

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS NODAĻA

**NEIROTROFO FAKTORU EKSPRESIJA STREPTOZOCĪNA –
ALCHEIMERA SLIMĪBAS MODELĪ AR MUSCIMOLU**

MAGISTRA DARBS

Autors: **Santa Timšāne**
Studenta apliecības Nr.: st11032
Darba vadītājs: Ulrika Beitnere

RĪGA 2016

ANOTĀCIJA

1906. gadā vācu psihiatrs un neiropatologs Aloīzs Alheimers pirmo reizi aprakstīja 56 gadu vecumā mirušu pacientu, kura mira neskaidras slimības dēļ, pēdējo četrus gadus laikā strauji zaudējot atmiņu un dažādas iemaņas. Laika gaitā, analizējot medicīniskos pierakstus un pētot mirušās pacientes smadzenes, tika noteikta amiloīdo plātņu un neurofibrilāro mezglu esamība smadzenēs, kas tika nosaukta par Alheimera slimību (Engstrom, 2007).

Alheimera slimība ir progresējoši smadzeņu darbības traucējumi, kā rezultātā smadzenes pakāpeniski „noārdās”. Visbiežāk tā rodas cilvēkiem 65-70 gadu vecumā. Slimības attīstības gaitā attīstās negatīvas izmaiņas atmiņā, domāšanā, dažādās darbībās un uzvedībā, kas laika gaitā tikai pasliktinās.

Lai arī pēdējos gadus desmitos zinātniekiem ir izdevies atklāt daudz par to, kā Alheimera slimība ietekmē smadzenes, veids, kā šo slimību ārstēt joprojām nav izgudrots.

Joprojām tiek meklēti arvien jauni risinājumi un metodes, kas ļautu uzlabot slimnieku dzīves kvalitāti un dzīves ilgumu, pēc iespējas ilgāk to pavadot pie pilnas apziņas.

Tā kā muscimola mazo devu neiroprotektējošā ietekme ir bijusi noteikta jau agrāk, šī darba mērķis bija noteikt, kā tā ietekmē mainās neirotrofo faktoru (GAD67; GAP43; BDNF) ekspresija žurku smadzenēs, kurās pirms tam izraisīti Alheimera slimībai raksturīgi bojājumi, izmantojot streptozocīnu.

Veicot datu apstrādi un analīzi tika noteikts, ka vislabāko efektu uz streptozocīna izraisītajiem bojājumiem uzrāda muscimola 0,01 mg/kg liela deva, palielinot GAD67 ekspresiju gan smadzeņu garozā, gan hipokampā. Pozitīvus rezultātus uzrādīja arī 0,05 mg/kg deva, pēc streptozocīna premedikācijas. GAP43 ekspresijā izmaiņas tika noteiktas tikai smadzeņu garozā, pozitīvi ietekmējot GAP43 ekspresiju 0,01 mg/kg lielā devā pēc streptozocīna premedikācijas. BDNF ekspresijā nekādas izmaiņas noteiktas netika.

Atslēgas vārdi: Alheimera slimība, muscimols, streptozocīns, glutamāta dekarboksilāze 67 (GAD67), augšanas proteīns 43 (GAP43), smadzeņu derivāta neirotrofais faktors (BDNF).

ANNOTATION

In 1906, German psychiatrist and neuropathologist Alois Alzheimer first described a patient who died at the age of 56 years due to an unclear illness, which caused loss of memory and other disorders in processes of cognition during the last four years. During the analysis of the medical records and exploring the brain of the patient, the presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles became known. These observations were called an Alzheimer's disease later (Engstrom, 2007).

Alzheimer's disease is a progressive disorder in the brain, which results in degradation of the brain volume. Patients most commonly start to show first symptoms at the age of 65 – 70 years. As a symptom of progression of the disease is a negative decline in memory, cognition, behavior and other actions which worsen during the time.

Despite many findings in last decades on how Alzheimer's disease affects the brain, the cure is still not found. New solutions and methods are still not found to improve the life of patients.

It was found that small doses of muscimol show neuroprotective action and the aim of this study was to evaluate how does it affect the expression of neurotrophic factors (GAD67; GAP43; BDNF) in the rat brain, in a model of Alzheimer's disease, caused by streptozocin.

After the collection and analysis of the data, the results showed that the best effect has been obtained with the dose of 0,01mg/kg of muscimol in the streptozocin lesioned brain, increasing the expression of GAD67 in brain cortex and as well in hippocampus. Positive effect was reached using the dose of 0,05 mg/kg as well. In expression of the GAP43, positive effect was obtained only in brain cortex but not in hippocampus using the dose of 0,01 mg/kg of muscimol. Any changes in expression of BDNF were not evaluated.

Key words: Alzheimer's disease, muscimol, streptozocin, glutamate decarboxylase 67 (GAD67), growth associated protein 43 (GAP43), brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

SATURS

ANOTĀCIJA	2
ANNOTATION	3
APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS.....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Alzheimer slimība.....	7
1.2. Alzheimer slimības iedalījums atkarībā no neurofibrilāro mezglu izplatības smadzenēs.....	11
1.3. Alzheimer slimībā iesaistītās smadzeņu daļas.....	12
1.4 Alzheimer slimības gaitā iesaistītās neirotrofās sistēmas	13
1.4.1. Glutamāterģiskā sistēma un GAD67.....	13
1.4.2. GAP43.....	14
1.4.3. BDNF.....	16
1.5. Alzheimer slimībā pielietojamās vielas un metodes.....	17
1.6. Alzheimer slimības streptozocīna modelis.....	18
1.7. Muscimols	20
2. MATERIĀLI UN METODES	22
2.1. Dzīvnieki	22
2.2. Intracerebroventrikulārā (icv) vielu ievade	22
2.3. Eksperimenta dizains	23
2.4. Imūnhistoķīmija (IHC).....	23
2.5. <i>Western</i> blota analīze	24
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	27
3.1. GAD67 ekspresija.....	27
3.2. GAP43 ekspresija	30
3.3. BDNF ekspresija.....	32
4. SECINĀJUMI	34
5. PATEICĪBAS	35
6. IZMANTOTĀ LITERATŪRA	36
DOKUMENTĀRĀ LAPA	47

Apzīmējumu saraksts

- aCSF – mākslīgs cerebrospinālais šķidrums (*artificial cerebrospinal fluid*)
- AD – Alcheimera slimība (*Alzheimer's disease*)
- AICD – iekššūnas citoplazmatiskais domēnu
- AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metill-4-izoazolepropionskābe
- APP – amiloīda prekursora proteīns
- A β – amiloīda- β peptīds
- BDNF – smadzeņu derivāta neirotrofo faktoru
- DPYSL3 – dihidropirimidināzei līdzīgais proteīns 3
- GABA – γ -amino-sviestskābe (*γ -Aminobutyric acid*)
- GAD – glutamāta dekarboksilāze
- GAP43 – „augšanas” jeb „plasticitātes” proteīns (*Growth Associated Protein*)
- Glu – glutamāts
- GLUT2 – glikozes transportproteīns 2
- GSK3 β – glikogēna sintāzes kināzes
- Icv – intracerebroventrikulāri
- NFT – neurofibrilārie mezgli (*Neurofibrillary tangles*)
- NMDA – N-metill-D-asparāts
- RAGE – glitācijas (cukura daļas pievienošana proteīnam) gala produktu receptori
- STZ – streptozocīns
- τ – „tau” proteīns

Ievads

Alcheimera slimība (AD) ir progresējoša nervu sistēmas saslimšana, kas bojā nervu šūnas, pasliktinot atmiņu un citas svarīgas psihiskās funkcijas. Tā skar aptuveni 35 miljonus cilvēku visā pasaulē. Slimības attīstības gaitā neatgriezeniski tiek bojātas galvas smadzenes. Tā ir visbiežāk sastopamā demences forma, kas izraisa aptuveni 50% līdz 70% no visiem demences gadījumiem. Tā ir deģeneratīva slimība, kas pilnībā izmaina slimnieku dzīvi (Correia et.al.,2013).

Smadzeņu šūnas iet bojā, un cilvēks nespēj atcerēties vai uzkrāt jaunu informāciju. Smadzeņu daļa, kas slimības gaitā tiek bojāta visvairāk ir hipokamps. Tas ir galvenā smadzeņu struktūra, kas atbild par atmiņas nodrošināšanu cilvēka smadzenēs. Cilvēks sāk aizmirst dažādas lietas, nespēj apgūt ko jaunu, parādās dažādi uzvedības traucējumi, bieži rodas saskarsmes problēmas. AD gaitā galvas smadzeņu neironi zaudē savu struktūru un nevar pildīt to atbilstošās funkcijas (Mieke et.al., 2012).

Šobrīd pasaulē vēl nav terapijas, ar kuru slimību varētu ārstēt, bet aizvien tiek meklētas jaunas iespējas, lai varētu apturēt slimības attīstību un novērstu radušos smadzeņu bojājumus.

Darba mērķis - Noskaidrot GABA-A agonista – muscimola ietekmi uz glutamāta dekarbosilāzi 67 (GAD67), augšanas asociēto proteīnu 43 (GAP43) un smadzeņu derivāta neirotrofo faktoru (BDNF) ekspresiju AD tipa modelī, kuru izraisīja intracerebroventrikulāra (icv) streptozocīna (STZ) ievadīšana.

Darba uzdevumi:

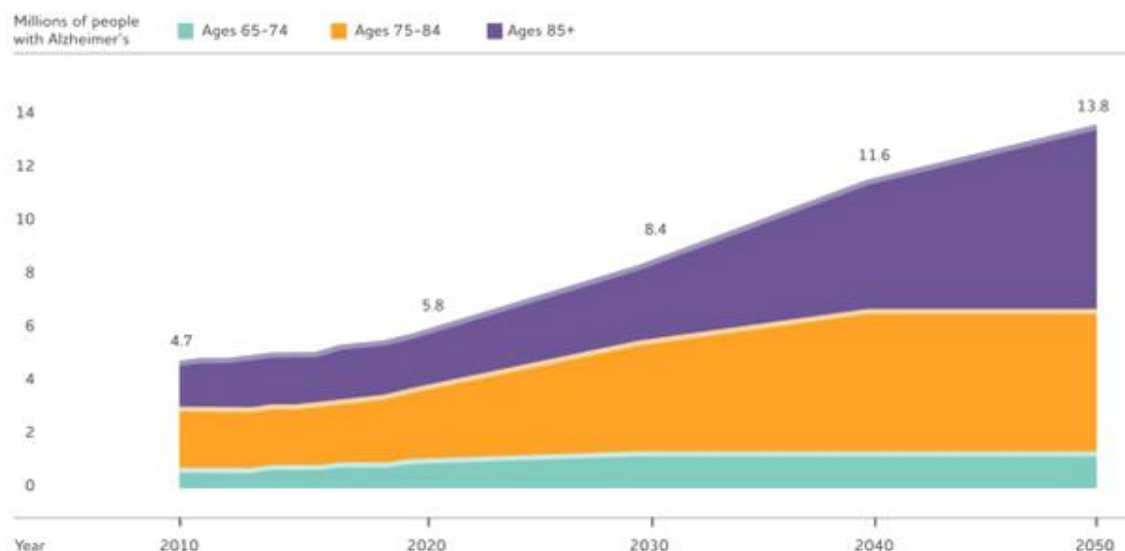
1. Veikt literatūras analīzi par jaunākajiem pētījumiem Alcheimera slimībai.
2. Izmantojot imūnhistoķīmijas metodi noteikt GAP43 un GAD67 ekspresiju žurku smadzeņu hipokampā un garozā.
3. Izmantojot *Western Blot* metodi noteikt BDNF ekspresiju žurku smadzeņu hipokampā.
4. Veikt statistisko datu analīzi un apstrādi.

Darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Dabaszinātņu akadēmiskajā centrā, farmakoloģijas katedrā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Alcheimera slimība

Alcheimera slimība (AD) ir visbiežākā demenci izraisošā slimība cilvēkiem, kuri sasnieguši 65 gadu vecumu. Tā skar aptuveni 35 miljonus cilvēku visā pasaulē un skarto skaits, papildzinoties dzīvildzei, ir ar tendenci katru gadu pieaugt. 1. attēlā redzama prognoze, ka līdz 2050. gadam slimības sastopamība varētu pieaugt līdz pat trīs reizēm (dati par ASV). Tas tiek izskaidrots ar apkārtējas un sociālās vides izmaiņām (Heber et.al., 2013).



1.1. Attēls. AD attīstības gadījumi skaita prognoze nākotnē

Attēls no: Hebert et.al., 2013

Šai slimībai raksturīga pakāpeniska un neapturama atmiņas pasliktināšanās, kas noved līdz pilnīgai kognitīvo funkciju izzušanai. Visvairāk bojājumu skartās smadzeņu zonas ir hipokamps un smadzeņu garoza (Correia et.al.,2013).

Etioloģiski slimību var iedalīt divās grupās – iedzimtā AD, kura ir sastopama aptuveni 5 % gadījumu (agrīns sākums – jau ap 40 gadiem) un sporādiskā - aptuveni 95 % gadījumu. Sorādiskās slimības cēloņi vēl joprojām nav izprasti. Kā viens no to ietekmējošiem faktoriem ir pasliktināta insulīna un glikozes metabolisms smadzenēs (Correia et al., 2011).

Viens no pirmajiem signāliem AD ir progresējošs deklarātīvās atmiņas zudums. Kaut gan to ir diezgan grūti diagnosticēt un atšķirt no atmiņas pasliktināšanās normas noteiktā vecumā, ir radīti speciāli, jutīgi neurofizioloģiski testi, ar kuru palīdzību iespējams identificēt vai noteiktais rezultāts atbilst normas robežām, vai tas ir progresējošas demences rādītājs (Backman et al., 2001). Kā būtisks faktors slimības attīstība ir arī hipokampa atrofija (Kohler et al., 1998; Petersen et al., 2000). Pētījumā uz indivīdiem, kuru vidējais vecums bija 78 gadi,

tika noteikts, ka pat vieglu kognitīvu traucējumu gadījumā, salīdzinot ar normāliem indivīdiem, ir novērojamas ievērojamas hipokampa tilpuma izmaiņas. Tika noteikts arī, ka uz neurodeģeneratīvajām izmaiņām, kas saistītas ar AD, visjūtīgākie ir CA1 un smadzeņu garozas priekšēji-mediālais reģioni (Mieke et al., 2012).

Mūsdienu cilvēku, lielākoties, saspringtais dzīvesveids var veicināt dažādu kognitīvo disfunkciju attīstību un atmiņas pasliktināšanos, jo ir noteikti faktori, kuru ietekmē tiek novērota hipokampa tilpuma samazināšanās. Kā viens no šiem iemesliem ir miega trūkums. Pētījumos noteikts, ka ilgstošs miega trūkums (miega stundu skaits diennaktī – 4 stundas) vai traucēts miegs – konkrētajā gadījumā – 1 mēneša periodā, žurkām izraisījis hipokampa samazināšanos par 10% (Novati et al., 2011). Balstoties uz šiem atklājumiem, veikti dažādi pētījumi arī uz cilvēkiem. Arī tajos uzrādās, ka pastāv pozitīva korelācija starp miega stundu skaitu diennaktī un hipokampa tilpumu, kas izpaudās pildot arī dažādus kognitīvus uzdevumus, pārbaudot verbālo un vizuālo atmiņu (Taki et al., 2012; Joo et al., 2014).

Arī ilgstošam stresam un depresijai ir līdzīga ietekme uz hipokampu. Tas izskaidrojams ar to, ka stresa laikā no virsnieru dziedzera pastiprināti izdalās glikokortikoīdi. Saistoties ar receptoriem smadzenēs, jo īpaši hipokampā, tiem piemīt neirotoksiskas īpašības, neurodeģenerācijas izraisīšana. Līdzīgs efekts noteikts arī posttraumatiska stresa gadījumos, izraisot deklaratīvās atmiņas funkciju bojājumus. Stresa ietekmē tiek palēnināti arī neiroģenēzes procesi (Bremner, 2000).

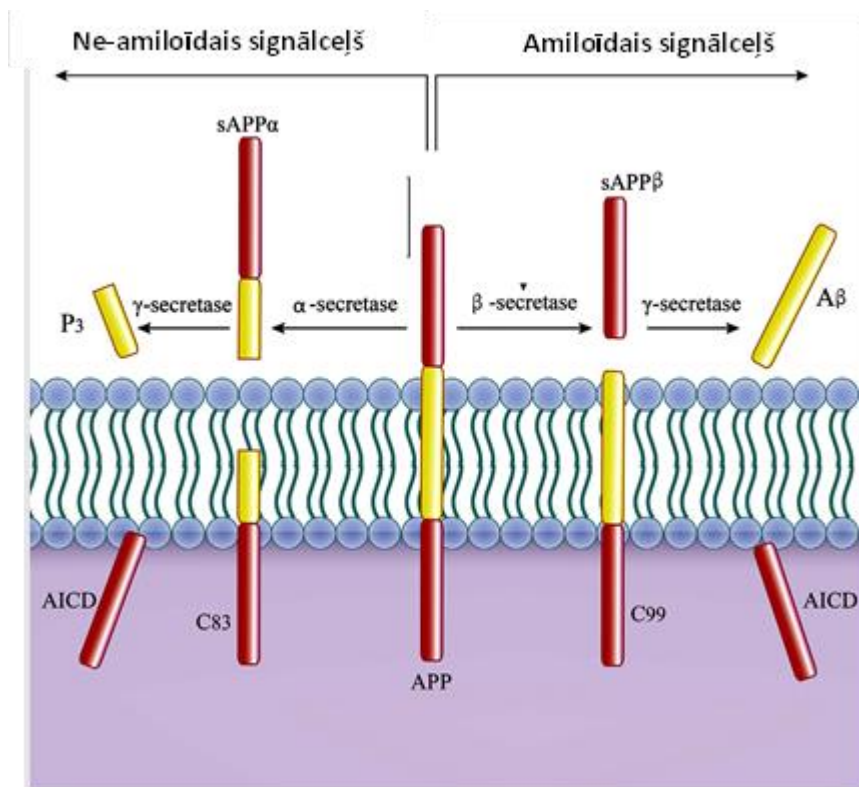
Tāpat, AD pacientiem vai indivīdiem AD attīstības posmā tiek novēroti glikozes metabolisma traucējumi deniņu daivā un parientālajos reģionos (Small et al., 2000).

Hipokampa atrofija ir saistīta arī ar glikozes metabolisma traucējumiem hipokampā, priekšējā un vidējā deniņu daļā, *cingulate gyrus*, un pieres daivā (Garrido et al., 2002).

Vienas no galvenajām smadzeņu patoloģijas pazīmēm, kas apstiprina AD *postmortem* audos ir neurofibrilārie mezgli un β – amiloīda (β A) plātnes (Hyman et al., 2012) un neurofibrilārie mezgli.

β A plātnes veidojas ekstracelulāri uzkrājoties β amiloīda peptīdam. Šo patoloģiju progresēšana sākas vēl ilgu laiku pirms pirmajiem slimības tipiskajiem kognitīvajiem simptomiem (Mufson et al., 2012).

Mutācijas gēnos, kas varētu veicināt AD attīstību ir amiloīda proteīna prekursora gēna mutācija (APP) (Goate et al., 1991), presilina (PS) gēnu (Sherrington et al., 1995) un apolipoproteīna E (ApoE) genotipa mutācijas (Corder et al., 1993). Mutācijas APP un PS gēnos veicina pārmērīgu β A veidošanos, bet mutācijas ApoE4 rezultātā notiek izmaiņas β A transportēšanā (Fryer et al., 2005; Rhinn et al., 2013).



1.2. Attēls. Aβ signālcēļi

Attēls no: Cheng et.al., 2014

Amiloīda prekursora proteīns (APP) pieder transmembrānas I tipa proteīnu grupai. APP struktūrā ir Aβ segments (1.attēlā – dzeltenā krāsā), kurš parasti, α-sekretāzes darbības rezultātā tiek sašķelts, no APP izveidojot šķīstošu amino-termināla domēna APP kompleksu (sAPPα) un karboksilgrupas termināla fragmentu C86. γ-sekretāze pabeidz šķelšanas procesu, radot APP iekššūnas citoplazmatisku domēnu (AICD) un šķīstošu P3 peptīdu. Šis process tiek dēvēts par ne-amiloīdo signālcēļu kaskādi.

AD gadījumā, APP vispirms tiek pakļauts β-sekretāzes darbībai. Tas notiek, APP un β-sekretāzei „ieslēdzoties” endosomā. β-sekretāze sašķeļ APP vietā, kur sākas Aβ posms, to nesabojājot. Tiek izveidots sAPPα un C-termināla APP komplekss, kurš, tālāk iedarbojoties γ-sekretāzei tiek sašķelts par Aβ un AICD. Aβ paliek ārpusšūnas telpā brīvā veidā. Ilgstošā šī procesa rezultātā notiek Aβ uzkrāšanās, kas izraisa neirotoksicitāti (Kim et.al., 2010).

Kā metodes, lai identificētu dažādas, ar slimību saistītas izmaiņas smadzenēs, izmanto pozitronu emisijas tomogrāfiju – lai noteiktu un attēlotu βA depolarizācijas vietas; magnētisko rezonansi – lai noteiktu hipokampa tilpumu vai citu smadzeņu daļu atrofiju; 18F-fluoroglikozes – pozitronu emisijas tomogrāfiju – lai noteiktu glikozes hipometabolismu smadzeņu audos, kas liecina par neironu bojājumiem un sinapšu pārtrūkšanu. Visi augstāk minētie rādītāji ir būtiski, mēģinot atšķirt vieglus kognitīvus traucējumus no AD pirmajiem simptomiem (Jack and Holtzman, 2013).

Smadzeņu trauma, miega traucējumi, epilepsija un citi faktori spēj ietekmēt β A līmeņu rādītājus. Pētījumos noskaidrojies, ka β A uzkrāšanos un transportu ietekmē arī sinaptiskā aktivitāte (Johnson et al., 2010; Mackenzie and Miller, 1994; Roh et al., 2012).

Neirofibrilārie mezgli (NFT) ir veidojumi, kas radušies τ proteīna hiperfosforilācijas rezultātā (Mufson et al., 2012). Tas notiek, kad nezināmu iemeslu dēļ, projekcijas šūnas smadzenēs sāk sintezēt τ proteīnu ārpus normas robežām, kas nav spējīgs sasaistīties ar mikrotubuļiem un brīvā veidā paliek šūnu citozolā. Šādos apstākļos τ proteīns sāk veidot nebiodegradējamus materiālus. Šie veidojumi uzkrājas intraneironāli, sākumā kā nefibrilārā formā, ko var ieraudzīt gaismas mikroskopā. Šie veidojumi tiek saukti pirmsmezglēm (PT). Laika gaitā, bet ne vienmēr, pirmsmezglī, dendrītisku procesu rezultātā, attīstās stingros, nelokāmos fibrilāros pavedienos – neirofibrilārajos mezglos (NFT), kuri uzkrājas šūnās (Braak et.al., 1994).

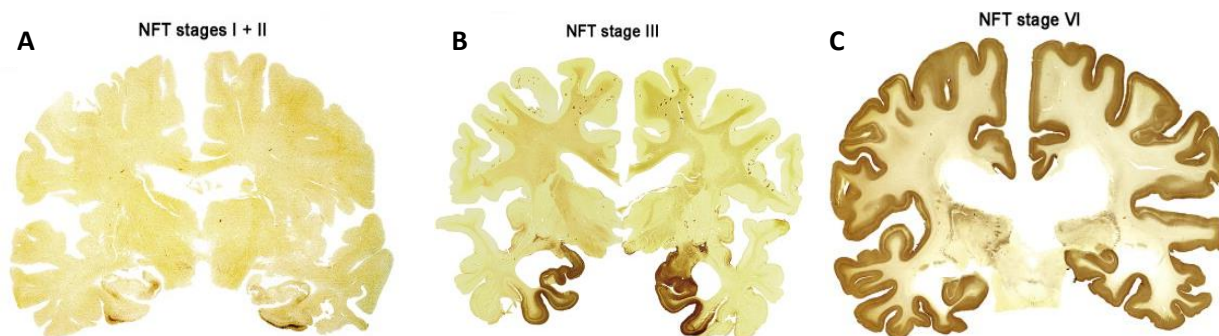
Pastāv viedoklis, ka AD varētu būt arī mikrobioloģiska etioloģija. AD pacientu un kontroles grupas smadzeņu audus, tika atrasts, ka slimnieku CNS šūnās ir sēņu šūnas un hīfas. To iespējams noteikt gan šūnās, gan ārpus tām, izmantojot specifiskas antivielas. Vairākos smadzeņu rajonos, piemēram, ārējā priekšējā garozā, smadzenīšu hemisfērā, hipokampā un *Choroid Plexus* tika identificētas sēņu materiāli, kuri kontroles objektos identificēti netika. Analizējot desmit slimnieku smadzeņu sekcijas, sēņu infekcijas tika konstatētas visos gadījumos. Tās tika konstatētas arī asinīs šūnās, kas varētu būt izskaidrojums asinsvadu patoloģijas, kas bieži tiek novērotas AD gadījumos. Sekvenējot smadzenēs identificēto sēņu DNS tiek noteikts, ka tās ir dažādu sugu. Kopumā, šis pētījums pierāda paustā uzskata ticamību, ka sēņu infekcijas tiešām ir iesaistītas AD gadījumos (Pisa et.al., 2015).

1.2. Alcheimera slimības iedalījums atkarībā no neurofibrilāro mezglu izplatības smadzenēs

Atkarībā no neurofibrilāro mezglu (NFT) līmeņa smadzenēs, AD var iedalīt sešās fāzēs. Otrajā attēlā A gadījumā ir redzamas smadzenes, kad NFT ir attīstības posmā. Kreisā smadzeņu puslode – I stadija, labā – II. Mezgli – tumšākās krāsas laukumi attēlā, praktiski nav redzami. I stadijas gadījumā nedaudz skarta tikai deniņu daiva, II stadijā – redzams, ka NTF plešas plašumā. Šajā fāzē nekādi slimības simptomi nav novērojami. Tā tiek dēvēta par preklīnisko jeb prodromālo fāzi. Šādā līmenī NFT sāk veidoties un var būt novērojami jau pusaudžu gados (Wollen, 2010; Braak et.al., 2011).

Pakāpeniski, laika gaitā NFT mezglu izvietojumos smadzenēs paplašinās (2. attēlā, B). Visvairāk skarts ir mandeļu formas neironu struktūras kodols (*amygdala*) un hipokamps, kā arī deniņu daivas apgabali. Visbiežāk šāda situācija sāk parādīties 50-60 gadu vecumā, bet ir arī gadījumi (aptuveni 4% gadījumu), kad tas var būt novērojams jau 31-40 gadu vecumā. Palielinoties vecumam, palielinās arī III fāzes novērojamo gadījumu skaits. Šajā attīstības fāzē indivīdiem mēdz konstatēt vieglus kognitīvus traucējumus (*mild cognitive impairments*; MCI).

Palielinoties NFT līmenim, slimība pakāpeniski pāriet līdz V-VI fāzei. V fāzē smadzenes vēl nav pārpildītas ar NFT, sasniedzot VI fāzi (2.attēlā, C), tomēr izplatības līmenis ir līdzīgs un visbiežāk, šo fāzi sasniegušie pacienti ir sasnieguši demenci. Šajā posmā parasti tiek uzstādīta diagnoze – AD. Lielākoties tie ir pacienti, kuri sasnieguši 80 un vairāk gadu vecumu. Sasniedzot pilnīgu demenci, kad smadzenes pilnībā ir pārpildītas ar NFT nekāda terapija vai medikamenti netiek pielietoti, jo vēl nav radīti tādi līdzekļi kuri spētu šos bojājumus atgriezt vai kādā veidā uzlabot cilvēka smadzeņu darbību (Wollen et.al., 2010; Braak et.al., 2011).



1.3. Attēls. Smadzenes dažādos NFT attīstības līmeņos

Attēls no: Braak et.al., 2012.

1.3. Alcheimera slimībā iesaistītās smadzeņu daļas

Visprecīzākais un izteiktākais rādītājs ceļā uz AD ir tieši hipokampa tilpumā novērojamās izmaiņas, kuras koralē arī ar fosforilētā τ proteīna līmeņiem un β -amiloīda struktūru daudzumu smadzenēs (Clerx et.al, 2013). Šajā pētījumā mērīja dažādu smadzeņu daļu tilpumus pacientiem ar viegliem kognitīviem bojājumiem, kopā apskatot 341 gadījumus. Smadzenes tika apskatītas ar dažādām metodēm, iegūstot un apstrādājot trīs dimensiju attēlus, no kuriem tika veikti nepieciešamie aprēķini. Pētījums ilga aptuveni piecus gadus.

Hipokamps ir smadzeņu struktūra, kas atrodas temporālās daivas vidusdaļā. Hipokamps sastāv no CA1, CA2, CA3 un *Dentate gyrus* subreģioniem (3.att.), kas veido aferento un eferento informācijas apmaiņu ar dorsālo un ventrālo hipkampu (Squire and Zola-Morgan, 1991).

Gyrus dentatus (latīniski) ir smadzeņu reģions hipkampā, kurā neuroģenēze notiek visa mūža garumā (Aimone J.B. et. al., 2006) un ir noteikts, ka hipokampālajai neuroģenēzei ir ievērojama loma atmiņas un mācīšanās norisē, antidepresīvos procesos, CNS darbības traucējumu gadījumos (Sahay and Hen, 2007 and Zhao et al., 2008). Pieaugušo hipokampālā neuroģenēze ir cieši saistīta ar neironālo aktivitāti, galvenokārt, ar līdzsvaru starp GABAerģisko un glutamāterģisko sistēmām (Zhao et al., 2008). Šūnu attīstības agrākajos posmos GABA_A receptoru aktivācija ar ārpusšūnām esošo GABA, regulē hipokampa neironālo cilmes šūnu diferenciāciju (Tozuka et al., 2005) un dendrītisko attīstību smadzeņu granulu šūnās (Ge et al., 2008).

Murphy et.al. veicis pētījumu, kura mērķis bija noteikt smadzeņu blīvumu un AD smaguma pakāpi. Kā metode, kas tika izmantota pētījumā, bija magnētiskās rezonanses elastogrāfija (MRE) – magnētiskās rezonanses paveids, ar kuru, bez invazīvas iejaukšanās iespējams noteikt smadzeņu fizisko stāvokli – šajā gadījumā – blīvumu. Tas tika mērīts dažādos smadzeņu reģionos (piemēram, priekšējā daivā, parientālajā daivā, smadzenītēs). Kopumā pētījumā piedalījās 48 dalībnieki, kuri tika sadalīti četrās grupās – amiloīda negatīvā grupa, ar normālām kognitīvām funkcijām (negatīvā kontrole); amiloīda pozitīvā grupa, ar normālām kognitīvajām funkcijām; amiloīda pozitīvā grupa, ar viegliem kognitīviem traucējumiem un amiloīda pozitīvā grupa, ar AD. Rezultātos noskaidrojās, ka AD gadījumā smadzenes nav tik blīvas salīdzinājumā ar normāli funkcionējošām. Vislielākās izmaiņas novērotas priekšējā, parientālajā un denīņu daivās. Novērota arī koralācija starp šīm izmaiņām un amiloīda esamību smadzenēs un hipokampa tilpuma izmaiņām (Murphy et.al., 2015).

Pieaugušo smadzenēs hipokampam ir izšķiroša loma atmiņas veidošanā. Pie hipokampa funkcijām pieskaitāma arī sinaptiska plasticitāte un jaunu neironu veidošanās (Deng et. al.,

2010). Hipokamps un citas, tam tuvumā esošās temporālās daivas struktūras ir atbildīgas par deklaratīvo atmiņu (Eichenbaum, 2004 and Squire, 2004). Šīs struktūras ir pamatā mācību procesam, jaunas informācijas nostabilizēšanai. (Jambaqué et al., 2007).

1.4. Alcheimera slimības gaitā iesaistītās neirotrofās sistēmas

1.4.1. Glutamaterģiskā sistēma un GAD67

Glutamāts (Glu) ir galvenais uzbudinošais neurotransmiters zīdītāju nervu sistēmā un tam ir liela nozīme atmiņas un mācīšanās procesos (Featherstone, 2010).

Glu darbojas caur jonotropajiem un metabotropajiem glutamaterģiskajiem receptoriem, kas ir izvietoti gandrīz visās smadzeņu daļās. Ir trīs galvenās jonotropo receptoru grupas, kuras nosauktas to savienojumu vārdā, kuri pirmie tika identificēti kā šo receptoru selektīvie agonisti – N-metill-D-asparāta (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metill-4-izoazolepropionskābes (AMPA) un 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidīna (kaināta) receptori (Wallace et.al., 2011).

Metabotropie receptori ir ar G proteīnu saistītie proteīni. Glu metabotropie receptori tiek iedalīti trīs subtipos. I subtips aktivizē fosfolipāzi C, II un III – saistīti ar cAMP signālceļiem (Conn and Pin, 1997).

GABA ir galvenais inhibējošais neurotransmiters cilvēka smadzenēs, piedaloties holīnergiskās un glutamaterģiskās aktivitātes regulēšanā hipokampa un garozas reģionos, kuri visvairāk tiek skarti AD attīstības laikā (Lawrence, 2008). Tā tiek sintezēta no glutamāta, ko izpilda enzīms glutamāta dekarboksilāze (GAD). GAD enzīmam ir divas izoformas – GAD65 (65 kDa) un GAD67 (67 kDa) un abi ir kā atslēga uz GABAerģiskās sistēmas darbību (Erlander et. al., 1991). Lai gan abas šī enzīma formas smadzenēs ir atrodamas, to lokalizācija nedaudz atšķiras. GAD65 ir lokalizēts nervu šūnu sinaptisko vezīkulu membrānās, bet GAD67 – viscaur šūnai. Galvenais GABA sintezētājs ir GAD67, bet, gadījumos, kad šūnu pieprasījums pēc GABA ir lielāks, GAD65 īslaicīgi aktivizējas, lai nepieciešamais GABA līmenis tiktu sasniegts (Korpershoek et al., 2007).

Dažāda veida pētījumos (pēc nāves sekcijās, neironu attēlu fiksēšanas) ir noteikts, ka AD gadījumā GABA aktivitāte ir samazināta (Lanctot et al., 2004).

Attīstījušos glitācijas (cukura daļas pievienošana proteīnam) gala produktu receptori (RAGE) ir šūnu membrānu receptori, pie kuriem ar augstu afinitāti piesaistās smadzeņu audiems toksiskais β A. AD gadījumos šo receptoru skaits ir palielināts (Lue et al., 2001). GABA samazina attīstīto RAGE skaitu, samazinot β A piesaistīšanos un uzkrāšanos (Sun et al., 2012).

Salīdzinoši nesen atklāts, ka inhibitorajam neurotransmitterim GABA ir nozīme vairākos neironālās attīstības procesos (Owens and Kriegstein, 2002b). Sākot ar šūnu proliferāciju un neirītu augšanu (LoTurco et al., 1995), līdz pat neuroģenēzei (Ge et al., 2006). GABA sintēze un signālceļi darbojas jau grauzēju grūtniecības vidusposmā, vēl ilgi līdz sinaptiskās komunikācijas procesiem (Ben-Ari, 2002).

Nomura et.al. veiktajā pētījumā tika noteikta NMDA receptoru nekonkurējošā antagonista – penciklidīna ietekmi uz hipokampu. Rezultātā tika noskaidrots, ka, penciklidīna iedarbības rezultātā ilgtermiņa potenciēšana (LTP) CA3-CA1 reģionu sinapsēs bija pasliktinājusies. Tika noskaidrots arī tas, ka GABAergiskās sistēmas darbība CA1 reģionā, kas saistīta ar hipokampa atkarīgajiem mācīšanās un atmiņas procesiem, bija uzlabojusies. Rezultāti liek domāt, ka izmaiņas GABA sistēmas darbībā hipokampā varētu veicināt kognitīvu disfunkciju grauzējos (Nomura et.al., 2016).

Chattopadhyaya et al. veiktajā pētījumā noskaidrots, ka GABAergiskās sistēmas inhibitorās darbības ceļi ir atkarīgi no neironālās aktivitātes. Aktivitātes atkarīgā GAD67 darbības regulēšana var radīt uzlabojumus intracelulārajam GABA izdalīšanās laukam. Pētījumā noskaidrojies, ka GAD67 un GABA līmeņu palielināšanās būtiski ietekmē interneironu aksonu augšanu un sinapšu formēšanos inhibitoro signālceļu attīstības laikā. GAD67 līmeņa samazināšanās izraisa deficītu šūnu aksonu sazarojumā un darbības traucējumus inervācijas laukā (Chattopadhyaya et.al., 2007).

1.4.2. GAP43

Ar augšanu asociētais proteīns 43 (GAP43) tiek dēvēts par „augšanas” jeb „plasticitātes” proteīnu, tāpēc, ka lielos daudzumos tas tiek sintezēts neironālās augšanas vietās aksonu attīstības un reģenerācijas laikā. Citi šī proteīna nosaukumi dažādā literatūrā – B50, neiromodulīns un F1. Tam piemīt būtiska loma neirītu augšanas, diferenciācijas un sinaptiskās plasticitātes procesos. Tas tiek uzskatīts par būtisku komponentu nervu sistēmas efektīvai reģenerācijai (Nielander et.al., 1993).

Tas veicina F-aktīna akumulāciju neirītos, izraisot citoskeletoņa veidošanos. Perinatāli tas ir ekspresēts visos neironos, bet tā ekspresija sarūk aksonālās attīstības un sinaptogēneses laikā, paliekot tikai augstas plasticitātes reģionos, piemēram, hipokampā (De La Monte et.al., 1989). Nesen tika noteikts, ka GAP43 ir substrāts kaspāzei-3 un, ka GAP43 gēna mutācija izraisa AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropion skābes) receptoru endocitozes samazināšanos, izraisot pasliktināšanos postsinaptisko membrānu ilgtermiņa nomākumā, kas nozīmē, ka tam ir nozīme ne tikai plasticitātes procesos (Gorup et.al., 2015).

Zhang et.al. veiktajā pētījumā mēģināja noskaidrot apkārtējās vides un aktivitātes ietekmi uz GAP43 ekspresiju žurku mazuļu hipokampā. Žurkas pirms dzemdībām tika sadalīti trīs grupās – negatīvās kontroles grupa (standarta būris, standarta apstākļi, izraisīts stress 3 reizes dienā), stresa ierobežotā grupa un stresa ierobežotā grupa ar uzlabotiem apkārtējās vides apstākļiem un aktivitātes iespējām (būris bagātināts ar krāsainām rotaļlietām, svaigām skaidām, pieradināšana – 15 minūtes dienā mazuļu mugura tika sukāta ar maigu birstīti). Veicot pētījumu tika iegūti trīs būtiski secinājumi: GAP43 līmeņi hipokampā bija palielinājušies, žurkām pirms dzemdībām atrodoties pilnīgos miera apstākļos; pirmsdzemdību stress pasliktināja telpiskās mācīšanās un atmiņas spējas mazuļiem; žurku mazuļu sukāšana un apkārtējās vides bagātināšana izraisīja GAP43 līmeņu pieaugumu, veicinot telpisko apgušanas un atmiņas spēju stresa apstākļos esošajiem mazuļiem (Zhang et.al., 2012).

Kowara et.al. 2007. gadā veica pētījumu, kurā noteica DPYSL3 (dihidropirimidināzei līdzīgā proteīna 3) un GAP43 proteīnu ekspresiju un mijiedarbību žurku embriju smadzenēs. Tāpat kā GAP43, arī DPYSL3 ir būtisks neironālās attīstības un diferenciacijas procesos. Eksperiments tika veikts pēc žurku augļu embrionālās attīstības 18 dienām. Tika noteikts, ka GAP43 un DPYSL3 ekspresija šajos smadzeņu audos ir spēcīgi izteikta. Visvairāk tie ir izvietojušies neironu pagarinājumos, citoplazmā un membrānā (Kowara et.al., 2007).

DPYSL3 un GAP43 ir iesaistīti F-aktīna struktūras regulācijā, kas ir pamatā neironu morfoloģijai un attīstībai (Rosslenbroich et.al., 2003). GAP43 efekts uz aktīna šķiedru struktūrām ir atkarīgs no tā fosforilācijas statusa, jo garo šķiedru stabilizāciju, galvenokārt, nodrošina fosforilētais proteīna variants (He et.al., 1997). GAP43 efekts uz neironu augšanas stāvokli presinaptiskajā reģionā ir saistīts ar tā spēju mijiedarboties ar membrānas skeletu – proteīnu tīklu membrānas iekšpusē, kas regulē tā formu, motilitāti un attīstību. Aktīns, tālīns un spektrīns ir daži no GAP43 mijiedarbībā iesaistītajiem proteīniem (Meiri et.al., 1999).

Dažādu neirodeģeneratīvu slimību gadījumos, piemēram, Alcheimera slimības gadījumā GAP43 ekspresija un funkcionēšana ir traucēta (Rekart et.al., 2004). Rekart et.al. veicis pētījumu uz Alcheimera slimības pacientu smadzeņu hipokampa audiem. Pacientu vidējais vecums bija 75,1 gadi. Rezultāti parādīja, ka Alcheimera slimības gadījumā novērojams palielināts GAP43 ekspresijas līmenis. Tika novērota pozitīva korelācija starp *Braaka* līmeni, kas ir pieņemts kā Alcheimera slimības attīstības rādītājs, un GAP43 pieaugumu hipokampa CA1 reģiona SML (*stratum lacunosum moleculare*) daļā (Rekart et.al., 2004). Viens no mehānismiem, kura dēļ GAP43 līmenis hipokampā ir palielināts, varētu būt nervu signālu pārneses zudums, neironu bojāejas dēļ *Cortex entorhinalis* smadzeņu daļā. Šo neironu zuduma dēļ, izdzīvojušajos neironos sākas simpatogēnēzes procesi, kuri pārsniedz normas robežas, tā iemesla dēļ parādās palielinātais GAP43 līmenis (Hyman and Trojanowski., 1987).

Šāds novērojums tika veikts arī Kadish and Van Groen darbā, kurā tas tika noteikts, izmantojot žurku uz peļu smadzenes. Četras nedēļas pēc veiktajiem smadzeņu bojājumiem tika novērota palielināta aktivitāte simpatogēnēzes procesos (Kadish and Van Groen, 2003).

1.4.3. BDNF

Smadzeņu derivāta neirotrofais faktors (BDNF) ir augšanas faktoru ģimenes loceklis. Kopā ar citiem bioloģiskiem faktoriem, tādiem kā neurotransmiteri, hormoni un citi neirotrofīni, BDNF regulē neironālās plasticitātes un dzīvotspējas mehānismus (Grande et. al., 2010). Tas ir visvairāk sintezētais neirotrofīns smadzenēs, kas regulē neironālo šūnu izdzīvošanu, diferenciaciju, sinaptisko spēku un morfoloģiju. Palielināts BDNF līmenis tiek saistīts ar uzlabotām mācīšanās un atmiņas spējām, bet, pazemināts tā līmenis novērojams ar vecumu saistītā atmiņas deficītā (Croll et. al., 1998).

BDNF ir plaši atrodams centrālās nervu sistēmas audos. Izteikta tā sekrēcija notiek hipokampā. BDNF ir izdzīvošanas un augšanu stimulējošas īpašības uz dažādu smadzeņu daļu neironiem, piemēram, hipokampa un smadzeņu garozas (Binder and Scharfman, 2004).

BDNF regulē neironālo struktūru un funkcijas. Īpaši svarīgs tas ir sinaptiskās plasticitātes un atmiņas veidošanā pieaugušo smadzenēs. BDNF inducē ilgtermiņa atmiņas veidošanos hipokampā, bet ekspresijas un funkcionēšanas nobloķēšana hipokampā izraisa atmiņas pasliktināšanos (Segal, 2005, Kaplan and Miller, 2000).

Pēdējos gados veiktajos pētījumos parādās dati, kas liecina, ka BDNF ir saistīts ar Alzheimer slimības attīstību. Tas izskaidrojams ar to, ka atmiņas pasliktināšanās ir viens no pirmajiem Alzheimer slimības simptomiem, savukārt, BDNF un tā galvenais receptors – tropomiozīna – saistītā kināze B (TrkB) ir vajadzīgi sinaptiskajos procesos un neironālajā plasticitātē, kas veicina atmiņas funkcijas. Vieglu kognitīvu traucējumu gadījumā novērojams BDNF mRNA līmeņa samazinājums hipokampā un deniņu daivā, novērojot saistību ar BDNF līmeni un kognitīvo traucējumu smagumu (Lee et.al., 2012; Garzon and Fahnstock, 2007) . Peļu eksperimentālajos modeļos noteikts, ka farmakoloģiski palielinot BDNF līmeni, tiek novēroti atmiņas un sinaptisko procesu uzlabojumi (Lee et.al., 2012). Cilvēkiem ar palielinātu riska pakāpi saslimt ar Alzheimer slimību, palielinot BDNF sekrēcijas līmeni veicot aerobas slodzes fiziskās aktivitātes, arī novērojami atmiņas uzlabojumi (Baker et.al., 2010).

1.5. Alcheimera slimībā pielietojamās vielas un metodes

Šobrīd vēl nav pieejama farmakoloģiska terapija, kas spētu slimību izārstēt vai apturēt pilnībā, bet arvien tiek meklēti jauni savienojumi un modeļi, kas spētu uzrādīt vēlamo rezultātu.

Pagaidām terapijā tiek izmantotas tikai vielas kas palīdz novērst slimības simptomus.

Kā viena no šo vielu grupām ir acetilholīnesterāzes inhibitori (AChEI). Ir noteikts ka holīnērgiskajai sistēmai ir liela loma smadzeņu darbības un atmiņas procesos. AChE ir enzīms, kas sadala acetilholīnu par holīnu un etiķskābi. Tā tiek sekretēta un saistās ar ārpusšūnas struktūrām - sinaptisko bazālo slāni neiromuskulārajā savienojumā un amiloīda plāksnēm smadzenēs. AChE piemīt spēja veicināt amiloīda β peptīda uzkrāšanos un amiloīdo šķiedru veidošanos, kas ir slimības pamatā (Pohanka, 2012). Kā daži no terapijā lietojamām vielām ir donezepils, rivastigmīns, galantamīns un takrīns. Šo medikamentu iedarbības rezultātā tiek uzlabotas kognitīvās funkcijas, spēja veikt ikdienas darbības, kopējais klīniskais stāvoklis un uzvedības traucējumi (Birks J., 2006).

Sinaptiskā plasticitātes procesos liela nozīme ir NMDA (N-metil-D-asparāta) receptoriem. To aktivācija izraisa jonu kanāla atvēršanos, kas izraisa nātrija un kalcija ieplūšanu šūnā un kālija – izplūšanu. Kalcija ieiešana postsinapsē caur NMDA receptoru ļauj saistīties elektriskajai sinaptiskajai aktivitātei ar bioķīmiskiem signāliem, aktivizējot kalcija atkarīgos enzīmus un signālceļus. Šādā ceļā kalcija ieplūšana sinapsē var izraisīt ilgtermiņa izmaiņas sinaptisko signālu spēcīgumā un citās šūnas modifikācijās, tajā skaitā izmaiņas sinaptiskajā struktūrā vai saziņā. NMDA receptoriem ir liela nozīme smadzeņu plasticitātē, smadzeņu spējā atbildēt uz ārējiem stimuliem (Zito and Scheuss, 2009), taču šīs sistēmas pārlietu liela aktivācija un pārlietu liela kalcija daudzuma iekļūšana šūnās var izraisīt šūnu nāvi. Šis process tiek novērots arī Alcheimera slimības gadījumā. Tāpēc, kā viens no terapijas veidiem ir daļēja NMDA receptoru bloķēšana ar memantīnu. Normālos apstākļos memantīns ar NMDA receptoriem saistās ar mazu afinitāti, bet, kad NMDA receptoru skaits pārlietu pieaug, tas kļūst par spēcīgu šo receptoru bloķētāju. Tāpēc, tas, galvenokārt tiek izmantots Alcheimera slimības smagākos gadījumos (McShane et.al., 2006).

Aktīvi notieka arī dažādu metožu izstrāde lai tieši iedarbotos uz $A\beta$ – tiek izmēģināta pasīvās imunizācijas metode, izmantojot monoklonālās antivielas pret $A\beta$, intravenozu imunoglobulīnu ievadi, γ and β sekretāžu inhibīcija (Haakon and Nygaard, 2013). Kā viena no jaunākajām metodēm, kuru mēģina attīstīt, ir nanotehnoloģija, ar kuras palīdzību aktīvajiem aģentiem būtu iespēja šķērsot hematoencefālisko barjeru, iedarbojoties tieši uz smadzenēm. Kādā no nesenākajiem pētījumiem noskaidrots, ka nanodaļiņas kā zāļu „nesēji” var

ievērojami uzlabot CNS farmakokinētiskos rādītājus un biopieejamību salīdzinājumā ar citām terapijas iespējām (Kreuter, 2014).

Tā kā noskaidrojies, ka arī uzturam ir nozīme slimības attīstībā, kā viens no potenciālās terapijas veidiem tiek izskatīta holesterīna līmeņa samazināšana. Diēta ar augstu holesterīna līmeni palielināja A β līmeņus peļu eksperimentālajā modelī (Refolo et.al., 2000). Holesterīns, kas tiek uzņemts ar uzturu divas reizes palielināja A β koncentrāciju trušu hipokampā, ka arī, tā samazināšanās tika noteikta holesterīna līmeni samazinot (Sparks et.al., 2000). Ir veikti vairāki pētījumi, lai izprastu holesterīna iedarbību uz γ -sekretāzes kompleksa aktivitāti. Statīni – holesterola biosintēzes līmeņa regulējošā enzīma – 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzīma A (HMG CoA) reduktāzes – konkurējošie inhibitori tieši samazina holesterīna līmeni un novērš APP apstrādi un A β veidošanos šūnās. AD peļu modelī simvastatīns uzlabo hipokampa atkarīgo telpisko atmiņu un novērš atmiņas bojājumus. Tāpat, tas veicina arī NMDA receptoru atkarīgo sinaptisko transmisiju (Parent et.al., 2014).

1.6. Alzheimerera slimības streptozocīna modelis

Streptozocīns ir glikozamīna – nitrozourīnvielu savienojums, kas sākotnēji tika identificēts kā antibiotiķis. Tā injekcijas icv izraisa palielinātu A β fragmentu un tau proteīna uzkrāšanos smadzenēs. Ir noteikts, ka grauzēju smadzenēs tas izraisa neuroiekaisumu, oksidatīvo stresu un bioķīmiskas izmaiņas (Gao et al., 2013).

STZ subdiabetogenās devās žurkām izraisa smadzeņu glikozes un metabolisma traucējumus, samazina holīna acetiltransferāzes līmeni hipokampā, un izraisa brīvo radikāļu veidošanos, kas izraisa atmiņas un mācīšanās spēju pazemināšanos (Lannert and Hoyer, 1998).



1.4. Attēls. Streptozocīna dabības mehānisms uz aizkuņģa dziedzerā β šūnām

Attēls no [http://www.nrronline.org/article.asp?issn=1673-](http://www.nrronline.org/article.asp?issn=1673-5374;year=2015;volume=10;issue=7;spage=1050;epage=1052;aulast=Kamat)

[5374;year=2015;volume=10;issue=7;spage=1050;epage=1052;aulast=Kamat](http://www.nrronline.org/article.asp?issn=1673-5374;year=2015;volume=10;issue=7;spage=1050;epage=1052;aulast=Kamat)

Perifērijā STZ ievade izraisa selektīvus aizkuņģa dziedzerā β-šūnu bojājumus. Streptozocīns iekļūst šūnās ar glikozes transportproteīnu 2 (GLUT2) un izraisa DNS alkilāciju, kas aptur poli ADF-ribolizāciju, tādā veidā izraisot šūnās esošā NAD⁺ un ATF izsīkšanu, kā arī bojājot šūnu galveno funkciju – spēju producēt un sekretēt insulīnu (Correia et.al., 2011).

Noskaidrojies, ka ar intracerebroventrikulārām (icv) streptozocīna injekcijām žurku smadzenēs tiek apturētas esošā insulīna funkcijas, novērotas uzvedības, neuroķīmiskas un strukturālas izmaiņas smadzenēs, kas raksturīgas sporādiskās Alcheimera slimības gadījumā (Grunblatt et. al., 2007; Salkovic-Petrisic et.al., 2007).

Izraisot insulīna deficītu smadzenēs, sākas neiroiekaisums, glikogēna sintāzes kināzes (GSK3β) aktivizēšanās rezultātā sākas Aβ akumulācija, τ proteīna fosforilācija, kas izraisa senīlo splātņu un neurofibrillāro mezglu ukrāšanos smadzenēs. Visu šo procesu rezultātā notiek neironālās aktivitātes samazināšanās un neronālo sinapšu zudums, kas ir Alcheimera slimības pamatā.

ICV streptozocīna injekcijas pasliktina telpisko atmiņu, apturot glikozes utilizāciju, smadzeņu garozā un hipokampā caur insulīna atkarīgajiem mehānismiem. Shoham et.al. pētījumā noskaidroja histopatoloģiskās izmaiņas pieaugušās žurkās pēc trīs icv 0,25 mg STZ injekcijām un to izraisīto efektu uz žurku atmiņu, pārbaudot to Morisa ūdens labirinta testā.

Rezultātā noskaidrojies, ka STZ injekcijas palēninājušas žurku apgūšanas spēju un pasliktinājušas darba atmiņu. STZ izraisīja selektīvus bojājumus mialīnam un aksoniem *fornix* (smadzeņu daļa, kas veic signālu pārvadi no hipokampa uz citiem smadzeņu reģioniem) rajona un hipokampa komunikācijas laukumā, iesaistot mikroglijas aktivāciju. *Ventriculus tertius* ependimālo šūnu zaudējuma un hipotalāma preventrikulārā mialīna bojājumu dēļ, trešais ventrikuls bija palielinājies 100 – 150% apmērā (Shoham et.al., 2003).

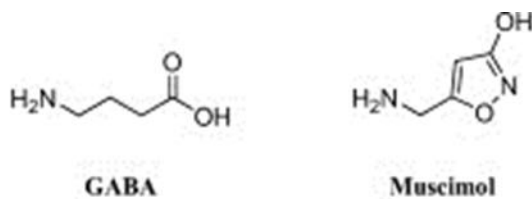
Saksena et. al. pētījumā, kurā tika noteikta melatonīna pozitīvā ietekme uz oksidatīvā stresa radītajiem bojājumiem un atmiņu, arī tika izmantots STZ modelis. Šajā darbā STZ (3 mg/kg) žurkām tika ievadīts divas reizes ar 48 stundu starplaiku. Ūdens labirinta rezultāti uzrādīja atmiņas pasliktināšanos, bioķīmiskās analīzes uzrādīja samazinātus glutaciona līmeņa rādītājus un palielinātus malondialdehīda rādītājus, salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem. STZ grupu smadzeņu sekcijās parādījās palielinātas vakuolas preventrikulārajā garozas reģionā, bojātas preventrikulārās un hipokampa CA4 reģiona šūnas (Saksena et.al., 2010).

1.7. Muscimols

Muscimols ir γ -amino sviestskābes A (GABA-A) receptoru agonists, kas ar augstu afinitāti saistas pie GABA-A receptoriem. Tas darbojas kā neironālās un gliālās GABA atpakaļsaistīšanās inhibitors un ir kā substrāts GABA-transamināzei. GABA ir atzīta kā galvenais neirotrofiskais faktors, kurš smadzenēs, saistoties ar jontropajiem A receptoriem, izraisa inhibējošu efektu (Krogsgaard-Larsen et.al., 1994). Jaundzimušo smadzenēs tā ietekmē dažādus neironālās attīstības procesus, piemēram, proliferāciju, sinaptiskos procesus. GABA's līmeņa izmaiņas smadzenēs var būtiski ietekmēt smadzeņu darbību un attīstību (Represa and Ben-Ari, 2005).

Dabā muscimols ir atrodams sēnē *Amanita muscaria*. Šī sēne veido vairākus alkaloidus, piemēram, ibotēnskābi, muskazonu, muskarīnu, tajā skaitā – muscimolu.

Muscimols ir polāra molekula, kura viegli šķīst ūdenī, spirtā un DMSO. Muscimola molekulārā struktūra ir līdzīga organismā esošā neirotransmitera – gamma amino sviestskābes (GABA) struktūrai (Michelot and Melendez-Howell, 2003).



1.5. Attēls. GABA un muscimola struktūrformulas

Attēls no https://www.researchgate.net/figure/227800364_fig2_Figure-1-Chemical-structures-of-the-GABAAR-agonists-GABA-and-muscimol-and-the

2005. gadā veikta pētījuma rezultāti parāda, ka muscimolam ļoti mazās devās piemīt spēja bloķēt A β izraisīto neirotoksicitāti hipokampa un garozas neironos. Tas tika noteikts, veicot pētījumu ar 15 vai 18 dienas vecu žurku mazuļu hipokampiem. Hipokampi tika izdalīti, homogenizēti un inkubēti 4 dienas. 1 stundu pirms A β 1-42 pievienošanas, smadzenes pa grupām tika turētas dažādas koncentrācijas muscimola šķīdumos. Pēc 48 stundām tika veikta audu analīze, kurā noskaidrojās, ka muscimols, koncentrācijā 1 μ M, pilnībā bloķēja neironu nāvi hipokampā. Tāds pats rezultāts parādījās arī apskatot smadzeņu garozas audus (Paula-Lima et. al., 2005).

Arī Lee et.al. savā darbā noteica muscimola 0,1-10 μ M ietekmi uz amiloīda β (A β) proteīna (25-35) izraisīto neirotoksicitāti žurku smadzeņu audu kultūrās. Rezultāti parādīja, ka šie bojājumi var tikt novērsti hroniski stimulējot GABA_A receptorus. Kad muscimols tika pievienots šūnu kultūrām 24 stundas pirms A β (25-35) izmantošanas, tas spēja novērst apoptisku šūnu nāvi, kalcija jonu līmeņa palielināšanos, glutamāta izdalīšanos, ROS (skābekļa aktīvo formu paaudze) veidošanos un kaspāzes-3 aktivizēšanos. Lai šo neiroprotektējošo efektu, stimulējot GABA_A receptoru stimulācijas, apstiprinātu, citā eksperimentā muscimola vietā izmantoja bikukulīnu – GABA_A receptoru antagonistu, kurš nekādas neiroprotektējošas īpašības neuzrādīja (Lee et.al., 2005).

Bickler et.al. pētījumā hipokampa CA1, CA3 reģioniem *dentate gyrus* subreģionā noteicis, ka muscimols (25 μ M) novērsis šūnu nāvi smadzeņu išēmijas modelī pēc 1 stundu ilgus skābekļa un glikozes nepietiekamības smadzenēs (Bickler et.al., 2003).

Jau 1994. gada veiktajā pētījumā Lyden un Lonzo noteica, ka muscimolam piemīt neiroprotektējošas īpašības, nosakot to eksperimentā ar žurkām, kurām tika izraisīta smadzeņu išēmija. Šajā darbā tika noteikta arī muscimola kombinācija ar MK-801 (dizocilpīnu), rezultātā noskaidrojot, ka abu preparātu kombinācija uzrāda vēl lielākas neiroprotektējošas īpašības. Abu šo preparātu kombinācija smadzenes arī pasargāja no tilpuma samazināšanās tādās smadzeņu daļās kā garoza un hipokamps (Lyden and Lonzo, 1994).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Dzīvnieki. Žurku *Wistar* tēviņi (svars 280 ± 20 g) tika iegādāti no Rīgas Stradiņa Universitātes vivārija. Tie tika uzturēti LU Bioloģijas fakultātes eksperimentālajā telpā, speciālos ventilācijas būros. Žurkas saņēma standarta (R70, Lantmännen, Zviedrija) granulētu laboratorijas barību un dzeramo ūdeni *ad libitum*. Telpā tika uzturēts tumsas - gaismas 12h cikls, kā arī konstanta temperatūra ($21-23^{\circ}\text{C}$) un darbojās ventilēšanas iekārta.

Visas eksperimentā veiktās procedūras ir veiktas saskaņā ar Eiropas Savienības konvencijas direktīvas 2010/63/EU vadlīnijām un tās tika saskaņotas ar Latvijas Pārtikas un veterinārā dienesta

2.2. Intracerebroventrikulārā (icv) vielu ievade

Muscimols (pulvera veida) un ketamīna/ksilazīna šķīdumi - Sigma-Aldrich (ASV) (M1523). Muscimols tika izšķīdināts 0,9% NaCl šķīdumā. Ketamīns un ksilazīns tika sajaukti kopā šļircē pirms ievadīšanas. Streptozocīns – Sigma-Aldrich (ASV) (S0130) pirms ievadīšanas tika izšķīdināts mākslīgā cerebrospinalajā šķīdumā (*artificial cerebrospinal fluid*, aCSF).

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

Pēc eksperimenta procedūru veikšanas, žurku smadzenes tika ievāktas un ieliktas uzglabāšanai saldētavā (-20°C), *antifreeze* šķīdumā, individuālos traukos.

Eksperimenta sākumā (D1-D3), žurkām tika intraperitoneāli (i.p.) ievadīts fizioloģiskais šķīdums (1 ml/kg) vai muscimols (0,01 mg/kg vai 0,05 mg/kg). Ceturtajā dienā (D4) žurkām 26 icv tika ievadīts STZ (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 5 μl uz smadzeņu ventrikuli) vai aCSF (5 μl uz smadzeņu ventrikuli, 10 μl uz vienu žurku).

2.3. Eksperimenta dizains

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

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

2.4. Imūnhistoķīmija (IHC)

Smadzeņu puslodes tika izņemtas no -20 C, kur tas tika turetas antifreeze šķīdumā un 24 stundas pirms smadzeņu sagriešanas tas tika turētas 30% sukrozes šķīdumā 4 °C. Pēc tam, smadzeņu segments tika uzlīmētas uz kriatoma statīva un ievietots tā kamerā sasalšanai. Smadzenes tika grieztas 30 µm biezumā, ievietotas platē (4 x 6 bedrītes, piepildītas ar antifreeze šķīdumu), katrā bedrītē liekot pa 3 šķēlēm parauga un atkal ieliktas -20 grādu temperatūrā līdz pašai IHC veikšanai.

Imūnhistoķīmiskās procedūras tika veiktas 3 plastmasas traukos, katrs – 4 x 6 bedrītes. Katra trauka bedrīšu kolonnas tika numurētas (1 – 6), bet rindas sarindotas alfabēta secībā (A; B; C; D). No katras eksperimentālās grupas tika ņemti trīs paraugi, vienā mēģinājumā apskatot 24 grupu paraugus, tajā skaitā arī negatīvo kontroli.

Lai paveiktu imūnhistoķīmisko analīzi ir nepieciešamas trīs dienas. Pirmajā dienā, pēc izņemšanas no antifreeze šķīduma un pārlikšanas darba traukā, paraugi tika skaloti divas reizes pa piecām minūtēm PBS-T buferī. Tad tika veikta audu balināšana 0,1 % H₂O₂ PBS-T šķīdumā, pusstundu, lai novērstu traucējoša fona rašanos no endogēnajām peroksidāzēm. Pēc balināšanas audi atkal tiek skaloti PBS-T šķīdumā, trīs reizes, pa piecām minūtēm. Lai novērstu nespecifisku primārās antivielas saistīšanos ar audiem, tiek veikta arī bloķēšana, PBS-T šķīdumā tiek pagatavojot 5 % vēršu seruma albumīna šķīdumu. Audi tajā tiek atstāti uz vienu stundu. Kad inkubācijas laiks bija nosledzies, atsevišķi tiek izņemti negatīvās kontroles paraugi. Tie tiek atstāti PBS-T šķīdumā. Visiem pārējiem tiek pievienota primārā

antiviela, atšķaidījumā 1:200 GAP-43 gadījumā, vai 1:100 GAD67 gadījumā. Atstāj inkubācijai uz nakti.

Nākamā diena sākas ar skalošanu, trīs reizes pa piecām minūtēm PBS-T šķīdumā. Pa to laiku tiek sagatavota sekundārā peļu antiviela, atšķaidījumā 1:500. Pēc skalošanās beigām, paraugi uz divām stundām tiek atstāti inkubēties sekundārajā antiviela. Kad noteiktais laiks pagājis – atkārtota skalošana trīs reizes pa piecām minūtēm PBS-T šķīdumā. Seko terciārās ExtrAvidin peļu antivielas uzlikšana, atšķaidījumā 1:1000, atstājot inkubācijai uz divām stundām. Kad divas stundas pagājušas, pēdējā skalošana PBS-T šķīdumā, trīs reizes pa piecām minūtēm. Tad paraugi uz trīs minūtēm tiek ievietoti DAB buferī, lai notiktu iekrāsošana. Pēc DAB, tie tiek ievietoti 0,05 M nātrija fosfāta buferī. Kā pēdējais solis pirms paraugu analizēšanas – audu izņemšana no darba platēm un salikšana un speciāliem priekšmetstikliņiem. Audi uz stikliņiem tiek salikti pa grupām, tāpat kā atradās traukos visā darba gaitā. Katrs stikliņš tiek parakstīts. Paraugi tiek atstāti uz nakti žāvēties, 37° C temperatūrā.

Trešajā dienā uz priekšmetstikliņiem tiek uzlīmēti aizsargstikliņi. Līme nožūst. Pirms datu analizēšanas mikroskopā, stikliņi tiek notīrīti no liekajiem līmes traipiem.

Datu analīze tiek veikta elektromikroskopā, palielinājums – 200 reizes. No katra priekšmetstikliņa analīzei tikai atlasīts viens smadzeņu paraugs, kurā vislabāk redzams hipokamps, un viens (var būt arī tas pats) – kurā vislabāk redzama smadzeņu garoza. Katram smadzeņu apgabalam tika uzņemti pieci attēli tālākai analīzei.

Tālāka attēlu apstrāde tika veikta attēlu apstrādes programmā ImageJ.

GAP43 paraugos marķiera ekspresija garozā tika noteikta izveidojot laukumu attiecību – iekrāsotā parauga laukums pret kopējā attēla laukumu. Iegūstot procentuālu attiecību grupas tika salīdzinātas, lai noteiktu marķiera ekspresijas izmaiņas. Nosakot iekrāsotā laukuma procentuālo lielumu hipokampā un GAD67 paraugos, tika izmantota cita mērīšanas metode, pārvēršot attēlu 32 bitu formātā un nosakot iekrāsoto laukumu mainot attēla uzstādījumus. Katrai smadzeņu daļai tika piemeklēta piemērotākā metode, kuru izmantojot, iekrāsoto laukumu noteikt būtu visefektīvāk, ņemot vērā attēlu atšķirības.

2.5. *Western blota* analīze

Smadzeņu audu sagatavošana *Western blota* analīzei

No vienas žurku smadzeņu puslodes (sasaldētas -85°C), mehāniski izdalīja hipokampu. No hipokampa izdalīja proteīnu, īsu brīdi homogenizējot homogenizatorā kopā ar lizējošo

buferi RIPA un ar proteāžu inhibitoru kokteili atšķaidījumā 1:10. Tika noteikts, ka gēlā ievadītā proteīna daudzumam jābūt 20 µg. Lai aprēķinātu nepieciešamo tilpumu katram paraugam, izdalītā proteīna koncentrāciju tika nomērīta ar *BCA Assay Kit* metodi, kuras pamatā ir proteīna saistīšanās ar vara kompleksu. Paraugi tika sajaukti ar SDSxSTOP buferi, un termiski denaturēti 5 minūtes 95°C. Pēc tam tie tika atdzesēti, turot uz ledus.

Gēla elektroforēze un pussausā pārnese

20 µg gēlā ievadītā proteīna daudzuma tika sadalīti pēc to izmēriem 15% poliakrilamīda gēla elektroforēzē, pieslēdzot 20 mA stipru strāvu, aptuveni 2 h. Proteīni tika pārnesti uz nitrocelulozes membrānas, izmantojot pussausās pārnese aparātu (laiks – 45–60 minūtes), vēlreiz izmantojot elektroforēzes principu. Pielietotais strāvas stiprums – vienāds ar pārnese membrānas laukumu.

Bloķēšana un Blotēšana

Pārnese membrānu, pirms blotēšanas bloķē ar 5% sauso pienu un 0,05% Tween-20 TBS-buferi. Membrānu ar pagatavoto šķīdumu atstāj uz 24 stundām 4°C temperatūrā, lai izvairītos no nespecifisku antivielu piesaistes. Nākamā tiek inkubēta primārā anti viela – 1 stundu, istabas temperatūrā. Atšķaidījums: BDNF 1:500. Pēc primārās antivielas piesaistes membrāna tiek skalota ar TBS-T buferi, 3 reizes pa 15 minūtēm, uz kratītāja istabas temperatūrā. Pēc tam membrāna tiek inkubēta attiecīgajā sekundārajā anti vielā istabas temperatūrā, 1 stundu. Vēlreiz atkārti skalošanu ar TBS-T buferi, 3 reizes pa 15 minūtēm, uz kratītāja istabas temperatūrā.

Membrānas attīstīšana

Ekspresijas detektēšanai tika izmantoti hemiluminescences reaģenti – šķīdumu A un B (1:1). Pēc reaģentu uzklāšanas uz membrānas, tie tika inkubēti 1 minūti, pēc tam uzmanīgi noslaucīti un ielikti tumšā kamerā ar CCD kameru (UVP Bioimaging Systems, Kanāda), kur bija nepieciešams iestatīt ekspozīcijas laiku, kurš var variēt (optimāli – 1 minūte).

Statistiska

Iegūtie dati tika apstrādāti biostatistikas programmā GraphPad Prism (Version 5). *Western* blota attēla analīze tika veikta ar programmu Image J. Ar Image J programmu atvērtais attēls tiek izveidots menlbalatajā režīmā (8 biti). Izmantojot taisnstūra figūru tiek iezīmēts SAL+aCSF josla *Western* blota analīzes attēlā, izveidojot to kā standartu, ar kuru tiks salīdzināti paraugi (iezīmētais laukums x vidējais pikseļu skaits iezīmētajā laukumā). Parauga iezīmēšana notiek, pēc iespējas precīzāk izvēlot lielāko piesātinājumu, cenšoties izvairīties no „trokšņiem”, kas rodas *Western* blota analīzes laikā. Paraugu ekspresija tiek iezīmēta, izmantojot tāda paša lieluma taisnstūra laukumu. Rezultāti tika izteikti absolūtās intensitātes skaitļos, pieņemot SAL+aCSF grupu par vērtību 1. Relatīvo intensitāti pārējām grupām aprēķināja dalot kontroli ar absolūtās intensitātes vērtībām.

Statistisku noteica ar *Analysis of variance* (ANOVA) un Bonferoni pēctestu, kā arī Stjūdenta nesapāroto t – testu. Visu datu statistisko ticamību izvērtēja pēc p vērtības, kas ir mazāka par 0,05.

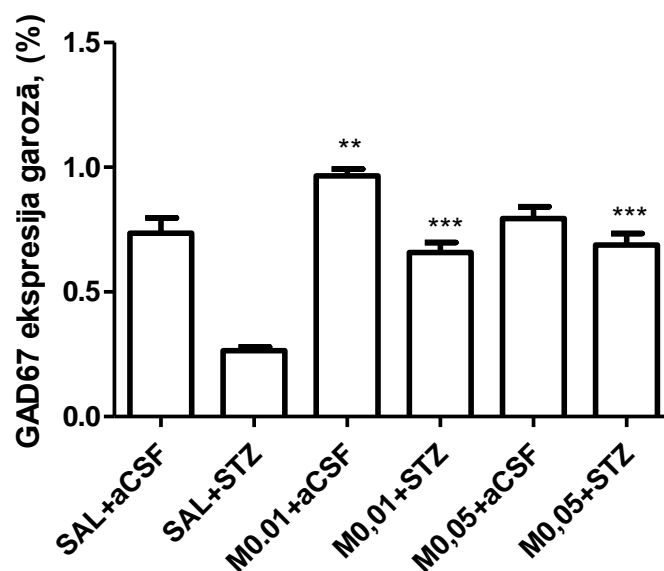
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Abu metožu iegūtie rezultāti tika apstrādāti GrapPad Prism (version 5) datorprogrammā, izmantojot dispersijas analīzi (ANOVA *One-way analysis of variance*), nosakot atšķirības starp grupām. Visievērojamākās ekspresijas izmaiņas tika noteiktas veicot GAD67 analīzi, kas verētu būt saistīts ar to, ka muscimols ir GABA-A receptora agonists un tamdēļ tas spēj ietekmēt arī GABA-ergiskās sistēmas aktivitāti. GAP43 un BDNF ekspresijā būtiskas izmaiņas noteiktas netika.

3.1. GAD67 ekspresija

GAD67 ekspresija garozā

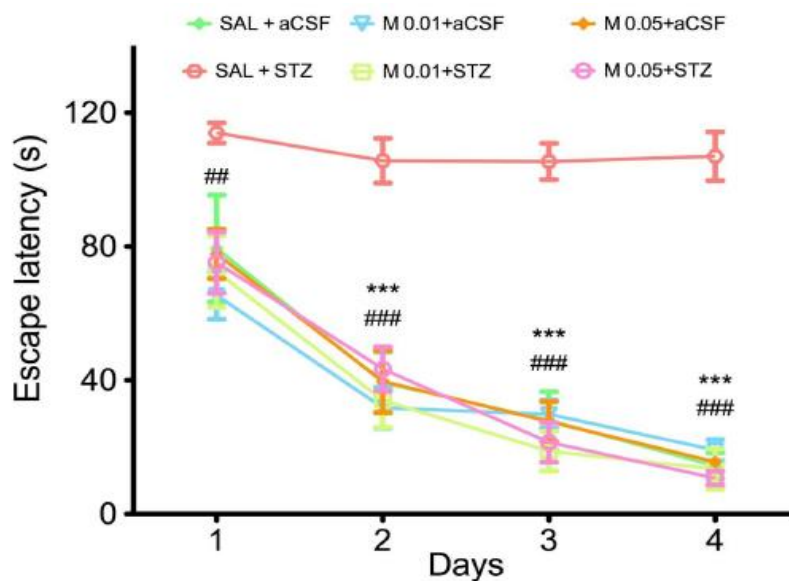
Nosakot GAD67 ekspresijas izmaiņas ar IHC metodi žurku smadzeņu garozā, tika noteikts, ka muscimols spēja palielināt GAD67 ekspresiju ne tikai bojājuma grupās – M0,01+STZ un M0,05+STZ (*SAL+STZ vs M0,01+STZ; SAL+STZ vs M0,05+STZ; (p<0,0001)*), bet 0,01 mg/kg lielā devā uzrādīja pozitīvu efektu arī bez streptozocīna premedikācijas (*SAL+aCSF vs M0.01+aCSF (p<0,01)*). Šie rezultāti apstiprina citu veiktos pētījumus, kur muscimols uzrādīja neiroprotektējošās īpašības AD bojājumu gadījumā, ko izraisa A β toksicitāte uz neironiem (Lee et.al., 2005).



3.1. Attēls. GAD67 ekspresija žurku smadzeņu garozā.

*M0.01+aCSF vs SAL+aCSF ** (p<0,01); M0,01+STZ vs SAL+STZ *** (p<0,0001); M0,05+STZ vs SAL+STZ *** (p<0,0001)*

Šie rezultāti arī paskaidro dzīvnieku uzvedības testu rezultātus, kur pārbaudīja telpisko atmiņu ar ūdens labiranta testu (3.2. attēls).



3.2. Attēls. Izbēgšanas latences (s) dinamika četrās treniņu dienās

Laiks, kura laikā dzīvnieks atrada paslēpto platformu reģistrēts secīgi eksperimenta 14.-17.dienās. Rezultāti attēloti kā vidējās vērtības \pm SEM. *** ($p < 0.0001$) vs SAL+aCSF; ## ($p < 0.01$) vs SAL+STZ; ### ($p < 0.0001$) vs SAL+STZ

Attēls no: Cibuļskis, 2015

Šajā testā noteica izbēgšanas latenci – laiku, kurā dzīvnieks atrod paslēpto platformu, kopš brīža, kad tiek ievietots ūdens baseinā. Statistiski būtiskas atšķirības izbēgšanas latencē tika noteiktas tieši minētajās grupās: M0,01+STZ un M0,05+STZ, no 2. – 4. dienai, parādot, ka muscimola mazu devu lietošana palīdzēja dzīvniekiem labāk iemācīties un iegaumēt platformas atrašanās vietu.

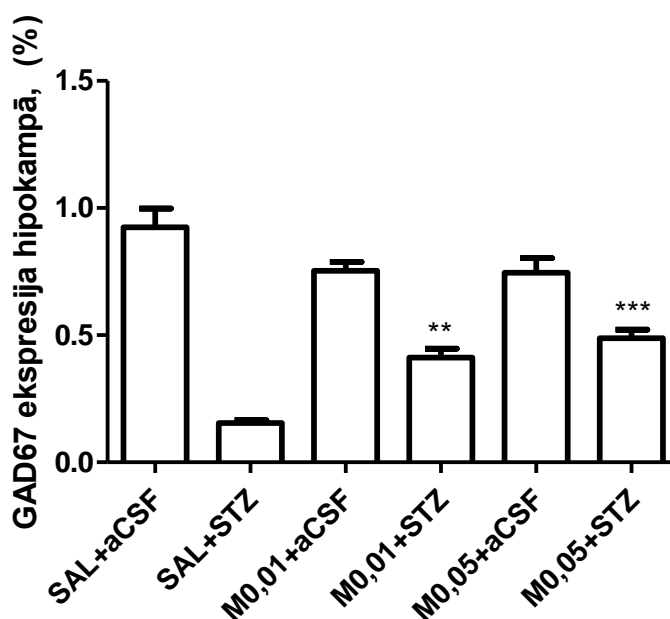
Līdzīgi rezultāti uzrādās Shirakawaa un Ichitani pētījumā, kur muscimols tika izmantots, lai noteiktu sistēmiskas un intranigrālas muscimola ievadīšanas efektu uz mācīšanos un telpisko atmiņu ūdens labiranta testā. Kā mērķa objekts eksperimentā bija *striatum* smadzeņu apgabals, kuram ir liela nozīme ne tikai kustību kontrolē, bet, arī uzmanības, mācīšanās un atmiņas procesos, saņemot impulsus no smadzeņu garozas (Lawrence et.al., 1998). Noskaidrojās, ka sistēmiska muscimola lietošana ievērojami samazina žurku iniciācijas latenci pēc ibotēnskābes (spēcīgs neirotoksīns) izraisītiem bojājumiem smadzeņu apgabalā. Tomēr izbēgšanas latencē šādas izmaiņas noteiktas netika. Lai gan iemesls tam nav izprasts, tiek pieļauta iespēja, ka tas ir saistīts ar to, ka muscimols ne tikai veicināja dzīvnieku peldēšanas ātrāku uzsākšanu, bet arī palielināja to aktivitāti baseinā,

tādējādi, žurkas peldot pavadīja ilgāku laiku apzināti, nevis tāpēc, ka tas ir ibotēnskābes izraisīto bojājumu nenovērsts efekts (Shirakawaa and Ichitani, 2004).

Šis skaidrojums tika apstiprināts arī esošā darba uzvedības testa eksperimentālajā daļā, kad, veicot fināla testus 18. dienā, noteica, ka M0,01+STZ grupā žurkas uzrāda lielāko peldēšanas ātrumu un platformas laukuma šķērsošanas reižu skaitu.

GAD67 ekspresija hipokampā

Hipokampā statistiski ticamas izmaiņas tika noteiktas tikai bojājuma grupās – M0,01+STZ un M0,05+STZ (*SAL+STZ vs M0,01+STZ* ** ($p < 0,01$); *SAL+STZ vs M0,05+STZ* *** ($p < 0,0001$)). Interesanti ir tas, ka hipokampā lielāks pozitīvais efekts tika novērots tieši M0,05+STZ grupā, salīdzinājumā ar pārējiem gadījumiem, kad statistiski ticamas izmaiņas, galvenokārt, noteiktas M0,01+STZ grupās.



3.3. Attēls. GAD67 ekspresija žurku smadzeņu hipokampā.

M0,01+STZ vs SAL+STZ ** ($p < 0,01$); *M0,05+STZ vs SAL+STZ* *** ($p < 0,0001$).

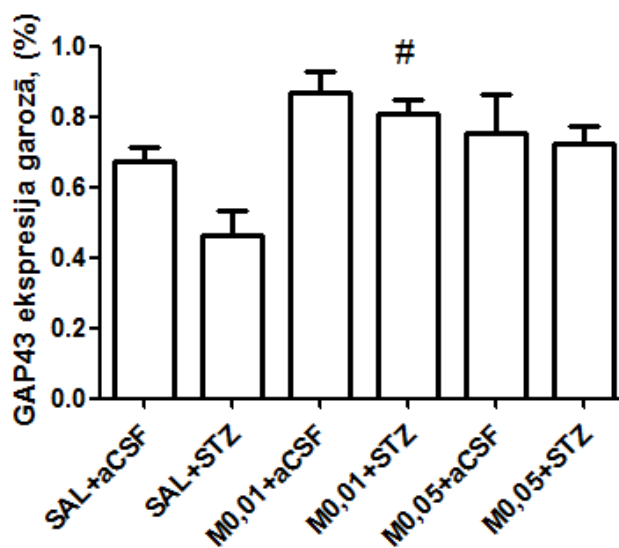
Šī darba rezultāti uzrāda, ka muscimola ievadīšana icv mazās devās spēj novērst STZ izraisītos bojājumus smadzenēs, kas ir pamatā AD. Tā kā muscimola terapeitiskais efekts tiek panākts caur GABA_A receptoriem, ir noteikts, ka GABA aktivācija smadzenēs ir saistīta ar atmiņas procesiem, neironu attīstību un deiferenciāciju (Hasegawa et. al., 2007).

Tomēr, lai arī ir vairāki pierādījumi muscimola pozitīvajai neiroprotektējošai īpašībai, metodes meklējumi, lai to varētu lietot AD terapijā joprojām ir liels izaicinājums, saistībā ar muscimola straujo metabolizāciju un spēju saistīties ne tikai GABA receptoriem uz šūnu membrānas un tā halucinogēnajām īpašībām (DeFeudis, 1980).

3.2. GAP43 ekspresija

GAP43 ekspresija garozā

Nosakot GAP43 ekspresijas izmaiņas garozā, tika noteikts, ka muscimolam 0,01 mg/kg devā ir spēja palielināt biomarķiera ekspresiju streptozocīna grupā. Šis rezultāts daļēji atspoguļo arī uzvedības testa rezultātus, jo pirms tam veiktie ūdens labirinta testa rezultāti uzrādīja izbēgšanas latences statistiski ticamu samazinājumu ($p < 0,0001$) M0,05+STZ un M0,01+STZ grupās.



3.4. Attēls. GAP43 ekspresija žurku smadzeņu garozā.

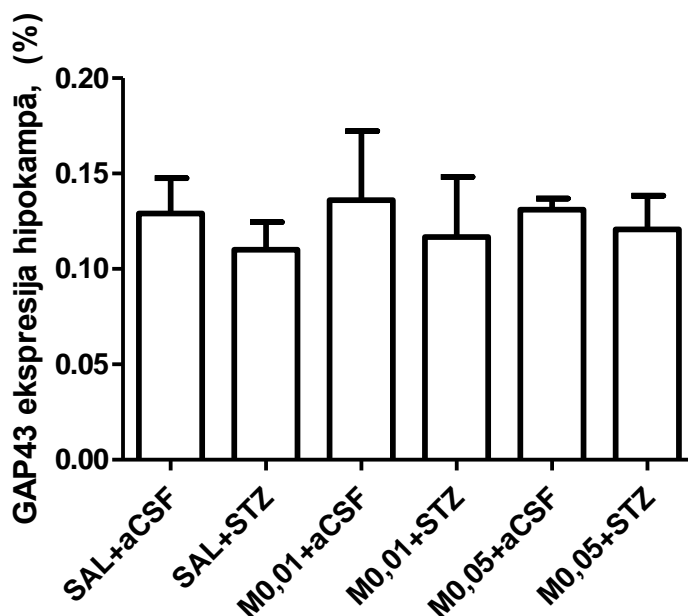
M0,01+STZ vs SAL+STZ # ($p < 0,05$)

Arī senāk veiktos pētījumos ir mēģināts noteikt muscimola ietekmi uz atmiņu. Jau tad, izmantojot, izmantojot ūdens labirinta testu tika noteikts, ka muscimolam ir pozitīva ietekme uz telpisko atmiņu, ar piebildi, ka tā lietošanai jābūt ilgstošai. Jo, piemēram, minētajā Nakagawa et.al. darbā pierādās, ka pozitīvais efekts tika novērots pēc četrus dienu muscimola ievadīšanas, salīdzinājumā ar grupu, kura muscimolu saņēma trīs dienas (Nakagawa et.al, 1995).

Minētie rezultāti rāda, ka muscimola mazās devās, ir potenciāls kā vielai, kura būtu jāturpina pētīt kā potenciālo papildus terapiju Alcheimera slimības farmakoterapijā. Muscimols jau ir pierādījis pozitīvu efektu uz A β izraisītiem neironu bojājumiem. Muscimola neiroprotektējošā ietekme tiek saistīta ar hlorā kanālu atvēršanu un membrānas hiperpolarizāciju, jo tas izraisa NMDA receptoru desintizāciju un voltāžas atkarīgo kalcija kanālu inaktivāciju, kas izraisa A β izraisīto neironu nāvi (Matsumoto et al., 2003).

GAP43 ekspresija hipokampā

Nosakot GAP43 ekspresiju hipokampā nekādas statistiski ticamas ekspresijas izmaiņas noteiktas netika.



3.5. Attēls. GAP43 ekspresija žurku smadzeņu hipokampā.

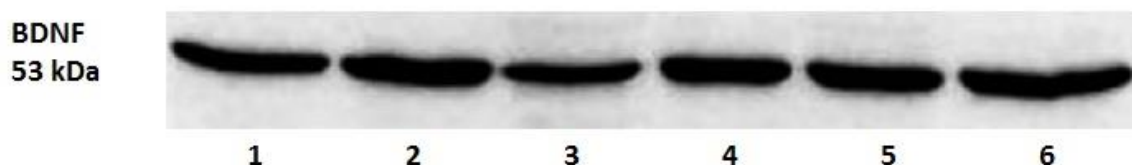
Hipokampā statistiski ticamas atšķirības starp grupām novērotas netika.

Tā kā hipokamps ir smadzeņu daļa, kas atmiņas un kognīcijas procesos ir iesaistīta visvairāk, joprojām tiek meklētas dažādas vielas un metodes, kas spētu palīdzēt atmiņas uzlabošanas procesos.

Ņemot vērā mūsdienu dzīves ritmu un apstākļus, īpaša uzmanība tiek pievērsta ne tikai farmakoloģiski aktīvu aģentu meklējumiem, bet arī fizisko aktivitāšu nozīmei šajos procesos. Ir veikti vairāki pētījumi, izmantojot dažādus modeļus (gan cilvēku, gan dzīvnieku), bet rezultāti aizvien apstiprina fizisko aktivitāšu pozitīvo ietekmi uz kognitīvajiem un atmiņas procesiem (Klein et.al, 2016; Klein et.al., 2016).

3.3. BDNF ekspresija

Biomarkieru analīze veikta *ex vivo*, uz izolēta premedicētu žurku (fizioloģiskais šķīdums + aCSF; fizioloģiskais šķīdums + STZ; muscimols 0,01 mg/kg + aCSF; muscimols 0,01 + STZ; muscimols 0,05 mg/kg + aCSF; muscimols 0,05 mg/kg + STZ; intracerebroventrikulāri, divas nedēļas pēc kārtas) smadzeņu hipokampa. Uzvedības testus neveica darba autore.



3.6. Attēls. BDNF ekspresija hipokampā pa grupām:

1 - SAL+ Acsf; 2 - SAL+ STZ; 3 - M 0,01 + aCSF; 4 - M 0,01 + STZ; 5 - M 0,05 + aCSF
6 - M 0,05 + STZ

Veicot *Western Blot* analīzi BDNF marķierim hipokampā, ievērojamas izmaiņas starp grupām noteiktas netika. Tas varētu būt izskaidrojams ar to, ka, lai arī parādās dati par BDNF saistību ar Alzheimeru slimību, notiekošie procesi, kuros iesaistīts BDNF joprojām nav līdz galam izprasti (Lim et.al., 2013). Iespējams, šajā modelī izmantotajām žurkām Alzheimeru slimības pakāpe vēl nebija tādā smaguma pakāpē, lai būtu iespējams noteikt izmaiņas tieši BDNF ekspresijā. Kā noteikts vairākos pētījumos – tieši A β akumulācija un tā izraisītā toksicitāte izraisa BDNF līmeņa un tā receptoru skaita samazināšanos (Ye et.al., 2012; Sothibundhu et.al., 2008).

Tā kā pasaulē arvien tiek meklētas terapijas iespējas Alzheimeru slimības pacientiem, uzmanība tiek vērsta arī uz BDNF izmantošanas iespējām. Šobrīd lielākais izaicinājums ir izveidot modeli BDNF izmantošanai, jo, neskatoties uz tā spējām uzlabot atmiņu (Lee et.al., 2012), regulēt neironālo šūnu izdzīvošanu, diferenciaciju un sinaptisko procesu aktivitāti (Croll et. al., 1998), tā izmantošana terapijā pagaidām nav iespējama vairāku iemeslu dēļ. Kā daži no tiem ir eliminācijas puslaiks, kas ir mazāks par vienu minūti (žurkām), spēja pārāk vāji šķērsot hematoencefalisko barjeru (Poduslo and Curran, 1996), savienojoties ar p75NTR spēja izraisīt sāpes (Zhang et.al., 2008). Kā minēts iepriekš darbā, viena no metodēm ar lielu potenciālu, kuru mēģina attīstīt, ir nanotehnoloģija, kura palīdzētu uzlabot BDNF biopieejamību (Kreuter, 2014).

Bez GAD67, GAP43 un BDNF ir arī vairāki citi biomarkēri, kuru ekspresijas izmaiņām ir nozīme Alcheimera slimības gaitā un, uz kuriem tēmējot varētu tikt rastas jaunas vielas, ko varētu izmantot cīņā ar šo slimību.

Kā viens no šādiem marķieriem ir sinaptofizīns. Tas ir galvenais sinaptisko vezīkulu membrānas proteīns, kas ir iesaistīts neurotransmiteru atbrīvošanā sinaptisko vezīkulu ciklā. Pētījumu gaitā noteikts, ka tas ir cieši saistīts ar kognitīvajiem procesiem un sinaptisko plasticitāti (Schmitt et.al., 2009). Viena no vielām, kuras ietekme ir apskatīta uz sinaptofizīnu ir triptolīds – iegūts no augs *Tripterygium wilfordii* Hook F. Triptolīdam piemīt pretiekaisuma un imunosupresīva iedarbība. Kaut arī līdz galam nav izprasts tiešs darbības mehānisms uz Aβ izraisītajiem bojājumiem, veicot eksperimentus ir noteikta tā neiroprotektējošā iedarbība (Gao et.al., 2008).

Ka vēl vienu būtisku bioloģisko aģentu var minēt ar ditamīnu saistīto proteīnu – 1 (Drp1). Tas ir proteīns, kas kontrolē mitohondriju šķelšanu, pārvēršot vienu mitohondriju – par diviem. Mitohondriālo darbības procesu bojājumi tiek saistīti ar dažādiem patoloģiskiem stāvokļiem, piemēram, diabētu, aptaukošanos, kardiovaskulāriem bojājumiem, vēzi, kā arī neurodeģeneratīvām saslimšanām, kā Hantingtona vai Alcheimera slimības (Roy et.al., 2015). Neseni pētījumi uzrāda, ka pārmērīga mitohondriju sadalīšanās izraisa mitohondriju pārlietu lielu aktivitāti un neironu bojājumus, kas saistīti ar Alcheimera slimību. Aβ akumulācija un τ proteīna fosforilācija izraisa mitohondriju formas, izmēra, izplatības izmaiņas un aksonālo transportu AD iesaistītajos neironos, kas var būt iemesls atmiņas zudumam un kognitīvo spēju pakāpeniskam zudumam. Šī ir vēl viena progresīva stratēģija kā varētu mēģināt apturēt Alcheimera slimības attīstību – atrodot molekulārus inhibitorus, kas apturētu nevēlamās Aβ, fosforilētā τ proteīna un Drp1 mijiedarbības (Kandimalla and Reddy, 2016).

4. SECINĀJUMI

1. Muscimols 0,01 mg/kg un 0,05 mg/kg lielā devā spēj palielināt glutamāta dekarboksilāzes 67 (GAD67) ekspresiju streptozocīnu izraisītā Alzheimerera slimības modelī gan smadzeņu garozā, gan hipokampā.
2. Muscimols 0,01 mg/kg devā uzrādīja pozitīvu efektu uz GAD 67 ekspresiju arī salīdzinājumā ar kontroles grupu.
3. Izmaiņas sinaptiskā plasticitātes proteīnam ar augšanu asociētajam proteīnam 43 (GAP43) ekspresijā tika atrastas ar muscimola devu 0,01 mg/kg streptozocīna premedikācijas grupā, žurku smadzeņu garozā. Izmaiņas hipokampā netika atrastas.
4. Izmaiņas BDNF ekspresijā starp eksperimentālajām grupām netika atrastas. Tālāki pētījumi nepieciešami citu sinaptiskās plasticitātes proteīnu ekspresijas noteikšanai.
5. Muscimola mazo devu pozitīvais efekts uz atmiņu un spēja izmainīt proteīnu ekspresiju norāda uz nepieciešamību to tālāk pētīt, lai noskaidrotu tā darbības mehānismu Alzheimerera slimībā un tā potenciālu ārstēt arī Alzheimerera slimības pacientus.

5. PATEICĪBAS

Vislielākā pateicība – maģistra darba vadītājai Ulrikai Beitneri par zināšanām, padomiem, apgūstot imūnhistoķīmijas metodi un atbalstu visā darba tapšanas gaitā.

Pateicība arī Vladimiram Piļipenko par palīdzību darba praktiskās daļas veikšanā.

6. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- Aimone J. B., Wiles J., H Gage F.**, Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature Neuroscience*, 2006, vol. 9, p. 723 – 727.
- Backman L., Small B.J., Fratiglioni L.**, Stability of the preclinical episodic memory deficit in Alzheimer's disease. *Brain*, 2001, vol. 124, p. 96-102.
- Baker L.D., Frank L.L., Foster-Schubert K., Green P.S., Wilkinson C.W., McTiernan A., Plymate S.R., Fishel M.A., Watson G.S., Cholerton B.A., Duncan G.E., Mehta P.D., Craft S.**, Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial. *Archives of neurology*, vol. 67, p. 71–79, 2010.
- Ben-Ari Y.**, Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, vol. 3, p. 728–739.
- Bickler P.E., Warner D.S., Stratmann G., Schuyler J.A.**, Gamma-Aminobutyric acid-A receptors contribute to isoflurane neuroprotection in organotypic hippocampal cultures. *Anesthesia & Analgesia Journal*, vol. 97, p. 564-571, 2003.
- Binder D.K., Scharfman H.E.**, Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*, vol. 22, p. 123 – 131, 2004.
- Birks J.**, CholinesteraseinhibitorsforAlzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2006.
- Braak E., Braak H., Mandelkow E.M.**, A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathologica*, 1994, vol. 87, p. 554–567.
- Braak H., Del Tredici K.**, Alzheimer's disease: Pathogenesis and prevention. *Alzheimer's & Dementia*, 2012, vol. 8, p. 227-233.
- Braak H., Thal D.R., Ghebremedhin E., Del Tredici K.**, Stages of the pathological process in Alzheimer' disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2011, vol. 70, p. 960-969.
- Bremner J.D., Narayan M., Anderson E.R., Staib L.H., Miller H.L., Charney D.S.**, Hippocampal volume reduction in major depression. *The American Journal of Psychiatry*, 2000, vol. 157, p. 115-118.
- Chattopadhyaya B., Di Cristo G., Wu C.Z., Knott G., Kuhlman S., Fu Y., Palmiter R.D., Huang Z. J.**, GAD67-mediated GABA Synthesis and Signaling Regulate Inhibitory Synaptic Innervation in the Visual Cortex. *Neuron*, 2007, vol. 54, p. 889–903.
- Cibuļskis D.**, *GABAA agonista muscimola ietekme uz žurku atmiņu Alcheimera slimības tipa modeli: Bakalaura darbs*. Rīga: LU MF FBSP, 2015. 28. lpp.

Clerx L., Rossum I.A., Burns L., Knol D. L., Scheltens P., Verhey F., Aalten P., Lapuerta P., Pol L., Schijndel R., Jong R., Barkhof F., Wolz R., Rueckert D., Bocchetta M., Tsolaki M., Nobili F., Wahlund L.O., Minthon L., Frölich L., Hampel H., Soininen H., Visser P.J., Measurements of medial temporal lobe atrophy for prediction of Alzheimer's
Conn P.J. and Pin J.P., Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1997, vol. 37, p. 205-237.

Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993, vol. 261, p. 921-923.

Correia S.C., Santos R.X., Casadesus G., LaManna J.C., Perry G., Smith M.A., Moreira P.I., Mitochondrial Abnormalities in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 2013, vol. 10.

Correia S.C., Santos R.X., Perry G., Zhu X., Moreira P.I., Smith M.A., Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic Alzheimer's disease? *Ageing Research Reviews*, 2011, vol. 10, p. 264-273.

Correia S.C., Santos R.X., Santos M.S., Casadesus G., LaManna J.C., Perry G., Smith M.A., Moreira P.I., Mitochondrial Abnormalities in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, vol. 10, p. 406 – 419, 2013.

Croll S.D., Lindsay R.M., Wiegand S.J., Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Research*, vol. 812, p. 200–208, 1998.
Current Opinion in Cell Biology, vol. 33, p. 111–118, 2015.

De la Monte S.M., Federoff H.J., Ng S.C., Grabczyk E., Fishman M.C., GAP-43 gene expression during development: persistence in a distinctive set of neurons in the mature central nervous system. *Developmental Brain Research*, 1989, vol. 46, p. 161–168.

DeFeudis F.V., Physiological and behavioral studies with muscimol. *Neurochemistry Research*, vol. 5, p. 1047–1068, 1980.

Deng W., Aimone J.B., Gage F.H., New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 2010, vol. 11, p. 339–350.

disease in subjects with mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 2013, vol. 34, p. 2003-2013.

Eichenbaum H., Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 2004, vol. 44, p. 109–120.

Engstrom E.J., Researching Dementia in Imperial Germany: Alois Alzheimer and the Economies of Psychiatric Practice. *Culture, Medicine and Psychiatry*, vol. 31, p. 405 – 413, 2007.

Erlander M.G., Tillakaratne N.J., Feldblum S., Patel N., Tobin A.J., Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, 1991, vol. 7, p. 91–100.

Featherstone D.E., Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. *ACS Chemical Neuroscience*, 2010, vol. 1, p. 4–12.

Fryer J.D., Simmons K., Parsadarian M., Bales K.R., Paul S.M., Sullivan P.M., Holtzman D.M., Human apolipoprotein E4 alters the amyloid-beta 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *Journal of Neuroscience*, 2005, vol. 25, p. 2803-2810.

Gao C., Liu Y., Jiang Y., Ding J., Li L., Geniposide Ameliorates Learning Memory Deficits, Reduces Tau Phosphorylation and Decreases Apoptosis via GSK3 β Pathway in Streptozotocin-Induced Alzheimer Rat Model. *Brain Pathology*, vol. 24, p. 261 – 269, 2013.

Gao J.P., Sun S., Li W.W., Chen Y.P., Cai D.F., Triptolide protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats: implication for immunosuppressive therapy in Parkinson's disease. *Neurosci Bull*, vol. 24, p. 133–142, 2008.

Garrido G.E., Furuie S.S., Buchpiguel C.A., Bottino C.M., Almeida O.P., Cid C.G., Camargo C.H., Castro C.C., Glabus M.F., Busatto G.F., Relation between medial temporal atrophy and functional brain activity during memory processing in Alzheimer's disease: a combined MRI and SPECT study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2002, vol. 73, p. 508-516.

Garzon D.J., Fahnstock M., Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience*, vol. 27, p. 2628–2635, 2007.

Ge S., Goh E.L., Sailor K.A., Kitabatake Y., Ming G.L., Song H., GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 2006, vol. 439, p. 589–593.

Ge S., Sailor K.A., Ming G.L., Song H., Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *The Journal of Physiology*, 2008, vol. 586, p. 3759-3765.

Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., Mant R., Newton P., Rooke K., Roques P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A., Williamson R., Rossor M., Owen M., Hardy J.,

Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1991, vol. 349, p. 704-706.

Grande I., Fries G.R., Kunz M., Kapczinski F., The Role of BDNF as a Mediator of Neuroplasticity in Bipolar Disorder. *Psychiatry Investigation*, vol. 7, p. 243–250, 2010.

Group D., Bohancek I., Milicevic T., Pochet R., Mitrecic D., Kriz J., Gajovic S., Increased expression and colocalization of GAP43 and CASP3 after bramin ischemic lesion in mouse. *Neuroscience Letters*, vol. 597, p. 176–182, 2015.

Grunblatt E., Salkovic-Petrisic M., Osmanovic J., Riederer P., Hoyer S., Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of Neurochemistry*, 2007, vol. 101, p. 757-70.

Haakon B., Nygaard M.D., Current and Emerging Therapies for Alzheimer's Disease. *Clinical Therapeutics*, vol. 35, p. 1480. – 1490, 2013

He Q., Dent E.W., Meiri K.F., Modulation of actin filament behavior by GAP-43 neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *Journal of Neuroscience*, vol. 17, p. 3515–3524, 1997.

Hebert L.E., Weuve J., Scherr P.A., Evans D.A., Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 Census. *Neurology*, vol. 80, p. 1778–1783, 2013.

Hyman B.T., Trojanowski J.Q., Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, vol. 56, p. 1095–1097, 1997.

in brain growth protein in postmortem hippocampus of Alzheimer's patients. *Neuroscience*, vol. 126, p. 579–584, 2004.

Jack C.R. and Holtzman D.M., Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron*, 2013, vol. 80, p. 1347-58.

Jambaqué I., Dellatolas G., Fohlen M., Bulteau C., Watier L., Dorfmueller G., Chiron C., Delalande O., Memory functions following surgery for temporal lobe epilepsy in children. *Neuropsychologia*, 2007, vol. 45, p. 2850–2862.

Johnson V.E., Stewart W., Smith D.H., Traumatic brain injury and amyloidbeta pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nature Reviews Neuroscience*, 2010, vol. 11, p. 361-370.

Joo E.Y., Kim H., Suh S., Hong S.B., Hippocampal substructural vulnerability to sleep disturbance and cognitive impairment in patients with chronic primary insomnia: magnetic resonance imaging morphometry. *Sleep*, 2014, vol. 37, p. 1189-1198.

Journal of Alzheimer's Disease, 2012, vol. 31, p. 635-649.

Kadish I., Van Groen T., Differences in lesion-induced hippocampal plasticity between mice and rats. *Neuroscience*, vol. 116, p. 499–509, 2003.

Kandimalla R., Reddy P.H., Multiple faces of dynamin-related protein 1 and its role in Alzheimer's disease pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1862, p. 814–828, 2016.

Kim S.H., Fraser P.E., Westaway D., St George-Hyslop P.H., Ehrlich M.E., Gandy S., Group II metabotropic glutamate receptor stimulation triggers production and release of Alzheimer's amyloid(β)42 from isolated intact nerve terminals. *Journal of Neuroscience*, 2010, vol. 30, p. 3870-3875.

Klein C., Rasińska J., Empl L., Sparenberg M., Poshtiban A., Hain E.G., Iggena D., Rivalan M., Winter Y., Steiner B., Physical exercise counteracts MPTP-induced changes in neural precursor cell proliferation in the hippocampus and restores spatial learning but not memory performance in the water maze. *Behavioural Brain Research*, vol. 307, p. 227–238, 2016.

Klein C., Rasińska J., Empl L., Sparenberg M., Poshtiban A., Hain E.G., Iggena D., Rivalan M., Winter Y., Steiner B., Exercise prevents high-fat diet-induced impairment of flexible memory expression in the water maze and modulates adult hippocampal neurogenesis in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 131, p. 26–35, 2016.

Kohler S., Black S.E., Sinden M., Szekely C., Kidron D., Parker J.L., Foster J.K., Moscovitch M., Winocour G., Szalai, J.P., Bronskill M.J., Winocour G., Memory impairments associated with hippocampal versus parahippocampal – gyrus atrophy: an MR volumetry study in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*, 1998, vol. 36, p. 901-914.

Korpershoek E., Verwest A.M., Ijzendoorn Y., Rottier R., Drexhage H.A., Krijger R.R., Expression of GAD67 and novel GAD67 splice variants during human fetal pancreas development: GAD67 expression in fetal pancreas. *Endocrine pathology*, 2007, vol. 18, p. 31 – 36.

Kowara R., Me´nard M., Brown L., Chakravarthy B., Co-localization and interaction of DPYSL3 and GAP43 in primary cortical neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 363, p. 190–193, 2007.

Kreuter J., Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 71, p. 2 – 14, 2014.

Krogsgaard-Larsen P., Frolund B., Jorgensen F. S., Schousboe A., GABA A receptor agonists, partial agonists, and agonists. Design and therapeutic prospects. *Journal of Medical Chemistry*, vol. 37, p. 2489–2508, 1994.

Lancot K.L., Herrmann N., Mazzotta P., Khan L.R., Ingber N., GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia. *Canadian Journal of Psychiatry*, 2004, vol. 49, p. 439-453.

Lannert H., Hoyer S., Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behavioral Neuroscience*, vol. 112, p. 1199–1208, 1998.

Lawrence A.D., Sahakian B.J., Robbins T.W., Cognitive functions and corticostriatal circuits: insights from Huntington's disease. *Trends in Cognitive Sciences*, vol. 2, p. 379–388, 1998.

Lawrence J.J., Cholinergic control of GABA release: emerging parallels between neocortex and hippocampus. *Trends in Neuroscience*, 2008, vol. 31, p. 317-327.

Lee B.Y., Ban J.Y., Seong Y.H., Chronic stimulation of GABAA receptor with muscimol reduces amyloid b protein (25–35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical cells. *Neuroscience Research*, vol. 52, p. 347–356, p. 2005.

Lee S.T., Chu K., Jung K.H., Kim J.H., Huh J.Y., Yoon H., Park D.K., Lim J.Y., Kim J.M., Jeon D., Ryu H., Lee S.K., Kim M., Roh J.K., miR-206 regulates brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer disease model. *Annals of Neurology*, vol. 72, p. 269–277, 2012.

Lima Y.Y., Villemagne V.L., Lawse S. M., Amesh D., Pietrzak R.H., Ellisa K.A., Harrington K.D., Bourgeat P., Salvado O., Darby D., Snyderl P.J., Busha A.I., Martinse R.N., Masters C.L., Rowec C.C., Nathanm P.J., Maruffa P., BDNF Val66Met, A β amyloid, and cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, vol. 34, p. 2457–2464, 2013.

LoTurco J.J., Owens D.F., Heath M.J., Davis M.B., Kriegstein A.R., GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, 1995, vol. 15, p. 1287–1298.

Lue L.F., Walker D.G., Brachova L., Beach T.G., Rogers J., Schmidt A.M., Stern D.M., Lyden P.D., Lonzo L., Combination therapy protects ischemic brain in rats. A glutamate antagonist plus a gamma-aminobutyric acid agonist. *Stroke*, vol. 25, p. 189-196, 1994.

Mackenzie I.R. and Miller L.A., Senile plaques in temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathologica*, 1994, vol. 87, p. 504-510.

Matsumoto M., Kano M., Togashi H., Ueno K., Otani H., Mano Y., Yoshioka M., Involvement of GABAA receptors in the regulation of the prefrontal cortex on dopamine

release in the rat dorsolateral striatum. *European Journal of Pharmacology*, vol. 482, p. 177–184, 2003.

Mc Shane R., Areosa S.A., Minakaran N., Memantine for dementia, 2006. [tiešsaiste] – 31.03.2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625572>

Meiri K.F., Gordon-Weeks P.R., GAP-43 in growth cones is associated with areas of membrane that are tightly bound to substrate and is a component of a membrane skeleton subcellular fraction. *Journal of Neuroscience*, vol. 10, p. 256–266, 1999.

Michelot D., Melendez-Howell L.M., *Mycological Research*, vol. 107, p. 131 – 146, 2003.

Mielke M.M., Okonkwo O.C., Oishi K., Mori S., Tighe S., Miller M. I., Ceritoglu C., Brown T., Albert M., Lyketsos C.G., Fornix integrity and hippocampal volume predict memory decline and progression to Alzheimer's disease. *Alzheimers Dementary*, 2012, vol. 8, p. 105-113.

Mufson E.J., Binder L., Counts S.E., DeKosky S.T., de Toledo-Morrell L., Ginsberg S.D., Ikonomic M.D., Perez S.E., Scheff S.W., Mild cognitive impairment: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathologica*, 2012, vol. 123, p. 13-30.

Murphy M.C., Jones D.T., Jack C.R., Glaser K.J., Senjem M.L., Manduca A., Felmlee J.P., Carter R.E., Ehman R.L., Huston J., Regional brain stiffness changes across the Alzheimer's disease spectrum. *NeuroImage: Clinical*, 2016, vol. 10, p. 283-290.

Nakagawa Y., Ishibashi Y., Yoshii T., Tagashira E., Muscimol induces state-dependent learning in Morris water maze task in rats. *Brain Research*, vol. 681, p. 126–130, 1995.

Nielander H.B., De Groen P.C., Eggen B.J., Schrama L.H., Gispen W.H., Schotman P., Nomura T., Oyamada Y., Fernandes H.B., Remmers C.L., Xu J., Meltzer H.Y., Contractor A., Subchronic phencyclidine treatment in adult mice increases GABAergic transmission and LTP threshold in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 2016, vol. 100, p. 90–97.

Novati A., Hulshof H.J., Koolhaas J.M., Lucassen P.J., Meerlo P., Chronic sleep restriction causes a decrease in hippocampal volume in adolescent rats, which is not explained by changes in glucocorticoid levels or neurogenesis. *Neuroscience*, 2011, vol. 190, p. 145-155.

Owens D.F., Kriegstein A.R., Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, vol. 3, p. 715–727.

Parent M.A., Hottman D.A., Cheng S., Zhang W., McMahon L.L., Yuan L.L., Simvastatin treatment enhances NMDAR-mediated synaptic transmission by upregulating the

surface distribution of the GluN2B subunit. *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 34, p. 693–705, 2014.

Paula-Lima A.C., De Felice F.G., Brito-Moreira J., Ferreira S., Activation of GABAA receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of β -amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology*, vol. 49, p. 1140-1148, 2005.

Petersen R.C., Jack Jr. C.R., Xu Y.C., Waring S.C., O'Brien P.C., Smith R.J., Ivnik R.J., Tangalos E.G., Boeve B.F., Kokmen E., Memory and MRI-based hippocampal volumes in aging and AD. *Neurology*, 2000, vol. 54, p. 581-587.

Pisa D., Alonso R., Rábano A., Rodal I., Carrasco L., Different Brain Regions are Infected with Fungi in Alzheimer's Disease. *Scientific Reports* 5, 2015, article number: 15015.

Poduslo J.F, Curran G.L., Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Molecular Brain Research Journal*, vol. 36, p. 280 – 286, 1996.

Pohanka M., Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Is a Target in Pharmacology and Toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, p. 2219-2238, 2012.

Refolo L.M., Malester B., LaFrancois J., Bryant-Thomas T., Wang R., Tint G.S., Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease*, vol. 7, p. 321–331, 2000.

Rekart J.L., Quinn B., Mesulam N.M., Routtenberg A., Subfield-specific increase

Represa A., Ben-Ari Y., Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends in Neuroscience*, vol. 28, p. 278–283, 2005.

Rhinn H., Fujita R., Qiang L., Cheng R., Lee J.H., Abeliovich A., Integrative genomics identifies APOE epsilon4 effectors in Alzheimer's disease. *Nature*, 2013, vol. 500, p. 45-50.

Roh J.H., Huang Y., Bero A.W., Kasten T., Stewart F.R., Bateman R.J., Holtzman D.M., Disruption of the sleep-wake cycle and diurnal fluctuation of β -amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology. *Science Translational Medicine*, 2012, vol. 4, p. 122-150.

Rosslenbroich V., Dai L., Franken S., Gehrke M., Junghans U., Gieselmann V., Kapler J., Subcellular localization of collapsin response mediator proteins to lipid rafts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 305, p. 392–399, 2003.

Roy M., Reddy P.H., Iijima M., Sesaki H., Mitochondrial division and fusion in metabolism
Salkovic-Petrisic M., Hoyer S., Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *Journal of Neural Transmission. Supplementa*, 2007, . 217-33.

Saxena G., S. Bharti, Kamat P.K., Sharma S., Nath C., Melatonin alleviates memory deficits and neuronal degeneration induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 94, p. 397–403, 2010.

Schmitt U., Tanimoto N., Seeliger M., Schaeffel F., Leube R.E., Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience*, vol. 162 p. 234–243, 2009.

Segal M., Dendritic spines and long-term plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 6, p. 277-284, 2005.

Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., Tsuda T., Mar L., Foncin J.F., Bruni A.C., Montesi M.P., Sorbi S., Rainero I., Pinessi L., Nee L., Chumakov I., Pollen D., Brookes A., Sanseau P., Polinsky R.J., Wasco W., Da Silva H.A., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Tanzi R.E., Roses A.D., Fraser P.E., Rommens J.M., St George-Hyslop P.H., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1995, vol. 375, p. 754-760.

Shirakawa K. and Ichitani Y., Prolonged initiation latency in Morris water maze learning in rats with ibotenic acid lesions to medial striatum: effects of systemic and intranigral muscimol administration. *Brain Research*, vol. 1030, p. 193–200, 2004.

Shoham S., Bejar C., Kovalev E., Weinstock M., Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Experimental Neurology*, vol. 184, p. 1043–1052, 2003.

Small G.W., Ercoli L.M., Silverman D.H., Huang S.C., Komo S., Bookheimer S.Y., Lavretsky H., Miller K., Siddarth P., Rasgon N.L., Mazziotta J.C., Saxena S., Wu H.M., Mega M.S., Cummings J.L., Saunders A.M., Pericak-Vance M.A., Roses A.D., Barrio J.R., Phelps M.E., Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, vol. 97, p. 6037-6042.

Sotthibundhu A., Sykes A.M., Fox B., Underwood C.K., Thangnipon W., Coulson E.J., β -Amyloid 1–42 Induces Neuronal Death through the p75 Neurotrophin Receptor. *The Journal of Neuroscience*, vol. 28, p. 3941–3946, 2008.

Sparks D.L., Kuo Y.M., Roher A., Martin T., Lukas R.J., Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 903, p. 335–344, 2000.

Squire L.R., Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2004, vol. 82, p. 171–177.

- Squire L.R., Zola-Morgan S.**, The medial temporal lobe memory system. *Science*, 1991, vol. 253, p. 1380–1386.
- Structure of the human gene for the neural phosphoprotein B-50 (GAP-43). *Brain Research. Molecular Brain Research*, 1993, vol. 19, p. 293-302.
- Sun X., Meng, X., Zhang J., Li Y., Wang L., Qin X., Sui N., Zhang Y.**, GABA attenuates amyloid toxicity by downregulating its endocytosis and improves cognitive impairment
- Taki Y., Hashizume H., Thyreau B., Sassa Y., Takeuchi H., Wu K., Kotozaki Y., Nouchi R., Asano M., Asano K., Fukuda H., Kawashima R.**, Sleep duration during weekdays affects hippocampal gray matter volume in healthy children. *NeuroImage*, 2012, vol. 60, p. 471-475.
- Tozuka Y., Fukuda S., Namba T., Seki T., Hisatsune T.**, GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 2005, vol. 47, p. 803-815.
- Wallace T.L., Ballard T.M., Pouzet B., Riedel W.J., Wettstein J.G.**, Drug targets for cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2011, vol. 99, p. 130-145.
- Wollen K.A.**, Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Alternative medicine review*, 2010, vol. 15, p. 223-244.
- Yan S.D.**, Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Experimental Neurology*, 2001, vol. 171, p. 29-45.
- Ye X., Tai W., Zhang D.**, The early events of Alzheimer's disease pathology: from mitochondrial dysfunction to BDNF axonal transport deficits. *Neurobiology of Aging*, vol. 33, p. 1122.e1–1122.e10, 2012.
- Zhang Y, Chi X.X., Nicol G.D.**, BDNF enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of the p75 neurotrophin receptor and the sphingomyelin pathway. *Journal of Physiology*, vol. 586, p. 3113–3127, 2008.
- Zhang Z., Zhang H., Du B., Chen Z.**, Neonatal handling and environmental enrichment increase the expression of GAP-43 in the hippocampus and promote cognitive abilities in prenatally stressed rat offspring. *Neuroscience Letters*, vol. 522, p. 1 – 5, 2015.
- Zhao C., Deng W., Gage F.H.**, Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 2008, vol. 132, p. 645–660.

Zito K., Scheuss V., NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. In *Encyclopedia of Neuroscience*, Germany: Springer, p. 1157–1164, 2009.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistradarbs _____

_____ izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

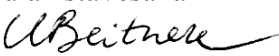
Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____

(vārds, uzvārds)

(paraksts)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: _docente Ulrika Beitnere_  _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Recenzents: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2016., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)