

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS BAKALaura STUDIJU PROGRAMMA

**JAUNA DIHIDROPIRIDĪNA ATVASINĀJUMA AV-6-93
EFEKTS UZ BIOMARĶIERA BDNF EKSPRESIJU STRESA
MODELĪ ŽURKĀM**

BAKALaura DARBS

Autore: **Inese Jargāne**

Studenta apliecības Nr.: ij12067

Darba vadītāja: Mg. biol. Ulrika Beitnere

RĪGA 2015

ANOTĀCIJA

Stresa izraisītie atmiņas bojājumi ir iemesls jaunu zāļu vielu meklējumiem, kas spētu aizkavēt smadzeņu bojājumus.

Mūsu pētījuma mērķis bija noteikt jauna Latvijas Organiskās sintēzes institūtā sintezētās zāļu vielas AV-6-93, kas sastāv no dihidropiridīna un adamantāna atvasinājumiem, ietekmi uz neirotrofā faktora BDNF ekspresiju imobilizācijas stresētām žurkām hipokampā ar *Western* blota metodi.

Pētījuma rezultāti rāda, ka imobilizācijas stress ir palielinājis BDNF ekspresiju žurku hipokampā salīdzinājumā ar kontroles hipokampa žurkām, un AV-6-93 piemīt spēja normalizēt BDNF ekspresiju stresēto žurku hipokampā. Mūsu dati rāda, ka nepieciešams turpināt pētīt šī savienojuma molekulāros mehānismus, lai noskaidrotu tā neiroprotektīvās īpašības.

Atslēgvārdi: imobilizācijas stress; zāļu viela AV-6-93; žurkas; hipokamps; BDNF; *Western* blots

ANNOTATION

The growing prevalence of stress related memory impairments continues to be the main impetus behind the search for new drugs.

The aim of this work was to ascertain the new Latvian Institute of Organic Synthesis dihydropyridine derivative AV-6-93 effect on the expression of the brain neurotrophic factor (BDNF) in immobilization stress-induced rat hippocampus with Western blot method.

The study results show that immobilization stress has increased BDNF expression in rats hippocampus compared to control rats, and AV-6-93 has the ability to normalize BDNF expression in stress-induced rat hippocampus. Our findings indicate that it would be necessary to further explore the molecular mechanisms of this compound in order to determine its neuroprotective properties.

Key words: immobilization stress; drug compound AV-6-93; rats; hippocampus; BDNF; Western blot

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Stress	9
1.1.1. Akūts stress	11
1.1.2. Hronisks stress.....	12
1.1.3. Stresa ietekme uz atmiņu	14
1.2. Sinaptiskā plasticitāte	16
1.2.1. Neurotrofie faktori.....	18
1.3. Dihidropiridīni un to atvasinājumi	19
1.3.1. Cerebrokrasts.....	21
1.3.2. AV-6-93	22
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	24
2.1. Eksperimenta dzīvnieki	24
2.2. Vielas.....	24
2.3. Eksperimenta dizains.....	25
2.3.1. Imobilizācijas stress dzīvniekiem.....	25
2.4. Western blota metode	25
2.4.1. Paraugu sagatavošana	26
2.4.2. Gēla elektroforēze un pussausā pārnese.....	26
2.4.3. Bloķēšana un blotēšana.....	26
2.4.4. Membrānas attīstīšana.....	27
2.5. Datu analīze.....	27
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	28
4. SECINĀJUMI.....	32
PATEICĪBAS	33
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	34
DOKUMENTĀRĀ LAPA	41

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

ACTH – adrenokortikotropais hormons

AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionskābe

AMPAR – AMPA receptori

AV-6-93 – 2,6-dimetil-3-(1-adamantiloksikarbonil)-4-(2-difluorometoksifenil)-5-[(2-propoksi)etoksikarbonil]-1,4-dihidropiridīns

BDNF – smadzeņu neirotrofiskais faktors

Ca²⁺ - kalcija jons

CaMKII – kalcija-kalmodulīna atkarīgā kināze II (*Calcium-Calmodulin-dependent kinase II*)

cAMP – cikliskais adenozīna monofosfāts

CB1 – kanabinoīdie receptori

CREB – cAMP atbildes element-saistošais proteīns (*cAMP response element-binding protein*)

CRH – kortikotropīna hormons

DHP - dihidropiridīni

EAAT – kairināmais aminoskābju transportētājs (*excitatory amino acid transporter*)

ERK – ekstracelulāro signālu saistītā kināze

GABA – gamma-amino sviestskābe

GC – glikokortikoīdi

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

Gln – glutamīns

Glu – glutamāts

GluA1, GluA2, GluN1, GluN2B, GluR1 – glutamāta receptori

GR – glikokortikoīdu receptori

HPA – hipotalāma-hipofīzes-virsnieru ass

IP3 – inozitola trifosfāts

LTD – ilgtermiņa nomākšanas process

LTP – ilgtermiņa stimulācijas process

MAPK – mitogēn-aktivētā proteīna kināze (*mitogen-activated protein kinases*)

mBDNF – nobriedis BDNF

mEPSCs – mazais kairināmības postsinaptiskais lādiņš (*miniature excitatory postsynaptic currents*)

Mg²⁺ - magnija jons

mGluR1, mGluR2, mGluR3 – glutamāta receptori

MR – mineralkortikoīdu receptori

Na⁺ - nātrijs jons

NMDA – N-metil-D-aspartāts

NMDAR – NMDA receptori

p75^{NTR} – nervu augšanas faktora receptors

PI3K – fosfatidilinozīdola 3-kināze

PKA – proteīna kināze A

PKB – proteīna kināze B

PLC γ – fosfolipāze C γ

Ru486 – glikokortikoīdu antagonists

SNARE – šķīstošais pievienojošais proteīna receptors (*soluble attachment protein receptor*)

TrkB – tirozīnkināzes receptors B

β -AR – β -adrenerģiskais receptors

IEVADS

Ik dienu mēs tiekam pakļauti stresa avotiem, kas spēj izjaukt normālu organisma līdzsvaru jeb homeostāzi (Holsboer and Ising, 2010). Kad organisms tiek pakļauts iespējamajiem stresa faktoriem, iesaistās galvenais stresa mērķorgāns - smadzenes, izdalot neurotransmiterus un hormonus mūsu ķermenī, kas cenšas tikt galā ar stresa situācijām un atgūt organisma līdzsvaru (Joëls and Baram, 2009).

Gan akūts, gan hronisks stress spēj ietekmēt smadzeņu struktūru un funkcijas, kas rada ilgstošas izmaiņas organisma uzvedībā (Cohen et al., 2012). Ilgstoša stresa iedarbība rada negatīvu ietekmi uz organismu un palielina risku psihopatoloģiju attīstībai, jo sinaptiskās plasticitātes mehānismi, kas nodrošina organisma normālu uzvedību, kļūst neregulējami, savienojumi starp smadzeņu reģioniem zaudē līdzsvaru, kā rezultātā rodas patoloģiskas izmaiņas organismā (Zeltser et al., 2012). Stress spēj ietekmēt arī atmiņas un mācīšanās procesus. Šie procesi ir viens no būtiskākajiem procesu kompleksiem centrālajā nervu sistēmā, ko raksturo informācijas glabāšana, iegaumēšana, atcerēšanās un aizmiršana (Okano et al., 2000). Atmiņas procesu veidošanās disfunkciju galvenokārt nosaka stresa veids, ilgums, intensitāte, kā arī individuālie faktori, piemēram, dzimums un vecums (Roozendaal et al., 2009).

Stresa negatīvā ietekme uz organismu palielina dažādu slimību risku, piemēram, neurodeģeneratīvo slimību attīstību vai progresiju (Cohen et al., 2012). Ir noteikts, ka gan dihidropiridīna atvasinājums cerebrokrasts, gan adamantāna grupa pētījumos ir uzrādījuši gan neiroprotektīvas, gan atmiņas un kognitīvo spēju uzlabojošas īpašības (Vicente et al., 2006). Balstoties uz šīm īpašībām, tika apvienotas abas struktūras, iegūstot dihidropiridīna derivātu – AV-6-93, ko sintezē Latvijas Organiskās sintēzes institūtā. Šīs vielas struktūru veido adamantāna gredzens, kas pievienots dihidropiridīna gredzenam trešajā pozīcijā (Klimaviciusa et al., 2012). Tiek uzskatīts, ka adamantāna grupa nosaka terapeitisko efektivitāti un tai ir būtiska nozīme neurodeģeneratīvo slimību ārstēšanā, jo tas ir dopamīnērgisks līdzeklis, un ir pierādīts, ka dopamīnērgiskā sistēma ir svarīga atmiņas procesu veidošanā (Kraus et al., 2005).

Darba mērķis:

Izmantojot *Western* blota metodi, noteikt AV-6-93 iespējamo ietekmi uz BDNF ekspresiju imobilizācijas stresētām žurkām hipokampā.

Darba uzdevumi:

- 1) Izolēt hipokampu un sagatavot hipokampa proteīnus *Western* blota veikšanai;
- 2) Ar *Western* blota metodi hipokampā *ex vivo* noteikt, kā dihidropiridīna un adamantāna atvasinājuma AV-6-93 ietekmē izmainās BDNF ekspresija;
- 3) Salīdzināt iegūtos datus ar imūnhistoķīmiju BDNF ekspresijai striatumā;
- 4) Veikt iegūto datu statistisko apstrādi un analīzi.

1. LITERATŪRAS APSKATS

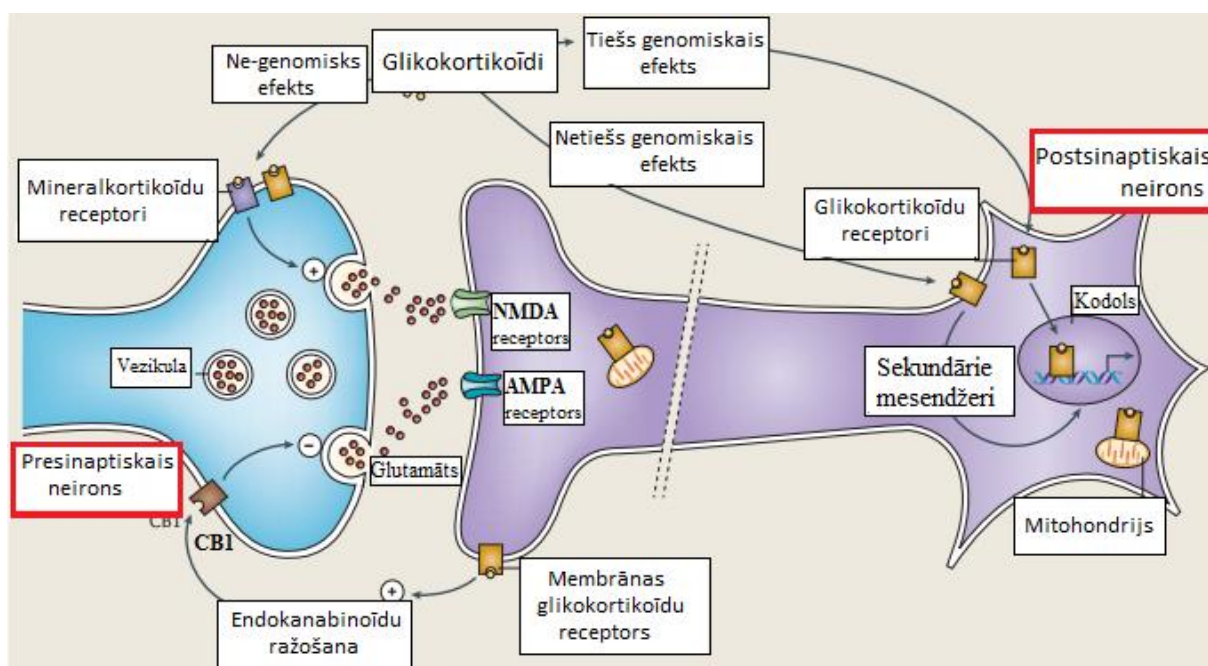
1.1. Stress

Ik dienu mēs tiekam pakļauti stresa avotiem, piemēram, tādiem, kas saistīti ar apkārtējo dabu (toksīni, karstums, aukstums), kā arī tādiem, kam piemīt psiholoģiskais (depresija) vai socioloģiskais raksturs (Joëls et al., 2011). Stress ir organisma atbildes reakcija uz vides apstākļiem vai emocionāliem kairinājumiem, kas izjauc normālu organisma līdzsvaru jeb homeostāzi. Organisma pielāgošana stresam tiek panākta ar fizioloģiskām reakcijām, kas ierosina savu darbību uzreiz pēc saskares ar to (Holsboer and Ising, 2010). Kad organisms tiek pakļauts iespējamajiem stresa faktoriem, iesaistās smadzenes, izdalot neurotransmiterus, peptīdus un hormonus mūsu ķermenī, kas cenšas tikt galā ar stresa situācijām un atgūt organisma līdzsvaru (Joëls and Baram, 2009).

Stresa ietekmē aktivizējas divas bioloģiskas sistēmas – simpātiskā nervu sistēma un hipotalāma-hipofīzes-virsnieru (HPA) ass. Viena no galvenajām neuroendokrīnajām reakcijām ir simpātiskās nervu sistēmas aktivizēšana, kuras rezultātā notiek strauja kateholamīnu (noradrenalīna, adrenalīna) atbrīvošana no virsnieru serdes, kas izraisa, piemēram, palielinātu sirds ritmu vai uzlabo asins plūsmu uz skeleta muskuļiem, tādējādi sagatavojot organismu, lai cīnītos ar stresu. Noradrenerģiskā projekcija izriet no nervu kodola *locus coeruleus*, tādējādi regulējot nervu funkcijas caur β -adrenerģiskajiem receptoriem (β -AR), kas iesaistīti atmiņas un mācīšanās procesos (Nater and Rohleder, 2009). Tā kā stresa iedarbība veicina ātru noradrenalīna izdalīšanos smadzenēs, tad tas ietekmē organisma veselības stāvokli, emocijas un kognitīvās spējas (Joëls and Baram, 2009). Šī straujā atbrīvošana, aktivizējoties caur β -AR receptoriem, aktivizē proteīnkināzi A (PKA), kalcija-kalmodulīna atkarīgo kināzi II (*Calcium-Calmodulin-dependent kinase II*, CaMKII), un palielina α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionskābes (AMPA) receptora GluR1 fosforilēšanos pie serīna 845 (S845) un S831, kas ir nozīmīga vieta AMPA receptoru sinapšu pavairošanai gan hipokampā, gan prefrontālajā garozā (Zhou et al., 2011).

Stress aktivizē arī HPA asi. Aktivizēšanas rezultātā notiek kortikotropīna hormona (CRH) atbrīvošana, kas stimulē adrenokortikotropā hormona (ACTH) izdalīšanu no hipofīzes, un glikokortikoīda (GC) hormona atbrīvošanu no virsnieru garozas (kortikosteronu grauzējiem, kortizolu cilvēkiem) (Roozendaal et al., 2009). Ir pierādīts, ka GC atbrīvošana ievērojami palielinās pēc stresa iedarbības. GC var iekļūt smadzenēs un saistīties ar diviem receptoriem – augstas afinitātes mineralkortikoīdu receptoriem (MR) un zemas afinitātes glikokortikoīdu receptoriem (GR), kas galvenokārt atrodas atmiņas veidošanas smadzeņu

reģionos, piemēram, hipokampā, amigdalā un prefrontālajā garozā (De Kloet et al., 2005). Virsnieru steroīdi var būt gan ar ātru, gan aizkavētu efektu (*1.attēls*). Efekts var veidoties ar - 1) ne-genomisko (*non-genomic*) mehānismu, kas tiek regulēts ar membrānu receptoriem, 2) netiešu genomisko (*indirect genomic*) mehānismu, kas tiek regulēts ar membrānu receptoriem un sekundārajiem mesendžeriem un 3) tiešu genomisko (*direct genomic*) mehānismu, kas tiek regulēts ar citoplazmas receptoriem, kas pāriet uz kodolu un darbojas kā transkripcijas faktori (Haller et al., 2008). Netiešs veids, ar kuru GC var ietekmēt neurotransmisiju (glutamāterģisko, kā arī GABAerģisko, holīnerģisko, noradrenerģisko un serotonīnerģisko) ir mijiedarbība jeb t.s. *crosstalk* ar endokanabinoīdo sistēmu. Tā strauji stimulē endokanabinoīdu ražošanu smadzenēs, kas saistās ar kanabinoīdajiem receptoriem (CB1) un inhibē neurotransmiteru atbrīvošanu. Lai arī G-proteīnu receptori ir iesaistīti endokanabinoīdu ražošanā, ir pierādījumi, ka šis mehānisms bloķē Ru486 – citoplazmas GC receptoru selektīvo antagonistu (Hill et al., 2010).



1.att. Virsnieru steroīdu neurotransmisija (Popoli et al., 2012)

Ir pierādīts, ka pēc stresa noradrenālīna līmenis strauji normalizējas, un AMPA receptoru apakšvienība GluA1 vairs nepiedalās noradrenālīna forsforilēšanā (Hu et al., 2007). Tomēr tajā brīdī kortikosteroīdu līmenis var joprojām pieaugt un var būt par starpnieku ne-genomiskam efektam caur MR un GR. Caur GR kortikosteroīdi lēnām palielina virsmas ekspresiju, sinapšu pavairošanu un palielina mazo kairināmības postsinaptisko lādiņa (*miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs*) amplitūdu (Martin et al., 2009).

Kopumā kortikosteroīdu hormoni un noradrenālīns nosaka sinaptisko funkciju, tādējādi šie hormoni uzlabo mEPSCs biežumu un AMPA receptoru aktivēšanu. Svarīgi, ka AMPA

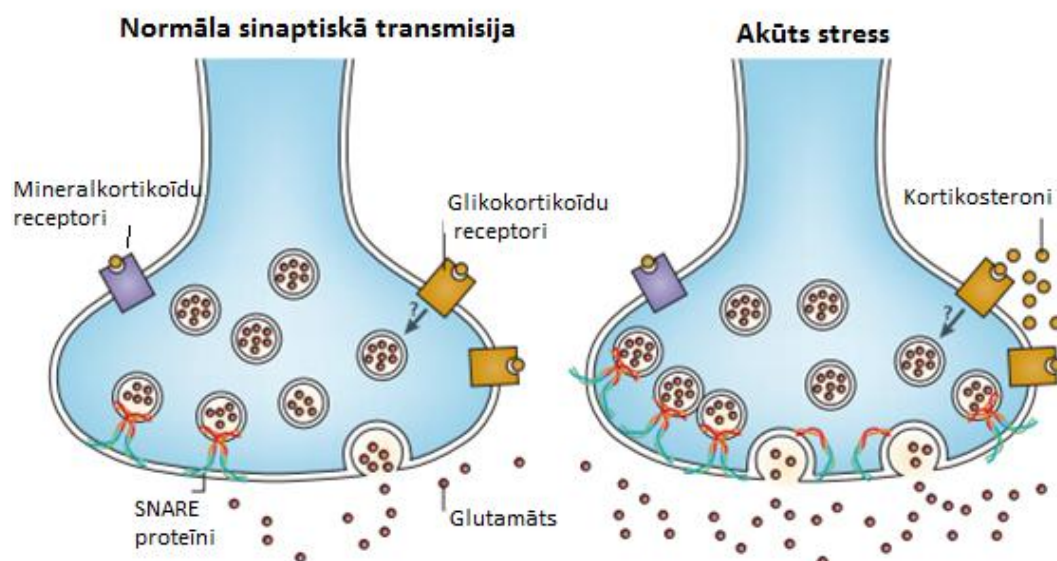
receptoru regulēšana ar noradrenālīnu un kortikosteroīdu hormoniem ir nozīmīga, jo tie ir iesaistīti atmiņas uzlabošanā (Zhou et al., 2011).

1.1.1. Akūts stress

Stresa hormoniem ir gan aizsardzības, gan kaitīgs efekts uz organismu (De Kloet et al., 2005). Akūts jeb īslaicīgs stress ir visbiežāk sastopamais stresa veids, kas rada īslaicīgas izmaiņas uzvedībā un organismā, piemēram, sirds un asinsvadu sistēmas traucējumus (Holsboer and Ising, 2010). Salīdzinot ar hronisku stresu, kas spēj radīt neatgriezeniskus kognitīvo traucējumus, akūts stress ir svarīgs homeostāzes pielāgošanai un saglabāšanai (McEwen and Gianaros, 2010).

Akūts stress caur GR palielina dažādu NMDA receptoru apakšvienību un AMPA receptoru apakšvienību (GluA1/GluA2) virsmas ekspresiju postsinaptiskajā membrānā. Šie efekti realizējas caur seruma un GC inducējošo kināzes (*serum and glucocorticoid-inducible kinase*) signāla transdukciju (Yuen et al., 2011).

Akūts stress (*2.attēls*) izraisa palielinātu glutamāta (Glu) atbrīvošanu no pre-sinaptiskās termināles prefrontālajā garozā (Musazzi et al., 2010). Šī reakcija ietver strauju kortikosteroīda cirkulārā līmeņa palielināšanos, kas saistās ar membrānā izvietotajiem GR. Tas izraisa strauju GR palielināšanos pre-sinaptiskajā šķīstošajā pievienošanās proteīna receptorā (*soluble attachment protein receptor, SNARE*) proteīnu kompleksā, kas ir kā starpnieks sinaptisko vezikulu sapludināšanai pre-sinaptiskajā membrānā. SNARE kompleksu skaits uz vezikulām ir nemainīgs, tas nozīmē, ka akūts stress inducē Glu vezikulu pieaugšanu (Treccani et al., 2014).

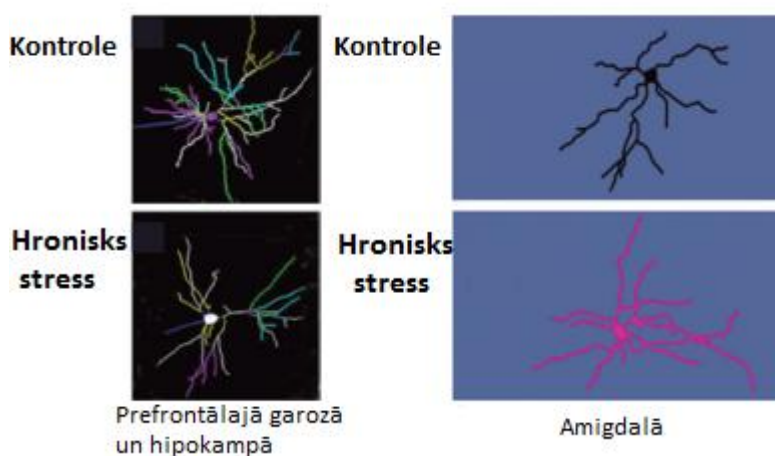


2.att. Akūta stresa izraisīta palielināta glutamāta izdalīšanās prefrontālajā garozā
(Popoli et al., 2012)

1.1.2. Hronisks stress

Ilgstoša stresa iedarbība rada negatīvu ietekmi uz organismu un palielina risku psihopatoloģiju attīstībai (Cohen et al., 2012). Jaunākie pētījumi liecina, ka ilgstošs stress ietekmē sinaptiskās kairināmības funkcijas un rada palielinātu GC sekrēciju caur HPA asi un kateholamīnu izdalīšanos caur adrenerģisko neurotransmisiju (Finsterwald and Alberini, 2014). GC ir steroīdie hormoni, kas regulē diennakts procesus, lai saglabātu organisma izdzīvošanai nepieciešamās homeostatiskās funkcijas. To izdalīšanās rada neironu signālu veidošanos paraventriculārajā kodolā (*paraventricular nucleus*), tāpēc stresa ietekmē GC saistās ar GR vairākās ķermeņa daļās, arī smadzenēs. Šī iemesla dēļ GC darbojas kā negatīva reakcija, nomācot savu sekrēciju (Herman et al., 2012). Ir pierādīts, ka smadzenes ir galvenais stresa mērķorgāns, jo tās uztver to, kas ir potenciāli bīstams, un nosaka uzvedības un fizioloģiskās reakcijas. Hronisks stress spēj mainīt smadzeņu struktūru, izmantojot iekšējos neurobioloģiskos mehānismus, kuros liela nozīme ir cirkulējošiem hormoniem (Cohen et al., 2012). Galvenokārt hronisks stress izraisa neironu saraušanos, dendrītu garuma un dendrītu dzelonīšu (*dendritic spines*) samazināšanos gan prefrontālajā garozā, gan hipokampā (*3.attēls*). Līdzīgas izmaiņas notiek arī amigdalā (Hunter et al., 2013). Pētījumos ir pierādīts, ka veselīgiem jauniem pieaugušiem dzīvniekiem dendrītu garuma un zarošanās, kā arī dzelonīšu blīvuma izmaiņas ir atgriezeniskas. Izņēmums ir amigdala, jo stresa izraisītās izmaiņas tajā

saglabājas vismaz 30 dienas pēc tā (Vyas et al., 2004). Savukārt jaunākie pētījumi liecina, ka smadzeņu strukturālās izmaiņas atšķiras starp vīriešiem un sievietēm (McEwen et al., 2015).

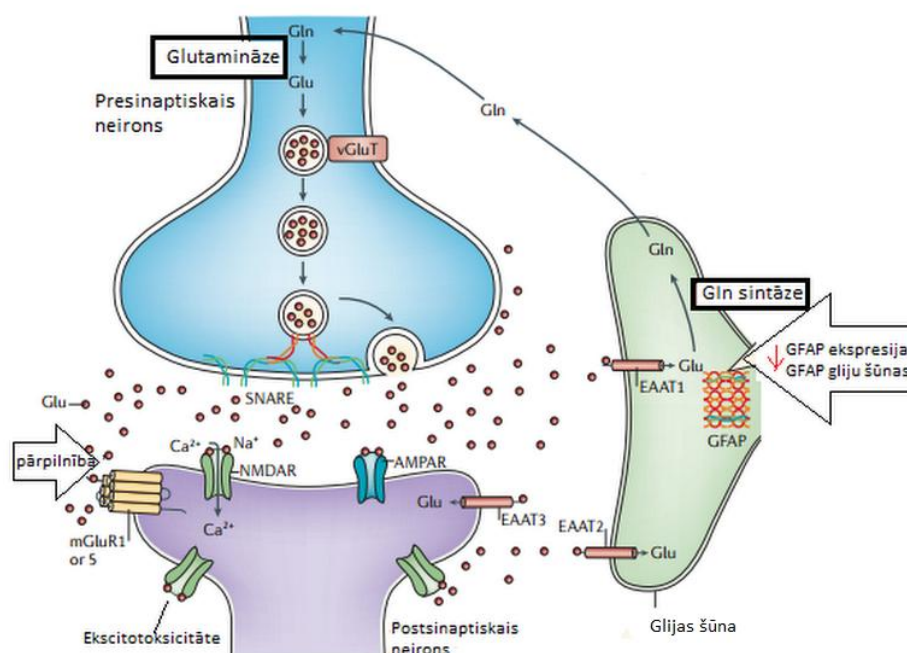


3.att. Hroniska stresa izraisītas strukturālas izmaiņas neironos (Popoli et al., 2012)

Visos hipokampa rajonos sinapšu aktivitāte ir ievērojami samazinājusies pēc hroniska stresa vai ilgstošas kortikosteroīdu iedarbības (Alfarez et al., 2003). Pētījumi šūnu līmenī liecina, ka ilgstoša stresa iedarbība caur kortikosteroīdu darbību nomāc glutamāterģisko sinaptisko pārraidi prefrontālajā garozā, tādējādi ilgstošs stress un paaugstināts kortikosteroīdu hormonu līmenis samazina glutamāta receptoru (GluN1 un GluA1) virsmas ekspresiju. Šie efekti realizējas ar pastiprinātu ubikvitīna degradēšanos un NMDA un AMPA receptoru sinaptisko degradāciju (Yuen et al., 2012). Ir konstatēts, ka prefrontālajā garozā pēc hroniska stresa ir pazemināts GluN2B un GluA2 ekspresijas līmenis (Gourley et al., 2009).

Ir publicēti vairāki pētījumi par gliju šūnu patoloģiju, uzsverot, ka tām ir saistība ar tādiem psihiskiem traucējumiem kā depresiju un bipolāriem traucējumiem. Piemēram, prefrontālās garozas reģionos konstatēja ievērojamu gliju šūnu skaita un blīvuma samazināšanos, kas tika iegūts no pēcnāves smadzeņu paraugiem personām, kuras iepriekš cieta no garastāvokļa traucējumiem (Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007). Konstatēts, ka hronisks stress būtiski ietekmē glijas šūnas funkcijas (4.attēls). Vairāki pētījumi ir pierādījuši samazinātu glijas fibrillāro skābes proteīnu (GFAP) ekspresiju un glijas šūnu skaitu hipokampā un prefrontālajā garozā pēc hroniska stresa (Banasr and Duman, 2008). Tas ir iemesls, kāpēc hronisks stress pavājina efektīvu Glu atbrīvošanos caur glijas kairināmo aminoskābju transportētāju (EAAT). Tas var novest pie Glu pārpilnības un palielinātas ekstrasinaptiskā Glu receptoru aktivitātes, kā rezultātā veidojas ekscitotoksicitāte (*excitotoxicity*) – patoloģisks process, kurā nervu šūnas tiek bojātas ar pārmērīgu stimulēšanu,

līdz ar to - ir ierosinātais vairākos neurodeģeneratīvos traucējumos. Hronisks stress samazina plūsmu caur glutamāta-glutamīna (Gln) ciklu, kā rezultātā samazinās Glu metabolisms (Yuen et al., 2012).



4.att. Hroniska stresa ietekme glijas šūnās un glutamāta metabolismā (Popoli et al., 2012)

Sinaptiskās transmisijas izjaukšana pēc hroniska stresa ir saistīta ar būtiskiem atmiņas un mācīšanās procesu traucējumiem, kas spēj ietekmēt sinaptiskās transmisijas kairinājumu un sinaptisko plastiskumu (Yuen et al., 2012).

1.1.3. Stresa ietekme uz atmiņu

Atmiņa ir viens no būtiskākajiem procesu kompleksiem centrālajā nervu sistēmā, ko raksturo informācijas glabāšana, iegaumēšana, atcerēšanās un aizmiršana (Okano et al., 2000). Tas ir process, kurā informācija tiek saglabāta kā zināšanas turpmākai lietošanai (Joëls et al., 2011). Ir pierādīts, ka stress būtiski ietekmē atmiņas un mācīšanās procesus, ko spēj ietekmēt stresa veids, ilgums, intensitāte, kā arī individuālie faktori, piemēram, dzimums un vecums (Rooszendaal et al., 2009).

Stresa negatīvā ietekme uz organismu palielina dažādu slimību risku, piemēram, sirds un asinsvadu neurodeģeneratīvās slimības (Cohen et al., 2012). Viena no galvenajām smadzeņu struktūrām, ko ietekmē stress, ir hipokamps. Hipokamps ir sarežģīta un organizēta smadzeņu struktūra, kas iesaistīta informācijas kodēšanas, glabāšanas, atjaunošanas un

atceršanās procesos (Fedulov et al., 2007). Tā bojājumus nosaka stresa intensitātes pakāpe, tomēr kopumā hipokamps ir ļoti jutīgs pret jebkāda stresa ietekmi, tādējādi pasliktinās mācīšanās un atmiņas procesi (Calabrese et al., 2007). Stresa ietekmē izmainās hipokampa neironu struktūru. Šis stresa izraisītās izmaiņas notiek vairākos līmeņos, sākot no straujām izmaiņām sinapšu struktūrā, līdz pat iespējamām dendrītu sazarojumu pārveidošanām. Viena no visvairāk sastopamajām hroniska stresa izmaiņām hipokampā ir dendrītisko piramīdveida šūnu sazarojuma samazināšanās (Alfarez et al., 2003). Dendrīti regulē kairinošo sinapšu funkcijas, kas atrodas uz specifiskajām struktūrām, ko sauc par dendrītu dzelonīšiem. Stresa izraisīta dendrītu dzelonīšu zaudēšana hipokampā izraisa dendrītisko atrofiju. Ir pierādīts, ka dzelonīši regulē vairākus faktorus, piemēram, neurotransmiterus, augšanas faktorus, hormonus, kas savukārt regulē stresu. Dendrītu dzelonīšu traucējumi var nodrošināt stresa izraisītas izmaiņas sinaptiskajās funkcijās, kas izraisa dendrītu zudumu un kognitīvos traucējumus (Fedulov et al., 2007).

Stresa iedarbība uz hipokampu sākas ar HPA ass aktivizēšanu, kā rezultātā notiek GC atbrīvošana no virsnieru dziedzeru. Steroīdais hormons šķērso hematoencefālisko barjeru un sasniedz hipokampu. Šīs darbības specifiku neironos nosaka receptori un to afinitāte - augstas afinitātes MR un zemas afinitātes GR (Nater and Rohleder, 2009). Aktivizējoties caur MR, GC modulē novērtēšanas un reakcijas izvēli mācīšanās procesos, kā arī pētījumi liecina, ka MR ir iesaistīti informācijas kodēšanā, kas iespējams saistīta ar reakcijas izvēli (Zhou et al., 2011). Savukārt kortikosteroīdu hormonu aktivizēšana caur GR receptoriem veicina ilgtermiņa atmiņas nostiprināšanu (Hui et al., 2004).

Papildus kortikosteroīdiem, stress izraisa arī monoamīnu izdalīšanos, piemēram, neurotransmiteru un neuropeptīdu. Šīs molekulas ietekmē hipokampu caur to receptoriem, piemēram, serotonīna un Glu receptoru aktivācija veicina stresa ietekmi uz hipokampa neironu struktūru un ilgtermiņa stimulācijas procesu (LTP) (Fedulov et al., 2007).

Arī noradrenalīns modulē atmiņas veidošanās procesus, kas saistīti ar emocijām (Joëls et al., 2011). Dažādos mācību uzdevumos konstatēts, ka tieši noradrenalīns veicina atmiņas veidošanos, izmantojot smadzeņu β -AR (Hu et al., 2007). Turklāt noradrenalīns darbojas saskaņoti ar citiem hormoniem, piemēram, GC, CRH, kas spēj nodrošināt optimālu atmiņas sniegumu gan cilvēkiem, gan grauzējiem (Roosendaal et al., 2009). Ir konstatēts, ka GC mijiedarbojas ar noradrenalīnu bazolaterālajā amigdalā, kas pēc tam modulē atmiņas procesus prefrontālajā garozā, hipokampā, astainajā kodolā un citos galvas smadzeņu apvidos (Joëls et al., 2011).

Ir pierādīts, ka stress var gan uzlabot, gan pasliktināt atmiņu. Stress uzlabo atmiņu, ja tas ir noticis mācīšanās laikā un ja hormoni un neurotransmiteri izdalās stresa laikā uz tām

smadzeņu vietām, kas aktivizē mācīšanās epizodes. Savukārt stress pasliktina atmiņu, ja tas notiek ārpus mācību konteksta, tas ir, bez jebkādas saiknes ar mācīšanos (Joëls, 2006). Šis pierādījums galvenokārt balstās uz dažādiem kateholamīnu un GC darbības ceļiem. Kateholamīni iedarbojas ātri un salīdzinoši ar īsu efektu, bet GC darbība vērsta galvenokārt uz genomu - lēnāka iedarbība ar ilgstošu efektu (Groeneweg et al., 2011). Tiek ierosināts, ka kateholamīni un GC atvieglo mācīšanos un atmiņas procesus īstermiņa atmiņā. Gēnu mediētā GC darbība tomēr var nomākt jaunas informācijas apstrādi, tādējādi pasliktinot atmiņas procesus, kas nav saistīti ar GC izdalīšanos (Joëls, 2006).

1.2. Sinaptiskā plasticitāte

Gan akūts, gan hronisks stress ietekmē smadzeņu struktūru un funkcijas, kas rada ilgstošas izmaiņas organisma uzvedībā (Cohen et al., 2012). Sinaptiskā plasticitāte ir mehānisms, ar kuru informācija tiek saglabāta un uzturēta sinapsēs, neironos un neironu ķēdēs, lai nodrošinātu organisma normālu uzvedību. Ja organismā ir novērojams ilgstošs stress, šie mehānismi kļūst neregulējami un savienojumi starp smadzeņu reģioniem zaudē līdzsvaru, kā rezultātā rodas patoloģiskas izmaiņas organismā (Zeltser et al., 2012). Lai starp neironiem būtu saskaņota aktivitāte, tie satur specializētas struktūras - sinapses, kas nodrošina informācijas apmaiņu starp neironiem. Nervu sistēmā sinapses ir galvenais veids saziņai no pre-sinaptiskajiem uz post-sinaptiskajiem neironiem, kā arī tās ir sinaptisko savienojumu pamatā nervu funkciju ķēdē, kas ir kā starpnieks informācijas apstrādē (Kay et al., 2011).

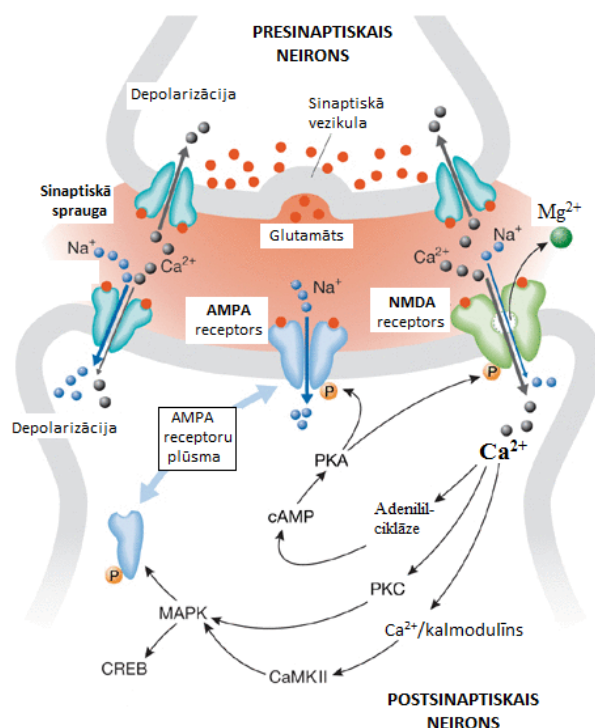
Neironu komunikācijas stiprumu pre-sinaptiskajās šūnās stimulē post-sinaptiskās šūnas, tāpēc sinaptisko plastiskumu var iedalīt 4 grupās: īstermiņa sinaptiskā plasticitāte – sinapšu aktivizēšana palielina vai samazina sinaptiskās transmisijas efektivitāti konkrētajā sinapsē par sekundi vai minūti; ilgtermiņa sinaptiskā plasticitāte – līdzīgs process īstermiņa stimulācijai, bet sinapses izmaiņas var ilgt pat visu mūžu (Ohno et al., 2011); metaplasticitāte – sinaptiskā vai šūnas aktivitāte regulē kapacitāti konkrētajā sinapsē, kas ir pakļauta sinaptiskajam plastiskumam (Hulme et al., 2013); homeostatiskais plastiskums - neirons pielāgo jutīgumu tās kairinošajā sinapsē, lai saskaņotu sinaptisko pieaugumu un stabilizētu tās darbību (Turrigiano, 2012).

Sinaptisko plastiskumu var pastiprināt vai nomākt sinaptiskās funkcijas, ko ietekmē sinapšu aktivitātes biežums - ja ir bieža sinapšu stimulācijas aktivitāte, kā rezultātā veidojas ilgtermiņa stimulācijas process (LTP), bet, ja ir zema biežuma stimulācija, kas nomāc sinaptisko aktivitāti, veidojas ilgtermiņa nomākšanas process (LTD) (Castillo, 2012). Gan

LTP, gan LTD šūnu mehānisma darbība galvenokārt ietver NMDA receptoru (NMDAR) aktivāciju, kas izraisa izmaiņas post-sinaptiskajos AMPA receptoros (AMPA) (Nabavi et al., 2014).

Sinaptiskā plastiskuma reakciju kaskāde sākas ar Glu sintēzi no glutamīna (Gln), ko piegādā glijas šūnas (*5.attēls*). Glu tiek iepakots sinaptiskajās vezikulās ar vezikulāro Glu transportētāja palīdzību. Šajā procesā SNARE kompleksa proteīni darbojas kā starpnieki vezikulu sajaukumam un mijiedarbībai ar pre-sinaptisko membrānu (Fremeau et al., 2004). Pēc Glu atbrīvošanas no pre-sinaptiskā neirona, tas saistās ar jonotropajiem Glu receptoriem - NMDAR, AMPAR un metabotropajiem Glu receptoriem (mGluR1, mGluR2, mGluR3) uz post-sinaptiskajiem un pre-sinaptiskajiem neironiem, kā arī gliju šūnām. Pēc saistīšanās, receptori ierosina dažādas atbildes reakcijas, tostarp membrānu depolarizāciju, starpšūnu mesendžeru kaskādes aktivāciju, proteīnu sintēzes modulēšanu un gēnu ekspresiju (Zeltser et al., 2012). Ja Glu saistās ar AMPAR, tas izraisa Na^+ ieplūšanu, kas depolarizē šūnu, ietekmējot citus post-sinaptiskos Glu receptorus, piemēram, NMDAR. Gan Ca^{2+} , gan Na^+ ieiešana caur aktivizētu NMDAR, rada papildus depolarizāciju (Nanou and Manira, 2010). Atveroties NMDAR, kas ir katjonu kanāli, palielinās Ca^{2+} koncentrācijas līmenis, kas ir saistīts ar LTP. Spēcīga depolarizācija post-sinaptiskā neironā pilnībā izgrūž Mg^{2+} , kas ļauj Ca^{2+} ieiet post-sinaptiskajā neironā caur NMDAR, izraisot LTP, bet vāja depolarizācija tikai daļēji izspiež Mg^{2+} , kā rezultātā mazāk post-sinaptiskajā šūnā ieiet Ca^{2+} , līdz ar to ir mazāka Ca^{2+} koncentrācija, kas inducē LTD (Lüscher and Malenka, 2012). Ca^{2+} , kas ir iekļuvuši post-sinaptiskajā neironā, izraisa gan AMPAR, gan NMDAR fosforilāciju, uzlabojot katjonu vadāmību un tādā veidā arī sinapšu stimulācijas procesus (Soderling and Derkach, 2000).

Ir konstatēts, ka Ca^{2+} aktivizē vairākas svarīgas kināzes postsinaptiskajos neironos, kas nepieciešamas sinaptiskajai plasticitātei, piemēram, adenilciklāzi (*adenylyl cyclases*), kas tālāk rada ciklisko adenoziņa monofosfātu (cAMP) un palielina PKA aktivitāti. Ca^{2+} spēj aktivizēt arī Ca^{2+} /kalmodulīnu (*Ca²⁺/calmodulin*), kas tālāk aktivizē Ca^{2+} /kalmodulīna atkarīgo kināzi II (*Calcium-Calmodulin-dependent kinase II*, CaMKII) (Matsumoto et al., 2014). Vēl viena kināze, kas tiek aktivizēta, ir proteīnkināze C (PKC), kas piedalās īstermiņa atmiņas veidošanas procesā (Chu et al., 2014). Visas aktivizētās kināzes fosforilē gan AMPAR, gan NMDAR kas nodrošina labāku Na^+ un Ca^{2+} atbrīvošanu. Gan PKC, gan CaMKII aktivizē mitogēn-aktivēto proteīna kināzi (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK), kas veicina AMPA receptoru sintēzi. Savukārt MAPK aktivizē cAMP atbildes element-saistošo proteīnu (*cAMP response element-binding protein*, CREB), kas veicina proteīnu sintēzi. Gan MAPK, gan CREB piedalās atmiņas procesu veidošanā (Luo et al., 2013).



5.att. Sinaptiskās plasticitātes darbība (Voglis and Tavernarakis, 2006)

Kopumā – sinaptiskais plastiskums ir būtisks atmiņas un mācīšanās procesos. Tā aktivitāte tiek veicināta sinapsēs atmiņas veidošanās laikā, tādēļ ir svarīga informācijas uzglabāšanā un kodēšanā noteiktos smadzeņu reģionos (Zeltser et al., 2012). Savukārt sinaptiskā plastiskuma regulācijas traucējumi ir iesaistīti dažādos psihiskos un neiroloģiskos traucējumos, kā arī pasliktinās kognitīvās spējas (Cohen et al., 2012).

1.2.1. Neurotrofie faktori

Neurotrofīni ir svarīgas molekulas smadzenēs, kas nodrošina sinaptisko plasticitāti, kā arī neironu augšanu, dzīvotspēju un diferenciāciju centrālajā un perifērajā nervu sistēmā. Šajā molekulu saimē ietilpst nervu augšanas faktors, smadzeņu neurotrofiskais faktors (BDNF), kā arī neurotrofīns 3 un 4 (Deister and Schmidt, 2006). No šiem, tieši BDNF vislabāk raksturo tā lomu sinaptiskajā plastiskumā, potenciālo lomu slimību patoloģijā, kā arī psihisko slimību ārstēšanā (Duman and Monteggia, 2006).

BDNF ir dimērisks proteīns, kas nepieciešams dopamīnerģisko, GABAerģisko, holīnerģisko un serotonīnerģisko neironu augšanai un dzīvotspējai, kas ir iesaistīti patoloģiskos traucējumos, piemēram, depresijā un šizofrēnijā (Pillai, 2007). Šis neurotrofīns ir sastopams smadzenēs, jo īpaši hipokampā un smadzeņu garozā, tāpēc domājams, ka tas kontrolē garastāvokli, emocijas un kognitīvās funkcijas (Deister and Schmidt, 2006). Tas

darbojas, saistoties ar divu veidu plazmas membrānu receptoriem - tirozīnkināzes receptoru B (TrkB) un nervu augšanas faktora receptoru p75 (p75^{NTR}) (Duman and Monteggia, 2006).

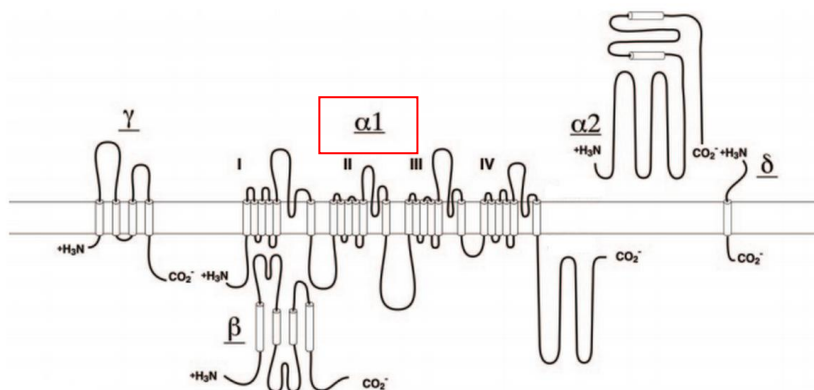
BDNF tiek sintezēts kā prekursors pre-proBDNF, kas tālāk tiek sašķelts endoplazmatiskajā tīklā. Sašķelšanas rezultātā rodas 32-kDa proBDNF, kas tālāk pārvietojas caur Goldži aparātu uz trans-Goldži tīklu (*trans-Golgi network*), kur veido vezikulas gan sekrēcijas, gan regulējamā aktivitātes ceļā (Chao et al., 2006). ProBDNF, kas ir iepakots divos vezikulu veidos, tiek sašķelts ar plazminogēna aktivatora enzīmu un izdalīts kā 14-kDa nobriedis BDNF (mBDNF), vai izdalīts kā proBDNF un sašķelts ar ekstracelulārajām proteāzēm, piemēram, plazmīnu. Pēc atbrīvošanas, proBDNF saistās ar zemas afinitātes p75^{NTR} receptoru, bet mBDNF saistās ar augstas afinitātes pre-sinaptisko TrkB receptoru (Dean et al., 2012). Ir pierādīts, ka proBDNF un mBDNF aktivāte rada dažādus intracelulāros signālu ceļus - proBDNF izraisa apoptozi un veicina LTD, bet mBDNF – dzīvotspējas efektu un veicina LTP (Yang et al., 2009).

BDNF, saistoties ar TrkB, ir nozīmīgs sinaptiskajā plastiskumā un neironu dzīvotspējā. Pēc saistīšanās ar TrkB receptoriem, TrkB kļūst fosforilēts, kas veicina dažādu intracelulāro signālu kaskāžu aktivāciju. Ir 3 signālu transdukcijas ceļi, ko regulē BDNF-TrkB aktivācija – 1) fosfatidilinozitola 3-kināzes (*phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) ceļš, kas aktivizē proteīna kināzi B (PKB), izraisot šūnu dzīvotspēju; 2) MAPK vai ekstracelulāro signālu saistītās kināzes (*extracellular signal related kinase*, ERK) ceļš, kad atbild par šūnas augšanu un diferenciāciju; 3) fosfolipāzes C γ (*phospholipase C γ* , PLC γ) ceļš aktivizē inozitola trifosfātu (*inositol trisphosphate*, IP3), lai atbrīvotu intracelulāro Ca²⁺, kas veicina CaMKII darbību un ir nozīmīga loma sinaptiskajā plasticitātē. Visi trīs ceļi apvienojas transkripcijas faktorā CREB, kas regulē gēnu transkripciju neironu dzīvotspējai un diferenciācijai (Yoshii and Constantine-Paton, 2010). Ir zināms, ka ātra sinaptiskā darbība un jonu kanāla efekts ir atkarīgi no PLC γ ceļa, kas ierosina Ca²⁺ atbrīvošanu, bet ilgstošāks efekts novērojams, ja ir iesaistīti PI3K un MAPK ceļi (Yang et al., 2009).

1.3. Dihidropiridīni un to atvasinājumi

Dihidropiridīni (DHP) ir Ca²⁺ kanālu antagonisti (Jadhav et al., 2012). Organisma audos Ca²⁺ koncentrācija ekstracelulārajā vidē ir augstāka, salīdzinot ar intracelulāro vidi, tādēļ membrānās ir iestarpināti Ca²⁺ kanāli, ļaujot Ca²⁺ ieplūst šūnā. Kā rezultātā pieaug intracelulārais Ca²⁺, kas pilda dažādas funkcijas (Yousef et al., 2005). Iedarbojoties Ca²⁺ kanālu antagonistiem, tie nomāc vai samazina voltāž-atkarīgo L-tipa Ca²⁺ kanālu atvēršanu,

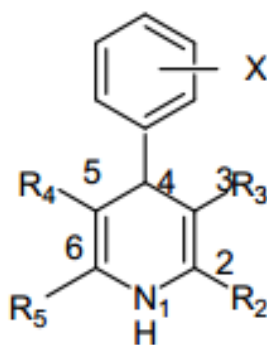
kas sastāv no 5 subvienībām - $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , δ (6.attēls). DHP saistās ar $\alpha 1$ subvienību (Catterall et al., 2005). L-tipa Ca^{2+} kanāli atrodas sirdī un asinsvados, tādējādi spēj mainīt sirds darbības potenciālu. Bloķējot Ca^{2+} iekļūšanu šūnā, Ca^{2+} kanālu antagonisti rada negatīvu hronotropo efektu (palēlina sirds darbību), negatīvu inotropo efektu (samazina miokarda kontrakcijas) un negatīvu dromotropo efektu (samazina vadāmības ātrumu atrioventrikulārajā mezglā) (Jadhav et al., 2012).



6.att. Voltāž-atkarīgā L-tipa Ca^{2+} kanālu subvienību struktūras modelis un $\alpha 1$ subvienība, pie kuras saistās DHP (Catterall et al., 2005)

DHP darbojas kā daudzfunkcionālas molekulas, kas tiek izmantotas ne tikai hipertenzijas ārstēšanai, bet arī uzrāda sirds un asinsvadu ārstējošās īpašības, kas ietver antianginālas, vazodilatoru un sirds depresantu farmakoloģiskās darbības (Marik and Varon, 2007). Lai arī DHP plaši lieto kardiovaskulāro slimību ārstēšanai, tiem piemīt arī prettuberkulozes, pretkrampju, antidiabētiska, pretspāpju, pretiekaisuma, pretvēža un pretstresa iedarbība (Swarnalatha et al., 2011).

Visi DHP atvasinājumi veido sešlocekļu aromātisko gredzenu (7.attēls). Tie satur slāpekli (N) pirmajā pozīcijā, un DHP farmakoloģisko aktivitāti nosaka tās molekulas struktūras elementi, kas visbiežāk tiek aizstāts ceturtās pozīcijas atomā (Triggle, 2007).



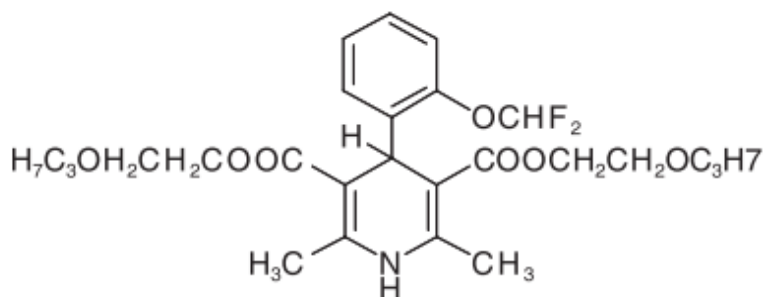
7.att. Dihidropiridīna struktūra (Swarnalatha et al., 2011)

Ir atklāts, ka antihipertenzīvie līdzekļi, kas ir Ca^{2+} kanālu antagonisti un pieder DHP klasei, spēj šķērsot hematoencefālisko barjeru. Tika pierādīts, ka tas ievērojami samazina risku Pārkinsona slimības attīstībai. Darbības mehānisma pamatā ir smadzeņu reģiona *substantia nigra* L-tipa Ca^{2+} kanālu bloķēšana dopamīnerģiskajos neironos, kur palielināta Ca^{2+} koncentrācija spēj izraisīt šūnu nāvi (Ritz et al., 2010).

1.3.1. Cerebrokrasts

Cerebrokrasts (4-(2-diflorometoksifenil)-2,6-dimetil-3,5-di(2propoksietoksikarbonil)-1,4-dihidropiridīns) ir viens no DHP atvasinājumiem, kas ir funkcionāli atšķirīgs. Ir pierādīts, ka tas atšķiras no pārējiem DHP atvasinājumiem ar to, ka *in vitro* nervu šūnu pētījumos neuzrāda Ca^{2+} kanālu antagonistu īpašības, jo tas nebloķē Ca^{2+} ieplūšanu neironu audos (Klusa, 1995). *In vivo* pētījumos ir pierādīta tā pretiekaisuma darbība, novēršot žurku ķepu tūsku veidošanās, bet *in vitro* – spēj inhibēt iekaisuma izraisīto citokīnu interleikīna-1 β un interleikīna-6 sekrēciju (Klegeris et al., 2002).

Cerebrokrasts ir DHP atvasinājums, kas izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā (Rīga) kā līdzeklis atmiņas procesu un smadzeņu asinsrites uzlabošanai, un tā struktūrformula redzama 8.attēlā (Vicente et al., 2006).



8.att. Cerebrokrasta struktūrformula (Fernandes et al., 2003)

Tā molekula ir raksturīga ar palielinātu lipofilitāti, ko nosaka divas vidēja garuma propoksi-etil-karbonil-grupas DHP gredzena trešajā un piektajā pozīcijā, un diflormetoksi-grupa fenilgredzena otrajā pozīcijā, kas savienota ar DHP gredzena ceturto oglekļa atomu (Vicente et al., 2006). Tā kā cerebrokrastam ir augstāka lipofilitāte, salīdzinot ar citiem DHP atvasinājumiem, piemēram, kardiovaskulāro medikamentu nifedipīnu, ir pierādīts, ka tā molekula spēj viegli šķērsot hematoencefālisko barjeru, arī mitohondriju un citu šūnu un

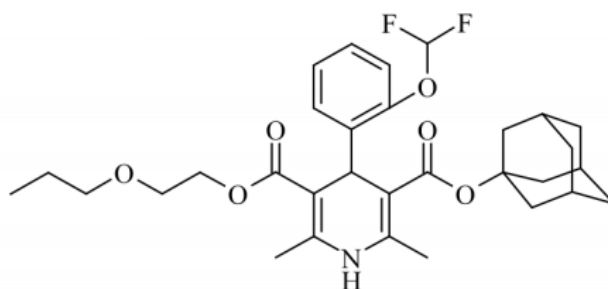
organellu membrānas, kā arī spēj mijiedarboties ar starpšūnu receptoriem (Briede et al., 2004). Ir pierādīta cerebrokrasta spēja izraisīt sinaptiskās manipulācijas, kas liecina, ka tas ir līdzīgs endogēnajiem ligandiem (Klusa, 1995).

Ir veikti vairāki pētījumi, lai novērtētu cerebrokrasta īpašības. Piemēram, pētījumi organisma līmenī, kur izmantota augstas cerebrokrasta devas (1.5–5 mg/kg), ir novērots nomierinošs efekts pelēm (Germane et al., 1991). Tam piemīt pretkrampju darbība epilepsijas izveidotā peļu modelī (Kryzhanovskii et al., 1993). Savukārt pētījumi orgānu līmenī liecina, ka cerebrokrasts rada negatīvu inotropo efektu izolēti pārklātā normālā žurku sirdī (*isolated perfused normal rat heart*), samazina sirds ritmu un sistolisko spiedienu kreisajā kambarī, kā arī ir cēlonis īslaicīgai koronāro artēriju vazodilatācijai (Briede et al., 2008).

Kopumā - cerebrokrastam raksturīgas visizteiktākās potenciālās neiroprotektīvās, pretiekaisuma un kognitīvo spēju uzlabojošas īpašības no visiem DHP atvasinājumiem (Vicente et al., 2006).

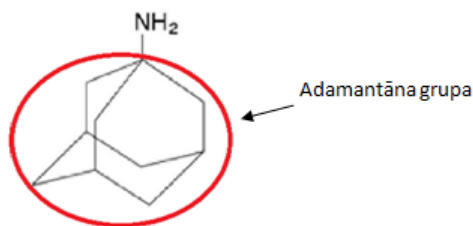
1.3.2. AV-6-93

AV-6-93 (2,6-dimetil-3-(1-adamantiloksikarbonil)-4-(2-difluorometoksifenil)-5-[(2-propoksi)etoksikarbonil]-1,4-dihidropiridīns) ir DHP derivāts, kas sintezēts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā. Tā struktūru veido adamantāna gredzens, kas pievienots DHP gredzenam trešajā pozīcijā (*9.attēls*). Sintezējot šādu savienojumu, tika apvienotas divas stabilas struktūras, kas ir uzrādījušas atmiņas uzlabojošas un neiroprotektīvas īpašības (Klimaviciusa et al., 2012).



9.att. AV-6-93 struktūrformula (Klimaviciusa et al., 2012)

Adamantāna gredzens veido amantadīna struktūru (*10.attēls*), ko klīniski izmanto kā pretvīrusu līdzekļus un Pārkinsona slimības terapijā (Kornhuber et al., 1993).



10.att. Amantadīna struktūrformula (Cady et al., 2010)

Amantadīns ir neselektīvs NMDA tipa glutamāta receptoru un dopamīna antagonists, kas veicina dopamīna izdalīšanos no nervu galiem un kavē tā atpakaļuzsūkšanos (Pristupa et al., 1998). Tas galvenokārt ir dopamīnerģisks līdzeklis, un ir pierādīts, ka dopamīnerģiskā sistēma ir svarīga atmiņas procesu veidošanā (Kraus et al., 2005). Piemēram, kādā pētījumā žurkām tika ievadīts SKF-38393, kas ir dopamīna D1 receptoru agonists, un MK-801, kas ir nekonkurējošais NMDA receptoru antagonists. Rezultāti liecina, ka dopamīna D1 receptoru aktivācija un NMDA receptoru bloķēšana mijiedarbības ietekmē rada uzlabojumus atmiņas veidošanās procesos (Valentim et al., 2009). Ir pierādīts, ka amantadīns ievērojami uzlabo kognitīvās funkcijas pacientiem pēc traumatiskas smadzeņu traumas (TBI) (Wang et al., 2014).

DHP atvasinājums AV-6-93 spēj regulēt šūnas izdzīvošanas procesus, kas saistīti ar mitohondriāliem procesiem, piemēram, kavējot indukcijas caurlaidību un novēršot oksidatīvo stresu. AV-6-93 efektivitāte ir pierādīta neirodeģeneratīvo slimību ārstēšanā, kas saistītas ar mitohondriāliem procesiem, piemēram, Pārkinsona slimībā (Klimaviciusa et al., 2012).

Tā kā gan DHP, gan amantadīns iepriekš ir uzrādījuši atmiņas uzlabojošas funkcijas, tad jaunizveidotajā savienojumā tika paredzēts, ka adamantāna grupa noteiks terapeitisko efektivitāti neirodeģeneratīvo slimību ārstēšanā un darbosies neiroprotektīvi, bet DHP - kā nesēj molekula, jo DHP spēj viegli šķērsot hematoencefālisko barjeru (Kraus et al., 2005).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Eksperimenta dzīvnieki

Eksperimentā tika izmantoti Rīgas Stradiņa Universitātes Eksperimentālo dzīvnieku audzētavas (Rīga, Latvija) 40 *Wistar* žurku tēviņi, kuru vidējais svars eksperimenta sākumā bija 180 ± 10 g. Dzīvnieki tika turēti standarta laboratorijas apstākļos (telpas temperatūra $22 \pm 1^\circ$ C, 12 stundu gaismas/tumsas cikls) Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedras eksperimentālajā telpā tiem paredzētajos ventilācijas būros. Dzīvniekiem tika nodrošināta nepārtraukta pieeja barībai un ūdenim.

Visas darbā veiktās eksperimentālās procedūras veiktas saskaņā ar Eiropas Savienības konvencijas direktīvu 86/609/EEC vadlīnijām „*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes*”(1986), un tika saskaņotas ar Latvijas Pārtikas un veterinārā dienesta Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi (Rīga, Latvija).

2.2. Vielas

Eksperimentā tika izmantots jauns dihidropiridīna atvasinājums AV-6-93, kas sintezēts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā.

*Western blot*ā izmantotie reaģenti: RIPA buferis (R0278, Sigma Aldrich, ASV), proteāžu inhibitora kokteilis (P8340, Sigma Aldrich, ASV), nitrocelulozes membrāna (RPN1010D, GE Healthcare, Lielbritānija). Poliakrilamīda gēla elektroforēzei izmantots proteīnu molekulārā svara standarts – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (26634, Thermo Scientific, Lietuva). Bloķēšanai izmantots 5% sausais piens (sc-2324, Santa Cruz Biotechnology, ASV) un 0,05% Tween-20 (P2287, Sigma Aldrich, ASV).

Izmantotās primārās antivielas: trušu poliklonālā BDNF (sc-20981, Santa Cruz Biotechnology, ASV). Parauga ievadīšanas kontrolei izmantots peļu monoklonālais β -aktīns (ab8224, Abcam, Lielbritānija).

Izmantotā sekundārā anti- β -aktīna anti-peļu IgG (sc-358920, Santa Cruz Biotechnology, ASV).

Detektēšanai izmantots hemiluminiscences ECL Advance šķīdumi A un B (RPN2135, Amersham GE Healthcare, ASV).

2.3. Eksperimenta dizains

Žurkas tika sadalītas grupās, katrā pa 8-10 žurkām:

1. grupa – Fizioloģiskais šķīdums (SAL);
2. grupa – Zāļu viela AV-6-93;
3. grupa – Fizioloģiskais šķīdums (SAL) + stress (Str);
4. grupa – Stress (Str) + zāļu viela AV-6-93.

Vielas, katru dienu svaigi pagatavotas, tika ievadītas intraperitonāli (i.p.) tilpumā 1 mL/kg 2 nedēļas pēc kārtas. Pēdējās vielas ievades dienā tika veikts imobilizācijas stress 2. un 4. grupas žurkām.

2.3.1. Imobilizācijas stress dzīvniekiem

Stresa modelī žurkas 2 h imobilizēja. Šis modelis iepriekš aprakstīts Nooshinfar *et al.*, 2011. Imobilizācijas stress ietekmē atmiņu, un tādējādi, piemēram, var novērtēt atmiņas traucējumu attīstību. Katra stresējamā žurka atsevišķi tika ievietota mazā plastikas būrī, kura garums 20 cm, platums 5 cm, augstums 6 cm. Ar plastikāta būra pārvietojamo durvju palīdzību būra garums tika pielāgots attiecīgi katras žurkas izmēriem. Visa testa laiku (2 h) žurkas bija pilnībā imobilizētas, bez kustībām. Pēc imobilizācijas stresa testa žurkas tika anastezētas ar ketamīnu un ksilazīnu un perfuzētas 10 minūtes ar fizioloģisko šķīdumu, lai pēc tam izolētu hipokampa struktūru smadzenēs. Smadzeņu audi līdz tālākām darbībām tika uzglabāti -80° C grādu temperatūrā.

2.4. Western blota metode

Tika pārbaudīta proteīnu ekspresija peļu hipokampā, izmantojot *Western* blota metodi, kas sastāv no parauga sagatavošanas, gēla elektroforēzes un pussausās pārnese, bloķēšanas, blotēšanas jeb inkubācijas ar primārajām un sekundārajām antivielām, membrānas attīstīšana

2.4.1. Paraugu sagatavošana

Eksperimentā izmantots žurku smadzeņu hipokamps, kas tika izdalīts no sasaldētā audu materiāla. Proteīnu izdalīja no hipokampa un homogenizēja homogenizatorā kopā ar 100 µL atdzesētu RIPA buferi un svaigu proteāžu inhibitoru kokteili. Visa eksperimenta laikā paraugi tika turēti uz ledus.

Koncentrācijas noteikšanai tika ņemti 20 µg no homogenizētā iegūtā proteīna maisījuma parauga. Proteīna koncentrācijas noteikšanai izmantoja *BCA Assay Kit* metodi, kuras pamatā ir vara – proteīna kompleksa veidošanās bāziskos apstākļos. Absorbcijas izmaiņas tika noteiktas ar spektrometru pie 562 nm viļņu garuma (Tecan infinite M200PRO). Tika izveidota kalibrēšanas līkne ar zināma proteīna atšķaidījumiem un nomērīta absorbcija visiem paraugiem, tādā veidā nosakot kopējo proteīnu koncentrāciju paraugos.

Pirms elektroforēzes paraugiem pievieno Laemmli buferi, kas iekrāso paraugu zilā krāsā, padarot proteīnus negatīvi lādētus un veicinot labāku parauga ievadīšanu gēla bedrītē. Tad tos termiski denaturē 5 minūtes 95° C termostatā. Pēc denaturēšanas tos atdzesē uz ledus.

2.4.2. Gēla elektroforēze un pussausā pārnese

No kopējā proteīnu daudzuma 20 µg proteīni tika sadalīti pēc to molekulārā svara, izmantojot 10% SDS poliakrilamīda gēlu pie 150 V sprieguma aptuveni 2 stundas. Vienā no gēla bedrītēm pievieno proteīnu molekulārā svara marķieri, lai pētāmais proteīns tiktu detektēts.

Pēc gēla elektroforēzes proteīnus pārnes uz nitrocelulozes membrānu, izmantojot elektroforēzes metodi. Gan vatmaņa papīrus, gan nitrocelulozes membrānu iepriekš samitrina ar atdzesētu transfēra buferi. Visu pieslēdz pie strāvas, un izmantoto strāvas stiprumu iestata attiecīgi membrānas laukumam ($8 \times 5 = 40 \text{ cm}^2 = 40 \text{ mA}$). Pārneses ilgums 45-60 minūtes.

2.4.3. Bloķēšana un blotēšana

Lai novērstu membrānas savstarpējo saistīšanos ar antivielu, to bloķē ar 5 % sauso pienu un 0,05% Tween-20 TBS-buferi 30 minūtes istabas temperatūrā.

Blotēšana tika veikta ar primāro antivielu 4°C temperatūrā diennakti atšķaidījumā 1:200. Pēc primāro antivielu piesaistes, membrānu skalo 3 reizes pa 15 minūtēm ar TBS-T buferi istabas temperatūrā uz kratītāja. Tad membrānu inkubē ar sekundāro antivielu 1 stundu

istabas temperatūrā peroksidāzes konjugētā anti-peļu IgG atšķaidījumā 1:2000. Atkārtoti membrānas skalošanu ar TBS-T buferi istabas temperatūrā 3 reizes pa 15 minūtēm uz kratītāja.

2.4.4. Membrānas attīstīšana

Ekspresijas detektēšanas noteikšanai izmanto hemiluminiscences reaģentus - šķīdumus A un B, ko sajauc attiecīgi 1:1. Šķīdumu vienmērīgi uzklāj uz membrānas, inkubē 1 minūti un pēc tam uzmanīgi noslauka no liekā šķidruma. Membrānu ievieto CCD kamerā (UVP Bioimaging System, Kanāda), kur iestata ekspozīcijas laiku – tas var variēt, bet optimāli 1 minūte.

2.5. Datu analīze

Iegūtie dati tika apstrādāti ar *GraphPad Prism 5.01*. biostatistikas programmu, bet *Western* blota attēli analizēti ar *ImageJ* programmu.

Iegūtais attēls tiek izveidots melnbaltajā režīmā (8 biti). Izmantojot taisnstūra figūru no *ImageJ* programmas rīkjoslās, tiek iezīmēta pirmā josla - β -aktīns, ko pieņem kā standartu *Western* blota analīzes attēlā. β -aktīns tiek izmantots paraugu salīdzināšanai, kas izteikts kā absolūtās intensitātes skaitlis - iezīmētā laukuma un tajā vidējo pikseļu skaitu reizinājums. Paraugu ekspresijas attēli arī tika iezīmēti, izmantojot taisnstūra figūru. Gan β -aktīna, gan paraugu ekspresijas attēlu iezīmēšana notiek, izvēloties lielāko piesātinājumu. Kontroles grupai, kur tika ievadīts fizioloģiskais šķīdums, pieņem vērtību 1, bet pārējo grupu relatīvo intensitāti aprēķina, dalot kontroles vērtību ar katras grupas absolūtās intensitātes vērtību.

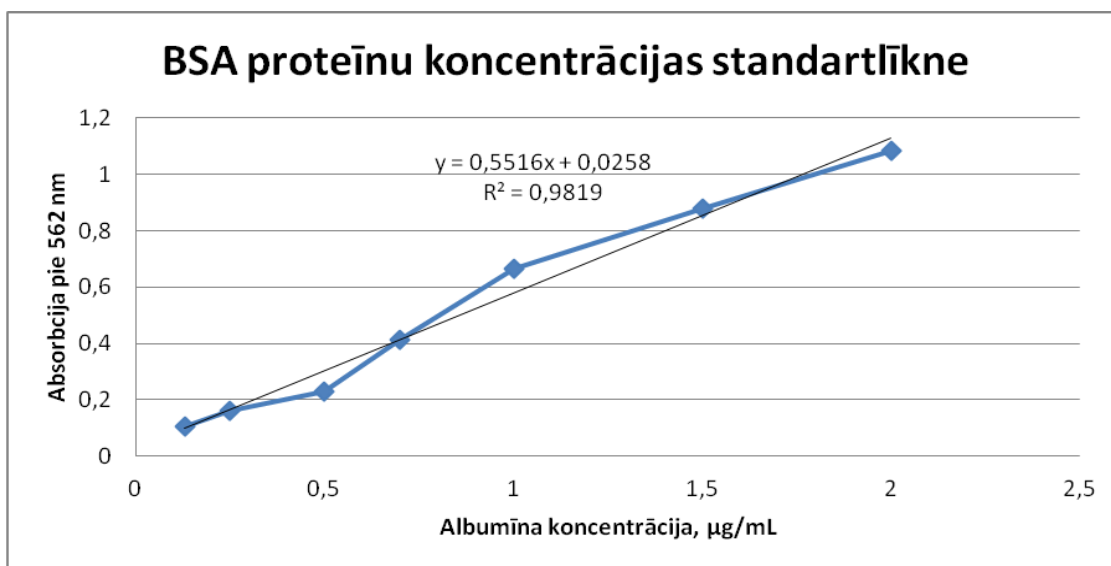
Statistisko datu analīzei tika izmantota dispersijas analīze (*Analysis of variance*; ANOVA), Stjudenta nesapārotais t tests, un datu statistiskā ticamība tika vērtēta pēc p vērtības, kas ir mazāka par 0,05 ($p < 0,05$).

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

AV-6-93 ir jauns DHP atvasinājums, kas apvieno DHP molekulu ar adamantāna gredzenu, kas pirmo reizi tika pārbaudīts uz BDNF ekspresiju imobilizācijas stresa pakļautu žurku hipokampus. Eksperimenta izpildei bija nepieciešams vispirms izolēt hipokampus no smadzenēm un tālāk izdalīt proteīnus. Hipokampus un attiecīgi to proteīnus izdalījām no visām četrām eksperimenta grupām:

1. grupa – Fizioloģiskais šķīdums (SAL);
2. grupa – Zāļu viela AV-6-93;
3. grupa – Fizioloģiskais šķīdums (SAL) + stress (Str);
4. grupa – Stress (Str) + zāļu viela AV-6-93.

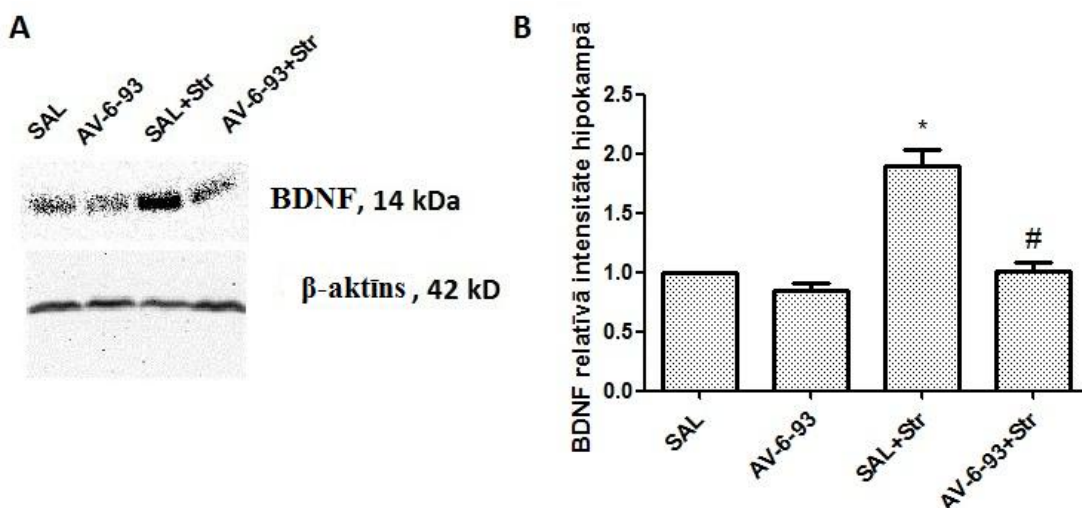
Visiem paraugiem noteicām kopējā proteīna koncentrāciju ar BCA metodi, kuras pamatā ir jau zināmu proteīna vērša seruma albumīna (BSA) koncentrācijas absorbcijas skaitļu noteikšana ar spektrofotometru (skat. metožu aprakstu) un nezināmo koncentrācijas noteikšana pēc aprēķiniem no standarta līknes, kas mūsu gadījumā bija ar salīdzinoši augstu precizitāti 0.9819 (1 ir ideāls) (*11. attēls*).



11.att. Proteīna albumīna koncentrācijas standartlīkne, izmantojot BCA metodi

Pēc šīs līknes, zinot albumīna koncentrāciju un absorbciju, aprēķinājām nezināmo hipokampa proteīna paraugu koncentrāciju. Šajā gadījumā katru hipokampa proteīna paraugu sagatavoja tā, ka kopējais proteīna daudzums, ko ievadīja gēlā bija 20 μg.

Tālāk ar *Western* blota metodi pārbaudījām DHP atvasinājuma AV-6-93 spēju ietekmēt BDNF proteīna ekspresiju. Redzams, ka stress (grupa SAL+Str) ir ievērojami palielinājis ekspresiju, salīdzinot ar fizioloģiskā šķīduma grupas (SAL) BDNF ekspresijas intensitāti hipokampā (* $p < 0,05$, SAL vs SAL+Str; 12. attēls). Salīdzinot stresa grupas (SAL+Str) rezultātus ar vielas AV-6-93 grupas (AV-6-93 + Str) rezultātiem, redzams, ka AV-6-93 grupa normalizē BDNF relatīvo ekspresijas intensitāti hipokampā (# $p < 0,05$, Str+AV-6-93 vs SAL+Str). Savukārt zāļu viela AV-6-93 neietekmē BDNF relatīvo intensitāti hipokampā, salīdzinot ar fizioloģisko šķīdumu grupu (SAL). β-aktīna ekspresija arī tika noteikta šiem paraugiem, lai pārlicinātos, ka gēlā ir ievadīts vienāds kopējais proteīna daudzums. β-aktīns ir šūnu citoskeleta proteīns, kura ekspresija ir salīdzinoši nemainīga, tāpēc to izmanto ļoti bieži par precizitātes kontroli, veicot *Western* blotus.



12. att. **BDNF ekspresija žurku hipokampā.** A – Reprezentatīvie *Western* blota attēli ar BDNF ekspresiju un ar β-aktīnu kā paraugu kontroli. B – BDNF relatīvās ekspresijas intensitātes hipokampā salīdzinājums starp grupām, kas uzrāda, ka stress statistiski būtiski palielināja BDNF ekspresiju hipokampā salīdzinājumā ar kontroles grupu. AV-6-93 ievadīšana normalizēja BDNF ekspresiju stresēto žurku grupā.

Neirotrofie faktori ir svarīgas molekulas smadzenēs, kas nodrošina sinaptisko plasticitāti, kā arī neironu augšanu, dzīvotspēju un diferenciāciju centrālajā un perifērajā nervu sistēmā (Deister and Schmidt, 2006). Iegūtie rezultāti norāda, ka BDNF ekspresiju līdzīgi kā citiem neirotrofajiem faktoriem, spēj ietekmēt gan akūta, gan hroniska stresa

situācijas. BDNF ekspresijas izmaiņu noteikšana hipokampā gan akūta, gan hroniska stresa gadījumā pierādīja, ka stress spēj izraisīt BDNF ekspresijas līmeņa dažādas izmaiņas. Akūts jeb īsa laika stress (līdz 60 minūtēm) izraisa ievērojamu BDNF ekspresijas palielināšanos žurku hipokampā, bet ilgāks stress (vismaz 180 minūtes) – samazina BDNF ekspresiju (Marmigère et al., 2003). Līdzīgu pētījumu 2010. gadā veica Shi *et al.*, kuri arī pētīja BDNF ekspresijas izmaiņas pie dažādiem stresa apstākļiem. Izmantoja piespiedu peldēšanu žurku tēviņiem 4 °C aukstā ūdenī un 25 °C siltā ūdenī. Akūts stress izraisīja ievērojamu BDNF ekspresijas palielināšanos, savukārt hronisks stress izraisīja BDNF ekspresijas samazināšanos žurku hipokampā. Rezultāti liecina, ka jebkuras BDNF ekspresijas līmeņa izmaiņas ietekmē svarīgus procesus hipokampā (Shi et al., 2010). Citā pētījumā ar BDNF ekspresijas izmaiņām pētīja nevēlamu dzīves notikumu (palielinātu stresu) agrā attīstībā spēju mainīt un ietekmēt smadzeņu nobriešanu un organismu jutīgumu uz psihiskiem traucējumiem, kura izmantoja atkārtotu pēcdzemdību mātes atņemšanu žurku mazuļiem. Atklājās, ka pēcdzemdību mātes atņemšana līdz divām stundām rada akūta stresa situāciju, līdz ar to notiek īstermiņa BDNF ekspresijas līmeņa palielināšanās gan hipokampā, gan prefrontālajā garozā, savukārt mātes atņemšana līdz 3 dienām rada hroniska stresa situāciju, kā rezultātā novēro BDNF ekspresijas samazināšanos (Roceri et al., 2004). Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka stress statistiski būtiski palielināja BDNF ekspresiju hipokampā salīdzinājumā ar kontroles grupu. Salīdzinot ar citu pētnieku iegūtajiem BDNF ekspresijas izmaiņu rezultātiem, var secināt, ka eksperimentā iegūtie proteīni tika izdalīti no akūti stresētu žurku smadzeņu hipokampa struktūrām.

Pēdējo gadu laikā ir konstatēts, ka stresam un BDNF ekspresijas izmaiņām ir saikne patoloģisko traucējumu iesaistīšanā, piemēram, depresijas attīstībā, jo stress ir viens no depresijas attīstības faktoriem. Ir pierādīts, ka stresa un antidepresantu molekulu un šūnu pētījumi ir saistīti ar garastāvokļa traucējumiem, kas uzrāda, ka stress un antidepresantu terapija iedarbojas pretēji tādos smadzeņu reģionos, kas iesaistīti garastāvokļa un kognitīvajā regulācijā, piemēram, hipokampā (Lopez et al., 2013). Vairākos pētījumos ir konstatēts, ka BDNF līmenis ir ievērojami zemāks depresijas pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu, un to iespējams normalizēt, lietojot antidepresantus (Gonul et al., 2005). Šos rezultātus apstiprina vairāki antidepresantu terapijas pētījumi, piemēram, Matrisciano *et al.* pārbaudīja BDNF līmeni pēc antidepresantu sertralīna, escitaloprāma vai venlafaksīna terapijas pēc 5 nedēļām un 6 mēnešiem. Kā rezultātā - pēc visu antidepresantu terapijas novēroja BDNF ekspresijas līmeņa normalizāciju gan pēc 5 nedēļām, gan pēc 6 mēnešiem depresijas pacientiem (Matrisciano et al., 2009). Līdzīgus rezultātus ziņoja arī Gonul *et al.*, kas arī novēroja BDNF

ekspresijas līmeņa normalizāciju pēc 8 nedēļu ārstēšanas ar sertralīnu, fluoksetīnu un paroksetīnu depresijas pacientiem (Gonul et al., 2005).

Kopumā šie pētījumi līdzinās citu pētnieku iegūtajiem datiem par BDNF ekspresijas līmeņa pieaugumu un normalizāciju hipokampā pēc ilgtermiņa ārstēšanas ar antidepresantiem pacientiem ar stresa izraisītu depresiju. AV-6-93 ievadītā viela stresētos žurku hipokampus atgriež BDNF ekspresiju kontroles līmenī, kas liecina, ka AV-6-93 piemīt spēja regulēt disbalansu no stresa. Tas norāda uz neiroprotektējošām īpašībām šim savienojumam, kas varētu būt par pamatu tālākiem pētījumiem, lai noskaidrotu molekulāros mehānismus.

4. SECINĀJUMI

1. Imobilizācijas stress ir palielinājis BDNF ekspresiju hipokampā žurkās, salīdzinot ar kontroles hipokampa žurkām.
2. Savienojums AV-6-93 pats par sevi neietekmēja BDNF ekspresiju hipokampā žurkām.
3. Savienojums AV-6-93 statistiski būtiski normalizēja BDNF ekspresiju hipokampā žurkām.
4. AV-6-93 piemīt spēja normalizēt neirotrofā faktora ekspresiju stresēto žurku hipokampā, līdz ar to būtu vēlams turpināt pētīt šī savienojuma iespējamās neiroprotektīvās īpašības un molekulāros mehānismus.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt vislielāko pateicību darba vadītājai LU MF zinātniskajai asistentei un Mg. biol. Ulrikai Beitnerei par bakalaura darba tēmas ideju, iespēju piedalīties eksperimentos un apgūt *Western* blota metodi, kā arī paldies par sniegto palīdzību literatūras materiālu meklēšanā, atbalstu darba tapšanas procesā un laiku, kas pavadīts konsultācijās.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Alvarez, D.N., Joels, M., Krugers, H.J.** Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 2003, 17(9), 1928-1934.
2. **Banasr, M. and Duman, R.S.** Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biological psychiatry*, 2008, 64(10), 863-870.
3. **Briede, J., Stivrina, M., Vigante, B., et al.** Acute effect of antidiabetic 1, 4-dihydropyridine compound cerebrocrast on cardiac function and glucose metabolism in the isolated, perfused normal rat heart. *Cell biochemistry and function*, 2008, 26(2), 238-245.
4. **Briede, J., Stivriņa, M., Stoldere, D., et al.** Effect of new and known 1, 4-dihydropyridine derivatives on blood glucose levels in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell biochemistry and function*, 2004, 22(4), 219-224.
5. **Cady, S.D., Schmidt-Rohr, K., Wang, J., et al.** Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature*, 2010, 463(7281), 689-692.
6. **Calabrese, E.J., Bachmann, K.A., Bailer, A.J., et al.** Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicology and applied pharmacology*, 2007, 222(1), 122-128.
7. **Castillo, P. E.** Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2012, 4(2), a005728.
8. **Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., et al.** International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews*, 2005, 57(4), 411-425.
9. **Chao, M.X., Rajagopal, R., Lee, F.X.** Neurotrophin signalling in health and disease. *Clinical science*, 2006, 110, 167-173.
10. **Chu, Y., Fioravante, D., Leitges, M., et al.** Calcium-dependent PKC isoforms have specialized roles in short-term synaptic plasticity. *Neuron*, 2014, 82(4), 859-871.
11. **Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Doyle, W.J., et al.** Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(16), 5995-5999.
12. **De Kloet, E.R., Joëls, M., Holsboer, F.** Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, 6(6), 463-475.

13. **Dean, C., Liu, H., Staudt, T., et al.** Distinct subsets of Syt-IV/BDNF vesicles are sorted to axons versus dendrites and recruited to synapses by activity. *The Journal of Neuroscience*, 2012, 32(16), 5398-5413.
14. **Deister, C. and Schmidt, C.E.** Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth. *Journal of Neural engineering*, 2006, 3(2), 172.
15. **Duman, R.S. and Monteggia, L.M.** A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological psychiatry*, 2006, 59(12), 1116-1127.
16. **Fedulov, V., Rex, C.S., Simmons, D.A., et al.** Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. *The Journal of neuroscience*, 2007, 27(30), 8031-8039.
17. **Fernandes, M.A., Santos, M.S., Vicente, J.A., et al.** Effects of 1, 4-dihydropyridine derivatives (cerebrocrast, gammapyrone, glutapyrone, and diethone) on mitochondrial bioenergetics and oxidative stress: a comparative study. *Mitochondrion*, 2003, 3(1), 47-59.
18. **Finsterwald, C. and Alberini, C.M.** Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiology of learning and memory*, 2014, 112, 17-29.
19. **Freneau, R.T., Kam, K., Qureshi, T., et al.** Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science*, 2004, 304(5678), 1815-1819.
20. **Germane, S., Bleidelis, E., Rakauskaite, I., et al.** Neuropharmacological study of IOS-1,1212, a novel dihydropyridine derivative. *Proceeding of the Latvian Academy of Sciences*, 1991, 45(6), 112–124.
21. **Gonul, A.S., Akdeniz, F., Taneli, F., et al.** Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 2005, 255(6), 381-386.
22. **Gourley, S.L., Kedves, A.T., Olausson, P., et al.** A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology*, 2009, 34(3), 707-716.
23. **Groeneweg, F.L., Karst, H., de Kloet, E.R., et al.** Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *Journal of endocrinology*, 2011, 209(2), 153-167.
24. **Haller, J., Mikics, E., Makara, G.B.** The effects of genomic and non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Frontiers in neuroendocrinology*, 2008, 29(2), 273-291.

25. **Herman, J.P., McKlveen, J.M., Solomon, M.B., et al.** Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2012, 45(4), 292-298.
26. **Hill, M.N., Patel, S., Campolongo, P., et al.** Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *The Journal of Neuroscience*, 2010, 30(45), 14980-14986.
27. **Holsboer, F. and Ising, M.** Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annual review of psychology*, 2010, 61, 81-109.
28. **Hu, H., Real, E., Takamiya, K., et al.** Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell*, 2007, 131(1), 160-173.
29. **Hui, G.K., Figueroa, I.R., Poytress, B.S., et al.** Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 2004, 81(1), 67-74.
30. **Hulme, S.R., Jones, O.D., Abraham, W.C.** Emerging roles of metaplasticity in behaviour and disease. *Trends in neurosciences*, 2013. 36(6), 353-362.
31. **Hunter, R.G., McEwen, B.S., Pfaff, D.W.** Environmental stress and transposon transcription in the mammalian brain. *Mobile genetic elements*, 2013, 3(2), 17657-17662.
32. **Jadhav, P., Pujari, R.R., Chatterjee, N.R.** Green synthesis and antihypertensive activity of some mannich bases of 1,4-dihydropyridine compounds. *International Journal of Biomedical Research*, 2012, 3(7), 334-342.
33. **Joëls, M. and Baram, T.Z.** The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009, 10(6), 459-466.
34. **Joëls, M.** Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in pharmacological sciences*, 2006, 27(5), 244-250.
35. **Joëls, M., Fernandez, G., Roozendaal, B.** Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends in cognitive sciences*, 2011, 15(6), 280-288.
36. **Kay, L., Humphreys, L., Eickholt, B.J., et al.** Neuronal activity drives matching of pre- and postsynaptic function during synapse maturation. *Nature neuroscience*, 2011, 14(6), 688-690.
37. **Klegeris, A., Liutkevicius, E., Mikalauskiene, G., et al.** Anti-inflammatory effects of cerebrocrast in a model of rat paw edema and on mononuclear THP-1 cells. *European journal of pharmacology*, 2002, 441(3), 203-208.
38. **Klimaviciusa, L., Fernandes, M.A.S., Lenberga, N., et al.** Targeting the Mitochondria by Novel Adamantane-Containing 1,4-Dihydropyridine Compounds. *Bioenergetics*, 2012, 257-272.

39. **Klusa, V.** Cerebrocrast. Neuroprotectant, cognition enhancer. *Drugs of the Future*, 1995, 20(2), 135-138.
40. **Kornhuber, J., Weller, M., Schoppmeyer, K., et al.** Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 1993, 43, 91-104.
41. **Kraus, M.F., Smith, G.S., Butters, M., et al.** Effects of the dopaminergic agent and NMDA receptor antagonist amantadine on cognitive function, cerebral glucose metabolism and D2 receptor availability in chronic traumatic brain injury: a study using positron emission tomography (PET). *Brain Injury*, 2005, 19(7), 471-479.
42. **Kryzhanovskii, G.N., Karpova, M.N., Abrosimov, I., et al.** Anticonvulsant activity of sodium valproate and various calcium antagonists during their combined use in mice. *Biulleten'eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 1993, 115(3), 231-233.
43. **Lopez, J.P., Mamdani, F., Labonte, B., et al.** Epigenetic regulation of BDNF expression according to antidepressant response. *Molecular psychiatry*, 2013, 18(4), 398-399.
44. **Luo, J., Phan, T. X., Yang, Y., et al.** Increases in cAMP, MAPK activity, and CREB phosphorylation during REM sleep: implications for REM sleep and memory consolidation. *The Journal of Neuroscience*, 2013, 33(15), 6460-6468.
45. **Lüscher, C. and Malenka, R. C.** NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2012, 4(6), a005710.
46. **Marik, P.E. and Varon, J.** Hypertensive crises: challenges and management. *Chest Journal*, 2007, 131(6), 1949-1962.
47. **Marmigère, F., Givalois, L., Rage, F., et al.** Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus*, 2003, 13(5), 646-655.
48. **Martin, S., Henley, J.M., Holman, D., et al.** Corticosterone increases AMPAR lateral diffusion and bidirectionally regulates synaptic AMPARs. *PLoS One*, 2009, 4, e4714.
49. **Matrisciano, F., Bonaccorso, S., Ricciardi, A., et al.** Changes in BDNF serum levels in patients with major depression disorder (MDD) after 6 months treatment with sertraline, escitalopram, or venlafaxine. *Journal of psychiatric research*, 2009, 43(3), 247-254.
50. **Matsumoto, Y., Sandoz, J.C., Devaud, J.M., et al.** Cyclic nucleotide-gated channels, calmodulin, adenylyl cyclase, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II are required for late, but not early, long-term memory formation in the honeybee. *Learning & Memory*, 2014, 21(5), 272-286.

51. **McEwen, B.S. and Gianaros, P.J.** Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1186(1), 190-222.
52. **McEwen, B.S., Gray, J.D., Nasca, C.** Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. *Neurobiology of stress*, 2015, 1, 1-11.
53. **Musazzi, L., Milanese, M., Farisello, P., et al.** Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PloS one*, 2010, 5(1), e8566.
54. **Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C.D., et al.** Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, 2014, 511(7509), 348-352.
55. **Nanou, E.E. and Manira, A.** Mechanisms of modulation of AMPA-induced Na⁺-activated K⁺ current by mGluR1. *Journal of neurophysiology*, 2010, 103(1), 441-445.
56. **Nater, U.M. and Rohleder, N.** Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, 34(4), 486-496.
57. **Nooshinfar, E., Akbarzadeh-Baghban, A., Meisami, E.** Effects of increasing durations of immobilization stress on plasma corticosterone level, learning and memory and hippocampal BDNF gene expression in rats. *Neuroscience letters*, 2011, 500(1), 63-66.
58. **Ohno, T., Hasegawa, T., Tsuruoka, T., et al.** Short-term plasticity and long-term potentiation mimicked in single inorganic synapses. *Nature materials*, 2011, 10(8), 591-595.
59. **Okano, H., Hirano, T., Balaban, E.** Learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(23), 12403-12404.
60. **Pillai, A.** Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neuro-signals*, 2007, 16(2-3), 183-193.
61. **Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., et al.** The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 2012, 13(1), 22-37.
62. **Pristupa, Z.B., McConkey, F., Liu, F., et al.** Protein kinase-mediated bidirectional trafficking and functional regulation of the human dopamine transporter. *Synapse*, 1998, 30(1), 79-87.
63. **Rajkowska, G. and Miguel-Hidalgo, J.J.** Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS & neurological disorders drug targets*, 2007, 6(3), 219.
64. **Ritz, B., Rhodes, S.L., Qian, L., et al.** L-type calcium channel blockers and Parkinson disease in Denmark. *Annals of neurology*, 2010, 67(5), 600-606.

65. **Roceri, M., Cirulli, F., Pessina, C., et al.** Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biological psychiatry*, 2004, 55(7), 708-714.
66. **Roosendaal, B., McEwen, B.S., Chattarji, S.** Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009, 10(6), 423-433.
67. **Shi, S.S., Shao, S.H., Yuan, B.P., et al.** Acute stress and chronic stress change brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase-coupled receptor (TrkB) expression in both young and aged rat hippocampus. *Yonsei medical journal*, 2010, 51(5), 661-671.
68. **Soderling, T.R. and Derkach, V.A.** Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends in neurosciences*, 2000, 23(2), 75-80.
69. **Swarnalatha, G., Prasanthi, G., Sirisha, N., et al.** 1, 4-Dihydropyridines: A Multifunctional Molecule-A Review. *International Journal of ChemTech Research*, 2011, 3(1), 75-89.
70. **Treccani, G., Musazzi, L., Perego, C., et al.** Acute stress rapidly increases the readily releasable pool of glutamate vesicles in prefrontal and frontal cortex through non-genomic action of corticosterone. *Molecular psychiatry*, 2014, 19(4), 401-401.
71. **Triggle, D.J.** Calcium channel antagonists: clinical uses—past, present and future. *Biochemical pharmacology*, 2007, 74(1), 1-9.
72. **Turrigiano, G.** Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2012, 4(1), a005736.
73. **Valentim, S.J.R., Gontijo, A.V.L., Peres, M.D., et al.** D 1 dopamine and NMDA receptors interactions in the medial prefrontal cortex: modulation of spatial working memory in rats. *Behavioural brain research*, 2009, 204(1), 124-128.
74. **Vicente, J.A.F., Duburs, G., Klusa, V., et al.** Cerebrocrast as a neuroprotective, anti-diabetic and mitochondrial bioenergetic effector: A putative mechanism of action. *Mitochondrial Pharmacology and Toxicology*, 2006, 37/661(2), 185-197.
75. **Voglis, G. and Tavernarakis, N.** The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO reports*, 2006, 7(11), 1104-1110.
76. **Vyas, A., Pillai, A.G., Chattarji, S.** Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*, 2004, 128(4), 667-673.

77. Wang, T., Huang, X.J., Van, K.C., et al. Amantadine improves cognitive outcome and increases neuronal survival after fluid percussion traumatic brain injury in rats. *Journal of neurotrauma*, 2014, 31(4), 370-377.
78. Yang, J., Siao, C.J., Nagappan, G., et al. Neuronal release of proBDNF. *Nature neuroscience*, 2009, 12(2), 113-115.
79. Yoshii, A. and Constantine-Paton, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Developmental neurobiology*, 2010, 70(5), 304-322.
80. Yousef, W.M., Omar, A.H., Morsy, M.D., et al. The mechanism of action of calcium channel blockers in the treatment of diabetic nephropathy. *International journal of diabetes and metabolism*, 2005, 13(2), 76-82.
81. Yuen, E.Y., Liu, W., Karatsoreos, I.N., et al. Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Molecular psychiatry*, 2011, 16(2), 156-170.
82. Yuen, E.Y., Wei, J., Liu, W., et al. Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron*, 2012, 73(5), 962-977.
83. Zeltser, L.M., Seeley, R.J., Tschöp, M.H. Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nature neuroscience*, 2012, 15(10), 1336-1342.
84. Zhou, M., Kindt, M., Joëls, M., et al. Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. *PLOS one*, 2011, 6(10), e26220.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs „Jauna dihidropiridīna atvasinājuma AV-6-93 efekts uz biomarķiera BDNF ekspresiju stresa modelī žurkām” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

Autore: Inese Jargāne _____
(paraksts)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Mg. Biol. Ulrika Beitnere _____
(paraksts) (datums)

Recenzents: pētnieks Juris Rumaks _____
(paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

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

Komisijas sekretāre: _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts)