir īpaši jutīgi pret bojājumiem, ko izraisa brīvie radikāļi, ģenerējoties no COX-2 peroksidāzes aktivitātes (sk. 1.2. att). Savukārt, glijas šūnas ir daudz rezistentākas pret šiem bojājumiem. Specifiski signāli ir atbildīgi par COX-2 indukciju un/vai pārlietu izteiktu ekspresiju šūnu tipos, piemēram, glutamāts neironos, citokīni astrocītos un apoptotiskie neironi mikroglijās (Minghetti, 2004).

Ir atklāta arī COX-2 metabolisma produktu protektīvā darbība iekaisuma progresēšanā un/vai rezolūcijā (ang. val. *resolution*) smadzenēs pēc endotoksīna smadzeņu iedzīmtās imunitātes aktivēšanas. Šo mediatoru darbība varētu izskaidrot COX-2 pretiekaisuma vai *pro-resolving* īpašības. Rezolūcijas fāzē (ang. val. *resolution phase*), kas seko iekaisuma stimulam, iekaisums tiek novērsts, ļaujot audiem atgriezties ne-iekaisuma, homeostatiskā fāzē. Rezolūcijas fāze ir aktīvs, mediēts ar lokālas darbības un specializētiem lipīdu mediatoriem, process. Šie lipīdu mediatori ar imūnregulatorām īpašībām ir lipoksīni, PG, rezolvīni un protektīni (ang. val. *protectins*). Balstoties uz hipotēzi, ka COX-2 ir nepieciešams iekaisuma rezolūcijā, COX-2 deficīta peles uzrādīja palielinātu leikocītu, pārsvarā neitrofilu, infiltrāciju smadzenēs pēc centrālā endotoksīna izraisītā stimula (Aid and Bosetti, 2011).

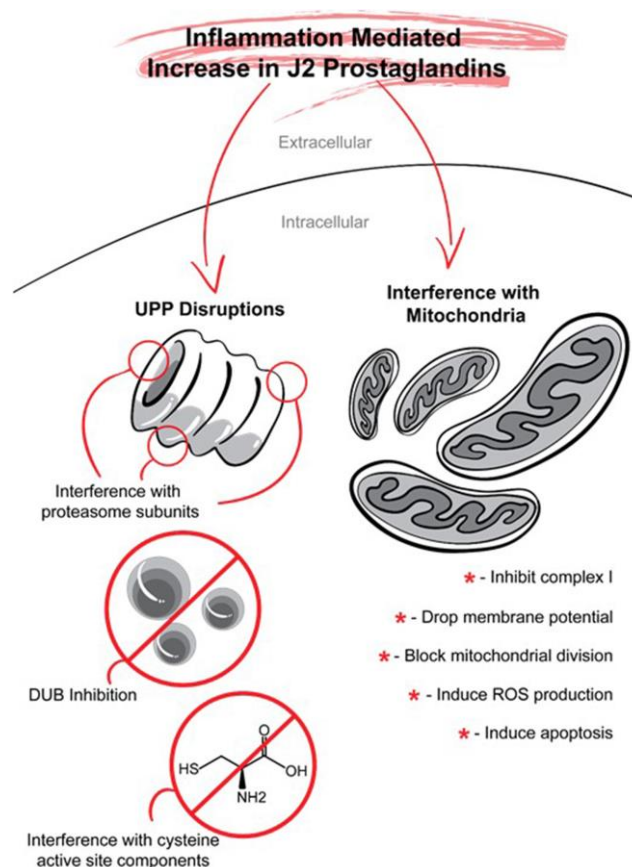
Visvairāk ekspresētais smadzenēs COX-2 ierosinātās kaskādes metabolīts ir PGD₂. Šis PG ir nestabils un gan *in vivo*, gan *in vitro* viegli pakļaujas neenzimātiskai dehidratācijai, ģenerējot bioloģiski aktīvu ciklopentanonu PGJ₂, kas, savukārt, producē divus metabolītus – Δ12-PGJ₂ un 15-deoksi-12,14-PGJ₂ (15d-PGJ₂) (sk. 1.4. att.) (Figueiredo-Pereira et al., 2015).



1.4. att. PGJ₂ un tā metabolītu veidošanās (Figueiredo-Pereira et al., 2015)

PGJ₂ veidojas PGD₂ neenzimātiskas dehidratācijas rezultātā. PGJ₂ metabolīti, Δ12-PGJ₂ un 15d-PGJ₂, rodas attiecīgi iesaistoties PGJ₂ vai cilvēka seruma albumīna (ang. val. *human serum albumin* (HSA)) katalizētajā reakcijā, vai dehidratācijā.

Kopumā, PGJ₂ loma iekaisumā ir kompleksa (Figueiredo-Pereira et al., 2015). Tam piemīt gan pretiekaisuma un rezolūcijas mediatora īpašības, gan pro-iekaisuma aktivitāte. Ir pierādīts, ka selektīvie COX-2 inhibitori, bloķējot COX-2 inducēto PGD₂ un tā metabolītu 15d-PGJ₂, kavē iekaisuma rezolūcijas fāzi un homeostāzes atgriešanos. 15d-PGJ₂ supresē arī inducētā NO sintāzes aktivitāti un pro-iekaisuma citokīnu ekspresiju (TNF-α, IL-6), samazina monocītu migrāciju un ierosina polimorfnukleāro monocītu un makrofāgu apoptozi (Aid and Bosetti, 2011). Taču PGJ₂ spēj darboties arī kā pro-iekaisuma aģents. PGJ₂ var tikt pakļauts diviem ceļiem, ubikvitīna – proteasomu un mitohondriju, kuriem ir būtiska loma neurodeģenerācijā (sk. 1.5. att.). Ir pierādīts, ka nervu šūnās PGJ₂ izraisa ubikvitīna proteīna akumulāciju/agregāciju, kā arī inhibē mitohondriālā elektrona transporta ķēdes kompleksa I enzīmu adenīna dinukleotīda reducētās formas (NADH) – ubikvinona reduktāzi. PGJ₂ inducē arī brīvo radikāļu veidošanos un apoptozi, samazina membrānas potenciālu un bloķē mitohondriālo dalīšanos (Figueiredo-Pereira et al., 2015).



1.5. att. PGJ₂ pro-iekaisuma darbības mehānisms (Figueiredo-Pereira et al., 2015)

PGJ₂ var iedarboties ar ubikvitīna – proteasomu ceļu, inhibējot 26S proteosomu, *de-ubiquitinating* (DUB) enzīmu un kovalenti modificējot cisteīna aktīvus saita komponentus. PGJ₂ var radīt arī traucējumus normālā mitohondrija funkcionēšanā, inhibējot NADH – ubikvīnona reduktāzi, samazinot membrānas potenciālu, bloķējot *fission* un inducējot brīvo radikāļu produkciju un apoptozi.

PGJ₂ komplekso darbību ietekmē tā intracelulārais mērķis un pakļautais ceļš, kas var būt devas un šūnu tipa atkarīgs. Neurotoksiskā mehānisma identificēšana, kuram ir pakļauts PGJ₂, varētu radīt jaunas stratēģijas ar neurodeģeneratīvo saistītā iekaisuma novēršanā (Figueiredo-Pereira et al., 2015).

Kopsavilkumā, identificējot COX-1 un COX-2 specifiskās lomas CNS iekaisumā un šo izoenzīmu saistīšanos ar receptoriem, izraisa neuroiekaisuma pašreizējās terapeitiskās stratēģijas pārskatīšanu un jaunu ārstēšanas pieeju atklāšanu. COX-1, kas klasiski uzskatīts par homeostatisku izoenzīmu, uzrāda aktīvu iesaistīšanos pro-iekaisuma stimulu inducētos smadzeņu bojājumos. Savukārt, COX-2 ierosinātās kaskādes metabolīti uzrāda pretiekaisuma un pro-rezolūcijas īpašības, kas var būt par pamatu COX-2 neuroprotektīvās darbības izskaidrošanai neuroiekaisuma apstākļos (Figueiredo-Pereira et al., 2015).

1.4.3. COX inhibitoru terapija

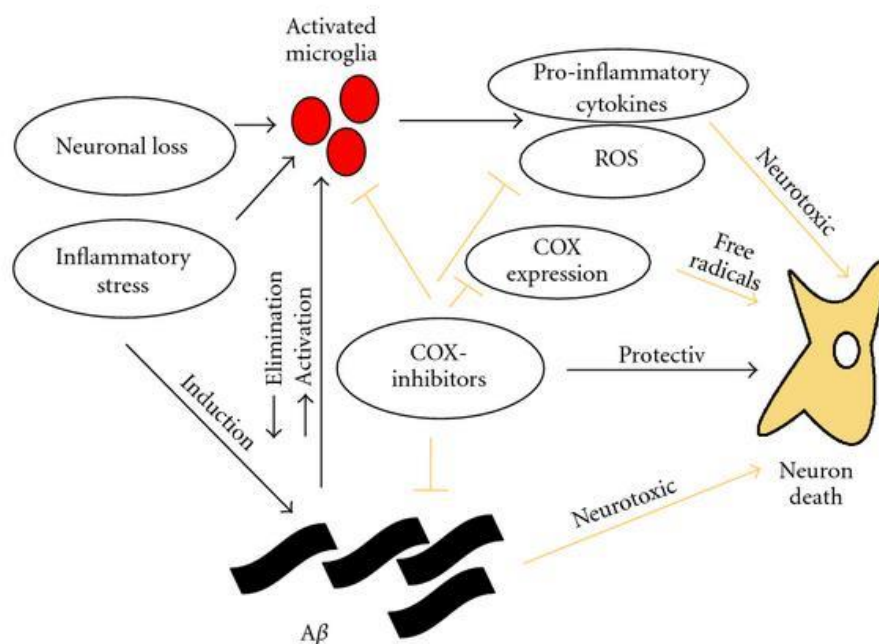
Ir zināms, ka neuroiekaisums, pārsvarā mikrogliju mediēts, ir svarīgs komponents vairākās neurodeģeneratīvās slimībās un var veicināt kognitīvos traucējumus gados vecākiem cilvēkiem (Aïd and Bosetti, 2011). Līdz ar to pretiekaisuma līdzekļu lietošana ir plaši izskatīta kā iespējamā terapeitiskā stratēģija neurodeģeneratīvo slimību ārstēšanā (Krause and Müller, 2010).

Alcheimera slimība ir viena no izplatītākajām neurodeģeneratīvām slimībām, kas tiek raksturota ar amiloīdo (A) β plākšņu nogulsnešanās smadzeņu parenhīmā un neurofibrilāro (ang. val. *neurofibrillary*) sapīšanos neironos (Krause and Müller, 2010). Šīs slimības pacientiem pakāpeniski zūd koncentrēšanās un ekstrapolācijas spējas, sašaurinās interešu loks, pakāpeniski pavājinās atmiņa, līdz beidzot iestājas izteikts atmiņas zudums, personas degradācija un demence (Kluša, 2006). Alcheimera slimības gadījumā COX-1 ekspresējas mikroglijās apkārt A β plāksnēm, savukārt, COX-2 ekspresija nav noteikta smadzeņu mikroglijās vai astrocītos. Tāpēc tiek ierosināts, ka NPL ieguvums Alcheimera slimības novēršanā varētu būt saistīts ar COX-1, nevis COX-2 inhibīciju (Aïd and Bosetti, 2011).

Vairāki pētījumi, galvenokārt izmantojot selektīvos COX-2 inhibitorus, Alcheimera slimības pacientiem ar viegliem vai vidēji smagiem kognitīviem traucējumiem, nav uzrādījuši nekādu ieguvumu, izņemot dažus pētījumus ar indometacīnu, kas ir duālais COX-1/COX-2 inhibitors (Aïd and Bosetti, 2011; Ajmone-Cat et al., 2010). Jāuzsver, ka pirmais un vienīgais primārais profilakses pētījums (ADAPT), pētot celekoksiba (selektīvs COX-2 inhibitors) un naproksēna (duālais COX-2/COX-1 inhibitors) efektu Alcheimera slimībā, selektīvais COX-2 inhibitors neuzrādīja slimības riska samazinājumu, pat norādīja negatīvu iedarbību uz kognitīvām funkcijām, salīdzinot ar *placebo* kontroles grupu. Vidēji pēc divu gadu ārstēšanas šis pētījums tika apturēts, kardiovaskulāro drošības apsvērumu dēļ (Aïd and Bosetti, 2011). Kaut gan selektīvie COX-2 inhibitori neizraisa klasisko NPL blakusparādības, piemēram, kuņģa – zarnu trakta asiņošanu, tomēr tie ir uzrādījuši nopietnus sirds un asinsvadu blakus efektus (piemēram, rofekoksibs), tādējādi ierobežojot to klīnisko lietošanu (Ajmone-Cat et al., 2010). Kaut gan ir nepieciešami vēl papildus pētījumi, tomēr izanalizējot šajā pētījumā (ADAPT) iegūtos datus, tie liecina, ka celekoksibs var veicināt Alcheimera slimības patoģenēzi pacientiem ar salīdzinoši progresējošu slimību, bet naproksēns spēj aizsargāt neurodeģenerāciju un demenci pacientiem ar mazāk bojājumu skartajām smadzenēm (Aïd and Bosetti, 2011).

NPL terapijai Alcheimera slimības gadījumā ir būtiska nozīme tieši agrīnā slimības stadijā. Tas tiek pamatots ar COX-2 ekspresētā PGE₂ līmeni. Šī PG cerebrospinālā šķidrums līmenis Alcheimera slimībā ir izteikti paaugstināts agrīnā slimības stadijā, bet samazināts – vēlīnā slimības stadijā (Krause and Müller, 2010).

COX inhibitoru darbība Alcheimera slimības patoģenēzē var būt daudzpusīga (sk. 1.6. att.) COX inhibitori var bloķēt COX ekspresiju, aktivētas mikroglijas, brīvos radikāļus un Aβ plāksnes (sk. 1.6. att.) (Krause and Müller, 2010).



1.6. att. COX inhibitoru iespējamie mehānismi Alcheimera slimībā (Krause and Müller, 2010)

Jaunākie pētījumi par COX-1 un COX-2 lomu CNS liek pārskatīt pašreizējās terapeitiskās stratēģijas un pētīt jaunas pieejas neuroiekaisuma ārstēšanā. Pētījumos tiek uzsvērts, ka tieši COX-1 inhibīcija būtu jāuzskata par potenciālo terapeitisko stratēģiju neurodeģeneratīvo slimību ārstēšanā (Aïd and Bosetti, 2011).

1.5. Neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnija

Neuroblastoma ir embrionāls audzējs no simpātiskās nervu sistēmas, kas rodas jau auglī vai agri pēc bērna dzimšanas. Tas ir izplatīts ļaundabīgais audzējs bērniem un zīdaiņiem (Davidoff,

2012). Neuroblastomas šūnu līnijām piemīt izteiktas neironālas un/vai neuroendokrīnas īpašības. Šīs šūnu līnijas izmanto kā modeli, lai pētītu nervu un neironendokrīno šūnu attīstību, kā arī kateholamīnu biosintēzes regulāciju (Thiele, 1998).

Neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnija tika trīs reizes klonēta no SK-N-SH šūnu līnijas, kas sākotnēji tika iegūta 1970. gadā no kaulu smadzeņu biopsijas četrus gadus vecai neuroblastomas pacientei (Biedler et al., 1973). SK-N-SH šūnu līnija ietver šūnas ar trīs fenotipiem: neironu (N tips), *Scwannian* (S tips) un starpnieku (I tips). SH-SY5Y šūnu līnija pieder pie N tipa (Xie et al., 2010). Šīs šūnas plaši izmanto neironu modeļos jau kopš 1980. gada eksperimentālajos neiroloģiskajos pētījumos, ieskaitot neironu funkcijas, augšanu, reakciju uz bojājumiem, deģenerāciju un diferenciaciju (Yusuf et al., 2013).



1.7. att. Neuroblastomas SH-SY5Y šūnas (Xing et al., 2005)

SH-SY5Y šūnām piemīt spēja sintezēt dopamīnu un noradrenalīnu, jo šūnas ekspresē tirozīna hidroksilāzi un dopamīna- β -hidroksilāzi. Šīs šūnas ekspresē arī dopamīna transportieri, kas regulē dopamīna homeostāzi, izmantojot specifisku dopamīna uzņemšanu (Xie et al., 2010). Parkinsona slimības modelim plaši tiek izmantotas neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnija (Constantinescu et al., 2007), kā arī šīs šūnas var izmantot *in vitro* modelim, lai pētītu Alzheimeras slimību (Yusuf et al., 2013).

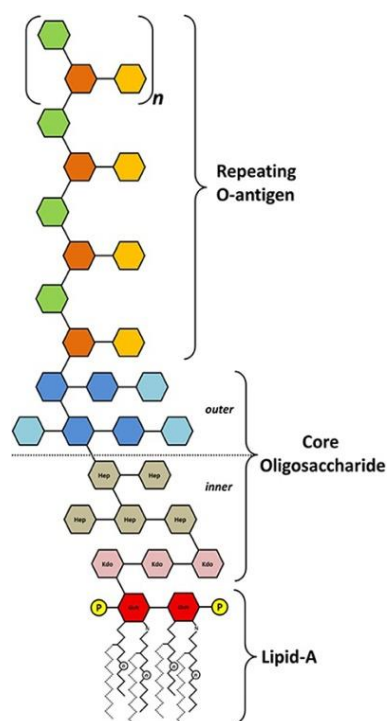
Pētījumi par šūnu citogēnētiskām, bioķīmiskām un kancerogēnām īpašībām norāda, ka šīs šūnas saglabā savas oriģinālās iezīmes arī pēc daudzkārtējas šūnu pārsēšanas (Biedler et al., 1973). Turklāt, SH-SY5Y šūnām piemīt spēja proliferēties kultūrā ilgā periodā bez kontaminācijas, kas ir būtisks priekšnosacījums *in vitro* šūnu modelim (Xie et al., 2010).

Diferencētas un nediferencētas SH-SY5Y šūnas ir kļuvušas par populāru *in vitro* modeli Parkinsona slimībai (Yusuf et al., 2013). SH-SY5Y šūnas, izmantojot dažādus aģentus (piemēram, retinoīnskābi), var tikt diferencētas par vairāk izteiktākiem dopamīnerģiskajiem neironiem. Taču daži šie aģenti var izraisīt ne tikai šūnu diferenciaciju, bet arī ilgstošā laika periodā piešķirt tām toleranci. Tāpēc nediferencētas SH-SY5Y šūnas ir piemērotākas neirotoksicitātes vai neiroprotekcijas izpētei Parkinsona slimības šūnu modelī (Xie et al., 2010).

1.6. Lipopolisaharīda (LPS) iekaisuma modelis

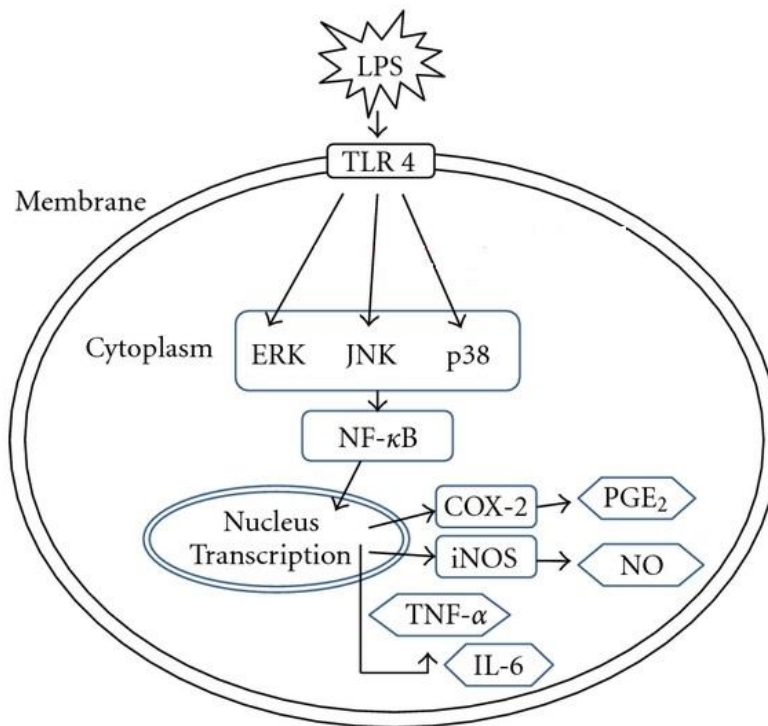
LPS ir endotoksīns, kas atrodas Gram-negatīvo baktēriju ārējā membrānā (Raetz and Whitfield, 2002; Serrato, 2014). Tā darbība izraisa plašu imūno atbildes reakciju, aktivējot imūno sistēmu un dažādus iekaisuma mediatorus (Raetz and Whitfield, 2002). LPS iekaisuma modeli plaši izmanto gan *in vivo*, gan *in vitro* pētījumos. LPS inducēts neuroiekaisums pētījumos *in vivo* uzrāda, ka tiek ietekmēti nopietni CNS aspekti – kognitīvās funkcijas, mācīšanās, atmiņa, dendrītu garumu un izaugumu blīvums, kā arī neuroģenēze (Das et al., 2012). *In vitro* pētījumos LPS modelis tiek izstrādāts dažādās šūnu līnijās, piemēram, BV2 peļu mikroglijas šūnās (Jo et al., 2014), RAW 264.7 peļu makrofāgu šūnās (Lee et al., 2012) un neuroblastomas SH-SY5Y šūnās (Das et al., 2012).

LPS sastāv no hidrofobā domēna lipīda A jeb endotoksīna, serdes oligosaharīda un O-sānu ķēdes jeb O-antigēna (sk. 1.8. att.). Lipīds A, LPS hidrofobais enkurs, ir glikozamīna balstīts fosfolipīds, kas veido Gram-negatīvo baktēriju ārējās membrānas ārējo monoslāni (Raetz and Whitfield, 2002). Tas galvenokārt ir atbildīgs par LPS izraisītajām iekaisuma īpašībām (Kallapura et al., 2014). Serdes oligosaharīds sastāv no diviem reģioniem – iekšējās un ārējās serdes. Ārējais serdes reģions nodrošina saistīšanos ar O-antigēnu, kas ir ievērojams ar savu strukturālo daudzveidību. Tas sastāv no vairāk nekā 60 monosaharīdiem un 30 dažādiem neogļhidrātu saturošiem komponentiem (Raetz and Whitfield, 2002).



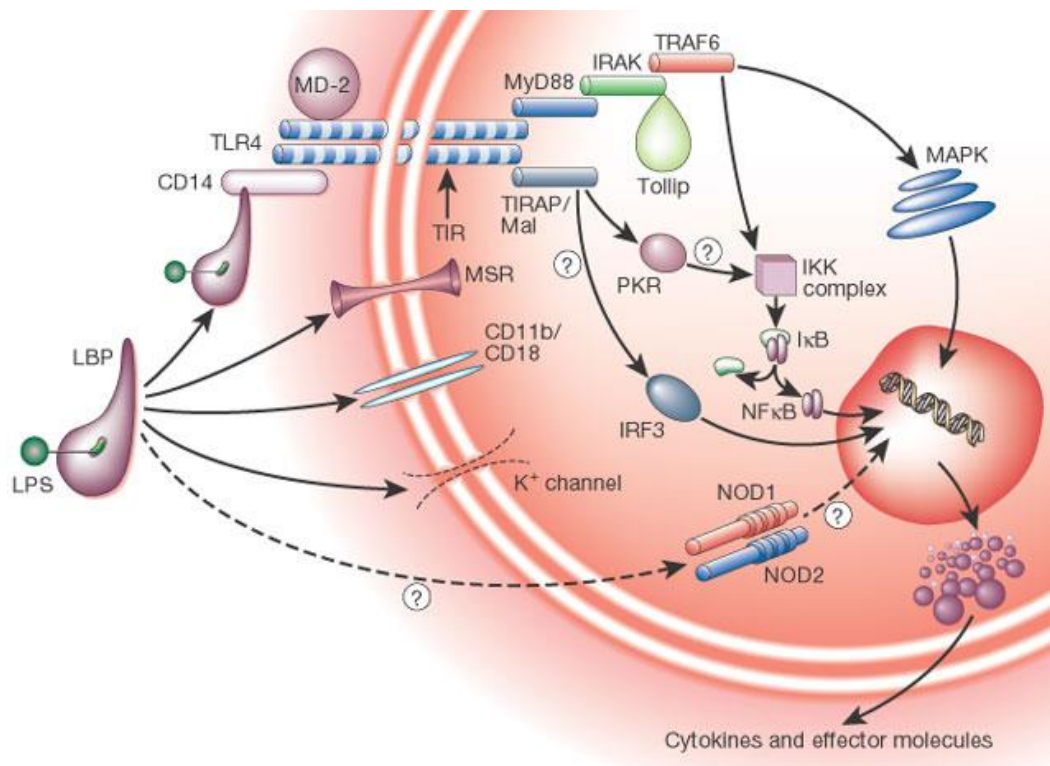
1.8. att. LPS struktūra (Serrato, 2014)

LPS iekaisuma modeļa darbība ir saistīta ar transkripcijas aktivēšanu, kā rezultātā notiek dažādu iekaisuma mediatoru ražošana un izdalīšanās caur receptoru mediētu signāla ceļu/kaskādi. Vispirms LPS saistās ar seruma proteīnu, kas ir zināms kā LPS saistīšanās proteīns (ang. val. *LPS binding protein*) (LBP). LBP ir būtiska loma ātrai iekaisuma atbildes reakcijas indukcijai, saistoties ar mazu daudzumu LPS vai Gram-negatīvajām baktērijām. Tālāk LPS-LBP komplekss saistās ar koreceptoru diferenciacijas klasteri 14 (ang. val. *cluster of differentiation*) (CD14), netieši ierosinot intracelulāros transdukcijas signālus. *Toll like* receptors 4 (TLR-4) ir galvenais receptors, kas ir iesaistīts LPS inducētās imūnās sistēmas atbildes reakcijas aktivizēšanā. LPS-LBP komplekss saistās ar TLR4 (Kallapura et al., 2014) un tālāk mitogēnu – aktivētās proteīna kināzes (MAPK) raida ekstracelulāro signālu dažādos šūnu procesos, piemēram, šūnu diferenciacija, proliferācija, izdzīvošana un apoptoze. MAPK galvenie komponenti ir ekstracelulāro signālu regulētā kināze (ERK), c-Jun N gala kināze (JNK) un p38. MAPK ierosinātais ceļš aktivē kodola faktoru – kappā B (ang. val. *nuclear factor – kappa B*) (NF-kB) un izraisa iekaisuma gēnu ekspresiju (Lee et al., 2012). Transkripcijas faktors NF-kB atzīst LPS molekulu par specifisku imūnās sistēmas šūnu un mediē vairāku LPS inducēto iekaisuma mediatoru izdalīšanos - citokīnus (TNF α , IL), PGE $_2$, NO (Kallapura et al., 2014) (sk. 1.9. att.).



1.9. att. **LPS inducēts iekaisums makrofāgos.** Attēls ar izmaiņām no (Lee et al., 2012)

LPS inducētā iekaisuma galvenais mehānisms ir saistīts LPS-LBP kompleksa TLR4 aktivēšanu. Tomēr LPS var saistīties arī ar citām šūnas virsmas molekulām, ieskaitot, makrofāgu *scavenger* receptoru (MSR), CD11b/CD18, jonu kanālus, kā arī ar intracelulāro receptoru, ko dēvē par nukleotīda-saistīšanās oligomerizācijas domēna (NOD) (ang. val. *nucleotide-binding oligomerization domain*) proteīnu (sk. 1.10. att.) (Cohen, 2002).



1.10. att. **LPS celulārie mehānismi** (Cohen, 2002)

LPS iekaisuma procesus šūnā var izraisīt, saistoties ar šūnas membrānā lokalizētām molekulām, kā TLR4, MSR, CD11b/CD18 un jona kanāliem, vai ar intracelulāro NOD receptoru.

Neironos TLR4 ekspresija nav pierādīta (Aïd and Bosetti, 2011), tomēr ir uzrādīta NOD receptora aktivitāte. Līdz ar to LPS iekaisuma modelis neironos tiek saistīts ar iespējamu NOD receptora aktivāciju. Ir divu veidi NOD receptori, NOD-1 un NOD-2, ar kuriem saistoties, tiek aktivēts NF-κB un MAPK ceļš. Tiek uzskatīts, ka tieši NOD-2 receptors ir saistīts ar iekaisuma procesiem neironos. Jāuzsver, ka NOD receptori neironos nav pilnībā izpētīti (Li et al., 2010).

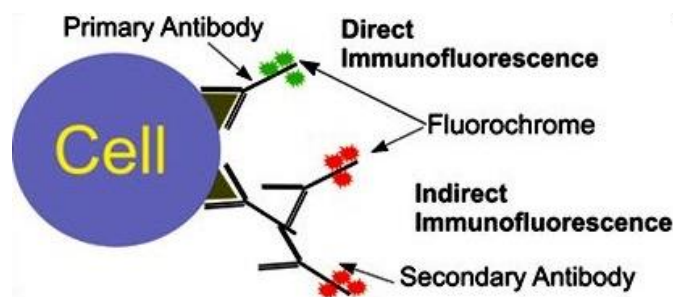
1.7. Imūnfluorescences (IF) metode

Fluorescence ir process, kurā tiek absorbēti viena konkrēta viļņa garuma gaismas stari un emitēti ar atšķirīgu viļņa garumu. Emisija notiek ļoti ātri, uzreiz pēc gaismas absorbcijas ierosināšanas. IF ir bioķīmiska iekrāsošanas metode antivielu noteikšanai, kuras ir saistījušās ar mērķa antigēnu. (Sawant et al, 2014). IF var pielietot kā histoķīmisku vai citoķīmisku metodi antigēna noteikšanai šūnās vai audos (Rodgers, 1994). Šo metodi plaši izmanto gan zinātniskajos pētījumos, gan klīniskajās laboratorijās (Odell and Cook, 2013).

IF metodē antigēnu, antivielu un citi kompleksi tiek aplūkoti ar ultravioleto mikroskopu, izmantojot attiecīgās antivielas kompleksu ar fluorohromu. Fluorohromi ir vielas, kas absorbē ienākošās gaismas enerģiju. Fluorescentais materiāls izstaro gaismu, pateicoties to atomu struktūrai. Vielas elektroni ir izkārtoti enerģijas līmeņos apkārt atoma kodolam. Elektrons absorbē enerģiju no fotona uz gaismu, kā rezultātā elektrons kļūst „uzbudināts” un pārvietojas augstākā enerģijas līmenī. Tas ir spontāns process, kurā tiek emitēta gaisma ar garāku raksturīgo viļņa garumu (Sawant et al, 2014).

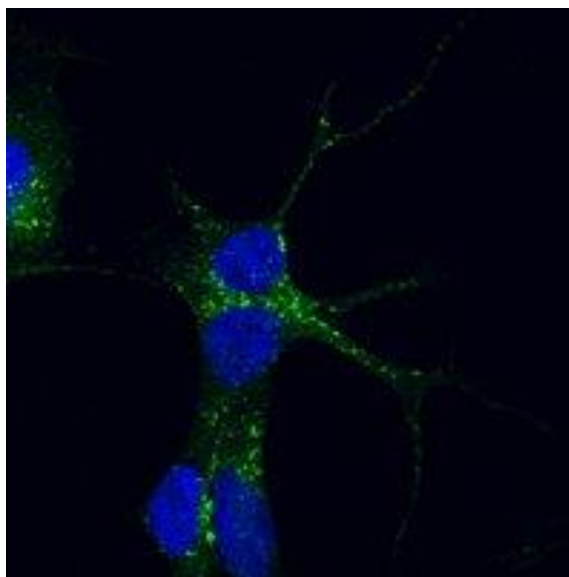
IF metodē plaši tiek izmantoti tādi fluorohromi kā fluorescīna izotiocianāts (FITC), kas tiek atspoguļots zaļā krāsā, tetrametilrodamīna izotiocianāts (TRITC) un fikoeritrīns, kas atspoguļojas sarkanā krāsā. Katram fluorohromam ir raksturīgs konkrēts optimālais ierosināšanās gaismas diapazons (Sawant et al, 2014). Piemēram, FITC gaismas absorbcijas maksimums ir 490 – 495 nm un tas izstaro zaļo krāsu pie 517 nm, bet TRITC absorbcijas maksimums ir 550 nm un maksimālā emisija ir pie 580 nm (Rodgers, 1994).

Ir divas galvenās IF metodes – tiešā un netiešā (sk. 1.11. att). Tiešajā IF izmanto fluorescēnta iezīmēto antivielu tiešu piesaistīšanos mērķa antigēnam. Savukārt, netiešā IF notiek divos etapos. Sākumā neiezīmētā primārā antiViela saistās ar mērķa antigēnu, pēc tam iezīmētā sekundārā antiViela tiek izmantota, lai noteiktu primāro antiVielu (Odell and Cook, 2013).



1.11. att. Tiešās un netiešās IF shematisks attēls (Sawant et al, 2014)

Iegūtais fluorescences signāls ir atkarīgs no vairākiem faktoriem. Antivielas atbilstībai, kvalitātei un koncentrācijai ir būtiska loma, jo tā ietekmē signāla un fona attiecību. Parauga uzglabāšana arī ietekmē signāla intensitāti. Paraugu jāuzglabā tumsā, jo ilgstošā gaismas iedarbībā var zust fluorescēnta signāls (Odell and Cook, 2013).



1.12. att. IF metodes iegūtā attēla paraugs (Nielsen)

Antivielas EB06268 iekrāsotas, paraformaldehīda fiksētas un saponīna permeabilizētas, neuroblastomas SH-SY5Y šūnas, noteiktas ar fluorohromu FITC konfokālajā mikroskopā.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

Pētījumā tika izmantota šūnu barotne *Minimum Essential Medium* (MEM) (kat. nr. 10370), fetālais vērša serums (FBS) (kat. nr. 10106), *Ham F12* (F12) (kat. nr. 21765), fosfāta buferēts sāļu šķīdums (PBS) (kat. nr. 10010-031) no *Gibco* (ASV), lipopolisaharīds (LPS) (kat. nr. L2880), penicilīns – streptomicīns (kat. nr. P4333), 0,01% poliornitīns (kat. nr. P4957), paraformaldehīds (PFA) (kat. nr. P6148), liellopu seruma albumīns (BSA) (kat. nr. A9418-100G), *Triton X-100* (kat. nr. T9284) no *Sigma – Aldrich* (ASV), 0,25% tripsīns-etilēndiaminotetraacetilskābe (tripsīns-EDTA) (kat. nr. 03-052-1B) no *Biological Industries* (Izraēla), tripānzilā krāsviela (kat. nr. L6232) no *Biochrom AG* (Vācija), dimetilsulfoksīds (DMSO) (kat. nr. A3006) no *AppliChem* (Vācija), cilvēka ciklooksigenāzes – 2 (COX-2) antivielā (kat. nr. MAB4198) no *R&D Systems* (ASV), Alexa Fluor 488 sekundārā antivielā (kat. nr. A11001) no *Invitrogen* (ASV), *Prolong Gold* ieslēgšanas vide ar 4,6-diamino-2-fenilindolu (DAPI) (kat. nr. P36931) no *Life Technologies* (ASV).

25 cm² šūnu audzēšanas flakoni (kat. nr. 7334082), 24-lauciņu šūnu kultūras plate (kat. nr. 83.1836.300) no *Sarstedt* (Vācija), 8-lauciņu plate (kat. nr. 177402) no *Thermo Scientific* (ASV).

2.2. Neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnija

Pētījums tika veikts ar neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līniju, kas iegūta no *American Type Culture Collection* kat. nr. CRL 2266. Šūnas tika atkausētas (sk. 2.2.1.) un audzētas 25 cm² šūnu audzēšanas flakonos barotnē MEM/F12 [1:1], kas papildināta ar 10% FBS un 100 µg/ml penicilīna – streptomicīna maisījumu, inkubatorā 5% CO₂ atmosfēras/95% mitruma un 37°C temperatūrā. Šūnām sasniedzot 70 – 80% konfluenci, tika veikta šūnu tripsinizēšana (sk. 2.2.2.) un sasaldēšana (sk. 2.2.3.).

2.2.1. Šūnu atkausēšana

Nepieciešamie reaģenti: barotne MEM/F12 [1:1] ar 10% FBS un 100 µg/ml penicilīna – streptomicīna maisījumu, tripānzilā krāsviela.

Nepieciešamie materiāli: sterilas vienreizlietojamās seroloģiskās pipetes, automātiskās pipetes un pipešu uzgaļi, 15 ml stobriņš, 1,5 ml mikrostobriņš, 25 cm² šūnu audzēšanas flakons, šūnu skaitīšanas (Gorjajeva) kamera.

Pirms darba uzsākšanas tika sagatavota darba vieta atbilstoši aseptiska laboratorijas darba prasībām (laminārs iepriekš apstarots 15 minūtes ar ultravioleto gaismu, virsmas apstrādātas ar 70% spirtu, ieslēgta nepieciešamā aparatūra). Šūnu atkausēšana tika veikta ātri un saudzīgi, lai pēc iespējas mazāk šūnas pakļautu stresa apstākļiem.

Šūnas tika uzglabātas mikrostobriņā saldētavā -80°C temperatūrā. Pirms šūnu izņemšanas no saldētavas, laminārā tika sagatavots stobriņš ar 5 ml siltas barotnes. Šūnu mikrostobriņš tika izņemts no saldētavas un atkausēts uz 1 – 2 minūtēm, iegremdējot ūdens vannā pie 37°C temperatūras. Atkausētās šūnas saudzīgi pārlietas stobriņā ar iepriekš sagatavoto 5 ml barotni. Stobriņš tika centrifugēts 5 minūtes pie 1500 apgriezieniem, tālāk tika noliets virsnogulšņu šķidrums un suspendētas nogulsnes barotnē, lai kopējais tilpums būtu 1 ml. No tā 50 µl tika ienesti mikrostobriņā un tam pievienots 50 µl tripānzilās krāsvielas (attiecībā 1:1). Šūnu suspensijas un tripānzilās krāsvielas piliens tika iepildīts Gorjajeva kamerā. Tika veikta visu un mirušo (tripānzilās krāsvielas iekrāsoto) šūnu skaitīšana. Procentuāli tika aprēķinātas dzīvotspējīgās šūnas no kopējā šūnu skaita.

Atlikušās šūnas tika suspendētas 5 ml barotnē un izsētas 25 cm² šūnu audzēšanas flakonā. Flakons tika noformēts atbilstoši laboratorijas prasībām (uz flakona sāna – šūnu līnijas nosaukums, datums, pasāžas numurs, iniciāļi) un ievietots inkubatorā.

2.2.2. Šūnu tripsinizēšana

Nepieciešamie reaģenti: PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH = 7,4), 0,25% tripsīns-EDTA, barotne MEM/F12 [1:1] ar 10% FBS un 100 µg/ml penicilīna – streptomicīna maisījumu.

Nepieciešamie materiāli: sterilas vienreizlietojamās seroloģiskās pipetes, automātiskās pipetes un pipešu uzgaļi, 15 ml stobriņš, 25 cm² šūnu audzēšanas flakons, 8-lauciņu plate vai 24-lauciņu šūnu kultūras plate, šūnu skaitīšanas (Gorjajeva) kamera.

Mikroskopā tika novērtēta šūnu konfluēnce flakonā, tripsinizēšana un pārsēšana tika veikta sasniedzot 70 – 80% konfluenci. Pirms darba uzsākšanas tika sagatavota darba vieta atbilstoši aseptiska laboratorijas darba prasībām. Nepieciešamie reaģenti iepriekš tika sasildīti ūdens vannā 37°C temperatūrā.

No šūnu flakona ar seroloģisko pipeti tika uzmanīgi atsūkta barotne. Šūnas flakonā tika skalotas ar 5 ml PBS, tripsinizētas ar 1 ml 0,25% tripsīnu-EDTA inkubatorā uz 1 – 2 minūtēm 37°C temperatūrā. Mikroskopā tika novērots, vai šūnas ir atrāvušās vienmērīgi no flakona virsmas un reakcija apstādināta ar 1 ml barotnes. Flakonā tika pievienots 8 ml PBS un šūnu suspensija pārnesta 15 ml stobriņā. Stobriņš centrifugēts 5 minūtes pie 1500 apgriezieniem. Virsnogulšņu šķidrums tika uzmanīgi noliets un nogulsnes suspendētas ar barotni, lai kopējais tilpums būtu 1 ml. Piliens no šūnu suspensijas ievietots Gorjajeva kamerā un tika veikta šūnu skaitīšana.

Pirmajās divās eksperimenta reizēs šūnas tika uzsētas uz 8-lauciņu priekšmetstikliņiem. Pirms šūnu uzsēšanas, lauciņu virsma tika pārklāta ar poliornitīnu, inkubēta 2 h istabas temperatūrā un skalota ar PBS. Turpmākajiem eksperimentiem tika izsētas 20 000 šūnu/lauciņā 1 ml barotnes 8-lauciņu platē.

Trešā eksperimenta reize tika veikta uz apaļiem polilizīna segstikliņiem (d=12mm) 24-lauciņu šūnu kultūras platē. Eksperimentam tika izsētas 30 000 šūnas/lauciņā 1 ml barotnes.

Atlikušās šūnas tika suspendētas 5 ml barotnē un izsētas 25 cm² šūnu audzēšanas flakonā. Šūnu flakons un plates noformēti atbilstoši laboratorijas prasībām un ievietoti inkubatorā.

2.2.3. Šūnu sasaldēšana

Nepieciešamie reaģenti: 10% DMSO/FBS, ledus.

Nepieciešamie materiāli: sterilas vienreizlietojamās seroloģiskās pipetes, automātiskās pipetes un pipešu uzgaļi, 15 ml stobriņš, šūnu skaitīšanas (Gorjajeva) kamera, saldēšanas stobriņš.

Pirms darba uzsākšanas tika sagatavota darba vieta atbilstoši aseptiska laboratorijas darba prasībām. Šūnām tika veikta tripsinizēšana (sk. 2.2.2) un skaitīšana Gorjajeva kamerā. Uz saldēšanas stobriņa tika uzrakstīts šūnu līnijas nosaukums, pasāžas numurs, datums, šūnu skaits ampulā un iniciāļi. Šūnu nogulsnēm tika pievienots atdzesēts 1 ml 10% DMSO/FBS un viss tika pārņemts saldēšanas stobriņā. Saldēšanas stobriņš atdzesēts ledū 30 – 60 minūtes, pēc tam ievietots saldēšanas konteinerī, kas nodrošina pakāpenisku temperatūras kritumu 1°C/min un ievietots saldētavā -80°C temperatūrā.

Uzskaites lapā tika atzīmēts sasaldēto šūnu līnijas nosaukums, ampulu skaits un datums.

2.3. LPS iekaisuma modelis

Neiroblastomas SH-SY5Y šūnas tika uzsētas uz 8-lauciņu ar poliornitīnu pārklātiem priekšmetstikliņiem vai uz 12 mm polilizīna segstikliņiem 24-lauciņu šūnu kultūras platē un audzētas inkubatorā pie 5% CO₂ atmosfēras/ 95% mitruma un 37°C temperatūrā. Eksperimenta 1. dienā tika veikta LPS pievienošana SH-SY5Y šūnām. Pirmajos divos eksperimentos uz 8-lauciņu priekšmetstikliņiem šūnām tika pievienots LPS koncentrācijā 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml un 800 ng/ml. Trešajā eksperimenta reizē uz 12 mm polilizīna stikliņiem 24-lauciņu šūnu kultūras platē šūnām tika pievienots LPS koncentrācijā 5 ng/ml un 25 ng/ml. Šūnas inkubēja ar LPS 24 h inkubatorā pie 5% CO₂ atmosfēras /95% mitruma un 37°C temperatūrā. Pēc inkubācijas perioda eksperimenta 2. dienā šūnām atsūca barotni un fiksēja ar 4% PFA šķīdumu 20 minūtes istabas temperatūrā.

2.4. COX-2 ekspresijas noteikšana

LPS ietekme uz COX-2 ekspresiju neiroblastomas SH-SY5Y šūnās tika noteikta ar peles monoklonālo antivielu IgG_{2B} pret cilvēka COX-2 un sekundāro kazas pret peļu IgG antivielu ar Alexa Fluor 488 iezīmi.

2.4.1. Inkubācija ar primāro antivielu

Pēc LPS inkubācijas, eksperimenta 2. dienā tika uzsākts IF protokols. PFA fiksētās šūnas tika skalotas vienu reizi ar 1 ml PBS, pēc tam šūnām pievienoja 0,5 ml bloķēšanas/permeabilizācijas šķīdumu (5% BSA/0,01% *Triton X-100*/PBS) un inkubēja istabas temperatūrā 45 minūtes. Pēc bloķēšanas/permeabilizācijas šķīduma atsūkšanas šūnām tika pievienoti 200 µl COX-2 specifiska primārā antivielas koncentrācijā 0,5 µg/ml, 1% BSA/PBS šķīdumā. Šūnas ar primāro antivielu inkubēja 16 – 18 h 4°C temperatūrā.

2.4.2. Sekundārās antivielas Alexa Fluor 488 konjugāta pievienošana

Eksperimenta 3. dienā *in vitro* tika pievienota sekundārā antivielas Alexa Fluor 488. Pirms sekundārās antivielas Alexa Fluor 488 konjugāta pievienošanas šūnas tika skalotas trīs reizes pa 0,5 ml ar 1% BSA/PBS. Šūnām pievienoja sekundārās kazas pret peļu antivielas Alexa Fluor 488 konjugātu atšķaidījumā 1:400 un inkubēja 1 h istabas temperatūrā, tumsā. Pēc inkubācijas perioda šūnas skaloja trīs reizes pa 0,5 ml ar 1% BSA/PBS. Pēc skalošanas tika uzlikti segstikliņi, uzklājot *Prolong Gold* DAPI ieslēgšanas vidi. Priekšmetstikliņus uzglabāja tumsā līdz mikroskopēšanai.

2.5. Konfokālā mikroskopēšana

Eksperimenta 4. dienā iegūtais neuroblastomas SH-SY5Y šūnu materiāls tika mikroskopēts konfokālajā mikroskopā *Nikon C2*, izmantojot iekārtas programnodrošinājumu. Mikroskopēšanā izmantoja DAPI un FITC filtrus. Tika iegūti un apstrādāti SH-SY5Y šūnu attēli pētījuma rezultātu iegūšanai un analizēšanai.

2.6. IF rezultātu kvantitatīvā analīze

Kopējā šūnu fluorescences intensitāte (ang. val. *corrected total cell fluorescence* (CTCF)) tika aprēķināta, apstrādājot IF iegūtos SH-SY5Y šūnu attēlus ar programmu *ImageJ*. Šajā programmā IF iegūtajā attēlā tika iezīmēta mērķa šūnu, kā arī fona laukumi un iegūti attiecīgi mērījumi CTCF aprēķināšanai – *Area*, *Integrated density*, *Mean gray value* (sk. 3.5. att.). CTCF aprēķina pēc formulas: $CTCF = Integrated\ Density - (Area_{\text{iezīmētās šūnas}} * Mean_{\text{fons}})$. Katrs attēls tika apstrādāts trīs reizes, tādējādi iegūstot vidējo CTCF.

2.7. Datu analīze

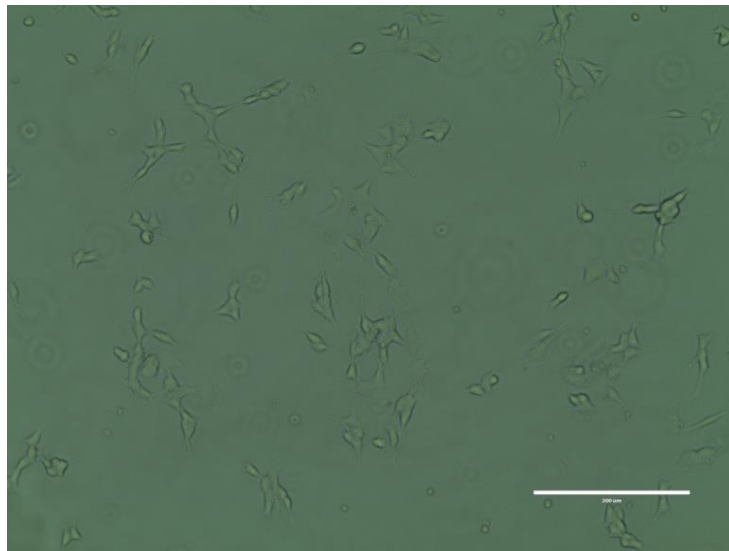
Iegūto datu statistiskai apstrādei izmantoja tādas programmas kā *Microsoft Excel 2007 for Windows* un *ImageJ*. Neuroblastomas SH-SY5Y šūnu konfokālās mikroskopēšanas attēli tika apstrādāti un iegūti nepieciešamie mērījumi fluorescences intensitātes noteikšanai programmā *ImageJ* (sk. 2.6.). Vidējo CTCF un standartnovirzi (S.D.) aprēķināja programmā *Microsoft Excel 2007 for Windows*. Rezultāti tika apstrādāti, izmantojot divu neatkarīgu paraugkopu *t* – testu (*unpaired t – test*), un tika uzskatīti par statistiski ticamiem, ja *p* vērtība mazāka par 0,05 ($p < 0,05$).

3. REZULTĀTI

3.1. SH-SY5Y šūnu morfoloģija

Nestimulētas neuroblastomas SH-SY5Y šūnas normālos augšanas apstākļos, inkubatorā 5% CO₂ atmosfēras/95% mitruma un 37°C temperatūrā, morfoloģiski ir līdzīgas neironiem. Šūnām ir raksturīga iegarena forma un tām piemīt substrāta adherentās īpašības, kā arī tendence augt klasteros. Eksperimentā tika novērots, ka šūnas blīvāk aug gar šūnas audzēšanas plates lauciņu sienām, salīdzinot ar lauciņu centru.

Eksperimenta laikā apstiprinājās, ka SH-SY5Y šūnu līnija ir īpaši jutīga pret dažādiem ārējiem apstākļiem, piemēram, lauciņu pārklājumu un skalošanas intensitāti.



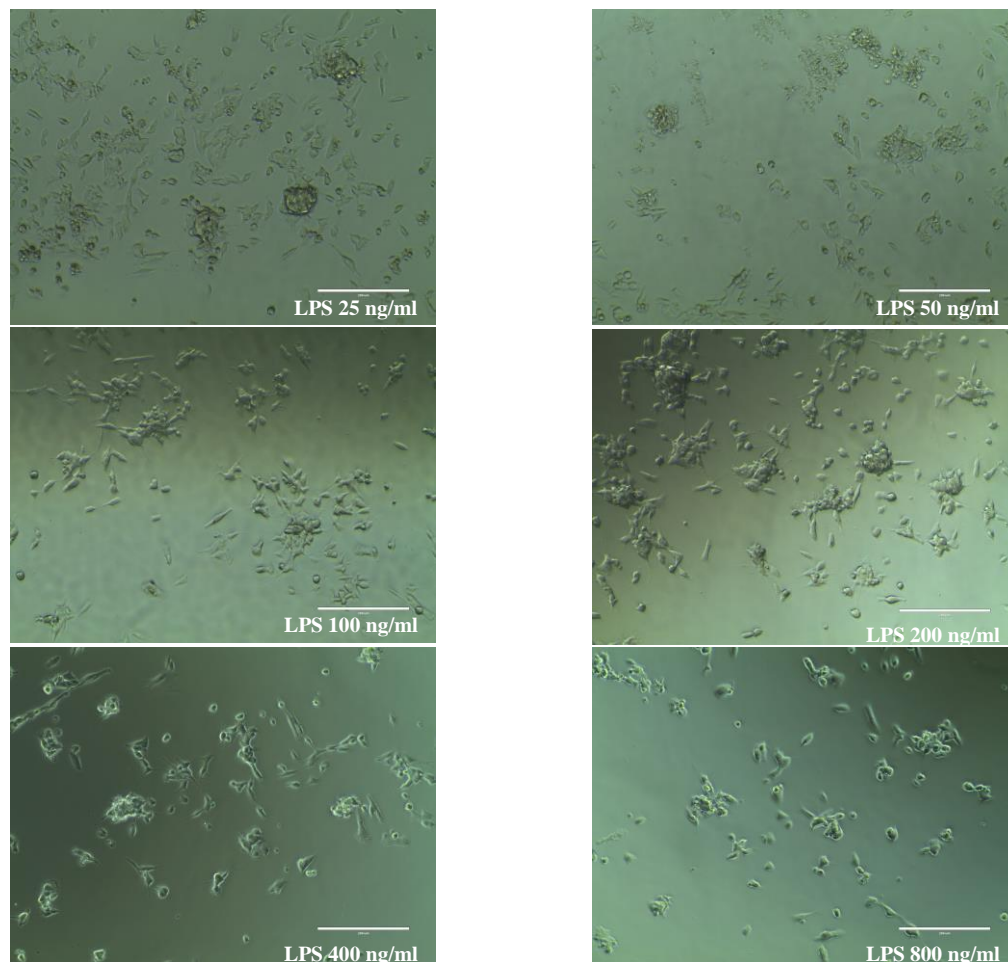
3.1. att. Neuroblastomas SH-SY5Y šūnu morfoloģija normālos augšanas apstākļos

SH-SY5Y šūnas audzētas 25 cm² šūnu audzēšanas flakonos barotnē MEM/F12 [1:1], kas papildināta ar 10% FBS un 100 µg/ml penicilīna – streptomīcīna maisījumu, inkubatorā 5% CO₂ atmosfēras/95% mitruma un 37°C temperatūrā.

3.2. SH-SY5Y šūnu morfoloģijas izmaiņas LPS ietekmē

Pievienojot SH-SY5Y šūnām LPS dažādās koncentrācijās (5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml un 800 ng/ml), pēc 24 h inkubācijas perioda varēja novērot

šūnu morfoloģiskās izmaiņas, salīdzinot ar kontroles, LPS nestimulētām, šūnām. LPS ietekmē šūnas bija atrāvušās no lauciņa pamatnes, mainījušās izmēru, zaudējušās iegareno formu un ieguvušas lodveida formu. Visizteiktāk gaismas mikroskopā varēja novērot SH-SY5Y šūnu morfoloģiskās izmaiņas LPS koncentrācijas 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml un 200 ng/ml ietekmē.



3.2. att. LPS dažādu koncentrāciju ietekme uz neuroblastomas SH-SY5Y šūnu morfoloģiju

SH-SY5Y šūnām, uzsētas uz poliornitīnu pārklātiem priekšmetstikliņiem 8-lauciņu platē, tika pievienots LPS koncentrācijā 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml un 800 ng/ml. Šūnas ar LPS tika inkubētas 24 h inkubatorā pie 5% CO₂ atmosfēras /95% mitruma un 37°C temperatūrā.

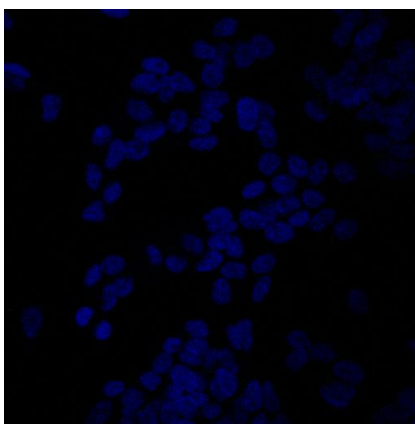
3.3. LPS inducēta COX-2 ekspresijas noteikšana ar IF metodi

Neuroblastomas SH-SY5Y šūnu kodoli fluorescēja zilā krāsā (DAPI filtra ietekmē), bet COX-2 signāls iekrāsoja šūnu citoplazmu zaļā krāsā (FITC filtra ietekmē). Pirmajās divās

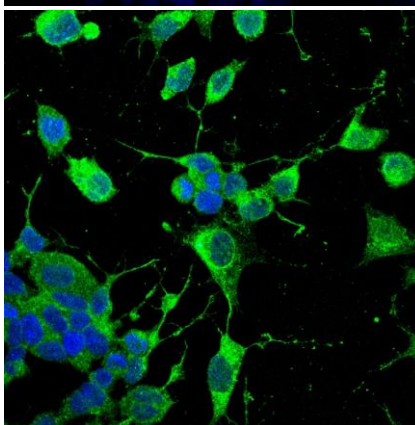
eksperimenta reizēs šūnām tika pievienots LPS koncentrācijā 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml un 800 ng/ml. Konfokālajā mikroskopēšanā visas pārbaudītās LPS koncentrācijas uzrādīja COX-2 ekspresijas signālu. LPS koncentrācijā 50 ng/ml uzrādīja visskaidrāko fluorescences signālu (sk. 3.3. att). Pārējās LPS koncentrācijas tālāk netika analizētas.

Tika pārbaudīts arī sekundārās antivielas Alexa Fluor 488 specifiskums SH-SY5Y šūnās. Šajām kontroles šūnām netika pievienota primārā anti viela, līdz ar to nenovēroja COX-2 ekspresiju citoplazmā (sk. 3.3. att.). Sekundārās antivielas specifiskuma kontroles šūnās novēroja tikai izteikti *Prolong Gold* DAPI iekrāsotos šūnu kodolus zilā krāsā.

**Sekundārās antivielas
specifiskuma kontrole**



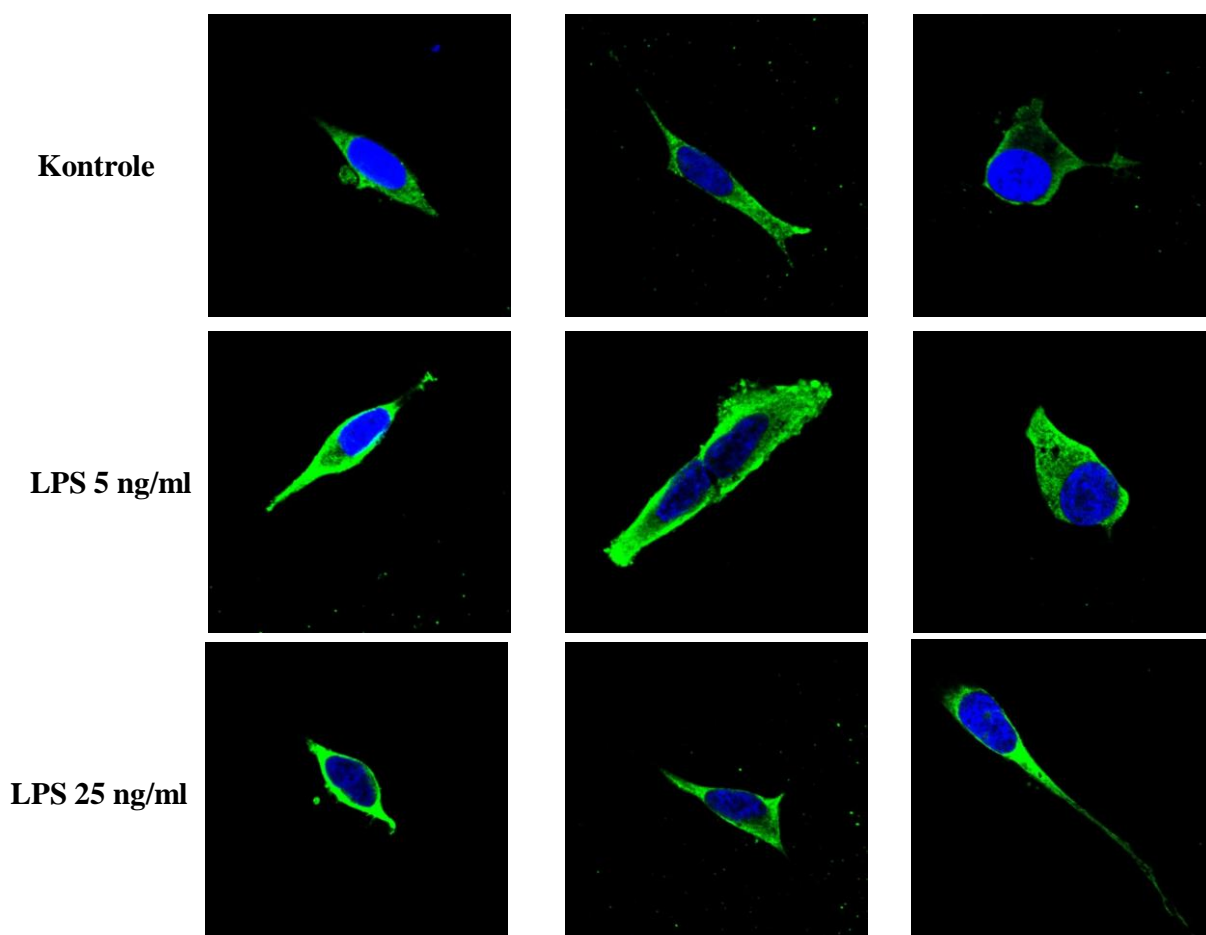
LPS 50 ng/ml



3.3. att. Ar IF metodi noteikta sekundārās antivielas Alexa Fluor 488 specifiskuma kontrole un LPS koncentrācijas 50 ng/ml ietekme uz COX-2 ekspresiju neuroblastomas SH-SY5Y šūnās (20 x palielinājums)

LPS koncentrācijas 50 ng/ml ietekmes noteikšana uz COX-2 ekspresiju SH-SY5Y šūnās ar netiešo IF metodi, izmantojot LPS kā antigēnu (inkubēts 24 h), peles monoklonālo antivielu IgG_{2B} pret cilvēka COX-2 kā primāro antivielu (inkubēta 16 – 18 h), Alexa Fluor 488 konjugātu kā sekundāro antivielu (inkubēts 1h) un fluorohromu FITC, kas sekundāro antivielu atspoguļo zaļā krāsā. DAPI filtrs atspoguļo kodolus zilā krāsā.

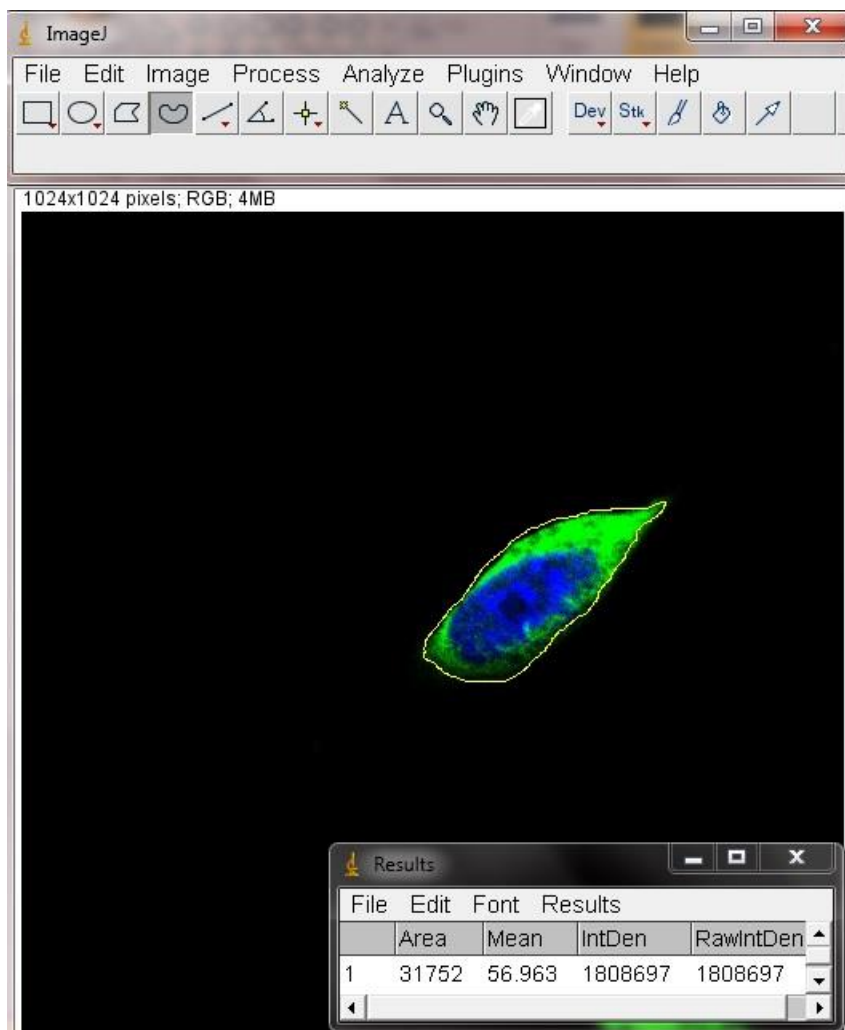
Trešajā eksperimenta reizē šūnām tika pievienots LPS koncentrācijā 5 ng/ml un 25 ng/ml. IF signāla noteikšanai tika iegūtas trīs šūnas no katras grupas – LPS nestimulētās šūnas, LPS koncentrācijā 5 ng/ml un 25 ng/ml stimulētās šūnas. Konfokālajā mikroskopēšanā visās šūnu grupās varēja novērot COX-2 fluorescences signālu šūnu citoplazmā, kā arī *Prolong Gold* DAPI iekrāsotos kodolus. Vispildītāko COX-2 ekspresijas signālu citoplazmā zaļā krāsā uzrādīja LPS koncentrācijā 5 ng/ml stimulētās šūnas.



3.4. att. LPS koncentrācijas 5 ng/ml un 25 ng/ml ietekmes noteikšana uz COX-2 ekspresiju ar IF metodi neuroblastomas SH-SY5Y šūnās, salīdzinot ar kontrolē šūnām (60 x palielinājums)
 LPS koncentrācijā 5 ng/ml un 25 ng/ml ietekmes noteikšana uz COX-2 ekspresiju SH-SY5Y šūnās ar netiešo IF metodi, izmantojot LPS kā antigēnu (inkubēts 24 h), peles monoklonālo antivielu IgG_{2B} pret cilvēka COX-2 kā primāro antivielu (inkubēta 16 – 18 h), Alexa Fluor 488 konjugātu kā sekundāro antivielu (inkubēts 1 h) un fluorohromu FITC, kas sekundāro antivielu atspoguļo zaļā krāsā. DAPI filtrs atspoguļo kodolus zilā krāsā.

3.4. IF rezultātu kvantitatīvā analīze

Vidējā šūnu fluorescences intensitāte (ang. val. *corrected total cell fluorescence*) (CTCF) tika aprēķināta, apstrādājot LPS koncentrācijas 5 ng/ml, 25 ng/ml un 50 ng/ml stimulētu un nestimulētu šūnu IF metodē iegūtos attēlus, izmantojot programmu *ImageJ*. Programmā tika iegūti nepieciešamie mērījumi CTCF aprēķināšanai (sk. 3.5. att.).



3.5. att. IF neuroblastomas SH-SY5Y šūnas attēla apstrādes paraugs programmā *ImageJ*
LPS koncentrācijā 5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml stimulētās un LPS nestimulētās SH-SY5Y šūnās kopējā CTCF tika noteikta, apstrādājot IF metodes konfokālās mikroskopēšanas attēlus, programmā *ImageJ*. CTCF aprēķina formula: $CTCF = Integrated\ Density - (Area_{\text{iezīmētās šūnas}} * Mean_{\text{fons}})$.

Iegūtie IF kvantitatīvās analīzes rezultāti uzrādīja, ka salīdzinot ar nestimulētām šūnām, vislielākā fluorescences intensitāte ir novērojama LPS koncentrācijā 5 ng/ml stimulētās šūnās.

Savukārt, vismazāko fluorescences intensitāti uzrādīja LPS koncentrācijā 50 ng/ml stimulētās šūnas (sk. 3.1. tabula).

3.1 tabula

Kopējā fluorescences intensitāte nestimulētās un LPS dažādu koncentrāciju stimulētās neuroblastomas SH-SY5Y šūnās

	CTCF	S.D.
Nestimulētās šūnas	2722758,142	711441,731
LPS 5 ng/ml	4116407,279	2646949,510
LPS 25 ng/ml	2073886,093	665600,610
LPS 50 ng/ml	456960,612	134971,594

Nestimulētās un LPS koncentrācijā 5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml stimulētās SH-SY5Y šūnās kopējā CTCF tika noteikta, apstrādājot IF metodes konfokālās mikroskopēšanas attēlus, programmā *ImageJ*. CTCF aprēķina formula: $CTCF = Integrated\ Density - (Area_{izīmētās\ šūnas} * Mean_{fons})$. Rezultāti parādīti kā vidējā vērtība ± S.D.

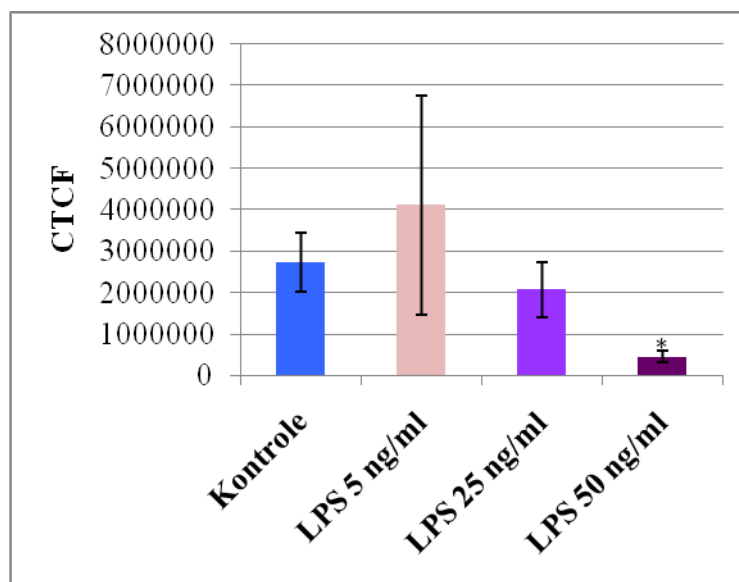
3.5. Fluorescences intensitātes izmaiņas SH-SY5Y šūnās atkarībā no LPS koncentrācijas

LPS koncentrācijā 5 ng/ml, 25 ng/ml un 50 ng/ml, uzrādīja atšķirīgu ietekmi uz neuroblastomas SH-SY5Y šūnām, līdz ar to arī atšķirīgu CTCF, salīdzinot ar kontroles, LPS nestimulētām, šūnām (sk. 3.6. att).

LPS koncentrācijā 5 ng/ml stimulētās šūnas uzrādīja skaitliski izteikti lielāku CTCF (4116407,279), salīdzinot ar kontroles šūnām (2722758,142). Procentuāli LPS stimulētās šūnās šis rādītājs ir lielāks par 51,19%, salīdzinot ar kontroles šūnu CTCF, kas tika pieņemta par 100%. Tomēr šo vērtību krasā atšķirība neuzrāda statistiski ticamu rezultātu ($p > 0,05$).

LPS koncentrācijā 25 ng/ml stimulētās šūnas uzrādīja skaitliski mazāku CTCF (2073886,093), salīdzinot ar kontroles šūnām (2722758,142). Procentuāli LPS stimulētās šūnās CTCF ir mazāka par 23,83%, salīdzinot ar kontroles šūnu CTCF, kas tika pieņemta par 100%. Atšķirība starp CTCF vērtībām neuzrāda statistiski ticamu rezultātu ($p > 0,05$).

LPS koncentrācijā 50 ng/ml stimulētas šūnas uzrādīja skaitliski izteikti mazāku CTCF (456960,612), salīdzinot ar kontroles šūnām (2722758,142). Procentuāli LPS stimulētās šūnās CTCF ir mazāka par 83,22%, salīdzinot ar kontroles šūnu CTCF, kas tika pieņemta par 100%. Atšķirība starp CTCF vērtībām uzrāda statistiski ticamu rezultātu ($p < 0,05$).



3.6. att. LPS dažādu koncentrāciju CTCF vērtības neuroblastomas SH-SY5Y šūnās, salīdzinot ar kontroles šūnām

LPS koncentrācijas 5 ng/ml, 25 ng/ml un 50 ng/ml CTCF vērtības stimulētās un kontroles SH-SY5Y šūnās. Rezultāti parādīti kā vidējā vērtība \pm S.D. * $p < 0,05$ vs. kontrole, ar neatkarīgu paraugkopu t – testu (*unpaired t – test*).

4. DISKUSIJA

Katru gadu vairāk par 10 miljoniem visā pasaulē pieaug neirodeģeneratīvo slimnieku skaits un tiek uzskatīts, ka tas palielināsies par 20% nākamo desmit gadu laikā (Spuch et al., 2012). Neirodeģeneratīvās slimības ir progresējošas, un līdz šim nav izdevies atrast racionālus paņēmienus, kā šo progresu pilnībā apturēt (Kluša, 2006).

Ir pierādīts, ka neuroiekaisums ir aktīvs process, kas ir konstatējams jau agrīnā neirodeģeneratīvo slimību stadijā (Figueiredo-Pereira et al., 2015). Tas ir viens no neironu nāves iemesliem un tiek uzskatīts par potenciālu terapeitisku mērķi neirodeģeneratīvo slimību ārstēšanā (Kluša, 2006). Ir zināms, ka COX ir bifunkcionāls enzīms ar centrālu nozīmi iekaisuma kaskādē (Aïd and Bosetti, 2011), jo tas atbild par prostanoīdu sintēzi, kuri ir iesaistīti dažādos bioloģiskos procesos (Frungeri et al., 2015). Taču jāuzsver, ka neuroiekaisums ir daudz vairāk kontrolēta reakcija nekā iekaisums perifērajos audos (Minghetti, 2004), līdz ar to arī COX galvenajiem izoenzīmiem, COX-1 un COX-2, neuroiekaisumā ir pilnīgi atšķirīgas funkcionālās darbības.

Šī darba ideja, izpētīt LPS inducētu COX-2 ekspresiju neiroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā, tika iegūta no diviem iepriekš Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmācijas bakalaura studiju programmas ietvaros izstrādātiem pētījumiem. Vienā no šiem pētījumiem tika izveidots 1-metil-4-fenilpiridīna (MPP⁺) toksicitātes modelis, kas specifiski inhibē mitohondriju elektronu transporta ķēdes kompleksu I, SH-SY5Y šūnās un pārbaudītas 1-4-dihidropiridīnu atvasinājuma AV-6-93, tā analoga un struktūras elementu neiroprotektīvās īpašības (Surgovte, 2013). Savukārt, otrajā pētījumā tika noskaidrota peptīda lunasīna ietekme uz SH-SY5Y šūnu IL-8 sekrēciju LPS izraisītā iekaisuma modelī (Kozlovska, 2014). Balstoties uz šiem pētījumiem un literatūras datiem par neuroiekaisuma lomu neirodeģenerācijā, radās interese izveidot LPS iekaisuma modeli un izpētīt tā inducētu COX-2 ekspresiju neiroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā. Jāuzsver, ka, iespējams, līdz šim vēl nav veikts pētījums ar mērķi noskaidrot LPS spēju inducēt COX-2 ekspresiju SH-SY5Y šūnās.

LPS iekaisuma modelis ir plaši izstrādāts *in vitro* gan uz dažādām primārajām, gan uz nemirstīgām šūnu līnijām. Literatūras dati liecina, ka LPS koncentrācijas dažādās šūnu līnijās, ņemot vērā pētījuma mērķi, ir atšķirīgas un variē plašā diapazonā (Das et al., 2015; Jo et al., 2014; Lee et al., 2012; Neher et al., 2011). Piemēram, pētījumā ar primārajām žurku neironu-glijas šūnām mikroglijas proliferācijai un fagocitozes aktivēšanai izmanto LPS koncentrācijā 100

ng/ml (Neher et al., 2011), RAW 264.7 peļu makrofāgu šūnās pro-iekaisuma mediatoru ekspresijai – 1 µg/ml (Lee et al., 2012), BV2 peļu mikroglijas šūnās iekaisuma gēnu ekspresijai – 10 ng/ml (Das et al., 2015), pro-iekaisuma mediatoru ekspresijai - 500 ng/ml (Jo et al., 2014). Iepriekšējā pētījumā tika noteikts, ka LPS koncentrācijā 5 µg/ml statistiski ticami inducē IL-8 sekrēciju neuroblastomas SH-SY5Y šūnās (Kozlovska, 2014). Tā pat kā COX-2, arī IL-8 ir būtiska loma iekaisuma procesā. IL-8 ir iekaisuma mediators, kura galvenā funkcija ir nodrošināt neitrofilu un T limfocītu hemotaksi (Cui et al., 2012). Šajā pētījumā LPS iekaisuma modelis SH-SY5Y šūnās tika pārbaudīts koncentrācijā 5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml un 800 ng/ml. Visu pārbaudīto LPS koncentrāciju ietekmē varēja novērot SH-SY5Y šūnu morfoloģijas izmaiņas, salīdzinot ar nestimulētām šūnām (sk. 3.2. att.), līdz ar to tas pierāda, ka LPS iekaisuma modelis darbojas neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā.

IF metodē COX-2 ekspresijas signālu varēja novērot visās LPS pārbaudītās koncentrācijās, tomēr rezultātu tālākai analīzei tika apskatīta LPS ietekme SH-SY5Y šūnās koncentrācijā 5 ng/ml, 25 ng/ml un 50 ng/ml. Būtisks šī pētījuma novērojums bija COX-2 ekspresija kontroles, LPS nestimulētās, SH-SY5Y šūnās. Tradicionāli perifēro audu iekaisumā COX-2 tiek uzskatīta par inducējamo COX izoformu, ko dēvē arī par „iekaisīgo” enzīmu, jo tā ekspresija ir saistīta ar dažādiem fizioloģiskiem un patoloģiskiem procesiem (Frungeri et al., 2015). Taču, salīdzinot ar perifēriju, COX-2 ir unikāla loma smadzenēs, jo smadzenēs COX-2 ir ekspresēta konstitutīvi (Krause and Müller, 2010). Ir pierādīts, ka COX-2 fizioloģiskos apstākļos ir ekspresēta smadzeņu neironos (Minghetti, 2004). Savukārt, neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnija pieder pie neironu fenotipa (Xie et al., 2010). COX-2 kā konstitutīvs enzīms un šūnu līnijas fenotips izskaidro pētījumā uzrādīto COX-2 ekspresiju LPS nestimulētās šūnās.

Pētījumā iegūtie rezultāti uzrāda LPS pētāmo koncentrāciju atšķirīgu ietekmi uz COX-2 ekspresiju neuroblastomas SH-SY5Y šūnās. Salīdzinot ar nestimulētām šūnām, LPS koncentrācijā 5 ng/ml inducēja COX-2 ekspresiju, bet koncentrācijā 25 ng/ml un 50 ng/ml – nomāca to. LPS koncentrācijas ietekmi uz COX-2 ekspresiju šūnās raksturo CTCF vērtības (sk. 3.1. tabula). LPS koncentrācijā 5 ng/ml stimulētās šūnas uzrādīja lielāku CTCF par 51,19%, LPS koncentrācijā 25 ng/ml – mazāku par 23,83%, un LPS koncentrācijā 50 ng/ml – mazāku par 83,22%, salīdzinot ar kontroles šūnām. Jāuzsver, ka statistiski ticamu rezultātu uzrādīja tikai LPS koncentrācijā 50 ng/ml. Vairāki faktori varēja ietekmēt LPS koncentrācijas 5 ng/ml un 25 ng/ml statistisko datu analīzi, tādējādi uzrādot $p > 0,05$. Pirmkārt, IF attēlu iegūšanu apgrūtināja LPS ietekmes izraisītās SH-SY5Y šūnu morfoloģiskās izmaiņas – samazinājās šūnu adherentās īpašības un tās „atrāvās”

no lauciņu pamatnes (sk. 3.2. att.). Otrkārt, šajās LPS koncentrācijās varēja novērot lielu CTCF vērtības izkliedi (sk. 3.6. att.). Treškārt, CTCF vērtības tika noteiktas apstrādājot katras LPS koncentrācijas tikai trīs IF metodē iegūtos šūnu attēlus. Statistiski ticamu rezultātu iegūšanai būtu jāveic vairāku šūnu attēlu analīze.

Dažiem COX-2 mediātiem PG (piemēram, PHJ₂, PGE₂) piemīt kompleksa darbība iekaisuma procesā – tie var darboties gan kā pretiekaisuma, gan kā pro-iekaisuma aģenti. Viens no iemesliem PG izraisītajiem efektiem ir iekaisuma procesa devas atkarīgs stimulants (Andreasson, 2010; Figueiredo-Pereira et al., 2015). Iespējams, arī COX-2 ekspresija SH-SY5Y šūnās ir atkarīga no stimula, šajā gadījumā LPS, koncentrācijas. Līdz ar to tas izskaidro LPS dažādu koncentrāciju ietekmi uz COX-2 ekspresiju SH-SY5Y šūnās.

Vairāki pētījumi pierāda, ka PGE₂ var pastiprināt pats savu veidošanos, inducējot COX-2 ekspresiju dažādās šūnās (Ansari et al., 2007; Bagga et al., 2003). Piemēram, PGE₂ ar pozitīvi atgriezenisko saiti regulē COX-2 ekspresiju primārajos peļu ādas keratinocītu šūnu kultūrā (Ansari et al., 2007) un RAW 264.7 peļu makrofāgu šūnās (Bagga et al., 2003), kā arī ne tikai PGE₂, bet arī 15d-PGJ₂ regulē COX-2 ekspresiju peļu plaušu fibroblastu šūnās (Vichai et al., 2005). Iespējams, arī neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā PGE₂ regulē COX-2 ekspresiju ar atgriezenisko saiti, tādējādi tas varētu izskaidrot dažādu LPS koncentrāciju ietekmi uz COX-2 ekspresiju. Tā kā, līdz šim, iespējams, vēl nav veikts pētījums ar mērķi noskaidrot LPS spēju inducēt COX-2 ekspresiju SH-SY5Y šūnās, ir nepieciešami papildus pētījumi, lai precīzi varētu izskaidrot dažādu LPS koncentrāciju ietekmi uz COX-2 ekspresiju.

Kopsavilkumā, pētījuma rezultāti norāda, ka neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā COX-2 ekspresija ir izteiktāka LPS nestimulētās šūnās, nekā LPS koncentrācijā 50 ng/ml stimulētās šūnās. Tas liek domāt, ka COX-2 ir konstitutīvs enzīms, kas neuroblastomas SH-SY5Y šūnās ekspresējas fizioloģiskos apstākļos, un LPS koncentrācijā 50 ng/ml samazina COX-2 ekspresiju, iespējams, pateicoties PG atgriezeniskai saitei. Tomēr, lai šo hipotēzi apstiprinātu, ir nepieciešami papildus pētījumi par COX-2 un COX-1 lomu, LPS dažādu koncentrāciju izraisītajiem efektiem SH-SY5Y šūnās, kā arī būtu nepieciešams izpētīt LPS inducētu COX-2 ekspresiju citās neironu tipa šūnu līnijās. Varētu veikt arī papildus pētījumus par citu iekaisuma toksīnu, piemēram, IL-1β (Wendeburg et al., 2009), forskolīna, retīnskābes (Williams et al., 1999) spēju inducēt COX-2 ekspresiju SH-SY5Y šūnās, izmantojot citas noteikšanas metodes, piemēram, *Western blot* analīzi (Wendeburg et al., 2009). Šis pētījums rada interesi arī izpētīt AS metabolītu – PG (PGE₂, PGJ₂), ekspresiju SH-SY5Y šūnās. Specifiska prostanoīda produkcijas

vai to mijiedarbības ar receptoru inhibēšana varētu būt piemērots mehānisms, lai kontrolētu neuroiekaisuma patoloģiskos procesus (Lima et al., 2012).

Pētījumi neirozinātnē ir nepieciešami, lai iegūtu izpratni par smadzenēs notiekošajiem procesiem un atrastu iespējas, kā apturēt neurodeģeneratīvos procesus, kas varētu uzlabot psihisko veselību un dzīves kvalitāti (Kluša, 2006). Līdz ar to šī darba rezultāti ir ieguldījums neurodeģeneratīvo slimību modeļu izpētē, kam būtu pielietojums jaunu neuroprotektīvo vielu atklāšanā.

SECINĀJUMI

- 1) LPS ietekmē novēroja SH-SY5Y šūnu morfoloģijas izmaiņas, salīdzinot ar nestimulētām šūnām. Pētījuma novērojumi, kā arī literatūras avoti apstiprina LPS inducētā iekaisuma modeļa darbību neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā.
- 2) Neuroblastomas SH-SY5Y šūnās ar imūnfluorescences metodi konstatēja COX-2 ekspresiju normālos kultivēšanas apstākļos, COX-2 ekspresijas indukciju LPS koncentrācijā 5 ng/ml un supresiju LPS koncentrācijās 25 ng/ml un 50 ng/ml .
- 3) LPS koncentrācijā 5 ng/ml stimulētās šūnās fluorescences intensitāte pieauga par 51,19%, bet LPS koncentrācijās 25 ng/ml un 50 ng/ml samazinājās attiecīgi par 23,83% un 83,22%, salīdzinot ar kontroles šūnām. Statistiski ticamu rezultātu uzrādīja LPS koncentrācijā 50 ng/ml.
- 4) Ir nepieciešami papildus pētījumi par LPS dažādu koncentrāciju izraisītajiem efektiem un COX-2 lomu SH-SY5Y šūnās, piemēram, analizējot arahidonskābes metabolītu sintēzes indukciju un COX-1 ekspresiju LPS iekaisuma modelī neuroblastomas SH-SY5Y šūnās.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājam asociētai profesorei Unai Riekstiņai par atsaucību, sniegtajiem ieteikumiem, metodiskajiem norādījumiem, ieguldīto laiku konsultācijās un visa maģistra darba tapšanā.

Pateicos pētniekam Kasparam Jēkabsonam par palīdzību darba metodikas daļas izstrādē.

Pateicos arī zinātniskajai asistentei Līgai Saulītei un LU MF Farmācijas MSP 1. kursa studentei Ingai Kozlovskai par palīdzību iegūto rezultātu apstrādē.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

Aid, S., Bosetti, F. Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: therapeutic implications. *Biochimie*, 2011, N 1, vol. 93, p. 46 – 51.

Ajmone-Cat, M. A., Bernardo, A., Greco, A., Minghetti, L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and brain inflammation: effects on microglial functions. *Pharmaceuticals*, 2010, vol. 3, p. 1949 – 1964.

Andreasson, K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2010, N 3-4, vol. 91, p. 104 – 112.

Ansari, K. M., Sung, Y. M., He, G., Fischer, S. M. Prostaglandin receptor EP2 is responsible for cyclooxygenase-2 induction by prostaglandin E2 in mouse skin. *Carcinogenesis*, 2007, N 10, vol. 28, p. 2063 – 2068.

Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J. A., Teddy, S.T. Differential effects of prostaglandin derived from ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, N 4, vol. 100, p. 1751 – 1756.

Baue, A. E., Faist, E., Fry, D. E. *Multiple organ failure: pathophysiology, prevention, and therapy*. New York: Springer – Verlag, 2000, p. 197 – 199.

Biedler, J. L., Helson, L., Spengler, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 1973, N 11, vol. 33, p. 2643 – 2652.

Biksone, G. *Medikamentozā ārstēšana un aprūpe*. 1. sējums, Rīga: Kerena, 2008. 74 – 75 lpp.

Brown, J. R., DuBois, R. N. COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol*, 2005, N 12, vol. 23, p. 2840 – 2855.

Bukovskis, M. Leikotriēni – universāli iekaisuma reakcijas mediatori. *Doctus*, 2004, Nr. 6.

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002, N 6917, vol. 420, p. 885 – 891.

Constantinescu, R., Constantinescu, A. T., Reichmann, H., Janetzky, B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl*, 2007, vol. 72, p. 17 – 28.

Cui G. B., An J. Z., Zhang N., Zhao M. G., Liu S. B., Yi J. Elevated interleukin-8 enhances prefrontal synaptic transmission in mice with persistent inflammatory pain. *Mol Pain*. 2012, N 11, vol. 8.

Das, A., Chai, J. C., Kim, S. H., Park, K. S., Lee, Y. S., Jung, K. H., Chai, Y. G. Dual RNA sequencing reveals the expression of unique transcriptomic signatures in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells. *PLoS One*, 2015, N 3, vol 10.

Das, N. D., Choi, M. R., Jung, K. H., Park, J. H., Lee, H. T., Kim, S. H., Chai, Y. G. Lipopolysaccharide-mediated protein expression profiling on neuronal differentiated SH-SY5Y cells. *BioChip J*, 2012, N 2, vol. 6, p. 165 – 173.

Davidoff, A. M. Neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg*, 2012, N 1, vol. 21, p. 2 – 14.

Doniņa, S. Hroniska iekaisuma loma gremošanas trakta orgānu vēža patoģenēzē. *Doctus*, 2008, Nr. 8.

Figueiredo-Pereira, M. E., Rockwell, P., Schmidt-Glenewinkel, T., Serrano, P. Neuroinflammation and J2 prostaglandins: linking impairment of the ubiquitin-proteasome pathway and mitochondria to neurodegeneration. *Front Mol Neurosci*, 2015, vol 7.

Frungieri, M. B., Calandra, R. S., Mayerhofer, A., Matzkin, M. E. Cyclooxygenase and prostaglandins in somatic cell populations of the testis. *Reproduction*, 2015, N 4, vol. 194, p. 169 – 180.

Gendelman, H. E. Neural immunity: Friend or foe? *J Neurovirol*, 2002, N 6, vol. 8, p. 474 – 479.

Jo, G. H., Choi, I. W., Jeong, J. W., Kim, G. Y., Kim, J., Suh, H., Ryu, C. H., Kim, W. J., Choi, Y. H. Anti-inflammatory potential of newly synthesized 4-[(butylsulfinyl)methyl]-1,2-benzenediol in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Molecules*, 2014, vol. 19, p. 16609 – 16623.

Jonas, P., Lisman, J. Structure, function, and plasticity of hippocampal dentate gyrus microcircuits. *Front Neural Circuits*, 2014, vol. 8.

Kallapura, G., Pumford, N. R., Hernandez-Velasco, X., Hargis, B. M., Tellez, G. Mechanisms involved in lipopolysaccharide derived ROS and RNS oxidative stress and septic shock. *J Microbiol Res Rev*, 2014, N 1, vol. 2, p. 6 – 11.

Kluša, V. Neuroprotekcija: jaunākās tendences zāļu dizainā. *Doctus*, 2006, Nr. 8.

Knights, K. M., Mangoni, A. A., Miners, J. O. Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2010, N 6, vol. 3, p. 769 – 776.

Kozlovskā, I. Lunasīna pretiekaisuma darbība cilvēku neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijā: bakalaura darbs. LU Medicīnas fakultāte. Rīga: Latvijas Universitāte, 2014. 53 lpp.

Krause, D. L., Müller, N. Neuroinflammation, microglia and implications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2010, vol. 2010.

Leach, R. A. *The chiropractic theories: a textbook of scientific research*. 4th edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 133 – 135.

Lee, C. W., Kim, S. C., Kwak, T. W., Lee, J. R., Jo, M. J., Ahn, Y. T., Kim, J. M., An, W. G. Anti-inflammatory effects of Bangpungtongsung-San, a traditional herbal prescription. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, vol. 2012.

Li, H., Hu, J., Ma, L., Yuan, Z., Wang, Y., Wang, X., Xing, D., Lei, F., Du, L. Comprehensive study of baicalin down-regulating NOD2 receptor expression of neurons with oxygen–glucose deprivation in vitro and cerebral ischemia-reperfusion in vivo. *Eur J Pharmacol*, 2010, N 1 – 3, vol. 649, p. 92 – 99.

Lima, I. V., Bastos, L. F. S., Limborço-Filho, M., Fiebich, B. L., Oliveira, A. C. P. Role of prostaglandins in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm*, 2012, vol. 2012.

Minghetti, L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *Neuropathol Exp Neurol*, 2004, N 9, vol. 63, p. 901 – 910.

Minghetti, L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol*, 2005, N 3, vol. 18, p. 312 – 321.

Narumiya, S., Furuyashiki, T. Fever, inflammation, pain and beyond: prostanoid receptor research during these 25 years. *FASEB J*, 2011, N 3, vol. 25, p. 813 – 818.

Neher, J. J., Neniskyte, U., Zhao, J. W., Bal-Price, A., Tolkovsky, A. M., Brown, G. C. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *The J Immunol*, 2011, N 8, vol. 186, p. 4973 – 4983

Nielsen, S. *Goat Anti-VPS35 / MEM3 Antibody (EB06268)* [tiešsaite]. [atsauce 12.04.2015.]. Pieejams internetā: <http://everestbiotech.com/product/goat-anti-vps35-mem3-antibody/>

Odell, I. D., Cook, D. Immunofluorescence techniques. *J Invest Dermatol*, 2013, N 1, vol. 133.

Panigrahy, D., Kaipainen, A., Greene, E. R., Huang, S. Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, N 4, vol. 29, p. 723 – 735.

Purviņš, I., Purviņa S. *Praktiskā farmakoloģija*. 4. izdevums, Rīga: Zāļu infocentrs, 2011. 212 – 215 lpp, 416 lpp, 427 lpp.

Raetz, C. R., Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 2002, vol. 71, p. 635 – 700.

Ricciotti, E., FitzGerald, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, N 5, vol. 31, p. 986 – 1000.

Rodgers, R. P. C. Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. **In:** *Basic and clinical immunology*. 8th edition, Norwalk: Appleton & Lange, 1994. p. 179.

Sawant, P., Kshar, A., Byakodi, R., Paranjpe, A. Immunofluorescence in oral mucosal diseases –a review. *Oral Surg, Oral Med, Oral Radiol*, 2014, N 1, vol. 2, p. 6 – 10.

Serrato, R. V. Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, N 119, vol. 4.

Shaveta, S., Singh, A., Kaur, J., Singh, P. Arachidonic acid metabolic pathway: Appraisal of differential availability of arachidonic acid and anti-inflammatory drugs to COX-1, COX-2 and 5-LOX enzymes. *Inflamm Cell Signal*, 2014, N 4, vol. 1.

Simmons, D. L., Botting, R. M., Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 2004, N 3, vol. 56, p. 387 – 437.

Smith, D. A. *Metabolism, pharmacokinetics and toxicity of functional groups*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010. p. 214.

Smith, F. G., Wade, A. W., Lewis, M, L. Qi, W. Cyclooxygenase (COX) inhibitors and the newborn kidney. *Pharmaceuticals*, 2012, N 11, vol. 5, p. 1160 – 1176.

Spuch, C., Ortolano, S. Navarro, C. New insights in the amyloid-Beta interaction with mitochondria. *J Agin Res*, 2012, vol. 2012.

Surgovte, L. 1-4-dihidropiridīnu atvasinājuma AV-6-93, tā struktūras analoga un struktūras elementu darbības izpēte MPP⁺ toksicitātes modelī SH-SY5Y šūnās: bakalaura darbs. LU Medicīnas fakultāte. Rīga: Latvijas Universitāte, 2013. 50 lpp.

Terr, A. I. Inflammation. **In:** *Basic and clinical immunology*. 8th edition, Norwalk: Appleton & Lange, 1994. p. 137 – 145.

Thiele, C. T. Neuroblastoma cell lines. **In:** *Human cell culture*. Lancaster: Kluwer Academic Publishers, 1998, vol. 1, p. 21 – 53.

Vichai, V., Suyarnsesthakorn, C., Pittayakhajonwut, D., Sriklung, K., Kirtikara, K. Positive feedback regulation of COX-2 expression by prostaglandin metabolites. *Inflamm Res*, 2005, N 4, vol. 54, p. 163 – 172.

Vodovotz, Y. At the interface between acute and chronic inflammation. **In:** *Chronic inflammation: molecular pathophysiology, nutritional and therapeutic interventions*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2013, p. 3.

Wallace, J. L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005, vol. 100.

Wendeburg, L., Oliveira, A. C. P., Bhati, H. S., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B. L. Resveratrol inhibits prostaglandin formation in IL-1 β -stimulated SK-N-SH neuronal cells. *J Neuroinflammation*, 2009, vol. 6.

Wiggins, H. L., Rappoport, J. Z. An agarose spot assay for chemotactic invasion. *Biotechniques*, 2010, N 2, vol. 48, p. 121 – 124.

Williams, C. S., Mann, M., DuBois, R. N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 1999, N 55, vol. 18, p. 7908 – 7916.

Wisastra, R., Dekker, F. J. Inflammation, cancer and oxidative lipoxygenase activity are intimately linked. *Cancers*, 2014, N 3, vol. 6, p. 1500 – 1521.

Xie, H. R., Hu, L. S., Li, G. Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J*, 2010, N 8, vol. 123, p. 1086 – 1092.

Xing, C., Peng, Y., Chang, R., Yin, Y., Xie, Z. Effects of insulin-like growth factor-1 on okadaic acid-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Cell Biol Int*, 2005, N 9, vol. 29, p. 803 – 808.

Yusuf, M., Leung, K., Morris, K. J., Vopli, E. V. Comprehensive cytogenomic profile of the *in vitro* neuronal model SH-SY5Y. *Neurogenetics*, 2013, N 1, vol. 14, p. 63 – 70.

Zeldin, D. C. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem*, 2001, N 39, vol. 276, p. 36059 – 36062.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs „COX-2 EKSPRESIJAS INDUCĒŠANA LPS IEKAISUMA MODELĪ NEIROBLASTOMAS SH-SY5Y ŠŪNU LĪNIJĀ” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

Autore: Līva Surgovte

(paraksts)

(datums)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: asoc. prof. Dr. Biol. Una Riekstiņa

(paraksts)

(datums)

Recenzents: prof. Dr. hab. biol. Ruta Muceniece

(paraksts)

(datums)

Darbs iesniegts: LU Medicīnas fakultātē 11.05.2015.

Vecākā lietvede: Juta Bārtule

(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

Komisijas sekretāre:

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)