

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

BAKALĀURA DARBS

RĪGA 2019

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

**PERORĀLI IEVADĪTA METFORMĪNA IETEKME UZ
NEIROIEKAISUMU UN SMADZEŅU NEIRONĀLO
PLASTICITĀTI ALCHEIMERA SLIMĪBAS TIPĀ
MODEĻA ŽURKĀS**

BAKALĀURA DARBS

Autors: **Baiba Kaņepe**

Studenta apliecības Nr.: bk16023

Darba vadītājs: Mg. pharm. Karīna Narbute

RĪGA 2019

Satura rādītājs

<i>ANOTĀCIJA</i>	3
<i>ABSTRACT</i>	4
<i>APZĪMĒJUMU SARAKSTS</i>	5
<i>IEVADS</i>	7
<i>1. ALCHEIMERA SLIMĪBA</i>	9
1.1. Epidemioloģija	9
1.2. Patoģenēze.....	11
1.2.1. Amiloīda beta teorija.....	11
1.2.2. <i>Tau</i> fosforilācijas teorija	14
1.2.3. Gēnu mutācijas.....	16
1.2.4. Neuroiekaisums.....	17
1.2.5. Neironālās plasticitātes izmaiņas	23
1.2.6. Citas teorijas.....	24
1.3. Simptomātika un riska faktori.....	25
1.4. Diagnostika	28
1.5. Terapija	30
1.5.1. Pašlaik izmantotā terapija.....	30
1.5.2. Jaunu terapiju pētniecības virzieni	31
<i>2. STREPTOZOCĪNA ALCHEIMERA SLIMĪBAS MODELIS</i>	34
<i>3. MATERIĀLI UN METODEDES</i>	36
3.1. Dzīvnieki	36
3.2. Eksperimenta dizains	36
3.3. Metformīna ievadīšana.....	38
3.4. Paraugu sagatavošana.....	39
3.5. Reāģenti.....	40
3.6. Imunohistoķīmiskā analīze.....	41
3.6.1. Antivielu imunohistoķīmiskā analīze.....	41
3.7. Mikroskopēšana un attēlu uzņemšana.....	42

3.8. Attēlu apstrāde un statistiskā analīze	43
4. REZULTĀTI	45
4.1. Metformīna ietekme uz astrocītu aktivitāti STZ- izraisītā AD tipa modeļa žurku hipokampā un smadzeņu garozā	45
4.2. Smadzeņu neironālās plasticitātes izmaiņas STZ-izraisītā AD tipa modeļa žurku hipokampā un smadzeņu garozā	49
5. DISKUSIJA	54
6. SECINĀJUMI	57
PATEICĪBAS	58
LITERATŪRAS SARAKSTS	59
PIELIKUMI	65
1. pielikums. GFAP imunohistoķīmijas protokols	66
2. pielikums. GAP43 imunohistoķīmijas protokols.....	67
DOKUMENTĀRĀ LAPA	68

ANOTĀCIJA

Alcheimera slimība (AD) ir pasaulē visbiežāk sastopamā neurodeģeneratīvā saslimšana, kā arī biežākais demences izraisītājs, turklāt šīs slimības izplatība ar katru gadu pieaug. Līdz šim izmantota simptomātiska terapija un kopš 2003. gada nav apstiprināts neviens jauns medikaments AD ārstēšanai, tādēļ arvien tiek meklēti jauni terapijas virzieni (Hung and Fu, 2017). Ņemot vērā, ka AD pacientu smadzenēs novērojami glikozes metabolisma traucējumi un paaugstināts cerebrālais glikozes līmenis (Campbell *et al.*, 2017), mēs pārbaudījām anti-diabētiskā preparāta metformīna devu (75 mg/kg un 100 mg/kg) ietekmi uz neuroieksumu un neironālo plasticitāti streptozocīna (STZ) izraisītā AD tipa modeļa žurkās.

Rezultāti uzrādīja, ka metformīns neietekmē ne specifiskā astrocītu proteīna GFAP, ne neironālās plasticitātes proteīna GAP43 ekspresiju smadzeņu garozā un hipokampā.

Iegūtie dati liecina, ka metformīns (75 mg/kg un 100 mg/kg) nespēj novērst STZ izraisītos neironālās plasticitātes traucējumus, kā arī nesamazina neuroiekaisumu. Tādēļ var secināt, ka metformīna darbības mehānisms nav saistīts ar neironālās plasticitātes vai neuroiekaisuma procesiem.

Atslēgas vārdi: Alcheimera slimība, neuroiekaisums, neironālā plasticitāte, metformīns, streptozocīns.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder in the world, as well as the most common cause of dementia, furthermore the prevalence of this disease is increasing every year. Symptomatic treatment has been used so far and since 2003 no new therapeutics have been approved to treat AD, therefore new therapeutic strategies are still being sought (Hung and Fu, 2017). Given the fact that brain glucose metabolism of AD patients is disturbed and cerebral glucose levels are elevated (Campbell *et al.*, 2017), we investigated antidiabetic drug metformin dose (75mg/kg and 100 mg/kg) effects on neuroinflammation and neuronal plasticity in STZ-induced AD model rats.

Results show that metformin does not affect the expression of astrocyte specific protein GFAP or neuronal plasticity protein GAP43 in brain cortex and hippocampus.

Obtained data demonstrate that metformin (75 mg/kg and 100 mg/kg) is not able to prevent STZ-induced neuronal plasticity impairment and can not reduce neuroinflammation. Therefore, it can be concluded that metformin mechanism of action is not related to neuronal plasticity or neuroinflammation processes.

Key words: Alzheimer's disease, neuroinflammation, neuronal plasticity, metformin, streptozocin.

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- A β – amiloīds beta
- aCSF (*artificial cerebrospinal fluid*) – mākslīgais cerebrospinālais šķidrums
- AD – Alcheimera slimība
- AMPK – adenozīna monofosfāta aktivētā proteīnu kināze
- APOE – apolipoproteīns ϵ
- APP – amiloīda prekursora proteīns
- ATF – adenozīna trifosfosfāts
- BACE1 – beta sekretāze 1
- BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) – smadzeņu neirotrofiskais faktors
- CA1/2 - *cornu ammonis 1/2* hipokampa reģioni
- CD (*cluster of differentiation*) – diferenciacijas sistēma
- ChE – holīnesterāze
- CSSŠ – cerebrospinālais šķidrums
- CTF α/β – C-gala terminālie fragmenti alfa/beta
- DAB – 3,3'-diaminobenzidīns
- DG – *dentate gyrus* hipokampa reģions
- GAP 43 (*growth associated protein 43*) – ar augšanu saistītais proteīns 43
- GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) – glijas fibrilārais skābais proteīns
- GLAST (*glutamate-aspartate transporter*) – glutamāta-aspartāta transporters
- GLT-1 (*glutamate transporter-1*) – glutamāta transporters 1
- GLUT – glikozes transporta molekula
- GSK3 β – glikogēna sintāzes kināze 3 beta
- HEB – hematoencefāliskā barjera
- Iba-1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*) – jonizētā kalciju saistošā adaptera molekula 1
- Icv – intracerebroventrikulāri
- IL-1 β – interleikīns 1 beta
- LNDSA – Latvijas Neurodeģeneratīvo slimību asociācija
- MCI (*mild cognitive impairment*) – viegli kognitīvi traucējumi
- MHC (*major histocompatibility complex*) – galvenais audu saderības komplekss
- MRI – magnētiskās rezonanses attēliegūšana
- NFT (*neurofibrillary tangle*) – neurofibrilārie mezgli
- NMDA – N-metil-D-aspartāts

NO – slāpekļa (II) oksīds

NPL – nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi

PARP – poli-adenozīna difosfāta ribozes polimerāze

PET – pozitronu emisijas tomogrāfija

PSEN1/2 – presenelīns 1/2

ROS – reaktīvie skābekļa savienojumi

S100B (*calcium-binding protein B*) – kalciju saistošais proteīns B

SAL (*saline*) – fizioloģiskais šķīdums

TBS-T – *Tris-buffered saline* – *Tween 20* buferšķīdums

TLR (*toll-like receptor*) – svečveidīgais receptors

TNF α – tumora nekrozes faktors alfa

IEVADS

Alcheimera slimība (AD) ir biežākā neuroģeneratīvā smadzeņu saslimšana pasaulē, ko raksturo progresējoši atmiņas traucējumi un kognitīvo funkciju zudums. AD pacientu skaitam ir tendence pieaugt. Saskaņā ar Pasaules Veselības organizācijas datiem, tiek prognozēts, ka 2050. gadā pasaulē slimības skarto skaits sasniegs 115 miljonus. Lai gan atklāta vairāk kā pirms gadsimta, AD vēl joprojām nav ārstējama (Hung and Fu, 2017).

Klasiski AD patoģenēzi raksturo neironu bojāeja ekstracelulāru amiloīda beta (A β) plātņu agregācijas un hiperfosforilēta *tau* proteīna intracelulāras akumulācijas ietekmē (Murphy and LeVine, 2010). Šobrīd aizvien lielāka nozīme tiek pievērsta hroniska neuroiekaisuma lomai AD patoģenēzē (Knezevic and Mizrahi, 2018). Hronisks neuroiekaisums rada neatgriezeniskus bojājumus, ievērojami samazinot neironālo plasticitāti (Mufson *et al.*, 2015). Patoloģiski smadzeņu plasticitātes traucējumi, kas saistīti ar AD, sastopami jau 25 gadus pirms pirmo simptomu parādīšanās (Bateman *et al.*, 2012). Turklāt AD raksturo arī glikozes metabolisma un transporta traucējumi, kas izraisa cerebrālā glikozes līmeņa paaugstināšanos un insulīna rezistences attīstību smadzenēs, tāpēc AD tiek dēvēta arī par 3. tipa diabētu (Campbell *et al.*, 2017; Koenig *et al.*, 2017). Tiek meklētas zāļu vielas, kas varētu ietekmēt šos procesus. Pretdiabēta medikaments metformīns jau iepriekš pētīts saistībā ar AD, izmantojot diabēta dzīvnieku modeļus. Iegūtie rezultāti ir bijuši daudzsološi, taču nepieciešams veikt plašākus un specifiskākus pētījumus, lai noskaidrotu metformīna darbības mehānismu AD terapijā (Markowicz-Piasecka *et al.*, 2017).

Darba mērķis:

Noskaidrot metformīna devu (75 mg/kg un 100 mg/kg) ietekmi uz neironālai plasticitātei (GAP43) un neuroiekaisumam (GFAP) specifisku proteīnu ekspresiju STZ-izraisītā Alcheimera slimības tipa modeļa žurku smadzeņu garozā un hipokampā.

Darba uzdevumi:

1. Ar imunohistoķīmiskās analīzes metodēm noteikt sekojošu proteīnu ekspresiju žurku smadzeņu garozā un hipokampa reģionos (CA1, CA2, DG), izmantojot biomarķierus:
 - a) neuroiekaisuma – glijas fibrilārā skābā proteīna GFAP (*glial fibrillary acidic protein*);
 - b) neironālās plasticitātes – ar neironālo reģenerāciju un sinaptoģenēzi saistītā GAP43 (*growth associated protein 43*).

2. Ar attēlu apstrādes programmu *ImageJ* apstrādāt un analizēt iegūtos datus, un veikt statistisko analīzi programmā *GraphPad Prism 6.0*.

Darbs tika izstrādāts Latvijas Universitātes Dabas mājā (Jelgavas iela 1) un Zinātņu mājā (Jelgavas iela 3) Farmakoloģijas katedras laboratorijās no 2018. gada septembra līdz 2019. gada aprīlim.

1. ALCHEIMERA SLIMĪBA

1.1. Epidemioloģija

Alcheimera slimība (AD) ir neurodeģeneratīva smadzeņu saslimšana un visbiežākais demences izraisītājs pasaulē (Bateman *et al.*, 2012). No visiem demences gadījumiem 60–70% ir AD izraisīti (Mielke *et al.*, 2014). AD izplatībai un saslimstībai ir tendence pieaugt līdz ar vecumu (Niu *et al.*, 2017). Pēc Pasaules Veselības organizācijas datiem 2015. gadā 47,47 miljoni pasaules iedzīvotāju slimoja ar demenci, turklāt gaidāms, ka 2030. gadā šis skaitlis būs 75,63 miljoni, bet 2050. gadā jau trīskāršojies (Prince *et al.*, 2015). Meta-analīzē (Fiest *et al.*, 2016) ziņots, ka AD izplatība pacientiem, kas vecāki par 60 gadiem, ir 40,2 uz katrām 1000 iedzīvotājiem.

AD izplatība Eiropā kopumā ir 4,66%, attiecīgi Dienvideiropas valstīs (Spānijā, Grieķijā un Itālijā) tā ir 6,88%, bet Ziemeļeiropas valstīs, kā Francija un Nīderlande, 4,31%. Vidēji saslimstība Eiropā ir aptuveni 10,78 saslimšanas gadījumi uz 1000 iedzīvotājiem. Saslimstība ir lielāka Ziemeļeiropā – aptuveni 15,94 saslimušie uz 1000 iedzīvotājiem, kamēr Dienvideiropā tā ir 8,97 AD pacienti uz 1000 iedzīvotājiem (Niu *et al.*, 2017).

Amerikas Savienotajās Valstīs 5,7 miljoni iedzīvotāju slimo ar AD, tas ietver 5,5 miljonus pacientu vecākus par 65 gadiem un 200 tūkstošus pacientu, kas ir jaunāki par 65 gadiem. Respektīvi 10% ASV iedzīvotāju, kas ir vecāki par 65 gadiem, slimo ar AD (*Alzheimer's Association Report*, 2018).

Pēc Slimību profilakses un kontroles centra datiem Latvijā 2017. gadā demence pirmoreiz konstatēta 1108 iedzīvotājiem, savukārt pacientu reģistrā kopumā ar diagnosticētu demenci 2017. gada beigās bija 5469 iedzīvotāji. Šajā gadā uzskaitē esošo demences pacientu skaits uz 100 000 iedzīvotājiem bija 282,7. Laika posmā no 2009. – 2017. gadam tendence demences pacientu skaitam palielināties novērojama arī Latvijā (Slimību profilakses un kontroles centrs, 2017).

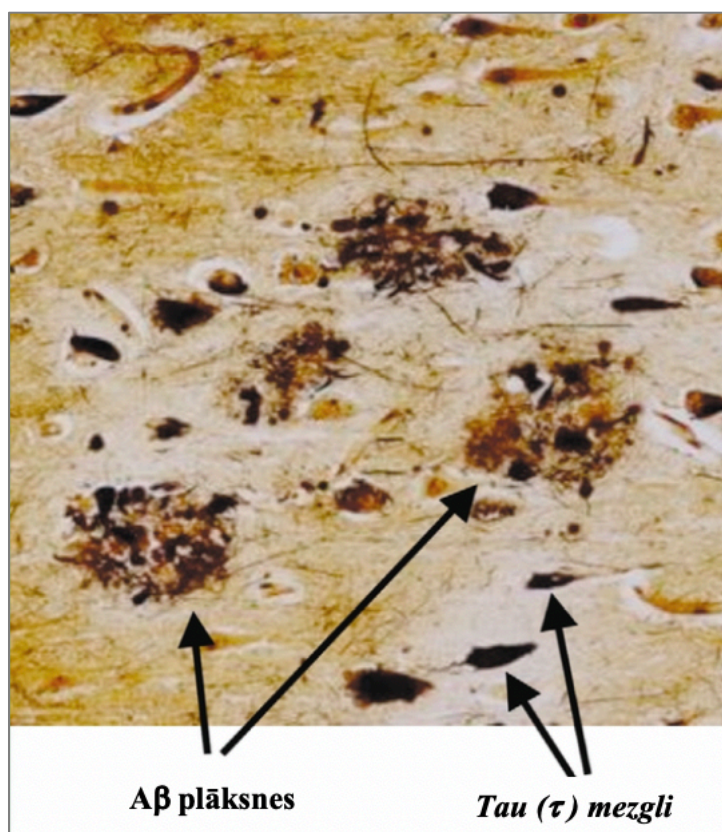
Atšķirības AD izplatībā novērojamas arī dzimuma robežās – sievietēm izplatība ir ievērojami lielāka. Saslimstība vīriešu un sieviešu vidū Eiropā ir attiecīgi 3,31% jeb 7:1000 un 7,13% jeb 13:1000 (Niu *et al.*, 2017). Šāda nevienlīdzīga slimības izplatība dzimuma robežās novērojama arī Latvijā, gada laikā sievietēm demence tiek diagnosticēta aptuveni divreiz biežāk nekā vīriešiem (Slimību profilakses un kontroles centrs, 2017). Izpētīts, ka vīriešiem ir lielāks risks attīstīties viegliem kognitīviem traucējumiem (*MCI – mild cognitive impairment*), kas ir stāvoklis starp novecošanās izraisītiem kognitīviem traucējumiem un demences attīstību. Kā viens no iemesliem, kādēļ sievietēm biežāk attīstās AD, tiek minēts vidējais mūža garums,

ņemot vērā, ka sievietēm dzīvildze ir garāka. Pētījumos atklāts, ka slimības izplatība vīriešiem un sievietēm no 70-79 gadu vecumam ir līdzvērtīga, bet pēc 80 gadu vecuma AD ir izplatītāka sieviešu vidū. Turklāt sievietēm pēc diagnozes uzstādīšanas kognitīvo un funkcionālo simptomu attīstība norit straujāk. Demences biežāka attīstība sievietēm saistīta arī ar menopauzi un hormonālo disbalansu, kā arī ar ģenētisko iedzimstību – sievietēm apolipoproteīna ε (APOE) alēle ε4, kas saistīta ar agrīnas AD formas attīstību, genotipiski izpaužas vairāk nekā vīriešiem (Mielke *et al.*, 2014). Slimnieku, kas ir vecāki par 65 gadiem, aptuvenā dzīvildze ir 4 līdz 8 gadi pēc diagnozes uzstādīšanas (*Alzheimer's Association Report*, 2018).

1.2. Patoģenēze

1.2.1. Amiloīda beta teorija

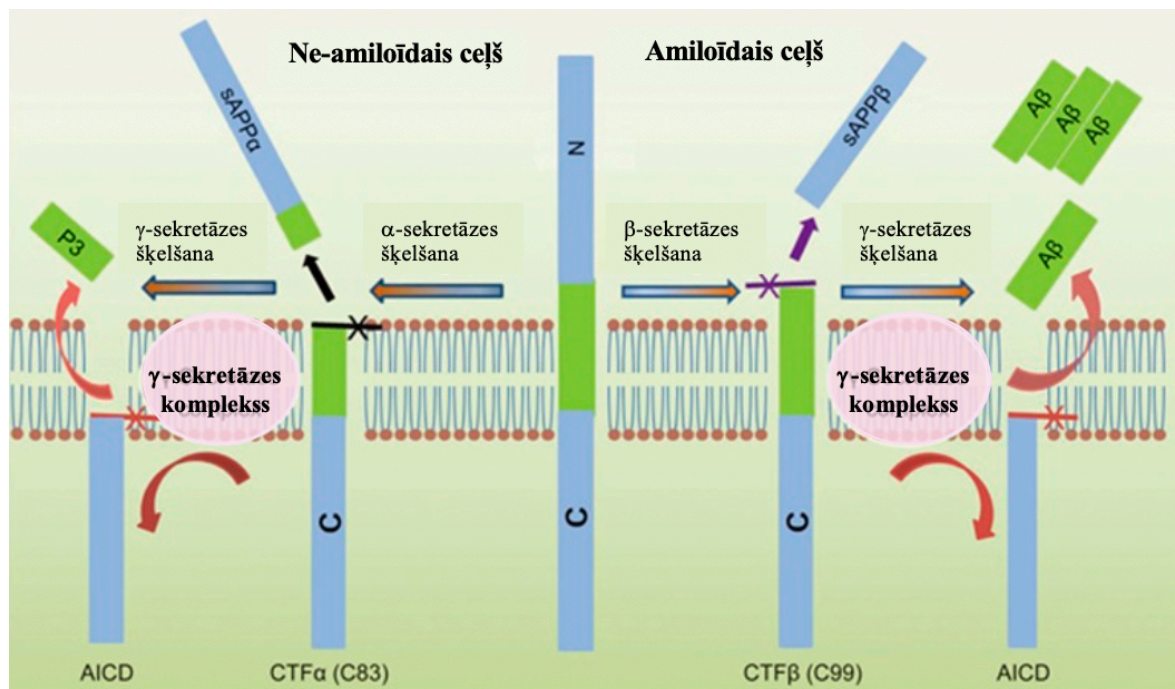
Pastāv divas galvenās AD etioloģijas teorijas. Ekstracelulāra amiloīda beta ($A\beta$) peptīda plātnīšu akumulācija un intracelulāra izmainītas formas *tau* proteīna mezglu akumulācija saistīta ar smadzeņu plasticitātes izmaiņām AD gadījumā (1.2.1.1. attēls). $A\beta$ plāksņu agregācija izraisa nekrozi, traucējot sinapšu darbību (Murphy and LeVine, 2010). *Tau* proteīna mezglu veidošanās izjauc mikrotubuļu citoskeletu, līdz ar to traucējot aksonālo signālpārvadi un neironu darbību (Blennow *et al.*, 2006).



1.2.1.1. attēls. $A\beta$ plāksņu un *tau* proteīna mezglu akumulēšanās AD pacientu smadzeņu garozā. $A\beta$ plāksņu akumulēšanās norisinās ekstracelulāri, tās satur distrofiskas nervu šūnas, aktivētas astroglijas un mikroglijas šūnas. Mikrotubuļu stabilizējošā proteīna *tau* hiperfosforilētas formas mezglu agregāti izvietoti intracelulāri (Blennow *et al.*, 2006).

$A\beta$ peptīda producēšanās organismā ir normāls fizioloģisks process. Pierādīts, ka ļoti mazas $A\beta$ koncentrācijas smadzenēs kavē cerebrospinālā šķidrums (CSŠ) un plazmas lipoproteīnu oksidāciju. *In vitro* pētījumos atklāts, ka $A\beta$ antioksidatīvās īpašības mazās koncentrācijās spēj pasargāt neironus no oksidatīvā stresa. Patoloģiskas pārmaiņas rodas, ja šis proteīns veido agregātus un akumulējas smadzenēs (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2014).

A β peptīds rodas, šķeloties amiloīda prekursora proteīnam (APP) (Chen *et al.*, 2017), kas ir plaši ekspresēts visā organismā. APP ir integrēts membrānas proteīns ar vienu transmembrānas domēnu, garu ekstracelulāru N-galu un īsāku citoplazmatisku C-galu (Mattson, 2004; Chen *et al.*, 2017).



1.2.1.2. attēls. APP degradācijas amiloīdais un ne-amiloīdais mehānisms. APP ne-amiloīdo šķelšanu veic α -sekretāzes, tās šķel APP A β domēnā, producējot CTF α (83 aminoskābes garš fragments) un sAPP α . CTF α šķelšanu tālāk veic γ -sekretāzes, kā rezultātā rodas ekstracelulārais P3 un intracelulārais AICD domēns. Amiloīdo APP šķelšanu veic β - un γ -sekretāzes. β -sekretāzes sašķel APP divos fragmentos – sAPP β un CTF β (99 aminoskābes garš fragments). Tālāk CTF β šķel γ -sekretāzes par intracelulāru domēnu AICD un A β (Chen *et al.*, 2017).

APP degradācija iespējama caur diviem ceļiem – amiloīdo un ne-amiloīdo (1.2.1.2. attēls). Caur amiloīdo ceļu, APP tiek pakļauts secīgai proteolīzei ar β - un γ -sekretāzēm, izveidojoties A β (Reddy and Beal, 2008). β -sekretāze 1 (BACE1) šķel APP par šķīstošu sAPP β un CTF β (99 aminoskābes garš fragments). CTF β ir saistīts ar membrānu, to tālāk šķel γ -sekretāze par A β_{42} vai A β_{40} , kuri piedalās amiloīdo plāksnišu veidošanā (Murphy and LeVine, 2010; Folch *et al.*, 2016). Caur ne-amiloīdo ceļu šķelšanu veic α -sekretāze A β domēnā un novērš tā producēšanos. Ģenētiskas mutācijas APP, presenelīna 1 (PSEN1) un presenelīna 2 (PSEN2) gēnos aktivē β - un γ -sekretāzes, kas stimulē A β_{1-42} producēšanos un akumulāciju, veidojot oligomērus un plātnītes. A β_{1-42} uzkrāšanās ierosina mikroglijas šūnu un astrocītu aktivāciju (Hardy and Selkoe, 2002; Reddy and Beal, 2008).

A β plātnīšu veidošanās iespējama ne tikai β - un γ -sekretāzēm šķeļot APP, bet arī šo plātnīšu neefektīvas degradācijas rezultātā. Degradējošo enzīmu nepriļisīna, insulīna degradējošā enzīma un angiotenzīna konvertējošā enzīma I samazināta aktivitāte var radīt disbalansu starp A β producēšanos un noārdīšanos (Folch *et al.*, 2016).

Vairāk izplatīta A β ekstracelulāra akumulēšanās (Reddy and Beal, 2008). Lielākoties A β peptīdu ķēdes, kas konstatējamas gan neizmainītās cilvēka smadzeņu struktūrās, gan AD pacientu A β agregātos, satur 40 (A β_{40}) vai 42 (A β_{42}) aminoskābes (Selkoe, 2008). A β_{1-42} piedalās fibriloģenēzē un A β plātnīšu veidošanā (Reddy and Beal, 2008). Lai gan akumulētajās proteīnu plātnēs pārsvarā sastopams A β_{40} , lielāka toksicitāte piemīt A β_{42} , kas ir nedaudz hidrofobiskāks un ar lielāku tendenci uz agregāciju nekā citas A β formas (Selkoe, 2001; Murphy and LeVine, 2010). Laiks, kas nepieciešams, lai A β plātnes izveidotos, nav zināms, bet uzskata, ka tas notiek vairāku desmitu gadu garumā (Selkoe, 2001).

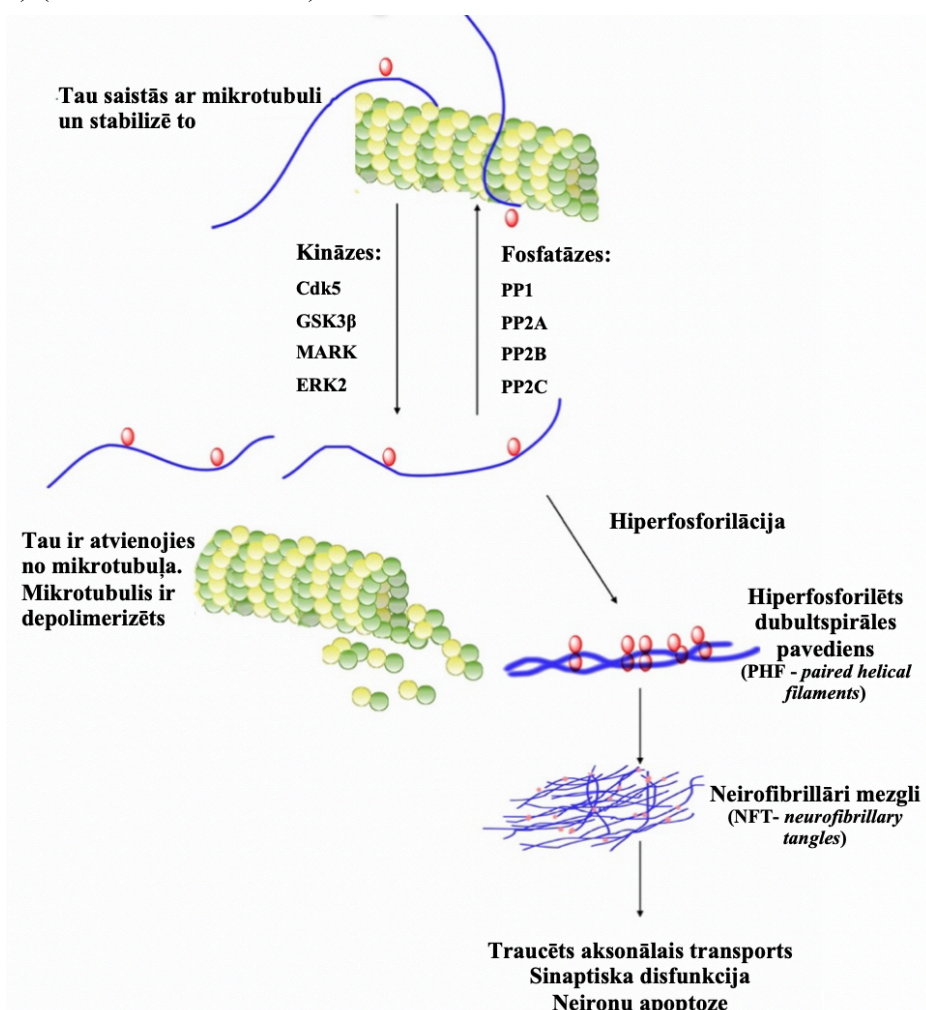
Smadzeņu rajonos, kas satur A β plātnītes, parasti ir samazināts sinapšu skaits un traucēti neironālie procesi, kas norāda, ka A β akumulēšanās bojā sinapses un ietekmē neironu darbību. Vairāk tiek ietekmēti neironi, kas kā neurotransmiterus izmanto glutamātu vai acetilholīnu, taču tiek skarti arī serotonīnu un norepinefrīnu producējošie neironi (Mattson, 2004). A β agregāti veicina slāpekļa (II) oksīda (NO) producēšanos un Ca⁺² jonu influksu, kas laika gaitā noved pie peroksinitrītu radikāļu veidošanās un šūnu bojāejas (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2014).

Oksidatīvajam stresam, kas rodas A β plātnīšu agregācijas rezultātā, ir būtiska nozīme AD patoģenēzē. A β agregāti saistās ar metāla joniem, piemēram, varu, dzelzi un cinku. Šāda saistīšanās veicina reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) veidošanos, kuri izraisa oksidatīvus bojājumus gan A β plātnītēm, gan apkārtējām šūnām (Cheignon *et al.*, 2018). ROS reaģē ar proteīniem un lipīdiem, veidojot toksisku oksidētu proteīnu un peroksidētu lipīdu formas. Lipīdu peroksidācijas rezultātā rodas toksiski savienojumi, kas bojā nervu šūnas. Proteīnu oksidācija bojā membrānas integritāti un var izmainīt tās izturību pret enzīmu glutamīnsintetāzes un kreatinīnkināzes darbību, ietekmējot neironu funkcijas. Turklāt oksidatīvais stress izraisa DNS oksidāciju un bojājumus. A β toksiskā darbība ietver arī Ca²⁺ homeostāzes un signālceļu izjaukšanu, ATF-āzes un glijas šūnu Na⁺-atkarīgā glutamāta transporta inhibīciju (Chen *et al.*, 2017). Salīdzinot ar citiem orgāniem, smadzenes ir jūtīgākas pret oksidatīvo stresu to augstā lipīdu satura dēļ, kā arī relatīvi augstā skābekļa metabolisma un zemā antioksidantu līmeņa dēļ. Mitohondriāls oksidatīvais stress manāms agri AD attīstībā pirms A β plātnīšu akumulēšanās. Brīvo radikāļu izraisīti mitohondriju bojājumi sastopami gan neironos, gan astrocītos. Smadzenēs novēroti arī trīs mitohondriālo enzīmu – piruvāta dehidrogenāzes kompleksa, α -ketoglutarāta dehidrogenāzes kompleksa un citohroma oksidāzes – līmeņu pazemināšanās (Reddy and Beal, 2008).

A β oligomēriem ir augsta neirotoksicitāte, tiem ir svarīga loma AD patoģenēzē, turklāt šķīstošu A β oligomēru agregācijas līmenis korelē ar slimības progresiju (Breydo *et al.*, 2016).

1.2.2. *Tau* fosforilācijas teorija

Tau ir šķīstošs proteīns, kas piedalās mikrotubuļu stabilizācijā. Ekstracelulāru neurofibrilāru mezglu (NFT – *neurofibrillary tangle*) veidošanos izraisa *tau* proteīna pārmērīga fosforilēšanās. Hiperfosforilēts *tau* proteīns nespēj saistīties ar mikrotubuļiem un tos stabilizēt (1.2.2.1. attēls) (Obulesu *et al.*, 2011).



1.2.2.1. attēls. *Tau* proteīna izraisīta neurodeģenerācija. Fizioloģiski *tau* proteīns saistās ar neironu mikrotubuļiem un stabilizē tos. *Tau* proteīna un mikrotubuļu saistīšanos regulē proteīna fosforilācijas līmenis. Fizioloģiski, ja fosforilēšanu veic kināzes (Cdk5, GSK3 β , MARK un EKR2), iespējama *tau* proteīna atdalīšanās no mikrotubuļa un tā depolimerizācija. Turpretī fosfatāzes (PP1, PP2A, PP2B un PP2C) samazina *tau* fosforilācijas līmeni un veicina tā saistīšanos ar mikrotubuļiem. Patoloģiskos procesos tiek izjaukts līdzsvars kināžu un fosfatāžu darbībā,

veicinot kināžu un samazinot fosfatāžu aktivitāti, kas izraisa *tau* proteīna hiperfosforilāciju. Hiperfosforilēts *tau* proteīns iegūst nepareizu konformāciju un veido β -plāksnes saturošus dubultspirāles pavedienus (PHF - *paired helical filaments*), kas savstarpēji savienojoties veido agregātus un neurofibrilārus mezglus (NFT- *neurofibrillary tangles*) neironos. Neurofibrilārie mezgli traucē aksonālo transportu un izjauc sinaptisko plasticitāti, kas noved pie šūnas bojāejas (Duan *et al.*, 2012).

Tau proteīnu producē neironi un tas lielākoties ir lokalizēts neirona ķermenī un aksonos. Normālos apstākļos nervu augšanas faktors palielina *tau* ekspresiju neironālās attīstības laikā. Patoloģiskos apstākļos *tau* proteīnu producē arī glijas šūnas. Lai gan *tau* proteīns pārsvarā tiek ekspresēts smadzeņu šūnās, tā mRNS molekulas atrodamas arī perifērijas audos. Organismā *tau* proteīns veicina tubulīna saistīšanos mikrotubuļos un uztur to stabilitāti. Tas mijiedarbojas ar spektrīna un aktīna filamentiem, kā arī *tau* proteīnam ir loma tropomiozīna receptora kināzes A receptora atkarīgajā signāla transdukcijā. *Tau* proteīna patoloģiskas izmaiņas rezultējas neurofibrilāru mezglu izsauktā neironu šūnu bojāejā un demences attīstībā. Hiperfosforilēts *tau* proteīns akumulējas neironu somatodendrītiskajās daļās un kopā ar neurofilamentiem veido neurofibrilārus mezglus. Neurofibrilāru mezglu veidošanās tiek tieši saistīta ar neironālu disfunkciju, un to apjoms saistīts ar demences attīstības gaitu (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2014).

Daudzus gadus pirms pirmo simptomu attīstīšanās smadzeņu garozā, hipokampā un citos ar kognīciju saistītos reģionos uzkrājas *tau* proteīna neurofibrilārie mezgli un A β plātnes. (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2014). Turklāt šo abu proteīnu akumulācija var norisināties neatkarīgi vienam no otra (Selkoe, 2001).

Pacientiem ar AD viscaur smadzeņu neokorteksam atrodami A β plātnīšu agregāti, savukārt *tau* proteīna mezgli pārsvarā skar smadzeņu amigdalas, hipokampu, talāmu, asociācijas un kortikālos reģionus (Dharmarajan and Gunturu, 2009).

A β plātnīšu un *tau* neurofibrilāru mezglu akumulēšanās teorijas ir visvairāk pētītās, taču šie pētījumi nav rezultējušies sekmīgas terapijas atklāšanā. Šī iemesla dēļ aizvien vairāk tiek pētīti citi procesi, kas norisinās vēl pirms šo proteīnu metabolisma mutācijām, piemēram, vaskulāro patoloģiju, mitohondriālās disfunkcijas, oksidatīvā stresa, insulīna rezistence un hronisks neuroiekaisuma procesi (Nazem *et al.*, 2015).

1.2.3. Gēnu mutācijas

AD izdala vairākas formas, atkarībā no to izraisošo mutāciju rakstura. Iespējamās spontānas mutācijas, šādā gadījumā slimību sauc par sporādisku vai idiopātisku. Sporādiskā forma tiek iedalīta atkarībā no vecuma, kurā pacientam attīstās pirmie simptomi – izdala agrīnu (3–5%) un vēlīnu (95–97%) sporādisku AD. Gadījumā, kad patoloģiskās pārmaiņas tiek pārmantotas ģenētiski, simptomi var parādīties pirms 65 gadu vecuma, citreiz jau tik agri kā 40 gadu vecumā – šādu formu dēvē par agrīnu familiālu AD (Folch *et al.*, 2016). Agrīnā familiālā forma sastopama 5% gadījumu, bet 95% sastāda vēlīna familiāla saslimšana (Bird, 2008). Šādu pacientu, kas mantojuši mutētus gēnus, īpatsvars ir aptuveni 2% no visiem AD skartajiem. Lielākoties izplatīta ir sporādiskā slimības forma, kuru izraisa jaunas mutācijas. Abu šo formu robežvecums ir 65 gadi (Folch *et al.*, 2016).

Ģenētiskas mutācijas var parādīties jebkurā no trīs specifiskiem gēniem – APP gēnā, kas lokalizēts 21. hromosomā, PSEN1 un PSEN2 kodējošos gēnos, kas atrodas attiecīgi 14. un 1. hromosomā (Selkoe, 2001). Ģenētiskā pārmantojamība ir otrs lielākais riska faktors saslimt ar AD uzreiz pēc novecošanās (Tanzi and Bertram, 2001).

Ģenētisko mutāciju iedzimšanas veids ir autosomāli dominants. Aptuveni 14% autosomāli dominanti pārmantotas agrīnās AD gadījumu izraisa dominantas mutācijas APP gēnā, zināmi vairāk kā 30 iespējamie mutāciju veidi šajā gēnā. Lielākoties mutācijas lokalizētas tuvu A β domēnam vai iekļautas tajā. Savukārt 80% no šādām mutācijām atrodas PSEN1 gēnā, kam zināmi aptuveni 185 mutāciju varianti. PSEN2 gēnam identificēti 13 dominantu patogēnu mutāciju varianti, kas izraisa aptuveni 5% agrīno AD formu. Dominanti pārmantotas mutācijas APP un PSEN1 gēnos ir novērojamas arī vēlīnu AD formu attīstībā gadījumos, kad ģimenes anamnēzē bijusi saslimšana (Karch *et al.*, 2014).

Ar familiālas formas AD attīstību saistīts arī APOE gēns, kas atrodas 19. hromosomā un ir svarīgs holesterīna transportā. APOE visvairāk producējas aknās, smadzenēs un makrofāgos. Tas ir iesaistīts nervu šūnu augšanā un reģenerācijā, kā arī imūnsistēmas atbildes reakcijās. Ikviens manto vienu no APOE gēna trīs alēlēm – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ vai $\epsilon 4$ – no katra vecāka. Visizplatītākā ir $\epsilon 3$ forma, tā sastāda aptuveni 72% no visām APOE alēlēm, tad seko $\epsilon 4$ un $\epsilon 2$. Palielinātu risku saslimt ar AD izraisa $\epsilon 4$ alēle – aptuveni 50% no AD pacientu ir APOE $\epsilon 4$ alēle, kas liecina par to, ka šis gēna variants varētu būt saistīts ar slimību. Šādas formas APOE gēna mantošana gan negarantē, ka attīstīsies AD. APOE $\epsilon 4$ palielina risku gan familiālas, gan sporādiskas agrīnās un vēlīnas AD attīstībai (Karch *et al.*, 2014). Pētījumos atklāts, ka vienas $\epsilon 4$ alēles esamība sievietēm palielina saslimstības risku līdz pat četrām reizēm, bet vīriešiem viena $\epsilon 4$ alēle risku būtiski nemaina (Mielke *et al.*, 2014). Interesanti, ka APOE $\epsilon 2$ samazina

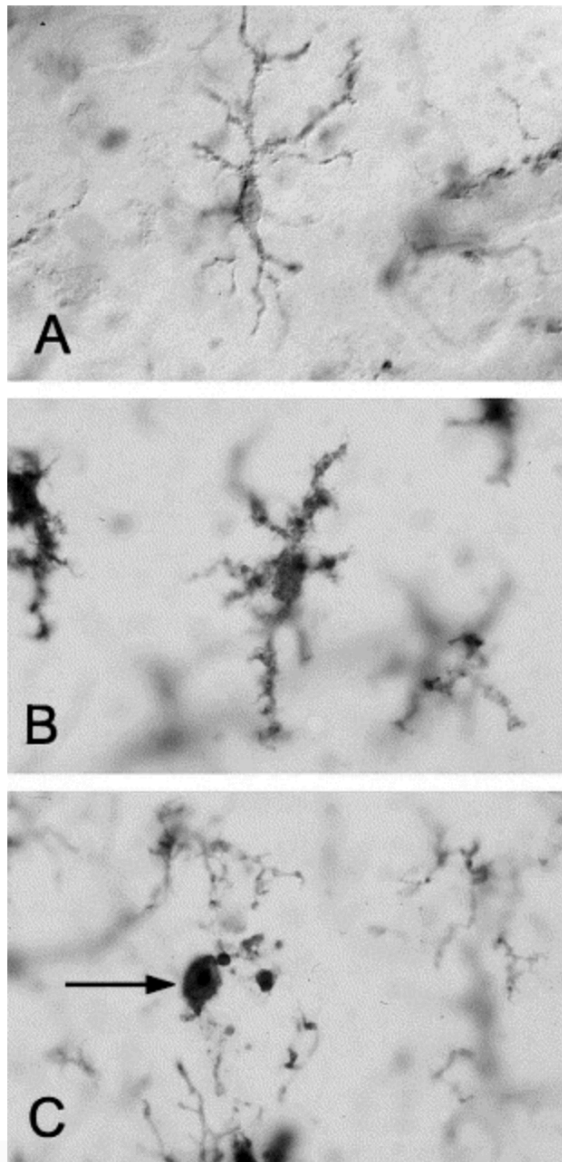
risku saslimt ar vēlīnu AD formu un palielina vecumu, kādā sāk attīstīties slimība (Karch *et al.*, 2014).

1.2.4. Neuroiekaisums

Neuroiekaisums uzskatāms par vienu no svarīgākajiem patoloģiskajiem procesiem AD attīstībā. Tas galvenokārt saistīts ar glijas šūnu pārlieku aktivitāti (Knezevic and Mizrahi, 2018).

Mikroglijas šūnas ir mononukleāras fagocitējošas šūnas, kas pirmās iedarbojas uz organismā nonākušajiem patogēniem un kaitīgiem savienojumiem – degradē toksiskus proteīnu agregātus un aizvāc šūnu atliekas no CNS (Knezevic and Mizrahi, 2018). Kā jau citas makrofāgiem līdzīgas šūnas, mikroglijas nodrošina CNS imūno aizsardzību, piedaloties iekaisuma veidošanā (Cherry *et al.*, 2014). Turklāt mikroglijām ir loma sinapšu struktūru uzturēšanā, sinaptiskās plasticitātes regulācijā un neironālo kanālu veidošanā (Heneka *et al.*, 2015). Kopumā tās ir multifunkcionālas šūnas, kas ne tikai nodrošina imūno aizsardzību, piedalās CNS attīstībā, ir fagocitējošas un antigēnus prezentējošas, bet arī darbojas citotoksiski, piedaloties autoimūnu slimību, hronisku neuroiekaisumu un deģeneratīvu slimību patogēnēzē (Boche *et al.*, 2013). Šīs šūnas lielā daudzumā atrodamas smadzenēs un sastāda aptuveni 10% no visām CNS šūnām (Knezevic and Mizrahi, 2018).

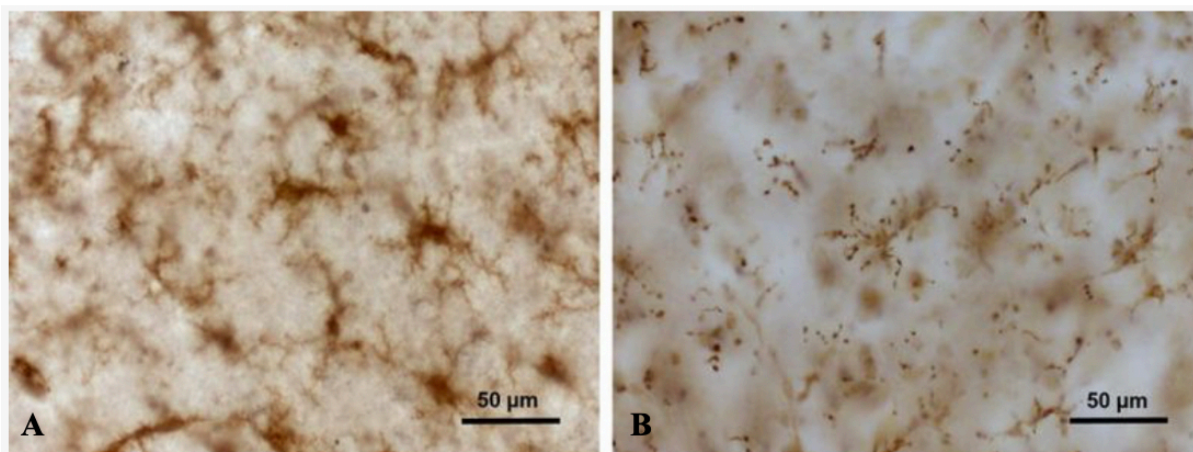
Mikroglijas šūnas organismā sastopamas divos stāvokļos – „miera” un aktivētā. Arī miera stāvoklī mikroglijas šūnām piemīt aktivitāte – ar neskaitāmiem sazarojumiem šūnas “uzrauga” apkārtējās vides izmaiņas un nodrošina smadzeņu homeostāzi. Tiklīdz mikroglijas nonāk saskarsmē ar kādu organismam nepiederīgu vai kaitīgu substanci, tās no miera stāvokļa pāriet aktivētā stāvoklī. Mikroglijas šūnas aktivācija var notikt divos veidos, no kā izdala divus aktivētās mikroglijas fenotipus – klasisko aktivēšanos (M1), ko pavada citokīnu un ROS izdalīšanās, un alternatīvo aktivēšanos (M2), kad mikroglija iegūst pretiekaisuma īpašības, kas saistītas ar dzīšanas un patogēnu aizvākšanas procesiem (Cherry *et al.*, 2014). Aktivējoties mikroglijas šūnu skaits palielinās un mainās to forma (*1.2.4.1. attēls*).



1.2.4.1. attēls. Mikroglijas šūnu digitālā mikroskopa attēli (palielinājums 600x). Redzama mikroglijas šūna miera stāvoklī (A), aktivētā stāvoklī (B) un distrofiska (amēbveida) mikroglija (C, ar bultiņu). (LN-3 imunohistoķīmiskā metode) (Streit, 2005).

Aktivētas mikroglijas šūnas migrē uz ievainojuma vietu, tur izdalot tādus iekaisuma faktorus, kā tumora nekrozes faktors α (TNF α), interleikīns 1 β (IL-1 β), brīvos radikāļus – NO un superoksīdu, kā arī taukskābju metabolītus, piemēram, eikosanoīdus (prostaglandīnus, tromboksānus un leukotriēnus) un hinolīnskābi. Lai gan mikroglijas šūnu iekaisuma faktoru izdalīšana ir normāls imūnsistēmas aizsargmehānisms, tam var būt kaitīga iedarbība uz organismu, jo pārāk liela mikroglijas šūnu aktivācija ir neirotoksiska (Knezevic and Mizrahi, 2018).

Hroniska iekaisuma izraisīta neurodeģenerācija ir viens no AD raksturojošiem procesiem (Cherry *et al.*, 2014). AD gadījumā mikroglijas šūnas aktivējas, saistoties pie A β ar CD36 (*cluster of differentiation 36*), TLR (*toll-like receptor*) 4 un 6 receptoriem (Heneka *et al.*, 2015). Pētījumos ar imunohistoķīmisko analīzi *post-mortem* AD pacientu smadzeņu griezumus var novērot, ka A β plāksnes aptver aktivētas mikroglijas šūnas (1.2.4.2. attēls). Iekaisuma apmērs korelē ar aktivēto mikroglijas šūnu skaitu. Uzskata, ka mikroglijas šūnas fagocitē A β plāksnes un izdala proteolītiskus enzīmus, kas degradē A β , tā attīrot smadzenes no A β agregātiem (Knezevic and Mizrahi, 2018). Nepārtrauktā A β veidošanās pārsniedz mikroglijas šūnu fagocitozes spēju, veidojot hronisku iekaisumu (Heneka *et al.*, 2015). Mikroglijas šūnu sadalījums smadzenēs nav vienmērīgs, tās visvairāk izplatītas *substantia nigra*, tādēļ šis smadzeņu reģions ir viens no visvairāk skartajiem (Li *et al.*, 2014).



1.2.4.2. attēls. Mikroglijas šūnas vesela vecāka gadu gājuma cilvēka un AD pacienta smadzenēs. A) Mikroglijas miera stāvoklī vecāka vesela cilvēka smadzeņu garozā. B) Daļēji fragmentētas, distrofiskas mikroglijas šūnas AD pacienta smadzeņu garozas audos (Iba-1 imunohistoķīmiskā iekrāsošana, brūna krāsa) (Prokop *et al.*, 2013).

Mikrogliju aktivitātes noteikšanai AD slimnieku smadzeņu audos iespējams izmantot vairākus biomarkierus (1.1. tabula). Visizplatītākie ir CD45 antigēns, kas ir bieži izmantots limfocītu antigēns, jonizētā kalciju saistošā adaptera molekula Iba-1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*), kas ir specifiska mikroglijas šūnu ekspresēta molekula (Boche *et al.*, 2013), kā arī plaši izmantots tiek CD11b antigēns, kura noteikšanai izmanto monoklonālo antivielu OX-42 (Korzhevskii and Kirik, 2016).

Mirkoglijas šūnu identifikācijā izmantojamie marķieri

Marķieris	Marķiera funkcija organismā	Ekspresijas izmaiņas AD gadījumā*	Marķiera noteikšanas metode
Iba-1 (<i>ionized calcium binding adapter molecule I</i>)	Piedalās kalcija homeostāzes uzturēšanā. Mirkoglijas aktivācijas pakāpes marķieris.	↑	Antivielas pret Iba-1
MHC II (<i>major histocompatibility complex class II</i>)	Mirkoglijas membrānas proteīns. HLA-DR homologs. Funkcionē kā antigēnu prezentējoša molekula.	↑	Antivielas pret MHC II
CD68	Mirkogliālo lizosomu membrānu proteīns ar nozīmi fagocitozē. Saista zema blīvuma lipoproteīnus.	↑	Antivielas pret CD68
CD45	Leikocītiem raksturīgs antigēns. Transmembrānas proteīns tirozīna fosfatāze.	↑	Antivielas pret CD45
CD11b/CD18	Komplementārais receptors 3, kas saistās ar komplementu C3b, plazmas un ekstracelulārā matricas proteīniem. Ir fagocitējošas īpašības.	↑	Antivielas pret CD11b/CD18; monoklonālā OX-42 antiķiela
F4/80 antigēns	Epidermālajam augšanas faktoram līdzīga molekula. Lektīnu saistoša molekula.	↑	F4/80 antivielas

*ekspresija ↓(samazināta), ↑ (paaugstināta), 0 (nemainīga). (Kettenmann *et al.*, 2011; Boche *et al.*, 2013; Hovens *et al.*, 2014; Mandrekar-Colucci and Landreth, 2010; Korzhevskii and Kirik, 2016).

Astrocītu darbība organismā ir multifunkcionāla, tie nodrošina neironiem labvēlīgu vidi, uzrauga jonu un pH homeostāzi, apgādā neironus ar glikozi un citām metabolismam vajadzīgām vielām, kā arī aizvāc neironu un neurotransmiteru atliekas.

Iekaisuma procesu vai traumas gadījumā novērojama astroglioze – process, kurā reaktīvi astrocīti veido sabiezējumus ap bojājuma vietām, veidojot rētaudus. Astroglioze veicinātā rētaudu veidošanās traucē neironālo reģenerāciju. Astrogliozi stimulē tādi stresa faktori, kā glutamāta līmeņa izmaiņas, folskābes nepietiekamība, asins lipīdu disbalanss, palielināts K^+ transports no šūnas uz citoplazmu un oksidatīvais stress. Reaktīvi astrocīti ir hipertrofiski un hiperplastiski, tie pastiprināti izdala glijas fibrillāro skābo proteīnu (GFAP), veicina aktīva polimerizāciju un bojā šūnu citoskeletonu. Ir pierādīts, ka $A\beta$ veicina astrocītu reaktivēšanos (1.2.4.3. attēls) (Li *et al.*, 2011). Astrocītu patoloģiskā darbība AD gadījumā ir līdzīga mikroglijas šūnām – līdzīgi kā mikroglijas šūnas, astrocīti aktivējas un veic $A\beta$ plāksņu fagocitozi, veidojot sabiezējumus pie $A\beta$ plāksnēm, un, tāpat kā mikroglijas šūnas, izdala iekaisuma faktorus – interleikīnus, prostaglandīnus, leukotriēnus, tromboksānus, koagulācijas faktorus, komplementa faktorus, proteāzes un to inhibitorus, kā arī citokīnus un hemokīnus (Tuppo and Arias, 2005).



1.2.4.3. attēls. Reaktīvi astrocīti ar izteiktu sazarojumu streptozocīna (STZ) izraisītā AD tipa modeļa žurku smadzenēs (GFAP imunohistoķīmiska iekrāsošana, brūna krāsa).

Astrocītu noteikšanai audu paraugā bieži izmanto glijas fibrillāro skābo proteīnu (GFAP), kura līmenis CSŠ korelē ar demences attīstību (Fagan and Perrin, 2012). Tāpat izmanto kalciju saistošo proteīnu S100B, kas nodrošina sinaptisko plasticitāti un neironu dzīvotspēju – patoloģijas gadījumā S100B līmenis ir paaugstināts. Iespējams izmantot arī citus biomarkierus (Li *et al.*, 2011) (1.2. tabula).

Astroglijas šūna identifikācijā izmantojamie marķieri

Marķieris	Marķiera funkcija organismā	Ekspresijas izmaiņas AD gadījumā*	Noteikšanas metode
GFAP (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)	Astrocītu citoskeleta struktūras elements, kas piedalās to funkcionalitātes nodrošināšanā. Ir loma šūnu migrācijā, to motilitātes uzturēšanā un mitozes procesā. Specifisks astrocītu marķieris.	↑	Antivielas pret GFAP
Vimentīns (<i>Vimentin</i>)	Astrocītu citoskeleta struktūras elements. Reaktīvu astrocītu marķieris.	↑	Antivielas pret vimentīnu
Nestīns (<i>Nestin</i>)	Astrocītu citoskeleta struktūras elements, kas tiek ekspresēts organisma attīstības periodā (ne pieaugušajiem) un astrocītu reaktivēšanās gadījumā.	↑	Antivielas pret nestīnu
GLAST (<i>glutamate-aspartate transporter</i>)	Na ⁺ -atkarīgs glutamāta aspartāta transportieris, kas uztur optimālu glutamāta ekstracelulāro koncentrāciju sinapsēs un pasargā no ekscitotoksicitātes.	↓	Antivielas pret GLAST
GLT-1 (<i>glutamate transporter-1</i>)	Na ⁺ -atkarīga glutamāta transporta molekula, kas uztur ekstracelulāro glutamāta līmeni.	↓	Antivielas pret GLT-1
S100B (<i>calcium-binding protein B</i>)	Kalciju saistošs proteīns. Neirotrofisks faktors, kas piedalās neironu attīstībā un dzīvotspējas uzturēšanā, kā arī sinaptiskās plasticitātes regulēšanā. Reaktīvu astrocītu marķieris.	↑	Antivielas pret S100B

*ekspresija ↓(samazināta), ↑ (paaugstināta), 0 (nemainīga) (Hol and Penky, 2015; Li *et al.*, 2011; Pajarillo *et al.*, 2019; Carter *et al.*, 2019).

1.2.5. Neironālās plasticitātes izmaiņas

Smadzenes ir spējīgas veikt neuroplastiskas izmaiņas ārējās un iekšējās vides faktoru, novecošanās un slimību ietekmē (Mufson *et al.*, 2015). Strukturālā plasticitāte iesaistīta atmiņas kapacitātes un pēctraumu bojājumu novēršanā (Holtmaat and Svoboda, 2009). Šādas smadzeņu elasticitātes mehānisms nav pilnībā noskaidrots, taču to saista ar kognitīvajām rezervēm. Neuroplasticitāte nodrošina patoloģijas skarto smadzeņu reģionu spēju reorganizēt sinaptiskās struktūras, signālceļus un funkcijas kopumā (Mufson *et al.*, 2015).

Patofizioloģiskas smadzeņu plasticitātes izmaiņas, kas saistītas ar AD, novērojamas jau 25 gadus pirms pirmo simptomu parādīšanās (Bateman *et al.*, 2012). Rodoties sākotnējām izmaiņām, smadzenes tās var kompensēt un netraucēti funkcionēt, smadzeņu neironālās plasticitātes dēļ. Palielinoties neironu bojājumu apmēram, kompensācija nevar notikt, un rodas nelieli kognitīvi traucējumi, kas attīstās līdz nopietniem smadzeņu darbības traucējumiem (Gregory *et al.*, 2017). Neuroplasticitāte ir viens no galvenajiem mehānismiem, kas nodrošina spēju funkcionēt ar minimāliem kognitīviem traucējumiem indivīdiem, kuriem ir nopietni AD raksturīgi smadzeņu bojājumi, kas ir līdzvērtīgi pacientiem ar smagu AD izraisītu demenci (Mufson *et al.*, 2015).

Smadzeņu plasticitātes izmaiņas nav vienmērīgas, visvairāk sinaptoģenēze, dendrītu un aksonu remodelēšana notiek smadzeņu reģionos, kuros pirmajos notiek patoloģiskais pārmaiņas (Rowan *et al.*, 2003). Hipokamps ir viens no pirmajiem AD skartajiem smadzeņu reģioniem, tajā vairāk novērojama neurofibrilāru mezglu akumulācija, nekā amiloīda proteīna agregātu uzkrāšanās. AD pacientiem hipokampā redzams neironu bojāeja un sinapšu zudums, kas korelē ar kognitīvo funkciju traucējumu apjomu (Mufson *et al.*, 2015). Hipokampa un entorinālās garozas plasticitātes pārmaiņas ietver arī dendrītu izaugumu sazarošanos un pagarināšanos, turklāt tiek vairāk ekspresēts ar augšanu saistītais proteīns (GAP) 43 (*growth associated protein 43*). GAP43 ir ar plasticitāti saistīts presinaptisks proteīns, kura ekspresijas līmenis hipokampā un asociācijas reģionos tiek ievērojami paaugstināts neironālās attīstības un reģenerācijas, sinaptoģenēzes, aksonālās reģenerācijas, mācīšanās un atmiņas formēšanās laikā, kas norāda uz šo procesu saistību ar neironālās plasticitātes veicināšanu. Visaugstākā GAP43 koncentrācija atrodama hipokampā, smadzeņu garozā un subkortikālajās struktūrās (Rahmati and Kazemi, 2019). *Post mortem* AD pacientu smadzenēs novērots samazināts GAP43 līmenis frontālajā garozā (Sandelius *et al.*, 2019). Smadzenēs ir palielināts arī smadzeņu neirotrofiskā faktora (BDNF – *brain-derived neurotrophic factor*) un tirozīna receptora kināzes B mRNS ekspresijas līmenis (Rowan *et al.*, 2003).

1.2.6. Citas teorijas

Demences attīstībā būtisks ir arī dzīvesveids, kognitīvo spēju samazināšanās faktori ir smēķēšana, aptaukošanās, paaugstināts asinsspiediens, mazkustīgs dzīvesveids, depresija, sociāla neaktivitāte, zems izglītības līmenis, vienveidīgs un nepilnvērtīgs uzturs, kā arī viens no būtiskākajiem faktoriem – 2. tipa diabēts (*diabetes mellitus*). Atkārtoti traumatiski smadzeņu bojājumi var būt iemesls paaugstinātam demences, kognitīvo traucējumu un neurodeģeneratīvu saslimšanu riskam (Baumgart *et al.*, 2015).

Diabetes mellitus un insulīna rezistence perifērijā ir AD riska faktori – meta-analīzē (Gudala *et al.*, 2013) demonstrēts, ka cilvēkiem ar diabētu ir par 76% lielāka iespēja attīstīties demencei un par 56% AD, salīdzinot ar kopējo populāciju. AD ar diabētu saistīta arī tieši, jo papildus neirītisko plātnišu un neurofibrilāro mezglu, kā arī neuroiekaisuma un oksidatīvā stresa radītajiem bojājumiem, AD pacientu smadzenēs novērojama arī hiperinsulinēmija, smadzeņu insulīna rezistence un glikozes metabolisma traucējumi, kas izraisa paaugstināta cerebrālā glikozes līmeņa veidošanos (Campbell *et al.*, 2017). Insulīna rezistence saistīta ar cerebrospinālo insulīna receptoru samazinātu aktivitāti, traucētu A β oligomēru klīrensu un A β plākšņu akumulēšanos smadzenēs, kā arī samazinātu glikozes metabolismu, kas korelē ar atmiņas traucējumu attīstību (Koenig *et al.*, 2017).

AD gadījumā ir samazināts glikozes transports cauri smadzeņu hematoencefāliskajai barjerai (HEB) (Winkler *et al.*, 2015). Glikozes transports cauri HEB tiek realizēts ar glikozes transporta molekulu (GLUT) palīdzību. Neironālajai glikozes transporta molekulai GLUT3 AD pacientu smadzenēs ir samazināta ekspresija (Cisternas and Inestrosa, 2017). Pētījumos minēta arī endotēlija šūnu un astrocītu ekspresēto GLUT1 transporta molekulu skaita samazināšanās (Winkler *et al.*, 2015). AD pacientu smadzeņu garozā un hipokampā raksturīga arī GLUT4 ekspresijas līmeņa samazināšanās. GLUT4 ekspresiju hipokampā regulē insulīna un adenozīna monofosfāta aktivētās proteīnkināzes (AMPK) darbība (Cisternas and Inestrosa, 2017).

Ziņots, ka paaugstināts glikozes līmenis smadzenēs traucē epizodiskās īstermiņa atmiņas veidošanos (Campbell *et al.*, 2017). AD pacientiem PET attēlos redzams samazināts glikozes metabolisms parietālajā un temporālajā reģionā, mugurējā cingulārajā garozā un *precuneus*, kā arī frontālajās daivās (1.3.1. attēls) (Gudreniece u.c., 2017). Izteiktāk glikozes metabolisma traucējumi novērojami agrīnas AD gadījumā (Filippi *et al.*, 2012).

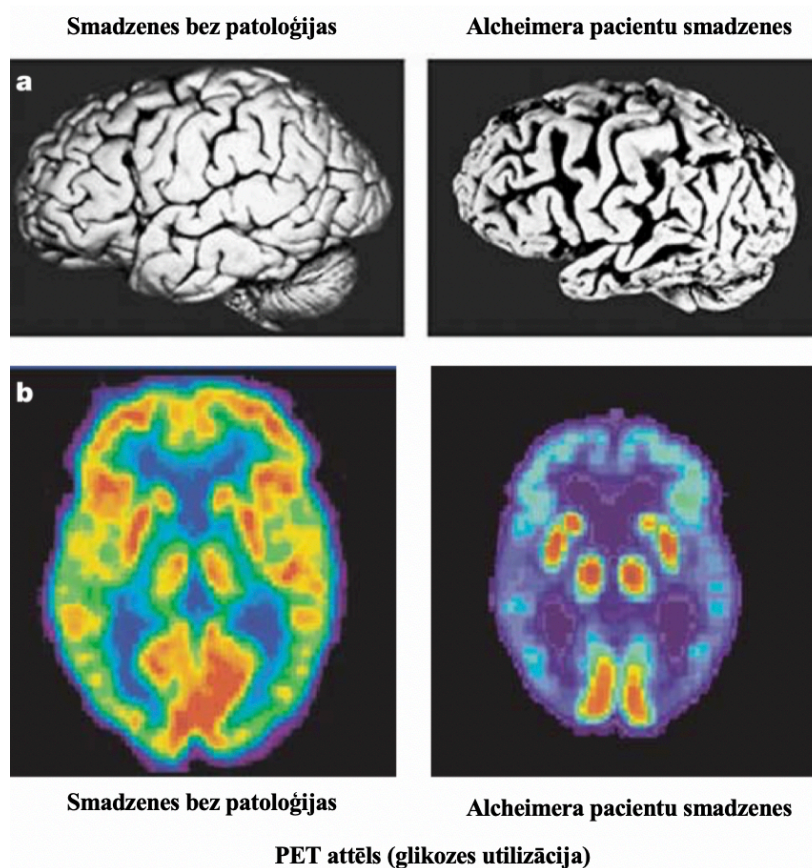
Zinātnieki atkārtoti diskutē par insulīna rezistences saistību ar AD, un, pamatojoties uz to, ka insulīna rezistence sastopama ne tikai perifērijā, bet arī smadzenēs, AD mēdz dēvēt par 3. tipa diabētu (Koenig *et al.*, 2017).

1.3. Simptomātika un riska faktori

AD raksturīgie simptomi un to attīstības gaita pacientu vidū variē, tie nav specifiski, turklāt gadu gaitā var mainīties. Simptomu izpausmes korelē ar smadzeņu neironu bojājumu līmeni. Pacienti zaudē laika un vietas izjūtu, nespēj orientēties, rodas apjukums. Veidojas saziņas traucējumi – grūtības sekot sarunai vai tajā iesaistīties, pacients var apstāties sarunas vidū un aizmirst, kas teikts, kā arī var rasties grūtības izteikties, jo aizmirsti lietu un priekšmetu apzīmējumi. Reizēm novērojama izvairīšanās no sabiedrības, kā arī garstāvokļa un personības izmaiņas – parādās depresija, bailes un satraukums (*Alzheimer's Association Report*, 2018).

Slimības attīstības sākuma stadijā vairākums pacientu ir spējīgi patstāvīgi funkcionēt, kaut arī rodas nelieli atmiņas traucējumi un apgrūtināta jaunu faktu apguve (Dharmarajan and Gunturu, 2009). MCI gadījumā, kas ir visilgākā slimības attīstības stadija, pacientiem ir traucētas ikdienas uzdevumu veikšanas spējas, tie apjūk jau pazīstamā vidē, parādās uzvedības un personības izmaiņas (Albert *et al.*, 2011). Smagas attīstības stadijā indivīdiem ir pilnībā traucēta atmiņa, runas un kognitīvās spējas, novērojami psiholoģiski traucējumi, kā arī nepieciešama palīdzība ikdienas darbību veikšanā, piemēram, lai apģērbtos, nomazgātos, izmantotu labierīcības, tiek traucēta spēja dzert un norīt ēdienu (Dharmarajan and Gunturu, 2009). Tā kā smadzeņu bojājumi aptver rajonus, kas atbild par motoro funkciju veikšanu (frontālā daiva), pacienti smagas saslimšanas stadijā var palikt guloši (*Alzheimer's Association Report*, 2018).

Neiroiekaisuma izraisītā šūnu bojāeja izraisa smadzeņu masas zudumu un atrofiju (*1.3.1. attēls*). Vispirms patoloģiskas izmaiņas skar mediālo temporālo daivu, vēlāk izplešoties līdz frontālajiem un parientālajiem smadzeņu garozas reģioniem (Scharre *et al.*, 2016). Mediālajā temporālajā daivā atrodas entorinālā garoza un hipokamps, atrofija šajā smadzeņu reģionā ietekmē atmiņu nostiprināšanos smadzenēs – veidojas progresējošs atmiņas zudums, īpaši ieteikmējot īstermiņa atmiņu. Jau esošu atmiņu atsaukšana jeb ilgtermiņa atmiņa, kas atkarīga no smadzeņu frontālās daivas un subkortikālajām struktūrām, tiek ietekmēta mazāk (Hort *et al.*, 2010). Atrofija parientālajā un frontālajā daļā izraisa orientācijas zudumu un sekojošu apātiju (Scharre *et al.*, 2016).



1.3.1. attēls. AD rezultātā notiek par atmiņu un mācīšanos atbildīgo smadzeņu reģionu tilpuma samazināšanās – to saista ar samazinātu šūnu enerģijas metabolismu. a) AD pacientu smadzenēm (pa labi) salīdzinājumā ar veselu cilvēku smadzenēm (pa kreisi) var novērot temporālo un frontālo daivu atrofiju. b) Pozitronu emisijas tomogrāfijas (PET) attēlā redzama smadzeņu glikozes uzņemšana veselai kontrolei (pa kreisi) (sarkanā un dzeltenā krāsa rāda augstu uzņemšanas līmeni). AD pacienta smadzeņu (pa labi) PET attēlā redzams zems glikozes metabolisma līmenis frontālajā garozā un temporālajās daivās (Mattson, 2004).

AD agrīnas attīstības formas gadījumā smadzeņu atrofija skar arī mugurējos smadzeņu rajonus – *precuneus* un mugurējo cingulāro garozu. Atipiskas AD formas gadījumā temporālās mediālās daivas atrofija parādās retāk, taču biežāk manāma atrofija parietālajos, laterālajos, temporālajos un frontālajos reģionos (Gudreniece u.c., 2017).

Epidemioloģiskie pētījumi uzrāda, ka fiziskām aktivitātēm ir pozitīva ietekme uz smadzeņu veselību, ko varētu izskaidrot ar plasticitātes uzlabošanu, vaskularizācijas un neuroģenēzes stimulēšanu, kā arī iekaisuma samazināšanos un pat amiloīda plāksnīšu veidošanās novēršanu. Novērots, ka cilvēkiem ar augstu fiziskās aktivitātes līmeni, risks attīstīties AD tiek samazināts uz pusi, arī kustīgs dzīvesveids vecumdienās uzlabo kognitīvās funkcijas (Crous-Bou *et al.*, 2017). Veselīga un sabalansēta diēta, kas iekļauj augļus, dārzeņus, pilngraudu izstrādājumus, zivis, vistas gaļu, riekstus un pākšaugus, varētu pasargāt no demences attīstības (Hardman *et al.*, 2016).

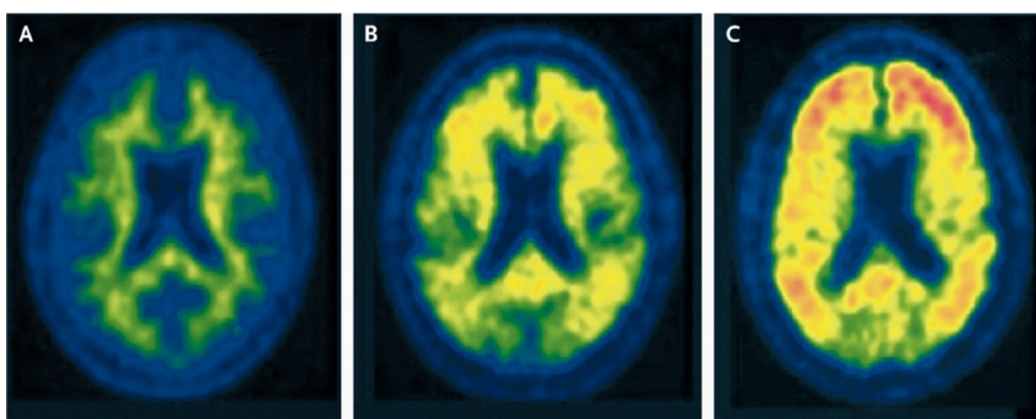
Sociāla, intelektuāla un kognitīva aktivitāte, kā arī augsts izglītības līmenis samazina AD un demences risku, izveidojot kognitīvo rezervi. Kognitīvā rezerve veicina smadzeņu spēju pretoties neiropatoloģiskiem bojājumiem, pielāgojoties apstākļiem, efektīvi izmantojot deģenerācijas neskartos smadzeņu neironu sakaru tīklus. Tā veicina spēju veikt ar domāšanu saistītus uzdevumus, neskatoties uz A β un *tau* proteīna akumulāciju (Crous-Bou *et al.*, 2017). Interesanti, ka bilinguālisms var atlikt slimības sākumu par aptuveni 4,5 gadiem, salīdzinot ar cilvēkiem, kas pārvalda vienu valodu (Guzmán-Vélez and Tranel, 2014). Kognitīvās rezerves veidošanos ietekmē ne tikai izglītības līmenis, bet arī mentāli stimulējošs darbs un aktivitātes (Stern, 2012).

1.4. Diagnostika

2011. gadā Nacionālais Novēcošanās Institūts un Alcheimera asociācija atjaunoja vadlīnijas, lai būtu iespējams ātrāk diagnosticēt slimību – jau preklīniskajā periodā. Šīs vadlīnijas ietver iepriekš neizmantotus biomarkieru testus (Sperling *et al.*, 2011). Biomarkieri ir anatomiski, fizioloģiski vai bioloģiski parametri, ko iespējams noteikt *in vivo*, un kas norāda uz specifiskiem slimību raksturojošiem patoloģiskiem procesiem. Ar biomarkieru palīdzību var noteikt slimības klātesamību vai saslimšanas risku (Jack *et al.*, 2011). Šajās vadlīnijās tika izdalītas trīs slimības attīstības stadijas. Pirmkārt, preklīniskā AD stadija, kurā ir sastopamas izmaiņas smadzenēs, bet simptomi vēl nav novērojami. Otrā stadija, kurā sastopamas smadzeņu plasticitātes izmaiņas un MIC, un trešā stadija, kurā novērojami smagi kognitīvie traucējumi, kas būtiski ietekmē atmiņu un uzvedību (Sperling *et al.*, 2011).

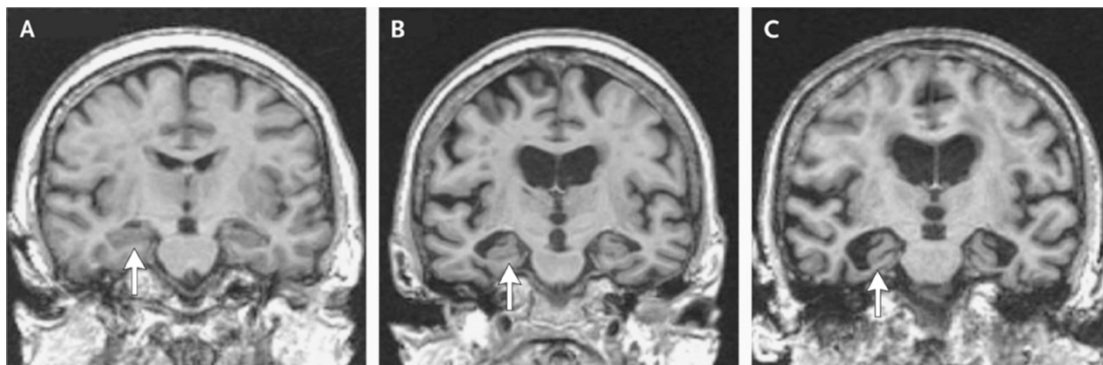
Latvijas Neurodeģeneratīvo slimību asociācijas (LNDSA) 2017. gadā izstrādātajās AD, vaskulāras demences, Levi ķermenīšu demences un frontotemporālās demences klīniskajās vadlīnijās noteikti Latvijā izmantojamie diagnostikas kritēriji. Diagnostika ietver neiropsiholoģisko kognitīvo spēju noteikšanu, tās izpēta ar neiropsiholoģisko testu un kognitīvo spēju testu. Tiek pārbaudīti dažādi atmiņas aspekti, uzmanība, izpildfunkcija, vizuāli telpiskā uztvere, domāšana, verbālās spējas, kognitīvās rezerves.

Latvijā veic arī laboratorisku izmeklēšanu, taču nepastāv rutīnas analīzes, kas apstiprinātu AD diagnozi. Tiek izmantoti biomarkieru testi, piemēram, A β deponēšanās marķieri galvas smadzenēs – zems CSŠ A β_{1-42} līmenis un paaugstināts A β_{1-42} marķiera līmenis PET attēlos norāda uz AD attīstību (1.4.1. attēls).



1.4.1. attēls. PET aksiālie smadzeņu attēli, izmantojot amiloīdu saistošo ar oglekli 11 [^{11}C] iezīmēto Pitsburga savienojumu B (*Pittsburgh Compound B*). Dzeltēnie un sarkanie rajoni iezīmē amiloīda saistošā marķiera uzkrāšanos, norādot uz amiloīda deponēšanos. Pacientam ar normālu kognīciju (A) nav novērojama marķiera uzkrāšanās, pacientam ar MCI (B) ir novērojama vidēja apmēra marķiera uzkrāšanās, un pacientam ar AD (C) ir redzama izteikta amiloīdu saistošā marķiera uzkrāšanās (Petersen, 2011).

Izmanto arī neurodeģenerācijas marķierus – palielinātu fosforilētā *tau* proteīna līmeni CSŠ un samazinātu glikozes metabolismu, ko nosaka ar PET analīzi, izmantojot fluorodeoksiglikozi (FDG-PET). Tiek pielietotas magnētiskās rezonanses attēliegūšanas (MRI) metodes, lai noteiktu neurodeģenerācijas un smadzeņu temporālās un parietālās daivas atrofiju. MRI ir izvēles attēldiagnostikas metode, ja pastāv aizdomas par demenci (*1.4.2. attēls*). Iespējams veikt arī ģenētisko testēšanu, lai noteiktu mutācijas APP, PSEN1 un PSEN2 gēnos. APOE ε4 alēles noteikšana netiek uzskatīta par lietderīgu AD diagnostikā (Gudreniece u.c., 2017).



1.4.2. attēls. Koronālie MRI attēli smadzenēm ar normālu kognīciju (A), ar MCI (B) un AD (C). Bultiņas norāda hipokampa plasticitātes izmaiņas un progresējošu atrofiju. Progresiju var novērot sākot no attēla A, tālāk B un visbeidzot C (Petersen, 2011).

1.5. Terapija

1.5.1. Pašlaik izmantotā terapija

Neviens no farmakoloģiskiem risinājumiem šobrīd nevar apstādināt vai bremsēt AD demences attīstību un neironu bojāeju, kas izraisa specifiskos simptomus (*Alzheimer's Association Report*, 2018). Eiropas Medicīnas aģentūras 2018. gadā apstiprinātajās AD ārstēšanas vadlīnijās galvenie terapijas virzieni ir simptomu izpausmju samazināšana, neiropatoloģisko procesu progresijas bremsēšana, funkcionālo un kognitīvo funkciju uzlabošana, kā arī psihiatrisko un demences simptomu ārstēšana.

Latvijas Neurodeģeneratīvo slimību asociācijas (LNDSA) 2017. gadā izstrādātajās Alcheimera slimības, vaskulārās demences, Levi ķermenīšu demences un frontotemporālās demences klīniskajās vadlīnijās aprakstīta gan farmakoloģiska, gan ne-farmakoloģiska AD ārstēšana, taču ieteikumi primārai AD profilaksei nav izstrādāti. Šajās vadlīnijās ne-farmakoloģiskai terapijai piešķirta tikpat liela nozīme kā medikamentozai ārstēšanai (Gudreniece u.c., 2017). Ne-farmakoloģiska terapija neiekļauj medikamentu izmantošanu. Šādu terapiju pielieto, lai uzturētu vai uzlabotu smadzeņu darbību, ikdienas darbību veikšanas spēju un kopējo dzīves kvalitāti. Tāpat šāda terapija var tikt pielietota ar mērķi samazināt depresiju un apātiju (*Alzheimer's Association Report*, 2018). Viens no ne-farmakoloģiskas terapijas veidiem ir mehāniskās atmiņas un ieradumu izveidošana, piemēram, izvietojot lietas strikti noteiktās vietās un nemainot šo kārtību. Tāpat noderīga ir ziņojumu dēļu lietošana, kur apkopota informācija par dienas plāniem, izvietoti atgādinājumi un tuvinieku bildes – izveidojot pacientam ieradumu aplūkot šo informāciju, tā tiek regulāri atgādināta. Attēlus pacienti bieži vien uztver labāk nekā mutiski izteiktu informāciju. Atmiņas zudumu palīdz kavēt arī socializēšanās, regulārs kontakts un diskusijas (Gudreniece u.c., 2017), kā arī jaunības dienu mīļākās mūzikas klausīšanās (*Alzheimer's Association Report*, 2018). Kognīcijas spējas uzlabo aerobikas vingrinājumi, piemēram, peldēšana un pastaigas, jo tiek stimulēta smadzeņu neoģenēze (Gudreniece u.c., 2017).

Farmakoloģiskai ārstēšanai LNDSA klīniskajās vadlīnijās minētas galvenokārt divas medikamentu grupas – holīnesterāzes inhibitori un N-metil-D-aspartāta (NMDA) receptoru antagonisti. Holīnesterāzes inhibitori (*Donepezili hydrochloridum*, *Rivastigminum*, *Galantamini hydrochloridum*) uzlabo pacientu kognitīvās funkcijas pacientiem ar mēreni un vidēji izteiktu AD, pozitīvi ietekmē atmiņas saglabāšanos, samazina neiropsihiatriskos simptomus, piemēram, psihozes un apātiju, kā arī uzvedības traucējumus. Šos medikamentus ieteicams nozīmēt uzreiz pēc diagnozes uzstādīšanas vieglas un mērenas slimības gadījumā,

taču smagā slimības attīstības stadijā holīnesterāzes inhibitoru lietošana nav pamatota un nedod pozitīvu efektu.

NMDA receptoru antagonisti (*Memantini hydrochloridum*) pozitīvi ietekmē kognitīvās funkcijas visās AD attīstības stadijās. Šo medikamentu lietošana samazina agresiju, aizkaitināmību un uzbudināmību. Psihiatrisko un uzvedības simptomu ārstēšanai izmanto arī antipsihotiskos medikamentus (*Risperidonum*), tos nozīmē pacientiem ar izteiktiem un smagiem psihiatriskiem un uzvedības simptomiem, ja iepriekš pieminēto medikamentu lietošana šos simptomus nemazina. Antipsihotisko medikamentu lietošana un nozīmēšana jāveic piesardzīgi, jo tiem ir nopietnas blaknes, piemēram, paaugstināts insulta risks, parkinsonisms, kā arī kognitīvo funkciju pasliktināšanās. Depresijas ārstēšanai pacientiem pielieto selektīvos serotonīna atpakaļsaistīšanās inhibitorus (*Sertralinum*, *Citalopramum*, *Escitalopramum*, *Fluoxitinum*) un citus antidepresantus (Gudreniece u.c., 2017).

Nemot vērā, ka AD patoģenēze saistīta ar smadzeņu neuroiekaisumu, tad terapijā ierosināts pielietot arī nesteroīdos pretiekaisuma līdzekļus (NPL), tomēr klīniskajos pētījumos gūtie rezultāti uzrāda, ka pat gadiem ilga NPL lietošana neārstē AD, vienīgi nedaudz samazina tās risku. Turklāt NPL lietošana nav lietderīga klīnisko simptomu izpausmju mazināšanai MCI vai vēlīnas slimības fāzē (Rojo *et al.*, 2008).

1.5.2. Jaunu terapiju pētniecības virzieni

Kā jau minēts, AD pašlaik ir neārstējama un medikamentozā terapija tiek lietota simptomu izpausmju samazināšanai (Folch *et al.*, 2016). Medikamentozās terapijas izstrādei pastāv dažādi darbības virzieni. Pašlaik vairāk pētīta AD terapija, kas mērķēta uz A β un *tau* proteīna izraisīto patoloģisko procesu novēršanu. Anti-amiloīdās terapijas izstrāde mērķēta uz vairākiem APP metabolisma posmiem – amiloīda transportu, sekretāzes enzīmu modulāciju, amiloīdu agregāciju un noārdīšanu. Izstrādāta arī A β oligomērus saturoša monoklonālā antivielas, ko ievada pacientam, tādā veidā stimulējot organisma imūno atbildi un kavējot A β oligomēru agregāciju, veicinot to noārdīšanu. Uz *tau* proteīnu balstītā terapija ietver *tau* proteīna fosforilācijas novēršanu, tēmējot uz glikogēna sintāzes kināzi 3 (GSK3), kas ir viens no fosforilācijā primāri iesaistītajiem enzīmiem. Tāpat ir mēģināts ieviest mikrotubuļu stabilizējošus medikamentus, *tau* proteīna oligomēru veidošanos inhibējošus medikamentus, agregācijas kavētājus, kā arī monoklonālās antivielas (Kumar *et al.*, 2015).

Lai gan daudzas AD ārstēšanai paredzētas zāļu vielas ir sasniegušas klīnisko pētījumu II fāzi, III fāzē visbiežāk atklātas nopietnas blakusparādības vai nepietiekams terapeitiskais

efekts, tādēļ kopš 2003. gada nav apstiprināta neviena jauna zāļu viela AD ārstēšanai (Hung and Fu, 2017).

Metformīns pieder pie biguanīdiem (1,1-dimetilbiguanīda hidrochlorīds) un ir visbiežāk lietotais orālais pret diabēta medikaments, kam papildus hipoglikēmiskai aktivitātei, piemīt arī seruma lipīdu profilu uzlabojoša darbība, hemostāzi veicinoša darbība, kā arī pretiekaisuma īpašības (Markowicz-Piasecka *et al.*, 2017). Metformīns darbojas kā insulīna sensitizētājs un samazina glikozes līmeni asinīs, palielinot tās uzņemšanu muskuļu šūnās. Tas samazina arī aknu glikoneoģenēzi, stimulējot AMPK darbību (Campbell *et al.*, 2017). Tā iedarbība ietver īslaicīgu svara zudumu un iekšējo orgānu tauku slāņa samazināšanu (Asadbegi *et al.*, 2016).

Metformīna biopieejamība indivīdos atšķiras – pēc orālas ievadīšanas tā var būt 50–60%. Eliminācijas pusperiods ir no 1,5 – 4 stundām. Metformīns nesaistās ar plazmas proteīniem un difundē eritrocītos. Tā izplatības tilpums svārstās no 63 līdz 276 L pēc intravenozas ievadīšanas, bet pēc orālas regulāras metformīna 2000 mg dienas devas uzņemšanas tas ir apmēram 600 L. Metformīns netiek metabolizēts, pēc perorāli (po) devas 24 stundu laikā 30–50% tiek izvadīti ar urīnu un aptuveni 30% ar fecēm neizmēģinātā veidā.

Pēdējo gadu laikā zinātnieki pievērsušies pētījumiem par metformīna iespējamu izmantošanu tādu neirodeģeneratīvu saslimšanu ārstēšanā, kā AD, amnistiski MCI un Pārkinsona slimība. Vairāki zinātniskie pētījumi apliecina, ka AD varētu raksturot kā metabolisma traucējumus smadzenēs, kuriem raksturīgs izjaukts glikozes metabolisms un utilizācija, nav iespējama enerģijas producēšana, kā arī rodas nespēja uztvert trofisko faktoru signālus insulīna rezistences dēļ. Daudzu klīnisko pētījumu rezultāti apstiprina, ka ilgstoša metformīna lietošana diabēta pacientiem uzlaboja to kognitīvās funkcijas, salīdzinājumā ar dalībniekiem, kas lietoja citus pret diabēta medikamentus. Detalizēts metformīna pozitīvās iedarbības mehānisms AD pacientu ārstēšanā nav pilnībā skaidrs, taču zinātnieki apgalvo, ka AMPK-atkarīgo signālceļu aktivācija cilvēka nervu cilmes šūnās varētu būt iemesls metformīna neiroprotektīvajai aktivitātei. AMPK ir organismam nozīmīgs faktors, kas iesaistīts lipīdu metabolismā, šūnu glikozes uzņemšanas mehānismā un mitohodriju bioģenēzē. AMPK-atkarīgo signālceļu aktivācija cilvēka nervu cilmes šūnās ir viens no potenciālajiem AD terapijas mērķiem, jo enerģijas metabolisms ir saistīts ar slimības patoģenēzi. Turklāt atklāts, ka metformīns šūnu kultūru modeļos un *in vivo* izteikti samazina BACE1 proteīna ekspresiju un aktivitāti, tādējādi samazinot BACE1 šķelšanas produktu apjomu un Aβ veidošanos. Metformīns samazina arī acetilholīnesterāzes aktivitāti un novērš acetilholīna degradāciju. Jāpiemin arī metformīna pozitīvās pretiekaisuma un antioksidatīvās īpašības – *in vitro* un *in vivo* metformīns novērš oksidatīvus bojājumus. Tas samazina iekaisuma šūnu endotēlija adhēziju, IL-1β izraisīto proteīnkināzes B un mitogēna aktivētās proteīnkināzes (p38) aktivitāti.

Turklāt metformīns regulē smadzeņu šūnu glikozes metabolismu (Markowicz-Piasecka *et al.*, 2017).

Vairāki pētījumi liecina, ka metformīns novērš kognitīvos traucējumus un atmiņas zudumu, kā arī palielina neironu dzīvotspēju un veicina neuroģenēzi. Piemēram, Alzoubi *et al.* 2014. gada pētījumā ar hronisku L–metionīna atmiņas traucējumu modeli, metformīns samazināja kognitīvos bojājumus, iespējams, samazinot oksidatīvo stresu hipokampā. Citā pētījumā ar divus gadus vecām žurkām metformīns uzlaboja to telpisko atmiņu Morisa ūdens labirinta testā (Ashrotaghi *et al.*, 2015). Ng *et al.* veiktajā pētījumā metformīna ilgstoša lietošana samazināja kognitīvo traucējumu rašanās risku vecākiem diabēta pacientiem, tādēļ arī zinātnieki atbalsta hipotēzi par metformīna pielietošanas pozitīvo ietekmi uz kognitīvo simptomu samazināšanu AD terapijā (Ng *et al.*, 2014).

2. STREPTOZOCĪNA ALCHEIMERA SLIMĪBAS MODELIS

Streptozocīns (STZ) ir glukozamīna-*nitrosurea* savienojuma atvasinājums, kas iegūts no augsnes baktērijām *Streptomyces achromogenes*. Sākotnēji tas izstrādāts kā antibiotikas un vēlāk kā pretvēža preperāts. STZ īpašību eksperimentālajiem dzīvniekiem inducēt diabēta veidošanos atklāja 1963. gadā, tāpēc mūsdienās to lieto eksperimentālos pētījumos. Laboratorijā cilvēku slimību izpētei tiek plaši izmantoti grauzēju modeļi, pamatojoties uz noteiktu līdzību patoloģisku procesu attīstībā. Kaut gan slimības modeļi netiek uzskatīti par precīziem un identiskiem slimības attīstības procesam, kas norisinās cilvēkos, pastāv savstarpējas analogijas. Lai izveidotu slimības modeli, ir jāpārzina patoloģijas attīstības mehānismi.

STZ ir selektīvi toksisks insulīnu producējošajām aizkuņģa dziedzera β šūnām, tas iedarbojas saistoties ar zemas afinitātes glikozes transporta 2 proteīnu (GLUT2), kas atrodas šūnu membrānās. STZ selektīvo iedarbību uz aizkuņģa dziedzera β šūnām var izskaidrot ar to, ka, atšķirīgi citiem *nitrosurea* savienojumiem, kas ir lipofīli un tiek ātri uzņemti šūnās, STZ ir mazāk lipofīls un tas šūnu membrānas šķērso ar GLUT2 transportiera palīdzību.

STZ citotoksicitāte lielākoties skaidrojama ar tā DNS alkilējošo darbību, kas izraisa šūnu bojāeju. STZ intracerebroventrikulāras (icv) injekcijas izraisa smadzeņu masas samazināšanos, nozīmīgu A β proteīna līmeņa palielināšanos hipokampā, kā arī hipokampa un smadzeņu garozas hiperfosforilētā *tau* proteīna līmeņa palielināšanos. Tāpat smadzeņu audos tiek izraisīts oksidatīvais stress un traucēta mitohondriju darbība, veicinot šūnu apoptozi. Mitohondriju bojājumi un oksidatīvais stress var būt saistīti ar ar glijas šūnu aktivāciju, TNF- α un brīvo radikāļu ģenerāciju. Tāpat STZ radītā hiperglikēmija rada oksidatīvo stresu, veicinot brīvo radikāļu veidošanos. STZ toksicitāte ir atkarīga no poli (ADP-ribozes) polimerāzes (PARP) klātbūtnes, grauzēji bez šī proteīna ir rezistenti pret toksīnu. Uzskata, ka palielināta ROS veidošanās organismā patoloģisku procesu rezultātā aktivē PARP. Pēc icv STZ injekcijām smadzenēs tiek novēroti insulīna transporta bojājumi, kā arī glikogēna sintāzes kināzes-3 β (GSK3 β) pāraaktivācija, samazināti glikozes transportieru līmeņi un palielināta *tau* proteīna fosforilācija (Grieb, 2015). Pēc icv injekcijas STZ mijiedarbojas ar enzīmiem, kas iesaistīti glikozes metabolismā smadzenēs, samazinot glikolīzi, un izjauc insulīna/IGF (insulīnam-līdzīgais augšanas faktors) kaskādi, izraisot insulīna rezistenci smadzenēs, kas veicina AD līdzīgu simptomu attīstību (Kraska *et al.*, 2012).

Ietekme uz smadzenēm nav tieša, jo HEB šo transporta proteīnu nav. Icv STZ injekcijas hroniski samazina cerebrālo glikozes uzņemšanu un izraisa vairākus citus efektus, kas molekulāri, patoloģiski un uzvedības ziņā līdzinās AD. Icv STZ injekcijas tiek izmantotas kā

ne-transgēns sporādiskas AD modelis un ir pielietots farmakoloģijā pre-klīniskos pētījumos jaunu AD terapiju izpētē.

Galvenie AD modeļa attīstības mehānismi ir saistīti ar insulīna rezistences veidošanos, kas izraisa neurofibrilāru deģenerāciju, samazinot PI3K-AKT signālceļa aktivizēšanu un veicinot GSK3 β pāraktivāciju, kā arī traucējot GLUT1/3 ekspresiju, kas izraisa samazinātu intraneironālu glikozes metabolismu (Grieb, 2015).

3. MATERIĀLI UN METODEDES

3.1. Dzīvnieki

Pētījumā tika izmantoti 70 *Wistar* žurku tēviņi svara robežās 280 ± 20 g, kas piegādāti no Tartu Universitātes laboratorijas dzīvnieku centra audzētavas. Dzīvnieki tika turēti Latvijas Universitātes Dabaszinātņu Akadēmiskā centra eksperimentālajās telpās, speciāli aprīkotos individuāli ventilējamās būros (*Scanbur*, GM900) – katrā būrī tika turēti 4–5 dzīvnieki. Eksperimentālajā telpā tika ievērots 12 stundu gaismas–tumsas cikls un uzturēti nemainīgi vides apstākļi – gaisa temperatūra 21–24°C, gaisa mitrums 55–60%. Dzīvniekiem tika nodrošināta brīva pieeja standarta granulētai laboratorijas barībai (*SSniff*, V1534-300) un ūdenim *ad libitum*. Visas eksperimentālās procedūras un dzīvnieku aprūpe tika veikta saskaņā ar Eiropas Savienības direktīvu 2010/63/EU “*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes*” (2010), un saskaņotas ar Pārtikas un Veterinārā dienesta Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi (Rīga, Latvija).

3.2. Eksperimenta dizains

Pēc dzīvnieku saņemšanas, tiem 7 dienas ļāva pielāgoties jaunajiem apstākļiem.

Dzīvnieki randomizēti tika iedalīti sešās grupās:

- Citrāta buferis (icv) + 0,9% NaCl (*per os*) (kontroles grupa);
- STZ (icv) + 0,9% NaCl (*per os*);
- Citrāta buferis (icv) + 75 mg/kg Metformīns (*per os*);
- Citrāta buferis (icv) + 100 mg/kg Metformīns (*per os*);
- STZ (icv) + 75 mg/kg Metformīns (*per os*);
- STZ (icv) + 100 mg/kg Metformīns (*per os*).

Eksperimenta 1. dienā tika veiktas operācijas, icv ievadot STZ vai citrāta buferi. Vispārīgajai anestēzijai tika izmantots izoflurāns (iemidzināšanai 3–3.5% un anestēzijas uzturēšanai 2%) kopā ar N₂O un O₂ maisījumu (70%:30% iemidzināšanai un 50%:50% uzturēšanai). Pēc iemidzināšanas dzīvnieki tika fiksēti, izmantojot stereotakses ierīci (*Stoelting Inc.*, ASV). Visu operācijas laiku tika kontrolēta dzīvnieku ķermeņa temperatūra (± 37 °C).

Dzīvnieku galvaskausā tika izurbti divi caurumi pēc šādām koordinātām: ± 0.72 mm anterioposteriori, ± 1.7 mm mediolaterāli un -4.0 mm dorsoventrāli no bregmas (Paxinos and Watson, 2007). Ar *Hamilton* mikroinjekcijas šļirci smadzenēs bilaterāli tika veikta icv STZ injekcija ($750 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ katram dzīvniekam) ar ātrumu $1 \mu\text{L}/\text{min}$, katrā ventrikulī ievadot $5 \mu\text{L}$. Kontroles grupai tika veikta bilaterāla icv citrāta bufera injekcija, vienā ventrikulī ievadot $5 \mu\text{L}$. Adata injekcijas vietā tika atstāta vēl 5 min, lai nodrošinātu vielu absorbciju smadzeņu audos. Operācijas tika veiktas pamatojoties uz Latvijas Universitātes Farmakoloģijas katedrā izstrādātajām standarta operāciju procedūrām (SOP nr. 2018/12/11) dzīvnieku operācijas laikā.

Pēc-operācijas periodā dzīvnieki tika apraudzīti divas reizes dienā, pēc nepieciešamības nodrošinot atsāpināšanu.

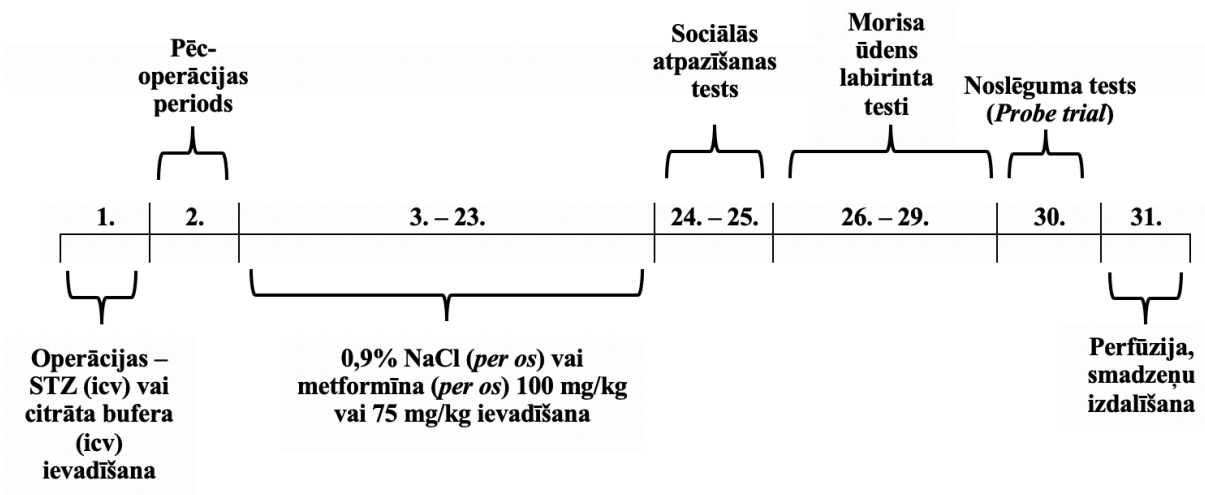
No 3. – 23. dienai žurkām tika ievadīts metformīns (*per os*) $100 \text{ mg}/\text{kg}$ vai $75 \text{ mg}/\text{kg}$, vai $0,9\%$ NaCl šķīdums (*per os*) (kontroles grupām).

Ik 7 dienas no pirmās metformīna ievadīšanas dienas žurkām tika noteikts pre-prandiālais glikozes līmenis asinīs. Testēšana tika veikta, lai pārlicinātos, ka metformīns neietekmē žurku asins glikozes līmeni. Glikozes līmeņa mērīšana tika veikta ar *Accu Check active* (Roche Diabetes Care, Inc., Vācija) glikometru un testa strēmelēm. Žurkas tika ievietotas imobilizatorā un zem astes novietots siltuma elements, lai paplašinātu astes vēnu un varētu iegūt asins paraugu. No astes tika paņemts 1 piliens asiņu (testam vajadzīgi $1-2 \mu\text{L}$) un uzlikts uz testa strēmeles, ko ievietoja glikometrā. Pēc literatūras datiem veselu žurku pre-prandiālais glikozes līmenis ir $3,95 \pm 1,31 \text{ mmol}/\text{L}$ un post-prandiālais glikozes līmenis – $5,65 \pm 1,63 \text{ mmol}/\text{L}$ (Wang *et al*, 2010). Testēšanas rezultāti uzrādīja, ka ne metformīna $75 \text{ mg}/\text{kg}$ deva, ne $100 \text{ mg}/\text{kg}$ deva perifēro glikozes līmeni žurkām neietekmēja (dati nav uzrādīti).

Pēc vielu ievadīšanas sekoja sociālās atpazīšanas testi (*social recognition tests*), ko veica 2 dienas (rezultāti redzami Ievas Laubes bakalaura darbā).

26. – 29. dienā norisinājās Morisa ūdens labirinta (*Morris water maze*) testi – vienai žurkai dienā tika veikti četri Morisa ūdens labirinta testi (rezultāti redzami Aleksandras Gžibovskas maģistra darbā)

31. eksperimenta dienā tika veikta perfūzija, smadzeņu izdalīšana, un uzglabāšana -80°C grādu temperatūrā līdz nākamajai eksperimenta daļai (3.2.1. attēls).

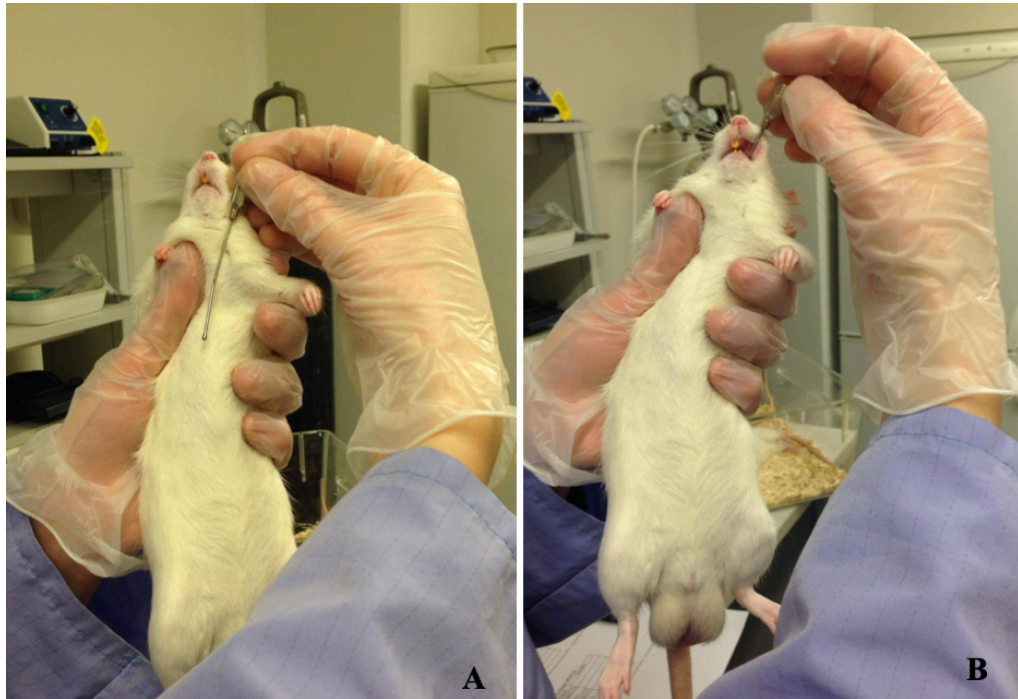


3.2.1. attēls. Eksperimenta dizaina shēma.

3.3. Metformīna ievadīšana

Metformīna ievadīšana eksperimenta dzīvniekiem tika veikta perorāli (po) ar gastrālo zondi. Šāda vielu ievadīšanas metode laboratorijas dzīvniekiem ir plaši izmantota (Turner *et al.*, 2011). Tika izmantota piemērota izmēra nerūsējošā tērauda gastrālā zonde (3.3.1. attēls), kas pirms procedūras tika sterilizēta. Tā kā metode var izraisīt dzīvniekiem stresu, pirms procedūras žurkas tika paturētas rokās un nomierinātas. Dzīvniekus pirms vielas vadīšanas maigi satvēra aiz skauņa, lai ierobežotu to galvas kustīgumu, bet saglabājot iespēju paust diskomforta sajūtu. Metformīna (100 mg/kg vai 75 mg/kg), kas izšķīdināts 0,9% NaCl, attiecīgu tilpumu iepildīja šļircē, kuras galā pievienota gastrālā zonde. Turot žurku vertikālā stāvoklī, gastrālās zondes galu maigi virzīja rīklē gar mutes kaktiņu, lai žurka to norītu (3.3.1. attēls). Kad zonde sasniedza kuņģi, ievadīja vielu.

Ja sastopama rezistence un žurka izrāda redzamu diskomfortu, iespējams, ka gastrālā zonde iekļuvusi trahejā un tā ir nekavējoties jāizņem, vielu nedrīkst ievadīt, ja ir aizdomas, ka zonde skārusi traheju. Šādam vielas ievadīšanas veidam nav ieteicams izmantot anestēziju, jo tādā gadījumā nav iespējams novērot dzīvnieka atbildi uz ievadīšanu, jo pareiza gastrālās zondes izmantošana neizraisa bojājumus.



3.3.1. attēls. Vielu ievadīšana ar gastrālo zondi. A) Gastrālās zondes garums tiek izvēlēts, lai sniegtos no žurkas mutes līdz pēdējai ribai. B) Gastrālo zondi ievada žurkai esot vertikālā stāvoklī, maigi virzot zondi gar mutes kaktiņu, lai žurka to norij.

3.4. Paraugu sagatavošana

Pirms smadzeņu paraugu sagatavošanas, smadzenes izņem no antifrīza (*antifreeze*) šķīduma, kas pagatavots no sukrozes, etilēnglikola un nātrija fosfāta šķīduma, pēc tam tās vismaz diennakti notur 30% sukrozes šķīdumā 4°C, lai nodrošinātu krioprotekciju. Griešanai izvēlētos smadzeņu audus pielīmē pie platformas ar *Jung Tissue Freezing Medium* audu līmi un sagaida, kamēr ievāktā smadzeņu daļa nekustīgi turas pie platformas. Smadzenes griež kriostatā aptuveni -25°C temperatūrā 30 µm biezumā, ievācot smadzeņu hipokampa un frontālās garozas griezumus, koordinātas tika izvēlētas balstoties uz atlasu "*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*" (Paxinos and Watson, 2007). Sagrieztos paraugus uzglabā 24 bedrīšu (4 x 6) platītē antifrīza šķīdumā pie -20 °C, katrā bedrītē liekot 5 secīgus paraugus (3.4.1. attēls). Paraugu ievākšanas secība (mm no Bregmas):

- +2.16 mm frontālās garozas griezumumi;
- -3,0 mm hipokampa paraugi.



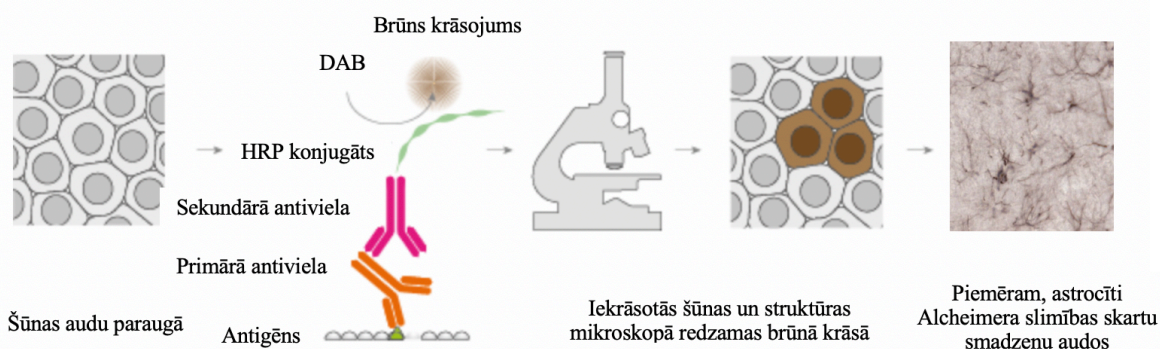
3.4.1. attēls. Smadzeņu griešana kriostatā (-25°C) un secīgu frontālās garozas un hipokampa paraugu ievākšana.

3.5. Reaģenti

Imunohistoķīmiskajā analīzē kā primārās antivielas tika izmantota monoklonālā peles antiViela pret glijas fibrilāro skābo proteīnu GFAP (G3893, *Sigma Aldrich*, ASV) un ar neironu augšanu saistītā proteīna GAP43 (B-5) monoklonālā peles IgG antiViela (sc17790, *Santa Cruz Biotechnology*, ASV). Tika izmantots kazās producētais peles antiVielu *ExtrAvidin*® peroksidāzes krāsošanas komplekts (EXTRA2-1KT, *Sigma Aldrich*, ASV), kura sastāvā ir sekundārā antiViela – kazās producētais pret-peļu Ig biotīna konjugāts (B6398) un peroksidāzes konjugāts (E8386). Paraugu krāsošana tika veikta ar 3,3'-diaminobenzidīnu (*DAB Chromogen Kit*) (06522, *Sigma Aldrich*, ASV), izmantots 3% ūdeņraža peroksīds (31642, *Sigma Aldrich*, ASV), niķeļa amonija sulfāts (11341849, *Alfa Aesar*, ASV). Izmantots streptozocīns (S0130, *Sigma Aldrich*, ASV).

3.6. Imunohistoķīmiskā analīze

Izmantojot imunohistoķīmisko analīzi iespējams noteikt plaša spektra šūnu vai audu antigēnus, sākot ar aminoskābēm un proteīniem, līdz pat infekciju izraisītājiem un specifiskām šūnu kultūrām. Metode ietver audu parauga sagatavošanu un apstrādi, piemēram, nespecifisko antivielu saistīšanās vietu bloķēšanu, endogēno peroksidāžu bloķēšanu, specifisko saistīšanās vietu atsegšanu, parauga inkubēšanu ar primārajām un sekundārajām antivielām, kā arī iekrāsošanu. Apstrādei seko audu paraugu mikroskopēšana un attēlu iegūšana, datu interpretēšana un analīze. Kopumā imunohistoķīmija ietver daudzas metodes, kas izmantojamas audu parauga satura noteikšanai ar specifiskām antivielām, ko iespējams vizualizēt iekrāsojot (3.6.1. attēls) (De Matos *et al.*, 2010).



3.6.1. attēls. Imunohistoķīmiskās analīzes pamatprincips. Audu paraugs tiek apstrādāts ar mērķproteīniem specifisku primāro un sekundāro antivielu, tad tiek inkubēts ar peroksidāzes konjugātu un iekrāsots ar DAB hromogēnu, iegūstot brūnu krāsojumu. Iekrāsotus paraugus apskata mikroskopā un uzņem attēlus (The Human Protein Atlas, 2018).

3.6.1. Antivielu imunohistoķīmiskā analīze

Smadzeņu audu koronāros griezumus skalo 1x TBS-T (*tris-buffered saline – Tween 20*) buferī 3 x 5min. Audu skalošanai parasti izmanto aptuveni 20 mL bufera.

Lai paraugs kvalitatīvāk iekrāsotos, veic specifisko antivielu saistīšanās vietu atsegšanu, karsējot tos ūdens vannā 95°C temperatūrā citrāta bufera šķīdumā (pH=6) 10 min, tad paraugus atdzesē istabas temperatūrā un atkārtoti skalo ar 1x TBS-T buferi 3x5min.

Veic inkubēšanu ar primāro antivielu (atšķaidījumā 1:1000), tumšā vietā temperatūrā 20 h. Pēc inkubēšanas paraugus skalo ar 1x TBS-T buferi 3 x 5 min.

Paraugus inkubē ar sekundāro antivielu (atšķaidījumā 1:500), uz kratītāja istabas temperatūrā 90 min. Pēc inkubēšanas skalo ar 1x TBS-T buferi 3 x 5 min.

Veic inkubēšanu ar peroksidāzes konjugātu (atšķaidījums 1:1000) istabas temperatūrā uz kratītāja 90 min. Paraugus skalo ar TBS-T buferi 3x10 min.

Veic paraugu krāsošanu ar 3,3'-diaminobenzidīnu (DAB), izmantojot 14 mL DAB bufera, kam pievieno 7 pilienus DAB hromogēna. Tieši pirms krāsošanas pievieno 28µL 30% ūdeņraža peroksīda un 600 µL 20x 1% niķeļa amonija sulfāta šķīduma. Ņemot vērā, ka DAB ir kancerogēns, procedūru veic ļoti uzmanīgi, izmantojot sejas aizsargmasku un cimdus. Paraugus ar DAB krāso ~1-2 min un tad 2x10 min skalo ar 20 mL 0.05 M nātrija fosfāta bufera šķīdumu.

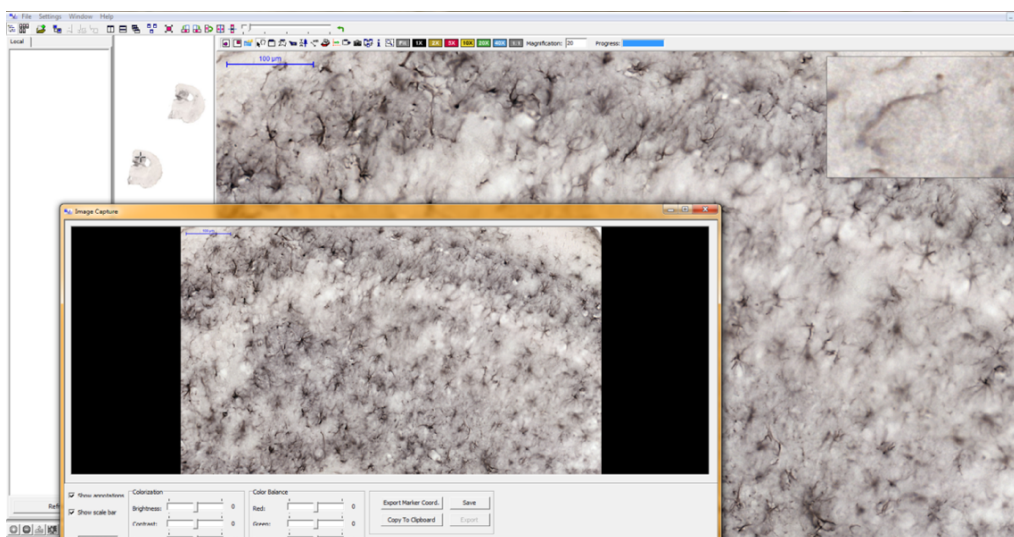
Paraugus liek uz priekšmetstikliņiem – uz viena priekšmetstikliņa novieto 2 secīgus paraugus – un liek diennakti žāvēties inkubatorā pie 37°C. Nožuvušus paraugus pārklāj ar segstikliņu, izmantojot audu līmi (*DPX Mounting Media*).

Katram biomarķierim tika izmantots visatbilstošākais imunohistoķīmiskās analīzes protokola veids, lai iegūtu iespējami kvalitatīvākus un precīzākus datus. Lai noteiktu, vai katram marķierim izmantota specifiska antiViela un vai eksperiments veikts precīzi, tika izmantota negatīvā kontrole (paraugi netika apstrādāti ar primāro antivielu).

Visu paraugu imunohistoķīmiskā analīze tika veikta vienlaicīgi.

3.7. Mikroskopēšana un attēlu uzņemšana

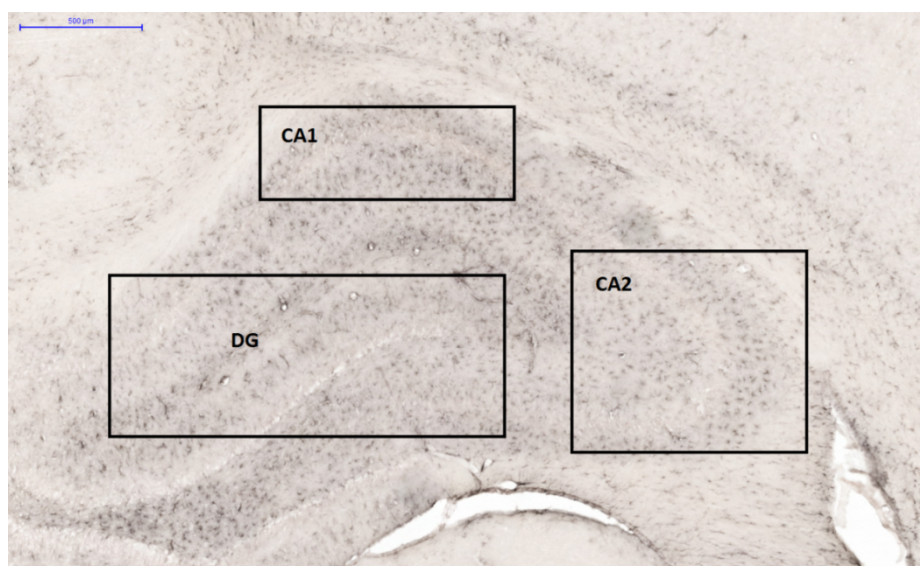
Mikroskopēšanai un attēlu uzņemšanai tika izmantots skenējošais mikroskops *Pannoramic Midi II (3HISTECH, ASV)* (ar 20x sākotnējo palielinājumu). Uzņemot attēlus, priekšmetstikliņi tika šifrēti. Visiem paraugiem tika izmantots vienāds apgaismojums, kā arī vienādi kameras iestatījumi. Hipokampa un smadzeņu garozas paraugu attēli tika uzņemti ar kopējo palielinājumu 40x *Pannoramic Viewer* programmā (3.7.1. attēls).



3.7.1. attēls. Parauga attēla (kopējais palielinājums 40x) uzņemšanas piemērs ar *Pannoramic Viewer* programmu.

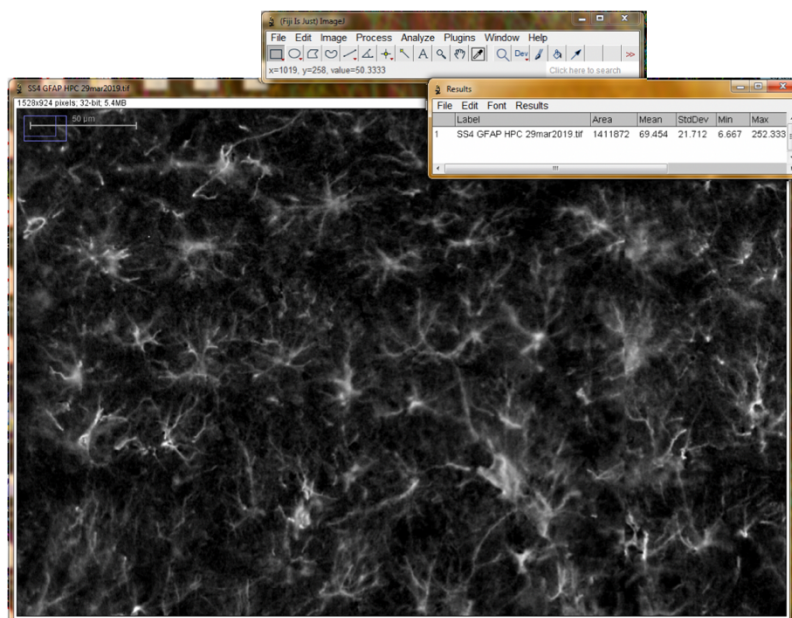
3.8. Attēlu apstrāde un statistiskā analīze

Paraugos tika analizēta smadzeņu garoza un hipokampa *cornu ammonis* (CA1, CA2) un *dentate gyrus* (DG) reģioni. Attēlu analīzei izmantota *ImageJ* attēlapstrādes programma (3.8.1. attēls).



3.8.1. attēls. Parauga attēla apstrādes piemērs ar *ImageJ* attēlapstrādes programmu. Analizētie smadzeņu reģioni: CA1 - *cornu ammonis* 1, CA2 - *cornu ammonis* 2, DG - *dentate gyrus*.

Visiem paraugu attēliem tika piemēroti 32 biti un krāsas intensitātes sliekšnis (*threshhold*) – starp attēliem bija pieļaujamas svārstības 10 iedaļu diapazonā, visus attēlus invertēja. Tika iestatīti mērījumu parametri – laukums (*area*), laukuma procenti (*area fraction*), standartnovirze (*standard deviation*), minimālās (*min*) un maksimālās (*max*) vērtības un vidējā vērtība (3.8.2. attēls). Iegūtie mērījumi tika sagrupēti un dati apvienoti tabulās izklājprogrammā *Microsoft Office Excel 2016*.



3.8.2. attēls. Parauga attēla apstrādes piemērs ar *ImageJ* attēlapstrādes programmu.

Datu statistiskā analīze veikta izmantojot statistiskās datu apstrādes programmu *GraphPad Prism 6.0* (*GraphPad Software Inc, ASV*). Rezultāti tika analizēti, izmantojot vienvirziena ANOVA testu un Sidaka post-testu. Par statistiski ticamiem tika uzskatīti dati, kuru *p* vērtība bija mazāka par 0,05 ($p < 0,05$).

4. REZULTĀTI

Šajā pētījumā STZ-izraisītā AD tipa modeļa žurkām tika perorāli ievadīts pret diabēta medikaments metformīns 75 mg/kg vai 100 mg/kg devā. Žurku smadzeņu griezumos noteicām specifisku neuroiekaisuma un neironālās plasticitātes proteīnu ekspresijas izmaiņas hipokampā un smadzeņu garozā. Analizējām iekaisuma apmēru ar astrocītu pāraktivācijas marķieri GFAP un smadzeņu plasticitātes izmaiņas, izmantojot GAP43 biomarķieri. Proteīnu ekspresijas izmaiņas tika noteiktas ar imunohistoķīmiskās analīzes metodi.

Imunohistoķīmiskā analīze tika veikta ievērojot gan telpu, gan personīgās higiēnas nosacījumus, lietojot aizsarglīdzekļus darbā ar kancerogēniem, kairinošām un gaistošām vielām. Tika ievēroti buferšķīdumu pagatavošanas un uzglabāšanas noteikumi un antivielu uzglabāšanas nosacījumi. Lai novērstu nespecifiska signāla analizēšanu, visām antivielām tika veikta negatīvā kontrole (paraugi netika inkubēti ar primāro antivielu).

Pieņemto apzīmējumu saraksts:

SAL – 0,9 % NaCl šķīdums

aCSF – citrāta buferis

STZ – streptozocīns

M75 – metformīns 75 mg/kg

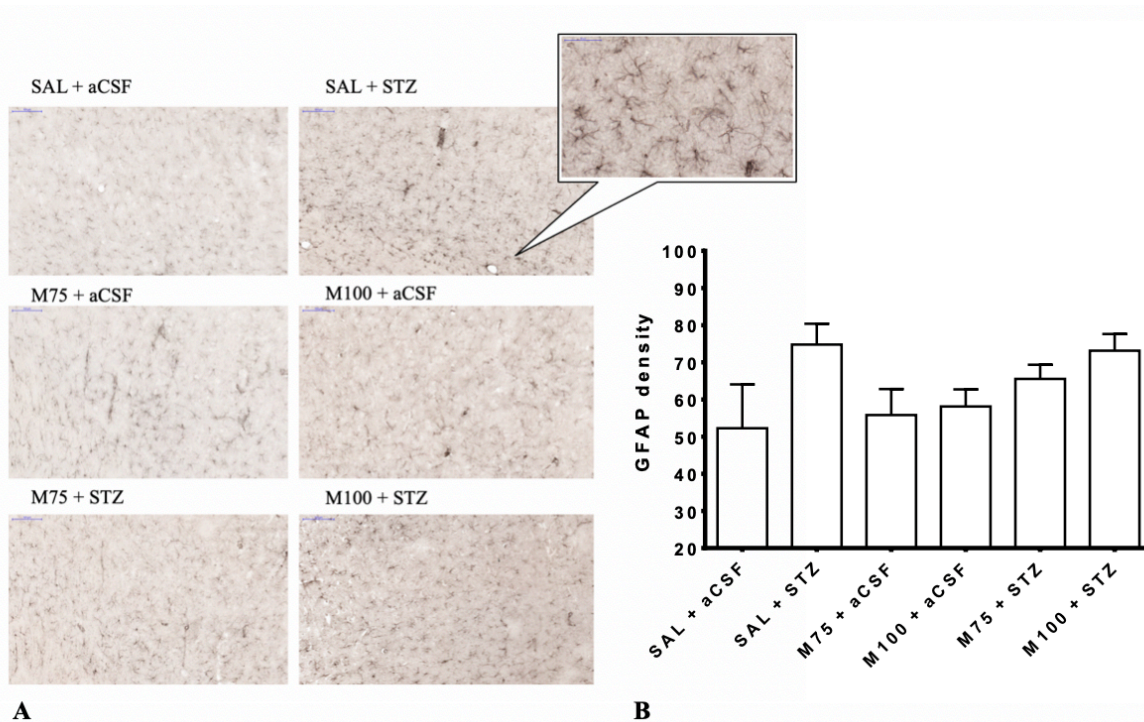
M100 – metformīns 100 mg/kg

CA1/2 – *cornu ammonis 1/2*

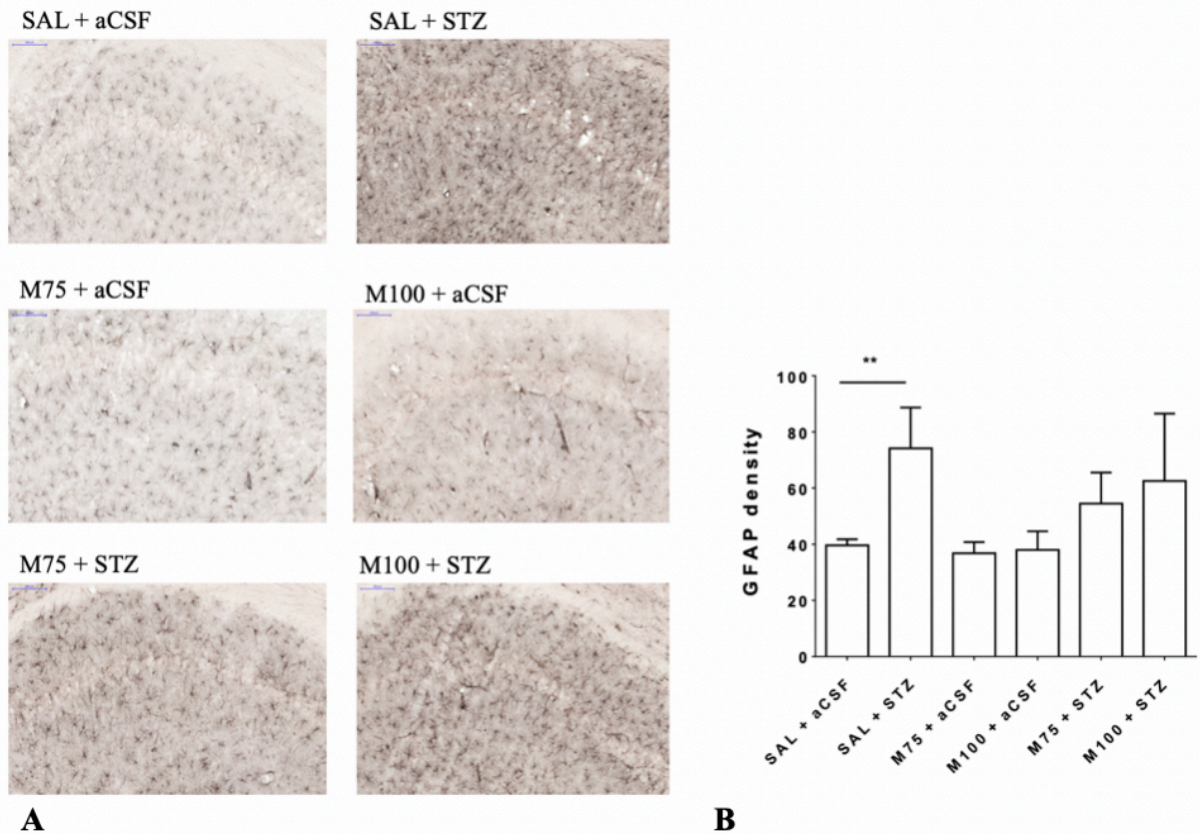
DG – *dentate gyrus*

4.1. Metformīna ietekme uz astrocītu aktivitāti STZ- izraisītā AD tipa modeļa žurku hipokampā un smadzeņu garozā

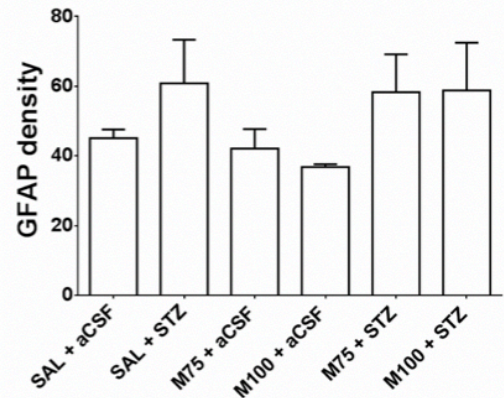
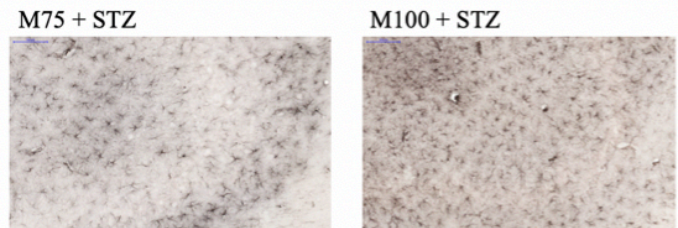
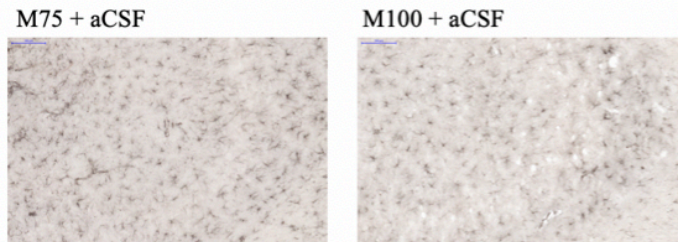
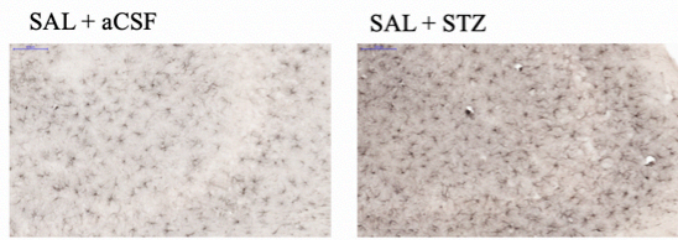
STZ palielināja GFAP ekspresiju smadzeņu hipokampā (CA1 un DG reģionos), kas norāda uz tā neuroiekaisuma veicinošajām īpašībām. Pēc imunohistoķīmiskās analīzes datiem metformīns kopumā neuzrādīja tendenci samazināt astrocītu aktivitāti ārstēšanas grupās (M75 + STZ un M100 +STZ). Statistiski nozīmīgas GFAP ekspresijas izmaiņas novērojamas tikai vienā grupā (M75 + STZ) hipokampa DG reģionā.



4.1.1. attēls. GFAP ekspresijas izmaiņas žurku modeļu smadzeņu garozā. A) Attēlā redzama GFAP ekspresija grupām: SAL + aCSF, SAL + STZ, M75 + aCSF, M100 + aCSF, M75 + STZ, M100 + STZ. Attēli iegūti, izmantojot 40x palielinājumu, attēlu mērogs – 100 μ m (mazajam attēlam izmantots 60x palielinājums un mērogs ir 50 μ m). B) Nav novērojama statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles (SAL + aCSF), modeļa kontroles (SAL + STZ) un metformīna abu devu kontroles (M75 + aCSF, M100 + aCSF), kā arī ārstēšanas (M75 + STZ, M100 + STZ) grupām.



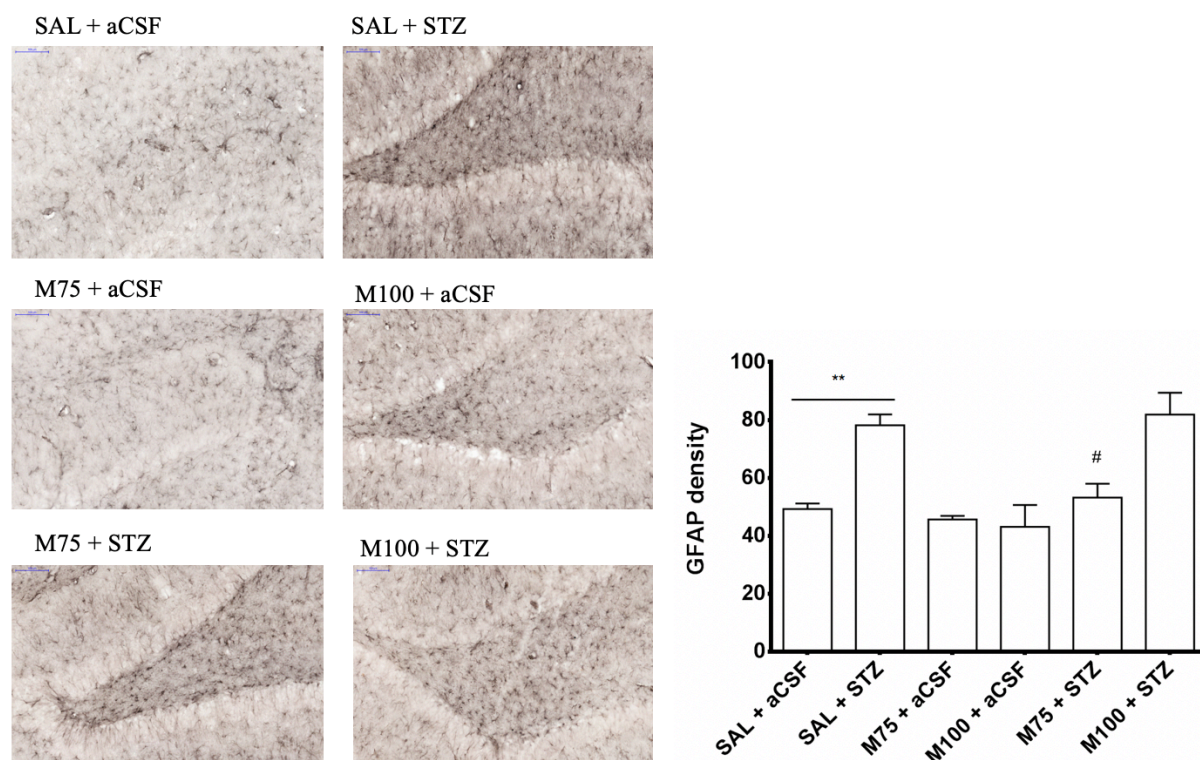
4.1.2. attēls. GFAP ekspresijas izmaiņas žurku modeļu hipokampa CA1 reģionā. A) Redzams, ka astrocītu aktivācijas marķiera GFAP ekspresija kontroles grupā (SAL + aCSF) ir mazāka nekā modeļa kontroles grupā (SAL + STZ), kas apstiprina, ka STZ veicina neuroiekaisuma veidošanos. Audu iekrāsošana veikta ar DAB. Attēli uzņemti ar 40x palielinājumu, mērogs 100 μ m. B) Novērojama statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles (SAL + aCSF) un modeļa (SAL + STZ) grupu (** $p < 0,01$). Metformīna 75 mg/kg deva uzrāda tendenci samazināt GFAP ekspresiju.



A

B

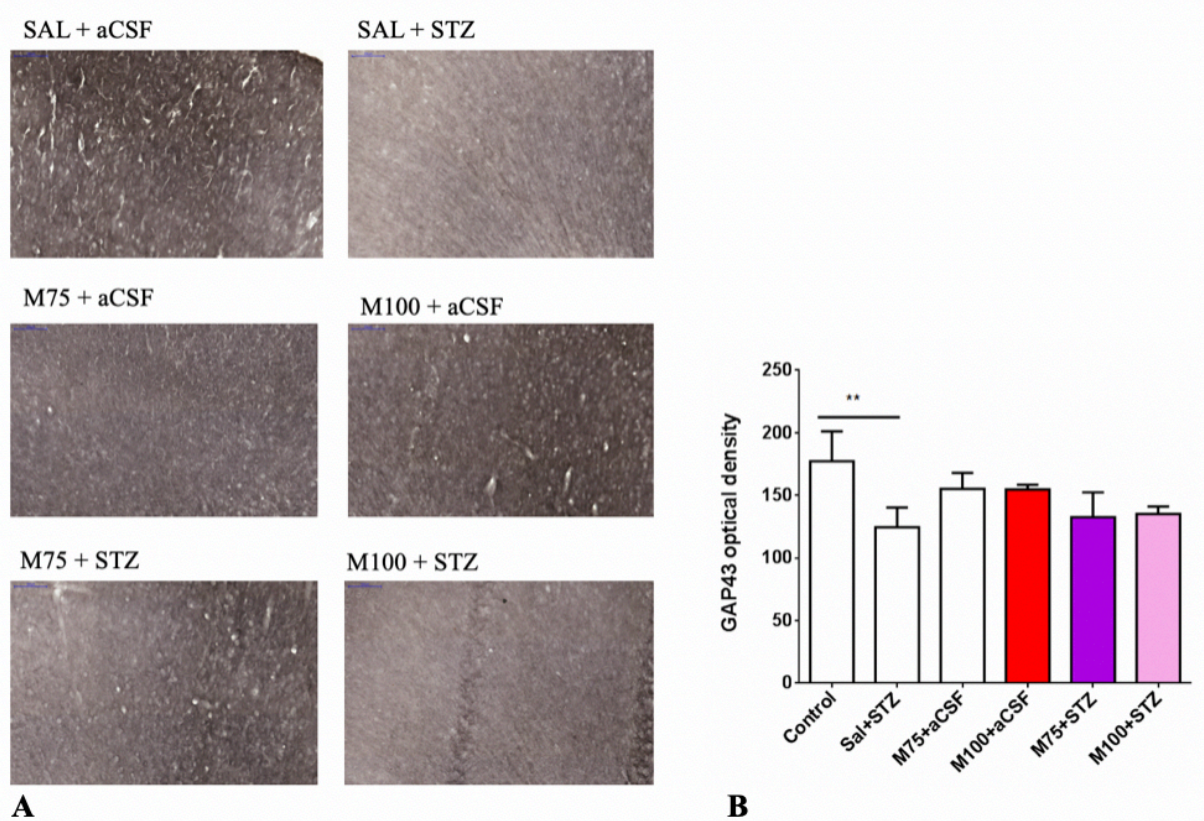
4.1.3. attēls. GFAP ekspresijas izmaiņas žurku modeļu hipokampa CA2 reģionā. A) Attēlā redzams, ka modeļa kontroles grupā (SAL + STZ) GFAP ekspresija ir lielāka un krāsojums intensīvāks, nekā kontroles grupā (SAL + aCSF) vai metformīna kontroles grupās (M75 + aCSF, M100 + aCSF). Smadzeņu audu paraugi iekrāsoti ar DAB. Attēli uzņemti ar 40x lielu palielinājumu, attēlu mērogs ir 100 μ m. B) Nav novērojama statistiski nozīmīga atšķirība grupu starpā.



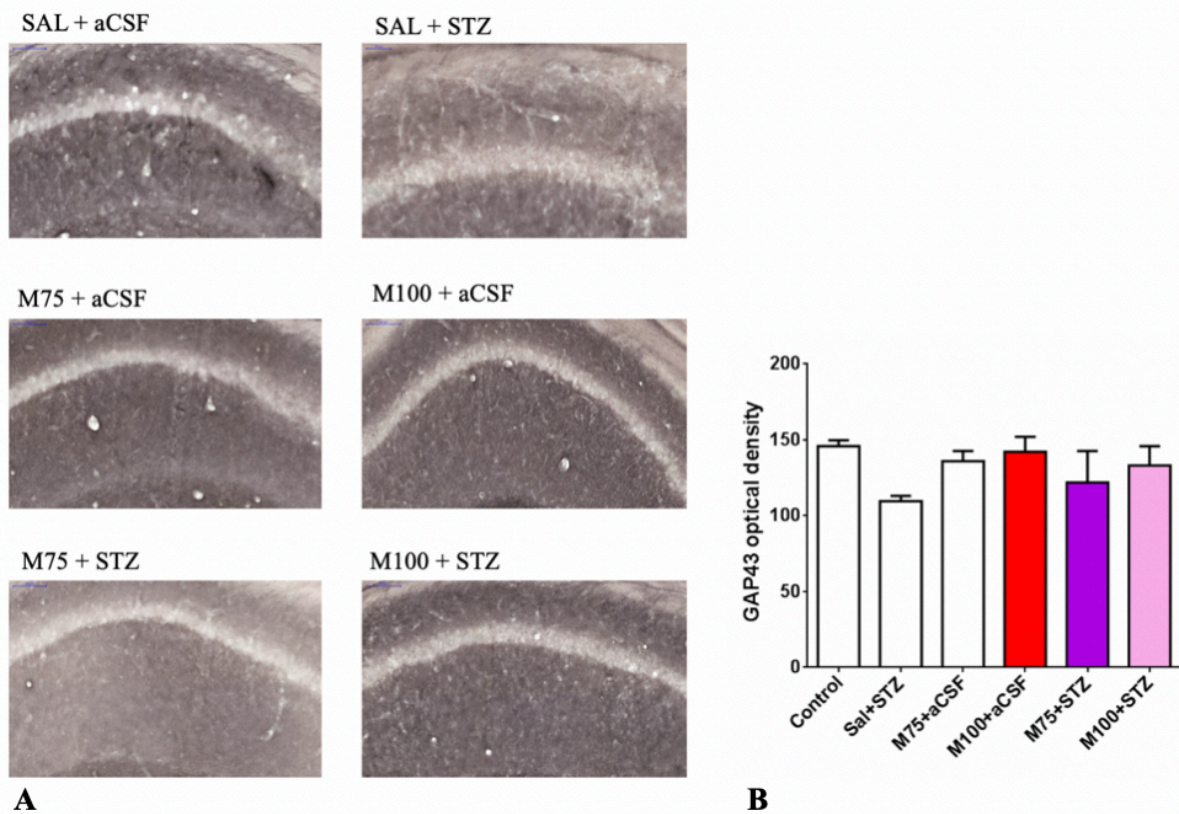
4.1.4. attēls. GFAP ekspresijas izmaiņas žurku modeļu hipokampa DG reģionā. A) Novērojama atšķirība starp astrocītu aktivitāti kontroles grupā (SAL + aCSF) un modeļa grupai (SAL + STZ), kas norāda uz izdevušos modeli. Attēlos redzams intensīvāks krāsojums arī ārstēšanas grupās (M75 + STZ, M100 +100). Attēli iegūti, izmantojot 40x lielu palielinājumu, mērogs ir 100 μ m. B) Pastāv statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles (SAL + aCSF) un modeļa (SAL + STZ) grupu (** $p < 0,01$), modeļa kontroles grupā GFAP ekspresija ir lielāka. Statistiski ticama atšķirība novērojama arī metformīna 75 mg/mg ārstēšanas grupā (M75 + STZ) salīdzinot ar bojājuma kontroli (SAL+STZ) (# $p < 0,05$).

4.2. Smadzeņu neironālās plasticitātes izmaiņas STZ-izraisītā AD tipa modeļa žurku hipokampā un smadzeņu garozā

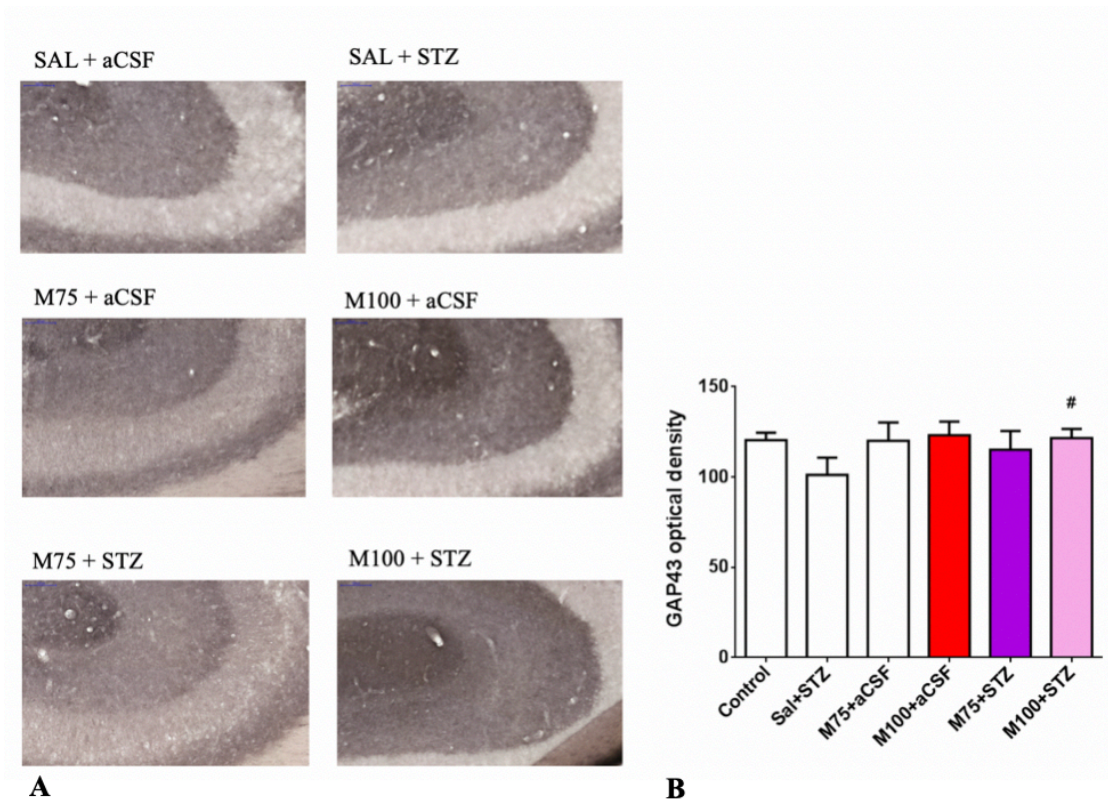
Tika novērota neironālās plasticitātes marķiera GAP43 samazināta ekspresija STZ ietekmē smadzeņu garozā un hipokampā, kas norāda uz to, ka STZ ietekmē neironālo plasticitāti un modelis ir izdevies. Metformīna (M100 + STZ) tendence samazināt STZ izraisītos neironālās plasticitātes traucējumus novērojama tikai smadzeņu hipokampa CA2 reģionā. Pārējos hipokampa reģionos un garozā metformīna devas (75 mg/kg un 100 mg/kg) nenovērsa STZ izraisīto neironālās plasticitātes samazinājumu.



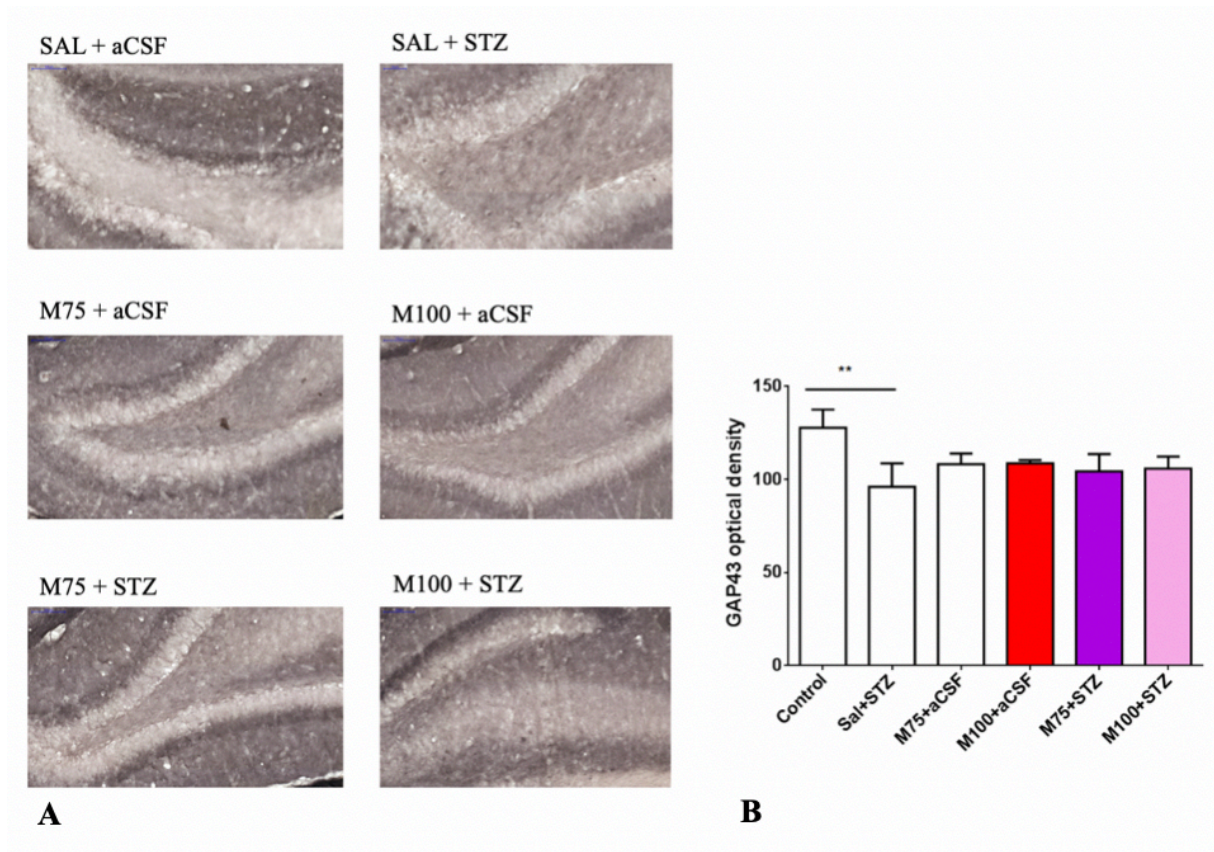
4.2.1. attēls. GAP43 ekspresijas izmaiņas žurku modeļu smadzeņu garozā. A) Attēlā redzama GAP43 neironālās plasticitātes marķiera ekspresijas izmaiņas starp grupām – SAL + aCSF (kontrolē), SAL + STZ (modeļa kontrolē), M75 + aCSF, M100 + aCSF (metformīna kontrolē grupas) M75 + STZ, M100 + STZ (ārstēšanas grupas). Imunohistoķīmiskā iekrāsošana veikta ar DAB, izmantots 40x liels palielinājums, attēla mērogs ir 100 μm. B) Novērojama statistiski nozīmīga atšķirība starp kontrolē grupu (SAL + aCSF) un bojājuma kontrolē grupu (SAL + STZ), GAP43 vairāk ekspresēts kontrolē grupā, kas norāda, ka STZ samazina neironālo plasticitāti smadzeņu garozā (**p<0,01).



4.2.2. attēls. GAP43 optiskās ekspresijas izmaiņas žurku modeļu hipokampa CA1 reģionā. A) Paraugiem veikta imunohistoķīmiskā analīze, tie iekrāsoti ar DAB, izmantots 40x palielinājums. Attēla mērogs ir 100 μ m. B) Starp grupām nepastāv statistiski nozīmīga atšķirība GAP43 ekspresijā.



4.2.3. attēls. GAP43 optiskās ekspresijas izmaiņas hipokampa CA2 reģionā. A) Paraugiem veikta imunohistoķīmiskā analīze. Attēlu iekrāsošanai pielietots DAB, izmantots 40x liels palielinājums, attēlu mērogs ir 100 μm . B) Redzama statistiski nozīmīga atšķirība metformīna 100 mg/kg devas ārstēšanas grupai (M100 + STZ) salīdzinot ar bojājuma kontroles grupu (SAL + STZ) ($\#p < 0,05$).



4.2.4. attēls. GAP43 optiskās ekspresijas izmaiņas hipokampa DG reģionā. A) Adu paraugu krāsošana veikta ar DAB, izmantots 40x palielinājums, mērogs 100 μ m. B) Starp kontroles grupu (SAL + aCSF) un modeļa kontroles grupu (SAL +STZ), kur tā ir samazināta, kas liecina, ka STZ traucē neironālo plasticitāti un modelis ir izdevies (** $p < 0,01$).

5. DISKUSIJA

Lai gan pirmo reizi AD diagnosticēta jau pagājušā gadsimta sākumā, 1906. gadā, kad šo slimību identificēja vācu psihiatrs Alois Alzheimers, tā joprojām ir neārstējama neurodeģeneratīva saslimšana un cēlonis līdz pat 60 – 70% visu demences gadījumu. Turklāt, ņemot vērā, ka populācijas vidējais vecums pēdējā gadsimta laikā ir pieaudzis, arī slimības izplatība strauji augusi, palielinājušās ārstēšanas izmaksas un sociālais slogs (Hung and Fu, 2017).

Pašlaik medikamentozā terapija paredzēta simptomātiskai ārstēšanai, galvenokārt pielietoti acetilholīnesterāzes inhibitori (rivastigmīns, galantamīns un donepezils) un memantīns (NMDA receptoru antagonists). Šie medikamenti neārstē AD, kā arī neapstādina demences attīstību – to lietošana pamatojas uz kognitīvo funkciju veicināšanu un uzturēšanu, kā arī acetilholīna līmeņa regulāciju (Hung and Fu, 2017). Jau vairāk nekā 15 gadus nav reģistrēti jauni medikamenti, kuru indikācija būtu AD ārstēšana – vairākums zāļu vielu klīnisko pētījumu izrādās neveiksmīgi II vai III klīniskajā fāzē (Hung and Fu, 2017). Ņemot vērā, ka jaunu medikamentu ieviešana klīniskajā praksē ir laikietilpīgs un sarežģīts process, tāpēc bieži vien tiek pētīts jau esošu medikamentu pielietojums vēl neapstiprinātām indikācijām.

Pētījumā analizējām pret-diabēta medikamenta metformīna efektus uz neuroiekaisumu un smadzeņu neironālo plasticitāti smadzeņu garozā un hipokampa reģionos. Hipokamps ir viens no pirmajiem smadzeņu reģioniem, ko skar AD, tas atrodas smadzeņu mediālajā temporālajā daivā. Šīs daivas atrofija izraisa AD raksturīgu progresējošu atmiņas zudumu, jo īpaši traucējot īstermiņa atmiņas veidošanos. Bojājums šajā smadzeņu reģionā ietekmē atmiņu nostiprināšanos smadzenēs (Hort *et al.*, 2010). AD pacientiem hipokampā novērojams sinapšu zudums, turklāt šīs plasticitātes izmaiņas korelē ar kognitīvo funkciju traucējumu apjomu (Mufson *et al.*, 2015). Patoloģiskas izmaiņas hipokampā ir cēlonis atmiņas traucējumiem, bet smadzeņu garozas izmaiņas saistītas ar orientācijas zudumu un apātiju (Scharre *et al.*, 2016). Šajā pētījumā izmantotajam STZ-izraisītā AD tipa modeļa žurkas. STZ icv injekcijas izraisa AD raksturīgu smadzeņu atrofiju (Grieb, 2015).

Šajā darbā tika analizētas 6 grupas: SAL + aCSF, SAL + STZ, M75 + aCSF, M100 + aCSF, M75 + STZ, M100 + STZ. Kā neuroiekaisuma marķieri izmantotajam specifiska astrocītu proteīna GFAP ekspresijas izmaiņas. STZ bojājuma modeļa kontroles grupā (SAL + STZ) uzrādīja tendenci palielināt GFAP ekspresiju hipokampā, īpaši CA1 un DG reģionos. Ir pierādīts, ka neuroiekaisumā, kas attīstās AD pacientu smadzenēs, iesaistās glijas šūnas. Astroglīozes rezultātā, kas rodas astrocītu pāraktivācijas gadījumā, tiek neatgriezeniski bojāti smadzeņu audi (Li *et al.*, 2011). GFAP ir viens no plašāk izmantotajiem marķieriem astrocītu

reaktivācijas noteikšanai (Fagan and Perrin, 2012). Rezultāti liecina, ka STZ izraisa neuroiekaisumu, tāpēc bojājuma modelis ir izdevies. Metformīna (75 mg/kg) ietekme uz astrocītu aktivitāti novērojama tikai hipokampa DG reģionā, bet metformīna 100 mg/kg ārstēšanas grupā nav novērojama astroglīozes samazināšanās nevienā no apskatītajiem smadzeņu reģioniem.

Lai noskaidrotu metformīna ietekmi uz neironālās plasticitātes izmaiņām STZ-izraisītā AD tipa modeļa žurkās, izmantojām GAP43 – ar neironālo plasticitāti saistītu proteīnu, kura ekspresija tiek palielināta neironālās attīstības un sinapšu veidošanās laikā, tāpat arī atmiņu nostiprināšanās un mācīšanās procesos. Šis proteīns lielākā koncentrācijā atrodams ar atmiņu un kognīciju saistītos reģionos – hipokampā, smadzeņu garozā un subkortikālajās struktūrās (Rahmati and Kazemi, 2019). Rezultāti liecina, ka STZ traucē neironālo plasticitāti smadzeņu garozā un hipokampā, samazinot GAP43 līmeni. Metformīna 100 mg/kg deva uzrādīja tendenci uzlabot neironālo plasticitāti hipokampā, palielinot GAP43 ekspresiju. Garozā šī proteīna ekspresijas izmaiņas grupu starpā netika novērotas.

Lai pārbaudītu metformīna devu (75mg/kg un 100 mg/kg) iespējamo toksicitāti, pētījumā tika iekļautas tā kontroles grupas (M75 + aCSF, M100 + aCSF). Metformīns kontroles grupās neuzrādīja nozīmīgu statistisku atšķirību salīdzinājumā ar kontroles grupu (SAL + aCSF). Tas pierāda, ka metformīns 75 mg/kg un 100 mg/mg devā neveicina astrocītu aktivēšanos un neuroiekaisuma attīstību, kā arī negatīvi neietekmē smadzeņu neironālo plasticitāti.

Jau iepriekš veikti pētījumi, kuros ar dažādu marķieru palīdzību noskaidrota metformīna ietekme uz kognitīvajām funkcijām. Bhutada *et al.* pētījumā 2011. gadā tika noteikts oksidatīvā stresa apjoms, vadoties pēc glutaciona līmeņa un lipīdu peroksidācijas pakāpes, kā arī apskatītas holīnerģiskās sistēmas funkcijas, izmantojot holīnesterāzes (ChE) aktivitāti kā marķieri. Šajā pašā pētījumā STZ diabēta žurku modelim tika novēroti atmiņas un mācīšanās traucējumi, kas saistīti ar lipīdu peroksidāciju un ChE aktivitāti. Hroniska ārstēšana (30 dienas) ar metformīna devu 500 mg/kg ievērojami uzlaboja kognitīvās funkcijas, samazināja oksidatīvo stresu un ChE aktivitāti. Statistiski nozīmīgs efekts uz ChE aktivitātes samazināšanu, ievadot metformīna devu 500 mg/kg īslaicīgi (5 dienas), netika novērots. Mūsu pētījumā metformīns tika ievadīts 21 dienu, izmantojot devas 75 mg/kg vai 100 mg/kg, kas ir daudz mazākas nekā izmantoja Bhutada *et al.*

Ņemot vērā, ka hroniska neuroiekaisuma veidošanās ir ilgstošs process, iespējams, ka trīs nedēļu metformīna terapija, kā tas bija mūsu pētījumā, varētu būt parāk īsa, lai spētu ietekmēt neuroiekaisuma procesus. Turklāt tā, kā neuroiekaisums traucē neironālās reģenerācijas procesus (Li *et al.*, 2011) un pastāv korelācija starp neuroiekaisumu un neironālās plasticitātes izmaiņām, metformīns, līdzīgi kā neuroiekaisumu, nespēja ietekmēt arī neironālo plasticitāti.

Šis darbs ir daļa no plašāka pētījuma, kurā apskatīti arī citi marķieri un veikti uzvedības testi. Veikti Morisa ūdens labirinta (*Morris water maze*) testi un sociālās atpazīšanas testi (*social recognition tests*), kā arī noteikta glikozes homeostāzē iesaistītu proteīnu ekspresija (GLUT3 un GSK3) ar *Western blot* metodi. GLUT3 un GSK3 ekspresijas analīze uzrādīja, ka metformīns pozitīvi ietekmē glikozes metabolismu un transportu smadzeņu audos (rezultātus skatīt Aleksandras Gžibovskas maģistra darbā). Tādēļ domājams, ka metformīna pozitīvā iedarbība uz AD simptomu samazināšanu varētu būt saistīta ar glikozes metabolisma normalizēšanu un transporta kontroli. Šie nav pētījuma gala rezultāti, iegūto audu paraugu analīze turpinās. Lai precizētu imunohistoķīmiskās analīzes datus, tiks veikta papildus paraugu analīze, palielinot bioloģisko atkārtojumu skaitu (n skaitu).

Literatūras dati par metformīna ietekmi uz CNS un tā potenciālo darbību AD ārstēšanā ir ierobežoti. Pārsvarā veikti *in vitro* pētījumi, taču *in vivo* pētījumi lielākoties ir īstermiņa un tajos izmantoti relatīvi jauni dzīvnieki (Markowicz-Piasecka *et al.*, 2017). Šis ir pirmais pētījums, kurā metformīna iedarbība pārbaudīta AD tipa dzīvnieku modelī.

Kopumā pēc iegūtajiem datiem tiecamies domāt, ka metformīns neietekmē GFAP un GAP43 ekspresiju, jo tā neiroprotektīvās darbības mehānisms nav vērsts uz neuroiekaisuma vai neironālās plasticitātes procesiem. Tādēļ pētījums jāturpina, lai noskaidrotu caur kādu mehānismu metformīns realizē tā neiroprotektīvo efektu.

6. SECINĀJUMI

1. Metformīna devu (75 mg/kg un 100 mg/kg) ietekme uz GFAP un GAP43 ekspresiju smadzenēs ir minimāla. Tas nesamazina astrocītu pāraktivāciju (neietekmē GFAP ekspresiju) un neatjauno neironālo plasticitāti (neizmaina GAP43 ekspresiju).
2. Pētījums kopumā liecina, ka pret diabēta medikaments metformīns neietekmē STZ-izraisītos smadzeņu neironālās plasticitātes traucējumus un nesamazina astrocītu hiperaktivāciju AD tipa modeļa žurkās.
3. Pētījums jāturpina, lai noskaidrotu metformīna neiroprotektīvās darbības mehānismu, piemēram, pārbaudot ietekmi uz smadzeņu neirotrofisko faktoru BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), sinaptisko plasticitāti (sinaptofizīnu 1), mikroglijas pāraktivācijas marķieri Iba-1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*) un citiem specifiskiem biomarķieriem.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt vislielāko pateicību darba vadītājai Mg. pharm. Karīnai Narbutei par pētījuma izstrādes gaitā sniegto palīdzību, veltīto laiku, padomiem un ierosinājumiem, kā arī par unikālo pieredzi un vērtīgajām iemaņām, ko ieguvu, veicot pētījuma eksperimentālo daļu. Pateicos Mg. pharm. Vladimiram Piļipenko par palīdzību imunohistoķīmiskās analīzes veikšanā un darba izstrādē.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. **Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., et al.** The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* (2011), 7(3): 270–279.
2. **Alzheimer's Association Report.** 2018 Alzheimer's disease facts and figures *Alzheimer's & Dementia* (2018), 14(3): 367–429.
3. **Alzoubi, K. H., Khabour, O. F., Al-Azzam, S. I., et al.** Metformin Eased Cognitive Impairment Induced by Chronic L-methionine Administration: Potential Role of Oxidative Stress. *Current neuropharmacology* (2014), 12(2): 186–192.
4. **Asadbegi, M., Yaghmaei, P., Salehi, I., et al.** Neuroprotective effects of metformin against A β -mediated inhibition of long-term potentiation in rats fed a high-fat diet. *Brain Research Bulletin* (2016), 121: 178-185.
5. **Ashroostaghi, Z., Ganji, F., Sepehri, H.** Effect of metformin on the spatial memory in aged rats. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology* (2015), 5(5): 416-420.
6. **Bateman, R. J., Xiong, C., Benzinger, T. L. S., et al.** Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* (2012), 367(9): 795–804.
7. **Baumgart, M., Snyder, H. M., Carrillo, M. C., et al.** Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimer's & Dementia* (2015), 11(6): 718–726.
8. **Bhutada P., Mundhada Y., Bansod K., et al.** Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Behavioural Brain Research* (2011), 220(1): 30–41.
9. **Bird T. D.** Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* (2008), 10(4): 231-9.
10. **Blennow, K., De Leon, M. J., Zetterberg, H.** Alzheimer's disease. *The Lancet* (2006), 368(9533): 387-403.
11. **Boche, D., Perry, V. H., Nicoll, J. A. R.** Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology* (2013), 39(1): 3-18.

12. **Breydo, L., Kurouski, D., Rasool, S., et al** Structural differences between amyloid beta oligomers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2016), 477(4): 700–705.
13. **Campbell, J. M., Stephenson, M. D., de Courten, B., et al.** Metformin and Alzheimer's disease, dementia and cognitive impairment. *JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports* (2017), 15(8): 2055–2059.
14. **Carter, F. S., Herholz, K., Rosa-Neto, P., et al.** Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends in Molecular Medicine* (2019), 25(2) : 77-95.
15. **Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., et al.** Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* (2018), 14: 450–464.
16. **Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., et al.** Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta pharmacologica Sinica* (2017), 38(9): 1205-1235.
17. **Cherry, J. D., Olschowka, J. A., O'Banion, M.** Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation* (2014), 11(1): 98.
18. **Cisternas, P., Inestrosa, N. C.** Brain glucose metabolism: Role of Wnt signaling in the metabolic impairment in Alzheimer's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* (2017), 80: 316–328.
19. **Crous-Bou, M., Minguillón, C., Gramunt, N., et al.** Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimer's Research & Therapy* (2017), 9(1): 71.
20. **De Matos, L. L., Trufelli, D. C., Luongo De, et al.** Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights* (2010), 5: 9-20.
21. **Dharmarajan, T. S., Gunturu, S. G.** Alzheimer's disease: a healthcare burden of epidemic proportion. *American health & drug benefits* (2009), 2(1): 39-47.
22. **Duan, Y., Dong, S., Gu, F., et al.** Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: focusing on tau-mediated neurodegeneration. *Translational neurodegeneration* (2012), 1(1): 24.
23. **European Medicines Agency.** Guideline on the clinical investigation of medicines for the treatment of Alzheimer's disease (2018). Pieejams tiešsaitē: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-investigation-medicines-treatment-alzheimers-disease-revision-2_en.pdf], skatīts [11.03.19].
24. **Fagan, A. M., Perrin, R. J.** Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomarkers in medicine* (2012), 6(4): 455-76.

25. **Fiest, K., Roberts, J., Maxwell, C., et al.** The Prevalence and Incidence of Dementia Due to Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Canadian Journal of Neurological Sciences* (2016), 43(S1): S51-S82.
26. **Filippi, M., Agosta, F., Barkhof, F., et al.** EFNS task force: the use of neuroimaging in the diagnosis of dementia. *European Journal of Neurology* (2012), 19(12): 1487–1501.
27. **Folch, J., Petrov, D., Ettcheto, M., et al.** Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. *Neural Plasticity* (2016), 2016: 1–15.
28. **Gregory, S., Long, J. D., Klöppel, S., et al.** Operationalizing compensation over time in neurodegenerative disease. *Brain* (2017), 140(4): 1158–1165.
29. **Grieb, P.** Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular Neurobiology* (2015), 53(3): 1741–1752.
30. **Gudala, K., Bansal, D., Schifano, F., et al.** Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of diabetes investigation* (2013), 4(6): 640-50.
31. **Gudreniece A., Paegle I., Karelis G., u.c.** Alcheimera slimības, vaskulāras demences, Levi ķermenīšu demences un frontotemporālās demences klīniskās vadlīnijas. Latvijas Neurodeģeneratīvo slimību asociācija (2017), 20-162. Pieejams tiešsaitē: [<https://spkc.gov.lv/uploads/files/59df1724400d4.pdf>], skatīts [11.03.19].
32. **Guzmán-Vélez, E., Tranel, D.** Does bilingualism contribute to cognitive reserve? Cognitive and neural perspectives. *Neuropsychology* (2014), 29(1): 139-50.
33. **Hardman, R. J., Kennedy, G., Macpherson, H., et al.** Adherence to a Mediterranean-Style Diet and Effects on Cognition in Adults: A Qualitative Evaluation and Systematic Review of Longitudinal and Prospective Trials. *Frontiers in nutrition* (2016), 3: 22.
34. **Hardy, J., Selkoe D. J.** The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* (2002), 297(5580): 353–356.
35. **Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., et al.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* (2015), 14(4): 388–405.
36. **Hol, E. M., Pekny, M.** Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology* (2015), 32: 121–130.
37. **Holtmaat, A., Svoboda, K.** Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience* (2009), 10(9): 647–658.

38. **Hort, J., O'Brien, J. T., Gainotti, G., et al.** EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology* (2010), 17(10): 1236–1248.
39. **Hovens, I., Nyakas, C., Schoemaker, R.** A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunology and Neuroinflammation* (2014), 1: 82-88.
40. **Hung, S. Y., Fu, W. M.** Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *Journal of Biomedical Science* (2017), 24(1): 47.
41. **Jack, C. R., Albert, M. S., Knopman, D. S., et al.** Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* (2011), 7(3): 257-62.
42. **Karch, C. M., Cruchaga, C., Goate, A. M.** Alzheimer's Disease Genetics: From the Bench to the Clinic. *Neuron* (2014), 83(1): 11–26.
43. **Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., et al.** Physiology of Microglia. *Physiological Reviews* (2011), 91(2): 461–553.
44. **Knezevic, D., Mizrahi, R.** Molecular imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (2018), 80: 123–131.
45. **Koenig, A. M., Mechanic-Hamilton, D., Xie, S. X., et al.** Effects of the Insulin Sensitizer Metformin in Alzheimer Disease: Pilot Data From a Randomized Placebo-controlled Crossover Study. *Alzheimer disease and associated disorders* (2017), 31(2): 107-113.
46. **Korzhevskii, D. E., Kirik, O. V.** Brain Microglia and Microglial Markers. *Neuroscience and Behavioral Physiology* (2016), 46(3): 284–290.
47. **Kraska, A., Santin, M. D., Dorieux, O., et al.** In vivo cross-sectional characterization of cerebral alterations induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin. *PloS one* (2012), 7(9): e46196.
48. **Kumar, A., Singh, A., Ekavali.** A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports* (2015), 67(2): 195–203.
49. **Li, C., Zhao, R., Gao, K., et al.** Astrocytes: Implications for Neuroinflammatory Pathogenesis of Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research* (2011), 8(1): 67–80.
50. **Li, Y., Tan, M.-S., Jiang, T., et al.** (2014). Microglia in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* (2014), 1–7.
51. **Mandrekar-Colucci, S., Landreth, G. E.** Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* (2010), 9(2): 156-67.

52. **Markowicz-Piasecka, M., Sikora, J., Szydłowska, A., et al.** Metformin – a Future Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutical Research* (2017), 34(12): 2614–2627.
53. **Mattson M. P.** Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* (2004), 430(7000): 631-9.
54. **Mielke, M. M., Vemuri, P., Rocca, W. A.** Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical epidemiology* (2014), 6: 37-48.
55. **Mufson, E. J., Mahady, L., Waters, D., et al.** Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience* (2015), 309: 51–67.
56. **Murphy, M. P., LeVine, H.** Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's disease* (2010), 19(1): 311-23.
57. **Nazem, A., Sankowski, R., Bacher, M., et al.** Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation* (2015), 12(1): 74.
58. **Ng, T. P., Feng, L., Yap, K. B., et al.** Long-Term Metformin Usage and Cognitive Function among Older Adults with Diabetes. *Journal of Alzheimer's Disease* (2014), 41(1): 61–68.
59. **Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., et al.** Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurología (English Edition)* (2017), 32(8): 523–532.
60. **Obulesu, M., Venu, R., Somashekhar, R.** Tau Mediated Neurodegeneration: An Insight into Alzheimer's Disease Pathology. *Neurochemical Research* (2011), 36(8): 1329–1335.
61. **Oyejide, L., Mendes, O. R., Mikaelian, I.** *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (Second Edition)*. Chapter 16 – Molecular Pathology: Applications in Nonclinical Drug Development. Academic Press (2017), 407–445.
62. **Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., et al.** The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology* (2019). Pieejams tiešsaitē: [<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390819300802?via%3Dihub>] skatīts [29.03.19].
63. **Paxinos, G., Watson C.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Compact 6th Edition*. Academic Press, Londona (2009), 1- 476.
64. **Petersen, R. C.** Mild Cognitive Impairment. *New England Journal of Medicine* (2011), 364(23): 2227–2234.
65. **Prince, M., Guerchet, M., Prina, M.** The epidemiology and impact of dementia. Current state and future trends. *World Health Organization (WHO)* (2015). Pieejams

tiešsaitē:

[https://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/dementia_thematicbrief_epidemiology.pdf?ua=1], skatīts [11.03.19].

66. **Prokop, S., Miller, K.R., Heppner, F.L.** Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* (2013), 126(4): 461-477.
67. **Rahmati, M., Kazemi, A.** Various exercise intensities differentially regulate GAP-43 and CAP-1 expression in the rat hippocampus. *Gene* (2019), 692: 185–194.
68. **Reddy, P. H., Beal, M. F.** Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* (2008), 14(2): 45–53.
69. **Rojo, L. E., Fernández, J. A., Maccioni, A. A., et al.** Neuroinflammation: Implications for the Pathogenesis and Molecular Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research* (2008), 39(1): 1–16.
70. **Rowan, M. J., Klyubin, I., Cullen, W. K. et al.** Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (2003), 358(1432): 821–828.
71. **Sadigh-Eteghad, S., Sabermarouf, B., Majdi, A., et al.** Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Medical Principles and Practice* (2014), 24(1): 1–10.
72. **Sandelius, Å., Portelius, E., Källén, Å., et al.** (2018). Elevated CSF GAP-43 is Alzheimer's disease specific and associated with tau and amyloid pathology. *Alzheimer's & Dementia*. (2019), 15(1): 55–64.
73. **Scharre, D. W., Chang, S. I., Nagaraja, H. N., et al.** Paired Studies Comparing Clinical Profiles of Lewy Body Dementia with Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Journal of Alzheimer's Disease* (2016), 54(3): 995–1004.
74. **Selkoe, D. J.** Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural brain research* (2008), 192(1): 106-13.
75. **Selkoe, D. J.** Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews* (2001), 81(2): 741–766.
76. **Slimību profilakses un kontroles centrs (SPKC).** Statistikas dati. Psihiskā veselība. Statistikas dati par psihisko veselību 2009. – 2017. Pieejams tiešsaitē: [<https://www.spkc.gov.lv/lv/statistika-un-petijumi/statistika/veselibas-aprupes-statistika1>], skatīts [11.03.19].
77. **Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., et al.** Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease.

- Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* (2011), 7(3): 280-92.
78. **Stern Y.** Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology* (2012), 11(11): 1006-12.
79. **Streit, W. J.** Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* (2005), 48(2): 234–239.
80. **Tanzi, R. E., Bertram, L.** New Frontiers in Alzheimer's Disease Genetics. *Neuron* (2001), 32(2): 181–184.
81. **The Human Protein Atlas.** Methods: Immunohistochemistry (2018). Pieejams tiešsaitē [<https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>], skatīts [05.04.19].
82. **Tuppo, E. E., Arias, H. R.** The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2005), 37(2): 289–305.
83. **Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., et al.** Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* (2011), 50(5): 600-13.
84. **Wang, Z., Yang, Y., Xiang, X., et al.** [Estimation of the normal range of blood glucose in rats]. *Journal of Hygiene Research* (2010), 39(2): 133-7, 142.
85. **Winkler, E. A., Nishida, Y., Sagare, A. P., et al.** GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nature Neuroscience* (2015), 18(4): 521–530.

PIELIKUMI

GFAP imunohistoķīmijas protokols

1. Paraugus skalo ar 1x TBS-T buferi 3x10 min, katram trauciņam izmantojot aptuveni 20 mL bufera.
2. Paraugus karsē 95°C citrāta buferī 10 min, izmantojot ūdens termostata vannu. Audus neliek aukstā citrāta buferī, bet pirms tam to pasilda.
3. Atdzesē istabas temperatūrā TBS-T buferī.
4. Paraugus skalo TBS-T buferī 3x5 min.
5. Pagatavo primārās antivielas (*Monoclonal mouse-anti GFAP*, G3893) atšķaidījumu 1:1000. Vienam trauciņam izmanto 12 – 15 mL antivielas šķīduma (uz 10 mL TBS-T bufera ņem 10 µL antivielas).
6. Inkubē ar primāro antivielu (*Monoclonal mouse-anti GFAP*, G3893) atšķaidījumā 1:1000 istabas temperatūrā 20 h tumšā vietā.
7. Paraugus skalo TBS-T buferī 3x5 min, katram trauciņam izmantojot aptuveni 20 mL bufera.
8. Pagatavo sekundārās antivielas (*Anti-mouse Ig Biotin Conjugate*, B6398) atšķaidījumu 1:500. Vienam trauciņam izmanto 12 – 15 mL antivielas šķīduma (uz 10 mL TBS-T bufera ņem 20 µL antivielas).
9. Inkubē paraugus ar sekundāro antivielu 1:500 istabas temperatūrā 1,5 h.
10. Paraugus skalo ar TBS-T buferi 3x5 min (izmanto aptuveni 20 mL katram trauciņam).
11. Pagatavo peroksidāzes konjugāta (*ExtrAvidin® Peroxidase Conjugate*, E8386) atšķaidījumu 1:1000. Katram trauciņam izmanto 12 – 15 mL antivielas šķīduma (uz 10 mL TBS-T bufera ņem 10 µL antivielas).
12. Paraugus skalo ar TBS-T buferi 3x10 min.
13. Pagatavo DAB Chromogen šķīdumu – vienam trauciņam ņem 14 mL DAB buferi, 7 pilienus DAB Chromogen krāsvielu, šķīdumu filtrē. Pēdējo tieši pirms krāsošanas pievieno 28 µL 30% H₂O₂. Šķīdumu jāizmanto tūlītēji pēc 30% H₂O₂ pievienošanas!
14. Veic paraugu krāsošanu ar pagatavoto DAB Chromogen šķīdumu līdz iegūts vajadzīgais krāsojums 1-2 min. Krāsojot obligāti izmanto aizsargcimdus un masku, jo DAB krāsviela ir kancerogēna.
15. Paraugus skalo 2x10 min ar 0,05 M nātrijas fosfāra buferi.
16. Audu paraugus liek uz priekšmetstikliņiem un žāvē 37°C.

NB! Paraugiem inkubēšanas un krāsošanas laikā nedrīkst ļaut izzūt! Uzrauga, lai audi būtu pilnībā iemērcēti šķīdumā un nav salīpuši!

GAP43 imunohistoķīmijas protokols

1. Paraugus skalo ar 1x TBS-T buferi 3x10 min, katram trauciņam izmantojot aptuveni 20 mL bufera.
2. Paraugus karsē 95°C citrāta buferī 10 min, izmantojot ūdens termostata vannu. Audus neliek aukstā citrāta buferī, bet pirms tam to pasilda.
3. Atdzesē istabas temperatūrā TBS-T buferī.
4. Paraugus skalo TBS-T buferī 3x5 min.
5. Pagatavo primārās antivielas (*monoclonal mouse-anti IgG antibody (B-5)*, sc17790) atšķaidījumu 1:1000. Vienam trauciņam izmanto 12 – 15 mL antivielas šķīduma (uz 10 mL TBS-T bufera ņem 10 µL antivielas).
6. Inkubē ar primāro antivielu (*monoclonal mouse-anti IgG antibody (B-5)*, sc17790) atšķaidījumā 1:1000 istabas temperatūrā 20 h tumšā vietā.
7. Paraugus skalo TBS-T buferī 3x5 min, katram trauciņam izmantojot aptuveni 20 mL bufera.
8. Pagatavo sekundārās antivielas (*Anti-mouse Ig Biotin Conjugate*, B6398) atšķaidījumu 1:500. Vienam trauciņam izmanto 12 – 15 mL antivielas šķīduma (uz 10 mL TBS-T bufera ņem 20 µL antivielas).
9. Inkubē paraugus ar sekundāro antivielu 1:500 istabas temperatūrā 1,5 h.
10. Paraugus skalo ar TBS-T buferi 3x5 min (izmanto aptuveni 20 mL katram trauciņam).
11. Pagatavo peroksidāzes konjugāta (*ExtrAvidin® Peroxidase Conjugate*, E8386) antivielas atšķaidījumu 1:1000. Katram trauciņam izmanto 12 – 15 mL antivielas šķīduma (uz 10 mL TBS-T bufera ņem 10 µL antivielas).
12. Paraugus skalo ar TBS-T buferi 3x10 min.
13. Pagatavo DAB Chromogen šķīdumu – vienam trauciņam ņem 14 mL DAB buferi, 7 pilienus DAB Chromogen krāsvielu, šķīdumu filtrē. Pēdējo tieši pirms krāsošanas pievieno 28 µL 30% H₂O₂. Šķīdumu jāizmanto tūlītēji pēc 30% H₂O₂ pievienošanas!
14. Veic paraugu krāsošanu ar pagatavoto DAB Chromogen šķīdumu līdz iegūts vajadzīgais krāsojums 1-2 min. Krāsojot obligāti izmanto aizsargcimdus un masku, jo DAB hromogēns ir kancerogēna viela.
15. Paraugus skalo 2x10 min ar 0,05 M nātrijas fosfāra buferi.
16. Audu paraugus liek uz priekšmetstikliņiem un žāvē 37°C.

NB! Paraugiem inkubēšanas un krāsošanas laikā nedrīkst ļaut izzūt! Uzrauga, lai audi būtu pilnībā iemērcēti šķīdumā un nav salīpuši!

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs “Perorāli ievadīta metformīna ietekme uz neuroiekaisumu un smadzeņu neironālo plasticitāti Alcheimera slimības tipa modeļa žurkās” 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.

Autors: Baiba Kaņepe _____
(paraksts) (datums)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai
Vadītāja: Mg. pharm. Karīna Narbute _____
(paraksts) (datums)

Recenzents: Mg. pharm. Jānis Kurlovičs _____
(paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2019., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: docente Kristīne Saleniece, dr.pharm. _____
(paraksts)