

**LATVIJAS UNIVERSITĀTE**

**MAGISTRA DARBS**

**RĪGA 2016**

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

NEIROIEKAISUMA BIOMARĶIERU EKSPRESIJAS IZMAIŅAS  
STREPTOZOCĪNA ALCHEIMERA SLIMĪBAS MODELĪ  
ŽURKĀM AR MUSCIMOLU

MAĢISTRA DARBS

**Autors:**

Karīna Narbutė

**Studenta apliecības nr.:**

kn11011

**Darba vadītājs:**

Dr. pharm. Ulrika Beitnere

RĪGA 2016

## Satura rādītājs

Anotācija.....	5
Abstract.....	6
Apzīmējumu saraksts.....	7
Ievads.....	9
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	11
1.1. Alzheimeras slimība un demence .....	11
1.2. Amiloīda beta teorija.....	12
1.3. Dzīvesveida ietekme slimības izcelsmē un attīstībā .....	18
2. NEIROIEKAISUMS .....	22
2.1. Mikroglijas aktivācija .....	22
2.2. Astroglijas aktivācija .....	27
3. STREPTOZOCĪNA NEIROIEKAISUMA MODELIS .....	32
4. MATERIĀLI UN METODES.....	35
5. EKSPERIMENTA DIZAINS .....	37
5.1. Ūdens labirina tests ( <i>Morris Water maze</i> ) .....	38
5.2. <i>Western blot</i> analīze.....	38
5.2.1. Smadzeņu audu sagatavošana <i>Western blot</i> analīzei.....	38
5.2.2. Gēla elektroforēze un pussausā pārnese.....	39
5.2.3. Inkubēšana ar primāro antivielu.....	39
5.2.4. Detektēšana un attēlu analizēšana .....	39
5.3. Imunofluorescence .....	40
5.3.1. Paraugu sagatavošana.....	40
5.3.2. Antivielu imunohistoķīmiskā analīze.....	40
5.4. Mikroskopēšana un attēlu uzņemšana .....	41
6. DATU ANALĪZE .....	42
7. REZULTĀTI.....	43
7.1. Muscimola efekts uz astrogliju un uz mikrogliju Alzheimeras STZ modelī žurkām garozā un hipokampā .....	43
7.2. Iba-1 ekspresijas izmaiņas žurku smadzeņu garozā un hipokampā.....	47
7.3. TH ekspresijas izmaiņas .....	51
8. DISKUSIJA.....	54
9. SECINĀJUMI.....	56

Pateicības.....	57
Literatūras saraksts .....	58

## Anotācija

Alcheimera slimība ir biežākā neirodeģeneratīvā slimība mūsdienu sabiedrībā, ar tendenci slimnieku skaitam ar katru gadu pieaugt. Sarežģītās diagnostikas un neefektīvās farmakoloģiskās terapijas dēļ, šo slimību ir grūti kontrolēt. Pētnieki nodarbojas ar Alcheimera slimības pirms-demences diagnostikas metožu un veiksmīgas farmakoloģiskās terapijas atklāšanu. Balstoties uz iepriekš veiktiem pētījumiem par GABA<sub>A</sub> agonista muscimola (0,01 un 0,05 mg/kg) spēju samazināt neuroiekaisumu, streptozocīna (STZ) izraisītā Alcheimera slimības modeli žurkām [Mareš P., et al. 2014], [Ding Y., et al. 2015], šajā pētījumā tika apskatīta un analizēta neuroiekaisuma biomarkieru ekspresija *post mortem* žurku smadzenēs.

Darba mērķis bija noteikt muscimola ļoti mazo devu (0,01 un 0,05 mg/kg) efektu uz iekaisuma marķieriem: astroglijas specifisku (*glial fibrillary acid protein*, GFAP), mikroglijas specifisku (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*, Iba-1) un dopamīnerģiskās sistēmas specifisku tirozīna hidroksilāzes (TH) ekspresiju smadzeņu struktūrās garozā un hipokampā Alcheimera slimības modeli žurkām, kas radīts ar toksīnu streptozocīnu.

Divas nedēļas pēc STZ vai mākslīgā cerebrospinalā šķidruma (aCSF) i.c.v. ievadīšanas, pieaugušiem dzīvniekiem tika veikts Morisa ūdens labirinta tests (*Morris water maze*), lai pārbaudītu telpisko atmiņu un uzvedību stresa apstākļos. Pēc tam tika ievāktas dzīvnieku smadzenes un, izmantojot imunohistoķīmijas analīzi, pētītas minēto marķieru ekspresijas izmaiņas dažādos smadzeņu reģionos.

Rezultāti uzrādīja GFAP ekspresijas palielinājumu STZ grupā salīdzinājumā ar kontroli. SAL+aCSF un muscimola abās devās redzams samazinājums GFAP ekspresijā salīdzinājumā ar STZ grupu. Iba-1 marķiera ekspresijai bija tendence samazināties M0,05-STZ grupā gan garozā, gan hipokampā, un TH marķiera ekspresijas izmaiņas tika novērotas garozā M0,01-STZ grupā. Muscimolam piemīt spēja mazināt iekaisumu, ko izraisījis streptozocīns un ir nepieciešami tālāki pētījumi, lai noskaidrotu darbības mehānismu.

**Atslēgas vārdi:** Alcheimera slimība; demence; neuroiekaisums; imunohistoķīmija; Iba-1; GFAP; TH.

## Abstract

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disorder in modern society, and the number of patients tends to increase every year. It is difficult to control the disease because of complicated diagnostics and ineffective pharmacological therapy. Scientists are working on finding diagnostic techniques for Alzheimer's disease at pre-dementia stage and effective pharmacological therapy. Based on the previous studies about the low doses of GABA<sub>A</sub> agonist muscimol's ability (0.01 and 0.05 mg/kg) to reduce neuroinflammation in a streptozocin (STZ) induced rat model of Alzheimer's disease [Mares P., et al. 2014], [Ding Y., et al. 2015], the expression of the neuroinflammatory biomarkers was investigated and analyzed in *post mortem* rat brain.

The goal of the MA thesis was to determine the effect of muscimol in low doses (0.01 and 0.05 mg/kg) on the particular neuroinflammatory biomarkers: astroglial-specific (glial fibrillary acid protein, GFAP), microglial-specific (ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba-1), and the specific expression of dopaminergic system's tyrosine hydroxylase (TH) in the cerebral cortex and hippocampus of the streptozocin (STZ) induced rat model of Alzheimer's disease.

Two weeks after the i.c.v. injection of STZ or artificial cerebrospinal fluid (aCSF), the Morris Water Maze test was used with adult animals to examine their spatial memory and behaviour under stressful conditions. Afterwards the animal brains were collected, and the expression changes of the particular markers in different brain regions were examined.

Results showed an increase in GFAP expression in the STZ group, compared to the control group. Both SAL-aCSF and muscimol doses show a decrease in GFAP expression, compared to the STZ group. Iba-1 marker expression showed a tendency to decrease in the M0.05-STZ group, both in the cortex and the hippocampus, and TH marker expression changes were observed only in the cortex, in the M0.01-STZ group. Muscimol shows the ability to decrease STZ induced neuroinflammation and further research is needed to determine the mechanism of action.

**Key words:** Alzheimer's disease, dementia, neuroinflammation, immunohistochemistry, Iba-1, GFAP, TH.

## Apzīmējumu saraksts

AchE – acetilholīnesterāze

aCSF – mākslīgais cerebrospinālais šķidrums (*artificial cerebrospinal fluid*)

ApoE – apolipoproteīns E

ApoJ – apolipoproteīns J

APP – amiloīda prekursora proteīns

ATF – adenozīna trifosfāts

A $\beta$  – amiloīds beta (*amyloid beta*)

BACE<sub>1</sub> – beta sekretāze 1

BCA – bicinhonīnskābes reaģenta pārbaude (*bicinchoninic acid assay*)

Ca<sup>2+</sup> - kalcija joni

ChAT – acetiltransferāze

CNS – centrālā nervu sistēma

CSS – cerebrospinālais šķidrums

DAB – diaminobenzidīns

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

EphB<sub>2</sub> – efrīna B-tipa receptors 2

ERAB – ar endoplazmatisko tīklu saistīts amiloīdu beta saistošs proteīns (*endoplasmatic reticulum associated amyloid beta peptide binding protein*)

fMRI – funkcionālā magnētiskās rezonanses attēliegūšana (*functional magnetic resonance imaging*)

GABA<sub>A</sub> –  $\gamma$ -aminosviestskābe ( *$\gamma$ -Aminobutyric acid*)

GAD 65/67 – glutamāta dekarboksilāzes izoformas

GFAP – glijas fibrilārais skābais proteīns (*glial fibrillary acidic protein*)

GLAST – glutamāta aspartāta transproters

GLUT1 – glikozes transporta proteīns 1 (*glucose transport protein 1*)

GSH – glutations

GSK3 $\beta$  – glikogēna sintāzes kināze beta

HDL – augsta blīvuma lipoproteīni (*high density lipoproteins*)

HEB – hematoencefāliskā barjera  
i.c.v. – intracerebroventrikulāri  
i.p. – intraperitoneāli  
Iba-1 – jonizēta kalciju saistoša adaptor molekula 1 (*ionized calcium-binding adaptor molecule 1*)  
IFN $\gamma$  – interferons gamma  
IL-10 – interleikīns 10  
IL-1 $\beta$  – interleikīns 1 beta  
IL-4 – interleikīns 4  
L-DOPA – L-3,4-dihidroksifenilalanīns  
LRP – receptoru saistīts lipoproteīna proteīns (*lipoprotein receptor – related proteins*)  
MCI – viegli kognitīvi bojājumi (*mild cognitive impairment*)  
NGF – nervu augšanas faktors (*nerve growth factor*)  
NKC – dabīgās galētājšūnas (*natural killer cells*)  
NMDA – N-metil-D-aspartāts  
p75 – neirotrofīna receptors  
PrP – prionu proteīns  
PS<sub>1/2</sub> – presenilīna 1 un 2 gēns  
RAGE – dziļās glikēšanas galaproduktu receptors (*receptor for advanced glycation endproducts*)  
ROS – reaktīvā skābekļa savienojumi  
SAL – fizioloģiskais šķīdums (*saline*)  
SAP – seruma amiloīda P komponents  
SEC – serpīna enzīma kompleksa receptors  
STZ – streptozocīns  
TH – tirozīna hidroksilāze (*tyrosine hydroxylase*)  
TLR – *toll-like* receptors  
TNF- $\alpha$  – tumora nekrozes faktors alfa  
 $\tau$  – *tau* proteīns

## Ievads

Alcheimera slimība ir biežākā neurodeģeneratīvā slimība cilvēkiem pēc 65 gadu vecuma, kas visbiežāk ietekmē kognitīvās funkcijas. Alcheimera pacientu skaitam ar katru gadu ir tendence pieaugt un tiek prognozēts, ka 2050. gadā ar šo slimību sirgs aptuveni 110 miljoni pasaules iedzīvotāju. Līdz šim vēl nav izdevies atklāt efektīvu terapiju pret Alcheimera slimību.

Ir noskaidrota neuroiekaisuma, oksidatīvā stresa un dažādu hronisku saslimšanu ietekme uz neurodeģenerācijas attīstību. Kā veiksmīgas diagnostikas pamats varētu būt neuroiekaisuma biomarkieru ekspresijas noteikšana smadzenēs un cerebrospinālajā šķidrumā, kas uzrādītu mikroglijas, astroglijas, dopamīnerģiskās, holīnerģiskās un citu sistēmu aktivitāti un disbalansu. Tiek meklētas zāļu vielas, kas spētu uzlabot kognitīvās funkcijas un samazinātu neurodeģenerāciju Alcheimera pacientiem. Ir atsevišķi pētījumi, kuros pierāda GABA<sub>A</sub> agonistu ļoti mazo devu neuroprotektīvo darbību [Ding et al. 2015], [Jafari-Sabet M., et al. 2013].

### **Darba mērķis:**

Noteikt muscimola ļoti mazo devu (0,01 un 0,05 mg/kg) efektu uz iekaisuma marķieriem: astroglija (*glial fibrillary acid protein*, GFAP), mikroglija (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*, Iba-1) un dopamīnerģiskās sistēmas tirozīna hidroksilāzes (TH) ekspresiju smadzeņu struktūrās garozā un hipokampā Alcheimera slimības modelī žurkām, kas radīts ar toksīnu streptozocīnu.

### **Izvirzītie darba uzdevumi mērķa sasniegšanai:**

1. Apkopot jaunāko literatūru par Alcheimera slimību, neuroiekaisumu un tā biomarkieriem;
2. Optimizējot metodes, ar imunohistoķīmijas palīdzību noteikt sekojošu biomarkieru ekspresiju žurku smadzeņu garozā un hipokampā:
  - a) mikroglijas (jonizētā kalciju saistošā adaptora molekula 1, Iba-1)
  - b) astrocītu (gliālais fibrilārais skābais proteīns, GFAP)
  - c) dopamīnerģiskās sistēmas (tirozīna hidroksilāze, TH)
3. Izmeklējot un izmēģinot dažādus algoritmus, analizēt iegūtos datus attēlapstrādes programmā *Image J*.

4. Veikt statistiko analīzi iegūtajiem rezultātiem.

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

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Alzheimer slimība un demence

Alzheimer slimība ir biežākā neurodeģeneratīvā slimība geriatrijas pacientu vidū, kas visbiežāk raksturojas ar kognitīvo funkciju (atmiņa, runa, iemācīšanās un citas ikdienai nepieciešamas darbības) strauju pasliktināšanos. Pēc 2012. gada datiem, Latvijā 2011. gadā ar šo slimību tika diagnosticēti 2472 iedzīvotāji pēc 65 gadu vecuma, ar tendenci katru gadu pacientu skaitam pieaugt. Ņemot vērā, ka sabiedrības vidējais mūža ilgums pieaug, tiek prognozēts, ka 2050. gadā ar Alzheimer slimību sirgs aptuveni 110 miljoni iedzīvotāju visā pasaulē [Pavasare K., et al. 2012].

Izmantojot cerebrospinālā šķidrums biomarkieru (amiloīda-beta (A $\beta$ ), kopējā *tau* proteīna un fosforilētā *tau* proteīna) un strukturālās/funkcionālās magnētiskās rezonanses attēlveidošanas (fMRI) testus, būtu iespējams diagnosticēt vieglus kognitīvus traucējumus (MCI) un pirms-klīniskās fāzes Alzheimer slimību. Šie testi ir aprakstīti un apstiprināti kā „zelta standarts” Starptautiskajā Darba Grupā (*International Working Group*), Nacionālajā Novecošanas un Alzheimer Institūta Asociācijā (*National Institute of Aging- Alzheimer`s Association*), Eiropas Zāļu Aģentūrā (*European Medicines Agency*) un Pārtikas un Zāļu Administrācijā ASV (*Food and Drug Administration*). Tomēr šādu agrīnu diagnostiku padara sarežģītu tas, ka tā ir invazīva - nepieciešama lumbārā punkcija cerebrospinālā šķidrums parauga iegūšanai. Kā arī nepiemērots/nepilnīgs laboratoriju aprīkojums, pasaulē atzītu standartu ieviešana un nepietiekams finansējums ir pamatproblēmas. CNS attēlu iegūšanas metodei nepieciešams: 1) specializēts, dārgs magnētiskās rezonanses attēliegūšanas (MRI) un/vai pozitronu emisijas tomogrāfijas (PET) aprīkojums, kas ir pieejams tikai īpaši aprīkotās medicīniskās iestādēs, 2) labilu reaģentu izmantošana, 3) īpaši apmācīts personāls, lai pareizi izpildītu nepieciešamos testus un interpretētu rezultātus, 4) finansējums klīnisko pētījumu izpildei.

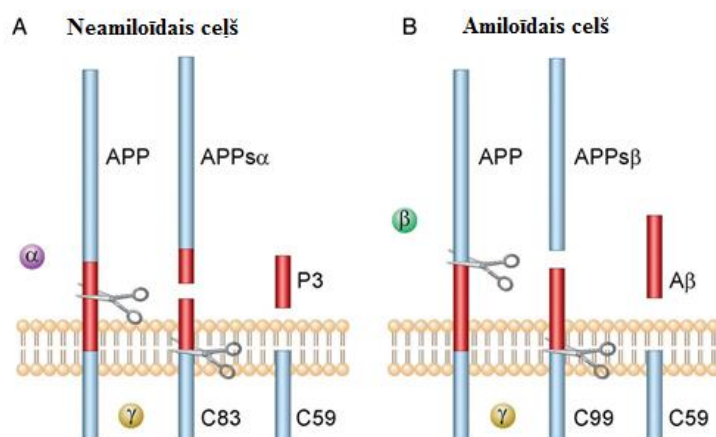
Latvijā nav izstrādāta valsts mērogā aktīva kampaņa cilvēkiem pēc 65 gadu vecuma veikt šādus vai līdzīgus testus pirms-klīniskai Alzheimer slimības diagnostikai, kā arī nav pieejama pilnīga datu bāze Alzheimer slimnieku apsekošanai

un uzskaitē. Pasaulē ir iespējams veikt arī vienkāršus ģenētiskos testus, lai noteiktu apolipoproteīna E (APOE ε2, ε3, ε4) mutācijas [Lutz M., et.al. 2016], bet Latvijā šādas iespējas vēl nav.

Alcheimera slimībai vidēji prognozētais pacienta dzīves ilgums pēc diagnozes noteikšanas ir 6 – 9 gadi. Līdz šim brīdim nav izdevies noskaidrot precīzu Alcheimera slimības etiopatogēni, tomēr pastāv vairākas teorijas par slimības attīstības mehānismiem.

## 1.2. Amiloīda beta teorija

Pastāv divas galvenās Alcheimera izcelsmes teorijas: peptīda amiloīda-β (Aβ) ekstracelulāro plātnīšu nogulsnešanās smadzeņu šūnās un hiperfosforilēta *tau* proteīna (τ) intracelulāro neirofibrilāro mezglu veidošanās. Neseni pētījumi pierāda, ka šķīstošie Aβ oligomēri un intracelulārais Aβ42, kas sastopami neironos slimības sākuma stadijā, ir daudz toksiskāki par ekstracelulāro plātnīšu izgulsnēšanos. Pie normāliem apstākļiem, *tau* proteīns ir šķīstošs, nodrošina mikrotubuļu stabilitāti un aksonālo transportu, bet hiperfosforilēts tas kļūst nešķīstošs un uzkrājas. Mutācijas amiloīda prekursora proteīna (APP) un presenilīna gēnos (PS1 un PS2) izsauc APP hiperregulāciju, kā rezultātā tiek sintezēts pārāk daudz Aβ. APP ir I tipa transmembrānas proteīns ar lielu ekstracelulāro domēnu, kas sastāv no N-gala un īsas C-citoplazmatiskās aste. APP degradācija notiek caur diviem mehānismiem: amiloīdo ceļu un ne-amiloīdo ceļu. Sākotnēji APP šķēļ α-sekretāze, neļaujot veidoties šķīstošiem APP savienojumiem un Aβ. Ja Aβ ir par daudz, tas tiek šķelts arī ar β-sekretāzi (BACE1) un pēc tam ar γ-sekretāzi, veidojot šķīstošu amiloīda prekursora proteīnu β (sAPPβ) un Aβ42 fragmentu, kuri veido toksiskus oligomērus un plātnītes, kas uzkrājas smadzeņu šūnās (*1. attēls*). Nešķīstošie Aβ oligomēri tieši pievienojas neironu lipīdu dubultslānim, veicinot membrānas depolarizāciju, jonu kanālu aktivāciju un izjaucot membrānas homeostāzi. Palielinoties kalcija jonu (Ca<sup>2+</sup>) ieplūšanai šūnā caur N-metil-D-aspartāta receptoru kanāliem (NMDA) un veidojoties reaktīvā skābekļa savienojumiem (ROS), neironos tiek inducēta neirotoksicitāte, kas ierosina to bojāeju [Kaushik A., et al. 2016].



**1. attēls.** APP degradācijas mehānismi. A. APP vispirms tiek sašķelts ar  $\alpha$ -sekretāzi A $\beta$  ietvaros, tā veidojot šķīstošu APP $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) ektodomēnu. Tālāk  $\gamma$ -sekretāze sašķel APP atlikumu, atbrīvojot P3 fragmentu, kas nepilda nekādu bioloģiski svarīgu lomu. B.  $\beta$ -sekretāze (BACE1) šķel APP, veidojot šķīstošu APP $\beta$  ektodomēnu. Tālāk,  $\gamma$ -sekretāzei šķeļot APP, tiek atbrīvots citotoksisks A $\beta$  [Frank M., et al. Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer`s disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2007].

Cilvēkiem, kas jaunāki par 20 gadiem, Alcheimera slimība nav diagnosticēta, bet vairāk nekā 30% pacientu virs 85 gadu vecuma, šī slimība ir sastopama, kas norāda uz tendenci slimībai progresēt, pieaugot pacienta vecumam. Neironu un sinapšu zuduma dēļ visās smadzenēs, galvenokārt hipokampā, mandeļveida ķermenī (amigdala), priekšējā daivā un smadzeņu garozā, tiek izjaukta normāla holīnērgiskās sistēmas darbība un cilvēks zaudē atmiņu, spēju uztvert apkārtējo vidi un kustību funkcijas. Cilvēka smadzenēs holīnērgiskais centrs atrodas bazālajās priekšsmadzenēs (*prosencephalon*), bet holīnērgiskie neironi un to aksoni stiepjas līdz smadzeņu garozai un hipokampam. Holīnērgiskā sistēma modulē dažādas kognitīvās funkcijas, to skaitā: atmiņu, apzinātu uzmanību un emociju izpausmes.

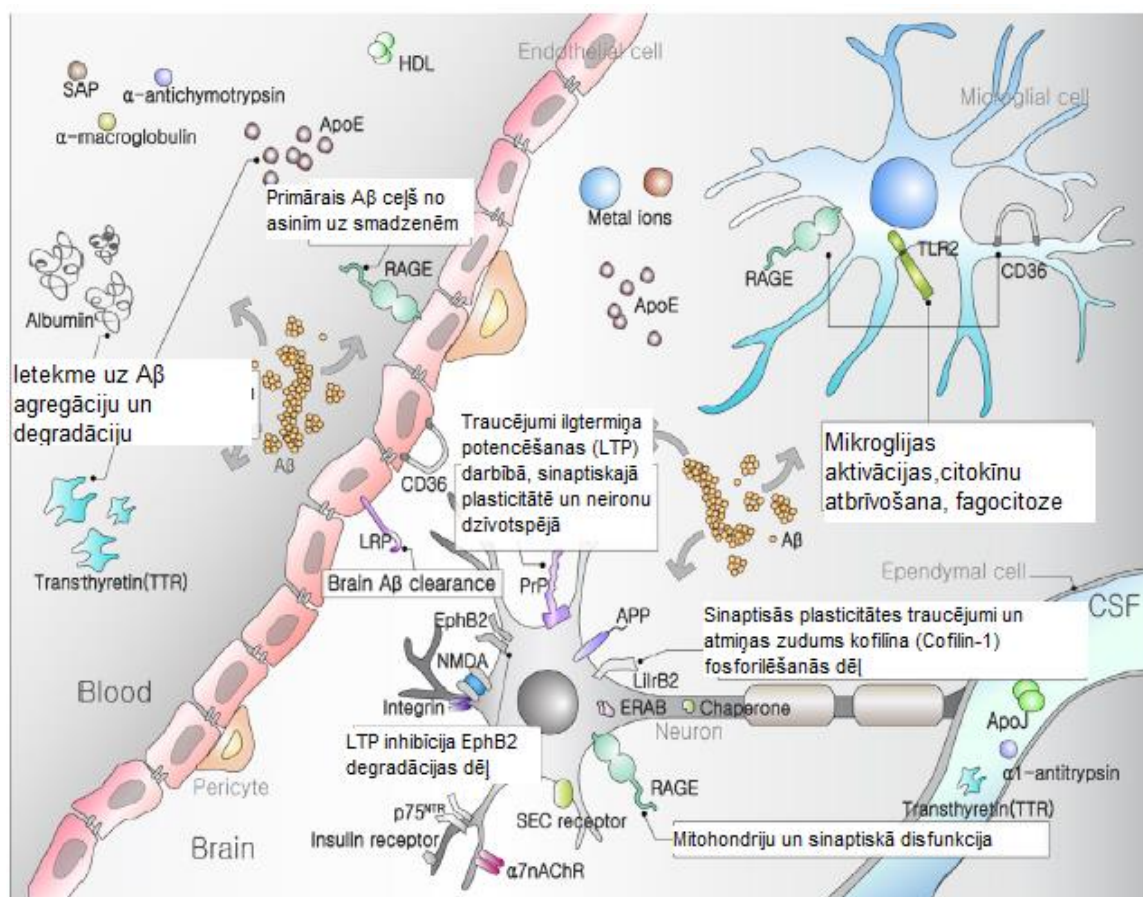
Specifiski holīnērgiskās sistēmas enzīmi, kuru ekspresija smadzeņu garozā un hipokampā Alcheimera slimības gadījumā samazinās, ir acetiltransferāze (ChAT) un acetilholīnesterāze (AChE). Plašas holīnērgiskās sistēmas deģenerācijas gadījumā (kā tas ir Alcheimera slimības gadījumā), tiek traucēta nervu augšanas faktora (*nerve growth factor*, NGF) signalizācija. Nervu augšanas faktors veicina perifēro un CNS neironu augšanu, attīstību un diferenciāciju [Karami et al. 2015],

[Salazar-Orta et al. 2014]. Visizteiktākais neironu zudums novērojams tieši hipokampā [Esmailzade B., et al. 2012]. Arī dopamīnerģiskās sistēmas disbalanss ietekmē cilvēka pašsajūtu, uzvedību (galvenokārt mezokortikolimbiskā sistēma), kognitīvās un motorās funkcijas (galvenokārt nigrostriatālā un tuberoinfundibulārā sistēma). Dopamīnerģiskās sistēmas galvenais neurotransmiters ir dopamīns. Samazināts dopamīna, dopamīna transportera vai tirozīna hidroksilāzes (L-DOPA katalizējošais enzīms smadzenēs) daudzums smadzenēs var izraisīt kustību traucējumus, hipotensiju (samazinātās adrenalīna un noradrenalīna sintēzes rezultātā), atmiņas pasliktināšanos un citus simptomus [Wang et al. 2016], [Alcaro et al. 2008].

Interesanti, ka slimība galvenokārt skar deklarātīvo atmiņu, kas atbild par notikumu un faktu atcerēšanos. Tas nozīmē, ka vecākiem cilvēkiem vidēji gada laikā var tikt novērota 0,8% augsta hipokampa atrofija, taču Alzheimerā pacientiem šis rādītājs var sasniegt pat 4,4% gada laikā. Kad parādās deklarātīvās atmiņas pasliktināšanās, slimība var tikt klīniski diagnosticēta, kur parasti hipokampa atrofija ir sasniegusi maksimumu un jauna neiroģenēze vairāk nav novērojama. Pirmie klīniskie simptomi, kuru dēļ pacienti vai viņu tuvinieki vēršas pēc palīdzības ir saistīti ar pacienta nespēju atcerēties dzīvesvieta, nesenus notikumus, dažādas, ar ikdienas notikumiem saistītas detaļas [Avila J., et al. 2010].

Lai pilnībā izprastu A $\beta$  pārprodukcijas nozīmi smadzenēs, ir svarīgi apzināties, cik daudzi procesi smadzenēs tiek izmainīti un kādi proteīni ietekmēti. A $\beta$  mijiedarbojas ar neskaitāmiem proteīniem gan smadzenēs, gan asins plazmā, un šo proteīnu tuvāka izpratne varētu vest tuvāk Alzheimerā slimības patoģenēzes izprašanai. Albumīns ir 65 kDa liels proteīns, kas galvenokārt cirkulē asinīs (aptuveni 640  $\mu$ M), salīdzinot ar cerebrospinalo šķidrumu, kur tas sastopams aptuveni 3  $\mu$ M. Albumīna galvenā funkcija ir saistīt toksiskas molekulas, ieskaitot A $\beta$ . Albumīns saista aptuveni 90 - 95% asinīs cirkulējošā A $\beta$ , ar ko varētu izskaidrot kāpēc A $\beta$  deponējas tieši smadzenēs, nevis perifērajos audos [Costa, et al. 2012]. Ahn et al., 2008 *in vitro* pilotpētījumā tika noskaidrots, ka smadzeņu mikroglijas šūnas spēj sintezēt albumīnu smadzenēs, kā atbildes reakciju uz terapiju ar lipopolisaharīdu vai A $\beta$ <sub>1-42</sub> aktivāciju. Nenoliedzami svarīga nozīme ir ApoE proteīnam, kas ietekmē A $\beta$  metabolismu. Lipidēts ApoE var izolēt A $\beta$  un modulēt tā degradāciju, caur receptoru-mediētu endocitozi. Vēl viens būtisks proteīns A $\beta$  akumulācijā smadzenēs ir transtiretīns. Tas ir proteīns, kas tiek sintezēts asinsvadu pinumā (*plexus choroideus*) un sastopams galvenokārt cerebrospinalajā šķidrumā (CSŠ) un asinīs. Tā galvenā loma ir saistīt un inhibēt A $\beta$  fibrillāciju un agregāciju smadzenēs normālos apstākļos, bet

Alcheimera slimības pacientiem transtirefīna līmenis CSŠ ir samazināts un cieši saistīts ar Alcheimera demences smaguma pakāpi, kā pierādīts neskaitāmos pētījumos [Castano et al. 2006; Han et al. 2011; Hansson et al. 2009]. Pārmērīga, patoloģiska A $\beta$  sintēze iedarbina proteīnu un receptoru kaskādi, kas noved pie A $\beta$  akumulācijas smadzenēs, neirotoksicitātes un demences izpausmēm. Alcheimera slimības patogēnēzes gadījumā vairāku proteīnu koncentrācija CSŠ samazinās, piemēram apoJ, prostaglandīna D2 sintētāzes, cistatīna,  $\alpha$ 1-antitripsīna un transtirefīna līmenis CSŠ varētu kalpot kā specifiski biomarkieri slimības diagnostikai. Cistatīns,  $\alpha$ 1-antitripsīns un transtirefīns tieši saista brīvo A $\beta$ . Vairāki plazmas proteīni - augsta blīvuma lipoproteīni (HDL), ApoA-I, ApoA-II, ApoE, klasterīns, seruma amiloīds A, tieši saistās pie A $\beta$  un varētu novērst fibrilizēto plātnīšu veidošanos vai tieši pretēji - ierosināt fibrilizāciju. Alcheimera slimības patoloģijas gadījumā pieaug arī vairāku metāla jonu koncentrācija smadzenēs, kas ietekmē A $\beta$  polimerizāciju, nukleāciju un plātnīšu veidošanos (2. attēls). Šīs kaskādes izjaukšana varētu kalpot kā jaunu zāļu vielu radīšanas mērķis, lai iedarbotos tieši uz Alcheimera slimības patofizioloģiskajiem cēloņiem, bet līdz tam nepieciešams veikt vēl pētījumus [Han, et al. 2016].



2. attēls. Ar Aβ saistīto molekulu mijiedarbības dažādos smadzeņu reģionos. Saīsinājumi: SAP (seruma amiloīda P komponents), ApoE (apolipoproteīns E), HDL (augsta blīvuma lipoproteīns), RAGE (dziļās glikēšanas galaproduktu receptors), TLR2 (antigēnu receptors 2), LRP (receptoru-saistīts lipoproteīna proteīns), PrP (prionu proteīns), EphB2 (Efrīna B-tipa receptors 2), APP (amiloīda prekursora proteīns), ERAB (ar endoplazmatisko tīklu saistītais amiloīds β), ApoJ (apolipoproteīns J), LILB2 (leikocītu imunglobulīnu tipa receptoru saime B), α7nAChR (alfa-7 nikotīnreceptors), SEC (serpīna-enzīma kompleksa receptors), p75 (neirotrofīna receptors) [Han et al. 2016].

Neskaitot *tau* proteīna un Aβ teoriju, svarīgi pieminēt, ka demences un citu smadzeņu bojājumu attīstībā minami ne tikai iedzimti faktori, piemēram, ģenētiskā predispozīcija (vistoksiskākais apolipoproteīna E subtips ir APOE ε4), bet arī dažādas smadzeņu traumas (ieskaitot oksidatīvo stresu pēc insulta), dažādas infekcijas (*I. tabula*), sinapšu deģenerācija, hronisks iekaisums, kā arī citas hroniskas saslimšanas, piemēram, cukura diabēts un ateroskleroze [Lim S., et al. 2015] [Alzheimer's Association Report, 2015]. Neironu un sinapšu zuduma dēļ, visās smadzenēs, galvenokārt, hipokampā, mandeļveida ķermenī (amigdala), priekšējā daivā

un smadzeņu garozā, tiek izjaukta normāla holīnerģiskās sistēmas darbība un cilvēks zaudē atmiņu, spēju uztvert apkārtējo vidi un kustību funkcijas. Visizteiktākais neironu zudums novērojams tieši hipokampā [Esmailzade B., et al. 2012].

**1. tabula. Līdz šim atklātie infekciju aģenti, kas ietekmē Alzheimerā slimības attīstību**

<b>Infekciju aģenti</b>			
<b>Baktērijas</b>	<b>Vīrusi</b>	<b>Sēnītes</b>	<b>Protozoji</b>
<i>Helicobacter pylori</i>	Citomegalovīruss	<i>Candida glabrata</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Herpes simplex vīruss 1. tips		
<i>Borellia burgdorferi</i>	Epšteina-Barra vīruss		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Cilvēka herpes vīruss 6		

Alzheimerā slimībai raksturīgie simptomi neizpaužas strauji, tie attīstās pakāpeniski un nespecifiski, tāpēc izšķiroša nozīme ir ar biomarkieru palīdzību noteikt pre-demences posmu Alzheimerā slimības gadījumā riska pacientiem. Noskaidrot atšķirības starp normāliem novecošanas faktoriem smadzenēs un *tau* proteīna agregāciju, hroniska neuroiekaisuma nozīmi un signāliem, un pacientiem ar Alzheimerā slimību ir ļoti būtiski [Hwag J., et al. 2015].



**3. attēls.** Riska faktori, kas var ietekmēt Alcheimera slimības attīstīšanos vecumdienās. Ģenētiska predispozīcija, saskare vai atkārtota pārslimošana ar infekcioziem patogēniem un sistēmisku iekaisumu visas dzīves garumā, kā arī hronisks iekaisums kombinācijā ar vecumu [Lim S., et al. 2015].

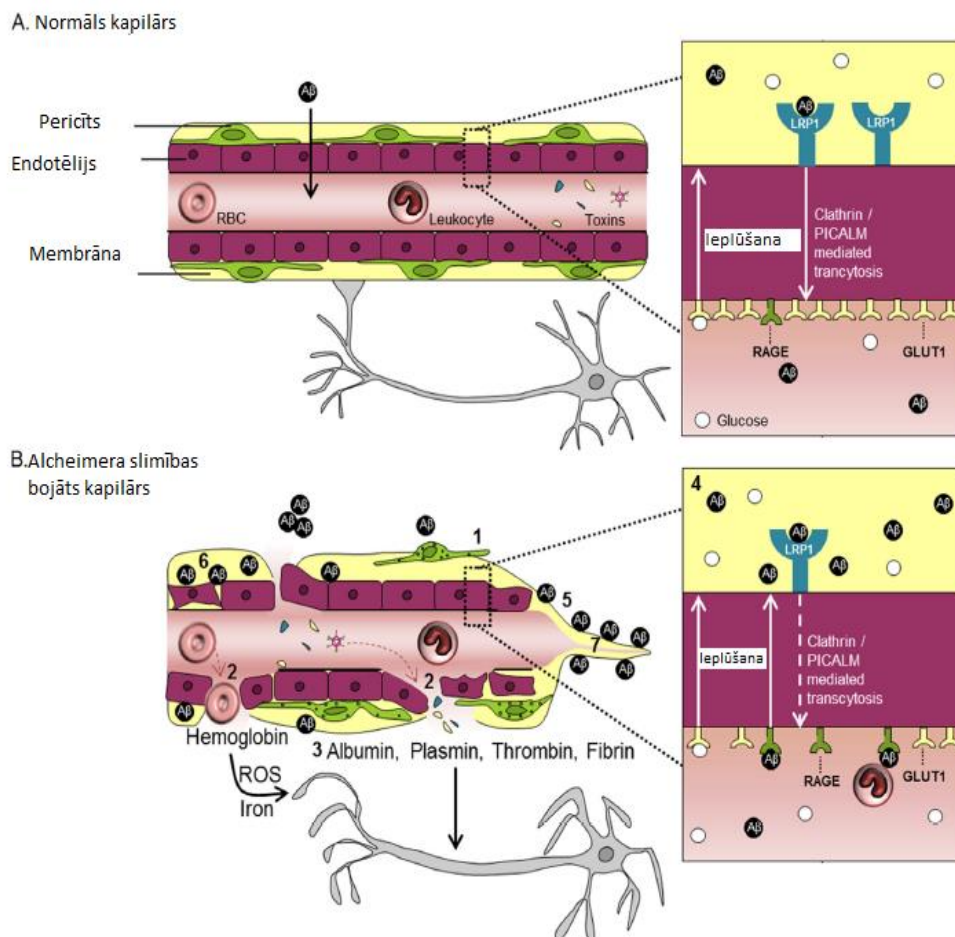
### 1.3. Dzīvesveida ietekme slimības izcelsmē un attīstībā

Alcheimera slimība ir multifaktoriāla un heterogēna slimība, un demences attīstības risks vecumdienās, galvenokārt ir saistīts ar lielāku vecumu (pēc 65 g.v.), apolipoproteīna E ε4 (APOE4) alēles mutāciju un ģimenes anamnēzi. Tikai aptuveni pēdējos piecus gadus pētniekiem ir pastiprināta interese par demences attīstību un nepareiza dzīvesveida rezultāta slimību (piemēram, ateroskleroze, hipertensija, 2. tipa cukura diabēts u.c.) saistību. Šobrīd ir pierādīta diabēta un hipoglikēmijas ietekme uz demences attīstību geriatrijas pacientu vidū.

Smadzenes patērē aptuveni 20% no visas uzņemtās glikozes un skābekļa daudzuma organismā un pat pāris minūtes traucētas vai apturētas cerebrālās asinsrites var rezultēties ar smadzeņu nāvi. To, lai smadzenes spētu saņemt un atdot nepieciešamās barības vielas, un atturētu nevēlamu molekulu un patogēnu nokļūvi tajās, nodrošina smadzeņu hematoencefāliskā barjera (HEB). Šī barjera ir selektīvi caurlaidīga, molekulu transportam izmantojot substrātselektīvo transportu, tā nepieļaujot nevajadzīgu molekulu nokļūvi un uzkrāšanos smadzeņu parenhīmā.

Cerebrālās asinsrites disfunkcijas rezultātā smadzenēs var nokļūt un uzkrāties neirotoksiskas molekulas, nevajadzīgas barības vielas un metabolīti, kā arī veidoties nekontrolēta augšanas faktoru ekspresija (4. attēls). Šīs disfunkcijas rezultātā var attīstīties tādas neurodeģeneratīvas saslimšanas, kā Alcheimera slimība, Pārkinsona slimība un Hantingtona horeja.

Alcheimera slimības skartajos smadzeņu audos *post mortem* tika atrasts samazināts daudzums glikozes transporta proteīna 1 (GLUT1) daudzums uz smadzeņu asinsvadiem. Normālai HEB ir augsti ekspresēti glikozes transporta proteīni (GLUT1), vidēji ekspresēti zema blīvuma lipoproteīnu receptora saistīts proteīns 1 (LRP1) un minimāli ekspresēti dziļās glikēšanas galaproduktu receptori (RAGE). GLUT1 ir proteīns, kas nodrošina glikozes transportu caur HEB no asinīm smadzenēs. Respektīvi, smadzeņu glikozes līmenis korelē ar GLUT1 ekspresiju uz smadzeņu asinsvadiem. GLUT1 nodrošina ne tikai glikozes transportu no asinīm uz smadzenēm, bet ir vitāli nozīmīgs cerebrālo kapilāru, smadzeņu apasiņošanas un HEB veseluma uzturēšanā [Nelson R. A., et al. 2015]. Perry T., et al. 2015 pētījumā, *in vivo* kulturētās neironu šūnās, apstiprināja, ka GLUT1 normāla ekspresija samazina apolipoproteīna prekursora (APP) un A $\beta$  daudzumu smadzenēs.



4. attēls. A. Vesela indivīda kapilārs ir ar neskartu hematoencefālisko barjeru (HEB), kas sastāv no cieši piegulošām endotēlija šūnām, kuru balsta pericītu siena. Gar šo barjeru ir vairākas molekulas un transporta proteīni, kuri nodrošina molekulu transportu no asinīm uz smadzenēm caur substrātspecifiskām transporta sistēmām, no kurām vairākas ir specifiskas Alcheimera slimības patofizioloģijai. B. Alcheimera slimības skarts kapilārs, kā bojājums var rezultēties ar neurodeģenerāciju. 1. Pericīti deģenerējas un atvienojas. 2. HEB kļūst viegli šķērsojama. 3. Asinīs esošas molekulas, piemēram, fibrinogēns, trombīns un plazminogēns, viegli nokļūst smadzenēs, kļūst tieši neirotoksiski un spēj ilgstoši bojāt HEB. Eritrocītu ekstravazācija ierosina dzelzs akumulāciju no hemoglobīna, kas ierosina reaktīvā skābekļa formu veidošanos un oksidatīvo stresu. Albumīns veicina lokālo audu tūsku. 4. HEB transporta proteīnu ekspresija ir izmainīta (GLUT1 un LRP1 receptoru ekspresija ir samazināta, bet RAGE ekspresija ir palielinājusies). Šo transporta proteīnu ekspresijas izmaiņas nodrošina paaugstinātu amiloīda-β (Aβ) iekļūšanu un akumulāciju smadzenēs. 5. Cerebrāla amiloīda angiopātija. 6. Bojāta membrāna. 7. Izveidojušās kapilāru paliekas

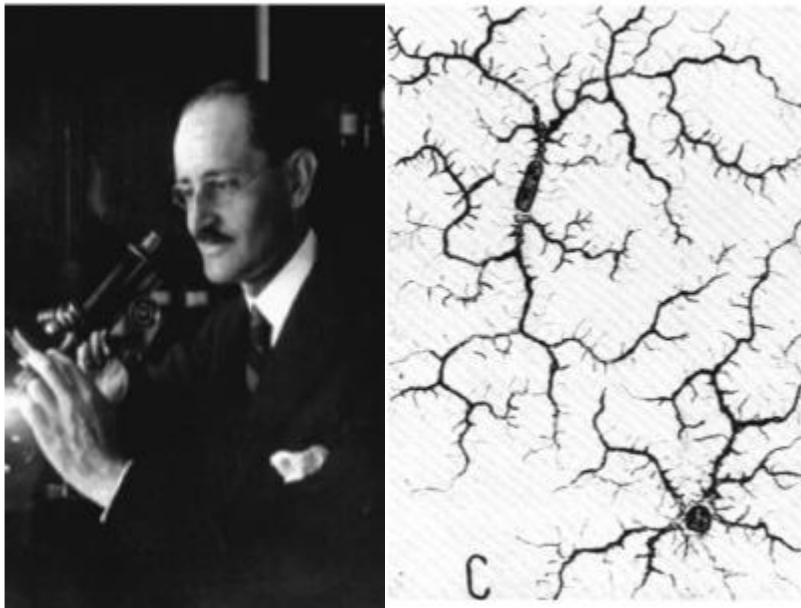
2. tipa cukura diabēts raksturojas ar insulīna rezistenci perifērajos audos, kas rezultējas ar hiperglikēmiju un hiperinsulinēmiju audos. Smadzenēs insulīns tiek uzņemts smadzenēs caur insulīna receptoriem HEB. Šie receptori galvenokārt ir izvietoti hipokampā, entorinālajā garozā un pieres daļā, kuru galvenās funkcijas ietver iemācīšanos un atmiņu. Insulīns piedalās arī tādu nozīmīgu neurotransmiteru sintēzē, kā acetilholīns un norepinefrīns. Hroniskas hiperinsulinēmijas gadījumā, kas izpaužas kā insulīna rezistence, kā tas ir 2. tipa cukura diabēta gadījumā, insulīna receptoru hiporegulācija uz HEB var samazināt insulīna transportu smadzenēs. Longitudināla meta-analīze apstiprināja 2. tipa cukura diabēta ietekmi vaskulāras demences, Alzheimeras slimības un vieglas kognitīvas disfunkcijas attīstībā, salīdzinājumā ar indivīdiem bez cukura diabēta [Cheng G., et al. 2012]. 2. tipa cukura diabēts ir multifaktoriāla saslimšana un tā saistība ar insulīna rezistenci smadzenēs vēl nav līdz galam izpētīta, tomēr cirkulējošās glikozes kontrole spēj palēnināt atmiņas pasliktināšanos geriatrijas pacientiem [Barbagallo M. et al. 2015].

## 2. NEIROIEKAISUMS

### 2.1. Mikroglijas aktivācija

Pirmo reizi ar jēdzienu – mikroglija, pasauli iepazīstināja spāņu zinātnieks Pio del Rio-Hortega (5. attēls) 1932. gadā, kad tika publicēta viņa publikācija *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (Nervu sistēmas citoloģija un šūnu patoloģija). Pio del Rio-Hortega mikroglijas un vēlāk arī oligodendrītus atklāja, audos injicējot sudraba nitrātu, kas piešķir šūnām ļoti precīzi skatāmu izskatu un krāsu. Savā publikācijā par mikrogliju, zinātnieks par mikroglijas šūnām secināja deviņus sekojošus postulātus, kas neapšaubāmi arī mūsdienās ir patiesi:

- 1) Mikroglijas sastopamas smadzenēs to agrīnā attīstības stadijā.
- 2) Šīm šūnām ir amēbveida forma un tām ir mezodermāla izcelsme.
- 3) Tās izmanto asinsvadus un baltās vielas traktus, lai migrētu un nonāktu visos smadzeņu reģionos.
- 4) Nobriedušās smadzenēs tās pārveidojas, izveidojot zarotus izaugumus (šobrīd zināmas kā „snaudošas” mikroglijas).
- 5) Nobriedušās smadzenēs mikroglijas šūnas ir vienlīdzīgi izkliedētas pa visu centrālo nervu sistēmu.
- 6) Katra mikroglijas šūna šķietami ieņem noteiktu smadzeņu reģionu.
- 7) Pēc patoloģiskām pārmaiņām smadzenēs, mikroglijas šūnas transformējas.
- 8) Transformētās šūnas ieņem amēbveida formu, līdzīgu kā to agrīnā attīstības stadijā.
- 9) Šīm šūnām piemīt spēja migrēt, proliferēt un fagocitēt.

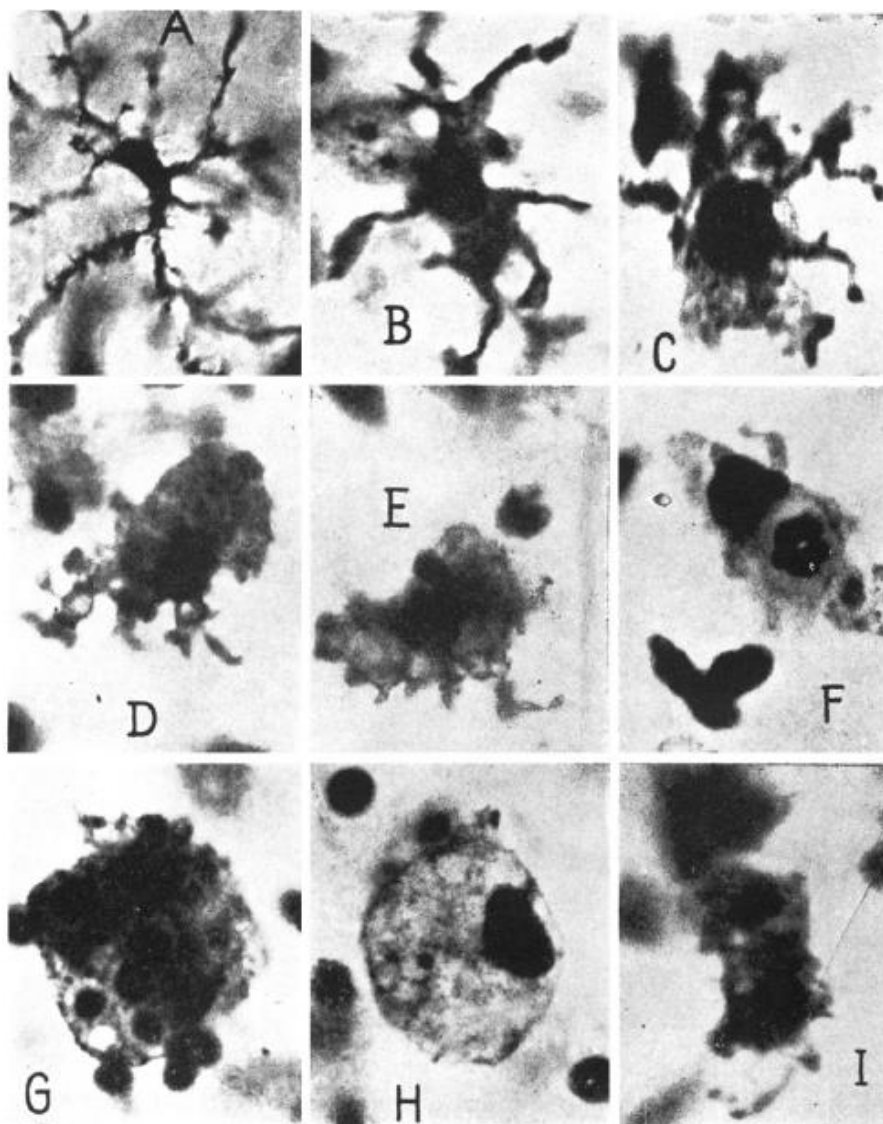


**5. attēls.** Labajā pusē redzams zinātnieks – mikroglijas atklājējs Pio del Rio-Hortega. Zīmējumā blakus redzamas šī zinātnieka attēlotas sazarotās „snaudošās” mikroglijas šūnas [Kettenmann H. 2011].

Mikroglija ir pastāvīga centrālās nervu sistēmas (CNS) imūnšūna, kas pieder pie mononukleāro fagocītu izcelsmes. Mikroglija, līdzīgi citiem makrofāgiem, pirmā reaģē uz dažādu patogēnu invāziju tos fagocitējot (tās aktivētajā fāzē), bet miera fāzē mikroglija pilda svarīgas neotropās funkcijas, izmantojot savus smalkos izaugumus, mijiedarbojas ar citām glijas šūnām un neironiem [Vilhardt F., 2005]. Mikroglija aizņem aptuveni 15% no visām neneironālajām šūnām smadzenēs un parasti ir miera fāzē jeb neaktīvas. Mikroglijas šūnas miera fāzē uztur homeostāzi, kontrolējot citokīnu, hemokīnu un citu iekaisuma molekulu izdalīšanos smadzenēs, kā arī nodrošinot jaunu sinapšu veidošanos jeb sinaptoģenēzi un neuroģenēzi. Dažādu patogēnu invāzijas, traumas, infekcijas, insulta un neurodeģeneratīvu slimību rezultātā, mikroglijas šūnas var aktivēties, kā rezultātā tiek atbrīvots reaktīvais skābeklis, dažādas slāpekli saturošas molekulas, citokīni un hemokīni. Citokīni ir proteīni (aptuveni 15 - 25 kDa), kas, galvenokārt, tiek atbrīvoti no imūnajām šūnām - monocītiem, makrofāgiem un limfocītiem, kā arī no mikroglijas un astroglijas šūnām. Neskatoties uz to samērā lielo molekulas izmēru, tie brīvi šķērso HEB caur HEB transporta sistēmu. Citokīnu galvenais uzdevums ir nodrošināt bojāto smadzeņu audu „salabošanu”, tā atjaunojot homeostāzi. Pie normāliem apstākļiem citokīnu koncentrācija smadzenēs ir zema, bet pie patoloģiskiem apstākļiem citokīnu koncentrācija var paaugstināties pat simts reizes virs normas [Kim et al., 2016].

Mikroglia izdala iekaisuma mediatorus, piemēram, prostaglandīnus, audzēja nekrozes faktoru alfa (TNF- $\alpha$ ), interleikīnu 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), proteāzes un citas molekulas, kā arī pretiekaisuma molekulas, piemēram, neirotrofinus, interleikīnu 10 (IL-10) un interleikīnu 4 (IL-4). Šis izveidojies neuroiekaisums var būt gan pozitīvs, gan postošs ilgtermiņā, tieši nekontrolētā iekaisuma molekulu un pretiekaisuma molekulu līdzsvara dēļ.

Sākoties iekaisuma procesam un aktivējoties mikroglijai, mainās ne tikai tās funkcijas, bet arī morfoloģija (6. attēls).



**6. attēls.** A: šūna ar smalkiem, izteiktiem sazarojumiem; B: palielinātas šūnas ar īsiem sazarojumiem; C: hipertrofiska šūna ar pseidopodijām (māņkājiņām); D un E: amēbveida un citas pseido formas; F: šūna ar fagocitētu leukocītu; G: šūna ar vairākiem fagocitētiem eritrocītiem; H: graudaina šūna; I: šūna dalīšanās (mitozes) fāzē.

Iekaisuma mediatoru klātbūtnē, piemēram  $IFN\gamma$  vai  $TNF\alpha$ , dabīgās galētājšūnas (NKC) stimulē makrofāga šūnas ekspresēt sekretētos iekaisuma citokīnus un izdalīt reaktīvā skābekļa radikāļus. Šo fāzi dēvē par M1 jeb aktivētā makrofāga fāzi. Šī fāze ir ļoti būtisks aizsargmehānisms, tomēr kaut neliela šīs fāzes kontroles sistēmas novirze var izraisīt smadzeņu un nervu bojājumus.

IL-4 vai IL-13 mikroglijas stimulācija izsauc M2a fāzi, ko mēdz dēvēt arī par „brūces dzīšanas fāzi”. Šajā fāzē ir ekspresēts liels daudzums IL-1 receptora antagonista (IL-1Ra), argināzes, hitināzes kā arī citu mediatoru, kas nodrošina ekstracelulārā matricas reorganizāciju. M2b makrofāga fāzi iedarbina imūnie kompleksi, tādi kā IgG antivielas-antigēna kompleksi, *toll-like* receptoru (TLRs) aktivēšana vai IL-1 receptoru ligandi. Šajā fāzē ir augsts argināzes, IL-1 $\beta$ , IL-6 un  $TNF\alpha$  līmenis, bet zems IL-12 līmenis. CD86 proteīns ir specifisks šīs fāzes marķieris. M2c fāzi aktivē IL-10. M2c fāze tiek saukta par „regulatoro” fāzi, jo veic pretiekaisuma aktivitāti, un pēc tam makrofāgs tiek deaktivēts [Latta et al., 2015].

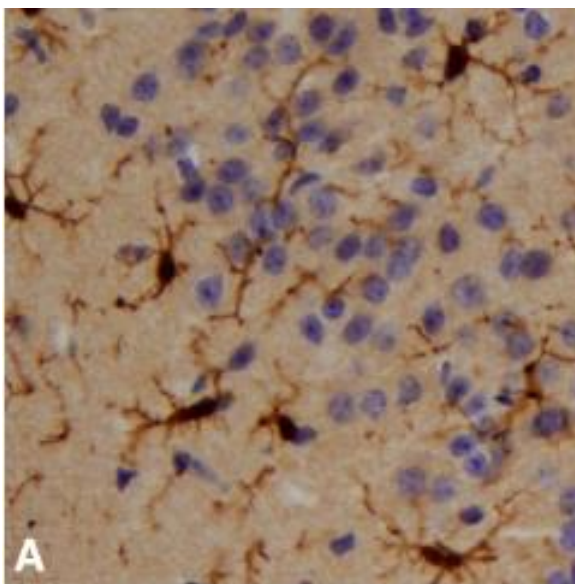
Mikrogliju identifikācijai izmanto vairākas imunonistoķīmiskās metodes un specifiskus marķierus (2. tabula), bet visbiežāk izmantojamie marķieri uz *ex vivo* šūnu līnijām ir Iba-1 (jonizēta calciju-saistoša adaptora molekula-1) (7. attēls), CD11b/18 ( $\alpha_M\beta_2$  integrīns), CD45 (biežākais leukocītu antigēns) un CD68 (*macrosialin*). Dažādo marķieru piemērošana konkrētai metodei tiek noteikta ar to spēju:

- 1) Atšķirt mikroglijas šūnas no citām CNS šūnām (piemēram, neironiem, astrocītiem, oligodendrocītiem vai endotēlija šūnām);
- 2) Atšķirt smadzeņu parenhīmā esošās mikroglijas no citiem monocītiem un makrofāgiem;
- 3) Uzrādīt visu mikroglijas šūnu ekspresiju vai konkrētas stadijas mikroglijas šūnu ekspresiju.

Mikroglijas šūnas iespējams identificēt ne tikai cilvēka šūnu līnijās, bet arī dzīvnieku šūnu līnijās.

2. tabula. Mikroglijas identifikācijas marķieri

<b>Molekula/Antigēns</b>	<b>Noteikšanas metode</b>	<b>Marķiera īpašību un nozīmes būtiskums</b>
<b>Identifikācija</b>		
<i>Iba-1</i>	Antivielas pret Iba1	Proteīns ar nozīmi kalcija homeostāzes uzturēšanā
<i>CD11b/18</i>	Antivielas pret CD11b/18	Komplementārais receptors 3 (CR3) ar īpašībām papildu saistīt citas molekulas, piemēram, fibrinogēnu
<i>CD45</i>	Antivielas pret CD45	Transmembrānas proteīns tirozīna fosfatāze, piedalās arī T šūnu receptora (TCR) un B šūnu receptora (BCR) aktivitātes signalizēšanā.
<i>CD68</i>	Antivielas pret CD68	Loma fagocitozē un darbojas kā oksidētā leukocītu antigēna (LCA) saistošais proteīns.
<i>F4/80 antigēns</i>	F4/80 antiViela	Epidermālā augšanas faktora (EGF)-transmembrānas 7 (TM7) saimes loceklis. Iespējama loma imūnās tolerances uzturēšanā.
<i>GDNF (glijas šūnu neurotrofiskais faktors)</i>	Antivielas pret GDNF	Astrociņu sintezēti ; piedalās mikroglijas aktivēšanā;



**7. attēls.** Ar diaminobenzidīnu (DAB) iekrāsota Iba-1 uzrāda mikroglijas ekspresiju peles smadzenēs.

## 2.2. Astroglijas aktivācija

Astrocīti ir neregulāras formas zvaigžņveida glijas šūnas, kuru morfoloģija, fizioloģiskās funkcijas un ekspresija atšķiras dažādos smadzeņu reģionos. Tiek iedalīti divi astrocītu subtipi: fibrozie jeb garastainie astrocīti, kas, galvenokārt, lokalizējas baltajā vielā, bet sastopami arī pelēkajā vielā, un protoplazmatiskie astrocīti jeb īssarainie, kas lokalizējas pelēkajā vielā. Smadzenēs astrocītu ir vismaz piecas reizes vairāk nekā neironu.

Aktivētus astrocītus var imunohistoķīmiski identificēt, izmantojot glijas skābā fibrillārā proteīna (GFAP) marķieri, tomēr GFAP nav absolūts identifikācijas marķieris, jo pilnīgi veselās smadzenēs tas nav ekspresēts vai ir ekspresēts ļoti mazos daudzumos. Astrogliju iespējams identificēt arī ar citiem marķieriem, piemēram, glutamīna sintetāzi un S100 $\beta$  (3. tabula). Astrocīti cilvēka smadzenēs ir daudz lielāki, strukturāli sarežģītāki un ar lielāku dažādību, nekā astrocīti graužēju smadzenēs. Līdz šim noskaidrotās svarīgākās astrocītu funkcijas smadzenēs ir sinapšu veidošana, jonu un šķidruma apmaiņa, sekretorā funkcija, atbrīvojot neurotransmiterus, neiromodulatorus, hormonus, trofiskos un imūnfaktorus, kā arī astrocīta reaktīvajā fāzē tās veic arī nozīmīgu aizsargfunkciju un spēj fagocitēt (8. attēls). Uz astrocītu virsmas ekspresējas kālija un nātrija jonu kanāli un tie spēj regulēt šo jonu iekšējo

plūsmu, bet, atšķirībā no neironiem, astrocīti tiek uzskatīti par neuzbudināmu atbalsta sistēmu, jo nespēj radīt darbības potenciālu. Tomēr astrocīti sev piesaista starpšūnu telpā esošos kalcija jonus, tā radot astrocīts-astrocīts un astrocīts-neirons starpšūnu komunikāciju. Kalcija jonu līmeņa pieaugums starpšūnu telpā izraisa glutamāta un citu neitrotransmiteru (adenozīna trifosfāta) atbrīvošanu sinaptiskajā spraugā. Šo sinaptiski aktīvo molekulu atbrīvošana izraisa neironu sinaptiskās aktivitātes izmaiņas, kā arī neironu uzbudināmības izmaiņas. Pārlietu paaugstināts kalcija jonu ( $Ca^{2+}$ ) daudzums starpšūnu telpā, kā rezultāts pārmērīgai NMDA receptoru stimulācijai, rezultējas ar mitohondriālo elektronu transporta sistēmas disfunkciju un ROS veidošanos. Mitohondriju disfunkcija un oksidatīvais stress rezultējas ar neurodeģenerāciju un apoptozi [Rai et al. 2014].

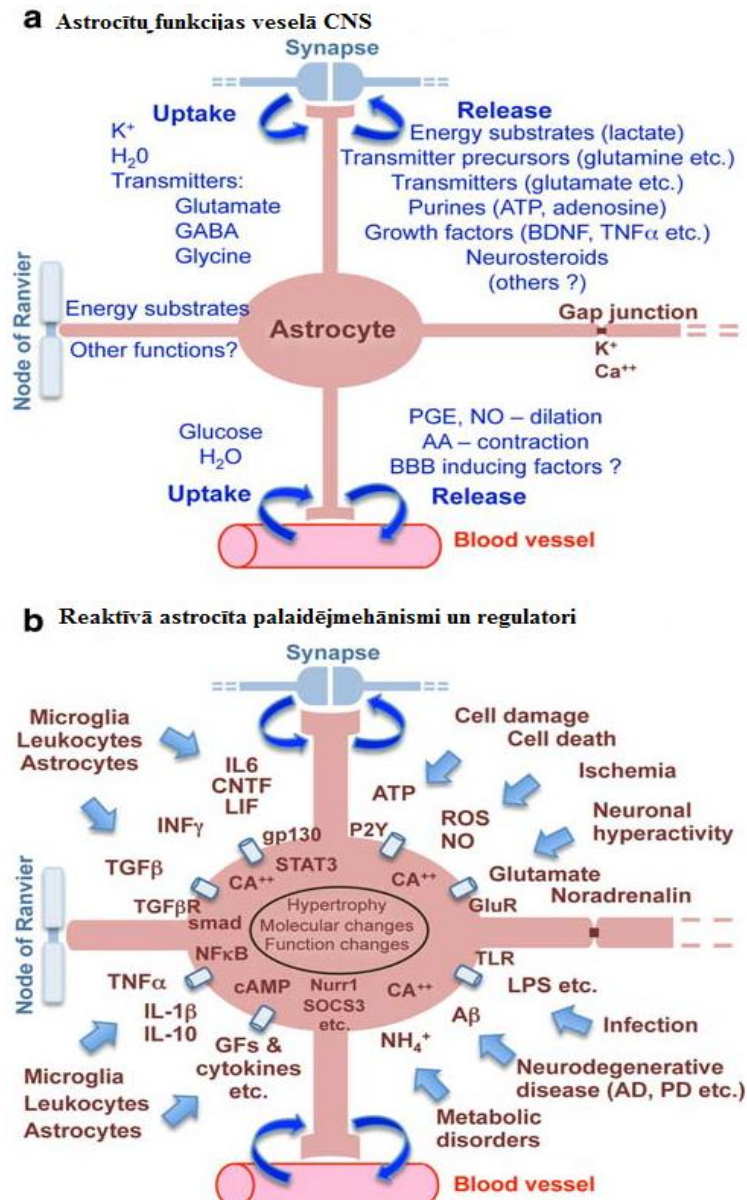
Astrocītiem piemīt spēja iedarboties arī tieši uz sinaptisko aktivitāti, atbrīvojot augšanas faktorus un citus gliotransmiterus [Tang J. et al. 2016].

### 3. tabula. Astroglijas identifikācijas marķieri

<b>Molekula/Antigēns</b>	<b>Noteikšanas metode</b>	<b>Marķiera īpašību un nozīmes būtiskums</b>
GFAP ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )	GFAP antivielas	Astrocīta citoskeleta nozīmīga sastāvdaļa. Piedalās citoskeleta reorganizācijā, mielinācijas saglabāšanā un šūnu adhēzijā.
S100 B (kalciju saistošs proteīns B)	S100 B antivielas	Kalciju saistošs proteīns; piedalās šūnas cikla regulācijā.
GLAST ( <i>glutamāta aspartāta transporters</i> )	GLAST antivielas	$Na^+$ atkarīgs glutamāta transportproteīns. Galvenā funkcija ir aizvērt lieko glutamātu no ārpusšūnu telpas, pasargājot šūnas no ārpusšūnas toksicitātes.
GAD65/67 ( <i>glutamāta dekarboksilāzes izoformas</i> )	GAD65 un GAD67 antivielas	Piedalās GABA sintēzē; nozīmīga loma CNS homeostāzes uzturēšanā.

Gan *post mortem* Alcheimera slimnieku smadzenēs, gan Alcheimera dzīvnieku modeļos, ap  $A\beta$  senilajām plātnēm tika atklāti neskaitāmi reaktīvie astrocīti.

Nicoll J. A. R. pētījumā tika pierādīts, ka, *in vitro* kultivētā astrocītu šūnu līnijā, astrocīti spēj pievienoties A $\beta$ <sub>1-42</sub> plātnēm, tās imobilizēt un degradēt 24h laikā. Svarīgi pieminēt, ka šī pētījuma ietvaros tika pierādīts, ka astrocītu aktivitāte un spēja degradēt A $\beta$  krietni atšķīrās jaunu astrocītu un pieaugušu astrocītu šūnu līnijās, kur pieauguši astrocīti šo funkciju pildīt vairs nespēj [Nicoll J. A. R. et al. 2003].



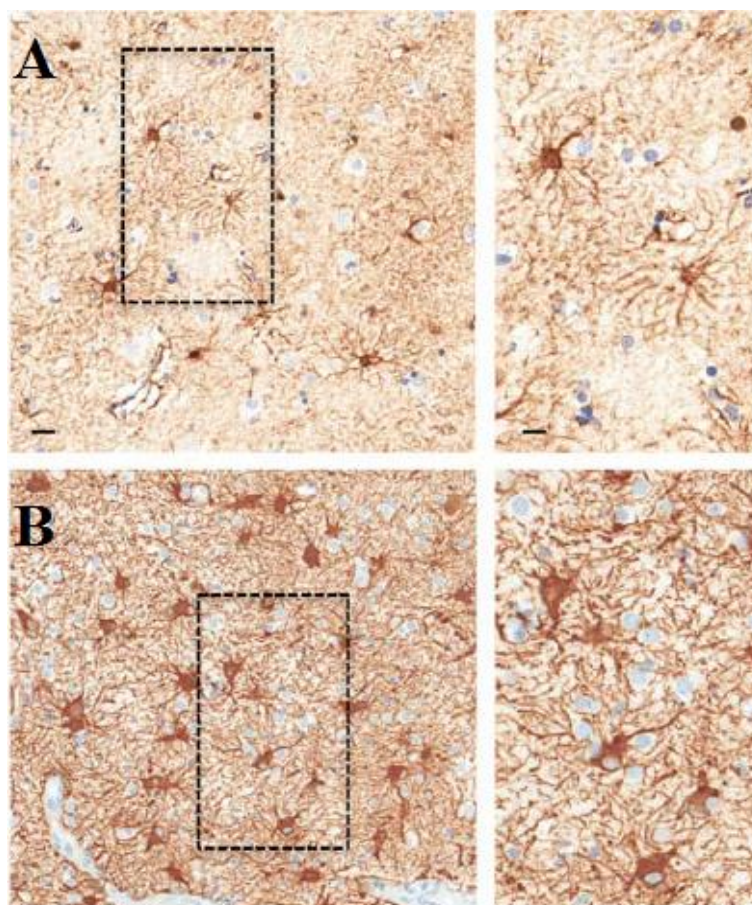
8. attēls. Shematisks attēls, kur attēlots a: veselas CNS astrocītu funkcijas un b: reaktīva astrocīta palaidējmehānismi un regulatori.

Astrocītiem ir nozīmīga loma sinapšu veidošanā, atbrīvojot signālmolekulas (trombospondīnu) un augšanas faktorus, un sinapšu transmisijā, atbrīvojot aktīvas molekulas, piemēram, glutamātu, adenozintrifosfātu (ATF), adenozīnu, GABA un D-serīnu. Astrocīti ir nozīmīga glikogēna rezervju krātuve CNS.

Visvairāk glikogēna rezerves sastopamas vietās, kur ir vislielākais sinaptiskais blīvums. Tas varētu liecināt par to, ka tieši astrocīti pilda nozīmīgu lomu smadzeņu hipoglikēmijas gadījumā, atbrīvojot glikogēnu (to tālāk sašķeļot līdz laktātam). Pateicoties tam, ka astrocītu garie izaugumi veido kontaktus gan ar asinsvadiem, nerva perikarionu (nerva ķermeni), gan aksoniem (Ranvjē mezgla vietā) un sinapsēm, tiem piemīt arī metabolā funkcija - nogādāt glikozi no asinīm un apgādāt smadzeņu šūnas ar enerģijas metabolītiem gan baltajā, gan pelēkajā vielā.

Iekaisuma, CNS traumas un infekcijas gadījumā aktivētās astroglijas aizsargā CNS šūnas un audus no iespējami toksiska ārpusšūnas glutamāta uzņemšanas, un no oksidatīvā stresa, izdalot glutationu (GSH), no  $\text{NH}_4^+$  toksicitātes, no neirodeģenerācijas degradējot amiloīdu beta, kā arī atvieglo HEB atjaunošanu un limitē iekaisuma molekulu, un infekcijas aģentu nokļūšanu veselā CNS parenhīmā, veidojot gliālās rētas.

Aktivētās astroglijas funkcionālās, celulārās un molekulārās izmaiņas CNS iekaisuma un traumas gadījumā tiek dēvētas par reaktīvo astrogliozi. Vidēji smagas un smagas reaktīvās astrogliozes gadījumā novērojama GFAP proteīna pastiprināta izdalīšanās, kā arī gliālo rētu veidošanās (9. attēls) [Sofraniew M. W. et al. 2010].



**9. attēls.** Ar GFAP detektētas dažādas morfoloģijas astroglijas šūnas cilvēka smadzenēs. A. Astroglijas ļoti viegla iekaisuma gadījumā; B. Aktivētas astroglijas vidēji smaga iekaisuma gadījumā, manāmi pārekspresēts GFAP uz astrocītu virsmas, kā arī novērojama šūnu hipertrofija.

### 3. STREPTOZOCĪNA NEIROIEKAISUMA MODELIS

Streptozocīns (2-deoxy-D-glikozes derivāts no N-methyl-N-nitrosylurea) ir glukozamīna-nitrosurea savienojums, kas iegūts no *Streptomyces achromogenes* baktērijām. Streptozocīnam (STZ) metabolizējoties tiek izdalīti citotoksiski savienojumi, kas, galvenokārt, iznīcina aizkuņģa dziedzera  $\beta$  šūnas, izraisot hipoinsulinēmiju un hiperglikēmiju. STZ metabolītu alkilējošās īpašības izpaužas ar spēju radīt ROS un izraisīt oksidatīvo stresu. Ņemot vērā streptozocīna DNS alkilējošās īpašības, tas klīnikā tiek izmantots kā ķīmijterapijas aģents aizkuņģa dziedzera  $\beta$  šūnu karcinomas ārstēšanā, bet izteikto un smago blakņu dēļ - hepatotoksicitāte un nefrotoksicitāte, to šim nolūkam izmanto ļoti reti [Murtishaw A. S. 2016].

Perifērijā intravenozi (i.v.) ievadīts STZ tiek izmantots 2. tipa cukura diabēta modelēšanai graužējos. Atkarībā no devas, STZ spēj izraisīt diabētisko stadiju divos veidos. Ņemot vērā STZ ķīmiskās struktūras līdzību insulīnam, tas spēj piesaistīties pie GLUT2 receptoriem, iekļūt  $\beta$  šūnās un tajās uzkrāties, ierosinot šūnas nāvi. GLUT2 receptori, galvenokārt, atrodas aizkuņģa dziedzera  $\beta$  šūnās, bet nelielās devās sastopami arī smadzenēs. Lielas devas STZ ievadīts perifēri intravenozi, iznīcina  $\beta$  šūnas, pateicoties *nitrosurea* savienojumu citotoksiskajām un alkilējošajām īpašībām. Mazas devas STZ ierosina imūnās un iekaisuma reakcijas, iespējams, glutamīnskābes dekarboksilāzes autoantigēnu atbrīvošanas rezultātā [Graham M. L. 2011].

Intracerebroventrikulāri (i.c.v.) ievadīts STZ kalpo kā sporādiskas Alzheimeras slimības modelis graužējos. I.c.v.-STZ izraisa smadzeņu insulīna rezistenci, kas tālāk rezultējas ar glikogēna sināzes kināzes beta (GSK3 $\beta$ ) regulācijas traucējumiem, un Alzheimeras slimībai raksturīgiem klīniskiem simptomiem, ieskaitot atmiņas pasliktināšanos, dezorientāciju, oksidatīvo stresu, kā arī molekulārā līmenī - A $\beta$  plātnīšu izgulsnēšanos, glikozes metabolisma disfunkciju un *tau* proteīna hiperfosforilāciju (10. attēls).

I.c.v. ievadīts STZ izraisa insulīna rezistentu stāvokli smadzenēs, kas raksturojas ar atmiņas traucējumiem, holīnerģiskās sistēmas disbalansu, glikozes

hipermetabolismu un neurodeģenerāciju. Ir pierādīts, ka perifēri ievadīts STZ izsauc smadzeņu insulīna degradāciju [Rai S. et al. 2014].

Neskatoties uz STZ absolūtu atbilstību Alcheimera slimības modulēšanai grauzējos, nekorekta STZ devas izvēle ( $LD_{50} = 200\text{mg/kg}$ ), dzīvnieka svara un dzimuma izvēle, kā arī izteiktā toksicitāte rezultējas ar modeļa dzīvnieku nāvi un ciešanām [Gojal S. N. 2016].



**10. attēls** STZ (i.c.v.) neuroiekaisuma modelis smadzenēs. Perifēri ievadīts STZ izraisa aizkuņģa dziedzera  $\beta$  šūnu bojāeju un insulīna nepietiekamību, kā arī izraisa smadzeņu insulīna rezistenci un A $\beta$  akumulāciju un tau proteīna fosforilēšanu. Šo kaskāžu rezultātā, tiek radīts neuroiekaisums, neironu un sinapšu zudums, kas raksturīgs sporādiskai Alcheimera slimībai.

STZ modeļa būtība ir pētīt patofizioloģiskos mehānismus, līdzīgus Alcheimera slimībai, un pētīt dažādu zāļu vielu iedarbību [Kumat P. K. 2015].

Gamma-aminosviestskābe (*gamma-aminobutyric acid*, GABA) ir galvenais inhibējošais neurotransmiters CNS. Tas kontrolē uzbudināmības un inhibitoros procesus smadzeņu garozā un hipokampā, un ir iesaistīts informācijas pārnese procesos hipokampā. GABA receptori pēc to saistīšanās veida iedala divās grupās: jonotropie receptori - GABA<sub>A</sub>/GABA<sub>C</sub> un metabotropie jeb ar G-proteīnu

saistītie receptori - GABA<sub>B</sub>. Galvenokārt GABA<sub>A</sub> receptori spēj samazināt paaugstinātā Ca<sup>2+</sup> jonu koncentrāciju starpšūnu telpā, tā samazinot ārpusšūnas toksicitāti. Ir pierādīts, ka GABA<sub>A</sub> receptoru agonisti spēj uzlabot iemācīšanās funkciju un samazināt šūnu apoptozi. Jafari-Sabet et al. un Ding et al. pētījumos apstiprināts, ka mazas devas selektīvā GABA<sub>A</sub> agonista muscimola ievadīšana grauzējiem uzlabo stāvokļa atkarīgo (*state-dependent*) atmiņu pasīvās izvairīšanās testos. Šajos pētījumos tika izmantotas muscimola 0,025; 0,05; 0,1 mg/kg devas. Devas pie kurām tika pierādīta telpiskās atmiņas uzlabošanās, samazināta pārmērīga apoptoze un hipokampa disfunkcija bija 0,1 mg/kg un 0,5 mg/kg [Ding et.al. 2015] [Jafari-Sabet M., et al. 2013].

## 4. MATERIĀLI UN METODEDES

**Dzīvnieki:** Pētījumā izmantoti Rīgas Stradiņa Universitātes dzīvnieku audzētavas *Wistar* žurku tēviņi ar vidējo svaru  $280 \pm 20$  g. Dzīvnieki tika turēti Latvijas Universitātes Dabaszinātņu centra eksperimentālajā telpā, speciālos ventilācijas būros. Šajā telpā bija 12 stundu gaismas/tumsas cikls un uzturēta konstanta temperatūra 21 – 23 °C. Pētījumā izmantotiem dzīvniekiem bija pieejama standarta granulēta laboratorijas barība un dzeramais ūdens *ad libitum*. Visas eksperimentālās procedūras veiktas saskaņā ar direktīvām 2010/63/EU “*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes*” (2010), un tās apstiprinātas Pārtikas un veterinārā dienesta Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomē (Rīga, Latvija).

**Vielas:** Streptozocīns (STZ) un muscimols tika iegādāti no *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO, USA). STZ tika izšķīdināts mākslīgā cerebrospīnālā šķidrumā (*artificial cerebrospinal fluid*, aCSF). Muscimols tika izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā. STZ un aCSF tika vadīti i.c.v., muscimols un fizioloģiskais šķīdums – intraperitoneāli (i.p.).

**Imūnhistoķīmijā izmantotās antivielas:** Primārās antivielas: peļu pret cilvēka jonu kalcija-pievienojošo adaptera molekulu Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule*) (sc-32725, *Santa Cruz Biotechnology*, ASV), peļu monoklonālā pret tirozīna hidroksilāzes anti- peļu (T2928, *Sigma Aldrich*, ASV), monoklonālā anti- peļu pret glijas fibrilāro skābo proteīnu GFAP (G3893, *Sigma Aldrich*, ASV). Sekundārās antivielas: anti-peļu producēta kazā (B6398-3ML, *Sigma Aldrich*, ASV), biotilēta kazas anti-peļu imunoglobulīns (B6398, *Sigma Aldrich*, ASV). Terciārā anti- peļu – ekstra avidīna proksidāzes konjugāts (E8386-3ML, *Sigma Aldrich*, ASV). Krāsvielas - DAB buffer (*3,3`-diaminobenzidine*) (957D-32, *Cell Marque*, ASV), DAB hromogēns (957D-31, *Cell Marque*, ASV), hematoksilīns (SLBM9178V, *Sigma Aldrich*, ASV). Vērša seruma albumīns (BSA; *Bovine albumin serum*).

**Western blotā izmantotie reaģenti:** RIPA buferis (R0278, *Sigma Aldrich*, ASV), proteāžu inhibitoru kokteilis (P8340, *Sigma Aldrich*, ASV), nitrocelulozes membrāna ar poru izmēru 0,45 μm (N8267-5EA, *Sigma Aldrich*, ASV), TBS pagatavošanas pulveris (*Tris-Buffered Saline Powder*, T903, Takara Bio). Proteīnu denaturēšanai izmantots *Laemmli* buferis. Elektroforēzei izmantotais sadalošais gēls: gatavais gēls (Bolt 10% *Bis-Tris Plus*, NW00102BOX, *Thermo Fisher*

*Scientific, ASV*). Bloķēšanai izmantoja 5% beztauku sauso pienu (sc-2325, *Santa Cruz Biotechnology, ASV*).

**Izmantotās antivielas:** peļu monoklonālā GFAP (G3893, *Sigma Aldrich, ASV*). Sekundārās antivielas: peroksidāzes konjugēto kazas anti-truša IgG (A9169, *Sigma Aldrich, ASV*) un peroksidāzes konjugēto truša anti-peļu IgG (A9044, *Sigma Aldrich, ASV*), goat anti-mouse IgG (sc 2005, *Santa Cruz biotechnology, ASV*). Detektēšanai izmantoja luminola un ūdeņraža persoksīda reaģentu (1:1) (*Pierce Ecl Western Blotting Substrate*).

## 5. EKSPERIMENTA DIZAINS

Kopā eksperimentā tika iekļauti 60 dzīvnieki, kuri tika sadalīti vairākās grupās (6-7 dzīvnieki katrā).

No 1. - 3. dienai žurkām intraperitoneāli (i.p.) ievadīja fizioloģisko šķīdumu vai muscimolu 0,01 un 0,05 mg/kg attiecīgi.

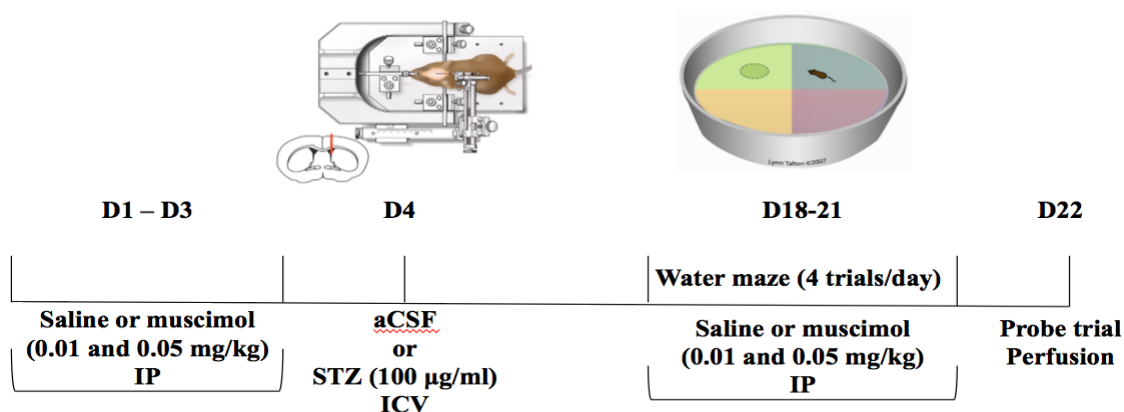
4. dienā dzīvniekam veica mākslīgā cerebrospinālā šķidruma (*artificial cerebrospinal fluid* jeb aCSF) vai streptozocīna intracerebrovaskulāru (i.c.v.) injekciju 100 µg/ml.

18. - 21. dienā tika veikti ūdens labirinta (*Morris water maze*) testi (4 testi dienā) un fizioloģiskā šķīduma vai muscimola i.p. injekcijas 0,01 un 0,05 mg/kg attiecīgi.

22. dienā Smadzeņu izdalīšana un sasaldēšana pie -80°C (*11. attēls*).

Eksperimentā bija šādas grupas:

1. fizioloģiskais šķīdums - aCSF (kontroles grupa);
1. fizioloģiskais šķīdums - STZ (bojājuma grupa);
2. muscimols 0,01 mg/kg - aCSF (M0,01-aCSF);
3. muscimols 0,01 mg/kg - STZ (M0,01-STZ);
4. muscimols 0,05 mg/kg - aCSF (M0,05-aCSF);
5. muscimols 0,05 mg/kg - STZ (M0,05-STZ).



*11. attēls.* Eksperimenta dizains

## 5.1. Ūdens labirina tests (*Morris Water maze*)

Divas nedēļas pēc intracerebroventrikulāras (i.c.v.) vielu ievadīšanas žurkas trenēja ūdens labirinta testā piecas dienas, katru dienu pa 2 minūtēm. Ūdens baseins (*Ugo Basile*; IT) sastāvēja no vannas (d = 180 cm un augstums 75 cm) ar tajā ievietotu caurspīdīgu apaļu plastmasas platformu (d = 10 cm un augstums 30 cm) un savienotu ar ūdens pievades/izvades sistēmu.

Visi treniņi tika reģistrēti ar videokameru, izmantojot *EthoVision XT9* novērošanas sistēmu (*Noldus Information Technology*, NL). Ūdens baseins tika uzpildīts ar ūdeni ( $21 \pm 3^\circ\text{C}$ ) aptuveni 32 cm augstumā jeb tā, lai platforma atrastos 1 - 2 cm zem ūdens līmeņa. Izmantojot tumši brūnu pārtikas krāsvielu (*Gemoss*, LV), ūdens tika iekrāsots, lai dzīvnieks kontrastētu ar ūdeni pēc iespējas vairāk un tādējādi videonovērošanas iekārta pēc iespējas labāk noteiktu tā kustības. Ūdens baseins tika sadalīts četros kvadrantos (I-IV), un platforma ielikta vienā no tiem. Katram dzīvniekam tika doti četri mēģinājumi dienā; katrā no tiem dzīvnieks uzsāka mēģinājumu no cita kvadranta randomizētā secībā ar seju pret baseina sienu.

Žurkām vajadzēja atrast platformu un uzrāpties uz tās 2 minūšu laikā, paliekot tur vismaz 15 sekundes. Ja dzīvnieks nespēja to izdarīt, viņu maigi novirzīja platformas virzienā un ļāva uz tās atrasties nepieciešamo laika periodu. Ar videonovērošanas programmu tika reģistrēts laiks līdz platformas atrašanai un kustību dinamika. Treniņi notika četras dienas pēc kārtas laika posmā no 09:00 līdz 15:00.

Piektajā dienā tika veikts gala tests, kurā platforma tika izņemta no baseina un dzīvniekam bija iespēja peldēt 2 minūtes, reģistrējot, cik reizes tika šķērsota zona, kur iepriekš tika iegremdēta platforma.

## 5.2. *Western blot* analīze

Tika pārbaudīta Iba-1, GFAP proteīnu ekspresija.

### 5.2.1. Smadzeņu audu sagatavošana *Western blot* analīzei

No sasaldētā hipokampa izdalīja proteīnu, homogenizējot īsu brīdi homogenizatorā kopā ar ekstrakcijas buferi RIPA ar proteāžu inhibitoru kokteili

atšķaidījumā 1:10. Izdalītajam proteīnam nomērīja koncentrāciju ar BCA metodi, lai aprēķinātu katram paraugam nepieciešamo tilpumu, lai gēlā ievadītā parauga koncentrācija būtu 50 µg. Paraugus sajauc 1:1 ar *Laemml* buferi, un termiski denaturēja 95°C 5 minūtes. Pēc tam tos atdzesēja, turot uz ledus.

### 5.2.2. Gēla elektroforēze un pussausā pārnese

No totālā proteīna paraugos, sadalīja pēc to izmēriem 15% poliakrilamīda gēla elektroforēzē pie sprieguma 100 - 140 V aptuveni 2h. Lai detektētu pētāmo proteīnu, pievienoja proteīnu molekulārā svara standartu vienā no gēla bedrītēm. Proteīnus no gēla tālāk pārnese uz nitrocelulozes membrānas pussausās pārnese aparātā 1h, izmantojot vēlreiz elektroforēzes principu. Iestatīja strāvas stiprumu, kas ir vienāds ar membrānas laukumu.

### 5.2.3. Inkubēšana ar primāro antivielu

Pirms inkubēšanas ar primāro antivielu, membrānu bloķē ar 5% beztauku sauso pienu ar 0,05% *Tween-20* TBS bufera 4°C uz diennakti, lai izvairītos no nespecifisku antivielu piesaistīšanās.

Primāro antivielu atšķaida ar 5% beztauku sauso pienu TBS-T (*Tris-Buffered Saline and Tween 20*) šķīdumā. Ļauj membrānām inkubēties 24h 4°C temperatūrā. Pēc 24h membrānas skalo 3x 5min ar TBS-T buferi. Membrānas liek inkubēties sekundārajā antiviēlā 1h istabas temperatūrā. Pēc tam mazgā membrānas 3x 5min ar TBS-T buferi.

### 5.2.4. Detektēšana un attēlu analizēšana

Detektēja izmantojot luminola un ūdeņraža persoksīda reaģentu (istabas temperatūrā). Uz membrānas uzpilināja detektēšanas reaģentu (luminola un ūdeņraža peroksīda šķīdumu attiecība 1:1) un membrānu ievietoja UVP, un uzstādīja laiku 15 sek, 1 min, 2 min un pie vāja signāla 10 min.

Pēc UVP instruktāžas iestatīja kameru. Attēlus analizēja ar *ImageJ* programmu, tika aprēķināta relatīvā intensitāte, un pārbaudīta statistika, izmantojot *GraphPad Prism* programmu.

### 5.3. Imunofluorescence

Imunohistoķīmiski tika pārbaudīti Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*), GFAP (*glial fibrillary acid protein*), un TH (*tyrosine hydroxylase*) marķieri.

#### 5.3.1. Paraugu sagatavošana

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

#### 5.3.2. Antivielu imunohistoķīmiskā analīze

Audus skalo ar PBS-T buferi (aptuveni 20 ml uz vienu trauciņu) 3x 5min. Audus balina ar 0,5% ūdeņraža peroksīdu 30 min istabas t° uz kratītāja.

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

Lai atsegtu specifiskās antivielu saistīšanās vietas un uzlabotu paraugu iekrāsošanas kvalitāti, paraugus karsē 85°C ūdens vannā citrāta bufera šķīdumā (pH 6) 20 - 30min. Tad istabas temperatūrā 20 min atdzesē (attiecas tikai uz Iba-1 antivielu).

Inkubē ar primāro antivielu, ar atšķaidījumu 1:500, uz kratītāja (*Biosan PSU-10i*) istabas temperatūrā 90 min.

Skalo ar 0,1% *PBS-Triton* buferi (aptuveni 20 ml) 3 x 5min. Inkubē ar sekundāro antivielu, attiecībā 1:500, uz kratītāja istabas temperatūrā 90 min.

Skalo ar 0,1% *PBS-Triton* buferi (aptuveni 20 ml) 3 x 5min. Inkubē ar terciāro antivielu, attiecībā 1:1000, uz kratītāja istabas temperatūrā 90 min.

Skalo ar 0,1% *PBS-Triton* buferi (aptuveni 20 ml) 3 x 5min.

Veic paraugu krāsošanu vispirms ar 3,3'-diaminobenzidīnu (DAB), ņemot 15 ml DAB bufera, kam pievieno 15 pilienus DAB hromogēnā maisījuma. To dara ļoti uzmanīgi, izmantojot cimdus un sejas masku, jo DAB ir kancerogēns.

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

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

Paraugus vairākkārtīgi skalo 0,05 M nātrija fosfāta buferī.

Paraugus liek uz priekšmetstikliņiem un liek žāvēties 37°C uz diennakti (uz katra priekšmetstikliņa novieto 3 paraugus).

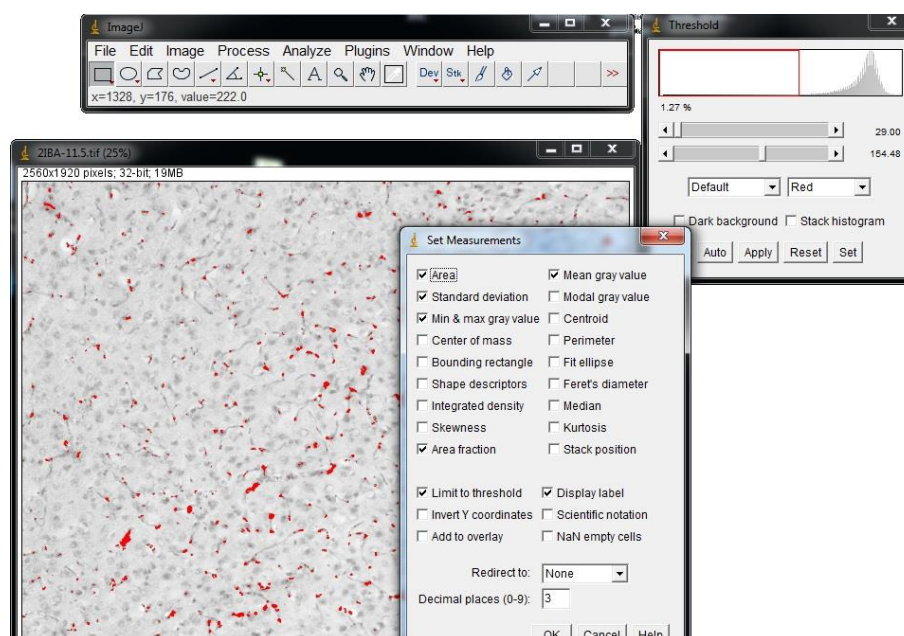
Katram marķierim tika piemērots visprecīzākais imunohistoķīmiskās analīzes protokola veids, lai pēc iespējas uzlabotu interpretējamo rezultātu precizitāti un ticamību. Katram marķierim tika veikta arī negatīvā kontrole, lai pārliecinātos, ka eksperiments tika veikts precīzi un primārā antivielā ir specifiska.

#### **5.4. Mikroskopēšana un attēlu uzņemšana**

Attēli tika uzņemti, izmantojot mikroskopu *Nikon Eclipse Ti NIS-Elements* programmas versiju 13.0. Priekšmetstikliņi tika šifrēti pie bildēšanas un visiem tika izmantots vienāds apgaismojums un kameras iestatījumi. Garozas attēli tika uzņemti ar 100x palielinājumu, bet hipokampa attēli ar 200x palielinājumu. Attēli tika analizēti, izmantojot *Image J* programmu.

## 6. DATU ANALĪZE

Imūnhistoķīmijā iegūtie attēli tika analizēti, izmantojot bezmaksas brīvi pieejamu un plaši izmantotu programmu *Image J*. Visi attēli tika pārveidoti uz 32-bit, tika piemērots krāsas intensitātes sliekšnis (*threshold*), kas starp attēliem drīkstēja tikt mainīts 10 iedaļu robežās. Tika uzstādīti mērījumu parametri: laukums (*area*), standartnovirze (*standard deviation*), laukuma procenti (*area fraction*), min & max vērtības un vidējā vērtība (*12. attēls*). Iegūtie mērījumi tika sašķiroti pa grupām programmā *MS Office Excel 2010*. Dati tika analizēti, izmantojot ANOVA (*GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software Inc, ASV*) Bartleta testu. Par statistiski ticamiem tika uzskatīti dati, kuru  $p$  vērtība bija mazāka par 0,05 ( $p < 0,05$ ).



12. attēls. *Image J* attēla apstrādes piemērs

## 7. REZULTĀTI

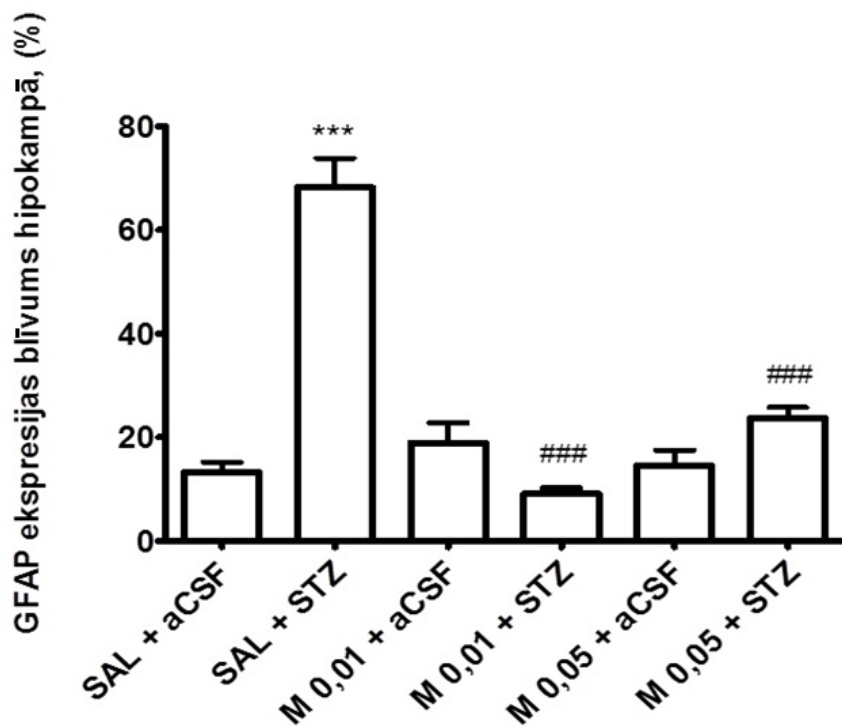
Šajā darbā STZ izraisītajā Alcheimera modelī žurkām un ar IP ievadītu selektīvu GABA<sub>A</sub> agonistu muscimola terapiju ļoti mazās devās 0,05 un 0,01 mg/kg devās mūs interesēja noteikt *ex vivo* žurku smadzenēs vairāku proteīnu ekspresijas hipokampā un garozā. Iekaisuma reakcijas noteikšanai tika noteikts astroglijas GFAP un mikroglijas Iba-1, savukārt, lai noskaidrotu par dopamīnerģiskās sistēmas aktivāciju, mēs noteicām dopamīna producēšanā noteicošo enzīmu tirozīna hidroksilāzes (TH) ekspresiju. Izmantotās metodes: imūnhistoķīmija un *Western blot* GFAP gadījumā.

Imūnhistoķīmijas analīzes laikā tika ievēroti visi precizitātes priekšnosacījumi - tika ievērota personīgā un vīrsmu higiēna, buferšķīdumu uzglabāšanas nosacījumi, antivielu uzglabāšanas nosacījumi, tika veikta negatīvā kontrole visām antivielām, lai novērstu nespecifisku antivielu saistīšanos ar proteīnu. Eksperimenti ar paraugiem tika veikti vairākkārt, lai pārlicinātos par rezultātu patiesumu.

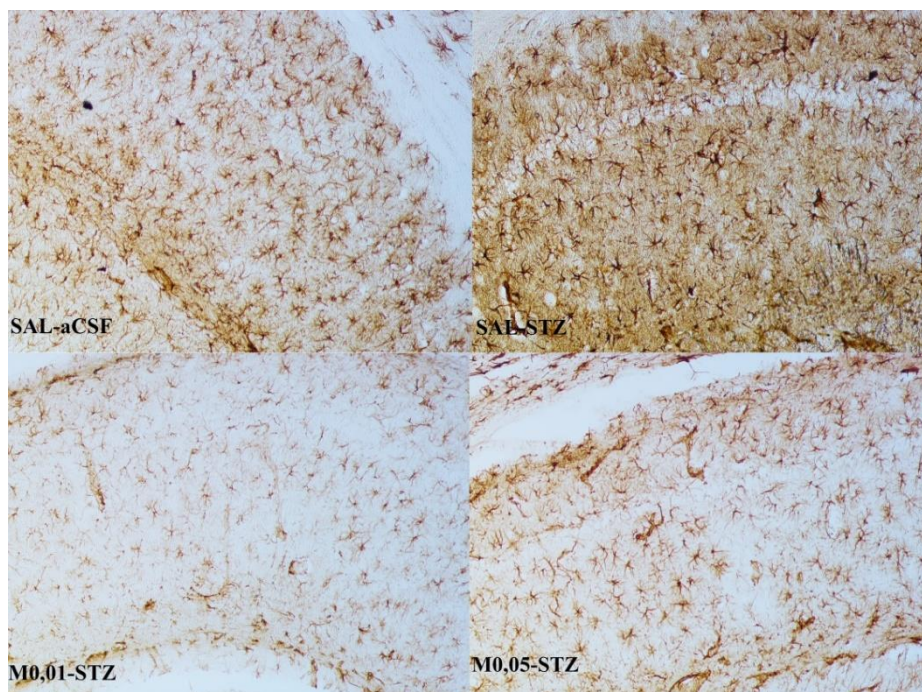
Iba-1 rezultāti tika publicēti un aizstāvēti RSU Starptautiskajā studentu konferencē 2016. gada 16. martā.

### **7.1. Muscimola efekts uz astrogliju un uz mikrogliju Alcheimera STZ modelī žurkām garozā un hipokampā**

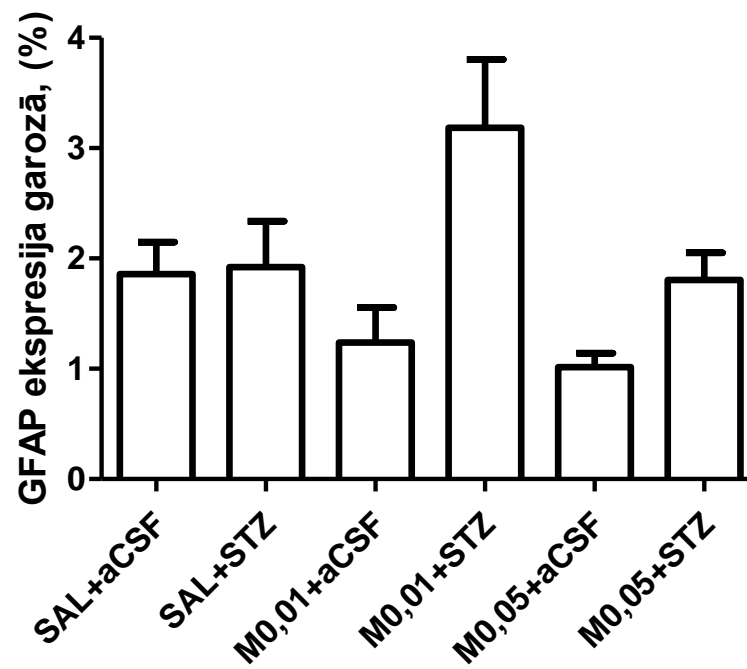
STZ manāmi palielināja astrocītu aktivāciju, ko varēja novērot ar izteiktu GFAP ekspresijas pieaugumu hipokampā. Imūnhistoķīmiskā analīze uzrādīja, ka muscimols mazās devās (0,01 un 0,05 mg/kg) samazināja GFAP ekspresiju hipokampā, salīdzinot ar STZ grupu, kur bija aktivēta astroglija.



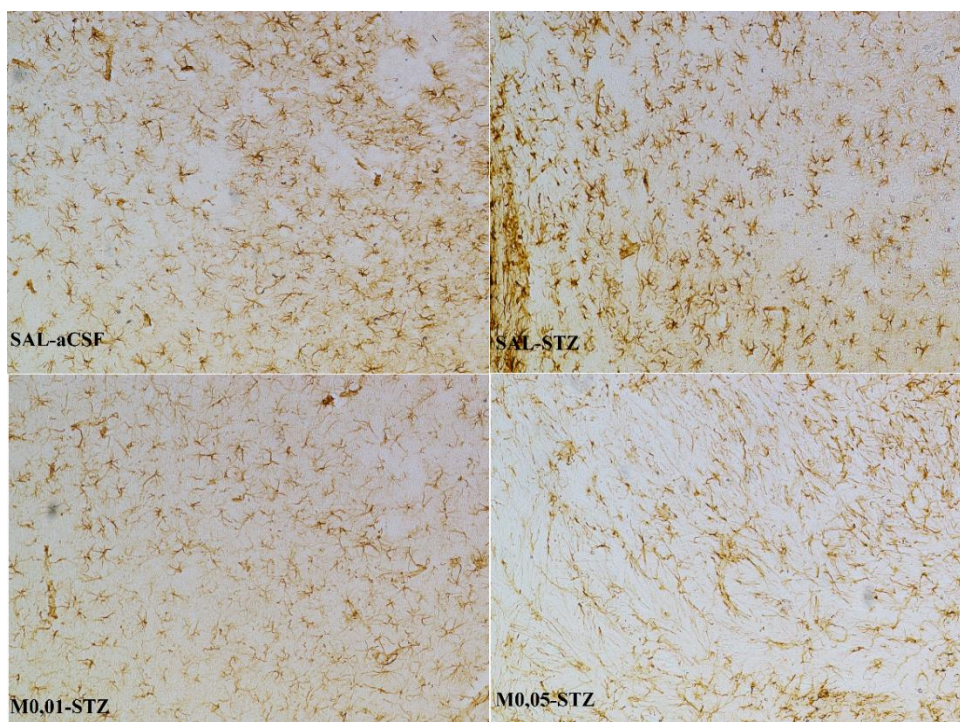
13. attēls. GFAP biomarķiera ekspresijas izmaiņas hipokampā starp grupām (SAL-STZ vs. SAL-aCSF \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; M0,01-STZ, M0,05-STZ vs. SAL-STZ ###  $p \leq 0,001$ )



14. attēls. GFAP ekspresijas izmaiņas hipokampā. Redzams, ka kontroles grupā (Sal-aCSF) astroglijas ekspresija ir mazāk izteikta nekā modeļa grupā (Sal-STZ), kas norāda uz streptozocīna spēju radīt neuroiekaisumu hipokampā. Muscimola protektīvā darbība novērojama pie 0,01 mg/kg devas. Izmantotais palielinājums attēliem 200x

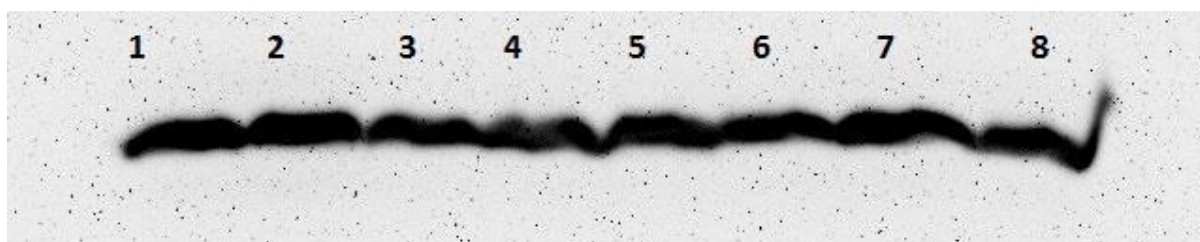


15. attēls. GFAP ekspresijas izmaiņas garozā. Nav novērojamas statistiski nozīmīgas izmaiņas starp grupām.



**16. attēls.** GFAP ekspresija garozā no grupām: Sal-aCSF, Sal-STZ, M0,01-STZ, M0,05-STZ. Attēli iegūti, izmantojot palielinājumu 100x

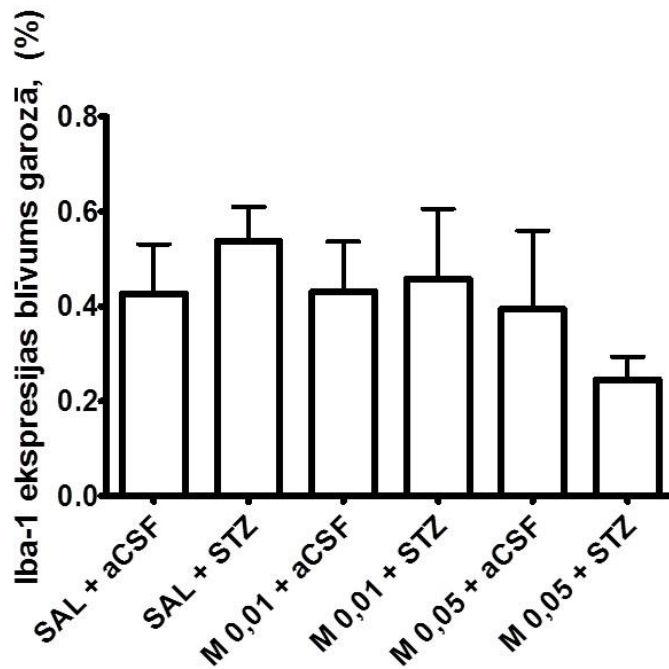
*Western Blot* analīzei paraugu hipokampi tika homogenizēti un izmantoti 50  $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$  no katra parauga. GFAP biomarkiera ekspresijas izmaiņas hipokampā starp grupām netika novērotas (17. attēls). Lai precīzi noteiktu šī marķiera ekspresijas izmaiņas hipokampā lokāli, precīzāk tomēr izrādījās imunohistoķīmiskā analīze. *Western blot*ā, homogenizējot visu struktūru, mana atšķirības, ja tās ir tiešām ļoti izteiktas.



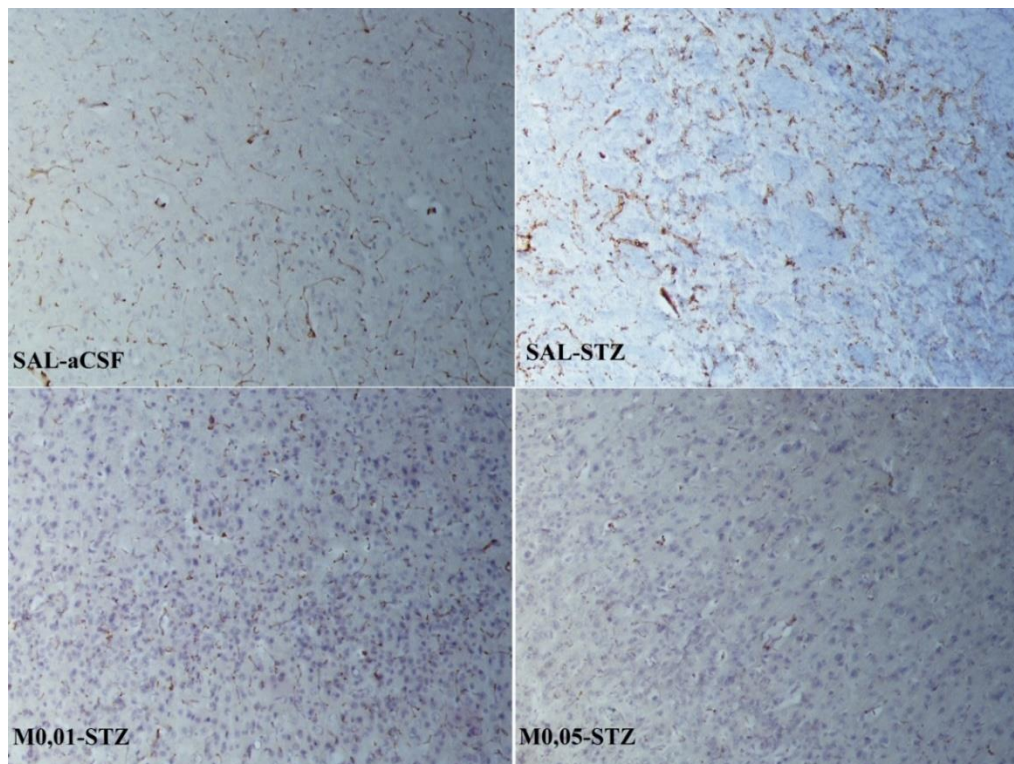
**17. attēls.** GFAP biomarkiera ekspresija hipokampā, izmantojot *Western Blot* metodi. Tika izmantoti sekojoši smadzeņu paraugi: 1) Sal-aCSF; 2) M0,01-aCSF; 3) M0,05-aCSF; 4) Sal-STZ; 5) M0,01-STZ; 6) M0,05-STZ; 7) Sal-aCSF; 8) M0,01-aCSF

## 7.2. Iba-1 ekspresijas izmaiņas žurku smadzeņu garozā un hipokampā

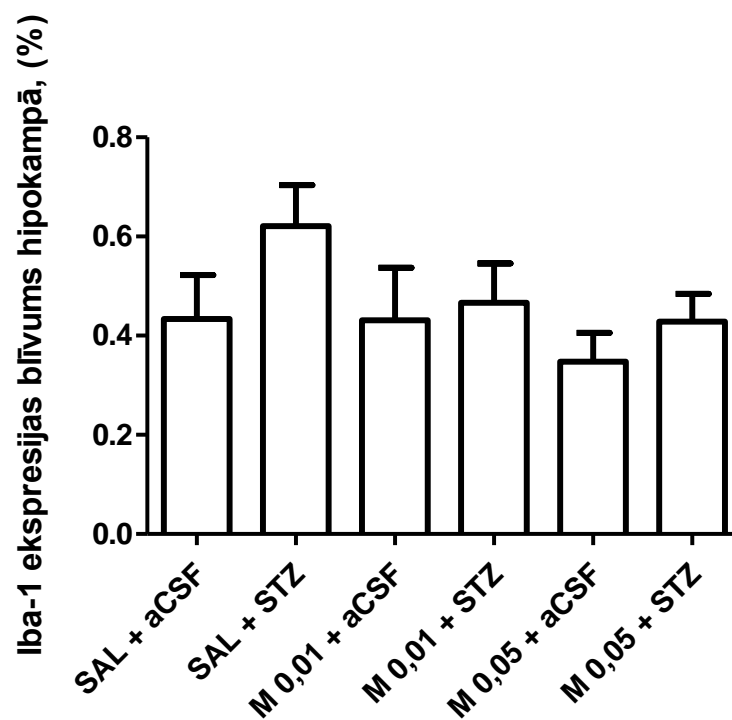
Iba-1 rezultāti tika iegūti, izmantojot arī vienkāršu šūnu skaitīšanas metodi – randomizēti izvēloties 5 reģionus struktūrā un uzskaitot iekrāsotās šūnas. Ar *ImageJ* programmu neizdevās iegūt atšķirības starp grupām, jo iespējams tumšais fons neļāva datorprogrammai atpazīt precīzi mikroglijas šūnas.



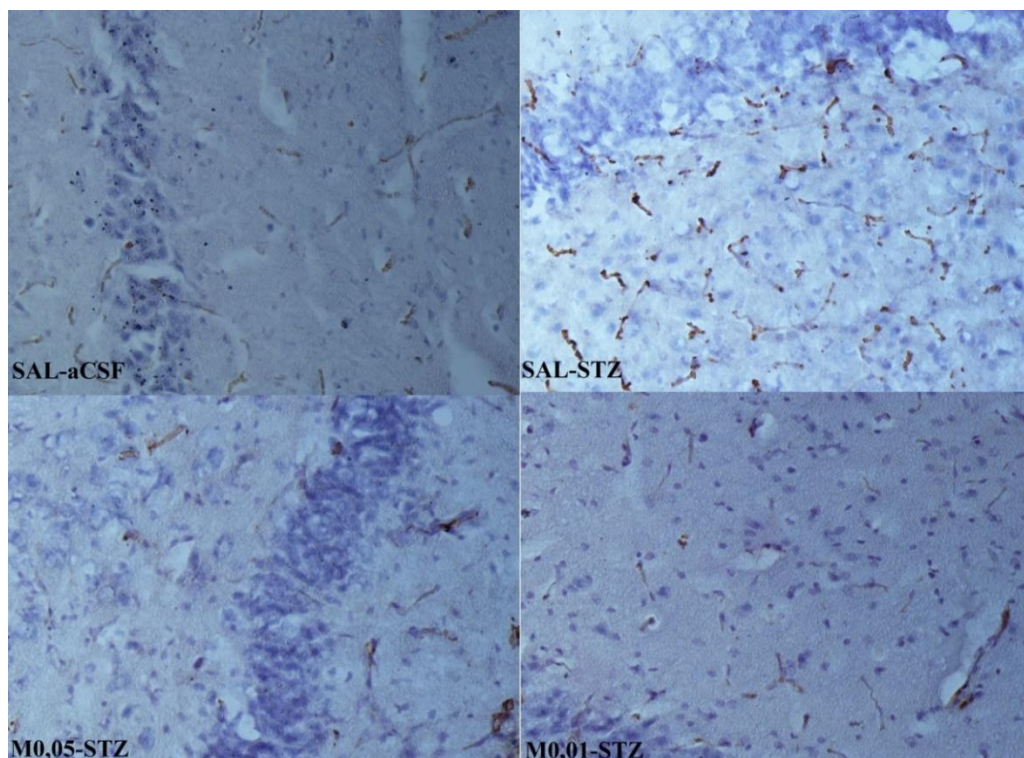
18. attēls. Iba-1 ekspresijas izmaiņas garozā. Nav novērojama statistiski nozīmīga atšķirība starp grupām



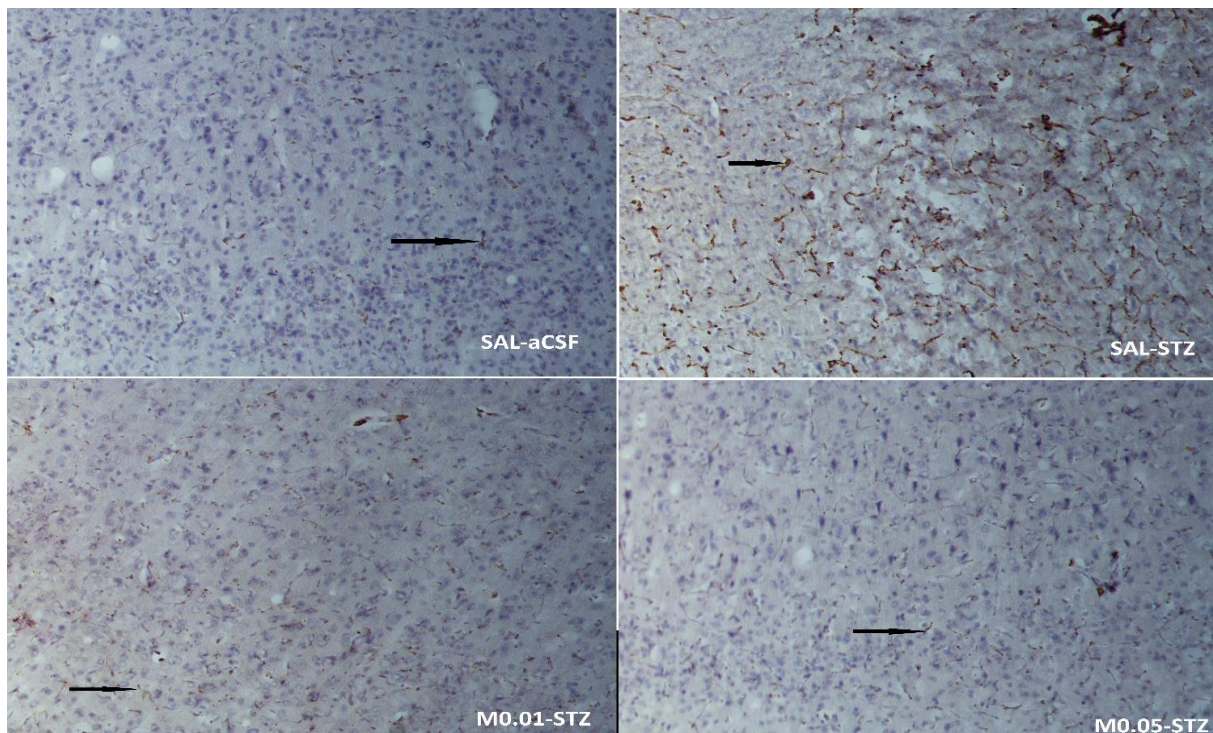
19. attēls. Iba-1 ekspresijas izmaiņas garozā no grupām: Sal-aCSF, Sal-STZ, M0,01-STZ, M0,05-STZ. Attēli iegūti, izmantojot palielinājumu 100x



20. attēls. Iba-1 ekspresijas izmaiņas hipokampā. Nav novērojamas statistiski nozīmīgas izmaiņas starp grupām

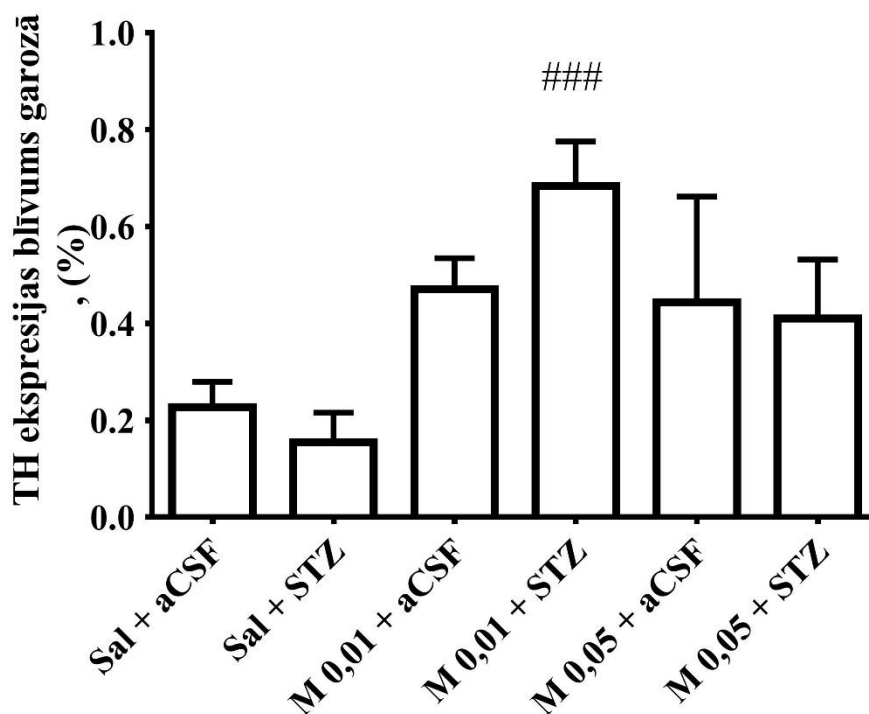


**21. attēls.** Iba-1 ekspresijas izmaiņas hipokampā no grupām: Sal-aCSF, Sal-STZ, M0,5-STZ, M0,01-STZ. Attēli iegūti, izmantojot palielinājumu 200x

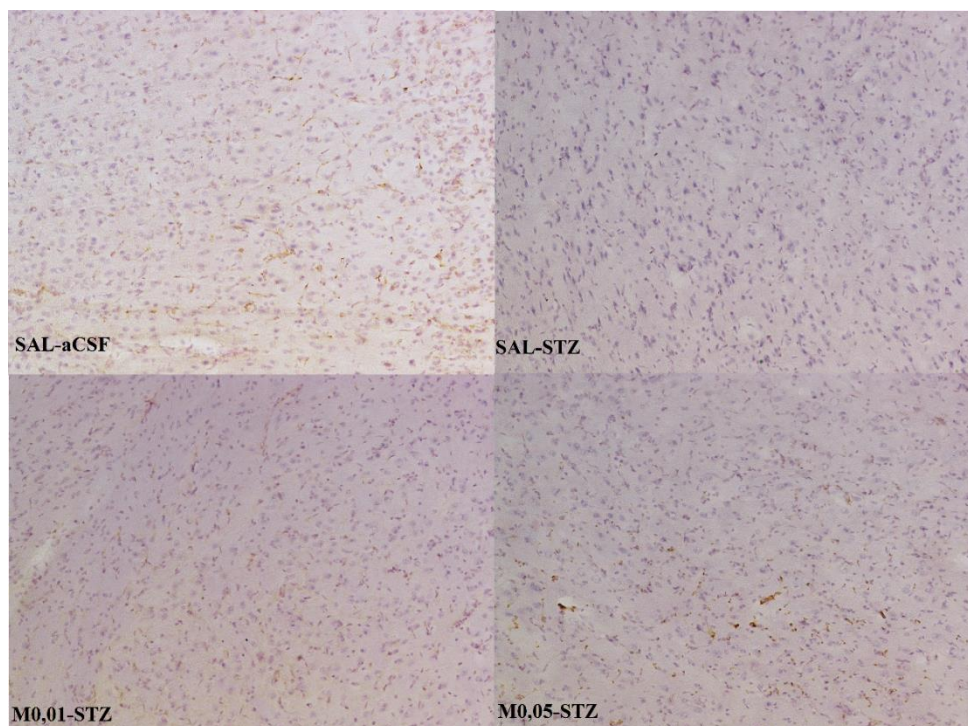


**22. attēls.** Iba-1 ekspresijas izmaiņas hipokampā. Ar melnajām bultiņām apzīmēti interesējošās šūnas. Novērojama izteikta Iba-1 ekspresija slimības kontroles grupā, kas liecina par izdevušos modeli.. Iekrāsošana veikta ar DAB un hematoksolīnu. Attēli iegūti, izmantojot palielinājumu 200x

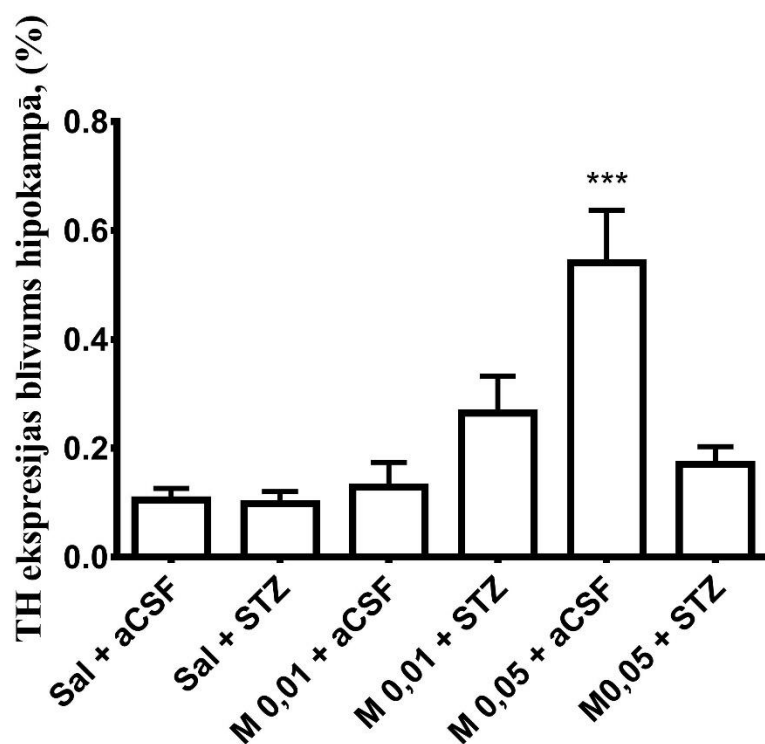
### 7.3. TH ekspresijas izmaiņas



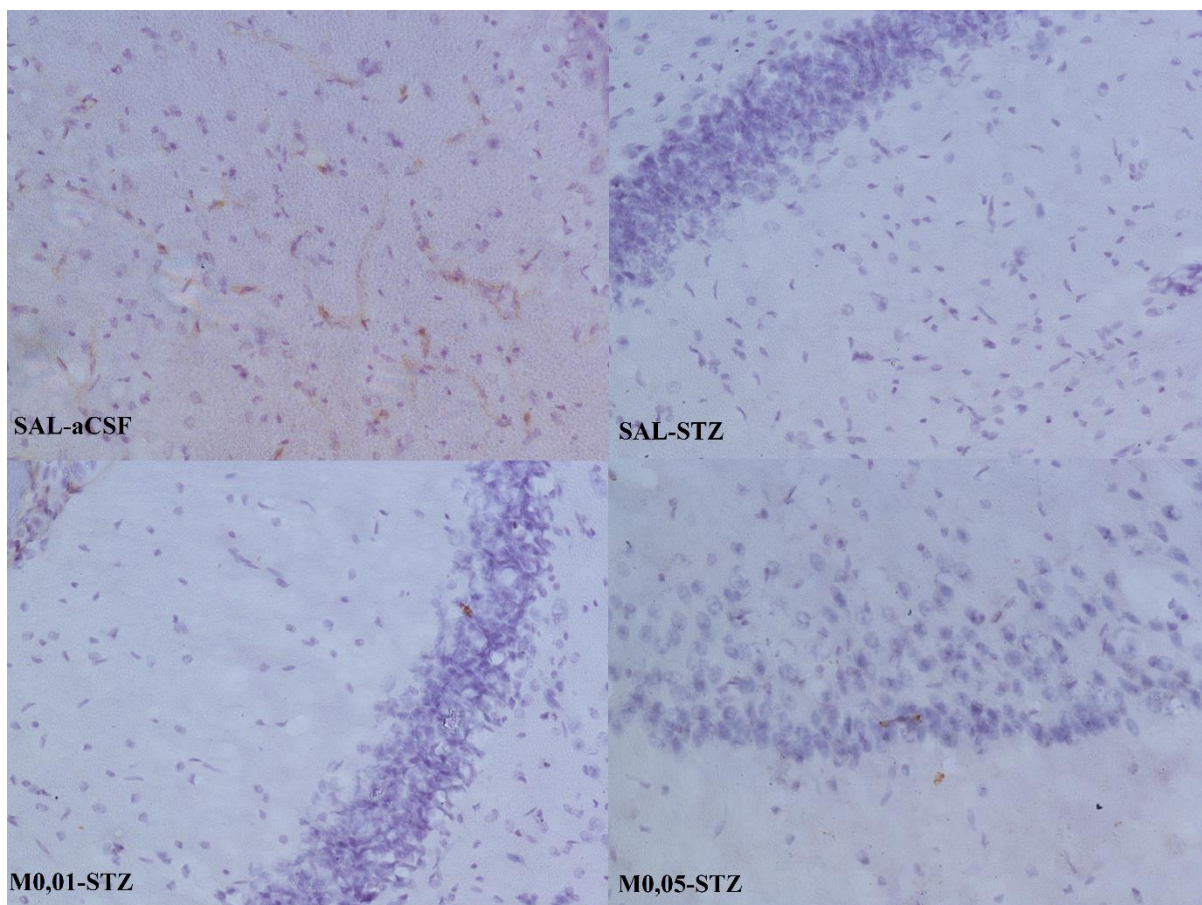
23. attēls. TH ekspresijas izmaiņas garozā. Redzams, ka kontrolēs grupā un modeļa kontrolēs grupā tirozīna hidroksilāze ir maz ekspresēta, kas liecina par dopamīnērgiskās sistēmas disbalansu. Statistiski nozīmīgas izmaiņas novērojamas M0,01-STZ grupā (M0,01-STZ vs. SAL-STZ  $p \leq 0,001$ ), kas norāda uz ļoti mazās muscimola devas (0,01 mg/kg) spēju atjaunot dopamīnērgiskās sistēmas aktivitāti



24. attēls. TH ekspresijas izmaiņas garozā no grupām: Sal-aCSF, Sal-STZ, M0,01-STZ, M0,05-STZ. Attēli iegūti, izmantojot palielinājumu 100x



25. attēls. TH ekspresijas izmaiņas hipokampā. Novērojama augoša tendence muscimola grupās, ar statistiski nozīmīgu izmaiņu M0,05-aCSF grupā (M0,05-aCSF vs. SAL-STZ un SAL-aCSF  $p \leq 0,001$ )



**26. attēls.** TH ekspresijas izmaiņas hipokampā no grupām: Sal-aCSF, Sal-STZ, M0,01-STZ, M0,05-STZ. Attēli iegūti, izmantojot palielinājumu 200x

## 8. DISKUSIJA

Šobrīd klīnikā pieejamie medikamenti pret Alzheimeru slimību nevar apturēt slimības attīstību, kā arī ne visiem pacientiem šie medikamenti ir piemēroti. Piemēram, NMDA receptoru antagonists memantīns tiek izmantots vidējas un smagas Alzheimeru slimības simptomātiskai terapijai, bet ilgtermiņā tas neuzrāda atmiņas uzlabošanu, izraisa nopietnas blaknes un dažādus uzvedības traucējumus, ieskaitot psihozi [Schneider L.S., et al. 2013].

Iepriekšējos pētījumos ir pierādīts, ka GABA receptoru aktivācija varētu novērst neuroiekaisuma sekas smadzenēs uzlabot Alzheimeru pacientu dzīves kvalitāti un dzīvildzi kopumā [Lima-Paula A., et al. 2005]. Viens no GABA receptoru agonistiem, kas tiek izmantots šāda veida pētījumiem, ir GABA<sub>A</sub> agonists muscimols. Iepriekšējos pētījumos muscimols ir ticis ievadīts i.p., Broca diagonālajā joslā (*diagonal band of Broca*), retrospleniālajā garozā (*retrosplenial cortex*, RSC), kā arī uz smadzeņu šūnām *in vitro* [Farber et al. 2003], [Ding et al. 2015]. Neatkarīgi no injekcijas veida un slimības modeļa, būtiski ir noskaidrot neuroiekaisuma molekulu ekspresiju dažādos smadzeņu reģionos, kas varētu liecināt par bojājumiem kādā no sistēmām un, kas tālāk varētu kalpot kā diagnostikas metode.

Tika analizētas 6 grupas: Sal-aCSF, Sal-STZ, M0,01-aCSF, M0,01-STZ, M0,05-aCSF, M0,05-STZ. GFAP ekspresija garozā (SAL-STZ vs. SAL-aCSF \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; M0,01-STZ, M0,05-STZ vs. SAL-STZ ####  $p \leq 0,001$ ), kur M0,01-STZ grupā ievērojami samazinājusies astroglioze, salīdzinot ar Sal-STZ grupu. Jau iepriekš ir ziņots par GABA-agonistu spēju daļēji atjaunot neironālo funkciju. Intraventrikulāri ievadīts muscimols spēj atjaunot melnās vielas (*Substantia nigra*) neironu funkciju un samazināt astrocītu hiperfunkciju (izmantojot GFAP marķieri) pēc bazālo gangliju bojājumiem [Dihne M. 2001]. GFAP marķiera analīze tika veikta, izmantojot arī *Western Blot* metodi. GFAP marķiera ekspresija hipokampā starp grupām (Sal-aCSF; M0,01-aCSF; M0,05-aCSF; Sal-STZ; M0,01-STZ; M0,05-STZ; Sal-aCSF; M0,01-aCSF) netika novērota, jo visi paraugi iepriekš tika homogenizēti un tāpēc, iespējams, nespēja uzrādīt izmaiņas.

Iba-1 marķiera ekspresijas noteikšana pieprasīja veikt paraugu sildīšanu 80-95 °C ūdens peldē. Iba-1 protokols tika uzlabots un pilnveidots visa eksperimenta laikā un secinājām, ka precīzākai proteīnu iekrāsošanai nepieciešams veikt paraugu

karsēšanu ūdens vannā, audiem atrodies citrāta buferšķīdumā (pH 6), kā arī veikt audu balināšanu ar 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un bloķēšanu ar 5% BSA PBS buferī ar Tritonu-100 .

Arī hronisks stress dzīvniekiem izraisa mikroglijas šūnu aktivāciju un iekaisuma šūnu atbrīvošanos [Ghosh S., et al. 2015], tāpēc jānodrošina eksperimenta dzīvnieku maksimāla labsajūta visu eksperimenta laiku (pareiza 12h apgaismojuma kontrole, gaisa temperatūra, nomierināšana cilvēka rokās pirms procedūrām utt.), lai izvairītos no hroniska stresa izraisīta neuroiekaisuma.

TH marķiera M0,01-STZ grupā (M0,01-STZ vs. SAL-STZ  $p \leq 0,001$ ), kas norāda uz ļoti mazās muscimola devas (0,01 mg/kg) spēju atjaunot dopamīnerģiskās sistēmas aktivitāti smadzeņu garozā, statistiski nozīmīgas izmaiņas starp grupām netika novērotas hipokampā. Dopamīnerģiskās sistēmas neironu projekcijas stiepjas līdz amigdalai, *nucleus accumbens*, mediālajai pieres garozai un hipokampam, un zināms, ka šīs smadzeņu daļas atbild par emocionālo atmiņu, uzvedību, bailēm un kompensatoro funkciju. Dopamīnerģiskās sistēmas neiromediatoru disbalansa gadījumā, ir novērojama neadekvāta, agresīva uzvedība, atmiņas traucējumi un pastiprināta baiļu sajūta [Alvarsson A. 2016]. Dzīvniekam no muscimola-STZ pētījuma tika novēroti uzvedības traucējumi un pastiprināta agresija pret citiem dzīvniekiem, kas rezultējās ar eksperimentā iesaistītā dzīvnieka nāvi. TH ekspresijas izmaiņas noteikti vajadzētu salīdzināt ar eksperimenta dzīvnieku uzvedības testiem, lai pārliecinoši norādītu uz izmaiņām dopamīnerģiskajā sistēmā.

Kopumā rezultāti uzrādīja, ka ļoti mazas devas (0,05 un 0,01 mg/kg) GABA<sub>A</sub> agonista muscimola, samazina neuroiekaisuma pazīmes smadzeņu garozā un hipokampā, samazinot astrogliozu un muscimols mazās devās spēj atjaunot dopamīnerģiskās sistēmas aktivitāti.

## 9. SECINĀJUMI

- 1) Streptozocīnam piemīt spēja izraisīt neuroiekaisumu, kas pierāda, ka šī metode der kā Alcheimera slimības modelis dzīvniekiem.
- 2) Muscimols ļoti mazās devās (0,01 un 0,05 mg/kg) spēj samazināt GFAP ekspresiju (astrocītu hiperaktivāciju) hipokampā.
- 3) Iba-1 marķiera ekspresijas noteikšanai precīzākais protokols ir iekļaujot paraugu karsēšanu ūdens peldē 80-95 °C, paraugiem esot citrāta buferī (pH 6), iekļaujot paraugu balināšanu ar 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un bloķēšanu 5 % BSA-PBS-T.
- 4) Muscimols normalizēja TH ekspresijas līmeni M0,01-STZ grupā garozā, kas liecina par tā spēju atjaunot dopamīnērgiskās sistēmas balansu.
- 5) Pētījums kopumā norāda uz GABA<sub>a</sub> agonista muscimola spēju ļoti mazās devās uzlabot rezultātus telpiskās atmiņas testos un samazināt STZ ierosināto neuroiekaisumu.

## **Pateicības**

Vislielākā pateicība manai darba vadītājai Dr. pharm. Ulrikai Beitnerei par patieso atbalstu darba tapšanā, par imunohistoķīmijas un *Western Blot* metožu apgūšanu un iedvesmošanu. Patiess paldies Mag. pharm. Vladimiram Piļipenko par palīdzību rezultātu sagatavošanā un imunohistoķīmiskās analīzes veikšanā.

## Literatūras saraksts

1. **Ahn S. M., et al.** Human microglial cells synthesize albumin in brain. *PloS ONE* 2008, 3(7): e2829.
2. **Alcaro A., Huber R., Panksepp J.** Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. *Brain Res.Rev.* 2008, 56(2): 283-321.
3. **Alvarsson A., Caudal D., et al.** Emotional memory impairments induced by AAV-mediated overexpression of human  $\alpha$ -synuclein in dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *Behavioral Brain Research* 2016, 296: 129-133.
4. Alzheimer`s Association Report. Alzheimer`s disease facts and figures. *Alzheimer`s & Dementia* 2015, 11(3): 332-384.
5. **Avila J., Insausti R., Del Rio J.** Memory and Neurogenesis in Aging and Alzheimer`s Disease. *Aging Dis.* 2010 Aug; 1(1), 30-36.
6. **Barbagallo M., Dominguez J. L.** Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer`s disease. *World J. Diabetes* 2015 Dec., 5(6): 889-893.
7. **Castano E. M., Roher A. E., et al.** Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer`s disease and non-demented elderly subjects. *Neurol.Res.* 2006, 28: 155-163.
8. **Cheng G., Huang C., Deng H., Wang H.** Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Internal Medicine Journal* 2012, 42(5): 484-491.
9. **Costa M., Ortiz A. M. et al.** Therapeutic albumin binding to remove amyloid- $\beta$ . *Journal of Alzheimer`s Disease*, 2012; 29(1):159-170.
10. **Dihne M., Block F., et al.** Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury. *Brain Research* 2001, 902 (2): 178-189.
11. **Ding Y., Xie L., et al.** Activation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (A) Receptor protects hippocampus from intense exercise-induced synapses damage and apoptosis un rats. *Chinese medical journal* 2015, 128 (17): 2330-2339.
12. **Esclapez M., Tillakaratne N. J. K. et al.** Comparative Localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *The Journal of Neurosciences*, 1994, 14 (3): 1834-1855.

13. **Esmailzade B., Joghataei T. M., Nobakht M. et al.** Delivery of Epidermal Neural Crest Stem Cells (EPI-NCSC) to hippocampus in Alzheimer`s Disease Rat Model. *Iran Biomed J.* 2012 Jan; 16 (1), 1-9.
14. **Farber N. B., Jiang X., et al.** Muscimol prevents NMDA antagonist neurotoxicity by activating GABA<sub>A</sub> receptors in several brain regions. *Brain Research* 2003, 993: 90-100.
15. **Ghosh S., Geahlen R. L.** Stress granules modulate SYK to cause microglial cell dysfunction in Alzheimer`s disease. *EbioMedicine* 2015, 2 (11): 1785-1798.
16. **Gojal S. N., Reddy N. M., et al.** Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes- A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico-Biological Interactions* 2016, 255: 49-63.
17. **Graham M. L., Janecek J. L., et al.** The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med* 2011; 61(4): 356-360.
18. **Han S. H., Park J. C., et al.** Amyloid  $\beta$ - interacting partners in Alzheimer`s disease: From accomplices to possible therapeutic targets. *Progress in Neurobiology* 2016, 137: 17-38.
19. **Hansson S. F., Andreasson U., et al.** Reduced levels of amyloid-beta-binding proteins in cerebrospinal fluid from Alzheimer`s disease patients. *J.Alzheimer`s Dis.:JAD* 2009, 16: 389-397.
20. **Hwag J., Mi Kim C., et al.** Prediction of Alzheimer`s disease pathophysiology based on cortical thickness patterns. *Alzheimer`s & Dementia* 2015 Dec, 1-10.
21. **Jessen F., Wolfsgruber S., Wiese B. et al.** Alzheimer`s disease dementia risk in late MCI, in early MCI, and in subjective memory impairment. *Alzheimer`s & Dementia* 2014, 10(1): 76 - 83.
22. **Karami A., Eyjolfsdottir H., et al.** Changes in CSF cholinergic biomarkers in response to cell therapy with NGF in patients with Alzheimer`s disease. *Alzheimer`s & Dementia* 2015, 11(11): 1261-1396.
23. **Katusic S .Z., Austin S. A.** Endothelial nitric oxide: protector of a healty mind. *European Heart Journal*, 2014, 35 (14): 888-894.
24. **Kaushik A., Jayant R., Tiwari S., et al.** Nano-biosensors to detect beta-amyloid for Alzheimer`s disease management. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80: 273-287.
25. **Kettenmann H., Hanisch U. K, et al.** Physiology of Microglia. *Physiol Rev* 2011, 91:461-553.

26. **Kim K., Na K. et al.** The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2016, 64: 277-284.
27. **Kumat P. K.** Streptozotocin induced Alzheimer`s disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural Regen Res.* 2015, 10(7): 1050-1052.
28. **Latta C. H., Brothers H. M., Wilcock D. M.** Neuroinflammation in Alzheimer`s disease; A source of heterogeneity and target for personalizes therapy. *Neuroscience* 2015, 302: 103-111.
29. **Lim S., Rodriguez-Ortiz C., Kitazawa M.** Infection, systemic inflammation, and Alzheimer`s disease 2015, *Microbes and Infection* 17: 549 – 556.
30. **Lima-Paula A. C., De Felice F. G., et al.** Activation of GABA<sub>A</sub> receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of  $\beta$ -amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology* 2005, 49: 1140-1148.
31. **Lutz M. W., Sundseth S. S., Burns D. K., et al.** A genetics-based biomarker risk algorithm for predicting risk of Alzheimer`s disease. *Alzheimer`s & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 2016 [Pieejams: [http://www.trci.alzdem.com/article/S2352-8737\(15\)00028-1/fulltext](http://www.trci.alzdem.com/article/S2352-8737(15)00028-1/fulltext)].
32. **Murtishaw A. S., Heaney C. F. et al.** Effect of acute lipopolysaccharide-induces inflammation in intracerebrovasculat-streptozotocin injected rats. *Neuropharmacology* 2016, 101: 110-122.
33. **Nelson R. A., Sweeney D. M., et al.** Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer`s disease. *Biochim.Biophys.Acta* (2015). Pieejams: [<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.12.016>].
34. **Nicoll J. A. R, Weller R. O.** A new role for astrocytes:  $\beta$ -amyloid homeostasis and degradation. *TRENDS in Molecular Medicine*, 2003, 9(7): 281-282.
35. **Pavasare K., Skrule J., Štāle M., Rozentāle G.** Latvijas gados vecu iedzīvotāju veselības stāvoklis un to ietekmējošie faktori.Tematiskais ziņojums. 2012 [Tiešsaiste] – [Citēts: 04.01.2015] Pieejams: [www.spkc.gov.lv](http://www.spkc.gov.lv)
36. **Perry T. A et al.** Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid- $\beta$  levels and protects hippocampal neurons from death induced by A $\beta$  and iron. *Journal of Neuroscience Research* 2003, 72:603-612.
37. **Rai S., Kamat P. K. et al.** Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: The key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2014, 117: 104-117.

38. **Sabet-Jafari M., Banafshe H. R., et al.** Modulation of muscimol state-dependent memory by  $\alpha$ -adrenoreceptors of the dorsal hippocampal area. *European Journal of Pharmacology* 2013, 710: 92-99.
39. **Salazar-Orta E., Lemus-Cuellar C. A., et al.** Cholinergic markers in the cortex and hippocampus of some animal species and their correlation to Alzheimer's disease. *Neurologia (English Edition)* 2014, 29 (8): 497-503.
40. **Schneider L. S., et al.** Alzheimer disease pharmacologic treatment and treatment research. *Continuum* 2013, 19: 339-357.
41. **Sofraniew M. V., Vinters H. V.** Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010, 119: 7-35.
42. **Tang J., Liu T. B. et al.** Effect of calcium channel noise in astrocytes on neuronal transmission. *Commun Nonlinear Sci Numer Simulat* 2016, 32: 262-272.
43. **Verkhatsky A., Zorec R., et al.** Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Pharmacology* 2016, 26: 74-79.
44. **Vilhardt F.** Microglia: phagocyte and glia cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005, 37 (1): 17-21.
45. **Wang L., Kang Y., et al.** Deficit in coordinated motor behavior and in nigrostriatal dopaminergic system ameliorated and VMAT2 expression up-regulated in aged male rats by administration of testosterone propionate. *Experimental Gerontology* 2016, 78: 1-1.