



RĪGAS STRADIŅA  
UNIVERSITĀTE

Sandra Skuja

Alkohola un narkotisko vielu  
izraisītu CNS izmaiņu  
morfoloģiskā izpēte

Promocijas darbs  
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – morfoloģija

Darba zinātniskā vadītāja:

*Dr. habil. med.* asociētā profesore **Valērija Groma**



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



EIROPAS SAVIENĪBA

Promocijas darbs veikts ar ESF projekta “Atbalsts doktorantiem  
studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei  
Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu

Rīga, 2014

## ANOTĀCIJA

Bojājumi, ko izraisa psihoaktīvu vielu lietošana, ir cēlonis centrālās nervu sistēmas (CNS) darbības traucējumiem. Alkohola un atkarību izraisošu vielu iedarbību saista ar oksidatīvo stresu un dažādiem smadzeņu bojājumiem. Matrices metaloproteināzes (MMP), kas iesaistās ekstracelulārās matricēs (ECM) komponentu šķelšanā, ir bieži analizētas smadzeņu patoloģiju pētījumos, tomēr nav pietiekoši izziņātas hroniska alkohola un narkotisko vielu lietošanas gadījumos. Jaunākie pētījumu rezultāti liecina par daudzfunkcionālo indukcijas faktoru iesaisti CNS izmaiņās atkarību izraisošu vielu lietošanas gadījumos.

Šis pētījums ir veikts, lai izskaidrotu iespējamo šūnu jutību struktūras un ultrastruktūras līmenī dažādos smadzeņu rajonos hroniska alkohola un narkotisko vielu lietošanas gadījumos. Pētījumā izmantots smadzeņu audu autopsijas materiāls no *cortex cerebri*, *corpus striatum* un *substantia nigra* rajoniem, kā arī aknu audu autopsijas materiāls no 46 hroniskiem alkohola un 10 narkotisko vielu lietotājiem.

Promocijas darbā iegūts novērtējums un noteikta rezultātu statistiskā ticamība neironu un glijas šūnu iesaistei smadzeņu ārpusšūnu matricēs degradējošu enzīmu sintēzē, kas veikts, pierādot paaugstinātu MMP9 ekspresijas līmeni CNS visos izpētes rajonos gan hronisko alkohola, gan narkotisko vielu lietotāju grupās. Pētījumā atrasts apstiprinājums smadzeņu bojājumu korelācijām, nosakot oksidatīvā stresa marķiera superoksīda dismutāzes (SOD1) un MMP9 ekspresijas vērtības nigrālā ( $r=0,532$ ,  $p<0,001$ ), striatālā ( $r=0,327$ ,  $p<0,001$ ) un garozas rajona neironos ( $r=0,306$ ,  $p<0,001$ ). MMP9 nozīme šajās izmaiņās analizēta un salīdzināta ar ultrastrukturālām izmaiņām. Noteikts, ka toksisku vielu izraisīts oksidatīvais stress ietekmē šūnu oksidatīvās aizsardzības mehānismus, izraisot reaktīvi adaptīvas izmaiņas dažādu smadzeņu rajonu šūnu un aknu šūnu struktūrelementos, kas īpaši skar citoskeletu, mitohondrijus un iekššūnu membrānas. Šajā pētījumā ar imūnhistoķīmijas metodi noteikta heterogēna indukcijas faktoru ekspresija *cortex cerebri* un *substantia nigra* smadzeņu rajonos, iegūtie rezultāti izvērtēti līdztekus elektronmikroskopiskajiem novērojumiem. Izteiktāka neironu un glijas šūnu TUNEL reakcijas pozitivitāte konstatēta *corpus striatum* rajona pelēkajā vielā, bet glijas šūnu – zemgarozas baltās vielas rajonos.

Ultrastrukturāli nervu šūnu ķermeņi neuzrāda neatgriezeniskas izmaiņas atšķirībā no to dendrītiskā zarojuma un glijas šūnām. Pētījuma rezultāti norāda, ka šāda atšķirīga uzvedība saistāma ar selektīvu atbildes reakciju uz alkohola un narkotisko

vielu ierosinātām izmaiņām CNS. Līdzīga selektīva atbildes reakcija konstatēta, novērojot SOD1 imūnreaktivitātes samazināšanos *substantia nigra* baltās vielas rajonos, kas korelē ar elektronmikroskopiski atklātajām mielīna apvalka izmaiņām.

Detektējot smadzenēs augstas koncentrācijas elementu sastāvu un nosakot "pamata" ķīmisko elementu – oglekļa (C) un skābekļa (O) pīķus, var pielietot enerģiju dispersās rentgenmikroanalīzes (EDX) metodi. Ar šo metodi iespējams noteikt arī mazākās koncentrācijās esošos fosforu (P), sēru (S) un kalciju (Ca), kā arī analizēt Ca koncentrācijas izmaiņas atšķirīgās smadzeņu struktūrās.

Promocijas darbs veikts ar ESF projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu (Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009).

## SUMMARY

Psychoactive substances-induced damage causes dysfunction of selected brain regions. Alcohol and addictive substances and their associated oxidative stress are widespread contributors to the brain damage. Matrix metalloproteinases (MMP), involved in the cleavage of extracellular matrix (ECM) proteins, are extensively analyzed in brain pathology studies. However, MMPs have not been sufficiently investigated in cases of chronic alcohol and drug consumption. Results, demonstrated recently, showed involvement of multifunctional inductive factors in CNS changes caused by alcohol and drug addiction.

This study attempted to elucidate a preferential cellular vulnerability in different brain regions of chronic alcoholics and drug users, structurally and ultrastructurally. Brain tissue autopsy material obtained from the *cortex cerebri*, *corpus striatum* and *substantia nigra* as well as the liver tissue of 46 alcoholic subjects and 10 drug users was studied.

A role of MMP9 in the injury and remodeling of extracellular space of brain via mediating cleavage of ECM components was specified in this study. Alcoholics and drug users revealed statistically significant elevation of neuronal MMP9 expression in all brain regions studied. Further evidence on the putative correlation between the brain damage in alcoholics and drug users, up-regulation of oxidative stress marker superoxide dismutase-1 (SOD1) and MMP9 expression were obtained. We found correlation between neuronal expression patterns of SOD1 and MMP9 in nigral ( $r=0.532$ ,  $p<0.001$ ), striatal ( $r=0.327$ ,  $p<0.001$ ), and cortical ( $r=0.306$ ,  $p<0.001$ ) regions. Contribution of MMP9 to these alterations was evidenced in alcoholics and drug users and correlated with ultrastructural changes. We demonstrated that oxidative stress caused by alcohol is one of the most important contributors to the changes of endogenous antioxidant system and protective reactivity of neural and hepatic constituents reflected by cytoskeleton, mitochondria, and intracellular membranes changes. In this study, immunohistochemically assessed heterogeneous expression of inductive factors was determined in the *cortex cerebri* and *substantia nigra* regions and correlated with results obtained by electron microscopy examination. Neuronal cells and glial cells of the gray matter demonstrated the strongest TUNEL reaction positivity in the *corpus striatum*.

We found that neuronal somata do not display irreversible changes, evident in dendritic tree and glial cells. We suggest that these behavior differences are related to the selective response to alcohol and drug addiction-induced injury in the central nervous system. This selective reaction was proven by a decrease of SOD1 immunoreactivity in the white matter of the *substantia nigra* was accompanied by severe damage of myelin structure revealed electron microscopically.

Energy dispersive spectroscopy can be used for carbon and oxygen peak identification in brain samples. Elements such as phosphorus, sulfur and calcium presented in lower concentrations, can be captured in brain samples as well. Moreover, changes of calcium concentrations related to different brain structures can be assessed by energy dispersive spectroscopy.

The study was elaborated with a support of ESF project “Support for doctoral and post-doctoral investigations Riga Stradins University” (Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009).

## SATURS

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI.....                                                         | 9  |
| 1. IEVADS.....                                                                          | 10 |
| 1.1. Darba aktualitāte.....                                                             | 10 |
| 1.2. Darba mērķis.....                                                                  | 12 |
| 1.3. Darba hipotēzes .....                                                              | 13 |
| 1.4. Darba uzdevumi.....                                                                | 13 |
| 1.5. Darba novitāte.....                                                                | 14 |
| 1.6. Sadarbības partneri .....                                                          | 14 |
| 1.7. Materiāli tehniskais nodrošinājums .....                                           | 15 |
| 1.8. Ētiskie aspekti.....                                                               | 15 |
| 2. LITERATŪRAS APSKATS .....                                                            | 16 |
| 2.1. Smadzeņu garozas un zemgarozas rajonu morfofunkcionāls raksturojums                | 16 |
| 2.1.1. Smadzeņu garozas morfofunkcionāls raksturojums .....                             | 16 |
| 2.1.2. Zemgarozas rajonu morfofunkcionāls raksturojums .....                            | 17 |
| 2.1.3. Laterālo ventrikulu sienīgas morfofunkcionāls raksturojums .....                 | 21 |
| 2.2. Smadzeņu garozas un zemgarozas šūnu ultrastrukturāls raksturojums.....             | 22 |
| 2.3. Asins-smadzeņu barjeras strukturāls un ultrastrukturāls raksturojums .....         | 28 |
| 2.4. Alkohola un narkotisko vielu ietekmes izpēte CNS.....                              | 30 |
| 2.5. Neironu un glijas šūnu imūnhistoķīmiskie marķieri.....                             | 33 |
| 2.5.1. NSE neironu citosola marķieris .....                                             | 33 |
| 2.5.2. GFAP – astrocītu marķieris un tā nozīme .....                                    | 33 |
| 2.5.3. Dzelzs metabolisma marķieris un tā loma .....                                    | 34 |
| 2.5.4. CD68 – mikroglijas aktivācijas marķieris.....                                    | 34 |
| 2.6. Augšanas faktoru un receptoru nozīme CNS.....                                      | 35 |
| 2.6.1. TGF-β1 un tā nozīme .....                                                        | 35 |
| 2.6.2. NGFR un tā loma CNS notiekošajos procesos .....                                  | 37 |
| 2.7. Cu/Zn superoksīda dismutāze un antioksidatīvā aizsardzība smadzenēs ....           | 37 |
| 2.8. Matrices metaloproteināzes un to nozīme CNS patoloģiju patoģenēzē .....            | 39 |
| 2.9. Apoptoze un tās raksturojums hroniska alkoholisma gadījumos .....                  | 43 |
| 2.10. Aknu morfofunkcionāls raksturojums un nozīme detoksikācijas procesā ..            | 44 |
| 2.11. Jonu homeostāze, mikroanalīze un tās iespējas CNS struktūrelementu<br>izpētē..... | 45 |

|                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. MATERIĀLI UN METODES .....                                                | 47  |
| 3.1. Izpētes materiāls un tā iedalījums grupās .....                         | 47  |
| 3.2. Materiāla apstrāde analīzei gaismas mikroskopā .....                    | 49  |
| 3.2.1. Rutīnās krāsošanas metode .....                                       | 51  |
| 3.2.2. Imūnhistoķīmijas metode.....                                          | 52  |
| 3.2.3. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu statistiskā analīze .....         | 55  |
| 3.3. Materiāla apstrāde analīzei caurstarojošā elektronu mikroskopā .....    | 56  |
| 3.3.1. Audu fiksācija un ieguldīšana epoksīda sveķos.....                    | 56  |
| 3.3.2. Pusplāno audu griezumu gatavošana .....                               | 56  |
| 3.3.3. Ultraplāno audu griezumu gatavošana.....                              | 57  |
| 3.4. Materiāla apstrāde analīzei skenējošā elektronu mikroskopā un EDX ..... | 58  |
| 3.4.1. Materiāla sagatavošana analīzei skenējošā elektronu mikroskopā.....   | 58  |
| 3.4.2. Rentgenmikroanalīzes metode .....                                     | 59  |
| 4. REZULTĀTI .....                                                           | 60  |
| 4.1. Gaismas mikroskopijas rezultāti.....                                    | 60  |
| 4.1.1. NSE imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti .....                         | 62  |
| 4.1.2. GFAP imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti.....                         | 63  |
| 4.1.3. Dzelzs histoķīmiskās noteikšanas rezultāti.....                       | 64  |
| 4.1.4. CD68 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti .....                        | 65  |
| 4.1.5. TGF-β1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti .....                      | 66  |
| 4.1.6. NGFR imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti .....                        | 73  |
| 4.1.7. SOD1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti .....                        | 76  |
| 4.1.8. MMP9 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti.....                         | 87  |
| 4.1.9. TUNEL reakcija.....                                                   | 99  |
| 4.1.10. Aknu audu SOD1 un TGF-β1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti .....   | 101 |
| 4.2. Caurstarojošās elektronmikroskopijas rezultāti.....                     | 102 |
| 4.2.1. Neironu perikarionu ultrastruktūra .....                              | 102 |
| 4.2.2. Neironu izaugumu ultrastrukturālā izpēte.....                         | 106 |
| 4.2.3. Astrocītu ultrastruktūra .....                                        | 108 |
| 4.2.4. Oligodendrocītu ultrastruktūra.....                                   | 109 |
| 4.2.5. Mielīna slāņa ultrastrukturālā izpēte.....                            | 109 |
| 4.2.6. Mikroglijas ultrastruktūra .....                                      | 111 |
| 4.2.7. Asins-smadzeņu barjeras ultrastruktūra.....                           | 111 |
| 4.3. Skenējošās elektronmikroskopijas rezultāti.....                         | 114 |

|                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|-----|
| 4.4. Rentgenmikroanalīzes rezultāti .....                | 115 |
| 5. DISKUSIJA .....                                       | 121 |
| 6. SECINĀJUMI.....                                       | 136 |
| 7. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU .....      | 138 |
| 7.1. Publikācijas starptautiski citējamās žurnālos ..... | 138 |
| 7.2. Tēzes starptautiski citējamās žurnālos .....        | 138 |
| 7.3. Kongresu un konferenču tēzes.....                   | 138 |
| 8. LITERATŪRAS SARAKSTS.....                             | 141 |
| 9. PIELIKUMS .....                                       | 159 |

## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

CNS – centrālā nervu sistēma

GABA – (angl. gamma-aminobutyric acid) –  $\gamma$ -aminosviestskābe

DA – (angl. dopamine) – dopamīns

CC – *lat. cortex cerebri* – smadzeņu garoza

BG – bazālie gangliji

CS – *lat. corpus striatum*

SN – *lat. substantia nigra*

VL – *lat. ventriculi laterales* – laterālie ventrikuli

ROS – (angl. reactive oxygen species) – reaktīvā skābekļa grupas

NCŠ – neirālās cilmes šūnas

BBB – (angl. blood-brain barrier) – asins-smadzeņu barjera

ECM – (angl. extracellular matrix) – ekstracelulārā matrice

NSE – (angl. neuron specific enolase) – neironu specifiskā enolāze

GFAP – (angl. glial fibrillary acidic protein) – glijas fibrilārā skābā olbaltumviela

TGF- $\beta$  – (angl. transforming growth factor  $\beta$ ) – transformējošais augšanas faktors beta

NGF – (angl. nerve growth factor) – nervu augšanas faktors

NGFR (p75NTR) – (angl. nerve growth factor receptor) – nervu augšanas faktora receptors

MMP – (angl. matrix metalloproteinase) – matricas metaloproteināze

TIMP – (angl. tissue inhibitor of metalloproteinase) – matricas metaloproteināzes inhibitors

Cu/Zn SOD – (angl. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1)) – vara/cinka superoksīda dismutāze

TUNEL – (angl. TdT-mediated dUTP nick-end labeling jeb terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling) – terminālās dezoksinukleotidiltransferāzes vadīta dezoksiuridintrifosfāta ierobes gala iezīmēšana

EDX – (angl. energy dispersive X-ray microanalysis) – enerģiju dispersā rentgenmikroanalīze

# 1. IEVADS

## 1.1. Darba aktualitāte

Atkarību izraisošu psihoaktīvu vielu lietošana saistīta ar centrālās nervu sistēmas (CNS) darbības traucējumiem, radot izmaiņas un bieži vien neatgriezeniski bojājot tās uzbūves elementus. Hroniska alkohola lietošana ik gadu izraisa 2,3 miljonus priekšlaicīgu miršanas gadījumu pasaulē (Pasaules Veselības organizācija (WHO), 2009), ieskaitot 3,5% nāves cēloņu ASV (Mokdad *et al.*, 2004). Eiropas reģionā proporcija ir augstāka, izraisot jau 1:10 nāves gadījumu gadā saistībā ar hronisku alkohola lietošanu (Rehm *et al.*, 2009). Atkarības izraisītās nervu saslimšanas, ieskaitot alkohola lietošanas gadījumus, ir plaši aprakstītas (Moselhy *et al.*, 2001; Kosten and O'Connor, 2003; Harper and Matsumoto, 2005; Spanagel, 2009); hroniskas alkohola lietošanas rezultātā tiek traucētas vai izmainītas nervu un glijas šūnu pamata funkcijas (Miguel-Hidalgo *et al.*, 2002; Ikegami *et al.*, 2003). Tomēr joprojām trūkst pilnīgas izpratnes par smadzeņu bojājumu norisēm, kas saistītas ar psihoaktīvu vielu lietošanu (Syapin, 2011; Tamrazi and Almast, 2012). Multidisciplinārajos pētījumos novērotie rezultāti rada pamatu pieņēmumam, ka būtu nepieciešami pētījumi par hronisku alkohola un narkotisko vielu lietotāju smadzeņu bojājumiem šūnu līmenī. Pētījumiem būtu jābūt saistītiem ar jēdzienu par selektīvo atbildes reakciju uz psihoaktīvu vielu radītām izmaiņām CNS.

Plašs neiroloģisko slimību spektrs tiek saistīts ar zemgarozas baltās vielas defektiem un mielīna slāņa bojājumiem, tajā skaitā alkohola izraisītām izmaiņām (Fields, 2008). Dažādu pētījumu dati sniedz atšķirīgu informāciju par hroniskas alkohola lietošanas izraisītām smadzeņu audu izmaiņām pelēkajā un baltajā vielā gan smadzeņu garozas, gan zemgarozas rajonos, kas variē no garozas pelēkās vielas samazinājuma un neironu zudumiem līdz nozīmīgam baltās vielas tilpuma samazinājumam (Kril *et al.*, 1997; Harper and Kril, 1989; Badsberg *et al.*, 1993; Fein *et al.*, 2002; Harper, 2009; Bühler and Mann, 2011; Kim *et al.*, 2014). Tajā pašā laikā ir pētījumi, kas parāda, ka smadzeņu funkciju bojājumi hroniskiem alkohola lietotājiem neizsauc garozas neironu bojāeju, taču izraisa: (1) izmaiņas dendrītos – ar izmainītu dendrītisko sazarosanos un iespējamu aksonu deģenerāciju (Harper and Corbett, 1990; Ullén, 2009; Rasakham *et al.*, 2014), vai (2) astroglijas noteiktās homeostāzes

pārmaiņas, ietekmējot sinaptisko plasticitāti (Aschner *et al.*, 2002; Benarroch, 2005; Volterra and Meldolesi, 2005).

Papildus neskaidrības, kas nav saistītas ar alkohola izraisītiem baltās vai pelēkās vielas bojājumiem, attiecināmas uz alkohola lietošanas gadījumos bojāto smadzeņu reģionu topogrāfijas noskaidrošanu. Neseni klīniskie un laboratoriskie pētījumi kombinācijā ar hronisku alkohola lietotāju smadzeņu MRI (magnētiskās rezonanses attēlošanas) analīzi parāda, ka izteikta ievainojamība ir raksturīga *corpus striatum* (CS) rajonam (Schneider *et al.*, 2001; Wise, 2004; Kalivas and Volkow, 2005; Schacht *et al.*, 2011). CS rajonam ir nozīmīga loma motorajā kontrolē un lēmumu pieņemšanā (Balleine *et al.*, 2007; Surmeier *et al.*, 2009), tas regulē tieksmi pēc apreibinošām vielām cilvēkiem, kas cieš no atkarības (Volkow *et al.*, 2009). *Substantia nigra* (SN) dopamīnerģiskie neironi iesaistīti kortiko-striatālās sinaptiskās plasticitātes regulācijā (Reynolds and Wickens, 2002; Kreitzer and Malenka, 2008), turklāt jaunākajos pētījumos novērotas morfoloģiskas izmaiņas šajā rajonā atkarību izraisošu vielu lietotājiem (Todd *et al.*, 2013).

Līdz ar ģenētiskiem, bioloģiskiem, ķīmiskiem faktoriem hroniska alkohola lietošana var izraisīt ar oksidatīvo stresu saistītas izmaiņas neironu endoplazmatiskajā tīklā (Kruman *et al.*, 2012; Ji, 2012). Antioksidantu aktivitāte smadzenēs ir zemāka, salīdzinot ar citiem audiem, un reaktīvā skābekļa grupu (ROS) pārmēru liela ekspresija var būtiski ietekmēt nervu šūnu bojāeju un nervu slimību attīstību (Mattson, 2000). Paaugstinātu superoksīda dismutāzes (SOD) aktivitāti saista ar šūnu aizsardzības mehānismu aktivāciju pret iespējamiem ROS radītiem bojājumiem (Uttara *et al.*, 2009). ROS pārmērīga ekspresija un paaugstināta metaloproteināžu (MMP), konkrētāk MMP9 aktivācija, novērota CS asins-smadzeņu barjeras (BBB) bojājumu gadījumos (Kim *et al.*, 2003). Turklāt oksidatīvā stresa ietekme var aktivēt MMP9, kas turpmāk var izraisīt neurodeģenerāciju (Wright and Harding, 2009). Daži no aizvien neatbildētajiem jautājumiem ir: 1) kādas īpatnības raksturo CNS bojājumus un to mehānismus psihoaktīvu vielu lietošanas gadījumos; 2) kāda, salīdzinājumā ar citiem bojājošiem faktoriem, ir psihoaktīvu vielu radītā oksidatīvā stresa relatīvā loma smadzeņu pelēkās un baltās vielas strukturālās izmaiņās, un, visbeidzot, 3) kāda ir MMP darbība psihoaktīvu vielu lietošanas gadījumā *in vivo* apstākļos – prefrontālajā garozā, CS un SN pelēkajā vielā, kā arī baltajā vielā, kas saistīta ar šiem rajoniem. Nozīmīga ir transformējošā augšanas faktora (TGF- $\beta$ ) loma neironu izdalīto neotropo faktoru

regulācijā (Krieglstein *et al.*, 2002); turklāt *in vitro* pētījumos apstiprināts, ka TGF- $\beta$  darbojas kā neironus aizsargājošs faktors (Roussa *et al.*, 2004).

Metālu jonu, tādu kā mangāns (Mn) un dzelzs (Fe), uzkrāšanās ir nozīmīgs patoģenētisks faktors, kas var būt dažādu neirodeģeneratīvu slimību cēlonis. Turklāt pētījumi apliecina, ka šo jonu koncentrāciju izmaiņas iespējams apstiprināt ar mērījumiem, kuros nosaka fosfora (P), kālija (K), kalcija (Ca) un hlora (Cl) jonu klātbūtni (Johansson and Strömberg, 2002; Dučić *et al.*, 2013). Tādiem BBB komponentiem kā kapilāru endotēlijam, bazālajai membrānai un astrocītiem ir īpaša nozīme smadzeņu homeostāzes nodrošināšanā. Ir zināms, ka astrocīti ekspresē dažādu neiromediatoru receptorus, to aktivācija saistīta ar iekšēju Ca izmaiņām (Haydon and Carmignoto, 2006; Winship *et al.*, 2007). Ir arī zināms, ka cinks (Zn) un varš (Cu) uzkrājas SN, stimulējot dopamīnērgisko neironu bojāeju šajā rajonā, attīstoties Parkinsona slimībai. Zināšanas par metālu izvietojumu un koncentrāciju audos ir ļoti nozīmīgas, jo metāli iesaistās dzīvo organismu bioloģiskajās funkcijās un savstarpējās kopsakarības ir sarežģītākas nekā līdz šim ticis pieņemts (Serpa *et al.*, 2008). Jonu kanālu aktivitāte un paaugstināta aksonu plazmatiskās membrānas caurlaidība, ko izraisa nātrija (Na) un Ca jonu līmeņa pieaugums aksonos, sekmē aksonu bojājumus, tostarp deģenerāciju (Medana and Esiri, 2003).

Pašlaik trūkst datu par hronisko alkohola un narkotisko vielu lietotāju smadzeņu strukturālo komponentu reaktīvi adaptīvo izmaiņu kvantitatīviem mērījumiem, kuru rezultāti būtu novērtēti, kompleksi izmantojot imūnhistoķīmiskās un elektronmikroskopiskās izpētes metodes. Izvēlētās tēmas nozīmīgumu raksturo nepieciešamība izprast gan smadzeņu struktūras, gan šūnu mijiedarbības izmaiņas atkarību izraisošu vielu iedarbības gadījumos.

## **1.2. Darba mērķis**

Smadzeņu audu raksturojums hroniskas alkohola iedarbības un narkotisko vielu lietošanas gadījumos struktūras un ultrastruktūras līmenī, kompleksi izmantojot gaismas mikroskopijas, imūnhistoķīmijas, elektronmikroskopijas un rentgenmikroanalīzes metodes.

### 1.3. Darba hipotēzes

1. CNS morfoloģiskās pārmaiņas ir saistāmas ar atkarību izraisošu psihoaktīvu vielu toksicitātes izraisītām izmaiņām nervaudos; alkohola un narkotisko vielu (opioīdu, benzodiazepīna, karbamazepīna, metkatinona) toksicitātes izraisītām izmaiņām ir līdzīgs raksturs.

2. Izvēlēto imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija ir atšķirīga, marķierus savstarpēji kombinējot, iegūstams nozīmīgs morfoloģisko izmaiņu vērtējums CNS psihoaktīvo vielu lietošanas gadījumā.

3. Alkohola un narkotisko vielu (opioīdu, benzodiazepīna, karbamazepīna, metkatinona) toksicitātes gadījumos var pielietot morfoloģisko izpēti metožu kompleksu ar integrētu iegūto rezultātu vērtējumu.

### 1.4. Darba uzdevumi

Mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši uzdevumi:

1. Izmantojot gaismas mikroskopijas, imūnhistoķīmijas, elektronmikroskopijas un rentgenmikroanalīzes metodes, veikt *cortex cerebri*, *corpus striatum* un *substantia nigra* izmaiņu izpēti audu un šūnu līmenī, iegūstot pārmaiņu kopainu psihoaktīvu vielu lietošanas gadījumos.

2. Veicot oksidatīvā stresa marķiera ekspresijas imūnhistoķīmisku noteikšanu, tā morfoloģisko un statistisko izvērtējumu, analizēt smadzeņu garozas un zemgarozas kodolu rajonu izmaiņas psihoaktīvu vielu ietekmē.

3. Veicot MMP9 ekspresijas izvērtējumu un pielietojot statistiskās datu analīzes metodes, pētīt dažādu smadzeņu rajonu un šūnu līdzdalību alkohola un narkotisko vielu izraisītās pārbūves norisēs.

4. Novērtēt ar SOD1 saistīto un metaloproteināzes-9 vadīto strukturālo izmaiņu iespējamās korelācijas, izvērtēt iegūto rezultātu korelācijas ar elektronmikroskopiskās analīzes ceļā iegūtiem rezultātiem.

5. Dot morfoloģiski pamatotu skaidrojumu smadzeņu pelēkās un baltās vielas ultrastrukturālo komponentu pārbūvei psihoaktīvu vielu lietošanas gadījumā.

6. Noskaidrot audu mediatoru līdzdalības nozīmi neironu un glijas šūnās notiekošajos procesos psihoaktīvo faktoru ietekmē, analizējot neironu un glijas šūnu jutību trīs dažādos smadzeņu rajonos.

7. Pētīt ķīmisko elementu nozīmi nervaudu strukturālajās pārmaiņās atkarību izraisošu psihoaktīvu vielu lietošanas gadījumos; pārbaudīt mikroelementu koncentrācijas noteikšanas iespējas, izmantojot enerģiju dispersās rentgenmikroanalīzes (EDX) metodi.

### **1.5. Darba novitāte**

Struktūras un ultrastruktūras līmenī salīdzinoši izanalizēti trīs dažādi CNS rajoni hroniskas alkohola un narkotisko vielu lietošanas gadījumos. Līdz šim pieejamos literatūras avotos atrodami dati par pētījumiem atsevišķos smadzeņu rajonos, tie bieži ir neviennozīmīgi un pat pretrunīgi. Trūkst datu par kompleksu šo rajonu analīzi psihoaktīvu vielu ietekmes gadījumā gan struktūras, gan ultrastruktūras līmenī. Šajā pētījumā pirmo reizi tiek iegūti un salīdzināti dati gan par atšķirīgu CNS rajonu iesaisti, gan neironu un glijas šūnu jutību un atbildes reakciju hroniskas alkohola un narkotisko vielu lietošanas gadījumos, izvērtējot oksidatīvā stresa izraisītas izmaiņas un MMP9 iesaisti un nozīmi.

### **1.6. Sadarbības partneri**

1. SIA "Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas" Patoloģijas centrs (prof. R. Kleina)

2. RSU Rehabilitācijas fakultāte (Dr. A. Stepens)

3. Valsts Tiesu medicīnas ekspertīzes centrs (prof. O. Teteris)

4. RSU Fizikas katedra (lektore V. Cauce)

### **1.7. Materiāli tehniskais nodrošinājums**

Pētījuma projektam izmantoti RSU AAI Starpkatedru elektronmikroskopijas laboratorijas materiāli tehniskie līdzekļi, kā arī ESF projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa Universitātē” (projekta vienošanās Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009) sniegtās iespējas.

### **1.8. Ētiskie aspekti**

Pētījuma veikšanai saņemta Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komisijas atļauja (lēmums 17.12.2009.), (pielikumā).

## 2. LITERATŪRAS APSKATS

### 2.1. Smadzeņu garozas un zemgarozas rajonu morfofunkcionāls raksturojums

#### 2.1.1. Smadzeņu garozas morfofunkcionāls raksturojums

Oskara un Cecīlijas Fogtu (*Oskar and Cecile Vogt*) aizsāktā smadzeņu garozas (CC) arhitektūras organizācijas izpēte un, vēlāk, Korbiniana Brodmana (*Korbinian Brodmann*) klasiskās CC kartes izveide, rezultējas CC sadalījumā 5 daļās, 11 lielos rajonos un 52 mazākos apgabalos (Augustine, 1996). Prefrontālā CC aizņem pieres daivas priekšējo daļu un ir viena no sarežģītākajām anatomiskām un funkcionālām struktūrām zīdītāju smadzenēs. Tās svarīgākā funkcija ir saistīt un analizēt ienākošos signālus gan no garozas, gan zemgarozas slāņiem, ieskaitot bazālos ganglijus. Prefrontālā garoza tiek dalīta trijos savstarpēji saistītos apakšrajonos – laterālā, mediālā un orbitālā daļā (Abernathy *et al.*, 2010).

Smadzeņu garozu (neocortex) raksturo 6 slāņu struktūra, kas satur projekcijas neironu un starpneironu ķermeņus, kā arī to izaugumus, glijas šūnas un asinsvadus. Neironi CC tiek iedalīti divās pamatgrupās – piramidālie neironi un starpneironi. Katra no grupām tiek sadalīta apakšgrupās atkarībā no neironu izmēra, formas, dendrītu un aksonu morfoloģijas un to savstarpējiem kontaktiem. Dažādos CC rajonos un slāņos lokalizējas atšķirīgas neironu apakšpopulācijas. Saskaņā ar morfoloģiskām iezīmēm, piramidālos neironus klasificē grupā, kuru biezie apikālie dendrīti zarojas virsējos garozas slāņos, savukārt otrajā grupā neironiem novēro neizteiktāku apikālā dendrīta zarošanos (Abernathy *et al.*, 2010). Pamatojoties uz morfoloģiskām pazīmēm, CC neironus iedala grupā ar dzelonīšiem (ietverot gan piramidālas, gan zvaigžņveida šūnas), kas veido asimetriskas glutamāterģiskās sinapses, un bezdzelonīšu grupā – lielā starpneironu populācijā, kam raksturīgas arī simetriskās GABAerģiskās sinapses (DeFelipe *et al.*, 2002; Hof and Sherwood, 2005).

Pieres daivai raksturīgs salīdzinoši liels neiropīla daudzums, kas skaidrojams ar šo rajonu saistību ar asociatīvo garozu un citiem garozas rajoniem (Hoffmann, 2013).

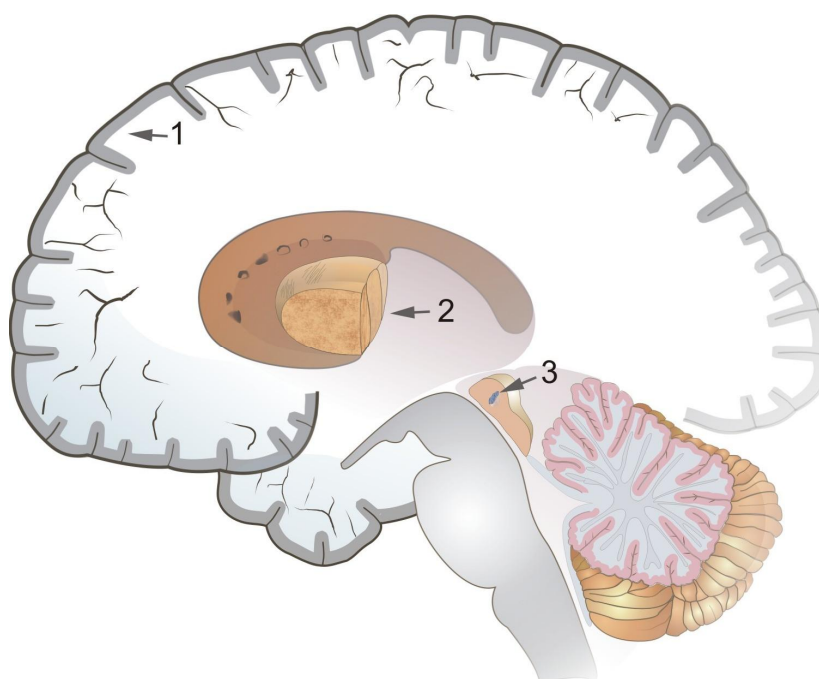
Astrocītu loma normālu fizioloģisku procesu noritē ietver gan specifisku, gan pamatfunkciju realizāciju. Sākotnēji astrocītiem biežāk tikušas piedēvētas pasīvas funkcijas, ieskaitot strukturālu un funkcionālu neironu atbalstu. Daudzus gadus astrocīti uzskatīti par neuzbudināmām glijas šūnām, tomēr pēdējos 20 gados šis uzskats ir radikāli mainījies. Ievērojami pieaudzis pētījumu skaits, kas apliecina astrocītu lomu

glutamāta regulācijā un dažādu signālmolekulu izdalē, tiem iesaistoties molekulārajos transporta mehānismos un nodrošinot lokālo komunikāciju (Volterra and Meldolesi, 2005). Pēdējo gadu pētījumi apliecina astrocītu iesaisti dažādu neiroloģisku saslimšanu etioloģijā (Pereira and Furlan, 2010), tajā skaitā ar pārmērīgu alkohola (González and Salido, 2009) un citu atkarību izraisīšu vielu lietošanu izraisītās izmaiņās (Haydon and Carmignoto, 2006). Izšķir divus astrocītu tipus – protoplazmatiskos un fibrozos. Protoplazmatiskie astrocīti atrodas CNS pelēkā vielā, tiem ir neregulāra forma, apaļīgs, vienmērīgas hromatīna struktūras kodols ar ekscentriski novietotu kodoliņu. Fibrozie astrocīti atrodas baltajā vielā, tiem raksturīgas regulāras kontūras (Peters *et al.*, 1970).

CC pelēkās vielas oligodendrocītiem ir satelītšūnu funkcijas, kamēr baltās vielas rajonā tās veido mielīna apvalku. Turklāt ziņojumos piramidālo neironu atrofiju saista ar oligodendrocītu deficītu garozas III un V slānī (Uranova *et al.*, 2004). Oligodendrocītiem raksturīgs neliels apaļš vai ovāls, relatīvi tumšs kodols un šaura citoplazmas daļa ap to (Uranova *et al.*, 2004).

### **2.1.2. Zemgarozas rajonu morfofunkcionāls raksturojums**

Bazālie gangliji (BG) (2.1. att.) ir ekstrapiramidālās sistēmas daļa, to veido zemgarozas kodolu grupa, kas iesaistīta dažādos procesos, ieskaitot motorās, asociatīvās, izziņas, kā arī ar atmiņu (Alexander and Churruarín, 1990; Herrero *et al.*, 2002) un ieradumiem (Yin and Knowlton, 2006; Yelnik, 2008; Rothwell, 2011; Bonsi *et al.*, 2011) saistītās funkcijās.

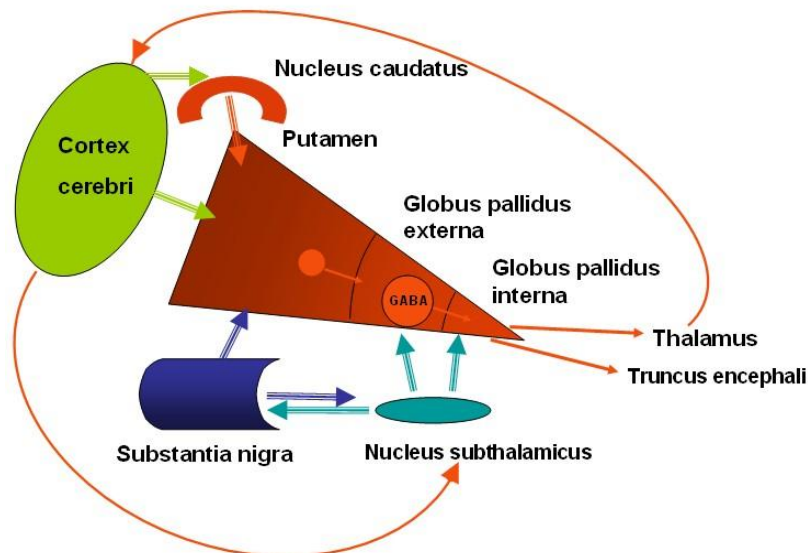


**2.1. att. Smadzeņu garozas (1) un zemgarozas kodolu – *corpus striatum* (2) un *substantia nigra* (3) anatomiskā lokalizācija. Modificēts pēc Dauber, Pocket Atlas of Human Anatomy, 2007**

BG tradicionāli saistīti ar CNS motorām struktūrām, taču dorsolaterālā-prefrontālā saistība un BG izeja uz prefrontālo garozu ir plašāka un topogrāfiski organizētāka, nekā līdz šim domāts (Middleton and Strick, 2002; Reynolds and Wickens, 2002; Tepper and Lee, 2007).

BG dorsālo daļu veido *striatum*, *globus pallidus*, subtalāmiskie kodoli un *substantia nigra* (SN). Ar limbisko sistēmu ir saistīta BG ventrālā daļa – *nucleus accumbens*, *pallidum ventrale* un *tegmentum ventrale* (Bolam *et al.*, 2000).

*Striatum*, ko veido *nucleus caudatus* un *putamen*, ir lielākā un galvenā funkcionāli specializētā BG vienība. Tas saņem ienākošus signālus gan no CC, gan ir savstarpēji saistīts ar dopamīnērgisko neironu signāliem (Yin and Knowlton, 2006; Albin *et al.*, 1989, DeLong, 1990, Kreitzer and Malenka, 2008), (2.2. att.). *Striatum* loma ir nozīmīga ar izzīņas un kustību traucējumiem saistītās saslimšanās (DeLong and Wichmann, 2007).



**2.2. att. Smadzeņu garozas un bazālo gangliju savstarpējā saistība.**  
**Modificēts pēc Bonsi *et al.*, Front Neuroanat., 2011**

*Nucleus caudatus* un *putamen* dažādā loma, kas saistīta ar augstākā līmeņa mācību un atmiņas procesiem, ir pētīta dzīvniekiem, analizējot izturēšanās izmaiņas bojājumu procesu gaitā, kā arī pielietojot eksperimentālas farmakoloģijas metodes (Grahns, 2008).

Klasificējot *striatum* nervu šūnas, var izdalīt divas neironu apakšgrupas. Pirmo veido vidēja izmēra projekcijas neironi (Goldži I tips) jeb GABAerģiskie dzelonīšu neironi (izmērs 10 – 20 μm). Šie GABAerģiskie maza un vidēja izmēra neironi sastāda vairāk nekā 95% un tiek sīkāk iedalīti apakšgrupās atkarībā no to izaugumu veida un saturošā proteīna – D1 vai D2 receptora. Šo šūnu dendrītu sākumdaļai nav dzelonīšu, tie parādās tikai, dendrītiem sākot zaroties. Tie saņem nervu impulsus gan no CC, gan no talāma (Parent and Hazrati, 1995; Sharott *et al.*, 2009).

Augstāk minēto neironu aktivitāte ir atkarīga no otras *striatum* neironu populācijas, ko veido vidēja līdz liela izmēra starpneironi (Goldži II tips). Tos iedala četrās dažādās bezdzelonīšu starpneironu apakšgrupās, saskaņā ar/pēc to dzelonīšu funkcionālās aktivitātes un neiromediatora veida (Raz *et al.*, 2001; Sharott *et al.*, 2009). Viena no tām – „gigantiskie” bezdzelonīšu starpneironi, kas izdala acetilholīnu, atbilst toniski aktīviem neironiem ar unikāliem jonu kanāliem. Šiem neironiem ķermeņa izmērs var būt līdz 40 μm. Starpneironus raksturo 3 – 6 biezi, gludi primārie dendrīti, kas veido dendrītisko zarojumu līdz 1 mm diametrā. Lai gan šie holīnerģiskie neironi sastāda tikai 1 – 3% no *striatum* neironiem, tie veido plašu kontaktu tīklu, apgādājot ar

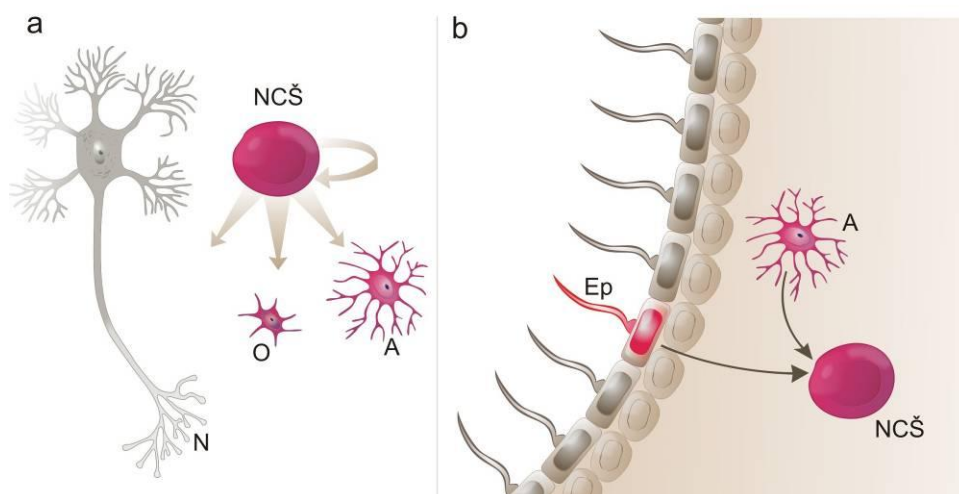
acetilholīnu *striatum*. Acetilholīna modulācija un savstarpējā mijiedarbība ar dopamīnerģiskiem neironiem ir izšķirīga normālai *striatum* darbībai. Holīnerģisko signālu disfunkciju asociē ar kustību traucējumiem saistītās saslimšanās. Holīnerģisko neironu funkcija nav vienkāršoti raksturojama kā aktivējoša vai nomācoša, šie neironi nodrošina *striatum* izejas signālu ilguma, stipruma un plašuma regulāciju. Šie neironi ir toniski aktīvi pat laikā, kad netiek saņemti sinaptiskie signāli. Šis brīdis, saukts par ar dopamīnu saistītām pauzēm, tiek uzskatīts par „apmācības” posmu un, iespējams, atkarīgs no kortiko-striatālo glutamāterģisko sinapšu aktivitātes. Papildus šai starpneironu populācijai izdala arī parvalbumīnu ekspresējošus, somatostatīnu/neuropeptīdu Y un kalretinīnu izdalošos GABAerģiskos starpneironus (Sharott *et al.*, 2009; Oldenburg and Ding, 2011). *Putamen* un *nucleus caudatus* izmaiņas, saistītas ar dopamīnerģisko neironu signāliem, raksturīgas Parkinsona slimībai (Kish *et al.*, 1988). Nesenie novērojumi atzīmē dorsālā *striatum* īpašu nozīmi striato-nigro-striatālā signālu kaskādē narkotisku vielu lietošanas gadījumos (Everitt *et al.*, 2008).

SN lokalizējas *mesencephalon*, ir saistīta ar CC, muguras smadzenēm, *corpus striatum* un retikulāro formāciju. SN ir anatomiski heterogēns zemgarozas kodols, to iedala divās daļās, kurām atšķiras struktūra un funkcijas – *pars compacta* (SNpc) un *pars reticulata* (SNpr) (Rinvik and Grofova, 1970; Tepper *et al.*, 1995). SN *pars compacta* lokalizējas dopamīnerģiskie neironi, kurus, atkarībā no citoarhitektūras, topogrāfiskiem un ķīmiskiem rādītājiem iedala 5 apakšgrupās. Savukārt SN *pars reticulata* lokalizējas GABAerģiskie neironi, kurus pēc iepriekš minētiem rādītājiem arī iedala 5 apakšgrupās (González-Hernández and Rodríguez, 2000). Pētījumi apstiprina, ka *globus pallidus internus* neironi tieši iesaistās motoro funkciju nodrošināšanā, taču SN *pars reticulata* loma motoro funkciju regulācijā nav viennozīmīgi skaidra, lai gan pētījumi, izmantojot retrogrādu aksonālu transportu, apstiprina SN *pars reticulata* saistību ar primāro motoro garozu (Hoover and Strick, 1993; Wichmann and Kliem, 2004). SN *pars compacta* lokalizējušies multipolārie dopamīnerģiskie neironi, kas satur pigmentu – neiromelanīnu. Neiromelanīna spēja mijiedarboties ar dažādām organiskām un neorganiskām sastāvdaļām, ieskaitot metālu jonus un lipīdus, ir daudzu sarežģītu pētījumu mērķis (Zecca *et al.*, 2001). Neiromelanīns ir iesaistīts metālu, īpaši dzelzs (Fe) jonu metabolismā neironos, tā nozīme saistīta arī ar oksidācijas mehānismu, novēršot šūnu bojājumus to darbības laikā. Parkinsona slimības gadījumā neiromelanīna daudzums ir samazināts, kas var būt iemesls šūnu bojāejai oksidācijas procesu radīto izmaiņu dēļ (brīvie radikāļi u.c.) (Fedorow *et al.*, 2005).

Daudz preklīnisku un klīnisku pētījumu par iespējami rezultatīvāku ārstēšanu kokaīna, nikotīna, heroīna un etanola ietekmes gadījumā norāda uz tiešiem GABA<sub>A</sub> receptoru un netiešiem (ar dopamīnerģiskā mehānisma modulāciju saistītiem) GABA<sub>B</sub> receptoru stimulācijas bojājumiem (Cousins *et al.*, 2002). Virkne pētījumu parāda, ka oksidatīvais stress var tikt iesaistīts dažādu deģeneratīvu procesu norisēs, slimību un sindromu izpausmēs (Sayre *et al.*, 2008). Pārmērīga un hroniska alkohola lietošana paaugstina ROS veidošanos un samazina antioksidantu aizsardzības sistēmu smadzenēs dažādās izpausmēs (Sun and Sun, 2001).

### **2.1.3. Laterālo ventrikulu sienas morfofunkcionāls raksturojums**

CNS izziņā būtisku nozīmi ieguvuši pētījumi par nervu sistēmas spēju radīt jaunus neironus noteiktos smadzeņu rajonos. Multipotentas neirālās cilmes šūnas (NCŠ), ar tām piemītošo potenciālu veidot neironus, astrocītus un oligodendrogliju, novērotas ne tikai embrionālās attīstības laikā, bet arī pieaugušo zīdītāju smadzenēs, tajā skaitā cilvēkam (Taupin and Gage, 2002; Okano, 2002), (2.3. att.). Pilnīgāka izpratne par pieaugušo NCŠ bioloģiju ir nozīmīga gan smadzeņu saslimšanu etioloģisko faktoru un patoģenēzes noskaidrošanā, gan potenciālās ārstēšanas izstrādē. Neuroģenēzes un NCŠ diferenciācijas regulācija noris ģenētisku faktoru ietekmē. Alkohols ir plaši pazīstams citotoksisks aģents, kas izraisa virkni izmaiņu neuroģenēzē hroniskas alkohola iedarbības gadījumā (Crews and Nixon, 2003; Tateno and Saito, 2008; Nixon *et al.*, 2010). Neskatoties uz plašajiem pētījumiem, mehānismi, kuru darbības rezultātā alkohols izraisa nervaudu bojājumus, joprojām ir neskaidri. Joprojām neatbildēti jautājumi ir: 1) vai alkohols ir nozīmīgākais, vai viens no faktoriem, kas var ietekmēt neuroģenēzi pieaugušo smadzenēs, un 2) kādā pakāpē un kādi mehānismi skar pieaugušo neuroģenēzi hroniskas alkohola lietošanas gadījumā.



**2.3. att. Neuroģenēze un neirālās cilmes šūnas pieaugušu zīdītāju CNS. a: Multipotentās neirālās cilmes šūnas (NCŠ), no kurām attīstās neironi (N), astrocīti (A) un oligodendrocīti (O). b: Divas teorijas par NCŠ attīstību no: 1) ependimocītiem (Ep), 2) astrocītiem līdzīgām šūnām (A). Modificēts pēc Taupin and Gage, JNeurosci Res, 2002**

## **2.2. Smadzeņu garozas un zemgarozas šūnu ultrastrukturāls raksturojums**

CC ultrastrukturāli raksturīgs daudz nervu šūnu ķermeņu un glijas šūnu, ko ietver neiropīls – dendrīti, dendrītu gala izaugumi un nemielinēti aksoni, sinapses veidojoši aksonu gala izaugumi. Pieres daivas rajonā esošos neironus klasificē pēc šūnas ķermeņa izmēriem: mazi (diametrs mazāks par 12  $\mu\text{m}$ ), vidēji (diametrs 12 – 17  $\mu\text{m}$ ) un lieli ar diametru virs 17  $\mu\text{m}$ . Neironus klasificējot, ņem vērā kodola apvalku, heterohromatīna izvietojumu kodolā, brīvo ribosomu, mitohondriju skaitu un uzbūvi, graudainā un gludā endoplazmatiskā tīkla esamību. Piramidālos neironus iespējams noteikt jau pusplānajos griezumos gaismas mikroskopā pēc izteikta apikālā dendrīta un dažreiz viena vai diviem laterālajiem dendrītiem. Neironus bez šīm iezīmēm klasificē kā zvaigžņveida neironus. Pirmā un trešā slāņa vidēja izmēra piramidāliem neironiem parasti ir regulāra ārējās membrānas veidota kontūra un dažreiz dziļas kodola apvalka ieloces. Citoplazma satur brīvas ribosomas, nedaudz graudainā endoplazmatiskā tīkla un mitohondrijus, kas parasti ir apaļas formas un gaiši, citoplazmā bieži ir lipofuscīna ieslēgumi. Goldži aparāts parasti lokalizējas vietās, kur no šūnas ķermeņa sākas apikālais un laterālie dendrīti. Piramidālo šūnu apikālie dendrīti satur mikrotubulus, dažus mitohondrijus un

brīvas ribosomas, aksoni satur daudz neurofilamentu. Aksonu gala izaugumi veido simetriskas sinapses ar lieliem, apaļiem un elipses formas sinaptiskiem pūslīšiem, bieži uzrādot elektronoptiski blīvas postsinaptiskās membrānas, un nesimetriskās sinapses ar maziem, apaļiem un saplacinātiem sinaptiskajiem pūslīšiem. Ceturtā un sestā slāņa piramidāliem neironiem raksturīgs salīdzinoši izlocītāks kodola apvalks. Smadzeņu garozā lokalizējas mazi (diametrs mazāks par 12  $\mu\text{m}$ ), salīdzinot ar piramidāliem, groziņveida neironi, kam raksturīgi heterohromatīna sakopojumi kodolā, izteikti daudzveidīga mitohondriju morfoloģija – raksturīgs gan ciešs kristu novietojums un elektronoptiski blīva matrice, gan arī ne tik blīvs kristu izvietojums un elektronoptiski gaiša matrice, retumis novēro arī aksosomatiskās sinapses. Vidēja izmēra zvaigžņveida neironiem (12 – 17  $\mu\text{m}$  diametrā) raksturīgi salīdzinoši nedaudz heterohromatīna kodolā un nedaudz organellu citoplazmā. Vērojams Goldži aparāts, daži vidēja izmēra mitohondriji un dažreiz lipofuscīna ieslēgumi. CC slāņos atrodami arī zvaigžņveida neironi ar lielu organellu daudzumu citoplazmā. Lielie zvaigžņveida neironi (diametrs lielāks par 17  $\mu\text{m}$ ) parasti ir ar apaļu ārējās membrānas veidolu. Tos iedala divās apakšgrupās, kas atšķirami pēc difūza vai sakopojumu veidā izvietota heterohromatīna (Ong and Garey, 1991).

Pelēkās vielas protoplazmatiskiem astrocītiem ir labi attīstīti citoplazmas organoīdi un īsi, sazaroti izaugumi, kas pielāgojas neiropīla formai, aptverot sinapses un ar gala izaugumiem sedzot asins kapilārus. Protoplazmatisko astrocītu citoplazmā ir salīdzinoši maz starpdiedziņu, kas sastāv no glijas fibrillārā skābā proteīna (GFAP), citoplazma gaiša, tajā bieži glikogēna ieslēgumi. Baltās vielas fibroziem astrocītiem raksturīgs neregulārs, bieži vien krokots kodola apvalks, gari, mazzaroti izaugumi (Peters *et al.*, 1970; Miller and Raff, 1984; Lange *et al.*, 2012).

Astrocīti tieši komunicē ar neironiem un dinamiski mijiedarbojas uz sinapsēm gan ar neiromediatoru, gan ar receptoriem saistītā iekššūnu Ca palīdzību, iespējams, iesaistoties dažādu sinaptisko posmu attīstībā (Slezak and Pfrieder, 2003). Astrocīti ekspresē dažādas regulatorās molekulas, tādas kā endotelīnus, asinsvadu endotēlija augšanas faktoru (VEGF), efrīnus un tā receptorus, kas regulē neironālo attīstību, aksonālo augšanu un vaskuloģenēzi (Seifert *et al.*, 2006). Ir ziņojumi par CC neironu kultūrām bez astrocītu klātbūtnes, kur, iedarbojoties ar etanolu, būtiski paaugstinās ROS līmenis, tādējādi ļaujot izteikt pieņēmumu par astrocītu nozīmi neironu aizsardzībā pret toksisku vielu iedarbību (Watts *et al.*, 2005). Patoloģisku situāciju gadījumos, posmā no

akūta iekaisuma līdz neurodeģeneratīvām saslimšanām, astrocītos norit izteiktas morfofunkcionālas izmaiņas (Ridet *et al.*, 1997; Giaume *et al.*, 2010). Ir pētījumi par astrocītu līdzdalību matricēs metaloproteināzes-2 ekspresijā, iesaistoties BBB veidošanā (Rosenberg *et al.*, 2001). DeVito un kolēģu pētījums ar plūsmas citometrijas analīzes metodi pierāda etanola ietekmi, izraisot paaugstinātu jutību un tumora nekrozes faktora-alfa (TGF- $\alpha$ ) izraisītu šūnu bojāeju eksperimentālo dzīvnieku astrocītu kultūrā (DeVito *et al.*, 2000). Nesen publicēts pētījums par alkohola nozīmi glikozes līmeņa samazināšanā gan astrocītos, gan neironos, tādējādi sekmējot neirotoksicitāti un neironu deģenerāciju (Abdul Muneer *et al.*, 2011).

Oligodendrocītus iedala mielīnu veidojošās šūnās un satelītšūnās. Satelītšūnas lokalizējas perineirāli un kalpo kā mikrovides regulators ap neironiem. Salīdzinot ar astrocītiem, tie ir mazāki izmēros, ar tumšāku citoplazmu un kodolu, pateicoties elektronoptiski blīvam heterohromatīnam. Tiem nav starpdiedziņu un glikogēna ieslēgumu citoplazmā. Oligodendrocītam ir maz īsu izaugumu, kuri kontaktē ar aksonu. Pēc „oligodendrocīts” termina atklājēja (1921) Rio Hortegas (*Río Hortega*) klasifikācijas oligodendrocītus, atkarībā no izaugumu skaita, iedala četrās grupās (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Pēc oligodendrocītu morfoloģiskajām pazīmēm un to veidotā mielīna apvalka izmēriem izdala: nelielas šūnas, kas veido plānu mielīna apvalku ap 15 – 30 maza diametra aksoniem, vidējas šūnas un lielas, kas veido mielīna apvalku ap vienu 1 – 3 reizes lielāka diametra aksonu (Butt and Ransom, 1989). Savukārt Mori un Leblonds klasificē oligodendrocītus trīs grupās pēc citoplazmas elektronoptiskā blīvuma noteikšanas elektronu mikroskopā (Mori and Leblond, 1970). Neskatoties uz zināšanām par oligodendrocītu lomu mielīna apvalka veidošanā, joprojām nav pilnībā izprasti oligodendrocītu diferenciācijas un CNS mielinizācijas molekulārie aspekti, taču ir pierādījumi mielīna apvalka plasticitātei kā atbildes reakcijai uz neironālu aktivitāti (Emery, 2010). Matutes un kolēģu (Matute *et al.*, 2006) pārskata ziņojumā apkopoti pētījumi par glutamāta saistītiem glijas šūnu bojājumiem dažādu CNS patoloģiju gadījumos. Apliecināts oligodendrocītu jutīgums un ievainojamība, paaugstinoties glutamāta līmenim, kas rezultātā var izraisīt šūnu bojāeju (Matute *et al.*, 2006). Ir ultrastrukturāli pētījumi par mielīna apvalka izmaiņām novecošanās un Alcheimera slimības gadījumos (Peters, 2002; Peters, 2009).

Mikroglija veido 5 – 10% no visas gliocītu populācijas, tās ir CNS imūnkompetentās antigēnu prezentējošās šūnas (Dheen *et al.*, 2007). Mikroglijas šūna ir neliela, ar šauru citoplazmas slāni, tai ir daudz izteikti sazaroti un izlocīti izaugumi.

Kodolā heterohromatīna sakopojumi tumši, kas kontrastē ar gaišo nukleoplazmu un kodola apvalku. Citoplazmā maz mitohondriju un īsas endoplazmatiskā tīkla cisternas, kā arī tumši, lizosomām līdzīgi ieslēgumi (Mori and Leblond, 1969). Citotoksisku un iekaisīgu faktoru ietekmē mikroglija aktivējas, BBB bojājuma gadījumā funkcionējot kā antigēnu prezentējošas šūnas (Nakajima and Kohsaka, 2001). Mikroglijas kontrolētie Fe homeostāzes procesi joprojām ir neskaidri, tomēr ir zināms, ka Fe depozīti izgulsnējas mikroglijā Alcheimera un Parkinsona slimību gadījumā (Ward *et al.*, 2011).

Šūnu ultrastukturālais raksturojums apkopots 2.1. tabulā pēc Petersa (Peters *et al.*, 1970).

2.1. tabula

## CNS šūnu ultrastrukturāls raksturojums

|                                | <b>Šūnas ķermenis</b>                                                                                             | <b>Dendrīti</b>                                                                                      | <b>Aksoni</b>                                         | <b>Izaugumi</b> |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Neironi:</b><br>kodols      | liels, mazajos neironos līdz ar to citoplazmas maz, maza izmēra neironos daudz heterohromatīna, ir tumšs kodoliņš | -                                                                                                    | -                                                     | -               |
| Nisla viela                    | ir                                                                                                                | ir                                                                                                   | nav                                                   | -               |
| Goldži komplekss               | nav piestiprinātu vai brīvu ribosomu, plašs cisternu komplekss, blīvs iepakojums, cisternas šauras                | ir piestiprinātas vai brīvas ribosomas, plašs cisternu komplekss, blīvs iepakojums, cisternas šauras | nav                                                   | -               |
| līzosomas                      | ir                                                                                                                | nav                                                                                                  | nav                                                   | -               |
| endoplazmatiskais tīkls        | ir                                                                                                                | ir                                                                                                   | nav graudainā endoplazmatiskā tīkla un brīvu ribosomu | -               |
| mitohondriji                   | nelieli zirņiņi, tievas nūjiņas                                                                                   | ir                                                                                                   | ir                                                    | -               |
| citoskelets                    | daudz mikrotubuļu un neurofilamentu                                                                               | maz neurofilamentu, ir mikrotubuļi - paralēli garenasij                                              | salīdzinoši maz mikrotubuļu un neurofilamentu         | -               |
| ieslēgumi                      | lipofuscīna ieslēgumi                                                                                             | nav                                                                                                  | nav                                                   | -               |
| šūnu gala izaugumi un sinapses | variabls daudzums citoskeleta elementu                                                                            | neregulāra forma, satur ribosomas                                                                    | gludas kontūras, nesatur ribosomas                    | -               |

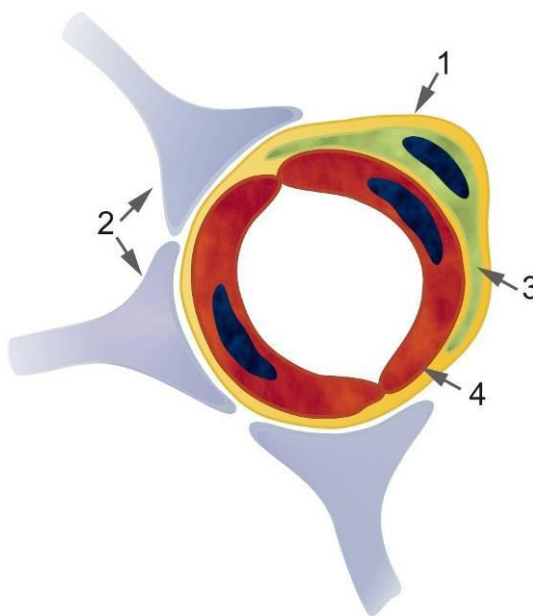
## 2.1. tabulas turpinājums

|                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |    |                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Fibrozie astrocīti:</b><br>kodols un šūnas<br>ķermenis          | kodolam neregulāra forma, bieži ar krokām, vienmērīgs saturs, citoplazma gaiša, citoplazmā organellas samērā nedaudz, raksturīgas fibrillas, gari mitohondriji, dažādi, pat „Y” forma, endoplazmatiskais tīkls vāji attīstīts                                                                                                                                     | -   | -  | -                                                                                                                  |
| izaugumi                                                           | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | -   | -  | zarojas, izaugumos mitohondriji, fibrillas un glikogēna granulas                                                   |
| <b>Protoplazmatiskie astrocīti:</b><br>kodols un šūnas<br>ķermenis | kodols apaļīgs, vienmērīgas struktūras, raksturīgas fibrillas, kas mazāk nekā fibrozajos astrocītos, endoplazmatiskais tīkls vāji attīstīts, citoplazma gaiša, tajā bieži glikogēna ieslēgumi, lieli, pagarināti mitohondriji, mikrotubuļi, pa reizei centriolas, var būt skropstiņas, kontūras nevienmērīgas (pielāgojas neiropīla formai), reti noapaļota forma | -   | -  | -                                                                                                                  |
| izaugumi                                                           | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | -   | -  | ir mitohondriji, endoplazmatiskais tīkls, ir ribosomas, nav mikrotubuļu, ir glikogēna ieslēgumi un fibrillu kūlīši |
| <b>Oligodendrocīti:</b><br>kodols un šūnas<br>ķermenis             | kodols apaļš, ovāls vai neregulāras formas, izteikts heterohromatīns, novietojums ekscentrisks, citoplazma tumša, elektronoptiski blīvāka (atšķirtībā no astrocītiem) nesatur starpdiedziņus un glikogēna ieslēgumus, īsi izaugumi                                                                                                                                | -   | -  | -                                                                                                                  |
| <b>Mielīna apvalks</b>                                             | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | nav | ir | -                                                                                                                  |
| <b>Mikroglīja:</b><br>kodols un šūnas<br>ķermenis                  | neregulāras formas kodols ar heterohromatīna sakopojumiem, kompakts organellu novietojums, maz garu endoplazmatiskā tīkla cisternu                                                                                                                                                                                                                                | -   | -  | -                                                                                                                  |
| izaugumi                                                           | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | -   | -  | zaroti                                                                                                             |

### 2.3. Asins-smadzeņu barjeras strukturāls un ultrastrukturāls raksturojums

Jēdziens par asins-smadzeņu barjeru (BBB) sākotnēji parādījies 19. gs. beigās Vācijā, pamatojoties uz Paula Ērliha (*Paul Ehrlich*) pētījumiem. 1960. gadā Rīss un Karnovskijs (*Reese and Karnovsky*), Braitmans un Rīss (*Brightman and Reese*) atkārtoja Ērliha un Goldmana (*Edwin Goldman*) eksperimentus strukturālajā līmenī, pielietojot elektronu mikroskopu un nosakot par BBB pamatu CNS asins kapilārus un endoteliālās šūnas (Ribatti *et al.*, 2006).

BBB ir augsti specializēta smadzeņu kapilāru endotēlija šūnu un astrocītu veidota struktūra (2.4. att.). Tā kopā ar pericītiem, mikroglijas šūnām, neironiem, kā arī ekstracelulāro matrici (ECM) veido neirovaskulāro vienību CNS normālas funkcionēšanas nodrošināšanai (Hawkins and Davis, 2005).



2.4. att. BBB struktūra un sastāvdaļas: 1 – bazālā membrāna, 2 – astrocītu kājiņas, 3 – pericīti, 4 – endoteliocīti. Modificēts pēc Zlokovic, Neuron, 2008

BBB ir selektīva, to veido endotēlija šūnas, kas tipiski aptvertas ar glijas šūnu izaugumiem – „kājiņām”. Barjera veidota no endoteliālo šūnu savienojuma vietām, kas kontrolē saskaņotu starpsūnu savienojumu atvēršanos un aizvēršanos. Ciešie endoteliālie savienojumi veidoti no dažādiem proteīnu kompleksiem, kuri ir galvenie šūnu caurlaidības regulatori. Slēgīgules (*zonula occludens*) sastāv no trim integrālām membrānas olbaltumvielām: kladīna, okludīna un savienojumu adhēzijas

olbaltumvielām, kā arī virknes papildus citoplazmatisko olbaltumvielu, ieskaitot *zonula occludens* (ZO) olbaltumvielas 1, 2 un 3, cingulīnu, un citas olbaltumvielas. Šīs papildus olbaltumvielas saista membrānas olbaltumvielas ar aktīnu, uzturot endotēlija struktūras viengabalainību un funkcionēšanu. Salipšanas josliņas (*zonula adhaerens*) veidotas no membrānas olbaltumvielām, sauktām par kadherīniem, kas ir savienotas ar aktīnu, un no saistošajām olbaltumvielu molekulām, sauktām par katenīniem, lai veidotu adhezīvus iekššūnu kontaktus un savstarpēji mijiedarbotos ar savienojumiem. Smadzeņu endoteliālās šūnas atrodas virs bazālās plātnītes, kas satur ECM molekulas, pārklājot vairāk nekā 90% no endoteliālo šūnu virsmas, un ir iesaistītas BBB caurlaidībā (Ballabh *et al.*, 2004; Groma un Zalcmane, 2012). BBB endotēlijam nav poru, tam raksturīgs neliels skaits pinocitotisku pūslīšu, daudz augstai metaboliskai aktivitātei raksturīgu mitohondriju. Endoteliocīta membrānu receptori un transporta olbaltumvielas nodrošina gan transporta molekulu pārvadi, gan potenciāli toksisku vielu caurlaidību (Weiss *et al.*, 2009). Cilvēka smadzenēs esošie astrocīti ir zvaigžņveida formas glijas šūnas, kas parasti ir 7 – 10 reižu vairāk nekā neironu; astrocītu izaugumi veido ciešu un pielīpošu plātnīšu tīklu pie ārējās BBB virsmas, attiecīgi bazālās membrānas. Aizvien vairāk gan *in vitro*, gan *in vivo* dati atbalsta hipotēzi, ka astrocīti ir uzbudināmas šūnas un spēlē būtisku lomu informācijas apstrādē un neironu aktivitātes modulācijā. Šīs šūnas ir nozīmīgas vaskulārā tonusa kontrolē, tādēļ astrocītu loma smadzeņu mikrovaskulāro endoteliālo šūnu un signālpārvades uzturēšanā analizēta indivīdiem ar dažādām saslimšanām, kā arī pētījumos par BBB integritāti. Astrocītiem ir īpaša nozīme BBB izveidē un funkcionālās aktivitātes nodrošināšanā, sekmējot komunikāciju un regulējot sinaptisko pārraidi, tādējādi nodrošinot neironālo plasticitāti (Abbott *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). Ar asinsvadu sienīņu pericītiem saistītais angiopoetīns var izraisīt okludīna ekspresiju endoteliocītos, tādējādi ietekmējot savienojuma vietas BBB (Winkler *et al.*, 2011). BBB veidošanas, nobriešanas un uzturēšanas pamatā ir pericītu un endotēlija sarežģīta mijiedarbība. Pericīti komunicē tieši ar endoteliālām šūnām ar invagināciju palīdzību, kur viens pericīts var kontaktēt ar vairākām endoteliālām šūnām, nodrošinot papildus komunikācijas kārtu un asinsvadu mehānisko stabilitāti. Pētījumos pericīti parādīti kā makrofāgiem līdzīgas šūnas ar miocītiem raksturīgu saraušanās spēju, kas regulē asins plūsmu kapilāros, spēlējot būtisku lomu BBB uzturēšanā vienlaikus ar smadzeņu homeostāzes pašregulāciju. *In vivo* pētījumi norāda, ka pericītu un endoteliālo šūnu savstarpējā mijiedarbība ir kritiska BBB regulācijā un šīs mijiedarbības sagraušana var izraisīt barjeras disfunkciju un nervaudu iekaisumu.

Pētījumi parāda, ka pericīti ekspresē tādas molekulas kā asins plātnīšu izdalīto augšanas faktoru (PDGFR), asinsvadu endotēlija augšanas faktora (VEGF), nervu augšanas faktora (NGF), TGFβ un MMP (ieskaitot MMP9), kas regulē BBB integritāti (Dohgu *et al.*, 2005; Zozulya *et al.*, 2008; Dore-Duffy, 2008; Armulik *et al.*, 2010; Winkler *et al.*, 2011; Ishitsuka *et al.*, 2012).

Nervu šūnu aktivitāte un asins mikrocirkulācija ir saistīti jēdzieni, kas atspoguļo smadzeņu funkcionālo aktivitāti, tomēr šī procesa šūnu mehānismi joprojām ir neskaidri. Endotēlija šūnu savienojuma vietas veido sarežģītas transmembrānu struktūras, kas citoplazmā saistītas ar šūnu citoskeleta diedziņiem. Bazālās membrānas un ECM bojājumi tiek viennozīmīgi saistīti ar paaugstinātu BBB jutību patoloģiskajās norisēs (Rosenberg, 2012). Hroniskas alkohola lietošanas gadījumos pierādīti baltās vielas bojājumi, kas saistāmi ar BBB pārmaiņām (Mann *et al.*, 2001). Toksiskas vielas var izraisīt BBB bojājumus un tiem sekojošas izmaiņas sinapšu un neironu darbībā (Zlokovic, 2008).

#### **2.4. Alkohola un narkotisko vielu ietekmes izpēte CNS**

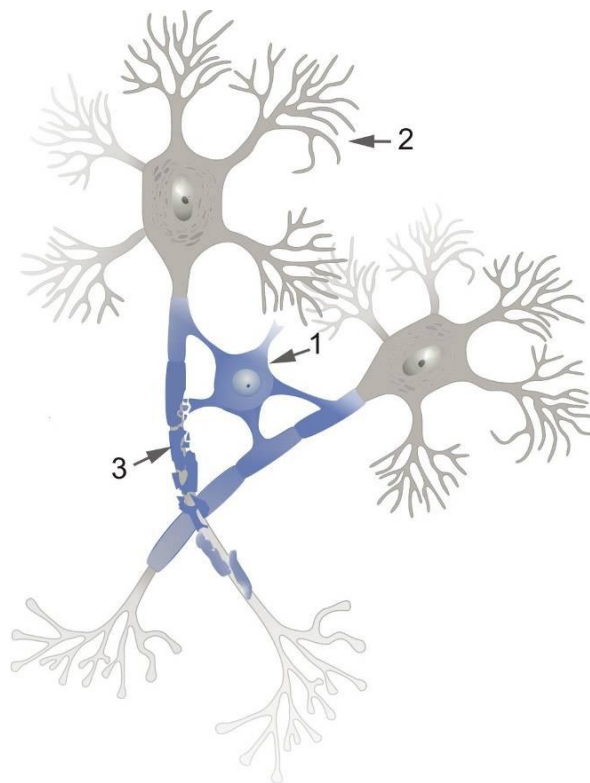
Daudz pētījumu saistīti ar atkarību izraisošu vielu, tajā skaitā alkohola un opioīdu, iedarbības mehānismiem un šo vielu izraisītu neiropatoloģiju. Daudz kustību saslimšanu tiek asociētas ar tiešu atkarību izraisošu vielu iedarbību. Luciano un Saunders-Pullmana (Luciano and Saunders-Pullman, 2009) pārskata ziņojumā un apkopota atkarību izraisošo vielu ietekme uz CNS neironu funkcionālo darbību: (1) kokaīna iedarbība saistāma ar dopamīnērgisko neironu funkcionālās aktivitātes stimulāciju – tas bloķē dopamīna atpakaļuzņemšanu presinaptiskajā polā, rezultātā palielinot dopamīna līmeni ārpus šūnas prefrontālajā CC (Trantham-Davidson *et al.*, 2014), (2) metkatinona darbība – ar D2 receptoru izmaiņām *striatum*, (3) opioīdu (gan dabīgā opioīda – morfīna, gan sintētisko – metadona un tramadola) iedarbība – gan ar GABAērgisko starpneironu, gan dopamīnērgisko neironu aktivitātes izmaiņām. Kokaīna iedarbība izmaina prefrontālās CC aktivitāti, izmainot dendrītisko zarojumu un sinaptisko plasticitāti (Rasakham *et al.*, 2014). Tādi medikamenti kā benzodiazepīns paaugstina GABA neironu aktivitāti, bet alkohols, kura iedarbība nav pilnībā izskaidrota, ietekmē GABA neironu aktivitāti un ir iesaistīts endogēno opioīdu

atbrīvošanā (Mitchell *et al.*, 2012). Karbamazepīns iesaistās dopamīnerģiskās un glutamāterģiskās sistēmas darbības regulācijā (Ambrósio *et al.*, 2002).

Saskaņā ar literatūras datiem prefrontālās CC struktūru un funkcijas ietekmē akūta un hroniska alkohola iedarbība, turklāt ir pierādījumi par psihoaktīvu vielu, arī opioīdu izraisītām izmaiņām šajā rajonā (Abernathy *et al.*, 2010). Kima un kolēģu (Kim *et al.*, 2014) pētījuma rezultāti apliecina piramidālo neironu izmaiņas prefronālā CC rajonā, kas saistāmas ar gliogēnēzi, oligodendroģenēzi un mielīna slāņa izmaiņām. Ašnera un kolēģu (Aschner *et al.*, 2001) pētījums ar šūnu kultūrām atklāj astrocītu uzbriešanu kā alkohola toksicitātes izraisītu efektu. Tādi toksīni kā amonijs, Mn un Cu, izraisa parkinsonisma simptomiem līdzīgas izmaiņas bazālajos ganglijos. Turklāt ir pierādīts, ka īpaši jutīgi uz šādu toksīnu ietekmi ir astrocīti, ko raksturo šūnas kodola uzbriešana, heterohromatīna marginācija un glikogēna ieslēgumu depoziiti citoplazmā (Butterworth, 2010). Spano (Spano *et al.*, 2010) un kolēģu pārskata ziņojumā norādīts uz opioīdu un kanabinoīdu ciešo saistību, iedarbojoties uz dopamīnerģiskās sistēmas vadīšanas ceļiem. Augsts kanabinoīdu CB1 receptoru blīvums atrasts CC (II – III un V – VI slānis), smadzenīšu, kā arī bazālo gangliju rajonā, kur tā receptoru atradnes lokalizējas aksonos, bet netika atrastas neironu ķermeņos un dendrītos. CB1 receptorus ekspresē GABAerģiskie vidēja izmēra projekcijas neironi (īpaši GP un SN *pars reticulata* rajonos), kā arī subtalāmisko kodolu glutamāterģiskajos projekcijas neironu termināli, kas lokalizējas GP. Presinaptiskā CB1 lokalizācija norāda uz kanabinoīdu iesaisti neiromediatoru atbrīvošanā aksonu terminālos. Pētījumos pierādīts to nomācošais efekts uz virkni neiromediatoru, tajā skaitā GABA, izdali. Informācija par šajā neiromediatoru inhibēšanas procesā iesaistītiem šūnu mehānismiem joprojām ir neskaidra, lai gan eksperimenti liek domāt par voltāžas atkarīgo Ca kanālu jutību un iesaisti, kanabinoīdiem samazinot sinaptisko pārvadi (Iversen, 2003). Ir daudz pētījumu ar šūnu kultūrām un dzīvnieku modeļiem saistītos eksperimentos par astrocītu dalību opioīdu, īpaši morfīna, izraisītu signālu aktivācijā, tajā skaitā kā atbildes reakciju modulējot tiešu šķelšanas proteīnu un citokīnu ekspresiju. Ir dati par *striatum* rajonu astrocītu iesaisti, bet nav morfoloģisku pierādījumu par SN astrocītu aktivāciju šādos gadījumos. Reģionālā heterogenitāte, kas saistīta ar opioīdu izraisītu signālu kaskādes aktivāciju, pašlaik nav izzināta (Coller and Hutchinson, 2012). Ir pētījumi, kas apliecina, ka alkohols izraisa paaugstinātu astrocītu sekretētu iekaisuma aģentu līmeni, izraisot neironālu iekaisumu (Floreani *et al.*, 2010). Veids, kā alkohols ietekmē dopamīnerģisko neironu aktivitāti un tai sekojošo GABAerģisko neironu nomākšanu,

joprojām ir neizskaidrots. Nav izziņāts, vai uzvedības atšķirības saistāmas ar neironu un astrocītu izmaiņām, lai gan ir pierādījumi par citokīnu un to receptoru iesaisti, akūtas alkohola lietošanas rezultātā samazinoties motorajai aktivitātei. Neirotoksisku alkohola iedarbības izpausmi daļēji saista ar glutamāta izdali no astrocītiem, tās laikā ar superoksīda anjonu līdzdalību izmainās Ca jonu koncentrācijas līmenis (Coller and Hutchinson, 2012).

Plašs starpdisciplināru pētījumu spektrs saistīts ar baltās vielas deģenerācijas izpēti alkohola un citu atkarību izraisošu vielu lietošanas gadījumos (Kril *et al.*, 1997; Moselhy *et al.*, 2001; Harper and Matsumoto, 2005; Pfefferbaum *et al.*, 2009; Pfefferbaum *et al.*, 2010), (2.5. att.).



**2.5. att. Mielīna apvalka bojājumi, saistīti ar smadzeņu baltās vielas deģenerāciju,  
1 – oligodendrocīts, 2 – nervu šūna, 3 – mielīna apvalka izmaiņas**

## **2.5. Neironu un glijas šūnu imūnhistoķīmiskie marķieri**

Pēdējos gados ievērojami pieaugusi iespējamība agrīnu vai pat preklīnisku neirodeģeneratīvu saslimšanu noteikt ar biomarķieru palīdzību. Kaut gan pašlaik pilnībā ir pierādītas pieaugušo CNS reģenerācijas spējas, bojā gājušo neironu aizvietošanas mehānisms paliek neskaidrs. Biomarķieru izpētes mērķis ir precīzi noteikt klīnisku diagnozi pirms plašākas neironu bojāejas konstatēšanas, progresējot saslimšanām, kā arī dot ieskatu patoģenēzes norisēs, veicot korelācijas izpēti dažādu biomarķieru vidū (Olsson *et al.*, 2011).

### **2.5.1. NSE – neironu citosola marķieris**

Enolāze ir glikolītiskā enzīma dimēriskais izoenzīms. Tai ir audu specifiskie izoenzīmi, kas sastāv no triju dažādu izoformu (alfa, beta, gamma) homo- un heterodimēriem. Neironu specifiskā enolāze (NSE) ir 47 kD gamma-homodimērs. NSE ir neirospecifisks marķieris, kas pārsvarā atrasts neironu un neuroendokrīno šūnu citoplazmā, arī eritrocītos, gludajos miocītos un tauku šūnās. NSE lokalizācija dažādos nervu šūnu veidos un to izaugumos smadzeņu garozā, smadzenītēs un hipokampā ir variabla (Schmechel *et al.*, 1987; Seshi *et al.*, 1988). Kaut arī NSE netiek pastāvīgi izmantota kā nervu šūnu marķieris, tomēr paaugstinātu tā līmeni novēro cerebrospīnālā šķidrumā dažādos neiroloģiski patoloģiskos procesos. Paaugstināts NSE līmenis serumā novērots pie hroniskas alkohola intoksikācijas (Mussack *et al.*, 2002); augstāki NSE līmeņi rādītāji asins serumā novēroti kokaīna lietotājiem (Kessler *et al.*, 2007). Biomarķiera līmeņa izmaiņas novērotas pētījumos par galvas smadzeņu bojājumiem un Alcheimera slimības gadījumos (Royds *et al.*, 1981; Sāmgård *et al.*, 2010).

### **2.5.2. GFAP – astrocītu marķieris un tā nozīme**

Glijas fibrilārā skābā olbaltumviela (GFAP) ir astrocītu citoskeleta starpdiedziņu galvenā sastāvdaļa, tā ir nosakāma un izvērtējama morfoloģiskās analīzes laikā gaismas mikroskopijas līmenī. Reaktīvi astrocīti, to hipertrofija un proliferācija

raksturīga CNS deģeneratīvo saslimšanu vai iekaisumu gadījumos, paaugstināta GFAP ekspresija novērota eksperimentālajos modeļos, iekļaujot gliomas, smadzeņu ievainojumus, toksisku iedarbību un autoimūnā encefalomiēlīta gadījumus (Hausmann *et al.*, 2000).

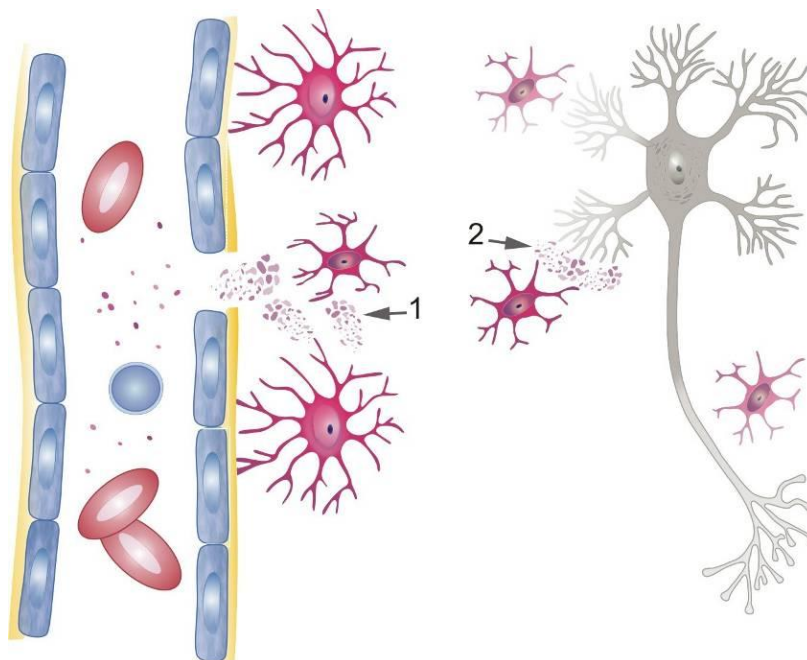
Pētījums par GFAP ekspresiju hipokampa astrocītos liek secināt, ka alkohola iedarbības gadījumā samazinās gan astrocītu skaits, gan to izaugumu garums un skaits (Franke, 1995). Savukārt Frankes un Kitnera pētījumi atklāj, ka pēc pentilēnetetrazola iedarbības pieaug astrocītu hipertrofija un GFAP ekspresija hipokampa rajonā (Franke and Kittner, 2001).

### **2.5.3. Dzelzs metabolisma marķieris un tā loma**

Bieži citētās izmaiņas Fe metabolismā, kas izraisa pārmērīgu Fe akumulāciju audos, ir iesaistītas oksidatīvā stresa izraisītās izmaiņās. Smadzeņu audos lielākā daļa Fe akumulējas kā feritīns ar relatīvi nelielu brīvo un reaktīvo formu. Perlisa (Perls) krāsošanas metode ļauj izvērtēt Fe lokalizāciju astrocītos, makrofāgos, mikroglijas šūnās, oligodendrocītos un neironos (Jellinger *et al.*, 1990; Perl and Good, 1992).

### **2.5.4. CD68 – mikroglijas aktivācijas marķieris**

Nervu šūnu bojāejā iesaistītie iekaisuma procesi CNS saistāmi ar virkni neirodeģeneratīvu saslimšanu – tādām kā Parkinsona, Alcheimera, multiplās sklerozes, prionu un cilvēka imūndeficīta vīrusa (HIV)-demences saistītās slimības. Ilgstoša mikroglijas aktivācija, atbrīvojot virkni citotoksisku molekulu, piemēram, citokīnus, ROS, proteināzes, var izraisīt neironu bojājumus (Dheen *et al.*, 2007). Divi atšķirīgi signālmolekulu izraisīti ceļi izsauc mikroglijas atbildes reakciju, iesaistoties 1) pēkšņai tādu faktoru kā mikrobu, seruma komponentu, iekššūnas faktoru iedarbībai un 2) ar īpašu funkcionālo stāvokli saistāmiem faktoriem, piemēram, proteīnu agregātiem. Atkarībā no mikroglijas aktivācijas pakāpes, izšķir trīs fāzes (Hanisch and Kettenmann, 2007), (2.6. att.).



**2.6. att. Mikroglijas aktivācija neliela lokāla bojājuma gadījumā: 1 – astrocītu aktivācija atbildes reakcijā; 2 – mikroglijas sekretētie neitropiskie faktori bojātā neirona aizsardzībai. Modificēts pēc Hanisch and Kettenmann, Nature Neuroscience, 2007**

Smadzeņu audu pētījumos par infekcijām un neurodeģeneratīvām saslimšanām pierādīts, ka mikroglijas aktivācija var būt saistīta ar plaša spektra fenotipiskām un funkcionālām izmaiņām (Zemtsova *et al.*, 2011). Alkohola lietošanas rezultātā aktivētā mikroglija var tikt atpazīta ar anti-CD68 antivielu, kas iezīmē lizosomālo membrānu glikoproteīnu gan makrofāgos, gan aktivētā mikroglijā ar fagocitotisku aktivitāti. Turklāt alkohola izraisīta mikroglijas aktivācija biežāk sekmē neurodeģenerācijas procesus nekā nodrošina homeostāzi audos. Neskatoties uz pētījumiem par mikroglijas aktivāciju alkohola lietošanas gadījumos, joprojām maz zināms par alkohola izraisītām mikroglijas šūnu izmaiņām (Marshall *et al.*, 2013).

## **2.6. Augšanas faktoru un receptoru nozīme CNS**

### **2.6.1. TGF- $\beta$ 1 un tā nozīme**

Transformējošais augšanas faktors beta (TGF- $\beta$ ) pazīstams kā multifunkcionāls faktors, kas piedalās attīstības pamatprocesu regulācijā, slimību un audu atjaunošanās norisēs. TGF- $\beta$  saimi raksturo trīs izoformas, kas noteiktas zīdītājiem nervaudos: TGF- $\beta$ 1, kas ekspresējas neironos, un TGF- $\beta$ 2 un - $\beta$ 3, kas tiek ekspresētas gan neironos,

gan glijas šūnās (Unsicker and Kreiglstein, 2002). TGF- $\beta$  tiek sekretētas kā latentas priekšteču molekulas, to aktivācijai nepieciešami saistošie receptori un tiem sekojoša signālmolekulu ceļu kaskādes aktivācija (Khalil, 1999; Massagué, 2000; Verrecchia and Mauviel, 2002). TGF- $\beta$ 1, citokīns ar daudzpusīgu iedarbību, spēj tieši samazināt citu iekaisuma citokīnu ekspresiju, tādējādi nomācot iekaisumu (Boche *et al.*, 2003). Ar TGF- $\beta$ 1 saistīta smadzeņu šūnu imūnreakcija (Liu *et al.*, 2006), tomēr šis faktors ir nozīmīgs un tiek nedaudz ekspresēts arī veselos nervaudos (Gomes *et al.*, 2005). TGF- $\beta$  ir nozīmīgs MMP sistēmas regulators, kas ierosina MMP2 un MMP9 ekspresiju, bet nomāc metaloproteināžu inhibitoru – TIMP2 – ekspresiju gliomu gadījumā (Wick *et al.*, 2001; Mentlein *et al.*, 2012). TGF- $\beta$ 1 spēj palielināt ECM izveidi, aktivējot gēnu transkripciju, kas regulē ECM produkciju un nomāc ECM degradējošo enzīmu aktivitāti (Horssen *et al.*, 2006). Pētījumi apliecina, ka TGF- $\beta$ 1 samazināšanās negatīvi ietekmē aksonālo transportu, aksonu morfoloģiju un funkcionālo reģenerāciju, kā arī paaugstina nervu šūnu bojāejas iespējamību (Makwana *et al.*, 2007). Pētījumi pierāda, ka, neitralizējot endogēno TGF- $\beta$ , nervu augšanas faktora (NGF) izdale var samazināties pat līdz 50% (Krieglstein *et al.*, 1995). Pierādīts, ka TGF- $\beta$  *in vitro* modeļos iedarbojas kā dopamīnergiskos neironus aizsargājošs faktors intoksikācijas gadījumos, tajā pašā laikā neizraisot proliferāciju (Roussa *et al.*, 2004). Salīdzinoši nesen publicēti dati par neironu spēju kontrolēt un paaugstināt TGF- $\beta$ 1 ekspresiju ar astrocītu līdzdalību, kas, savukārt paaugstina astrocītu veidotu aizsardzību pret eksocitotoksisku faktoru ietekmētu blakus esošo neironu bojāeju. TGF- $\beta$ 1 regulē GFAP gēna ekspresiju un šūnu diferenciāciju, inhibē ECM molekulu sekrēciju (Gomes *et al.*, 2005). *In vitro* pētījumi pierāda TGF- $\beta$  spēju regulēt astrocītu iesaisti BBB veidošanā un līdzdalību ECM pārmaiņās (Garcia *et al.*, 2004). CNS rajonos paaugstināta TGF- $\beta$ 1 ekspresija novērota akūtu – išēmijas, traumu, encefalīta – un hronisku neurodeģeneratīvu saslimšanu gadījumos, uzsverot tā lomu smadzeņu šūnu atbildes reakcijā bojājumu/novecošanās gadījumos (Bae *et al.*, 2011). Jaunākie ziņojumi apstiprina paaugstinātu TGF- $\beta$ 1 līmeni asins plazmā hronisku alkohola lietotāju izpētes grupā (Kim *et al.*, 2009); korelācija starp paaugstinātu TGF- $\beta$ 1 līmeni perifēro asiņu plazmā un CC slāņa biezuma mērījumiem apstiprinās Pirasa un kolēģu (Piras *et al.*, 2012) pētījumā.

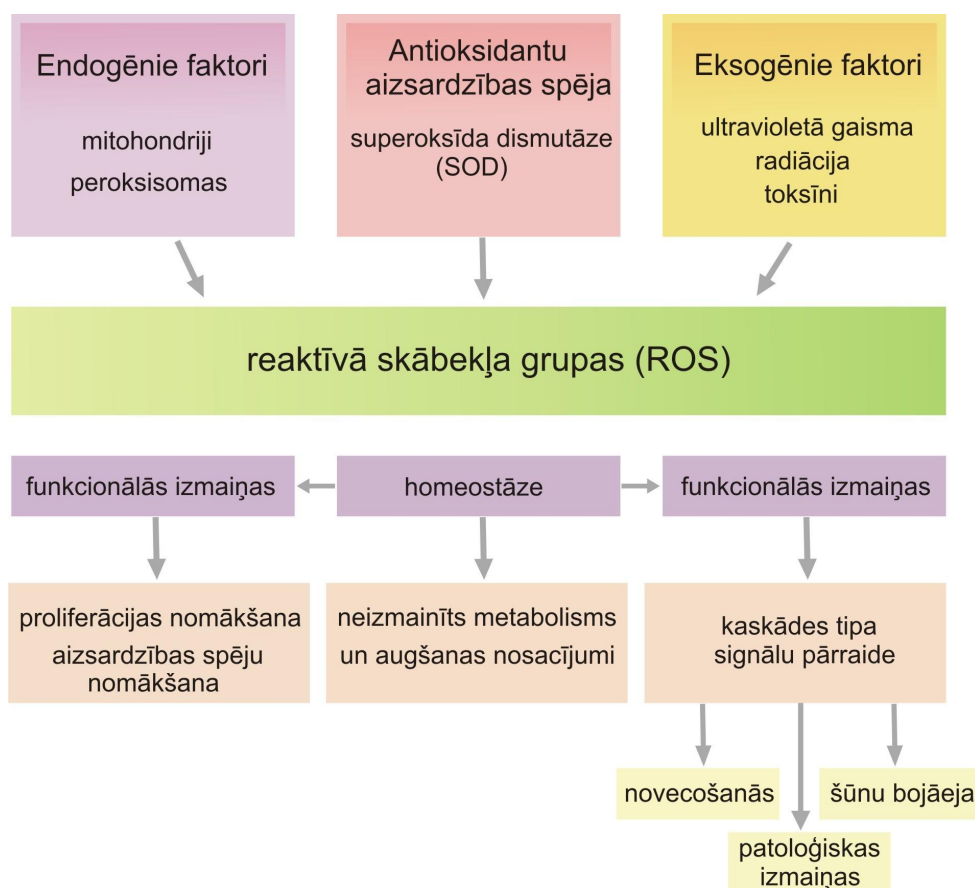
### 2.6.2. NGFR un tā loma CNS notiekošajos procesos

Neirotropīni, tajā skaitā nervu augšanas faktors (NGF), ir nozīmīgi nervaudu homeostāzes, attīstības, funkcionēšanas un plasticitātes regulatori. NGF piedalās aksonu un dendrītu veidošanās procesā, inervācijas un proteīnu ekspresijas regulācijā, nodrošinot normālu nervu šūnu funkcionēšanu. Pieaugušo nervaudos NGF nodrošina sinaptisko funkciju un ietekmē sinaptisko plasticitāti (Berry *et al.*, 2012). NGF aktivē divu dažādu grupu receptorus – transmembrānu tirozīna kināzes saimes (Trk) un p75NTR (pazīstamu kā NGFR) receptorus, kas pieder tumora nekrozes faktoru receptoru klasei (Huang and Reichardt, 2001). NGF kopā ar NGFR un Trk izšķiroši ietekmē smadzeņu holīnerģiskos neironus, kas degradējas neirodeģeneratīvu saslimšanu gadījumos un novecojot (Fischer *et al.*, 1987). Hroniskiem alkohola lietotājiem NGF receptoru samazināšanās rezultātā (Miller *et al.*, 2002) novēro izmaiņas neironos (Cadete-Leite *et al.*, 2003). Pētījumi rāda, ka alkohola vai heroīna iedarbība NGF līmeni būtiski paaugstina gan eksperimentos izmantoto dzīvnieku, gan cilvēku asinīs (Aloe *et al.*, 1996). Pēdējo gadu pētījumi (Mamidipudi and Wooten, 2002; Johnston *et al.* 2007) demonstrē dažādus rezultātus par cilvēka p75NTR. Tiek ziņots par tā paaugstinātu ekspresiju aksonu augšanas laikā, kā arī sniegti pretrunīgi dati par tā klātbūtni neironālās reģenerācijas gaitā. Lai gan p75NTR ekspresija pieaugušo smadzenēs nav izteikta, ieskaitot *nucleus caudatus* un *putamen* holīnerģiskos neironus, pētījumi atklāj sensomotorās CC piramidālās šūnās p75NTR proteīnus pieaugušām žurkām, kā arī šī proteīna ekspresiju oligodendrocītos un – nelielā daudzumā – astrocītos (Sofroniew *et al.*, 2001). Pētījumu dati par neirotropīna ekspresiju dažādos smadzeņu rajonos ir ļoti daudzveidīgi, eksperimentāli pētījumi rāda, ka alkohola lietošana negatīvi ietekmē NGFR ekspresiju un samazina augšanas faktora sintēzi un sekrēciju (Heaton *et al.*, 2003; Gericke *et al.*, 2006).

### 2.7. Cu/Zn superoksīda dismutāze un antioksidatīvā aizsardzība smadzenēs

Nozīmīga loma organisma antioksidatīvajā aizsardzībā ir superoksīda dismutāzei (SOD), kas katalizē superoksīda radikāļu pārvēršanu skābeklī un ūdeņraža peroksīdā. Tā kopā ar citiem antioksidantu fermentiem aizsargā organismu, tajā skaitā nervaudus, no

augsti toksiskiem skābekļa radikāļiem un no iespējamā oksidatīvā stresa (Finkel and Holbrook, 2000; Zelko *et al.*, 2002; Yon *et al.*, 2008; Linseman, 2009). Cu/Zn SOD (SOD1) – metālus saturošais enzīms, kas parasti ekspresējas visos audos un šūnās, lokalizējas galvenokārt citosolā, nedaudz arī kodolā, peroksisomās, lizosomās (Lindenau *et al.*, 2000; Viggiano *et al.*, 2003; Culotta *et al.*, 2006; Gandhi and Abramov, 2012). CNS izmaiņas izraisa endogēnie un eksogēnie faktori, īpaša ietekme ir alkohola izraisītam oksidatīvam stresam (Finkel and Holbrook, 2000), (2.7. att.).



**2.7. att. Oksidatīvā stresa izraisītie faktori un iespējamās sekas.  
Modificēts pēc Finkel and Holbrook, Nature, 2000**

Superoksīda anjoni ir sevišķi reaktīvi radikāļi, un to paaugstināts līmenis konstatēts daudzās patoloģiskās situācijās. Nav vienota viedokļa par neurodeģeneratīvo slimību attīstību, jo pētījumi liecina, ka nervu šūnu bojāeja saistāma gan ar pazeminātu, gan pārmērīgi augstu SOD koncentrāciju (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2002; Maier and Chan, 2002). Pētījumi liecina, ka paaugstināta SOD aktivitāte var būt saistāma ar aizsardzības mehānismu aktivāciju pret reaktīvā skābekļa izraisīto bojājumu risku. Tajā pašā laikā ir ziņojumi par metālu jonu, kas atbrīvojušies pēc oksidatīvā stresa iedarbības

uz enzīmu, radot pārmērīgi lielu to daudzumu, toksicitāti, izraisot dažādu patoloģisko procesu attīstību neurodeģeneratīvo slimību gadījumos (Kocatürk *et al.*, 2004; Johnson and Giulivi, 2005).

Oksidatīvais stress iesaistīts vairāku slimību – aterosklerozes, miokarda infarkta, Parkinsona un Alzheimer slimības patoģenēzē (Sayre *et al.*, 2008), turklāt pētījumi liecina, ka SOD1 aktivitāte dažādu slimību gadījumos var būt gan paaugstināta (Dauna sindroms), gan samazināta (laterālā amiotrofiskā skleroze), kā arī neizmainīta (Seetharaman *et al.*, 2009). Tajā pašā laikā Mančinelī un kolēģu (Mancinelli *et al.*, 2011) pētījums apstiprina oksidatīvā stresa iesaisti alkoholisma, Dauna slimības, kā arī Alzheimer slimību gadījumos. Floreani un kolēģu pētījums pierāda brīvo radikāļu izraisītu iekaisuma mediatoru izdalīšanu no astrocītiem hroniskas alkohola ietekmes gadījumā (Floreani *et al.*, 2010), turklāt apstiprinātas oksidatīvā stresa izraisītas endoplazmatiskā tīkla izmaiņas, tajā skaitā nervu šūnās, alkohola lietošanas ietekmei mijiedarbojoties ar ārējiem, ģenētiskiem faktoriem, medikamentu vai vīrusu iedarbības gadījumā (Ji, 2012). Antioksidantu aktivitātes disbalanss bieži paaugstina lipīdu peroksidāciju, izraisot molekulāru procesu kaskādi, kā rezultātā notiek, piemēram, pastiprināta lipofuscīna veidošanās (Maier and Chan, 2002).

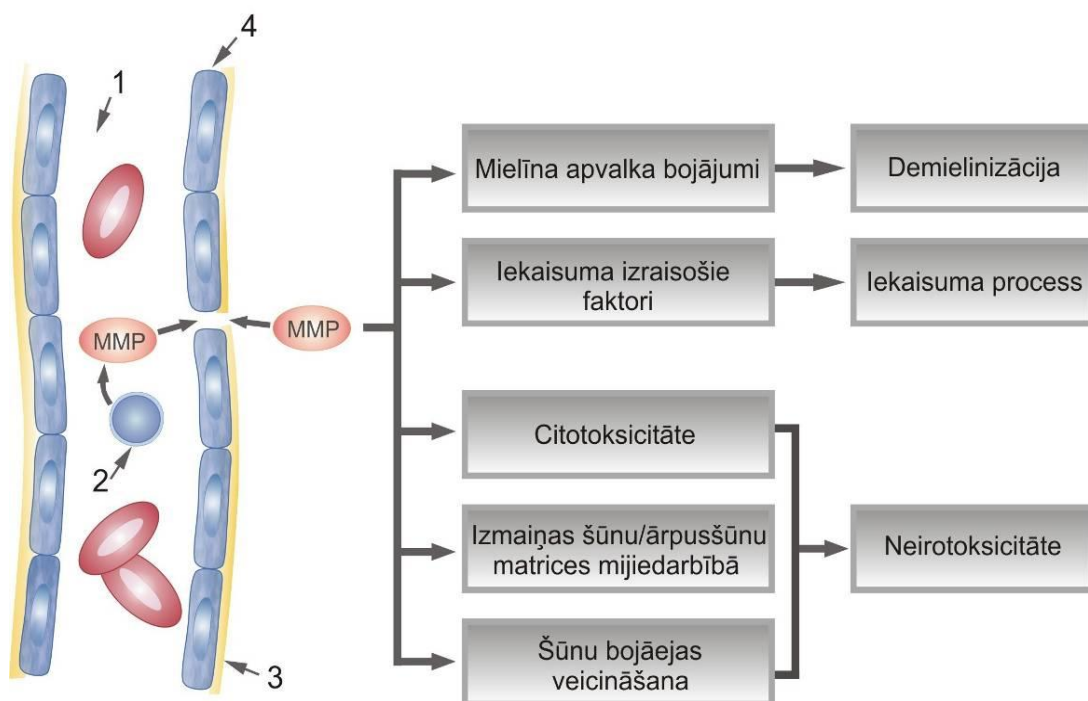
Ir skaidrs, ka SOD ir 1) īpaša nozīme ātrajā reakcijā ar superoksīda anjonu, 2) klātesošs katrā orgānā un katrā šūnā; 3) augsta SOD koncentrācija salīdzināma ar brīvo radikāļu koncentrāciju. Lokalizācijai un SOD1 aktivitātes izvērtējumam audos ir pievērsta paaugstināta interese, jo tas sniedz informāciju par šūnu atbildes iespējām uz oksidatīvā stresa izraisītiem procesiem. SOD1 ekspresija un aktivitāte raksturo gan nervaudu, gan organisma antioksidatīvo statusu kopumā, kā arī nervu šūnu bojāejas pakāpi.

## **2.8. Matrices metaloproteināzes un to nozīme CNS patoloģiju patoģenēzē**

Matrices metaloproteināzes (MMP) tradicionāli saistītas ar ECM pārveidi audu morfoģenēzes laikā dzīves garumā. MMP pieder proteāžu grupai, kas tiek iedalīta apakšgrupās un ietver želatināzes, stromelizīnus, kolagenāzes, ar membrānu saistītas metaloproteināzes un citas – kopā ap 25 paveidiem. MMP vairākumam normālos apstākļos ir neliela ekspresija, tā tiek inducēta ECM pārveides gadījumos. MMP tiek

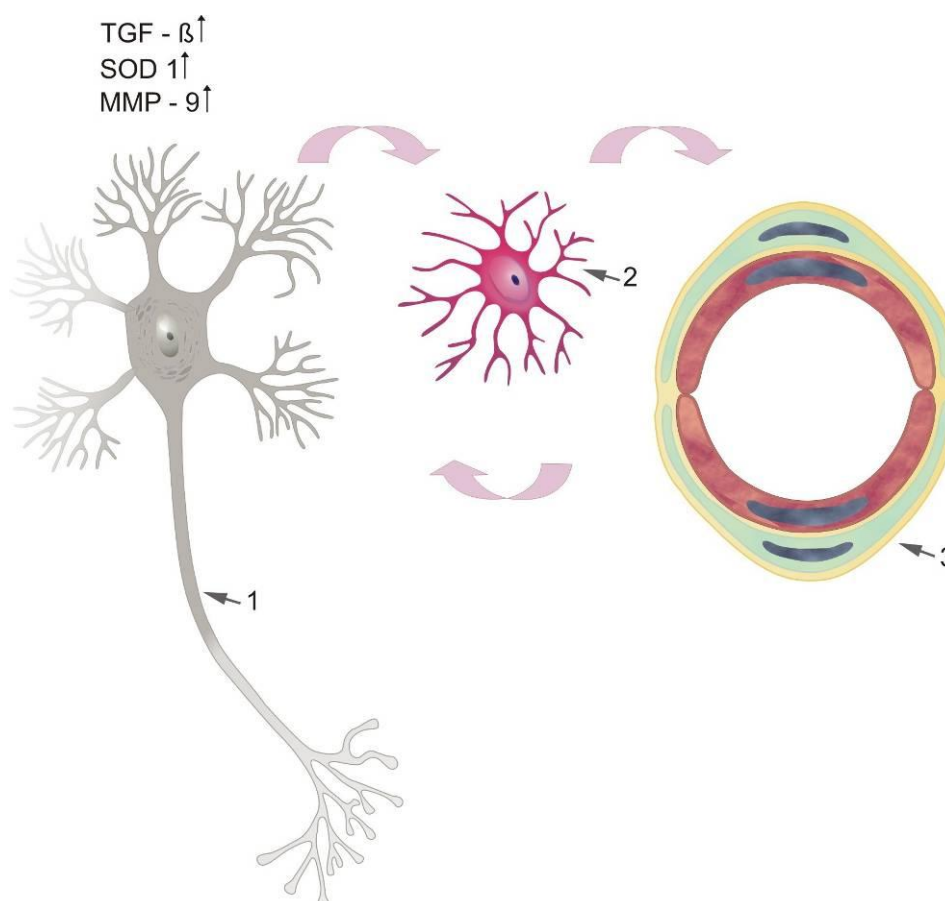
sekretēts kā latents enzīms, kura aktivāciju regulē endogēni MMP inhibitori, tādējādi tā fizioloģiska vai patofizioloģiska aktivācija var kļūt par izšķirošu regulējošu signālu (Yong, 2005). Ierosinātāji, kas izraisa MMP aktivāciju, ir šūnu specifiski, un ROS iesaistās signālu ceļos, kas izraisa endogēnu enzīma aktivāciju (Morita-Fujimura *et al.*, 2000). MMP ekspresijas un aktivitātes regulācija ir sarežģīts process, tas tiek precīzi vadīts trijos atšķirīgos līmeņos: gēnu transkripcijas, pro-enzīma aktivācijas un TIMP aktivācijas ceļā, turklāt dažādi citokīni, ieskaitot tumora nekrozes faktoru-alfa, interleikīnu-1, TGF- $\beta$ , eikosanoīdus, spēj tieši inducēt vai nomākt MMP ekspresiju transkripcijas līmenī (Hartung and Hieseler, 2000; Rosenberg, 2009). Ārpusšūnu MMP aktivācija saistīta ar citu MMP, plazmīna-plazminogēna kaskādes un dažādu proteināžu aktivāciju (Zhang *et al.*, 2010). Dažādu akūtu un hronisku neiroloģisko saslimšanu pētījumu ietvaros ziņots par patoloģisku MMP ietekmi smadzeņu traumā, Alcheimera, cilvēka imūndeficīta vīrusa saistītās demences, multiplās sklerozes un migrēnas gadījumos. MMP izraisa BBB bojājumus, citokīnu produkciju un imūnās atbildes ierosi, demielinizāciju, kā arī ekspresējas audzēju, angiogēnēzes un ECM degradācijas gadījumos (Gupta, 2009). MMP izraisa BBB bojājumus Hantingtona slimības gadījumā (Duran-Vilaregut *et al.*, 2011); ziņots, ka oksidatīvā stresa izraisīta MMP aktivitāte var inhibēt neurodeģenerāciju (Wright and Harding, 2009).

MMP9 pieder cinka atkarīgai želatīnāžu grupai un ir viena no vairāk minētajām metaloproteināzēm pētījumos par smadzeņu patoloģijām. Normā MMP9 nav cerebrospinalajā šķidrumā, taču tā līmenis paaugstinās ar cilvēka imūndeficīta vīrusa saistītās demences gadījumā (Yong *et al.*, 2001). Nav noskaidrots, kāds orgāns iesaistās MMP9 līmeņa paaugstināšanā serumā alkohola lietošanas gadījumos (Sillanauke *et al.*, 2002). Pieejami dati par MMP9 iesaisti selektīvas neironu bojāejas procesos hipokampā išēmijas gadījumos (Lee *et al.*, 2004). Pētījumā ar dzīvnieku modeļiem novērota paaugstināta MMP9 ekspresija gan agrīnajā, gan vēlīnajā fāzē pēc smadzeņu traumas, kad MMP9 ekspresija novērota endoteliocītos un neitrofīlos leukocītos, radot izmaiņas BBB un iesaistoties sekundārās cerebrovaskulāra bojājuma kaskādes reakcijās un demielinizācijā (Seo *et al.*, 2013), (2.8. att.).



**2.8. att. Metaloproteināžu iesaiste BBB bojājumu, iekaisuma, demielinācijas un neurodeģenerācijas procesos; 1 – asins kapilārs, 2 – limfocīts, 3 – bazālā membrāna, 4 – endoteliocīti. Modificēts pēc Yong *et al.*, Nature Reviews Neuroscience, 2001**

Starpšūnu telpa, kas aizņem ap 20% no nobriedušu smadzeņu apjoma, satur augsti organizētu ECM, kas ļauj prezentēt augšanas faktorus šūnu virsmas receptoriem (Dityatev *et al.*, 2010). Pētījumā ar dzīvnieku modeļiem, kam zemgarozas baltajā vielā veikta MMP9 mikroinjekcija, demonstrēti metaloproteināžu regulācijas traucējumi multiplās sklerozes gadījumā. Ir iespējams, ka MMP, degradējot ECM, veicina aksonu bojājumus, turklāt tas korelē ar iekaisuma reakciju (Newman *et al.*, 2001). Mielīna pamatproteīns – viena no mielīna komponentēm (Hemmer *et al.*, 2002); lokalizējas mielīna apvalka iekšpusē (Omlin *et al.*, 1982). Veids, kādā ECM esošās proteināzes degradē mielīna pamatproteīna produkciju, to šķēļot (Gijbels *et al.*, 1993; Chandler *et al.*, 1997), ir neskaidrs. Ir iespējams, ka brīvie radikāļi un citi enzīmi piedalās signālceļos, izraisot iekšēji lokalizētā enzīma aktivāciju (Rosenberg, 2002; Hsieh *et al.*, 2010), (2.9. att.).



**2.9. att. Shematisks attēlojums neironu (1), astrocītu (2) un BBB (3) sarežģītai mijiedarbībai, iesaistoties MMP9, TGF- $\beta$ 1 un superoksīda dismutāzei. Dati no Page-McCaw *et al.*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007; Rosenberg, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2012; Mentlein *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012**

MMP9 iesaistās sinapšu pārveidē, ieskaitot glutamāterģiskās sinapses, to aktivitāte var norādīt gan uz fizioloģisku norišu, gan patoloģisku nosacījumu mainītu sinaptisku plasticitāti (Michaluk *et al.*, 2011). Pētījumos ar dzīvnieku modeļiem par želatīnāžu aktivāciju un iesaisti Alcheimera, epilepsijas slimību un dažādu atkarību izraisīto vielu lietošanas gadījumos noskaidrots, ka kompleksi procesi šūnu un molekulāros mehānismos ietekmē sinaptisko plasticitāti, tajā pašā laikā norādot, ka MMP/TIMP sistēma ir aktīva gan neironos, gan glijas šūnās, regulējot smadzeņu funkcijas (Mizoguchi *et al.*, 2011). MMP9 ekspresija novērota neironos (Szklarczyk *et al.*, 2002), astrocītos (Lee *et al.*, 2004) un astrocītu kultūrā (Hsieh *et al.*, 2010), mikroglijā un makrofāgos (Kaczmarek *et al.*, 2002; Yong, 2005), bet ne asins kapilāru endoteliocītos kontrolē dzīvnieku grupā (Duran-Vilaregut *et al.*, 2011).

## 2.9. Apoptoze un tās raksturojums hroniska alkoholisma gadījumos

Programmēta šūnu bojāeja ir būtiska normālas audu homeostāzes nodrošinātāja. Neironu bojāeja saistāma ne tikai ar akūtām, bet arī hroniskām smadzeņu saslimšanām. Izšķir divus mehānismus – apoptozi un nekrozi, pie kam abiem veidiem ir būtiska nozīme dažādu nervu slimību norisē. Morfoloģiski apoptoze raksturojas ar šūnas ķermeņa samazināšanos, mitohondriju, citoskeleta, kodola hromatīna izmaiņām un membrānas ietvertu apoptotisko ķermenīšu veidošanos (Yu *et al.*, 2001; Casha *et al.*, 2001; Elmore, 2007). Viena no hipotēzēm, kas izvirzīta saistībā ar apoptozi, uzsver neirotropīnu nozīmi, to slāpējot, vai, gluži pretēji, šūnas bojāejas ierosināšanā, neirotropīniem saistoties ar neirotropīnu receptoru (Yuan and Yankner, 2000; Saito *et al.*, 2005). Kaskādes tipa reakciju noritē apoptozes gadījumā nozīmīgs ir mitohondriālais ceļš, kad novēro pēkšņu mitohondriālās ārējās membrānas caurlaidību proteīniem, kas parasti sastopami starp iekšējo un ārējo mitohondriālo membrānu (Green and Kroemer, 2004; Ferri and Kroemer, 2001).

Hroniska alkohola lietošana izraisa smadzeņu lielo pusložu garozas, smadzenīšu atrofiju, negatīvi ietekmē neironu darbību hipokampa un prefrontālās CC rajonā, 50 – 75% gadījumos izraisot demenci (Kruman *et al.*, 2012). Magnētiskās rezonanses attēlošanas analīze apstiprina pelēkās un baltās vielas apjoma samazināšanos pieres daivas un prefrontālās garozas, kā arī *striatum* rajonā hroniska alkohola lietošanas gadījumā (Ikegami *et al.*, 2003; Harper and Matsumoto, 2005; Sullivan *et al.*, 2005). Pētījumā ar dzīvniekiem histoķīmiskas un elektronmikroskopiskas analīzes rezultātā apstiprināta nigrostriatālo dopamīnerģisko neironu bojāeja mitohondriāla un oksidatīva stresa dēļ intoksikācijas gadījumā (Lin *et al.*, 2012). Fabriciusa un kolēģu pētījumā, pielietojot stereoloģiskās metodes, apliecināts, ka nav būtiskas starpības starp neironu un glijas šūnu daudzumu hronisku alkohola lietotāju un kontroles grupas CC rajonos (Fabricius *et al.*, 2007), tomēr pastāv apliecinājumi, ka alkohols izmaina sinaptisko plasticitāti (Takeuchi *et al.*, 2012), astrocītu jutību, kas negatīvi ietekmē neironu-glijas šūnu komunikāciju (González and Salido, 2009) un izraisa to bojāeju (Vallés *et al.*, 2004).

## 2.10. Aknu morfofunkcionāls raksturojums un nozīme detoksikācijas procesā

Aknas kā funkcionāli daudzveidīgs orgāns sastāv no atšķirīgām šūnām, kuras sakārtotas noteiktā secībā, veidojot aknu daiviņas, portālos laukus ar noteiktu asinsrites un žults izvadceļu sistēmu. Lielāko šūnu daļu aknās sastāda hepatocīti, bet būtiska loma šī orgāna darbībā ir arī aknu zvaigžņveida šūnām, Kupfera šūnām, sinusveida asins kapilāru endoteliocītiem un citām šūnām. Visbiežāk patoloģiskais process skar aknu daiviņu portālos laukus, tur parādoties infiltrējošām šūnām (limfocītiem, aktīviem makrofāgiem, neitrofiliem leukocītiem u.c.), kas reaģē uz infekciozo vai kādu citu aģentu. Infekciozā aģenta ietekmē morfoloģiskās izmaiņas aknās var būt ļoti dažādas. Pārmaiņām šo šūnu strukturālajā un ultrastrukturālajā uzbūvē seko patoloģiskas izmaiņas un bieži attīstās fibroze (Afdhal and Nunes, 2004; Teutsch, 2005).

Alkohola izraisīto aknu morfoloģisko izmaiņu spektrs variē no neizteiktas triglicerīdu uzkrāšanās hepatocītos līdz cirozei un hepatocelulārai karcinomai. Hroniska alkohola lietošana ir biežākais aknu fibroģenēzes un cirozes etioloģiskais faktors rietumu sabiedrībā (Breitkopf *et al.*, 2005). Raksturīgākās histoloģiskās atradnes aknās ir steatoze, pericelulāra/perisinusoidāla fibroze, ciroze un neitrofilo leukocītu infiltrācija. Izmaiņas šūnu līmenī variē, bet bieži ietver Malori ķermenīšu, megamitohondriju un tauku ieslēgumu klātbūtni, kā arī gludā endoplazmatiskā tīkla hiperplāziju hepatocītos (Diehl, 2002; Kleiner *et al.*, 2005; Ramirez *et al.*, 2013). Savukārt 90% gadījumos narkotisko vielu lietotājiem raksturīga limfocītu, plazmatisko šūnu un neitrofilo leukocītu infiltrācija daiviņu un portālo traktu rajonos (Weller *et al.*, 1984; Milroy and Parai, 2011), kā arī progresējoša fibroze (Wilson *et al.*, 2006).

Transformējošais augšanas faktors beta (TGF- $\beta$ ) ir viens no svarīgākajiem fibrozi veicinošiem citokīniem, kas izraisa ECM veidošanu, angiogēnēzi un imunomodulāciju. TGF- $\beta$  aktivācija izsauc aknu zvaigžņveida šūnu ražotās ECM veidošanos (Siegmund *et al.*, 2005; Gerjevic *et al.*, 2012). TGF- $\beta$  iesaistīts aknu zvaigžņveida šūnu aktivācijā, līdz ar to tas ir nozīmīgs vietējais regulators. TGF- $\beta$  ekspresija norāda uz šūnu izmēra izmaiņām aktīva citoskeleta reorganizācijas rezultātā (Meyer *et al.*, 2010). Savukārt SOD1 ir nozīmīga loma organisma antioksidatīvajā aizsardzībā (Cederbaum *et al.*, 2009). Pētījumā ar laboratorijas dzīvniekiem pierādīts, ka pazemināts SOD līmenis negatīvi ietekmē aknu hepatocītu aizsardzības spējas alkohola ietekmē (Kessova *et al.*, 2003).

### 2.11. Jonu homeostāze, mikroanalīze un tās iespējas CNS struktūrelementu izpētē

Jonu homeostāze smadzenēs, tajā skaitā nātrija (Na) jonu līmenis un no tā atkarīgie Na jonu kanāli, kas lokalizējas membrānās astrocītu izaugumos, endodēmas šūnās un neironos, tiek stingri kontrolēti (Shimizu *et al.*, 2007). Pētījumā ar eksperimenta dzīvniekiem uzsvērtā astrocītu nozīme, kontrolējot lokālo mikrocirkulāciju. Paaugstināta neironu aktivitāte sekmē selektīvu, ar kalcija (Ca) joniem saistītu signālu izraisītu vazodilatāciju (Takano *et al.*, 2006). Pārlietu augsts Ca jonu līmenis sekmē mitohondriālās membrānas izmaiņas, kas rezultējas ar mitohondriālu tūsku (Medana and Esiri, 2003).

Nav noskaidrots, kā Mn šķērso BBB, izraisot intoksikāciju un neatgriezeniskas neiroloģiskas izmaiņas, bet ir skaidrs, ka Mn metabolisma izmaiņas ietekmē alkohola lietošana (Bouchard *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Stepens *et al.*, 2008).

Pētījumi apstiprina, ka izmaiņas šūnu homeostāzē, kas saistāmas ar Ca, kālija (K), hlora (Cl) jonu izmaiņām, kā arī toksiska magnija (Mg) iedarbība un glutamāta ierosināta neironu bojāeja, vai endogēnā cinka (Zn) translokācija postsinaptiskajos neironos kļūst par nozīmīgiem faktoriem programmētas šūnu bojāejas kaskādes reakciju laikā (Yu, 2001). Parkinsona slimības gadījumā, izmantojot enerģiju dispersās spektroskopijas (EDS) metodi, noteikts, ka Ca, Cu un Mg jonu līmenis bija nosakāms, tomēr nepietiekošs tālākas analīzes veikšanai, taču dzelzs (Fe), K, Na un Zn jonu līmenis bija nosakāms un ticami atšķirīgs, salīdzinot SN rajonu ar melanīnu saturošiem neironiem un zemgarozas pelēkās vielas (ietverot arī CS) rajonu. Noteikts arī īpaši augsts Fe un alumīnija (Al) jonu līmenis, kas, iespējams, ietekmē Parkinsona slimības gaitu (Hirsch *et al.*, 1991). Pētījumā ar eksperimenta dzīvniekiem ar šādu metodi noteikta Al spēja pastiprināti uzkrāties divpadsmitpirkstu zarnā, nierēs un aknās, izteikti akumulējoties lizosomās (Kametani, 2002). Paaugstināta Al un Fe uzkrāšanās spēja konstatēta pētījuma dzīvnieku aknās (Stacchiotti *et al.*, 2008). Ar caurstarojošā elektronu mikroskopa enerģiju dispersās spektroskopijas sistēmu noteikts paaugstināts Al līmenis nervu šķiedrās un nervu šūnu citoplazmā – pretēji ECM – gan hipokampa, gan denīņu daivas rajonos Alzheimerā pacientiem (Yumoto *et al.*, 2009). Behčeta saslimšanas gadījumā pētīts *pons cerebri* rajons, nosakot gan organiskos bioloģiskos pamatelementus oglekli (C), skābekli (O), fosforu (P), sēru (S), gan neorganiskos elementus Mg un Ca, konstatējot par 20% augstākus C, O un P elementu mērījumu

rādītājus kontroles grupā (Aranyosiova *et al.*, 2008). Novecošanās periodā kopējā Fe koncentrācija pieaug tajos smadzeņu rajonos, kurus skar deģeneratīvas smadzeņu patoloģijas, ieskaitot Alcheimera, Parkinsona un Hantingtona slimības. Nespēja regulēt Fe homeostāzi ģenerē papildu reaktīvu Fe, kas negatīvi ietekmē astrocītus, mikrogliju un neironus. Izpratne par Fe regulācijas traucējumiem sniedz nozīmīgu informāciju par progresējoša neironu zuduma patoģenēzi (Zecca *et al.*, 2004).

Ķīmisko elementu koncentrācijas noteikšanai ērti lietojama ir rentgenstaru fluorescences (XRF) metode. Izmantojot paraugu ierosināšanai submikronu izmēros fokusētu sinhrotrona rentgenstarojumu vai protonu kūli ("PIXE"), kļuvis tehniski iespējams noteikt Mn koncentrācijas audos koncentrācijās zem 1 µg/g ar telpisko izšķiršanu 300nm (Robison *et al.*, 2012; Dučić *et al.*, 2013). Rentgenstaru fluorescences parādību var izmantot elementu analīzei arī SEM, kur rentgenstarus ierosina elektronu kūlis. To parasti apzīmē kā EDX vai EDS. Tā tikusi izmantota kvantitatīvai galveno CNS audus veidojošo elementu analīzei (Chwiej *et al.*, 2005), taču jautājums par tās pielietojamību mazākās koncentrācijās klātesošu elementu analīzei ir palicis atklāts.

### 3. MATERIĀLI UN METODES

#### 3.1. Izpētes materiāls un tā iedalījums grupās

Pētījumā izmantots SIA "Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas" Patoloģijas centra un Valsts Tiesu medicīnas ekspertīzes centra smadzeņu un aknu audu arhīva materiāls, iegūts laika posmā no 2007. – 2012. gadam no 46 hronisku alkohola lietotāju, 10 narkotisku vielu lietotāju un 12 kontroles grupas autopsiju audiem (1.tabula pielikumā).

Pētījuma gaitā ietverti sekojoši 5 etapi:

I. Pētāmā materiāla iegūšana un atlase.

Pētījuma sākotnējā etapā tika veikta SIA "Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas" Patoloģijas centra pacientu vēstures izrakstu (laika posmā no 2007. līdz 2010. gadam) analīze, tādējādi atlasot 13 gadījumus ar diagnozi „hronisks alkoholisms”. No Valsts Tiesu medicīnas ekspertīzes centra laika posmā no 2007. līdz 2012. gadam tika iegūts materiāls, sertificētam patanatomam sekciju laikā izvērtējot 1) smadzeņu, sirds, aknu un aizkuņģa dziedzera patanatomisko ainu makroskopiskajā līmenī iespējamām hroniskiem alkohola lietotājiem (Ji, 2012), 2) dūrienu pēdu esamību iespējamām narkotisko vielu lietotājiem. Smadzeņu audu materiāls ņemts saskaņā ar Daubera (Dauber, 2007) atlantā ietvertiem smadzeņu attēliem, precīzi ievērojot pētāmo rajonu atrašanās vietu. Turpmāk, lai papildus izvērtētu iespēju materiālu iekļaut izpētes grupās, ņemti vērā Valsts Tiesu medicīnas ekspertīzes centra arhīva materiālu asins un urīna ķīmisko analīžu rezultāti (paaugstināta etanola un/vai citu atkarību izraisīšu vielu koncentrācija) un histoloģisko izmeklējumu dati. Veidojot hronisku alkohola lietotāju pētījuma grupu, izmantoti ieslēgšanas kritēriji saskaņā ar Harpera un kolēģu ziņojumu (Harper *et al.*, 2003). Pētījumā izmantoti audi ar 7 – 36 h *post mortem* intervālu.

Tāpat visiem pētījumā iekļautajiem gadījumiem veikta aknu morfoloģiskā analīze, kā arī papildus imūnhistoķīmisks nepieciešamo marķieru ekspresijas izvērtējums, kas atspoguļots promocijas darba attiecīgajā apakšnodaļā, pamatojot materiāla iekļaušanu pētījumā.

Pēc materiāla atlases izveidotas šādas grupas:

1. Hroniski alkohola lietotāji: 34 vīrieši vecumā no 33 līdz 66 g. (73,9%), 12 sievietes vecumā no 44 līdz 60 g. (26,1%). Hronisku alkohola lietotāju vidējais vecums

bija  $47 \pm 10$  gadi. 17 no 25 (68%) hroniskiem alkohola lietotājiem asinīs konstatēts etanols no 0,53 līdz 4,07 ‰; citas vielas asinīs un urīnā nav konstatētas.

2. Narkotisko vielu lietotāji: deviņi vīrieši vecumā no 22 g. līdz 45 g. (90%), viena sieviete 22 g.v. (10%). Narkotisko vielu lietotāju vidējais vecums bija  $34 \pm 8$  gadi. Piecos gadījumos narkotisko vielu lietotāju asinīs konstatēts arī etanols no 0,59 līdz 1,67 ‰. Narkotisko vielu lietotāju asinīs konstatēti opioīdi (morfīns, metadons un tramadols). Benzodiazepīns konstatēts vienā, karbamazepīns – vienā gadījumā. Metkatinona lietotāji: divi.

Kontroles grupā iekļauti 12 gadījumi, vecumā no 17 līdz 37 g., sertificētam patanatomam izslēdzot sirds-asinsvadu, elpošanas sistēmas un aknu patoloģijas, kā arī papildus morfoloģiskās analīzes rezultātā veicot smadzeņu un aknu audu atlasī. Grupā iekļauti 10 vīrieši (83,3%) un 2 sievietes (16,7%). Kontroles grupā vidējais vecums bija  $29 \pm 6$  gadi.

Lai pārbaudītu iespējamās pārmaiņu korelācijas ar vecumu, no hronisku alkohola lietotāju grupas tika izveidotas divas apakšgrupas: 1. – gados jauni alkohola atkarīgie (zem 34 g.) un 2. – gados veci alkohola lietotāji (virs 60 g.).

## II. Marķieru izvēle imūnhistoķīmisko reakciju veikšanai.

Balstoties uz pasaules literatūras analīzes rezultātiem par nervaudu un smadzeņu neironu un glijas šūnu struktūru un tajā notiekošo procesu izpēti ar biomarķieriem un attiecīgām antivielām, tika izveidots promocijas darbā izmantojamo marķieru un antivielu klāsts.

## III. Trīs smadzeņu rajonu audu materiāla analīze.

Balstoties uz zinātnisko rezultātu iztrūkumu par selektīvo CNS jutīgumu un ievainojamību psihoaktīvo vielu ietekmē salīdzinošā aspektā, tika ieplānota trīs smadzeņu rajonu audu materiāla analīze, pielietojot gaismas, imūnhistoķīmijas, elektronu mikroskopijas (TEM un SEM) un rentgenmikroanalīzes metodes.

## IV. Pielietoto metožu informativitātes analīze, izmantojot datu statistiskās apstrādes metodes.

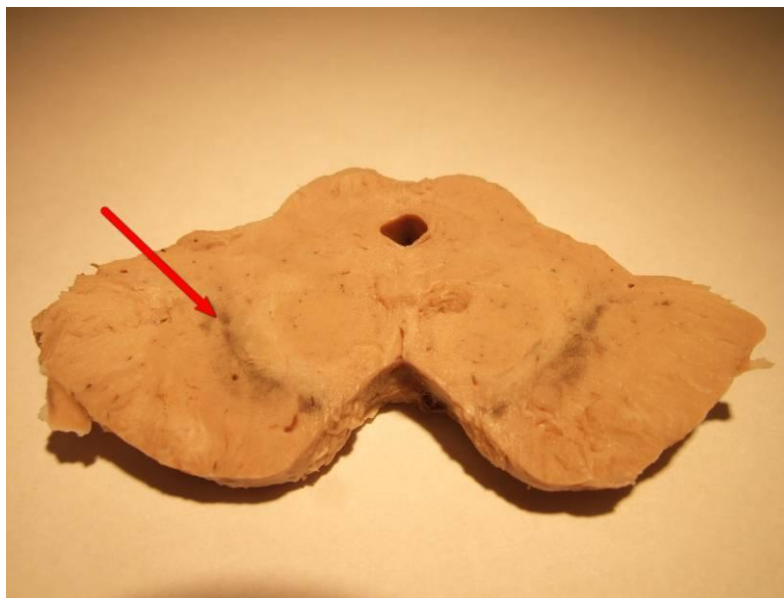
Datu statistiskās apstrādes metožu klāsts tika izvēlēts, lai objektivizētu un kvantificētu atradnes par marķieru ekspresiju CNS, veicot salīdzinājumu starp smadzeņu rajoniem un izpētes grupām.

## V. Ķīmisko elementu koncentrāciju izmaiņu analīze smadzeņu audu uzbūves elementos.

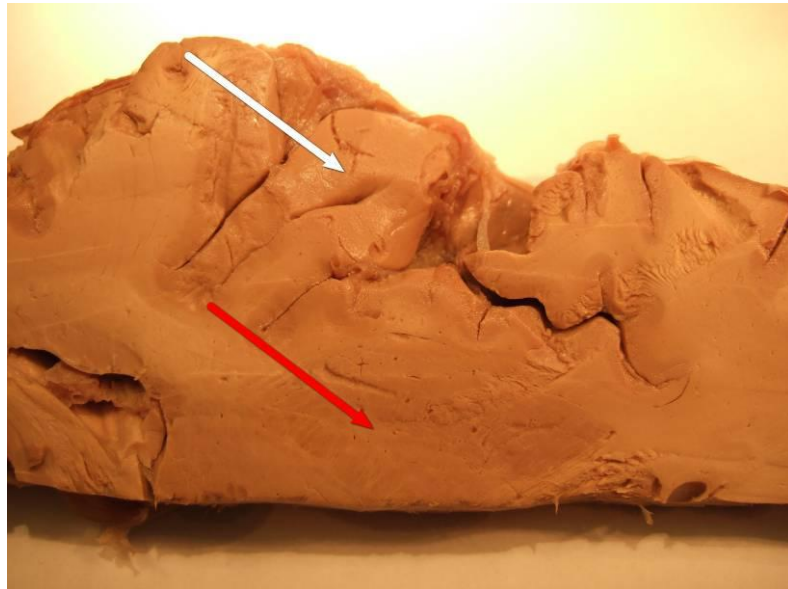
Ķīmisko elementu, tostarp metālu, koncentrāciju izmaiņu analīze smadzeņu struktūrās tika paredzēta, lai izvērtētu metodes informativitāti un noteiktu mikroelementu koncentrāciju audos, kā arī korelētu EDX atradnes ar smadzeņu izmaiņām struktūras un ultrastruktūras līmenī.

### 3.2. Materiāla apstrāde analīzei gaismas mikroskopā

Smadzeņu audu materiāls no prefrontālās garozas (CC), *substantia nigra* (SN) un *corpus striatum* (CS) ņemts saskaņā ar Daubera (Dauber, 2007) atlantā ietvertiem smadzeņu attēliem, precīzi ievērojot pētāmo rajonu atrašanās vietu (3.1., 3.2. un 3.3.att.).



3.1. att. *Substantia nigra* (bulta) rajons



**3.2. att. *Cortex cerebri* (balta bulta) un *corpus striatum* (sarkana bulta) rajoni**



**3.3. att. Laterālie ventrikuli (bulta)**

Veicot smadzeņu un aknu audu materiāla apstrādi un sagatavošanu mikroskopiskajai analīzei gan gaismas, gan elektronmikroskopijas līmenī, ievērota noteikta secība. Materiāla apstrādes kārtība ir izzināta un teorētiski pamatota. Pētāmā materiāla sākuma apstrādes posmā vienmēr iekļauj audu fiksāciju. Pareiza materiāla fiksācija ir svarīga, lai iegūtu visaugstākās kvalitātes audu griezumus. Audu fiksācijai ir nozīme šūnas struktūrelementu, molekulu nostiprināšanā tādā stāvoklī, kādā tie atrodas

dzīvē (attiecīgā funkcionālā stāvoklī). Nepieciešams panākt, lai šūnas mikroskopiskie un submikroskopiskie elementi pēc savas uzbūves, formas un novietojuma būtu maksimāli tuvi stāvoklim pirms fiksācijas (Maunsbach, 1994). Galvenais noteikums ir panākt pēc iespējas mazāku laika atstatumu starp fiksējamā materiāla ieguvī un fiksācijas sākumu (2 min.) (Гайер, 1974; Celis, 1994). Tas ievērojami samazina skābekļa bada, kā arī autolīzes izraisītu izmaiņu rašanās iespējas. Laiku, kas nepieciešams fiksējošam šķīdumam, lai tas sasniegtu audus visā dziļumā, var variēt. Tas atkarīgs no audu struktūras, no fiksējošā šķīduma sastāva, difūzijas spējas un audu parauga izmēra. Fiksācijas kvalitāte atkarīga arī no fizikāliem un fizikāli-ķīmiskiem faktoriem, pie kuriem pieder fiksējošā šķīduma fizikālās un ķīmiskās īpašības, temperatūra, pielietošanas veids un ūdeņraža jonu koncentrācija.

Preparāti, kuri bija pagatavoti, izmantojot gaismas mikroskopijas metodi un ieguldot smadzeņu un aknu audu autopsiju materiālu parafīnā, vispirms tika fiksēti, izmantojot formalīna fiksējošās īpašības. Smadzeņu un aknu audu preparāti ar izmēru  $1\text{ cm}^3$  fiksēti 10% formalīnā. Formalīns sākotnēji reaģē ar audu olbaltumvielām, saistās ar ūdeņradi saturošām grupām, veido oksimetilgrupu. Šī grupa kondensācijas reakcijās reaģē ar citu līdzīgu grupu, kura satur aktīvo ūdeņraža atomu un veido metilēntilpiņus (Гайер, 1974; Maunsbach, 1994). Parastos fiksācijas apstākļos formalīns var reaģēt ar aminogrupām, ar pirmējām amīdgrupām, guanidīngrupām, kā arī ar fenolgrupām, bet izveidojušās saites bieži ir nestabilas. Uzskata, ka notiek reakcijspējīgas grupas nepilnīga bloķēšana, tāpēc nepieciešamais fiksācijas laiks ir 24 – 72 stundas (Гайер, 1974). Pēc fiksācijas preparāti atūdeņoti pieaugošas koncentrācijas spirta šķīdumos. Atūdeņošana sākas  $50^\circ$  spirtā, pēc tam seko  $70^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $95^\circ$  un absolūtais spirts. Tad smadzeņu un aknu audu gabaliņus iegulda izkausētā parafīnā un sacietina. No sacietētā parafīna blokos ielietā smadzeņu un aknu audu materiāla ar mikrotomu pagatavoti 4 – 6  $\mu\text{m}$  biezi audu griezumus.

### 3.2.1. Rutīnās krāsošanas metode

Parafīna bloku griezumus krāsoja ar hematoksilīnu un eozīnu, lai iegūtu pārskata preparātus. Pārskata griezumus tiek vizualizētas hematoksilīna iekrāsotās šūnu bazofilās struktūras, galvenokārt, šūnu kodolu hromatīns un ribosomas citoplazmā, kā arī eozīna

iekrāsotā šūnu citoplazma, citoskelets, šūnas plazmatiskā membrāna, organoīdu membrānas, bet ārpus šūnas – kolagēna šķiedras. Ar mikrotomu pagatavotus audu griezumus pārnes uz priekšmetstikliņa, kurš pārklāts ar adhezīvām vielām, tad griezumus žāvē istabas temperatūrā vai ievieto termostatā. Tas nodrošina griezumu pielīmēšanu. Pēc tam griezumus deparafinē un krāso. Nokrāsotos audu griezumus atūdeņo spirta šķīdumos, caurspīdina ksilolā un pārklāj ar ieslēgšanas vidi (Celis, 1994).

### 3.2.2. Imūnhistoķīmijas metode

Imūnhistoķīmijas metode ļauj noteikt makromolekulāro komponentu lokalizāciju audos ar antigēna īpašībām (Гайер, 1974). Metode pamatojas uz vienu no visspecifiskākajām reakcijām – uz imunoloģisko reakciju starp antigēnu-antivielu (Celis, 1994).

Pētījumā izmantotas ABC (avidin: biotinylated enzyme complex), HRP Polymer system un EnVision vizualizācijas sistēmas:

1. StreptABC Complex/HRP Duet (biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig, streptavidin, biotinylated horseradish peroxidase (DacoCytomation, Glostrup, Denmark)); vizualizācijai izmantots diaminobenzidīns (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride jeb DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO);

2. HiDef Detection™ HRP Polymer system (CellMarque, Rocklin, CA, USA), ieskaitot HiDef Detection™ Amplifier un HiDef Detection™ HRP Polymer Detector, vizualizācijai izmantots komplekts: DAB substrate kit (UltraMarque™ HRP Detection system);

3. DacoCytomation EnVision + Dual Link System-HRP (DAB+) (DacoCytomation, Glostrup, Denmark), ieskaitot Dual Endogenous enzyme block, Labeled polymer-HRP, vizualizācijai izmantots kits DAB+Chromogen un DAB+Substrate buffer (DacoCytomation, Glostrup, Denmark).

Šajā pētījumā skrīninga veidā smadzeņu audos veiktas imūnhistoķīmiskās reakcijas ar peles monoklonālām antivielām: anti-NSE (Novocastra, Newcastle, UK, Leica Biosystems, 1:100, klons 5E2), anti-GFAP (Novocastra, Newcastle, UK, Leica Biosystems, 1:100, klons GA5), anti-NGFR (DacoCytomation, Carpinteria, CA, USA, 1:50, klons NGFR5<sub>1</sub>). Skrīninga veidā izvēlētos smadzeņu audu gabaliņos aktivētās

Smadzeņu audu analīzei, nosakot oksidatīvā stresa izraisītas izmaiņas, izmantota anti-SOD1 antivielā (Novocastra, Newcastle, UK, Leica Biosystems, 1:100, klons 30F11). Savukārt augšanas faktoru un metaloproteināžu ekspresijas noteikšanai izmantotas šādas antivielas: anti-TGF- $\beta$ 1 (Novocastra, Newcastle, UK, Leica Biosystems, 1:40, klons TGFB17) un anti-MMP9 (Novocastra, Newcastle, UK, Leica Biosystems, 1:40, klons 15W2). TUNEL-pozitīvo šūnu iezīmēšanai izmantots *In Situ* Cell Death Detection Kit, POD marķieris, ieskaitot Enzyme solution, Label solution un Converter-POD (Roche, Mannheim, Germany).

Reakcijas gaita (StreptABC Complex/HRP, HiDef Detection™ HRP Polymer system, DacoCytomation EnVision + Dual Link System-HRP (DAB+)): audu histoloģiskie griezumumi, kuri novietoti uz HistoBond®+ (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) priekšmeta stikliņiem, deparafinizēti ksilolā un hidratēti spirta šķīdumos ar dilstošu koncentrāciju. Pēc tam 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> saturošā metilspirta šķīdumā izturēti 20 – 40 minūtes, vai lietots šķīdums endogēno enzīmu nomākšanai (Dual Endogenous enzyme block). Antigēnās struktūras apstrādei (antigēnu epitopu pieejamības nodrošināšanai) stikliņi vārīti 0,01 M Na citrāta bufera šķīdumā (pH 6,0) 15 minūtes, pēc tam atdzesēti temperatūrā līdz 60° C. ABC vai En Vision pielietošanas gadījumā reakcijas gaitā preparāti inkubēti ar 1% vērša seruma albumīnu (bovine serum albumin fraction V jeb BSA, Roche, Mannheim, Germany) TRIS bufera šķīdumā līdz stundai istabas temperatūrā. Tad preparāti inkubēti ar primāro monoklonālo antivielu saturošu serumu (atšķaidījums ar TRIS bufera un BSA šķīdumu attiecīgi katrai antivielai pēc specififikācijas rekomendācijām) un izturēti 12 stundas ledusskapī 2 – 6 °C temperatūrā. Pēc trīsreizējas skalošanas PBS šķīdumā griezumumi inkubēti kamerā ar sekundāro antivielu saturošo serumu (biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) vai HRP polimēru (Labeled polymer-HRP) 30 minūtes istabas temperatūrā, vai ar HiDef

Detection™ Amplifier 10 minūtes istabas temperatūrā. Tad veikta trīsreizēja skalošana PBS šķīdumā un, attiecīgi, inkubācija (ABC un HiDef Detection™ HRP Polymer system lietošanas gadījumā) ar terciālo antivielu saturošo serumu (streptavidin, biotinylated horseradish peroxidase) 30 minūtes istabas temperatūrā vai HiDef Detection™ HRP Polymer Detector 10 minūtes istabas temperatūrā. Pēc tam veikta skalošana ar TRIS bufera šķīdumu. Turpmāk DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) vai DAB komplekts (UltraMarque™ HRP Detection system vai DAB+Chromogen un DAB+Substrate buffer) lietots kā hromogēns 10 minūtes, bet Meijera (Mayer) hematoksilīns – kā šūnu kodolu krāsviela. Pēc krāsošanas preparāti skaloti krāna ūdenī un dehidratēti augošanas koncentrācijas spirta šķīdumos (70°, 80°, 90°). Nobeigumā preparāti caurspīdināti ksilolā un pārklāti ar ieslēgšanas vidi (ieslēgšanas vide PERTEX, mounting medium for light microscopy, Histolab, Gothenburg, Sweden). Par imūnpozitīvām uzskatītas šūnas, kuras ar diamminobenzidīnu uzrādījušas brūnus reakcijas produktus. Preparāti ar attiecīgā epitopa jau zināmu pozitivitāti lietoti kā pozitīvā kontrole. Minēto preparātu paralēlie griezumī, kuros primārā antivielu aizstāta ar TRIS, izmantoti kā negatīvā kontrole.

TUNEL reakcijas veikšanai skrīninga veidā izvēlētie smadzeņu audu griezumī deparafinizēti, hidratēti spirta šķīdumos ar dīstošu koncentrāciju, tad skaloti destilētā ūdenī. Pēc tam 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> saturošā metilspirta šķīdumā tie izturēti 40 minūtes un pārnesti destilētā ūdens vannā. Tālāk audu griezumī ievietoti Na citrāta bufera šķīduma (pH6) vannā un vārīti 15 minūtes, pēc tam atdzesēti istabas temperatūrā līdz 60°C. Audu griezumī atstāti 1% BSA TRIS bufera šķīdumā uz 1 stundu, pēc tam pārklāti ar TUNEL mix (TUNEL Enzyme solution : TUNEL label, atšķaidījums 1 : 9) un izturēti 1 stundu 37° C temperatūrā termostatā. Pēc skalošanas TRIS bufera šķīdumā griezumī inkubēti ar konvertoru (Converter-POD solution) termostatā 37° C 30 minūtes. Pēc skalošanas TRIS bufera šķīdumā griezumī pārklāti ar DAB (10 minūtes) un skaloti krāna ūdenī. Šūnu kodolu kontrastkrāsošana veikta ar hematoksilīnu, preparāti dehidratēti augošanas koncentrācijas spirta šķīdumos, tad caurspīdināti ksilolā un pārklāti ar ieslēgšanas vidi.

Perlisa reakcija veikta izlases veidā, ietverot gan hronisku alkohola un narkotisko vielu lietotāju, gan kontroles grupas materiālu. Perlisa krāsošanas metodi ar Prūsijas (*Prussian*) zilo rekomendē Fe(III) noteikšanai dzīvnieku audos ātrā un labi izvērtējamā rezultāta dēļ, dodot izteikti zilu krāsu reakcijas produktam (Jellinger *et al.*,1990; Perl and Good,1992).

Antigēnu ekspresijas izvērtējums veikts smadzeņu autopsiju CC, zemgarozas kodolu rajonu pelēkās un ar tiem asociētās baltās vielas rajonos, kā arī laterālo ventrikulu (VL) rajonā, katrā no tiem izvērtējot ekspresiju dažādos šūnu veidos. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu analīze veikta, izvērtējot imūnreaktivitāti neironu un glijas šūnās, tostarp astrocītos un oligodendrocītos; veikta arī asins kapilāru veidojošo endoteliocītu un pericītu analīze. SOD1 un TGF- $\beta$ 1 imūnreaktivitāte noteikta arī aknu audu griezumos.

Reakciju imūnreaktivitātes intensitāte un antigēnu ekspresija izvērtēta, gaismas mikroskopā Leica (LEICA, LEITZ DMRB, Vācija), randomizēti izvēloties 10 redzeslaukus  $\times 400$  palielinājumā.

Intensitāte analizēta puskvantitatīvi, izmantojot šādu sistēmu: 0 – negatīva reakcija, 1 – vāja, 2 – vidēja, 3 – izteikta reakcija. TGF- $\beta$ 1, SOD1 un MMP9 imūnreaktivitātes izvērtējums smadzeņu audos veikts, analizējot relatīvo proporciju, t.i., izvērtējot, cik lielu daļu no redzeslauka, izteiktu procentos (0% – 100%), aizņem analizējamā struktūra, kurā novēro antigēna ekspresiju. Iegūtās vērtības reizinātas ar intensitāti un definētas kā ekspresija. Neironu skaits redzeslaukā analizēts kvantitatīvi.

### **3.2.3. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu statistiskā analīze**

Imūnhistoķīmisko reakciju rezultāti atspoguļoti kā mediānas ar starpkvartīļu vērtībām (IQR (25%; 75%)). Vairāku kategorizētu mainīgo salīdzināšanai izmantots hī kvadrāta (Chi-Square) tests. Imūnreaktivitātes vērtības starp grupām analizētas ar Manna-Vitnija (Mann Whitney U) vai Kruskola-Volisa (Kruskal-Wallis) testu, grupā – ar Vilkoksona (Wilcoxon Signed Ranks) vai Fridmena (Friedman's) testu. Spīrmena (Spearman's rank) korelācijas koeficients lietots, izvērtējot saistību starp TGF- $\beta$ , SOD1 un MMP9 ekspresiju. Korelācija novērtēta kā cieša, ja korelācijas koeficients bijis lielāks vai vienāds ar 0,7. Būtiskuma līmenis (p) ar vērtību, kas mazāka par 0,05, vērtēts kā statistiski ticams. SPSS 20.0 programma izmantota nepieciešamo aprēķinu veikšanai.

### **3.3. Materiāla apstrāde analīzei caurstarojošā elektronu mikroskopā**

#### **3.3.1. Audu fiksācija un ieguldīšana epoksīda sveķos**

Smadzeņu audu materiāls elektronmikroskopiskajai analīzei sasmalcināts 1 mm<sup>3</sup> gabaliņos un fiksēts 2,5% glutāraldehīda šķīdumā 0,1 M fosfāta buferī (pH=7,4) 2 līdz 4 stundas 4 °C temperatūrā. Glutāraldehīds ļauj veidot ciešāku saistību starp molekulām ar metiltiltiņa palīdzību nekā formalīns, tāpēc fiksējošās īpašības ir stiprākas. Fiksētais audu materiāls skalots fosfāta bufera šķīdumā (pH=7,4), kam pievienota saharoze (trīs reizes buferis mainīts ik pēc 10 minūtēm 4 °C temperatūrā). Papildu fiksācija veikta ar 1% osmijskābi 0,1 M fosfāta buferī 1 stundu 4 °C temperatūrā. Pēc fiksācijas ar osmijskābi nepieciešama, lai pilnīgi stabilizētu šūnu struktūras. Pēc tam preparāts trīs reizes skalots fosfāta bufera šķīdumā bez saharozes, ik pēc 10 minūtēm šķīdumu mainot 4 °C temperatūrā. Tad audu materiāls atūdeņots ar spirtu pieaugošā koncentrācijā (50°, 70°, 80°, 90°, 96° un 100°), katras koncentrācijas spirta šķīdumu nomainot 2 – 3 reizes ik pēc piecām minūtēm 4 °C temperatūrā. Pēc izturēšanas 70° spirtā, audu gabaliņus uz diennakti ievieto 2% uranilacetāta 70° spirta šķīdumā. Audu materiāls pakāpeniski piesātināts ar epoksīda sveķu (Epoxy embedding medium kit: Epoxy embedding medium, Epoxy embedding medium hardener DDSA [2-dodecenylsuccinic anhydrite], NMA [methylnadic anhydrite], Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) komponentu un acetona maisījumu, izturot termostatā +37 °C temperatūrā vienu stundu. Pēc tam audu gabaliņi atstāti pa nakti istabas temperatūrā epoksīda sveķu maisījumā (bez katalizatora Epoxy embedding medium accelerator DPM-30 [2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol]). Materiāls ieguldīts epoksīda sveķu maisījumā (ar katalizatoru) speciālās plastmasas kapsulās un ievietots termostatā +60 °C temperatūrā uz 24 – 48 stundām (Maunsbach, 1994; Celis, 1994).

#### **3.3.2. Pusplāno audu griezumu gatavošana**

Smadzeņu audu materiāla pusplānie griezumi, kas krāsoti ar toluidīnzilo, ļauj novērtēt griezumā ietverto pamatelementu kopējo ainu un izvērtēt morfoloģiskās izmaiņas gaismas mikroskopā. Salīdzinot ar parafīnā ieguldīto audu materiāla analīzi, šī metode ir informatīvāka – tā dod plašākas iespējas atpazīt, izvērtēt un aprakstīt

smadzeņu šūnu struktūru. Šī metode dod iespēju precīzi izvēlēties turpmāko ultraplāno griezumam analīzes vietu.

No epoksīda sveķos ieguldītā audu materiāla, izmantojot ultramikrotomu (Y2088, LKB, Zviedrija), izgatavoti 1 – 2 µm biezi audu pusplānie griezumumi. Tālāk no ultramikrotoma audu griezumumi pārnesti uz priekšmeta stikliņa, uz kura iepriekš uzpilināts ūdens piliens, pēc tam žāvēti uz elektriskās plīts. Tādā veidā izžāvētie audu griezumumi iztaisnojas un pielīmējas pie priekšmeta stikla. Krāsošanai gatavots 1% toluidīnzilā šķīdums ūdenī pie pH 9,0 (Гайер, 1974). Pagatavotajam šķīdumam pievienots nātrija tetraborāta ūdens atšķaidījums attiecībā 1:1. Krāsošanas intensitāte atkarīga no krāsas koncentrācijas, krāsošanas laika, audu griezumuma biezuma un temperatūras. Uz priekšmeta stikla ar griezumiem uzpilināta krāsa un stikls sildīts apmēram pusminūti. Tad stikls noskalots ar destilētu ūdeni un žāvēts. Nokrāsotie audu griezumumi pārklāti ar ieslēgšanas vidi un segstikliņu.

Pusplānie smadzeņu audu griezumumi analizēti un izvērtēti pie dažādiem gaismas mikroskopa palielinājumiem. Ar 400× gaismas mikroskopa palielinājumu var vērtēt smadzeņu pamatelementu izvietojumu, to savstarpējās attiecības, krāsošanas kvalitāti, kā arī analizēt šūnas, šūnu kodolus, ieslēgumus u.c. (Zalcmane un Groma, 2004; Kamann *et al.*, 2007).

### 3.3.3. Ultraplāno audu griezumumu gatavošana

Pēc pusplāno audu griezumumu novērtēšanas gaismas mikroskopā izvēlēta noteikta elektronmikroskopiskai analīzei derīga audu materiāla vieta preparātā, lai pagatavotu 60 – 80 nm ultraplānus griezumus. Pēc tam, kad blokā atrasta nepieciešamā audu vieta un pats bloks noasināts, ar ultramikrotomu (Y2088, LKB, Zviedrija) palīdzību pagatavoti ultraplānie griezumumi.

Pirmā audu kontrastēšana (krāsošana) notikusi pēc audu fiksēšanas 1% osmijskābē (osmija tetroksīda (Acros Organics, Geel, Belgium) šķīdums fosfāta buferī), kas satur smagā metāla atomus. Osmijskābe reaģē gan ar lipīdiem, gan ar olbaltumvielām, rezultātā palielinot kontrastu starp šūnu membrānu lipoproteīdiem un citoplazmas tauku ieslēgumiem. Nukleoproteīdu kontrasts ir salīdzinoši mazāks, jo osmijskābe reaģē tikai ar to olbaltumvielu komponentu. Vēlāk ultraplānie griezumumi, kas

novietoti uz vara sietiņiem, dubultkontrastēti ar uranilacetātu (Polysciences, Inc, Warrington, P.A.) šķīdumu un svina citrātu (pagatavots no svina (II) nitrāta (Merck, Darmstadt, Germany), nātrija citrāta monohidrāta (Merck, Darmstadt, Germany) un 1M Na hidroksīda) (Reynolds, 1963). Elektronmikroskopijā audu ultraplāno griezumā dubultkontrastēšana (dubultkrāsošana) ietver: 1 – kontrastēšanu ar uranilacetāta šķīdumu 10 – 20 minūtes, 2 – skalošanu ar destilētu ūdeni, 3 – kontrastēšanu ar svina citrātu 2 – 5 minūtes, 4 – skalošanu ar destilētu ūdeni. Zināms, ka uranilacetāts ievērojami palielina DNS un RNS kontrastu, mazāk – olbaltumvielu kontrastu. Tādēļ uranilacetātu uzskata par selektīvu, bet nespecifisku nukleīnskābju krāsvielu. Krāsviela var reaģēt ar fiksatora molekulām, kas saistītas ar audiem. Svina citrāts saistās ar osmijskābes savienojumiem starp osmiju un dažiem šūnas komponentiem audu fiksācijas laikā. Tādā veidā pēc fiksācijas ar osmijskābi svins darbojas kā universāla audu kontrastviela. Svina sāļi augstās pH vērtībās labi iekrāso šūnas membrānu (Watson, 1958).

Preparāta analīze vispirms veikta mazā elektronu mikroskopa palielinājumā (ap  $2000\times$  –  $3000\times$ ). Pēc tam, kad vajadzīgais šūnu griezumā atrasts, tas analizēts, aprakstīts un, ja nepieciešams, fotografēts rezultātu dokumentēšanai. Turpmāk, veicot preparātu analīzi, izvēlēts lielāks palielinājums. Optimālais preparāta analīzes palielinājums atkarīgs no parauga īpatnībām un kontrasta. Darbā preparātu analīze veikta palielinājumā no  $2000\times$  līdz  $40000\times$ . JEOL firmas elektronu mikroskopā JEM 1011 (Japāna) zem ekrāna ievietotas speciālas Kodak firmas fotoplātnītes (SO-163, Kodak, Rochester, N.Y.), kas pārklātas ar sīkgraudainu emulsiju, nodrošinot elektronattēla detaļu fiksāciju. Tālāk fotoplātnītes attīstītas, izmantojot atbilstošu Kodak firmas fotofilmu attīstītāju un skenētas (Epson Perfection V700 Photo, Seiko Epson Corp., Japāna) digitālai attēlu iegūšanai.

### **3.4. Materiāla apstrāde analīzei skenējošā elektronu mikroskopā un EDX**

#### **3.4.1. Materiāla sagatavošana analīzei skenējošā elektronu mikroskopā**

Audu autopsijas gabaliņi sākotnēji fiksēti atbilstoši metodei 2,5% glutāraldehīda šķīdumā un 1% osmijskābē. Audu apstrādes ar osmijskābi mērķis ir audu cietības panākšana un elektriskās vadītspējas palielināšana. Pirms audu žāvēšanas kritiskajā

punktā, tie atūdeņoti pieaugošas koncentrācijas acetonā (60°, 70°, 80°, 90°, 100°). Žāvēšana kritiskajā punktā ar žāvētāju (E3000, Agar Scientific Ltd, Anglija) nodrošināta ar oglekšābās gāzes (CO<sub>2</sub>), attiecīga spiediena un ūdens temperatūras palīdzību. Sausie paraugi piestiprināti speciālam turētājam ar sudraba pastas palīdzību, tad pārklāti ar zelta kārtiņu katoda putinātāja aparātā (JFC-1300, JEOL, Japāna). Sagatavotie audu turētāji ar paraugiem ievietoti skenējošā elektronu mikroskopā JSM-6490LV (JEOL, Japāna); SEI (sekundāro elektronu attēlošana) režīmā pie 25kV liela sprieguma paraugi vērtēti 3,000× – 20,000× lielā palielinājumā.

### 3.4.2. Rentgenmikroanalīzes metode

Starpkatedru elektronmikroskopijas laboratorijā sagatavoti smadzeņu autopsiju paraugi, tos īpaši apstrādājot ķīmisko elementu analīzei ar EDX skenējošā elektronmikroskopā augsta vakuuma apstākļos. Audu griezumi atūdeņoti pieaugošas koncentrācijas acetonā (60°, 70°, 80°, 90°, 100°). Pēc žāvēšanas kritiskajā punktā paraugi sagatavoti, pārklājot tos ar oglekļa kārtiņu. Sagatavotie audu turētāji ar paraugiem ievietoti skenējošā elektronu mikroskopā JSM-6490LV; BSE (atstarotie sekundārie elektroni) režīmā pie 25kV liela sprieguma paraugi vērtēti 3,000× – 20,000× lielā palielinājumā.

Elementu sastāva noteikšanai analizēts parauga izstaroto sekundāro rentgenstaru spektrs, izmantojot ar šķidru slāpekli dzesētu silīcija detektoru (JSM 6490LV, JEOL, Japāna) ar no polimēru filmas veidotu ieejas logu, kas, atšķirībā no detektoriem ar berilija logu, ļāvis reģistrēt arī vieglos elementus, sākot no bora un ieskaitot organiskās vielās svarīgos elementus – oglekli un skābekli. Elementu analīzes ekspozīcijas laiks ildzis ne vairāk par 10 minūtēm, nodrošinot minimālu parauga materiāla desorbciju zem elektronu kūļa. Iegūtajos rentgenfluorescences spektros novērtēts, kuri spektrālie maksimumi ir virs trokšņu līmeņa, noteikti artefakti, tā saucamie "summas" pīķi un enerģijas noplūdes silīcija detektorā ("escape") pīķi. Kopā ar šo informāciju iegūtais spektrs izmantots elementu koncentrācijas aprēķinam ar firmas "Ametek" programmu paketi, lietojot tā saucamo fundamentālo parametru metodi, tas ir, izmantojot zināmos atomu fundamentālos parametrus un neizmantojot empīrisku salīdzināšanu ar zināmas elementu koncentrācijas saturošiem etalonparaugiem.

## 4. REZULTĀTI

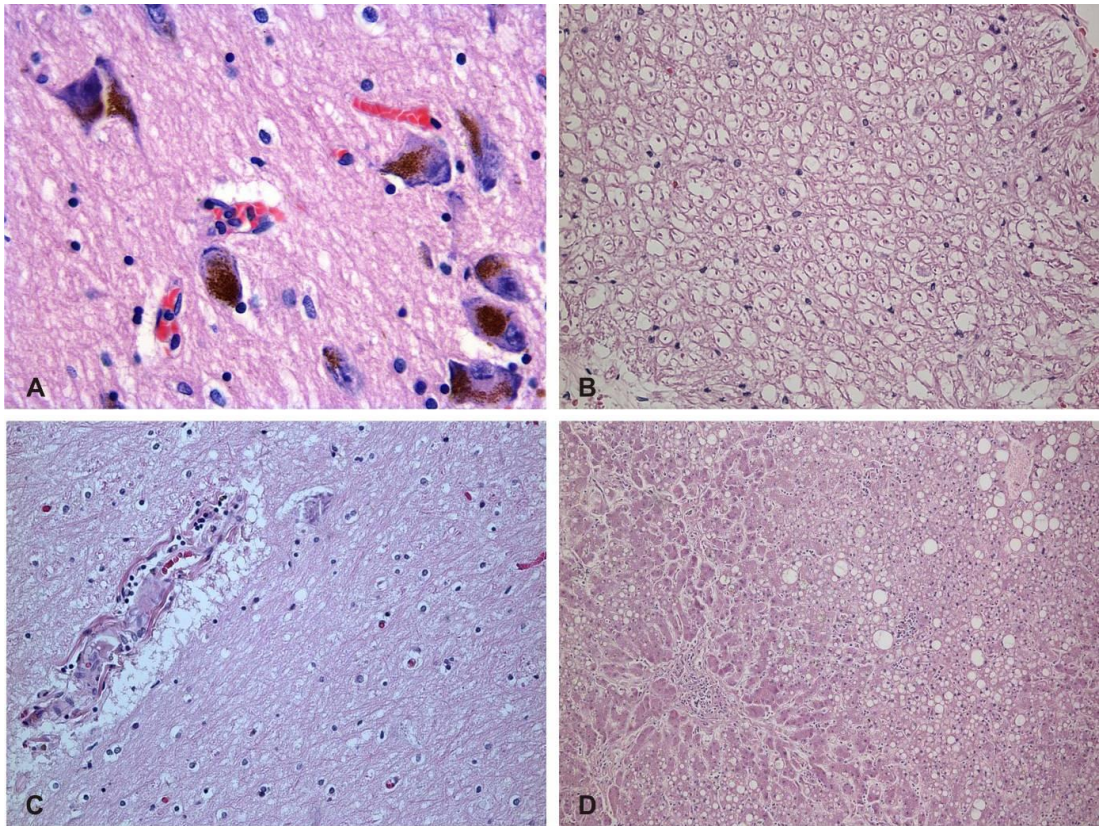
### 4.1. Gaismas mikroskopijas rezultāti

Hroniskiem alkohola lietotājiem pārskata griezumos novēro galvas smadzeņu asinsvadu pilnasinību, perivazālas hemorāģijas, difūzu perivaskulāru tūsku, bieži mīkstā smadzeņu apvalka fibrozi un perēkļveidīgus demielinizācijas rajonus baltajā vielā (4.1. A, B, C att.). Aknu analīze uzrāda perēkļainu vai totālu hepatocītu steatozi, bieži novēro hepatocītus, kas satur lielpiliena tauku ieslēgumus, t.s. tauku cistas citoplazmā. Novēro periportālu un portālu fibrozi, reizēm izteiktu cirozi (4.1. D att.). Bieži novēro portālu aknu cirozi uz difūzas aknu steatozes fona.

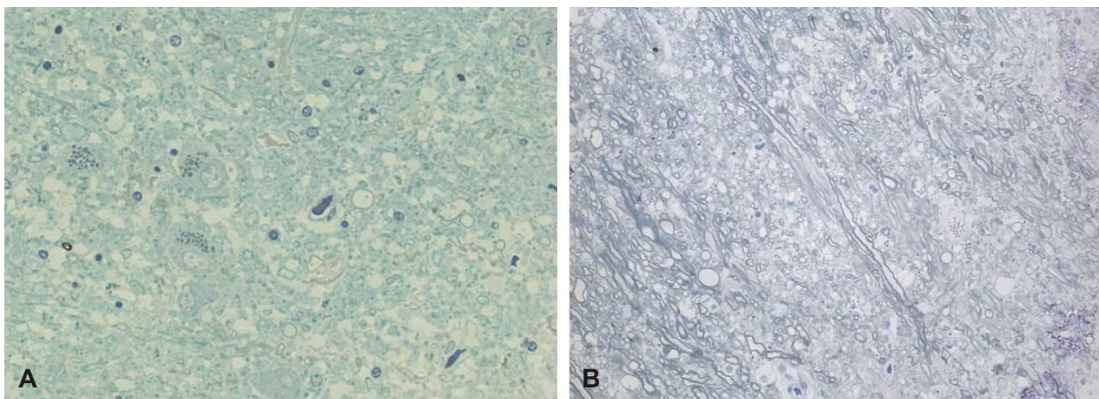
Narkotisko vielu lietotājiem novērota galvas smadzeņu tūska, sastrēgumpilnasinība un asinsvadu mikrocirkulācijas traucējumi. Aknu audu analīze uzrāda hepatocītus ar gludā endoplazmatiskā tīkla hiperplāziju, leukocitāru infiltrāciju portālajos traktos, taukaino hepatozi un aknu fibrozi.

Kontroles grupā vienā no gadījumiem konstatēta asinsvadu pilnasinība smadzeņu vielā. Sešos no analizētajiem kontroles paraugiem novērots galvas smadzeņu mīkstā apvalka neregulārs caurasīojums, smadzeņu apvalku un vielas nevienmērīga pilnasinība, taču vielas zīmējums saglabāts. Pieci no analizētajiem kontroles paraugiem histoloģiski bez izmaiņām. Kontroles grupā, analizējot aknu audus, divos gadījumos novērota aknu hepatoze, vienā gadījumā limfocītu infiltrāti un vienā no tiem arī fibroze, citos daiviņu un parenhīmas zīmējums saglabāts. Aknu audos tika konstatēta sīkpilienu hepatoze, mazizteikta steatoze, žultsstāze un neizteikta fibroze, 4 no pētāmās grupas gadījumiem aknu audi bez patoloģijas.

Gaismas mikroskopā, analizējot pusplānos griezumus bazālo gangliju rajona pelēkajā vielā, novēro neironu ķermeņus un to izaugumus, astrocītus, retāk oligodendrocītus, savukārt baltajā vielā novēro oligodendrocītus ar nelielu, apaļu un tumšu kodolu, mielinētus aksonus un polimorfus astrocītus (4.2. A,B att.).



**4.1. att. Alkohola lietotāju grupa: asinsvadu pilnasinība SN pelēkās (A) un baltās vielas (C) rajonos,  $\times 400$ ,  $\times 200$ ; (B) perēkļveidīgi demielinizācijas rajoni SN baltajā vielā,  $\times 250$ ; (D) aknu fibroze, tauku cistas hepatocītu citoplazmā,  $\times 100$**

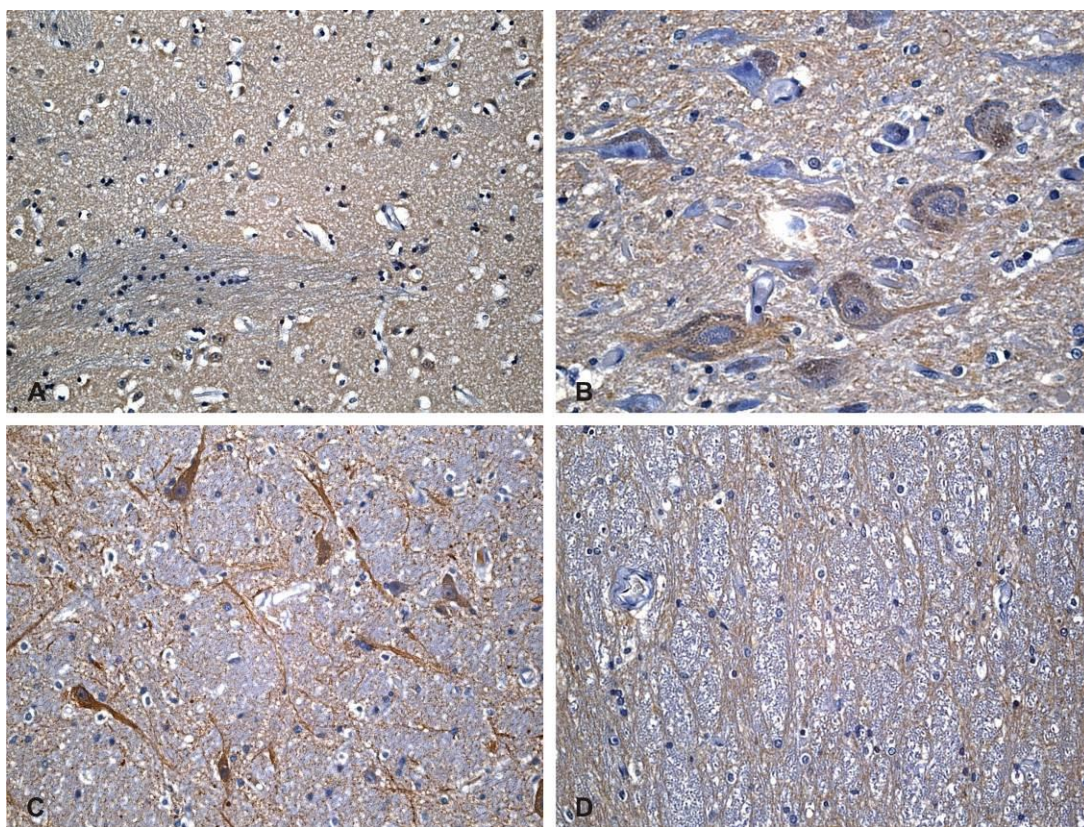


**4.2. att. Puslānie griezumi: (A) SN rajona pelēkā viela, (B) SN rajona baltā viela,  $\times 400$**

#### 4.1.1. NSE imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

Imūnhistoķīmiskās reakcijas ar anti-NSE antivielu tika veiktas izlases veidā, ietverot gan hronisku alkohola un narkotisko vielu lietotāju gadījumus, gan kontroles grupas materiālu. NSE ekspresija novērota neironu perikarionā un izaugumos. Novērots, ka NSE imūnekspressija variē, izvērtējot intensitāti SN un CS rajonos.

Hronisku alkohola lietotāju SN rajona pelēkās vielas neironos novērotā intensitāte variēja no negatīvas (0) līdz vājai (1), neiropīlā vāja (1) un mērena (2), baltās vielas rajonā tā variē no negatīvas (0) līdz mērenai (2). CS rajonā pelēkajā vielā neironos negatīva (0), biežāk mērena (2), neiropīlā vāja (1) un mērena (2), baltās vielas šķiedrās variē no negatīvas (0) līdz izteiktai (3) intensitātei (4.3. A att.). Hronisku alkohola lietotāju CC rajonos novērota vāja (1), biežāk mērena (2) NSE intensitāte pelēkās vielas neironos, neiropīlā vāja (1) un mērena (2), baltās vielas šķiedrās negatīva (0), retāk vāja (1).



4.3. att. NSE ekspresija hronisku alkohola lietotāju CS rajonā (A), ×250; narkotisko vielu lietotāju SN pelēkajā vielā (B), ×400; kontroles grupas SN un CS rajonos (C,D), ×250

Narkotisko vielu lietotāju grupā SN rajonā pelēkajā vielā novēro negatīvu vai reti vāji pozitīvu (1) imūnreaktivitātes intensitāti neironos, savukārt neiropīlā mērenu (2) līdz izteiktu (3), baltās vielas rajonā līdzīgi (4.3. B att.).

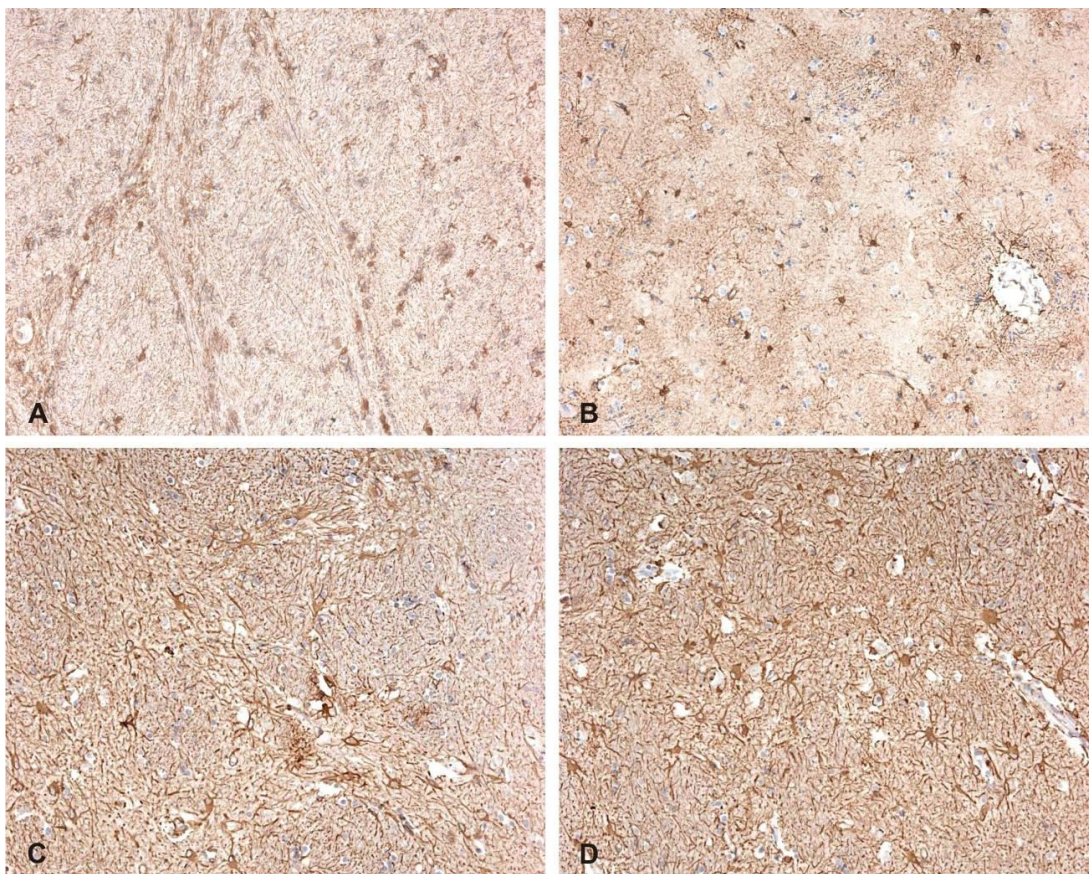
No kontroles grupas izvēlētajos gadījumos negatīva (0), biežāk izteikta (3) intensitāte novērota SN pelēkās vielas neironos, neiropīlā vāja (1) līdz mērena (2), savukārt baltās vielas rajonos mērena (2) (4.3. C att.). CS rajona pelēkās vielas neironos novērota negatīva (0) un reti vāja (1) NSE intensitāte, savukārt neiropīlā mērena (2). Variabla NSE intensitāte konstatēta baltās vielas rajonos, kur novērota gan vāja (1), gan izteikta (3) (4.3. D att.).

#### **4.1.2. GFAP imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti**

Sakarā ar sarežģīto galvas smadzeņu telpisko struktūru, astrocītu diferenciācijai tika izmantots specifiskais astrocītu marķieris – monoklonālā anti-GFAP antivielas, izlases veidā izvēloties gadījumus no hronisku alkohola un narkotisko vielu lietotāju pētījuma grupām.

Izteikta (3) GFAP intensitāte tika novērota gan CC astrocītos baltajā vielā, gan pelēkās vielas rajonos. Līdzīgi CS rajona astrocītos – gan baltajā, gan pelēkajā vielā – alkohola un narkotisko vielu lietotājiem novērota izteikta (3) GFAP intensitāte (4.4. A,B,C,D att.).

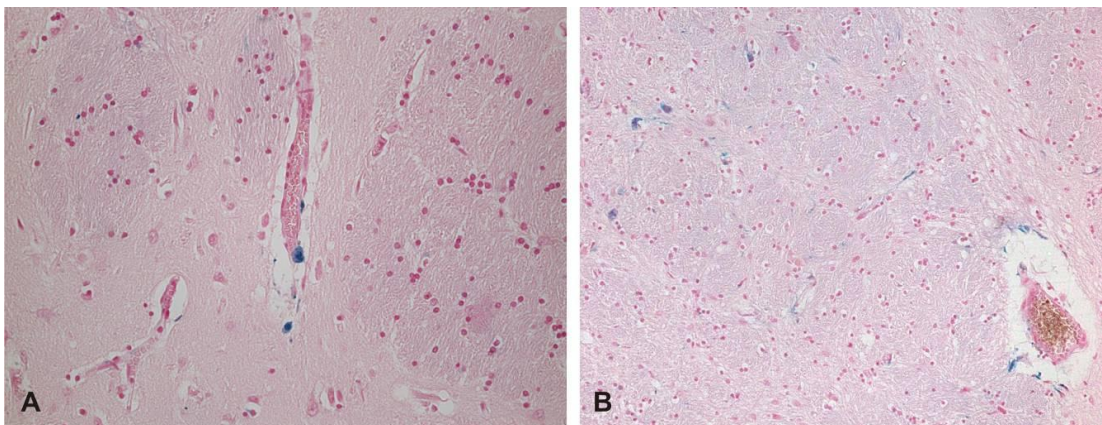
Anti-GFAP antivielas lokalizācija vērtējama kā difūza, to novēro gan šūnas ķermenī, gan izaugumos. Izteiktu GFAP intensitāti (3) novēro astrocītu gala izaugumos pie asins kapilāriem (4.4. B,D att.).



**4.4. att. GFAP ekspresija CS rajonā (A,B) hroniskiem alkohola lietotājiem, ×200; (C,D) narkotisko vielu lietotājiem, ×200, ×250**

#### **4.1.3. Dzelzs histokīmiskās noteikšanas rezultāti**

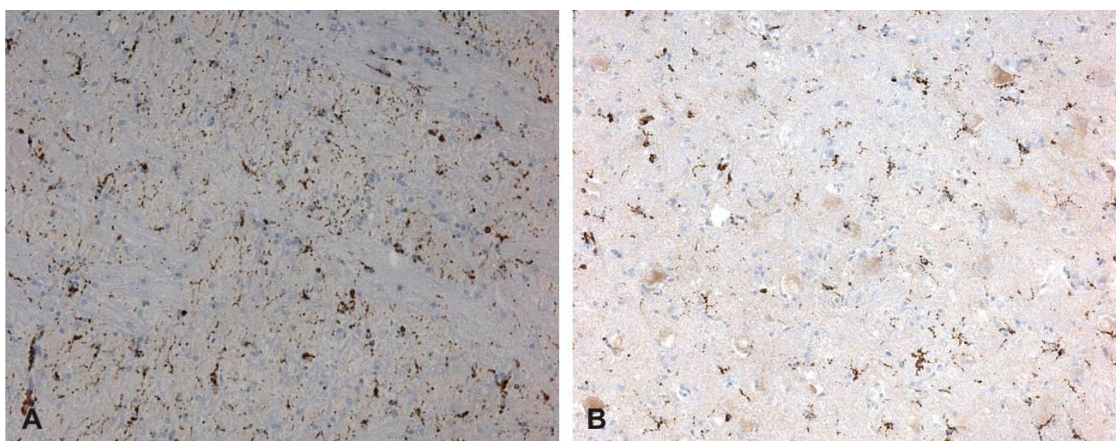
Perlsa reakcija tika veikta izlases veidā, ietverot gan hronisku alkohola un narkotisko vielu lietotāju gadījumus, gan kontroles grupas materiālu. Perlsa reakcijā šūnas ar dzelzi saturošām granulām novēro zilā krāsā. Izvēlētajos paraugos no hronisku alkohola lietotāju grupas Fe pozitīvas šūnas tika novērotas maz, bieži neviena. Salīdzinoši vairāk Fe depozītus novēro narkotisko vielu lietotāju grupā asins kapilāru tuvumā (4.5. A,B att.).



**4.5. att. Fe depozīti narkotisko vielu lietotāju grupā asins kapilāru tuvumā: CS rajons (A,B), ×250, ×200**

#### **4.1.4. CD68 imūnhistokīmiskās izpētes rezultāti**

Izteiktu (3) CD68 intensitāti novērojām gan pelēkā, gan baltajā vielā hroniskiem alkohola lietotājiem visos izpētes smadzeņu rajonos. Bieži CD68 pozitīvas šūnas novēro asins kapilāru, arī neironu tuvumā (4.6. A,B att.).

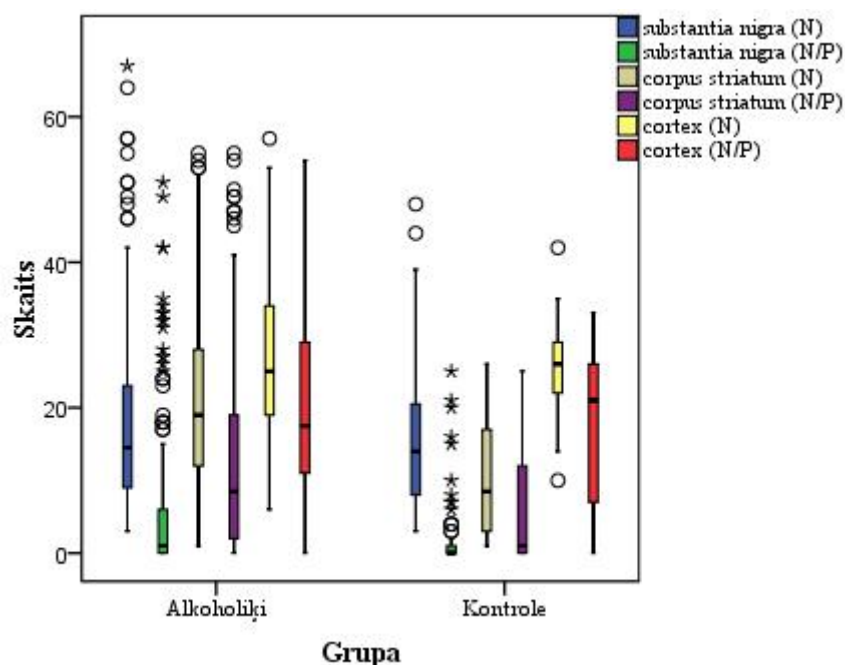


**4.6. att. CD68 pozitīvas šūnas asins kapilāru un neironu tuvumā CS rajona baltajā (A) un pelēkā (B) vielā, ×250, ×200**

#### 4.1.5. TGF- $\beta$ 1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

Statistiski ticami atšķīrās alkohola atkarīgo un kontroles TGF- $\beta$ 1 pozitīvo neironu skaits SN rajonā: 1,0 (0,0; 6,0) un 0,0 (0,0; 1,0), ( $p < 0,001$ ), CS rajonā 8,5 (2,0; 19,0) un 1,0 (0,0; 12,3), ( $p < 0,001$ ), CC statistiski ticamas atšķirības nenovēro: 17,5 (11,0; 29,0) un 21,0 (7,0; 26,0), ( $p = 0,266$ ), (4.7. att.).

Salīdzinot TGF- $\beta$ 1 intensitāti neironos starp izpētes rajoniem pētījuma grupās, dati statistiski ticami atšķīrās ( $p = 0,007$ ) gan hroniskiem alkohola lietotājiem, attiecīgi: SN 1,0 (0,0; 1,0), CS 1,0 (1,0; 1,0) un CC 1,0 (1,0; 1,0), gan kontrolei ( $p < 0,001$ ), attiecīgi SN 0,0 (0,0; 1,0), CS 1,0 (0,0; 1,0) un CC 1,0 (1,0; 1,0). Salīdzinot TGF- $\beta$ 1 intensitāti neironos hroniskiem alkohola lietotājiem un kontrolei, dati statistiski ticami atšķīrās visos izpētes rajonos: SN un CS ( $p < 0,001$ ), kā arī CC ( $p = 0,008$ ).



4.7. att. Hronisku alkohola lietotāju un kontroles grupas kopējais neironu skaits (N) un TGF- $\beta$ 1 pozitīvo neironu skaits (N/P) izpētes rajonos

Salīdzinot TGF- $\beta$ 1 intensitāti neiropilā starp izpētes rajoniem, dati statistiski ticami atšķīrās ( $p < 0,001$ ) gan hroniskiem alkohola lietotājiem, attiecīgi: SN 1,0 (0,0; 1,0), CS 1,0 (0,0; 1,0) un CC 0,0 (0,0; 1,0), gan kontrolei ( $p < 0,001$ ), attiecīgi SN 0,0 (1,0; 2,0), CS 1,0 (1,0; 2,0), CC 0,0 (0,0; 1,0).

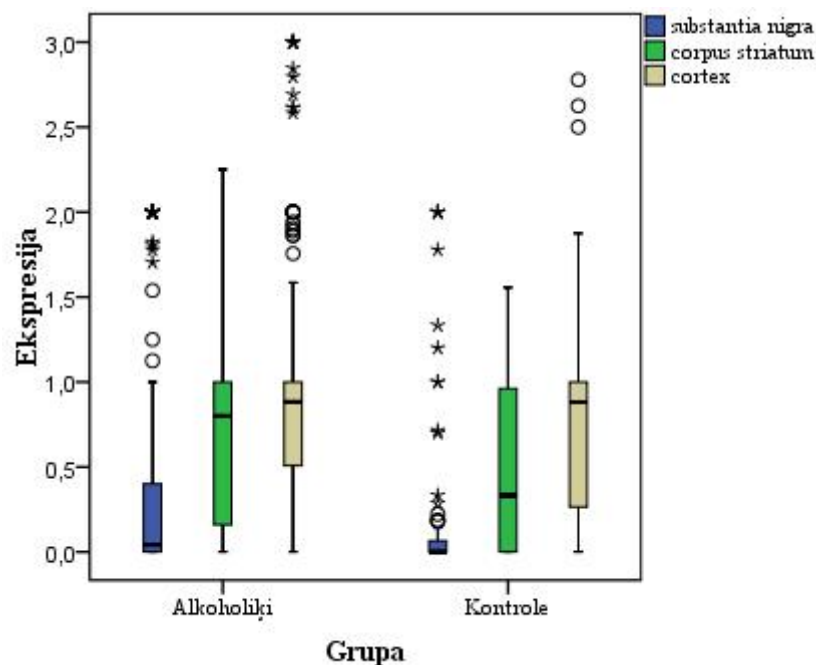
Statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ) TGF- $\beta 1$  intensitātei novēro hroniskiem alkohola lietotājiem, salīdzinot SN rajonā neironus ar neiropīlu: 1,0 (0,0; 1,0) un 1,0 (0,0; 1,0), līdzīgi CC rajonā 1,0 (1,0; 1,0) un 0,0 (0,0; 1,0). Līdzīgi, statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēro, salīdzinot baltās vielas šķiedras ar neiropīlu – SN: 2,0 (2,0;3,0) un 1,0 (0,0;1,0), CC: 2,0 (1,0;2,0) un 0,0 (0,0; 1,0).

TGF- $\beta 1$  intensitāte narkomāniem neironos statistiski ticami atšķīrās, salīdzinot ar kontroli, CC rajonā: 1,5 (1,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 1,0), ( $p < 0,001$ ), citos rajonos atšķirības nenovēro.

Kontroles grupā novēro statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ) TGF- $\beta 1$  intensitātei visos izpētes rajonos, salīdzinot neironus ar neiropīlu – SN: 0,0 (0,0; 1,0) un 0,0 (1,0; 2,0), līdzīgi CS rajonā 1,0 (0,0; 1,0) un 1,0 (1,0; 2,0), kā arī CC 1,0 (1,0; 1,0) un 0,0 (0,0; 1,0). Turklāt, statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēro, salīdzinot SN baltās vielas šķiedras ar neiropīlu: 2,0 (2,0; 3,0) un 1,0 (0,0; 2,0), līdzīgi CS rajonā 1,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 2,0), CC atšķirības nenovēro.

Ependimocīti uzrādīja negatīvu (0) un vāju (1) TGF- $\beta 1$  imūnreaktivitātes intensitāti alkohola lietotāju grupā. Vidēji izteikta TGF- $\beta 1$  ekspresija novērota VL sienīnā.

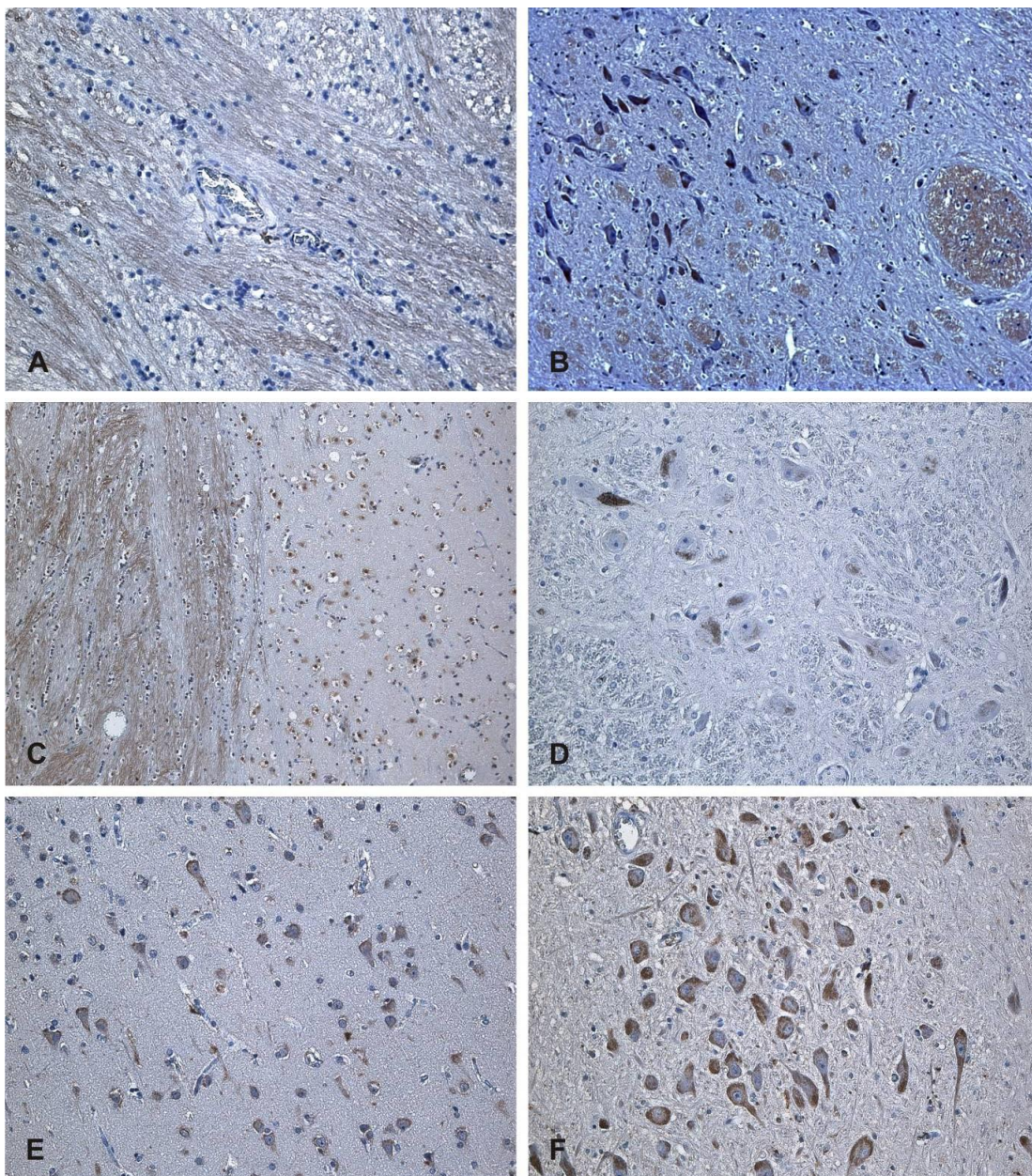
Salīdzinot alkohola atkarīgo grupā TGF- $\beta 1$  ekspresiju neironos starp izpētes rajoniem, novēro statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ): SN 0,04 (0,00; 0,40), CS 0,8 (0,15; 1,00), CC 0,88 (0,50; 1,00). Līdzīgi, salīdzinot kontroles grupā TGF- $\beta 1$  ekspresiju neironos starp izpētes rajoniem, novēro statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ): SN 0,00 (0,00; 0,07), CS 0,33 (0,00; 0,97), CC 0,88 (0,26; 1,00). Salīdzinot TGF- $\beta 1$  ekspresiju alkohola atkarīgajiem ar kontroli, statistiski ticami atšķiras SN ( $p < 0,001$ ) un CS neironi ( $p = 0,001$ ), CC neironos atšķirības nenovēro ( $p = 0,372$ ), (4.8. att.).



**4.8. att. Hronisko alkohola lietotāju un kontroles grupas TGF-β1 ekspresija neironos izpētes rajonos**

Salīdzinot hronisko alkohola lietotāju grupā TGF-β1 ekspresiju neironos un baltās vielas šķiedrās, iegūti statistiski ticami atšķirīgi rezultāti ( $p < 0,001$ ) SN rajonā: 0,04 (0,00; 0,40) un 0,95 (0,60; 1,50), ( $p < 0,001$ ). Salīdzinot kontroles grupā TGF-β1 ekspresiju neironos un baltās vielas šķiedrās, iegūti statistiski ticami atšķirīgi rezultāti ( $p < 0,001$ ) – SN: 0,00 (0,00; 0,07) un 1,40 (0,80; 2,10), CC 0,88 (0,26; 1,00) un 1,60 (0,90; 2,00).

Salīdzinot hronisko alkohola lietotāju grupā TGF-β1 ekspresiju neiropīlā visos izpētes rajonos, novēro statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ): SN 0,20 (0,00; 0,80), CS 0,20 (0,00; 0,50), CC 0,00 (0,00; 0,60), ( $p = 0,007$ ). Līdzīgi, salīdzinot kontroles grupā TGF-β1 ekspresiju neiropīlā visos izpētes rajonos, novēro statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ): SN 0,40 (0,00; 1,00), CS 0,20 (0,10; 0,40), CC 0,00 (0,00; 0,68), ( $p < 0,001$ ).



**4.9. att. TGF-β1 ekspresija hronisku alkohola lietotāju grupā: (A) SN baltās vielas rajonā, ×200, un (C) CS rajona pelēkajā un baltajā vielā, ×100; (B) kontroles grupas SN rajona baltajā vielā, ×100, un (D) pelēkās vielas neironos, ×200; (E) narkotisko vielu lietotāju CC neironos, ×250, un (F) SN rajona neironos, ×200**

Alkohola atkarīgajiem statistiski ticami atšķīrās ( $p < 0,001$ ) TGF-β1 ekspresija visos izpētes rajonos baltās vielas šķiedrās, salīdzinot ar neiropilu – SN 0,95 (0,60; 1,50) un 0,20 (0,00; 0,80), CS: 0,70 (0,20; 1,20) un 0,20 (0,00; 0,50), CC: 0,90 (0,60; 1,00) un 0,00 (0,00; 0,60), (4.9. A,C att.). Līdzīgi, kontroles grupā statistiski ticami atšķīrās ( $p < 0,001$ ) TGF-β1 ekspresija visos izpētes rajonos baltās vielas šķiedrās,

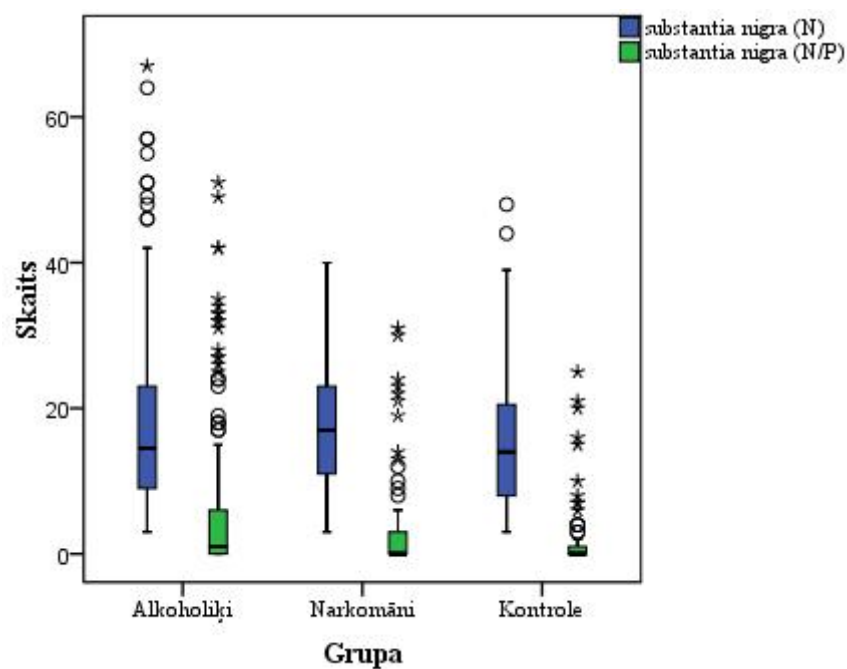
salīdzinot ar neiropīlu – SN: 1,40 (0,80; 2,10) un 0,40 (0,00; 1,00), CS 0,60 (0,20; 1,00) un 0,20 (0,10; 0,40), CC 1,60 (0,90; 2,00) un 0,00 (0,00; 0,68), (4.9. B,D att.).

Salīdzinot TGF- $\beta$ 1 ekspresiju hroniskiem alkohola lietotājiem ar kontroli, statistiski ticami atšķīrās SN neiropīls 0,20 (0,00; 0,80) un 0,40 (0,00; 1,00), ( $p=0,028$ ); SN baltās vielas šķiedras, attiecīgi 0,95 (0,60; 1,50) un 1,40 (0,80; 2,10), ( $p<0,001$ ), kā arī CC baltās vielas šķiedras, attiecīgi 0,90 (0,60; 1,00) un 1,60 (0,90; 2,00), ( $p<0,001$ ). Citur atšķirības nenovēro.

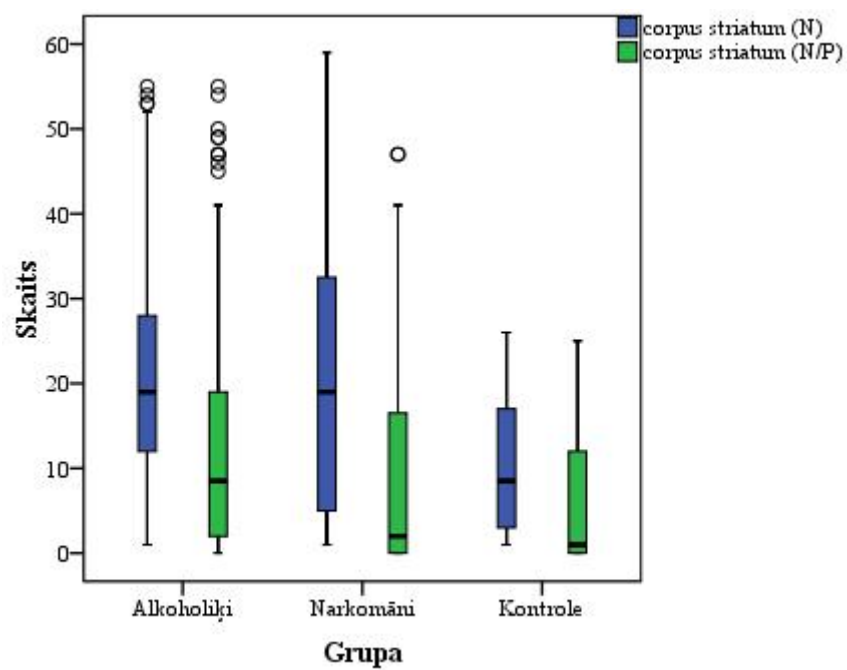
Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, statistiski ticami atšķīrās gan pozitīvo neironu skaits 40,5 (33,3; 45,8) un 21,0 (7,0; 26,0), gan TGF- $\beta$ 1 ekspresija: 1,20 (0,84; 2,66) un 0,88 (0,26; 1,00), ( $p=0,011$ ) tikai CC rajonā (4.9. E att.). Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, statistiski ticamas TGF- $\beta$ 1 ekspresijas atšķirības novēro, salīdzinot SN neiropīlu 0,00 (0,00; 0,20) un 0,40 (0,00; 1,00), ( $p<0,001$ ) un baltās vielas šķiedras 0,90 (0,50; 1,60) un 1,40 (0,80; 2,10), ( $p<0,001$ ). CC rajonā novēro statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot baltās vielas šķiedras 1,10 (0,30; 1,80) un 1,60 (0,90; 2,00), ( $p=0,003$ ).

Narkotisko vielu lietotājiem statistiski ticamas TGF- $\beta$ 1 ekspresijas atšķirības ( $p<0,001$ ) novēro, salīdzinot neironus un baltās vielas šķiedras visos izpētes rajonos: SN 0,00 (0,00; 0,14) un 0,60 (0,40; 0,63); CS 0,50 (0,00; 0,93) un 0,40 (0,10; 0,50), CC 1,20 (0,84; 2,66) un 0,35 (0,20; 0,40), (4.9. F att.).

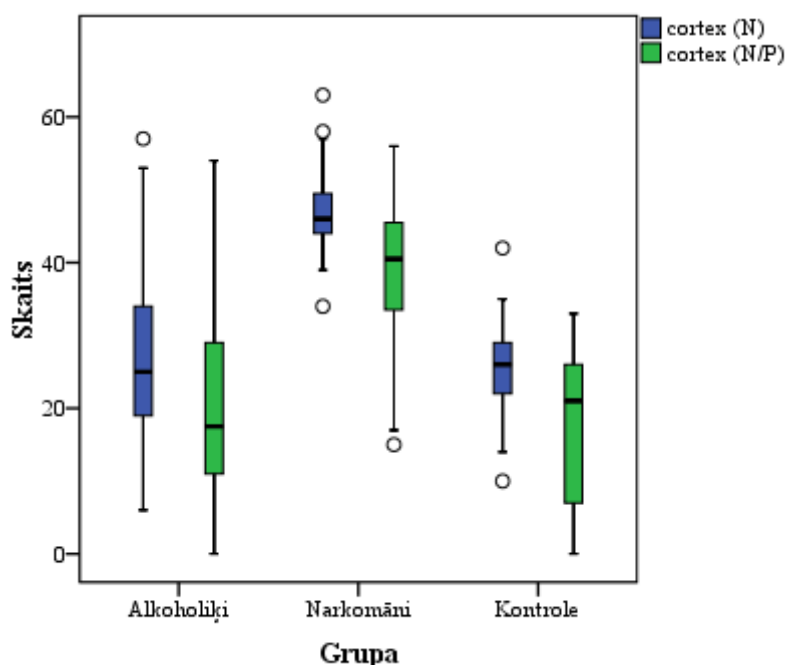
Salīdzinot alkohola lietotāju, narkomānu un kontroles grupas neironus visos izpētes rajonos, statistiski ticami atšķīrās neironu skaits CS un CC rajonos, kā arī TGF- $\beta$ 1-pozitīvo neironu skaits visos izpētes rajonos ( $p<0,001$ ), (4.10., 4.11., 4.12. att.).



4.10. att. Visu izpētes grupu kopējais neironu skaits (N) un TGF-β1 pozitīvo neironu skaits (N/P) SN rajonā



4.11. att. Visu izpētes grupu kopējais neironu skaits (N) un TGF-β1 pozitīvo neironu skaits (N/P) CS rajonā



**4.12. att. Visu izpētes grupu kopējais neironu skaits (N) un TGF- $\beta$ 1 pozitīvo neironu skaits (N/P) CC rajonā**

Hroniskiem alkohola lietotājiem neironos TGF- $\beta$ 1 ekspresija statistiski ticami korelē ar SOD1 ekspresiju SN ( $r=0,199$ ,  $p=0,038$ ), CC rajonos turpretī novēro negatīvu korelāciju ( $r=-0,326$ ,  $p<0,001$ ). Savukārt CS rajonā novēro negatīvu korelāciju ar MMP9 ekspresiju ( $r=-0,366$ ,  $p<0,001$ ). Kontroles grupā novēro pozitīvu TGF- $\beta$ 1 korelāciju ar SOD1 ekspresiju SN ( $r=0,257$ ,  $p=0,22$ ) un CC ( $r=0,553$ ,  $p=0,002$ ) neironos, savukārt CS rajonā novēro negatīvu ekspresijas korelāciju ( $r=-0,528$ ,  $p=0,17$ ).

Alkohola lietotāju grupā novēro pozitīvu TGF- $\beta$ 1 ekspresijas korelāciju ar MMP9 ekspresiju SN neiropilā ( $r=0,360$ ,  $p<0,001$ ), savukārt negatīvu korelāciju ar SOD1 CC neiropilā ( $r=-0,197$ ,  $p=0,025$ ). Kontrolei novēro pozitīvu TGF- $\beta$ 1 ekspresijas korelāciju ar SOD1 ekspresiju neiropilā SN rajonā ( $r=0,307$ ,  $p=0,006$ ), savukārt CS rajonā novēro negatīvu korelāciju ( $r=-0,600$ ,  $p=0,005$ ).

Alkohola lietotājiem novēro negatīvu TGF- $\beta$ 1 ekspresijas korelāciju ar MMP9 ekspresiju CS rajona baltās vielas šķiedrās ( $r=-0,303$ ,  $p=0,004$ ), savukārt šeit pozitīva korelācija ar SOD1 ( $r=0,332$ ,  $p=0,005$ ). Kontrolē novēro pozitīvu korelāciju TGF- $\beta$ 1 ekspresijai ar SOD1 ekspresiju SN baltās vielas šķiedrās ( $r=0,243$ ,  $p=0,030$ ).

Kopsavilkums.

Salīdzinot TGF- $\beta$ 1 ekspresijas mediānās vērtības neironos, hroniskiem alkohola lietotājiem SN un CS rajonos tās ir augstākas nekā kontrolei, CC atšķirības nenovēro.

Zemākas TGF- $\beta$ 1 ekspresijas mediānās vērtības bija alkohola lietotāju grupā SN un CC baltās vielas šķiedrās, tās salīdzinot ar kontroli. Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, neironos augstākas mediānās vērtības novēro tikai CC rajonā, līdzīgi, augstākas tās bija arī, salīdzinot baltās vielas šķiedras.

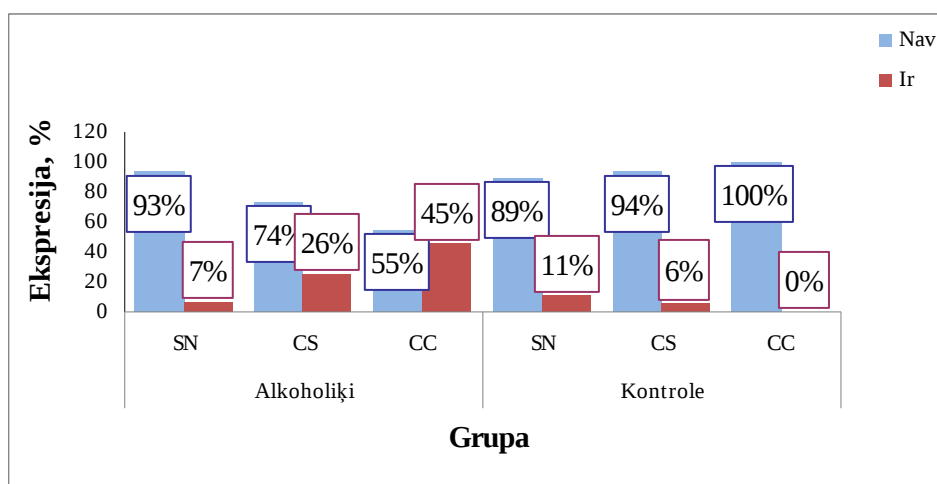
Hroniskiem alkohola lietotājiem neironos TGF- $\beta$ 1 ekspresija statistiski ticami korelē ar SOD1 ekspresiju SN rajonā, CC rajonā turpretī novēro negatīvu korelāciju. Savukārt CS rajonā novēro negatīvu TGF- $\beta$ 1 korelāciju ar MMP9 ekspresiju. Hroniskiem alkohola lietotājiem novēro negatīvu TGF- $\beta$ 1 ekspresijas korelāciju ar MMP9 ekspresiju CS rajona baltās vielas šķiedrās, savukārt šeit pozitīva korelācija ar SOD1 ekspresiju.

#### **4.1.6. NGFR imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti**

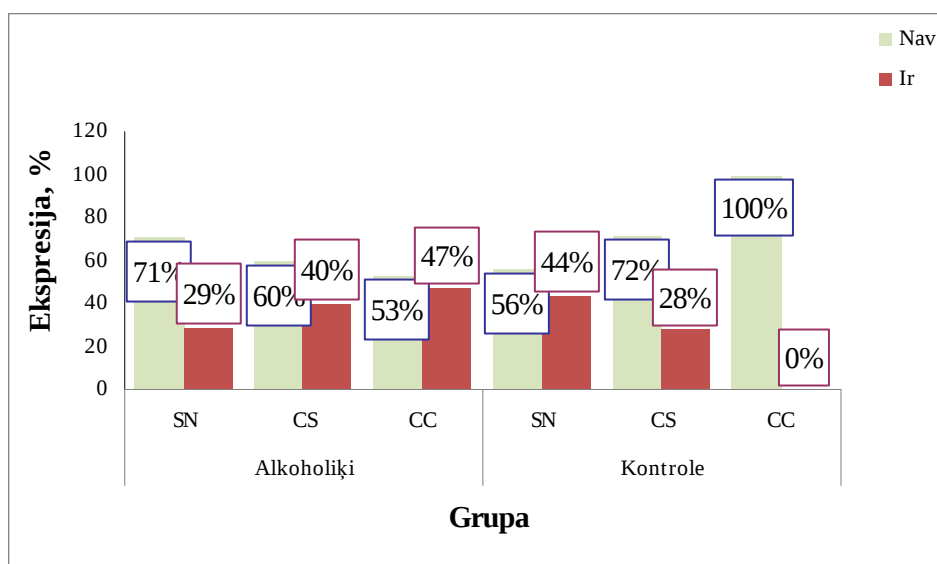
Salīdzinot SN rajona NGFR pozitīvo neironu skaitu, ieguvām statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ) visās izpētes grupās: hroniskiem alkohola lietotājiem 7,3%, ( $n=8$ ), narkomāniem 38,0%, ( $n=35$ ) un kontroles grupā 11,4%, ( $n=19$ ), (4.13. att.). Salīdzinot ar kontroli (44,3%), ( $n=31$ ), alkohola lietotājiem novēro 29,1%, ( $n=32$ ) NGFR pozitīvas baltās vielas šķiedras SN rajonā ( $p=0,037$ ), – narkomāniem (40,0%), ( $n=20$ ), salīdzinājumā ar kontroli, statistiski ticamas atšķirības nenovēro (4.14. att.).

Salīdzinot CS rajona NGFR pozitīvo neironu skaitu, ieguvām statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ): alkohola lietotājiem 26,0%, ( $n=26$ ), narkomāniem 40,0%, ( $n=20$ ) un kontroles grupā 6,0%, ( $n=3$ ), (4.13. att.). Salīdzinot CS rajona NGFR pozitīvo šķiedru daudzumu baltās vielas rajonā, neieguvām statistiski ticamas atšķirības: alkohola lietotājiem 40,0%, ( $n=40$ ), narkomāniem 28,0%, ( $n=14$ ) un kontroles grupā 28,0%, ( $n=14$ ).

Salīdzinot CC rajona NGFR pozitīvo neironu skaitu, ieguvām statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ): alkohola lietotāju grupā 45,0%, ( $n=27$ ), kontroles grupā 0,0%, ( $n=0$ ), līdzīgi dati iegūti, salīdzinot abu grupu baltās vielas šķiedras: 46,7%, ( $n=28$ ) un 0,0%, ( $n=0$ ).



4.13. att. NGFR-pozitīvo neironu skaits *substantia nigra*, *corpus striatum* un *cortex cerebri* rajonos alkohola lietotāju un kontroles grupās



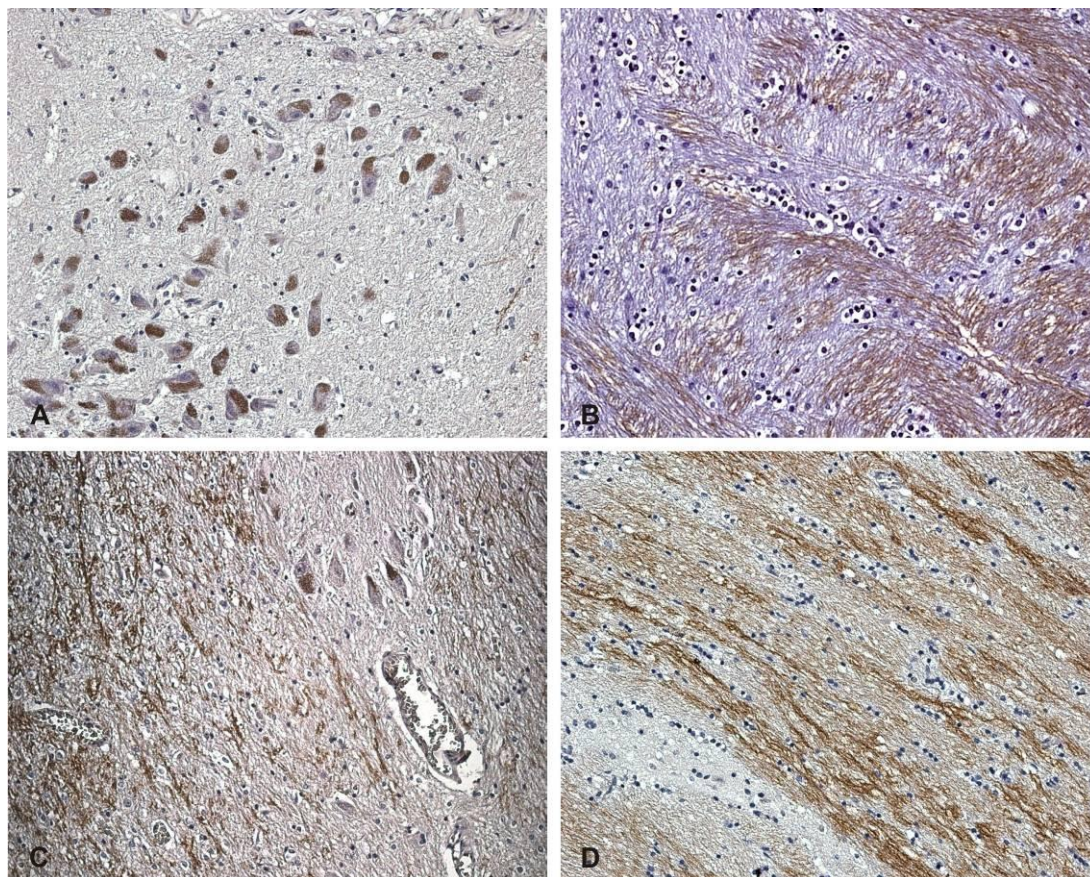
4.14. att. NGFR-pozitīvo šķiedru daudzums *substantia nigra*, *corpus striatum* un *cortex cerebri* baltās vielas rajonos alkohola lietotāju un kontroles grupās

Neironu izaugumi uzrādīja heterogēnu NGFR ekspresiju CC un bazālo gangliju rajonos.

Hroniskiem alkohola lietotājiem NGFR intensitāte neironos SN rajonā bija pārsvarā negatīva (0), CS rajonā vāji izteikta (1); attiecīgi mērena (2) intensitāte novērota SN baltās vielas rajonos, bet mērena (2) līdz izteikta (3) CS rajona baltajā vielā (4.15. A,B att).

Narkotisko vielu lietotājiem novēro pārsvarā negatīvu (0) intensitāti bazālo gangliju rajonā, reti tā bija vāji izteikta (1). SN rajona baltajā vielā tika novērota izteikta intensitāte (3), savukārt CS baltajā vielā tā bija mērena (2) līdz izteikta (3), (4.15. C att).

Kontroles grupā bazālo gangliju neironu aksoni demonstrēja negatīvu (0) vai ļoti vāju NGFR intensitāti, tajā pašā laikā SN un CS baltās vielas rajonos novērota vidēja (2) līdz izteikta (3) NGFR intensitāte (4.15. D att).



**4.15. att. (A) NGFR ekspresija alkohola lietotāju grupā SN rajona pelēkajā,  $\times 250$ , un (B) CS baltajā vielā,  $\times 250$ ; (C) narkotisko vielu lietotāju SN rajona pelēkajā un baltajā vielā,  $\times 200$ ; (D) kontroles grupā SN rajona baltajā vielā,  $\times 250$**

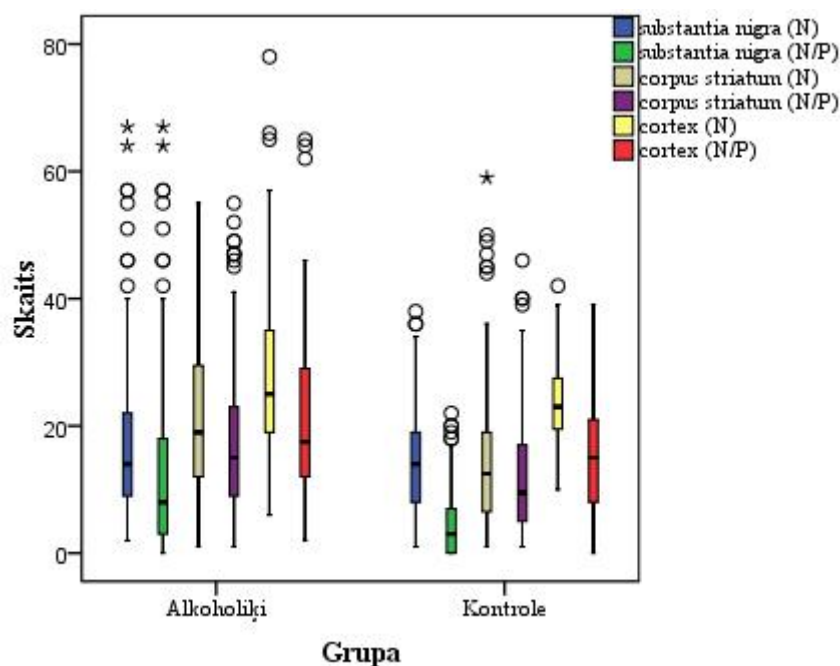
Kopsavilkums.

Salīdzinot ar kontroles grupu, izpētes grupās SN rajonos NGFR intensitāte bija zemāka gan pelēkās, gan baltās vielas rajonos, CS un CC rajonos tā bija augstāka.

Atšķirības tika novērotas, salīdzinot arī SN rajona NGFR-pozitīvo neironu skaitu un šķiedru daudzumu alkohola lietotājiem ar kontroli, attiecīgi ( 7,3%, (n=8) un 11,4%, (n=19),  $p < 0,001$ ; 29,1%, (n=32) un 44,3%, (n=31),  $p = 0,037$ ).

#### 4.1.7. SOD1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

Neironu perikarionu skaits statistiski ticami atšķīrās hroniskiem alkohola lietotājiem šajā pētījumā iekļautajos rajonos, uzrādot sekojošus rādītājus: smadzeņu garozā 25,0 (19,0; 35,0), CS 19,0 (12,0; 29,8) un SN 14,0 (9,0; 22,0), ( $p < 0,001$ ). Lielāks SOD-pozitīvu neironu skaits tika novērots CC rajonā gan hroniskiem alkohola lietotājiem, gan kontrolei, turklāt atšķirības bija statistiski ticamas – attiecīgi 17,5 (11,8; 29,0) un 15,0 (8,0; 21,0),  $p = 0,014$ . Tajā pašā laikā CS and SN uzrādīja attiecīgi statistiski ticami atšķirīgus sekojošus rezultātus: 15,0 (9,0; 23,0) un 9,5 (5,0; 17,0); 8,0 (3,0; 18,0) un 3,0 (0,0; 7,0), ( $p < 0,001$ ), (4.16. att.).



4.16. att. Hronisku alkohola lietotāju un kontroles grupas neironu (N) un SOD1 pozitīvo neironu skaits (N/P) izpētes rajonos

Neironos novēro sekojošas SOD1 intensitātes hroniskiem alkohola lietotājiem un kontrolei: attiecīgi SN 1,0 (1,0; 1,0) un 1,0 (0,0; 1,0), CS 2,0 (2,0; 3,0) un 2,0 (2,0; 3,0), CC 2,0 (2,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 1,0), turklāt rezultāti statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) atšķīrās, salīdzinot visu rajonu neironu SOD1 intensitāti gan alkohola lietotājiem, gan kontrolei. Salīdzinot SOD1 intensitāti neironos starp alkohola lietotājiem un kontroli, statistiski ticamas atšķirības novēro SN un CC rajonos, ( $p < 0,001$ ).

Alkohola lietotājiem, salīdzinot SOD1 intensitāti neironos un neiropīlā, rezultāti statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) atšķīrās visos izpētes rajonos: SN 1,0 (1,0; 1,0) un 2,0 (2,0; 3,0), CS 2,0 (2,0; 3,0) un 2,0 (2,0; 3,0), CC 2,0 (2,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 2,0). Alkohola lietotājiem, salīdzinot astrocītu un oligodendrocītu SOD1 intensitāti pelēkajā vielā, dati statistiski ticami atšķīrās SN rajonā 2,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 2,0), ( $p < 0,001$ ), un CC rajonā 2,0 (1,0; 2,0) un 2,0 (1,0; 2,0), ( $p = 0,003$ ). Alkohola lietotājiem, salīdzinot astrocītu un oligodendrocītu SOD1 intensitāti baltajā vielā, dati statistiski ticami atšķīrās SN 2,0 (2,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 3,0), ( $p = 0,044$ ), un CS rajonos 2,0 (2,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 3,0), ( $p < 0,001$ ).

Alkohola lietotājiem visos izpētes rajonos, salīdzinot pelēkās un baltās vielas rajonus, statistiski ticami atšķīrās SOD1 intensitāte astrocītos: SN 2,0 (1,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 2,0), ( $p < 0,001$ ); CS 2,0 (2,0; 3,0) un 2,0 (2,0; 2,0), ( $p = 0,004$ ); CC: astrocīti 2,0 (1,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 3,0), ( $p < 0,001$ ). Līdzīgi, alkohola lietotājiem visos izpētes rajonos, salīdzinot pelēkās un baltās vielas rajonus, statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) atšķīrās SOD1 intensitāte oligodendrocītos: SN 1,0 (1,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 3,0); CS 2,0 (2,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 3,0); CC 2,0 (1,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 3,0). Alkohola lietotāju grupā statistiski ticamas intensitātes atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēro visos izpētes rajonos, salīdzinot baltās vielas šķiedras un pelēkās vielas neiropīlu: SN 2,0 (1,0; 3,0) un 2,0 (2,0; 3,0); CS 2,0 (1,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 3,0); CC 2,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 2,0).

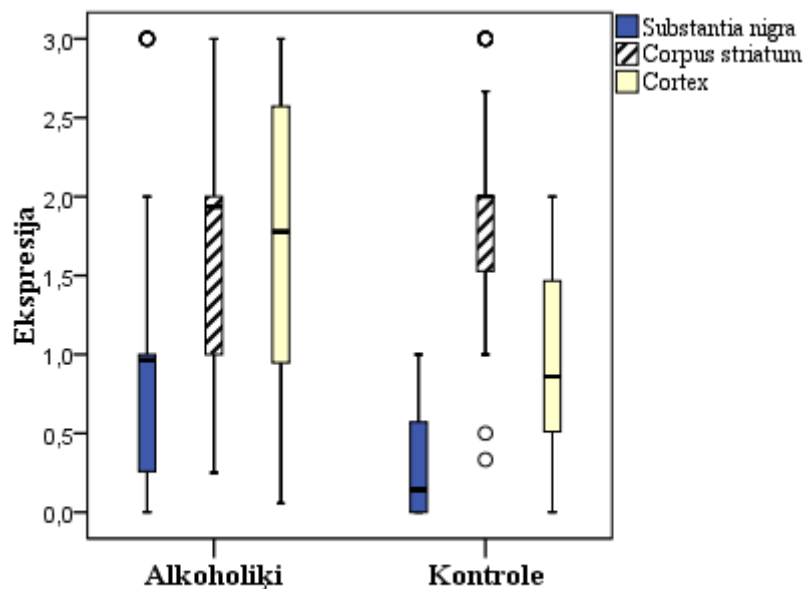
Līdzīgi kā alkohola lietotājiem, kontroles grupā visos izpētes rajonos, salīdzinot SOD1 intensitāti neironos un neiropīlā, rezultāti statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) atšķīrās: SN 1,0 (0,0; 1,0) un 2,0 (1,0; 2,0), CS 2,0 (2,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 2,0), CC 1,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 1,0). Kontroles grupā, salīdzinot astrocītu un oligodendrocītu SOD1 intensitāti pelēkajā vielā, dati statistiski ticami atšķīrās visos izpētes rajonos: SN rajonā 2,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (0,0; 1,0), ( $p < 0,001$ ); CS 2,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 2,0), ( $p < 0,001$ ) un CC rajonā 0,0 (0,0; 1,0) un 2,0 (2,0; 3,0), ( $p = 0,001$ ). Kontroles grupā, salīdzinot astrocītu un oligodendrocītu SOD1 intensitāti baltajā vielā, dati statistiski ticami atšķīrās SN 2,0 (1,0; 2,0) un 3,0 (2,0; 3,0), ( $p < 0,001$ ) un CS rajonā 1,0 (0,0; 1,8) un 2,0 (2,0; 3,0), ( $p < 0,001$ ). Kontroles grupā, salīdzinot pelēkās un baltās vielas rajonus, statistiski ticami atšķīrās SOD1 intensitāte astrocītos: CS 2,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (0,0; 1,8), ( $p < 0,001$ ); CC: 1,0 (0,0; 1,0) un 0,0 (0,0; 1,0), ( $p = 0,001$ ). SN rajonā statistiski ticamas atšķirības nenovēro, ( $p = 0,600$ ). Kontroles grupā visos izpētes rajonos, salīdzinot pelēkās un baltās vielas rajonus, statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) atšķīrās SOD1 intensitāte oligodendrocītos: SN 1,0 (0,0; 1,0) un 3,0 (2,0; 3,0); CS 1,0 (1,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 3,0); CC 1,0 (1,0; 2,0)

un 2,0 (2,0; 3,0). Kontroles grupā statistiski ticamas intensitātes atšķirības ( $p < 0,001$ ), salīdzinot baltās vielas šķiedras un pelēkās vielas neiropīlu: SN 2,0 (2,0; 2,0) un 2,0 (1,0; 2,0) un CS rajonos 1,0 (1,0; 1,0) un 1,0 (1,0; 2,0). CC rajonā statistiski ticamas SOD1 intensitātes atšķirības nenovēro, salīdzinot baltās vielas šķiedras un pelēkās vielas neiropīlu.

Statistiski ticamas SOD1 intensitātes atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēro, salīdzinot alkohola lietotājus ar kontroli: SN pelēkās vielas neiropīlā: 2,0 (2,0; 3,0) un 2,0 (1,0; 2,0), oligodendrocītos 1,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (0,0; 1,0); baltās vielas šķiedrās 2,0 (1,0; 3,0) un 2,0 (2,0; 2,0), astrocītos 2,0 (2,0; 2,0) un 2,0 (1,0; 2,0), oligodendrocītos 2,0 (2,0; 3,0) un 3,0 (2,0; 3,0). CS pelēkās vielas neiropīlā 2,0 (2,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 2,0), oligodendrocītos 2,0 (2,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 2,0); baltās vielas šķiedrās 2,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 1,0), astrocītos 2,0 (2,0; 2,0) un 1,0 (0,0; 1,8). CC pelēkās vielas astrocītos 2,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (0,0; 1,0), baltās vielas šķiedrās 2,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 1,0), astrocītos 2,0 (2,0; 3,0) un 0,0 (0,0; 1,0), oligodendrocītos 2,0 (2,0; 3,0) un 2,0 (1,0; 2,0). Salīdzinot alkohola lietotājus ar kontroli, ticami atšķīrās ( $p < 0,001$ ) astrocītu intensitāte SN baltajā vielā un CC pelēkajā vielā, savukārt oligodendrocītu intensitāte ticami atšķīrās ( $p < 0,001$ ) SN gan pelēkajā, gan baltajā vielā.

SOD1 intensitāte statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) atšķīrās, salīdzinot narkotisko vielu lietotāju un kontroles grupas neironus visos izpētes rajonos: SN 1,0 (1,0; 1,3) un 1,0 (0,0; 1,0), CS 1,0 (1,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 3,0), CC 3,0 (2,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 1,0). SOD1 intensitāte statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) atšķīrās, salīdzinot narkotisko vielu lietotāju un kontroles grupas baltās vielas šķiedras: SN 2,0 (1,0; 2,0) un 2,0 (2,0; 2,0), CC 2,0 (2,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 1,0).

SOD1 ekspresija neironos statistiski ticami atšķīrās gan alkohola lietotāju, gan kontroles grupā visos izpētes rajonos ( $p < 0,001$ ): SN 0,96 (0,25; 1,00) un 0,14 (0,00; 0,57), CS 1,97 (1,00; 2,19) un 2,00 (1,55; 2,00), CC 1,78 (0,94; 2,57) un 0,86 (0,51; 1,47). Turklāt statistiski ticamas ekspresijas atšķirības uzrādīja neironi SN un CC rajonos, salīdzinot alkohola lietotāju grupu ar kontroli, ( $p < 0,001$ ), (4.17. un 4.23. A,B,C att.).



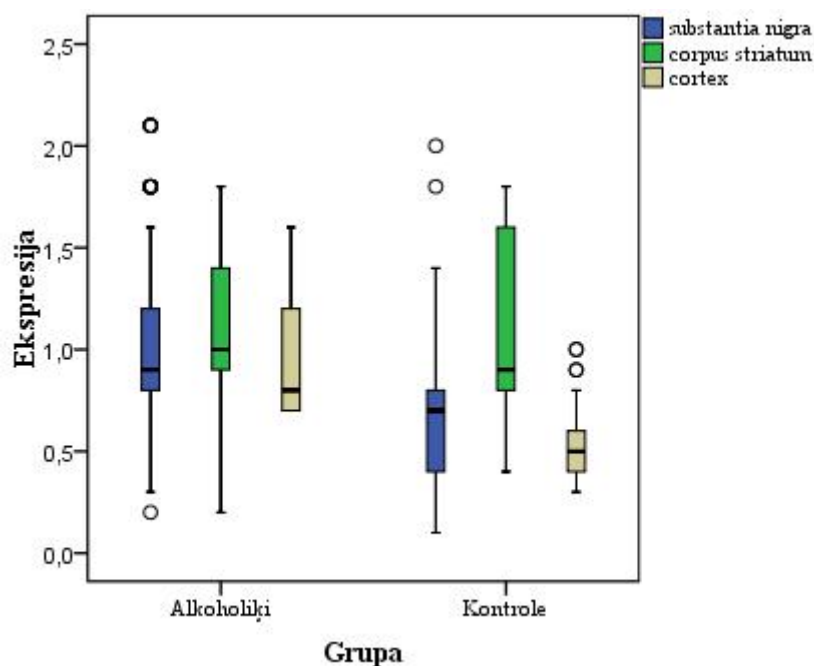
**4.17. att. SOD1 ekspresija neironos pētījumā iekļautajos rajonos hroniskiem alkohola lietotājiem un kontroles grupā**

Alkohola lietotājiem statistiski ticamas ekspresijas atšķirības novēro, salīdzinot SN ( $p=0,044$ ) un CS baltās vielas oligodendrocītus ar astrocītiem. Salīdzinot pelēkās vielas oligodendrocītus un astrocītus, statistiski ticamas atšķirības novēro tikai CC rajonā ( $p=0,022$ ).

4.1. tabulā apkopoti rezultāti ( $p<0,001$ ) par SOD1 ekspresiju oligodendrocītos, astrocītos un neiropilā pelēkās vielas rajonos, kā arī oligodendrocītos, astrocītos un neironu izaugumos baltajā vielā (4.23. D att.) visos izpētes rajonos gan alkohola lietotājiem, gan kontrolei. Salīdzinot SOD1 ekspresiju neiropilā un baltās vielas šķiedrās alkohola lietotājiem, statistiski ticamas atšķirības uzrādīja: SN 0,90 (0,80; 1,20) un 0,70 (0,50; 0,90),  $p<0,001$ ; CS 1,00 (0,90; 1,40) un 0,80 (0,60; 1,00),  $p<0,001$ ; CC 0,80 (0,70; 1,20) un 0,80 (0,60; 1,00),  $p<0,001$ . Alkohola lietotāju grupā augstāku ekspresiju novēroja visu izpētes rajonu oligodendrocītos baltajā vielā, salīdzinot attiecīgi ar pelēko vielu: SN 0,35 (0,30; 0,60) un 0,30 (0,20; 0,40),  $p<0,001$ ; CS 0,70 (0,20; 1,50) un 0,60 (0,40; 0,80),  $p=0,001$ ; CC 0,40 (0,20; 0,80) un 0,20 (0,20; 0,40),  $p<0,001$ . Statistiski ticamas atšķirības SOD1 ekspresijā novēroja astrocītos, salīdzinot balto un pelēko vielu visos izpētes rajonos alkohola lietotājiem ar kontroli, taču ekspresija atšķirības neuzrādīja, salīdzinot attiecīgos rādītājus grupu robežās. Salīdzinot oligodendrocītus ar astrocītiem baltajā vielā visos rajonos alkohola lietotājiem, statistiski ticamas atšķirības novēroja sekojoši: SN 0,35 (0,30; 0,60) un 0,30 (0,20;

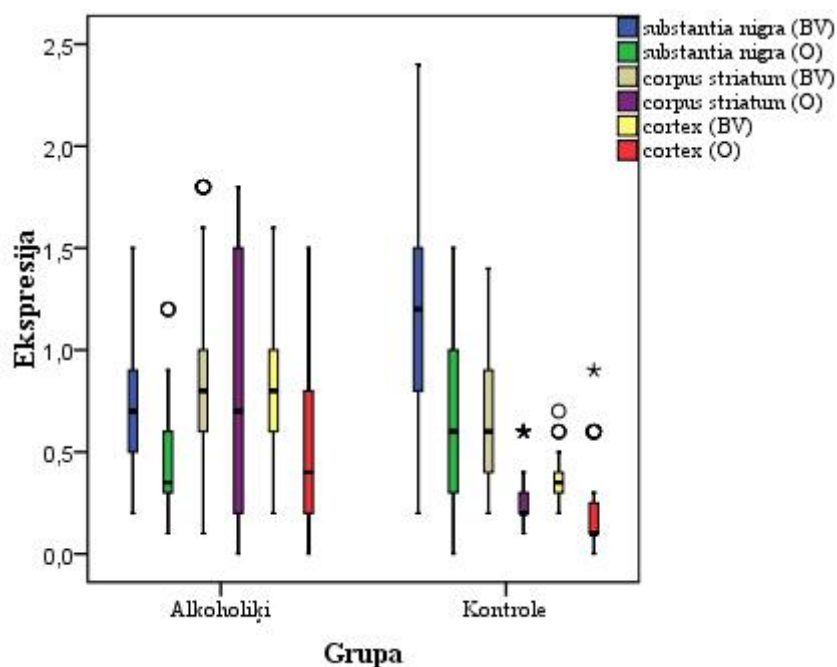
0,60),  $p=0,002$ ; CS 0,70 (0,20; 1,50) un 0,60 (0,20; 1,20),  $p<0,001$ ; CC 0,40 (0,20; 0,80) un 0,25 (0,20; 0,40),  $p<0,001$ . Turklāt alkohola lietotājiem SOD1 ekspresijas sadalījums oligodendrocītiem un astrocītiem pelēkajā vielā uzrādīja līdzīgu tendenci. Kontrolē, pretēji, astrocītos SOD1 ekspresija ticami pieauga pelēkajā vielā, salīdzinot ar oligodendrocītiem: SN 0,20 (0,18; 0,40) un 0,00 (0,00; 0,00),  $p<0,001$ ; CS 0,20 (0,10; 0,40) un 0,10 (0,00; 0,20),  $p<0,001$ ; CC 0,00 (0,00; 0,10) un 0,00 (0,00; 0,10),  $p=0,037$ .

Atšķirībā no alkohola lietotājiem, kur ticami atšķīrās ekspresija tikai CC pelēkās vielas oligodendrocītiem, tos salīdzinot ar astrocītiem, kontrolei atšķirības novēro visos izpētes rajonos: SN un CS ( $p<0,001$ ), CC ( $p=0,037$ ). Salīdzinot SOD1 ekspresiju neiropilā alkohola lietotājiem un kontrolei, statistiski ticamas atšķirības novēro SN un CC rajonos ( $p<0,001$ ), (4.18. att.).



**4.18. att. SOD1 ekspresija neiropilā alkohola lietotājiem un kontrolei visos izpētes rajonos**

Salīdzinot SOD1 ekspresiju baltās vielas šķiedrās un šī rajona oligodendrocītos alkohola lietotājiem un kontrolei, statistiski ticamas atšķirības novēro visos izpētes rajonos ( $p<0,001$ ), (4.19. att.).



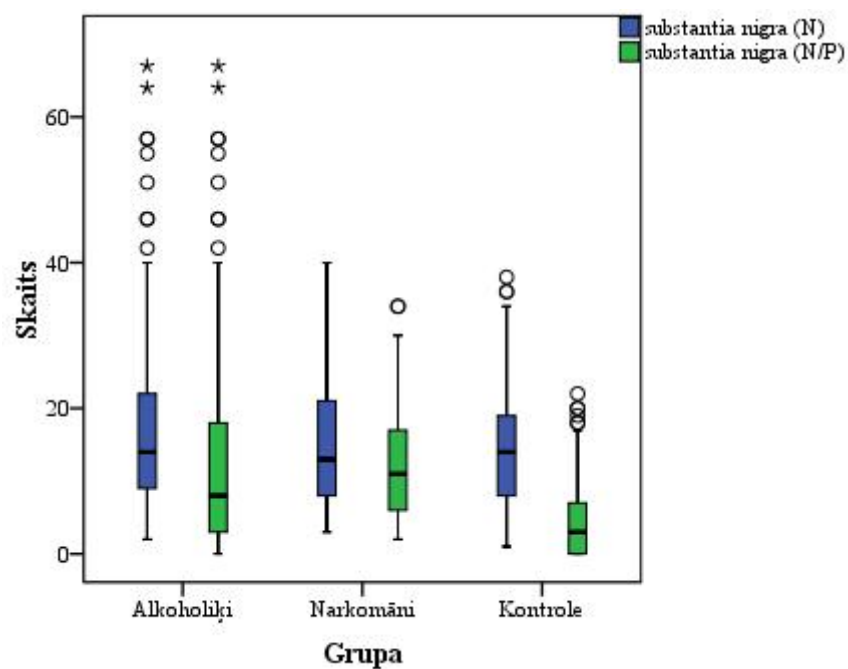
**4.19. att. SOD1 ekspresija baltās vielas šķiedrās (BV) un šī rajona oligodendrocītos (O) alkohola lietotājiem un kontrolei**

LV sieniņas endimocītos alkohola lietotāju grupā novēro negatīvu līdz vidēju ekspresiju (4.23. E att.). SOD1 ekspresija netika novērota endoteliocītos.

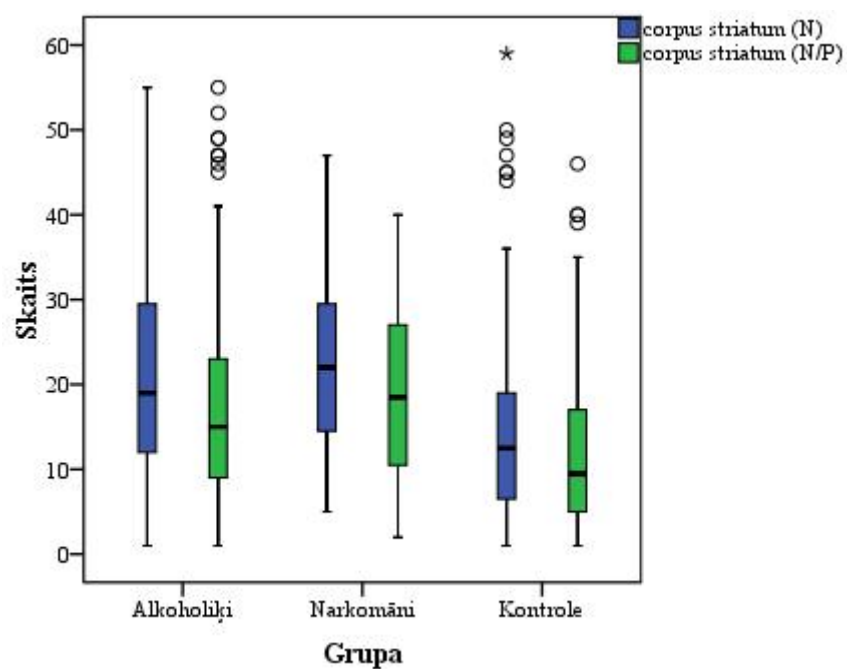
SN rajonā novēro pozitīvu SOD1 ekspresijas korelāciju neironos un baltās vielas šķiedrās alkohola lietotājiem ( $r=0,222$ ,  $p=0,002$ ). Kontroles grupā šādu korelāciju nenovēro. CS rajonā SOD1 ekspresijas korelāciju neironos un baltās vielas šķiedrās alkohola lietotājiem nenovēro, savukārt kontroles grupā novēro negatīvu korelāciju

( $r=-0,264$ ,  $p=0,042$ ). CC rajonā SOD1 ekspresijas korelāciju neironos un baltās vielas šķiedrās alkohola lietotājiem nenovēro, savukārt kontroles grupā novēro pozitīvu korelāciju ( $r=0,384$ ,  $p=0,002$ ).

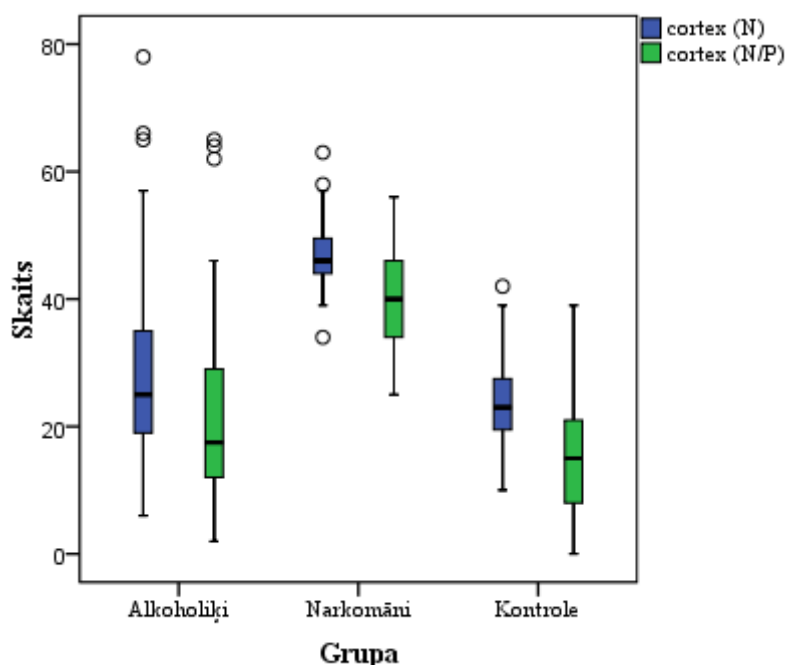
Narkotisko vielu lietotājiem novēro SOD1 pozitīvus neironus: SN 11,0 (6,0; 17,0), CS 18,5 (10,3; 27,0), CC 40,0 (34,0; 46,0). Salīdzinot alkohola lietotāju, narkomānu un kontroles grupas SOD1 pozitīvos neironus, statistiski ticamas atšķirības ( $p<0,001$ ) atrastas visos izpētes rajonos (4.20., 4.21., 4.22. att.).



4.20. att. Visu izpētes grupu neironu kopējais skaits (N) un SOD1 pozitīvo neironu skaits (N/P) SN rajonā



4.21. att. Visu izpētes grupu neironu kopējais skaits (N) un SOD1 pozitīvo neironu skaits (N/P) CS rajonā



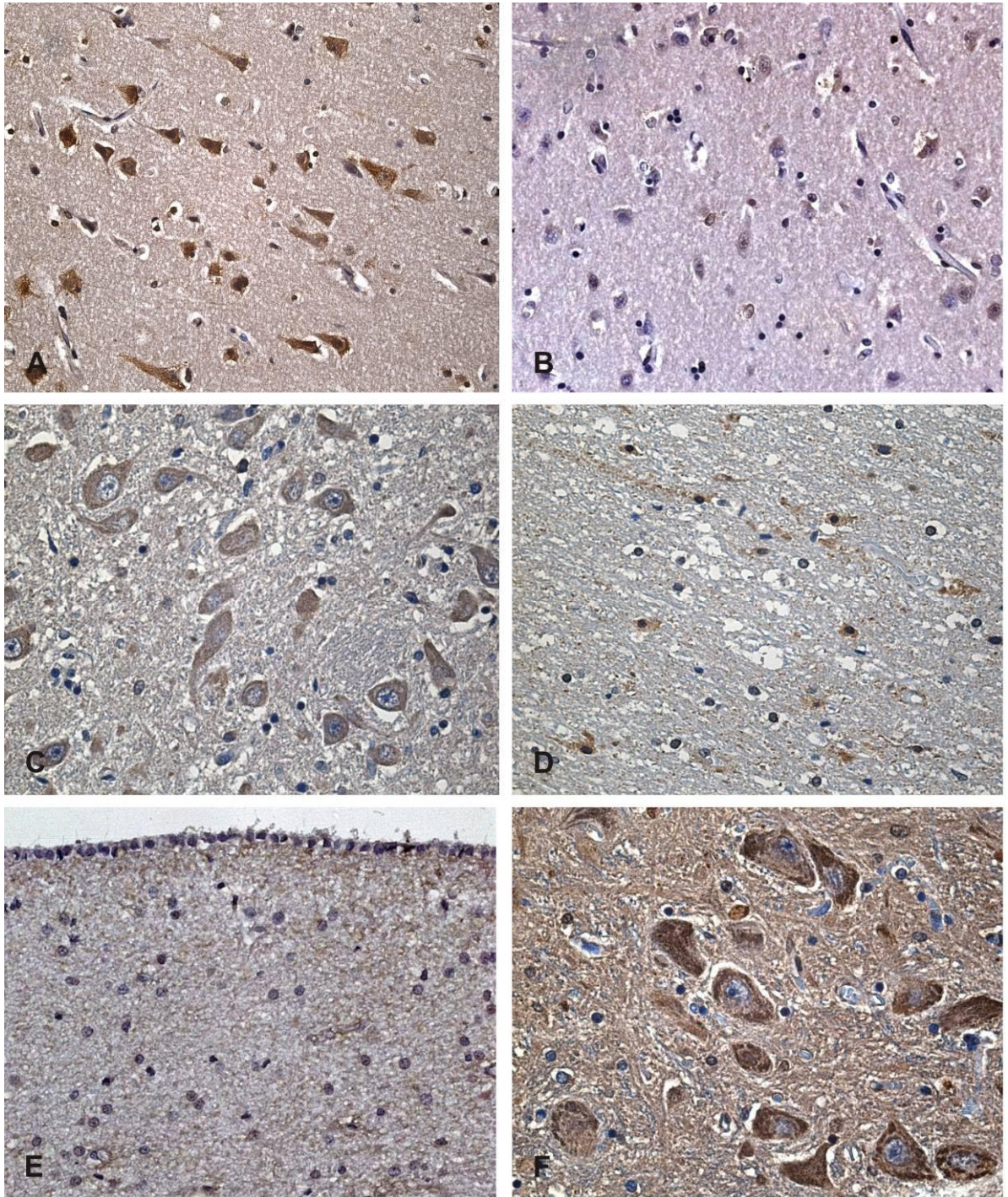
**4.22. att. Visu izpētes grupu neironu kopējais skaits (N) un SOD1 pozitīvo neironu skaits (N/P) CC rajonā**

Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, neironos SOD1 ekspresijai novēro statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ) visos izpētes rajonos: SN 1,00 (0,40; 1,00) un 0,14 (0,00; 0,57), CS 1,00 (0,79; 2,00) un 2,00 (1,55; 2,00), CC 2,22 (1,73; 2,79) un 0,86 (0,51; 1,47), (4.23. F att.).

Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, statistiski ticamas SOD1 ekspresijas atšķirības novēro visos izpētes rajonos neiropīlā: SN 1,40 (1,13, 1,60) un 0,70 (0,40; 0,85), ( $p < 0,001$ ), CS 0,80 (0,70; 1,15) un 0,90 (0,80; 1,60), ( $p = 0,001$ ), CC 1,40 (1,40; 1,60) un 0,50 (0,40; 0,60), ( $p < 0,001$ ).

Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, statistiski ticamas SOD1 ekspresijas atšķirības novēro visos izpētes rajonos pelēkās vielas astrocītos: SN 0,80 (0,40; 1,20) un 0,20 (0,18; 0,40), ( $p < 0,001$ ), CS 0,40 (0,30; 0,80) un 0,20 (0,10; 0,40), ( $p = 0,001$ ), CC 0,20 (0,20; 0,40) un 0,00 (0,00; 0,10), ( $p < 0,001$ ). Līdzīgi – pelēkās vielas oligodendrocītos SN 0,60 (0,40; 0,60) un 0,00 (0,00; 0,00), ( $p < 0,001$ ), CS 0,60 (0,30; 0,70) un 0,10 (0,00; 0,20), ( $p < 0,001$ ), CC 0,40 (0,20; 0,60) un 0,00 (0,00; 0,10), ( $p < 0,001$ ).

Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, statistiski ticamas SOD1 ekspresijas atšķirības novēro SN 0,90 (0,70; 1,20) un 1,20 (0,80; 1,50), ( $p = 0,005$ ) un CC rajona 0,60 (0,40; 0,80) un 0,35 (0,30; 0,40), ( $p < 0,001$ ) baltās vielas šķiedrās.



**4.23. att. (A) SOD1 ekspresija alkohola lietotāju grupā CC rajona neironos,  $\times 250$ , (C) SN rajona neironos,  $\times 400$ , un (D) baltajā vielā,  $\times 400$ , (E) laterālo ventrikulu sienīnā,  $\times 400$ . (B) SOD1 ekspresija CC rajonā kontroles grupai,  $\times 250$ ; (F) narkotisko vielu lietotāju SN rajona neironos,  $\times 400$**

Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, statistiski ticamas SOD1 ekspresijas atšķirības novēro visos izpētes rajonos baltās vielas astrocītos: SN 0,80 (0,60; 1,20) un 0,60 (0,48; 1,00), ( $p=0,030$ ), CS 0,30 (0,10; 0,75) un 0,05 (0,00; 0,10),

( $p < 0,001$ ), CC 0,40 (0,20; 0,60) un 0,00 (0,00; 0,10), ( $p < 0,001$ ), līdzīgi baltās vielas oligodendrocītos SN 0,60 (0,40; 0,90) un 0,60 (0,30; 1,00), ( $p = 0,039$ ), CS 0,60 (0,40; 0,60) un 0,20 (0,20; 0,30), ( $p < 0,001$ ), CC 0,60 (0,60; 0,60) un 0,10 (0,10; 0,28), ( $p < 0,001$ ).

#### Kopsavilkums.

Statistiski ticamas ekspresijas atšķirības uzrādīja neironi SN un CC rajonos, salīdzinot alkohola lietotāju grupu ar kontroli, turklāt, hroniskiem alkohola lietotājiem SOD1 ekspresijas mediānās vērtības bija augstākas. Līdzīgi rezultāti iegūti, salīdzinot narkotisko vielu lietotājus un kontroli. Rezultāti par SOD1 ekspresiju oligodendrocītos, astrocītos un neiroplā pelēkās vielas rajonos, kā arī oligodendrocītos, astrocītos un neironu izaugumos baltajā vielā alkohola lietotājiem uzrāda augstākas mediānās vērtības CS un CC rajonos, kā arī SN pelēkajā vielā. Pretēji, SN baltās vielas rajonos novēro zemākas SOD1 ekspresijas mediānās vērtības. Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, augstākas SOD1 ekspresijas mediānās vērtības novēro baltās vielas šķiedrās SN un CC rajonos.

## SOD1 ekspresijas sadalījums dažādos smadzeņu rajonos

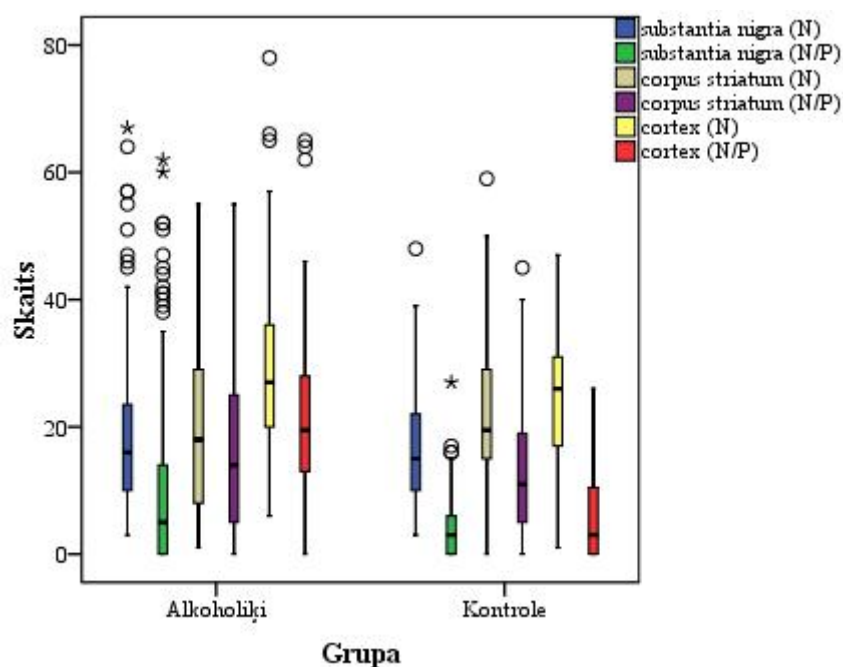
| Lokalizācija    | <i>Substantia nigra</i>    |                            |                            |                            | <i>Corpus striatum</i>       |                             |                            |                           | <i>Cortex cerebri</i>      |                           |                            |                           |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                 | Pelēkā viela               |                            | Baltā viela                |                            | Pelēkā viela                 |                             | Baltā viela                |                           | Pelēkā viela               |                           | Baltā viela                |                           |
|                 | Alkoholīķi                 | Kontrole                   | Alkoholīķi                 | Kontrole                   | Alkoholīķi                   | Kontrole                    | Alkoholīķi                 | Kontrole                  | Alkoholīķi                 | Kontrole                  | Alkoholīķi                 | Kontrole                  |
|                 | Mediāna<br>(IQR) *         | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)             | Mediāna<br>(IQR)            | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)          | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)          | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)          |
|                 | n                          | n                          | n                          | n                          | n                            | n                           | n                          | n                         | n                          | n                         | n                          | n                         |
| Neiropīls       | 0,90<br>(0,80;1,20)<br>210 | 0,70<br>(0,40;0,85)<br>110 |                            |                            | 1,00**<br>(0,90;1,40)<br>220 | 0,90**<br>(0,80;1,60)<br>80 |                            |                           | 0,80<br>(0,70;1,20)<br>190 | 0,50<br>(0,40;0,60)<br>60 |                            |                           |
| Astrocīti       | 0,40<br>(0,30;0,60)<br>210 | 0,20<br>(0,18;0,40)<br>110 | 0,30<br>(0,20;0,60)<br>200 | 0,60<br>(0,48;1,00)<br>110 | 0,60<br>(0,40;0,80)<br>210   | 0,20<br>(0,10;0,40)<br>80   | 0,60<br>(0,20;1,20)<br>180 | 0,05<br>(0,00;0,10)<br>60 | 0,20<br>(0,20;0,40)<br>190 | 0,00<br>(0,00;0,10)<br>60 | 0,25<br>(0,20;0,40)<br>160 | 0,00<br>(0,00;0,10)<br>60 |
| Oligodendrocīti | 0,30<br>(0,20;0,40)<br>220 | 0,00<br>(0,00;0,00)<br>110 | 0,35<br>(0,30;0,60)<br>200 | 0,60<br>(0,30;1,00)<br>110 | 0,60<br>(0,40;0,80)<br>210   | 0,10<br>(0,00;0,20)<br>80   | 0,70<br>(0,20;1,50)<br>180 | 0,20<br>(0,20;0,30)<br>60 | 0,20<br>(0,20;0,40)<br>190 | 0,00<br>(0,00;0,10)<br>60 | 0,40<br>(0,20;0,80)<br>160 | 0,10<br>(0,10;0,28)<br>60 |
| Nervu šķiedras  |                            |                            | 0,70<br>(0,50;0,90)<br>220 | 1,20<br>(0,80;1,50)<br>110 |                              |                             | 0,80<br>(0,60;1,00)<br>180 | 0,60<br>(0,40;0,90)<br>60 |                            |                           | 0,80<br>(0,60;1,00)<br>160 | 0,30<br>(0,30;0,40)<br>60 |

\*IQR(25%; 75%)

p<0,001; \*\* SOD1 ekspresija *corpus striatum* neiropīlā neuzrāda statistiski ticamas atšķirības salīdzinot ar kontroli, p=0,259

#### 4.1.8. MMP9 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

Statistiski ticami palielināts MMP9-pozitīvo neironu skaits tika novērots CC rajonā alkohola lietotājiem 19,5 (12,8; 28,0), salīdzinot ar kontroli 3,0 (0,0; 10,8),  $p < 0,001$ . Zemāks MMP-pozitīvu neironu skaits novērots SN rajonā alkohola lietotājiem: 5,0 (0,0; 14,0), salīdzinot ar kontroli 3,0 (0,0; 6,0),  $p < 0,001$ , (4.24. att.).



4.24. att. Alkohola lietotāju un kontroles grupas neironu kopējais skaits (N) un MMP9 pozitīvo neironu skaits (N/P) izpētes rajonos

Statistiski ticamas MMP9 intensitātes atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēro, salīdzinot visu izpētes rajonu neironus hroniskiem alkohola lietotājiem un kontrolei – SN: 1,0 (0,0; 1,0) un 1,0 (0,0; 1,0), CS: 1,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 1,0), CC: 2,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (0,0; 1,0).

Alkohola lietotāju grupā statistiski ticamas MMP9 intensitātes atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēro, salīdzinot visos izpētes rajonos neironus un neiropīlu: SN 1,0 (0; 1,0) un 1,0 (1,0; 2,0); CS 1,0 (1,0; 1,0) un 1,0 (1,0; 1,0); CC 2,0 (1,0; 2,0). Turklāt statistiski ticamas intensitātes atšķirības ( $p < 0,001$ ) tika novērotas, salīdzinot SN oligodendrocītus un astrocītus baltajā vielā 2,0 (1,0; 3,0) un 2,0 (1,0; 2,0), kā arī attiecīgi CS oligodendrocītus un astrocītus gan pelēkā 1,5 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 2,0), gan baltajā vielā 2,0 (1,0; 3,0) un 2,0 (1,0; 2,0).

Statistiski ticamas MMP9 intensitātes atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēro, salīdzinot visu izpētes rajonu neironus narkotisko vielu lietotājiem un kontrolei – SN: 1,0 (1,0; 1,0) un 1,0 (0,0; 1,0), CS: 1,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 1,0), CC: 2,0 (1,0; 3,0) un 1,0 (0,0; 1,0).

Narkomāniem statistiski ticamas MMP9 atšķirības novēro, salīdzinot intensitāti: SN neironos un neiropīlā 1,0 (1,0; 1,0) un 1,0 (1,0; 2,00), ( $p < 0,001$ ); CS 1,0 (1,0; 2,0) un 0,6 (0,5; 0,8), ( $p < 0,001$ ) un CC 2,0 (1,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 1,0), attiecīgi ( $p = 0,002$ ), kā arī SN baltās vielas astrocītos un oligodendrocītos 2,0 (2,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 2,0), ( $p = 0,002$ ).

Kontroles grupā statistiski ticamas MMP9 intensitātes atšķirības novēro, salīdzinot SN un CS neironus un neiropīlu, attiecīgi 1,0 (0,0; 1,0) un 1,0 (1,0; 1,0), ( $p < 0,001$ ); 1,0 (1,0; 1,0) un 1,0 (1,0; 1,0), ( $p = 0,009$ ). Statistiski ticamas MMP9 intensitātes atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēro, salīdzinot SN baltās un pelēkās vielas oligodendrocītus un astrocītus, attiecīgi 1,0 (0,0; 1,0) un 1,0 (0,0; 1,0); 1,00 (0,0; 2,0) un 0,0 (0,0; 1,0). Statistiski ticamas atšķirības novēro, salīdzinot CC baltās vielas oligodendrocītus un astrocītus 0,0 (0,0; 1,0) un 0,0 (0,0; 0,8), ( $p = 0,034$ ).

Alkohola lietotāju grupā statistiski ticamas ( $p < 0,001$ ) MMP9 intensitātes atšķirības novēro visu izpētes rajonu oligodendrocītos, salīdzinot balto un pelēko vielu katrā rajonā, attiecīgi SN 2,0 (1,0; 3,0) un 1,5 (1,0; 2,0); CS attiecīgi 2,0 (1,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 2,0); CC 2,0 (2,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 2,0).

Narkomānu grupā statistiski ticamas MMP9 intensitātes atšķirības novēro, salīdzinot baltās un pelēkās vielas astrocītus SN 2,0 (2,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 2,0), ( $p < 0,001$ ) un CC 2,5 (1,0; 3,0) un 1,50 (1,0; 2,0), ( $p = 0,003$ ). Līdzīgi, statistiski ticamas atšķirības novēro, salīdzinot oligodendrocītus SN 2,0 (2,0; 3,0) un 1,0 (1,0; 2,0), ( $p < 0,001$ ), CS 0,0 (0,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 1,0), ( $p = 0,003$ ), CC 2,0 (1,3; 3,0) un 1,0 (1,0; 2,0), ( $p = 0,001$ ).

Kontroles grupā statistiski ticamas MMP9 intensitātes atšķirības novēro, salīdzinot oligodendrocītus baltajā un pelēkajā vielā SN 1,0 (0,0; 2,0) un 1,0 (0,0; 1,0) ( $p = 0,004$ ), CS 0,0 (0,0; 0,0) un 1,0 (0,0; 1,0), ( $p = 0,006$ ), CC 0,0 (0,0; 1,0) un 0,0 (0,0; 0,0), ( $p = 0,005$ ). Līdzīgi, atšķirības novēro, salīdzinot baltās vielas šķiedras un pelēkās vielas neiropīlu SN 1,0 (1,0; 2,0) un 1,0 (1,0; 1,0), ( $p < 0,001$ ), kā arī CS 0,0 (0,0; 1,0) un 1,0 (1,0; 1,0), ( $p < 0,001$ ). Statistiski ticamas MMP9 intensitātes atšķirības novēro, salīdzinot CS baltās un pelēkās vielas astrocītus 0,0 (0,0; 0,0) un 1,5 (0,0; 1,0), ( $p = 0,001$ ).

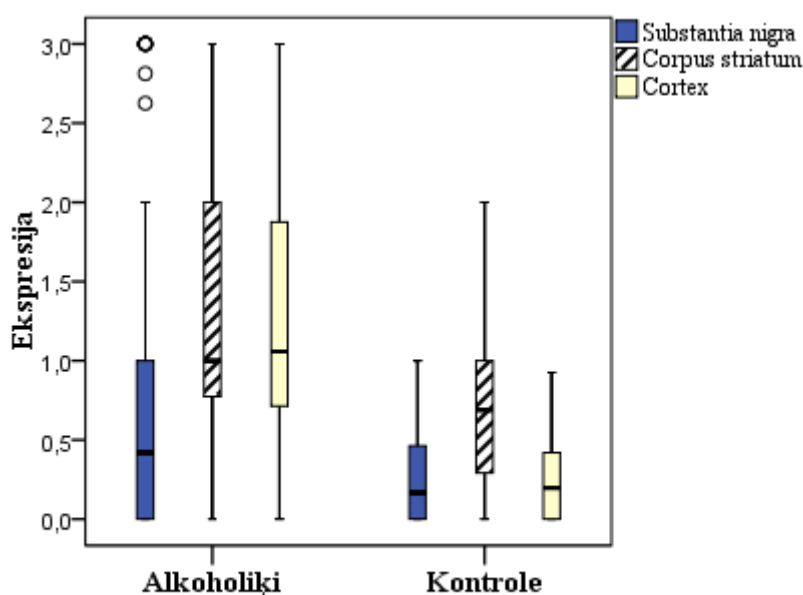
Alkohola lietotāju grupā ticamas atšķirības nenovēro MMP9 intensitātē starp SN pelēkās vielas astrocītiem un oligodendrocītiem, CC pelēkās vielas astrocītiem un oligodendrocītiem, CC baltās vielas astrocītiem un oligodendrocītiem. Šajā grupā nenovēro ticamas atšķirības starp CS pelēkās vielas astrocītiem un baltās vielas astrocītiem.

Kontroles grupā nav ticamas intensitāšu atšķirības starp SN pelēkās vielas un baltās vielas astrocītiem, kā arī CC pelēkās vielas un baltās vielas astrocītiem.

Salīdzinot MMP9 intensitāti savstarpēji alkohola lietotājiem, narkomāniem un kontrolei, statistiski ticamas atšķirības novērojām SN un CS rajonu neironos, astrocītos, oligodendrocītos pelēkajā vielā ( $p < 0,001$ ), kā arī attiecīgi baltās vielas šķiedrās, astrocītos un oligodendrocītos ( $p < 0,001$ ).

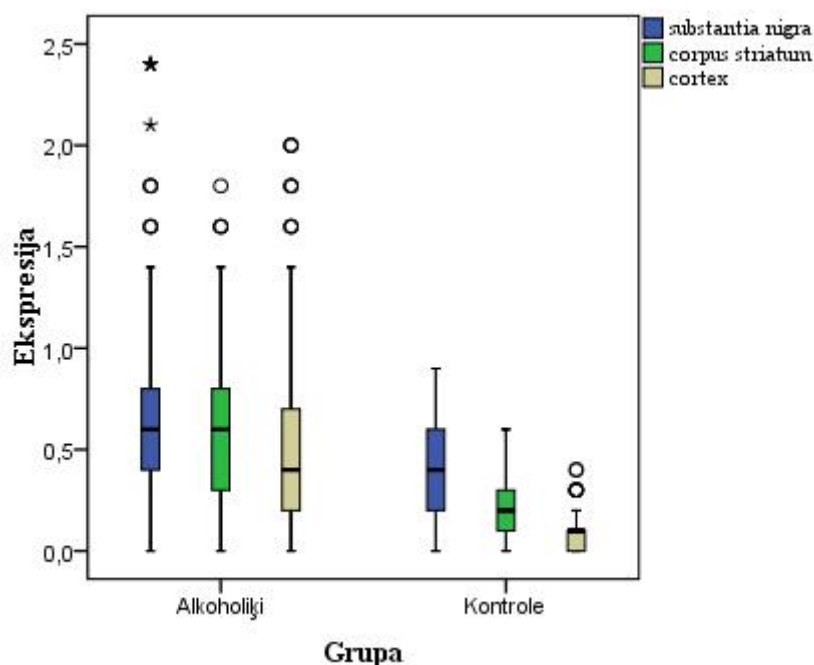
CC rajonā statistiski ticamas MMP9 intensitātes atšķirības novērojām pelēkās vielas neiropilā, baltās vielas astrocītos un oligodendrocītos ( $p < 0,001$ ).

MMP9 ekspresija neironos ticami atšķīrās ( $p < 0,001$ ) alkohola lietotāju: SN 0,42 (0,00; 1,00), CS 1,00 (0,77; 2,00), CC 1,06 (0,71; 1,88) un kontroles: SN 0,17 (0,00; 0,46), CS 0,69 (0,29; 1,00), CC 0,20 (0,00; 0,42) grupās, analizējot atšķirīgus smadzeņu rajonus. Alkohola lietotājiem statistiski ticamas atšķirības novērotas visu rajonu neironos, salīdzinot ar kontroli, ( $p < 0,001$ ), (4.25. att. un 4.31. A,B att.).



4.25. att. MMP9 ekspresija neironos alkohola lietotājiem un kontrolei visos izpētes rajonos

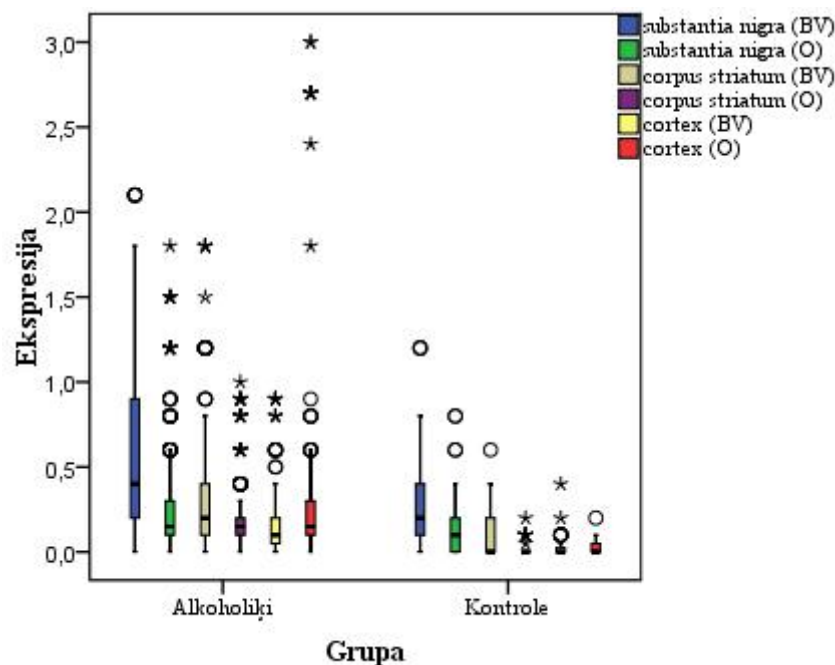
4.2. tabulas dati ( $p < 0,001$ ) atspoguļo MMP9 ekspresiju neiropīlā, oligodendrocītos, astrocītos pelēkājiā vielā un oligodendrocītos, astrocītos, neironu izaugumos baltajā vielā (4.31. C att.) gan alkohola lietotājiem, gan kontrolei visos izpētes rajonos. Salīdzinot MMP9 ekspresiju neiropīlā alkohola lietotājiem un kontrolei, statistiski ticamas atšķirības novēro visos izpētes rajonos ( $p < 0,001$ ), (4.26. att.).



**4.26. att. MMP9 ekspresija neiropīlā alkohola lietotājiem un kontrolei visos izpētes rajonos**

Salīdzinot MMP9 ekspresiju neiropīlā un baltajā vielā alkohola lietotājiem, statistiski ticamas atšķirības novēro: CS 0,60 (0,30; 0,80) un 0,20 (0,10; 0,40),  $p < 0,001$ ; CC 0,40 (0,20; 0,70) un 0,10 (0,05; 0,20),  $p < 0,001$ . Statistiski ticamas atšķirības netika novērotas SN rajonā alkohola lietotājiem, attiecīgi 0,60 (0,40; 0,80) un 0,40 (0,20; 0,90),  $p = 0,277$ .

Salīdzinot MMP9 ekspresiju baltās vielas šķiedrās un šī rajona oligodendrocītos alkohola lietotājiem un kontrolei, statistiski ticamas atšķirības novēro visos izpētes rajonos ( $p < 0,001$ ), (4.27. att.).



4.27. att. MMP9 ekspresija baltās vielas šķiedrās (BV) un šī rajona oligodendrocītos (O) alkohola lietotājiem un kontrolei

Augstāka ekspresija oligodendrocītos novērota pelēkajā vielā, salīdzinot ar kontroli: SN 0,30 (0,10; 0,60) un 0,15 (0,10; 0,30),  $p < 0,001$ , CS 0,50 (0,20; 0,80) un 0,15 (0,10; 0,20),  $p < 0,001$ . Attiecīgi MMP9 ekspresija CC oligodendrocītos neuzrādīja statistiski ticamas atšķirības. Alkohola lietotājiem MMP9 ekspresija CS baltajā vielā ticami pieauga, salīdzinot ar MMP9 ekspresiju astrocītos: 0,15 (0,10; 0,20) un 0,10 (0,00; 0,20),  $p < 0,001$ . Statistiski ticamas atšķirības novēroja MMP9 ekspresijā astrocītos alkohola lietotājiem, salīdzinot pelēko un balto vielu: SN 0,40 (0,20; 0,60) un 0,20 (0,10; 0,30),  $p < 0,001$ ; CS 0,40 (0,20; 0,80) un 0,10 (0,00; 0,20),  $p < 0,001$ ; CC 0,25 (0,10; 0,40) un 0,20 (0,10; 0,30),  $p = 0,011$ . Reti MMP9 ekspresiju novērojām asinsvadu endoteliocītos un pericītos. Tomēr alkohola lietotājiem statistiski ticamas atšķirības MMP9 ekspresijā novēroja CC endoteliocītiem, salīdzinot ar kontroli: 36 laukos no 160 (22,5%) un attiecīgi 3 laukos no 60 (5%),  $p = 0,002$ . Mēs nenovērojām MMP9-pozitīvas iekaisuma šūnas nevienā no izpētes rajoniem alkohola lietotājiem. Novērojām statistiski ticami pieaugošas MMP9 mediānās vērtības neiropīlā, astrocītos, oligodendrocītos visos rajonos alkohola lietotājiem, salīdzinot ar kontroli.

SN rajonā nav korelāciju starp neironu un baltās vielas šķiedru MMP9 ekspresiju ne alkohola lietotāju, ne kontroles grupās. Savukārt CS rajonā novēro šādas korelācijas gan alkohola lietotāju grupā ( $r = 0,298$ ,  $p < 0,001$ ), gan kontroles grupā ( $r = 0,417$ ,

$p=0,003$ ). Līdzīgas korelācijas novēro CC rajonos gan alkohola lietotājiem ( $r=0,376$ ,  $p<0,001$ ), gan kontrolei ( $r=0,382$ ,  $p=0,003$ ).

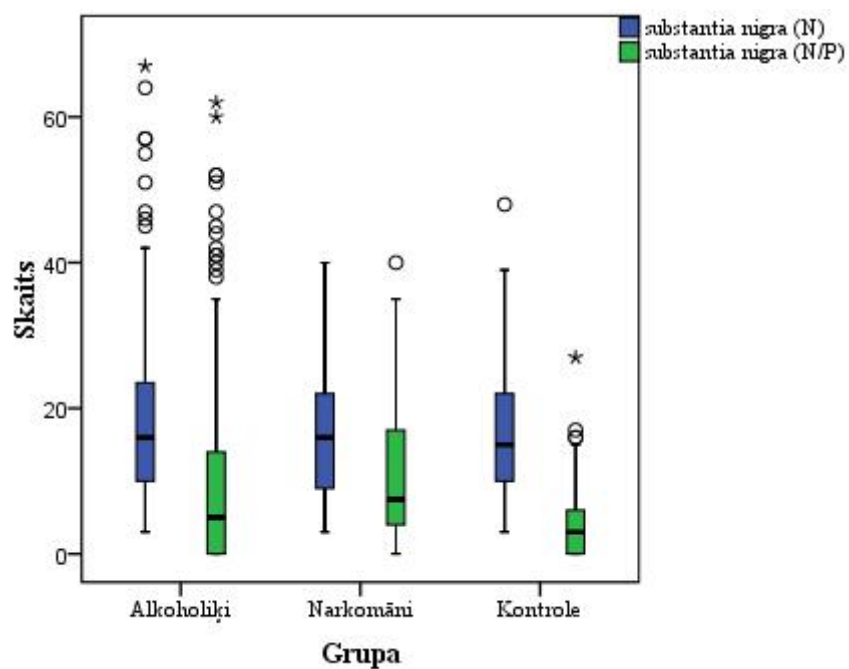
Neironos MMP9 ekspresija statistiski ticami korelē ar SOD1 ekspresiju, attiecīgi: SN ( $r=0,532$ ,  $p<0,001$ ), CS ( $r=0,327$ ,  $p<0,001$ ), un CC ( $r=0,306$ ,  $p<0,001$ ). Neiropīlā statistiski ticamas korelācijas novērojām SN ( $r=0,532$ ,  $p<0,001$ ) un CS ( $r=0,352$ ,  $p<0,001$ ) rajonos. Imūnekspressija glijas šūnās uzrādīja pretēju sakarību: alkohola lietotāju CC pelēkajā un baltajā vielā, salīdzinot ekspresiju oligodendrocītiem un astrocītiem, novērota pozitīva MMP9/SOD1 ekspresijas korelācija: ( $r=0,402$ ,  $p<0,001$ ), ( $r=0,307$ ,  $p<0,001$ ) un ( $r=0,547$ ,  $p<0,001$ ), ( $r=0,337$ ,  $p<0,001$ ), kamēr CS astrocīti baltajā vielā uzrādīja negatīvu korelāciju ( $r= -0,236$ ,  $p=0,003$ ).

MMP9 ekspresija neironos statistiski ticami korelē ar SOD1 ekspresiju baltās vielas šķiedrās SN rajonā ( $r=0,316$ ,  $p<0,001$ ); CS rajonā korelācija bija negatīva ( $r=-0,183$ ,  $p=0,021$ ). Kontroles grupā šāda korelācija ir tikai SN rajonā ( $r= 0,374$ ,  $p<0,001$ ).

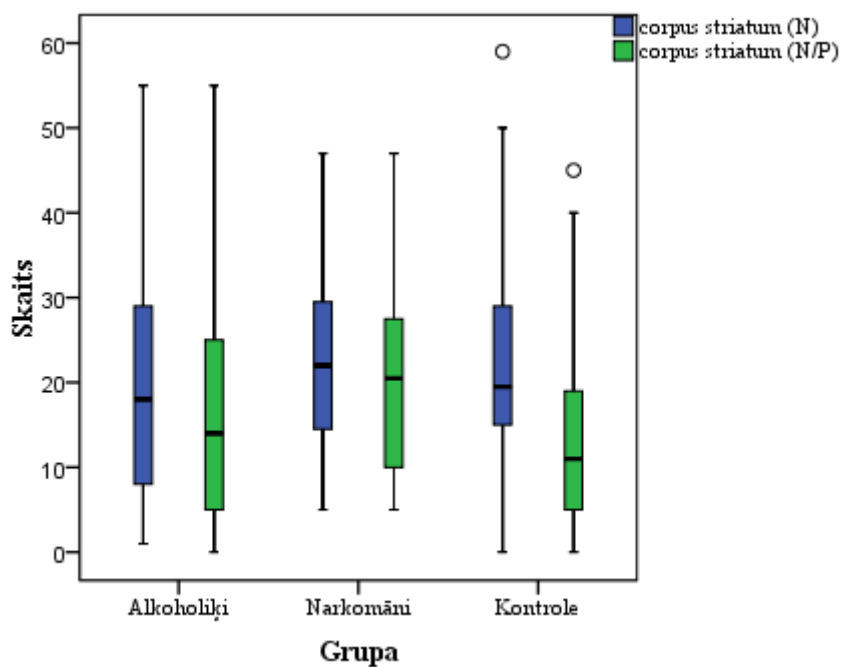
Narkotisko vielu lietotājiem MMP9-pozitīvo neironu skaits bija: SN 7,5 (4,0; 17,3); CS 20,5 (9,5; 27,8); CC 35,5 (22,3; 45,0). Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, neironos novēro MMP9 intensitāti: SN 1,00 (1,00; 1,00) un 1,00 (0,00; 1,00), CS 1,00 (1,00; 2,00) un 1,00 (1,00; 1,00), CC 2,00 (1,00; 3,00) un 1,00 (0,00; 1,00), ( $p<0,001$ ).

Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, neironos novēro statistiski ticamas MMP9 ekspresijas atšķirības ( $p<0,001$ ) visos izpētes rajonos: SN 0,56 (0,33; 1,00) un 0,17 (0,00; 0,46), CS 1,00 ( 0,85; 2,00) un 0,69 (0,29; 1,00), CC 1,76 (0,71; 2,66) un 0,20 (0,00; 0,42), (4.31. D att.).

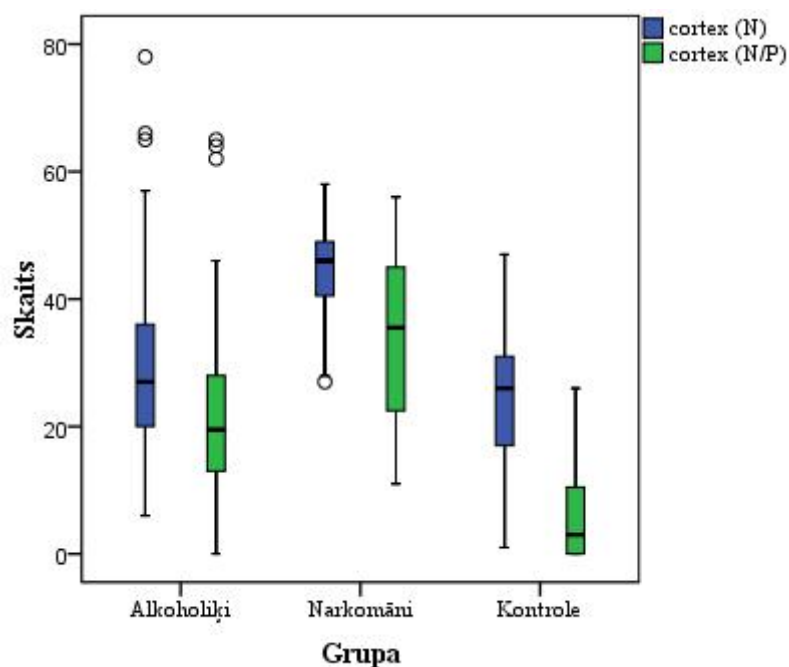
Salīdzinot MMP9 pozitīvos neironus alkohola lietotājiem, narkomāniem un kontrolei, ieguvām statistiski ticami atšķirīgus rezultātus visos izpētes rajonos: SN ( $p<0,001$ ), CS ( $p=0,001$ ), CC ( $p<0,001$ ), (4.28., 4.29., 4.30. att.).



4.28. att. Visu izpētes grupu neironu kopējais skaits (N) un MMP9 pozitīvo neironu skaits (N/P) SN rajonā



4.29. att. Visu izpētes grupu neironu kopējais skaits (N) un MMP9 pozitīvo neironu skaits (N/P) CS rajonā



**4.30. att. Visu izpētes grupu neironu kopējais skaits (N) un MMP9 pozitīvo neironu skaits (N/P) CC rajonā**

Narkotisko vielu lietotāju grupā, salīdzinot ar kontroli, statistiski ticamas ekspresijas atšķirības novēro visu izpētes rajonu šūnās un izaugumos: SN pelēkās vielas neiroplā attiecīgi 0,65 (0,5; 0,9) un 0,40 (0,20; 0,60), ( $p < 0,001$ ), astrocītos 0,30 (0,20; 0,43) un 0,10 (0,00; 0,45), SN baltajā vielā 0,6 (0,40; 0,63) un 0,20 (0,10; 0,40), astrocītos 0,60 (0,40; 0,60) un 0,00 (0,00; 0,10), oligodendrocītos 0,40 (0,19; 0,40) un 0,10 (0,00; 0,20). CS attiecīgi narkomāniem un kontrolei pelēkajā vielā neiroplā 0,60 (0,50; 0,80) un 0,20 (0,10; 0,30), astrocītos 0,30 (0,20; 0,60) un 0,03 (0,00; 0,06), oligodendrocītos 0,30 (0,20; 0,66) un 0,03 (0,00; 0,10). Savukārt baltās vielas šķiedrās 0,40 (0,10; 0,50) un 0,00 (0,00; 0,20), astrocītos 0,00 (0,00; 0,23) un 0,00 (0,00; 0,00). CC pelēkās vielas neiroplā 0,75 (0,70; 0,90) un 0,10 (0,00; 0,10), astrocītos 0,10 (0,10; 0,20) un 0,00 (0,00; 0,10), oligodendrocītos 0,10 (0,10; 0,20) un 0,00 (0,00; 0,00), bet baltās vielas šķiedrās 0,35 (0,20; 0,40) un 0,00 (0,00; 0,038), astrocītos 0,25 (0,10; 0,83) un 0,00 (0,00; 0,038), oligodendrocītos 0,40 (0,10; 0,60) un 0,00 (0,00; 0,05), izņemot SN pelēkās vielas oligodendrocītus ( $p = 0,17$ ) un CS baltās vielas oligodendrocītus ( $p = 0,223$ ).

Narkotisko vielu lietotāju grupā, salīdzinājumā ar kontroli, statistiski ticamas ekspresijas atšķirības novēro, salīdzinot baltās un pelēkās vielas astrocītus; SN, ( $p < 0,001$ ); CS ( $p < 0,001$ ); un CC ( $p = 0,005$ ). Līdzīgi, salīdzinājumā ar kontroli, statistiski ticamas ekspresijas atšķirības novēro, salīdzinot baltās un pelēkās vielas

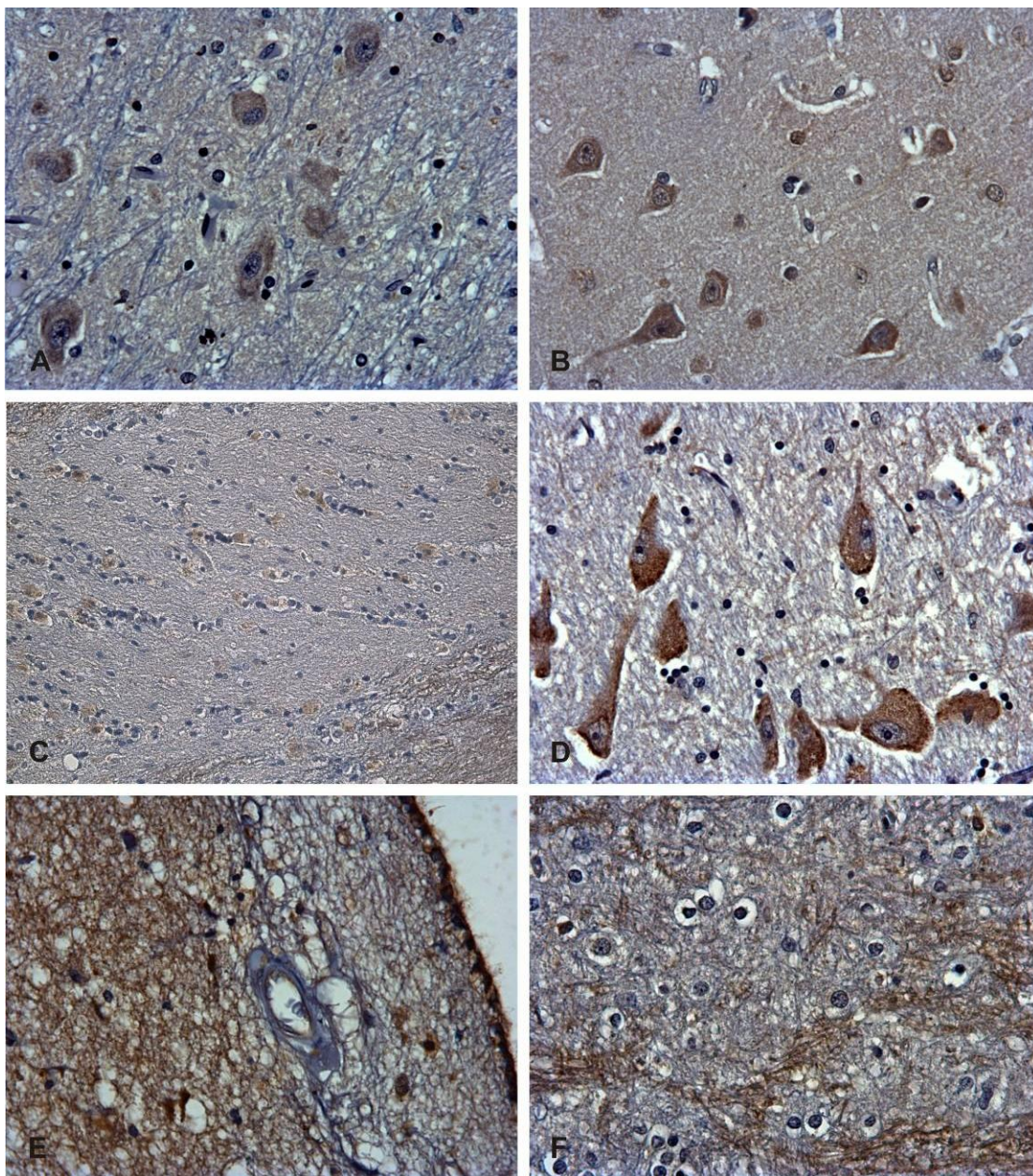
oligodendrocītus: SN ( $p<0,001$ ); CS ( $p<0,001$ ); un CC ( $p=0,001$ ). Salīdzinājumā ar kontroli, statistiski ticamas ekspresijas atšķirības novēro, salīdzinot baltās vielas šķiedras un pelēkās vielas neiroplāku CS ( $p<0,001$ ) un CC ( $p=0,002$ ) rajonos.

Salīdzinot alkohola lietotājus, narkomānus un kontroli, statistiski ticamas ekspresijas atšķirības novērojām visu izpētes rajonu baltās un pelēkās vielas šūnās un izaugumos ( $p<0,001$ ).

Narkotisku vielu lietotājiem neironos MMP9 ekspresija statistiski ticami korelē ar SOD1 ekspresiju, attiecīgi: SN ( $r=0,463$ ,  $p<0,001$ ), CS ( $r=0,269$ ,  $p<0,001$ ), un CC ( $r=0,323$ ,  $p<0,001$ ).

Narkomānu izpētes grupā ependimocītos novēro neizteiktu MMP9 ekspresiju. Kontroles grupā novērojumi līdzīgi, savukārt alkohola lietotājiem ependimocīti bija izteikti MMP9 pozitīvi (4.31. E att.).

Narkotisko vielu lietotājiem MMP9 ekspresija statistiski ticami negatīvi korelē ar SOD1 ekspresiju, novērtējot neironus un baltās vielas šķiedras: SN ( $r=-0,413$ ,  $p<0,001$ ), (4.31. F att.).



**4.31. att. (A) MMP9 ekspresija hronisko alkohola lietotāju SN rajona neironos,  $\times 400$ , (B) CC neironos,  $\times 400$  un (C) baltajā vielā,  $\times 250$ . (D) MMP9 ekspresija narkotisko vielu lietotāju SN rajona neironos,  $\times 400$ , un (F) baltajā vielā,  $\times 400$ . (E) Izteikta MMP9 ekspresija laterālo ventrikulu sienīnā un ependimocītos alkohola lietotājiem,  $\times 400$**

Kopsavilkums.

Alkohola lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, augstākas MMP9 ekspresijas mediānās vērtības novērotas visu rajonu neironu perikarionos. SN rajonā nav korelāciju starp neironu un baltās vielas šķiedru MMP9 ekspresiju ne alkohola lietotāju, ne kontroles grupās. Savukārt CS un CC rajonā novēro šādas korelācijas gan alkohola lietotāju grupā, gan kontroles grupā.

Iegūts jauns ieskats attiecībā uz antioksidantu aktivitātes un degradējošo enzīmu līdzdalības savstarpējo saistību CNS bazālajos ganglijos un CC uzbūves elementos. Izvērtējot oksidatīvā stresa izraisītus bojājumus un precizējot MMP9 lomu hronisku alkohola un narkotisko vielu lietotāju smadzenēs notiekošajos procesos, iegūtas statistiski ticamas pozitīvas SOD1 un MMP9 ekspresijas korelācijas visu izpētes rajonu neironos. SN rajonā alkohola lietotāju grupā iegūtas statistiski ticamas pozitīvas SOD1 un MMP9 ekspresijas korelācijas, izvērtējot neironus un baltās vielas šķiedras, pretēji negatīvai korelācijai CS rajonā, tādējādi pierādot atšķirīgu iespējamo izmaiņu pakāpi dažādos smadzeņu rajonos. Ar imūnhistoķīmijas un statistikas metožu iegūtajām SOD1 un MMP9 korelācijām SN rajonā alkohola lietotāju grupā skaidrojamas izmaiņas šī rajona baltās vielas šķiedrās, kas konstatētas elektronmikroskopiskās analīzes ceļā.

Narkotisku vielu lietotājiem neironos MMP9 ekspresija statistiski ticami korelē ar SOD1 ekspresiju visos izpētes rajonos. Negatīva korelācija novērota, salīdzinot narkotisko vielu lietotāju neironus un baltās vielas šķiedras SN rajonā.

**MMP9 ekspresijas sadalījums dažādos smadzeņu rajonos**

| Lokalizācija      | <i>Substantia nigra</i>    |                            |                            |                            | <i>Corpus striatum</i>     |                           |                            |                           | <i>Cortex cerebri</i>      |                           |                            |                           |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                   | Pelēkā viela               |                            | Baltā viela                |                            | Pelēkā viela               |                           | Baltā viela                |                           | Pelēkā viela               |                           | Baltā viela                |                           |
|                   | Alkoholiķi                 | Kontrole                   | Alkoholiķi                 | Kontrole                   | Alkoholiķi                 | Kontrole                  | Alkoholiķi                 | Kontrole                  | Alkoholiķi                 | Kontrole                  | Alkoholiķi                 | Kontrole                  |
|                   | Mediāna<br>(IQR) *         | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)          | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)          | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)          | Mediāna<br>(IQR)           | Mediāna<br>(IQR)          |
|                   | n                          | n                          | n                          | n                          | n                          | n                         | n                          | n                         | n                          | n                         | n                          | n                         |
| Neiropīls         | 0,60<br>(0,40;0,80)<br>240 | 0,40<br>(0,20;0,60)<br>110 |                            |                            | 0,60<br>(0,30;0,80)<br>250 | 0,20<br>(0,10;0,30)<br>70 |                            |                           | 0,40<br>(0,20;0,70)<br>170 | 0,10<br>(0,00;0,10)<br>60 |                            |                           |
| Astrociīti        | 0,40<br>(0,20;0,60)<br>240 | 0,10<br>(0,00;0,5)<br>110  | 0,20<br>(0,10;0,30)<br>230 | 0,00<br>(0,00;0,10)<br>110 | 0,40<br>(0,20;0,80)<br>250 | 0,03<br>(0,00;0,07)<br>70 | 0,10<br>(0,00;0,20)<br>220 | 0,00<br>(0,00;0,00)<br>50 | 0,25<br>(0,10;0,40)<br>170 | 0,00<br>(0,00;0,10)<br>60 | 0,20<br>(0,10;0,30)<br>160 | 0,00<br>(0,00;0,04)<br>60 |
| Oligodendroīti    | 0,30<br>(0,10;0,60)<br>240 | 0,10<br>(0,00;0,60)<br>110 | 0,15<br>(0,10;0,30)<br>240 | 0,10<br>(0,00;0,20)<br>110 | 0,50<br>(0,20;0,80)<br>250 | 0,03<br>(0,00;0,10)<br>70 | 0,15<br>(0,10;0,20)<br>220 | 0,03<br>(0,00;0,10)<br>50 | 0,30<br>(0,10;0,40)<br>160 | 0,00<br>(0,00;0,00)<br>60 | 0,15<br>(0,10;0,30)<br>160 | 0,00<br>(0,00;0,05)<br>60 |
| Nervu<br>šķiedras |                            |                            | 0,40<br>(0,20;0,90)<br>240 | 0,20<br>(0,10;0,40)<br>110 |                            |                           | 0,20<br>(0,10;0,40)<br>220 | 0,00<br>(0,00;0,20)<br>50 |                            |                           | 0,10<br>(0,05;0,20)<br>160 | 0,00<br>(0,00;0,04)<br>60 |

\*IQR(25%; 75%)

p&lt;0,001

Neironu imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas sadalījums dažādās alkohola lietotāju vecuma grupās.

Ar vecumu vāji korelē SOD1 SN neironos ( $r=0,139$ ,  $p=0,039$ ), citos izpētes rajonos korelācijas nenovēro, korelācijas nenovēro arī MMP9 ekspresijā.

Atlasītu grupu, kur gados jauni hroniski alkohola lietotāji (zem 34 g.), salīdzinot ar grupu, kur gados veci alkohola atkarīgie (virs 60 g.), korelācijas nenovēro SOD1 un MMP9 ekspresijai, bet tādas novēro TGF- $\beta$ 1 ekspresijai, turklāt SN rajonā vērtības samazinās līdz ar vecumu, bet CC – pieaug.

#### 4.1.9. TUNEL reakcija

TUNEL reakcija tika veikta, skrīninga veidā izvēloties gadījumus no hronisku alkohola lietotāju, narkotisku vielu lietotāju un kontroles grupas.

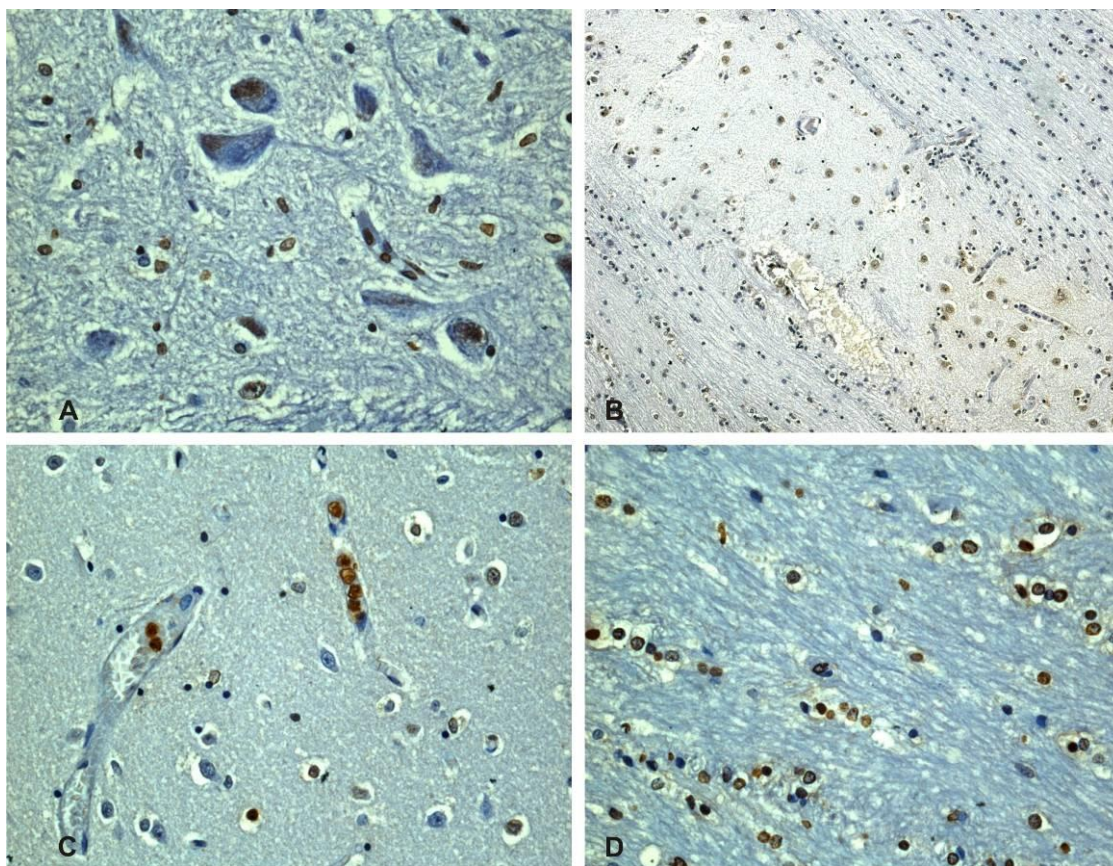
Alkohola lietotājiem SN rajonā neatrod TUNEL-pozitīvu neironu kodolus; gan pelēkās, gan baltās vielas astrocītos un oligodendrocītos atrod 5%, ( $n=20$ ) TUNEL-pozitīvu šūnu kodolu. Narkotisko vielu lietotājiem atrasti TUNEL-pozitīvi kodoli neironos ( $< 5\%$ ), ( $n=20$ ); gan pelēkās, gan baltās vielas astrocītos un oligodendrocītos atrasti 10 – 20%, ( $n=20$ ) TUNEL-pozitīvu šūnu kodolu (4.32. A att.). Kontroles grupā šajā rajonā neatradām TUNEL-pozitīvus neironu kodolus; gan pelēkajā, gan baltajā vielā atradām atsevišķus TUNEL-pozitīvus astrocītu un oligodendrocītu kodolus.

CS rajonā alkohola lietotāju grupā atrasti TUNEL-pozitīvi neironu kodoli (20%), ( $n=70$ ); gan pelēkās, gan baltās vielas astrocītos un oligodendrocītos atrod 5 – 10%, ( $n=70$ ) TUNEL-pozitīvu šūnu kodolu (4.32. B att.). Kontroles grupā atrasti TUNEL-pozitīvi neironu kodoli (5 – 20%), ( $n=30$ ); gan pelēkās, gan baltās vielas astrocītos un oligodendrocītos atrod  $<5\%$ , ( $n=30$ ) TUNEL-pozitīvu šūnu kodolu (4.32. C att.).

CC rajonā alkohola lietotāju grupā atrasti TUNEL-pozitīvi neironu kodoli (10%), ( $n=10$ ); gan pelēkās, gan baltās vielas astrocītos atrod 10%, ( $n=10$ ) TUNEL-pozitīvu šūnu kodolu. Savukārt pelēkās vielas rajonā atrasti 10%, ( $n=10$ ) TUNEL-pozitīvi oligodendrocītu kodoli, bet baltās vielas rajonos 30%, ( $n=10$ ) TUNEL-pozitīvi oligodendrocītu kodoli (4.32. D att.).

TUNEL reakcijas rezultāti, t.i., TUNEL-pozitīvo šūnu kodolu skaits gan hroniskas alkohola, gan narkotisku vielu lietošanas gadījumos, salīdzinot ar kontroles grupu bija augstāka.

Vislielāko skaitu TUNEL-pozitīvo neironu kodolu alkohola lietotāju grupā novēro CS rajonā (4.32. B att.), salīdzinoši CC rajonā mazāk. Visvairāk TUNEL-pozitīvu astrocītu kodolu novērots CS un CC baltajā vielā, retāk SN rajonā. TUNEL-pozitivitāte tika novērota oligodendroglijas šūnu kodolos baltās vielas rajonos – visvairāk CC rajonā (4.32. D att.). Ļoti reti novēroja ekspresiju ependimocītu kodolos. TUNEL-pozitīvi endoteliālo šūnu kodoli variēja no 2,88%, (n=30) līdz 10,46%, (n=30) hroniska alkoholisma gadījumos un no 16,30%, (n=20) līdz 16,34%, (n=20) narkomānijas gadījumos.



**4.32. att. (A) Narkotisko vielu lietotāju SN rajona pelēkā vielā,  $\times 400$ ; (B) alkohola lietotāju CS rajona pelēkā un baltā vielā,  $\times 200$ ; (C) kontroles grupas TUNEL-pozitīvi oligodendrocīti CS pelēkās vielas rajonā,  $\times 400$ , (D) alkohola lietotāju CC baltajā vielā TUNEL-pozitīvie oligodendrocīti un astrocīti,  $\times 400$**

Kopsavilkums.

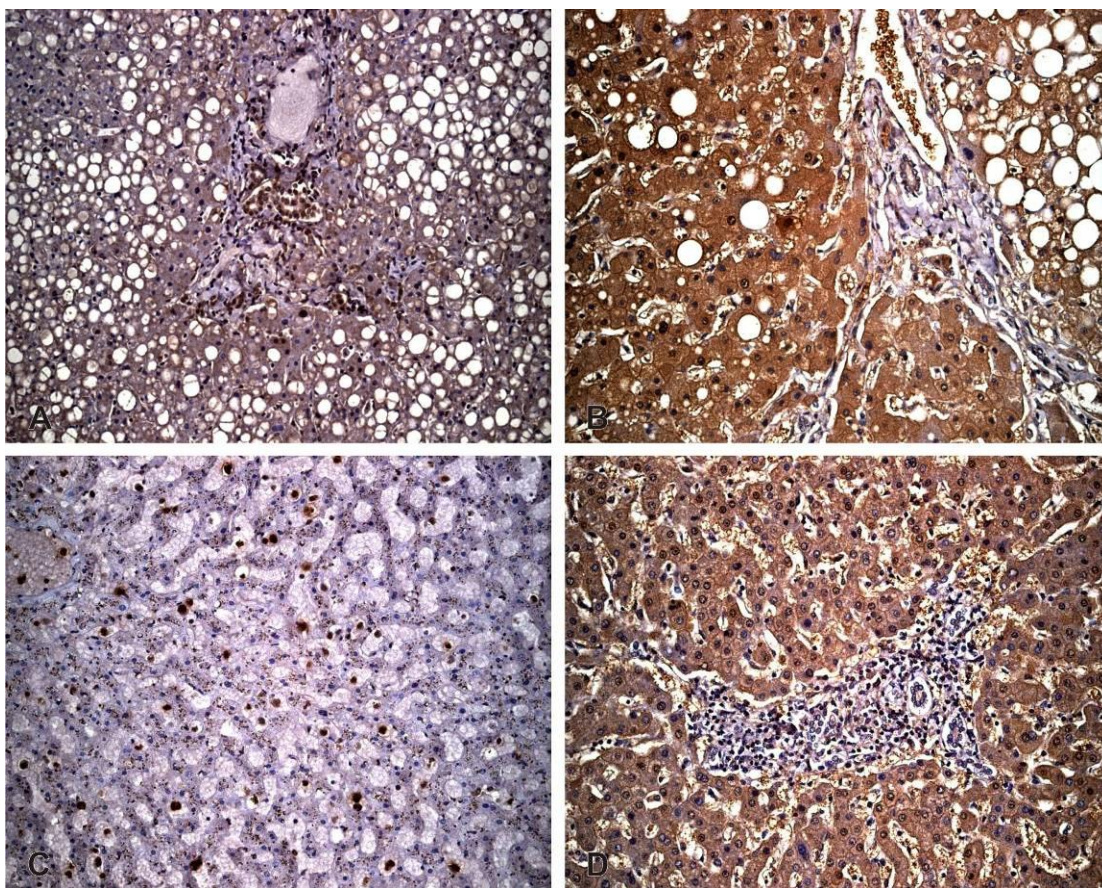
Alkohola lietotāju grupā SN rajonā neatrod TUNEL-pozitīvus neironu kodolus atšķirībā no narkotisko vielu lietotāju grupas, kur novērota neliela TUNEL-pozitivitāte neironos. Vislielāko skaitu TUNEL-pozitīvo neironu kodolu alkohola lietotāju grupā novēro CS rajonā, CC rajonā mazāk. Augstāku TUNEL-pozitīvu glijas šūnu kodolu skaitu novēro SN rajona baltajā un pelēkajā vielā pretēji CS, kur novēro lielāku TUNEL-pozitīvu neironu skaitu, salīdzinot ar glijas šūnām. Izņēmums bija CC baltā viela, kur novēro visaugstāko TUNEL-pozitivitāti oligodendrocītos.

#### **4.1.10. Aknu audu SOD1 un TGF- $\beta$ 1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti**

Analīzei ar anti-TGF- $\beta$ 1 un anti-SOD1 antivielām tika izvēlēti atsevišķi gadījumi no alkohola lietotāju un kontroles grupām.

Hroniskiem alkohola lietotājiem TGF- $\beta$ 1 ekspresija hepatocītos variēja no vāji izteiktas (1) līdz izteiktai (3), galvenokārt tā bija mēreni izteikta (2) (4.33. A att.). Savukārt SOD1 intensitātes pakāpe variēja no mēreni izteiktas (2) līdz izteiktai (3) (4.33. B att.). SOD1 pozitīvo hepatocītu daudzums variēja no 51 – 75%, (n=130), savukārt TGF- $\beta$ 1 pozitīvo hepatocītu daudzums bija >76%, (n=60). TGF- $\beta$ 1 imūnekspresija bija izteikti pozitīva žultsvadu epitēlijā un makrofāgos, un negatīva fibroblastos (4.33. C att.). SOD1 intensitāte žultsvadu epitēlijā un makrofāgos visbiežāk bija negatīva (0). Alkoholisma gadījumā SOD1 reakcijas produkts lokalizējas hepatocītos, ir manāmi intensīva krāsojuma rajoni, tomēr tie nav viendabīgi, līdzīgi narkotisko vielu lietošanas gadījumā (4.33. D att.). Mazāk izteikta reakcijas produkta lokalizācija ir vērojama portālā trakta saistaudu šūnās.

Kontroles grupā SOD1 un TGF- $\beta$ 1 intensitāte variēja no vāji izteiktas (1) līdz mēreni izteiktai (2).



**4.33. att. (A,C) TGF- $\beta$ 1 ekspresija hepatocītos un žultsvadu epitēlijā alkohola lietotājiem,  $\times 200$ ,  $\times 250$ . SOD1 ekspresija alkohola lietotāju (B) un narkotisko vielu lietotāju hepatocītos (D),  $\times 250$**

## **4.2. Caurstarojošās elektronmikroskopijas rezultāti**

### **4.2.1. Neironu perikarionu ultrastruktūra**

Atsevišķi vidēja izmēra neregulāras formas nervu šūnu ķermeņi redzami CS rajonā. SN rajonā raksturīgi vidēja izmēra un lieli neironu perikarioni. Nervu šūnu kodoliem ir samērā gluda, membrānas veidota kontūra un smalks, granulāra hromatīna veidots zīmējums. Viens liela izmēra kodoliņš raksturīgs katram kodolam. Dažiem neironu kodoliem vērojama viļņota kodola membrāna, bet arī šādos gadījumos kodola hromatīns ir sīkgraudains (4.34. A att.). Vairākumā gadījumu vērojams izteikts graudainais endoplazmatiskais tīkls ar regulāri izvietotām paralēlām cisternām (4.34. B att.) šūnas citoplazmā. Dažreiz šīs cisternas ir nedaudz paplašinātas. Goldži komplekss ir vāji vai vidēji attīstīts un lokalizējas endoplazmatiskā tīkla rajonā. Nervu šūnu

citoplazmā vērojami apaļi vai ovālas formas uzbrieduši mitohondriji ar zemu matricas blīvumu. Mitohondriju kristas uzrāda ļoti lielu formas daudzveidību, daži mitohondriji uzrāda reducētu kristu daudzumu. Vairums gadījumu kristas ir šauras un paralēli orientētas, tomēr vērojamas arī vakuolizētas mitohondriju kristas. Nervu šūnu perikarionos vērojami atsevišķi lipofuscīna ieslēgumi. Bieži lipofuscīna ieslēgumus satur arī dendrītu izaugumi. Atsevišķi CC neironi satur ovālus ieslēgumus ar elektronoptiski blīvu matrici. SN neironi satur melanīna pigmenta graudiņus, kas labi saskatāmi jau gaismas mikroskopijas līmenī. Elektronmikroskopiskajā analīzē nenovērojām nervu šūnu bojāeju. Neironu perikariona ultrastruktūra atspoguļo normālu sintēzes procesa norisi šūnā. Ultrastrukturālie novērojumi apkopoti 4.3. tabulā. Izteiktas atšķirības neironu uzbūvē dažādos smadzeņu rajonos netika novērotas.

### Ultrastrukturālas izmaiņas CNS rajonos hroniskiem alkohola lietotājiem

|                                | <i>Corpus striatum</i>                                                                                                     | <i>Substantia nigra</i>                                                                                                      | <i>Cortex cerebri</i>                                                                                                  |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Neironi:</b>                |                                                                                                                            |                                                                                                                              |                                                                                                                        |
| kodols                         | apaļi vai ovālas formas kodoli ar izteiktu sīkgraudainu hromatīnu                                                          | apaļas vai viļņotas formas kodols ar kodoliņu; izteikts granulārā hromatīna zīmējums                                         | apaļīgas formas kodols ar fragmentētu kodoliņu; samazināts hromatīna daudzums                                          |
| endoplazmatiskais tīkls        | dažreiz uzbriedušas cisternas                                                                                              | vidēji attīstīts, pārsvarā ar saplacinātām cisternām, ribosomu un poliribosomu esamība                                       | uzbriedušu cisternu esamība                                                                                            |
| mitohondriji                   | vidējs daudzums mitohondriju ar uzbriedušām un vakuolizētām kristām                                                        | daudz ovālas formas mitohondriju ar uzbriedušām un vakuolizētām kristām                                                      | daži uzbrieduši, elektronoptiski gaiši mitohondriji ar vakuolizētām kristām                                            |
| ieslēgumi                      | bieži lipofuscīna ieslēgumi šūnu izaugumos                                                                                 | melanīna ieslēgumi perikarionā                                                                                               | lipofuscīna ieslēgumi perikarionā                                                                                      |
| šūnu gala izaugumi un sinapses | variabls daudzums citoskeleta elementu; sinaptiskie termināli ar pūslīšiem, iztukšotu sinapšu esamība                      | neredz sinapses                                                                                                              | iztukšota citoplazma, dažu sinapšu esamība                                                                             |
| <b>Astrocīti:</b>              |                                                                                                                            |                                                                                                                              |                                                                                                                        |
| kodols un šūnas ķermenis       | ieapaļi kodoli ar regulāri izvietotiem hromatīna sakopojumiem, uzbriedis endoplazmatiskais tīkls, dažas apoptotiskas šūnas | ieapaļš kodols, bieži uzbriedis endoplazmatiskais tīkls, dažādas formas mitohondriji, daži astrocīti ar iztukšotu citoplazmu | apaļīgi kodoli, bieži samazināts hromatīna daudzums, elektronoptiski gaiša citoplazma ar samazinātu organellu daudzumu |
| izaugumi                       | vidējs daudzums citoskeleta elementu                                                                                       | vidēja daudzuma citoskeleta elementi                                                                                         | endotēlija tuvumā izaugumos iztukšota citoplazma ar lieliem, uzbriedušiem mitohondrijiem                               |
| <b>Oligodendrocīti:</b>        |                                                                                                                            |                                                                                                                              |                                                                                                                        |
| kodols un šūnas ķermenis       | apaļas vai ovālas formas kodoli ar hromatīna sakopojumiem                                                                  | elektronoptiski blīva citoplazma, ieslēgumu esamība, daži apoptotiski šūnu ķermeņi                                           | elektronoptiski blīva citoplazma, uzbriedis endoplazmatiskais tīkls                                                    |

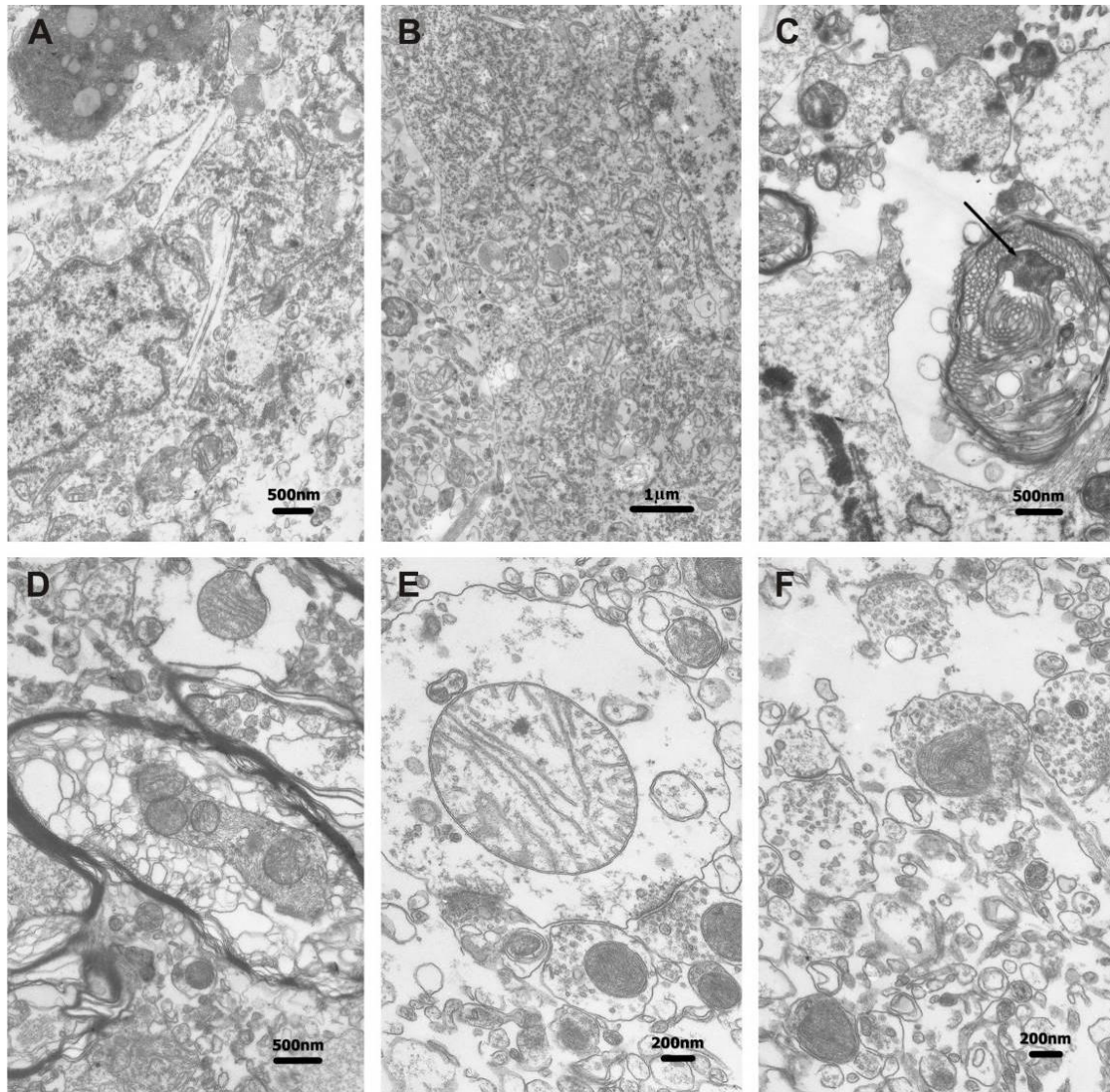
4.3. tabulas turpinājums

|                        |                                                                                                                                                                                   |                                                                                                     |                                                                                                                |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mielīna apvalks</b> | dažāda biezuma mielīna apvalks; mielīna slāņa paplašinājumi; neregulāras formas cilpas ar balonveida paplašinājumiem paranodālajos rajonos; gan normāla, gan iztukšota citoplazma | gan paralēlas, gan atslāņojušās mielīna membrānas, bieži novēro cilpveida membrānas, to krustošanos | aksonāla deģenerācija ar elektronoptiski blīvu citoplazmu, iztukšota citoplazma ar uzbriedušiem mitohondrijiem |
| <b>Mikroglia</b>       | neregulāras formas kodols ar heterohromatīna sakopojumiem, elektronoptiski blīva citoplazma                                                                                       | neregulāras formas kodols ar heterohromatīna sakopojumiem, elektronoptiski blīva citoplazma         | neregulāras formas kodols ar heterohromatīna sakopojumiem, elektronoptiski blīva citoplazma                    |

#### 4.2.2. Neironu izaugumu ultrastrukturālā izpēte

Novērojām aksonus, kuru citoplazma pārsvarā uzbriedusi. Raksturīgi, ka novērojami aksoni, kam iztukšota centrālā daļa, perifērijā saglabājušies citoplazmas un organellu fragmenti. Tomēr ir arī tādi aksoni, kur vērojami izteikti citoskeleta diedziņi. Abos iepriekš minētajos variantos aksonu citoplazmā novēroti lieli, uzbrieduši mitohondriji. Reizēm viens vai divi mitohondriji aizņem visu aksona šķērs griezumu. Ap aksoniem bieži novērots mielīna apvalks, kas zaudējis membrānu paralēlo novietojumu. Bieži mielīna apvalkā veidojas paplašinājumi ar citoplazmas ieslēgumiem vai bez tiem. Nereti novērojām mielīna membrānu ieloces, līdzīgas vakuolām, membrānas bieži krustojas. Sakrustotas membrānas novērojām gan mielīna apvalka ārējā daļā, gan vidusdaļā, retāk tuvu aksonam (4.34. C,D att.). Salīdzinoši, kontroles gadījumos novērojām mielīna membrānu atslāņošanas, reti arī vakuolām līdzīgus paplašinājumus. Tomēr mielinētiem aksoniem skaidri iezīmējās apvalka kopējā paralēlā struktūra.

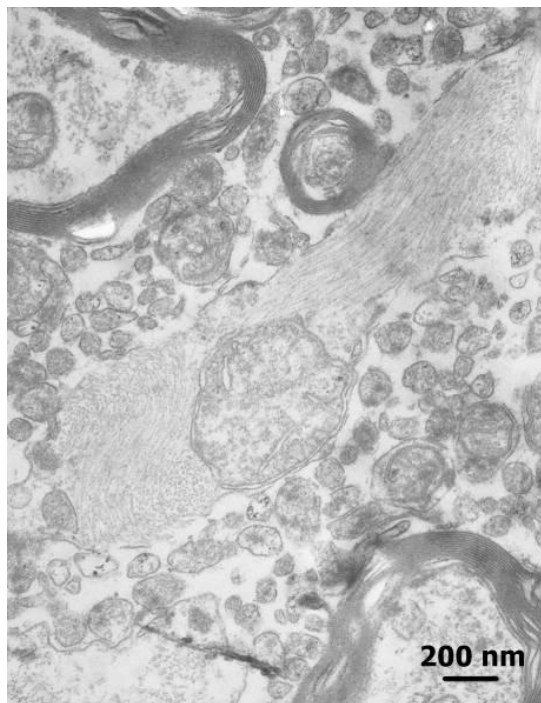
Novērojām salīdzinoši elektronoptiski blīvāku dendrītu citoplazmu nekā aksonos, kurā bieži uzbrieduši mitohondriji ar izmainītu kristu daudzumu un formu. Novēroti arī dendrīti, kuru citoplazmā redzami sinaptiskie pūslīši, izteikta pre- un post-sinaptiskā daļa ar sabiezinātām, elektronoptiski blīvām membrānām (4.34. E att.). Mitohondriji vidēji lieli, salīdzinoši tumšāki nekā aksonos, uzbrieduši (4.34. F att.). Novēro gan asimetriskas, gan simetriskas sinapses, bieži tās ir iztukšotas.



**4.34.att. Ar hronisku alkohola lietošanu saistītās izmaiņas *cortex cerebri* (A), *substantia nigra* (B,C) un *corpus striatum* (D – F) rajonos: (A) viļņota kodola membrāna, citoplazma ar graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternām, mitohondrijiem un ieslēgumiem. (B) Neirona perikariona fragments ar elektronoptiski gaišu citoplazmu, ar izteiktām, regulārām graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternām, poliribosomām un mitohondrijiem ar vakuolizētām kristām. (C) Mielīna slāņa izmaiņas, aksona deģenerācijai (bulta) raksturīga elektronoptiski blīva aksoplazma; paranodālie rajoni tuvu vai attālināti no aksolemmas uzrāda membrānu cilpveida veidojumus, kas bieži krustojas. (D) Neregulāras formas mielīna apvalks, vērojama mielīna membrānu cilpveida krustošanās. (E) Uzbrieduši dendrītu izaugumi, kuru citoplazmā redzami sinaptiskie pūslīši. (F) Mitohondriji vidēji lieli, šaurām kristām aksonu un dendrītu gala izaugumos**

#### 4.2.3. Astrocītu ultrastruktūra

Astrocīti demonstrē izmēru samazināšanos un/vai saraušanos, kas raksturīga apoptozei, bet netika konstatētas citas šūnu bojāejai raksturīgās iezīmes. Astrocīti demonstrē elektronoptiski gaišu citoplazmu ar atsevišķām organellām (4.35. att.), paplašinātas graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternas un uzbriedušus mitohondrijus starp tām. Citoskeleta elementu kūlīši bija vērojami uzbriedušajā, gaišajā citoplazmā. CC rajonos atradām pavisam nedaudz izstiepta profila astrocītus. Šūnas kodols elektronoptiski gaišs, tajā neliels, tumšs kodoliņš. Maza izmēra heterohromatīna pociņas izvietotas vienmērīgi. Astrocītu citoplazma bieži iztukšota. Citoplazmā maz citoskeleta elementu. Uzbrieduši, vidēja izmēra mitohondriji. Mitohondriji gan apaļi, gan neregulāras formas.



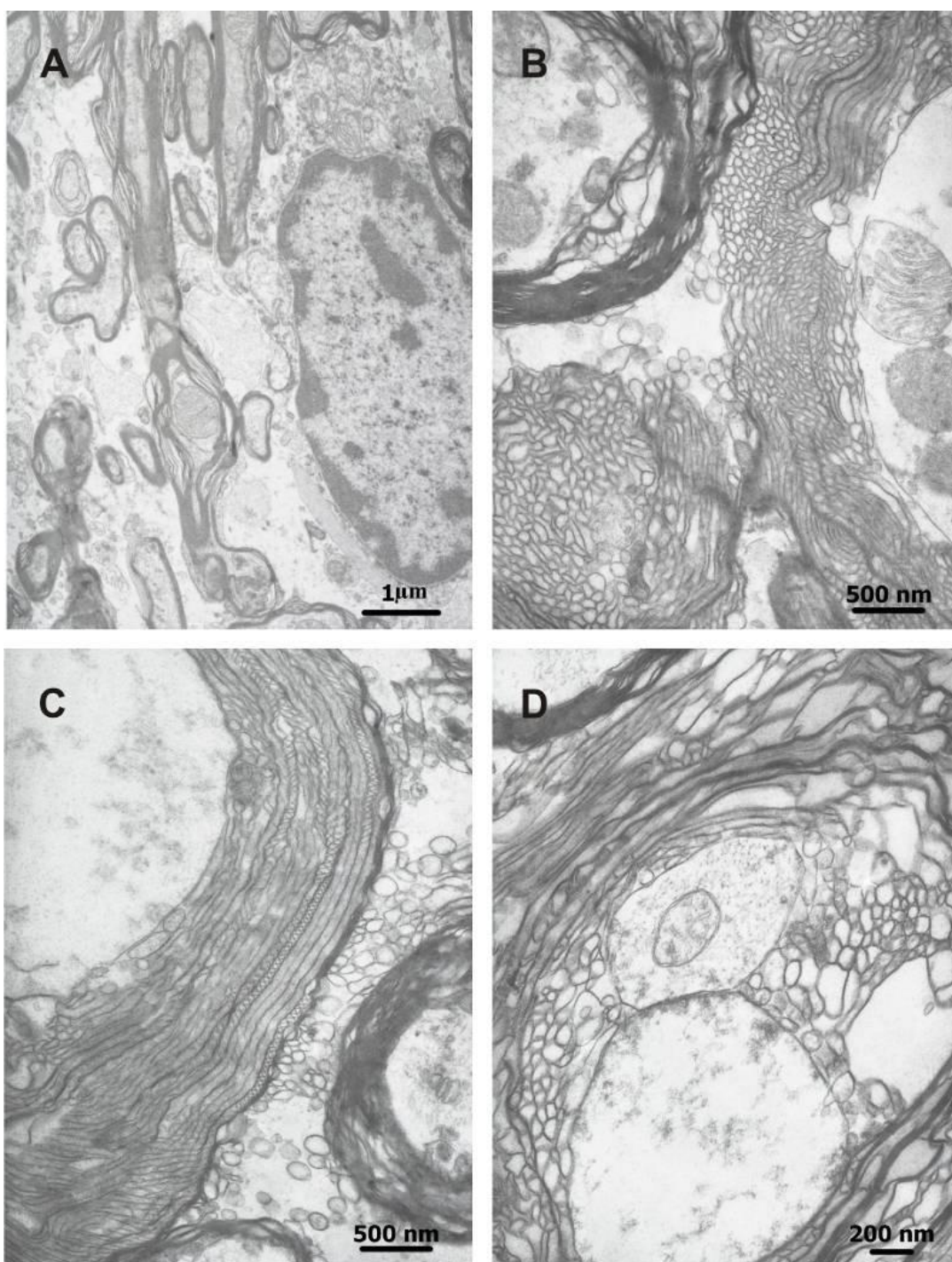
**4.35. att. Astrocīta citoskeleta elementu kūlīši uzbriedušajā, gaišajā citoplazmā, uzbrieduši mitohondriji ar reducētām kristām**

#### **4.2.4. Oligodendrocītu ultrastruktūra**

Ultraplānie griezumi demonstrē izteikti daudz baltās vielas rajonu esamību striatālos un nigrālos rajonos, tajos vērojam galvenokārt oligodendrocītus. CC pelēkā viela demonstrē izteikti daudz neiropīla ap neironiem, oligodendrocītus un astrocītus. Ultrastrukturāli oligodendrocīti demonstrē vidēju līdz normālu šūnas struktūras saglabāšanos ar elektronoptiski blīvu citoplazmu, kas satur īsas graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternas, Goldži aparātu un mitohondrijus. SN baltās vielas rajonos reizēm novēro oligodendrocītus ar samazinātiem šūnas izmēriem un tumšu citoplazmas daļu. Oligodendrocītos starp normāla izmēra organelām vērojamas graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternas, kas ir izteikti paplašinātas. Dažkārt šūnas citoplazmā vērojami ieslēgumi. Oligodendrocītu kodola profils ir apaļš līdz ovāls, dažreiz demonstrē nedaudz neregulāru formu. Tipiski kodols novietots šūnas centrālajā daļā, dažreiz vērojam ekscentriski novietotu kodolu. Kodola hromatīnu raksturo lieli sakopojumi, tie uzrāda izteiktu hromatīna margināciju (4.36. A att.). Novērojām oligodendrocītus ar apaļu kodolu, dažreiz ar viļņotu kodola membrānu. Kodols elektronoptiski tumšs, tajā izteikts liels, tumšs kodoliņš. Ir kodoli, kas gaišāki, bet arī tajos tika novērots tumšs kodoliņš, kā arī perifērijā lokalizēti lieli heterohromatīna sakopojumi. Citoplazmas zona ap kodolu bieži iztukšota. Reizēm citoplazmā novēroti osmiofili ieslēgumi. Mitohondriji biežāk apaļi, vidēji lieli, tumši, uzbrieduši.

#### **4.2.5. Mielīna slāņa ultrastrukturālā izpēte**

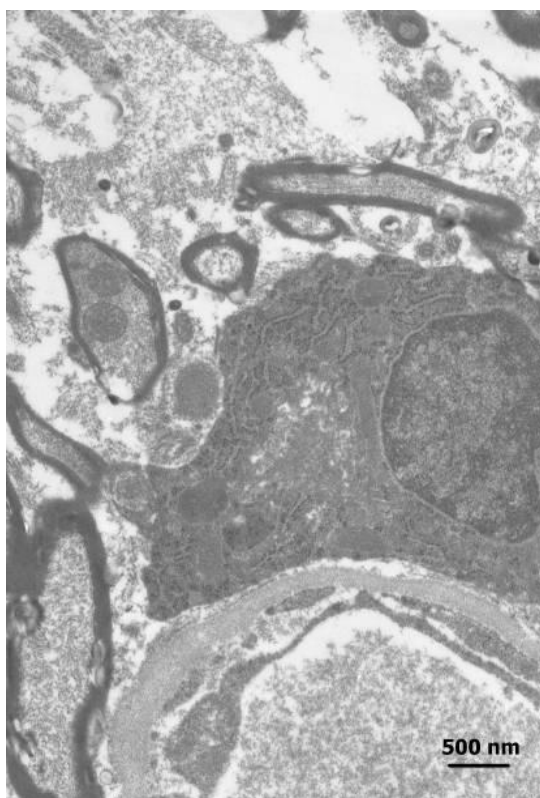
Mielinētie aksoni uzrāda variablu ultrastruktūras ainu pārsvarā ar labi saglabātu aksonu citoplazmas struktūru, ieskaitot citoskeletu. Vērojām nedaudz palielinātu aksoplazmas satura vakuolizāciju un lielu, uzbriedušu mitohondriju klātbūtni ar reducētām kristām, dažreiz kristās novērojām tubulārus paplašinājumus. Pavisam reti mielinētajos aksonos novērojām elektronoptiski blīvu citoplazmu, kas norāda uz nervu šūnas deģenerācijas procesu (4.34. C att.). Mielīna apvalks uzrāda neregulārus iešķēlumus ar vakuolizētu saturu starp mielīna membrānām. Paranodālie rajoni tuvu vai attālināti no aksolemmas uzrāda cilpveida veidojumus, kas bieži krustojas. Šādas izmaiņas bija raksturīgas nigrāliem un striatāliem rajoniem (4.36. B, C, D att.).



4.36. att. Ar hronisku alkohola lietošanu saistītas izmaiņas *corpus striatum* (A) un *substantia nigra* (B, C, D) rajonā. (A) Oligodendrocīta kodola fragments ar šauru citoplazmas daļu un īsām graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternām, ribosomām, uzbriedušiem mitohondrijiem. (B) Dažādas pakāpes mielīna slāņa izmaiņas. (C) Aksoni ar elektronoptiski gaišu citoplazmu, uzbriedušiem mitohondrijiem. (D) Mielinēti aksoni ar heterogēnu mielīna slāņa ultrastruktūru

#### 4.2.6. Mikroglijas ultrastruktūra

Mikroglijas šūnas novērojām tuvu asins kapilāriem. Mikroglijas šūnām raksturīgs neregulāras formas kodols, tā perifērijā izvietoti tumši heterohromatīna sakopojumi. Novērojām elektronoptiski blīvu citoplazmu. Citoplazmā izteikti uzbriedis graudainais endoplazmatiskais tīkls ar stipri paplašinātām cisternām, Goldži aparāts, neliela izmēra lizosomas un ieslēgumi (4.37. att.).

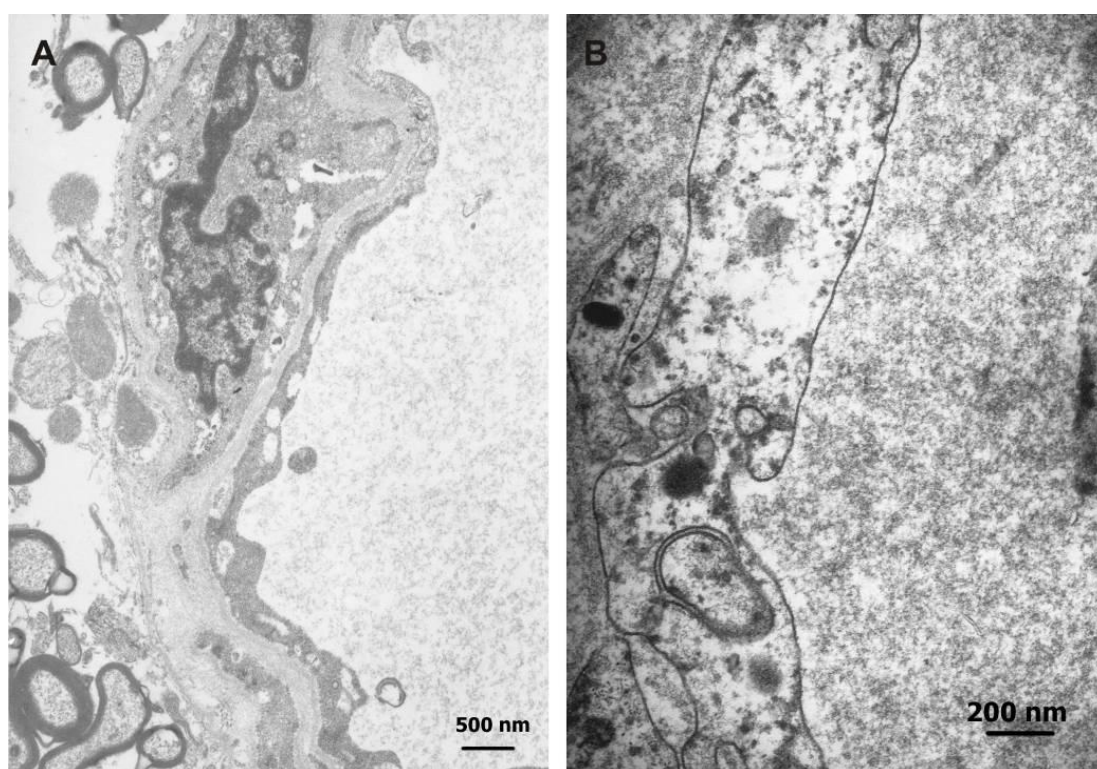


4.37.att. Mikroglijas šūna asins kapilāra tuvumā

#### 4.2.7. Asins-smadzeņu barjeras ultrastruktūra

Endoteliālo šūnu raksturo saplacināta, variabla forma un elektronoptiski blīva citoplazma. Endoteliocīta kodola apvalks viļņots (4.38. A att.). Endoteliālās šūnas virsma uzrāda neregulāras formas īsas mikrobārktstīņas, plazmatiskajā membrānā vidēji daudz nelieli pinocitotiski pūslīši. Citoplazmā reti, nelieli, reizēm uzbrieduši mitohondriji.

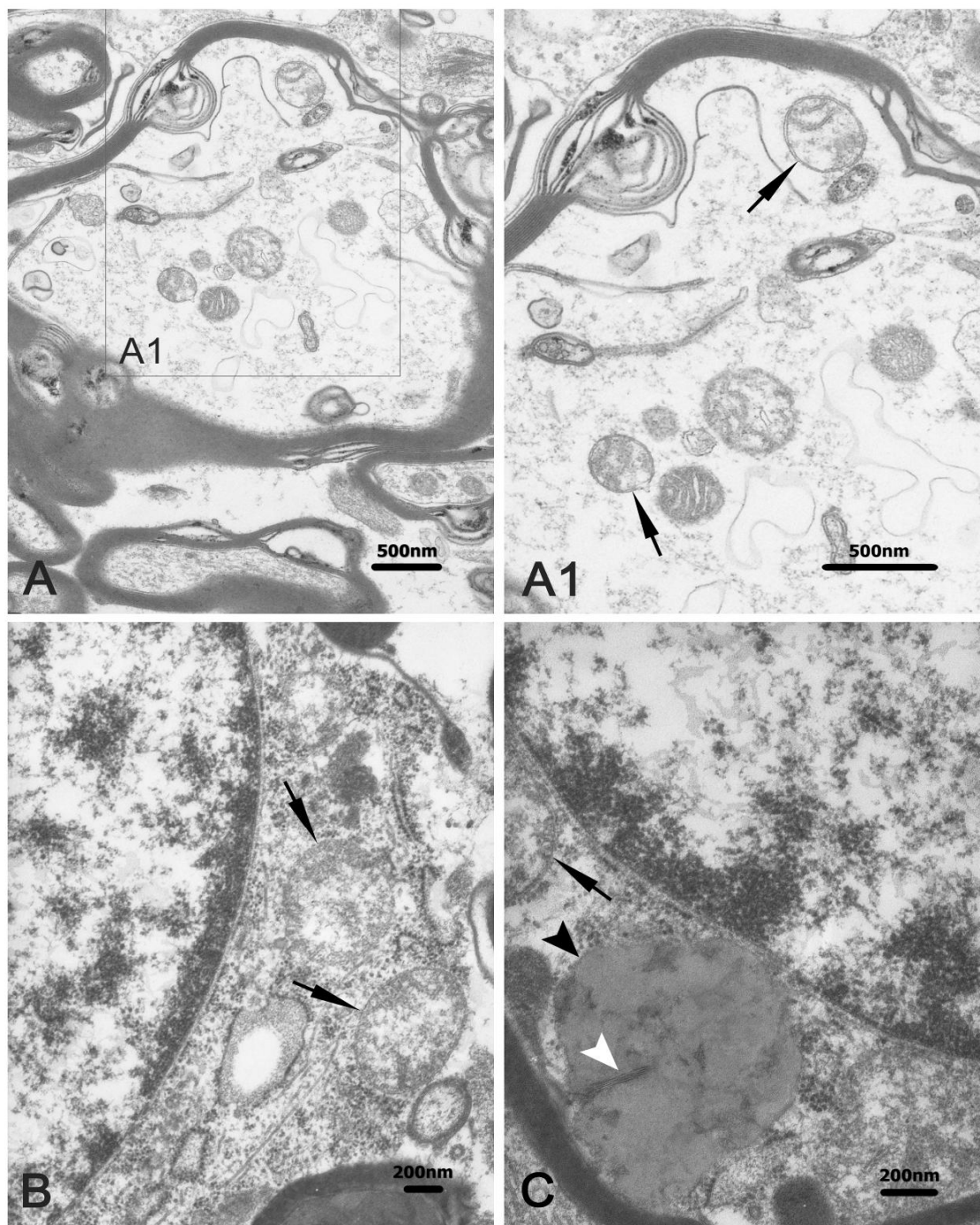
Endoteliocītu savienojuma vietās novēro vienkāršas jūgles, retāk slēgējūgles (4.38. B att.). Bazālā membrāna variabla platuma, vietām daudzplāksņaina. Bazālās membrānas plāksnītes lokāli apņem pericītu citoplazmas un endoteliocītu izaugumu fragmentus. Pericītu citoplazma elektronoptiski blīva, plazmatiskā membrāna uzrāda pinocitotiskus pūslīšus un atsevišķas balsta plātnītnes. Pericītu kodola apvalks reizēm izteikti viļņots, citoplazmā paplašināts graudainais endoplazmatiskais tīkls, poliribosomas, uzbrieduši, dažādas formas mitohondriji. Astrocītu kājiņas demonstrē lielus, uzbriedušus mitohondrijus, vakuolas un samazinātu citoskeleta elementu daudzumu. Novēro kapilāru tuvumā esošo aksonu mielīna apvalka izmaiņas, aksonu citoplazmā izteikti citoskeleta elementi, dažādas formas mitohondriji.



**4.38. att. (A) Endoteliocīts ar elektronoptiski blīvu citoplazmu un viļņotas formas kodolu tajā. (B) Endoteliocītu savienojuma vietas ar vienkāršām jūglēm**

Narkotisko vielu lietotājiem bazālo gangliju rajonā novēro oligodendrocītus, mielinētus aksonus un astrocītus. Minēto šūnu un šķiedru izmaiņas novēro, analizējot šīs struktūras caurstarojošā elektronu mikroskopā. Aksoni ar atšķirīga biezuma mielīna apvalku tika novēroti starp nemielinētiem šūnu izaugumiem, kas, ticami, ir astrocītu

izaugumi. Mielīna apvalka paplašinājumos tika novēroti citoplazmas ieslēgumi. Atšķirīga elektronoptiskā blīvuma aksoplazmā tika novēroti polimorfi mitohondriji, nelielas un neregulāras cisternas, kas atgādina membrānas, neurofilamenti un neirotubuļi (4.39. A, A1 att.).

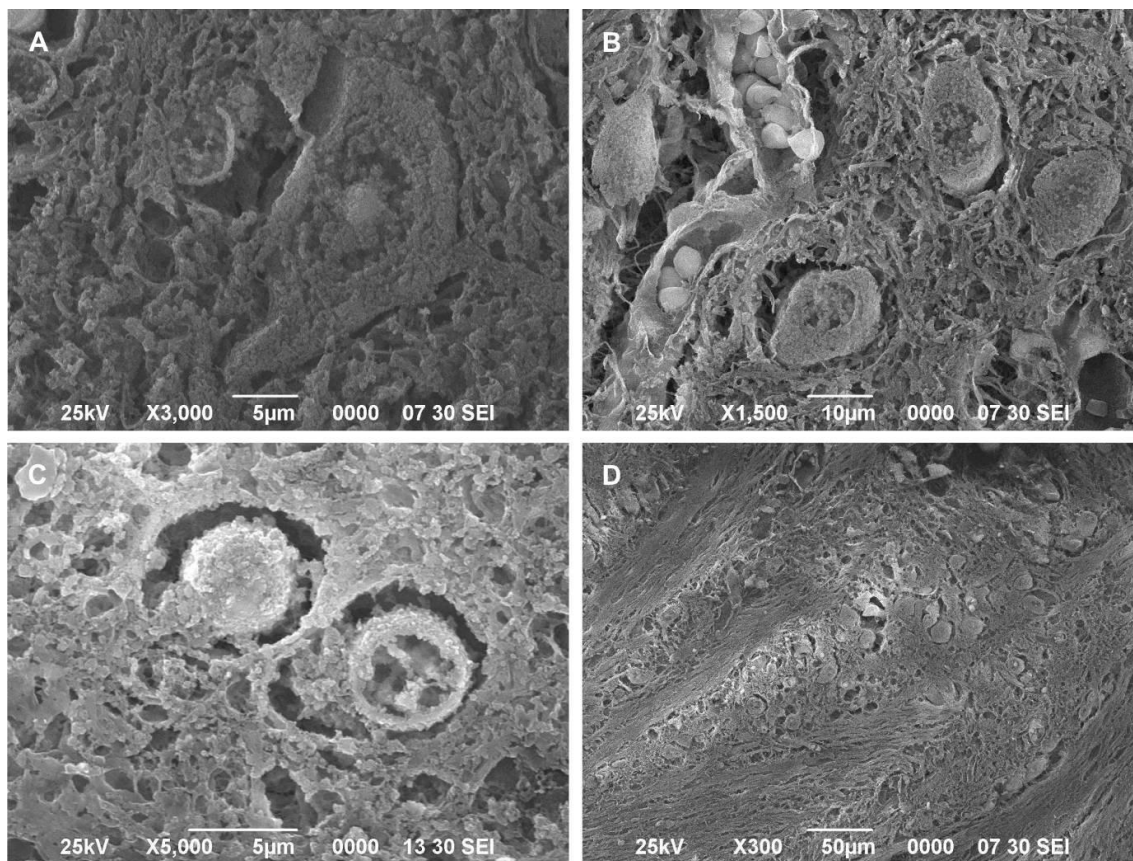


**4.39. att. (A) Aksoni ar dažāda biezuma mielīna slāņiem. (A1) Aksoplazma ar uzbriedušiem mitohondrijiem un samazinātu kristu daudzumu (bultas). (B,C) Oligodendrocīti ar uzbriedušiem mitohondrijiem (bultas), lieli, osmiofili ieslēgumi šūnas citoplazmā (melns bultas gals), kas satur mielīna membrānas (baltais bultas gals)**

Mitohondriji bieži iegareni, ar reducētām kristām un matrici ar zemu elektronoptisko blīvumu. Astrocītos novēro nedaudz viļņotu šūnas kodola apvalku, polimorfus, bieži uzbriedušus un palielinātus mitohondrijus ar lielu reducētu kristu daudzumu, šūnas izaugumos novēro neirofilamentu kūlīšus (4.39. B att.). Oligodendrocītos novēro regulāras formas kodolu, reducētas graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternas, palielinātus, uzbriedušus mitohondrijus ar reducētām kristām un lielus, osmiofilus ieslēgumus šūnas perinukleārā citoplazmas daļā, kas satur mielīna membrānas (4.39. C att.).

#### **4.3. Skenējošās elektronmikroskopijas rezultāti**

Skenējošā elektronu mikroskopā analīzei izvēlēti zemgarozas kodolu pelēkās un baltās vielas rajoni. Pelēkās vielas rajonos labi izšķirami neironi ar izteiktu stūrainu šūnas ķermeni un labi nosakāmu aksona sākuma daļu, neirona izmēri ap 20µm (4.40. A att.). Nervu šūnas citoplazmas daļai salīdzinoši liels apjoms. Nervu šūnas perikarionā labi izšķirams kodols. Asins kapilāru tuvumā atradām astrocītus ar salīdzinoši nelielu šūnas ķermeni, izmēri variē ap 12 µm, labi izšķirams kodols tajā (4.40. B att.). Neiropīla daļā vērojami izaugumi ar ļoti variablu diametru (1,3 – 2,9 µm), bieži novēro izaugumu paplašinājumus. Baltajā vielā labi nosakāmi oligodendrocīti, šūnu izmērs ap 7µm. Oligodendrocīta kodols liels, aizņem praktiski visu citoplazmas daļu.

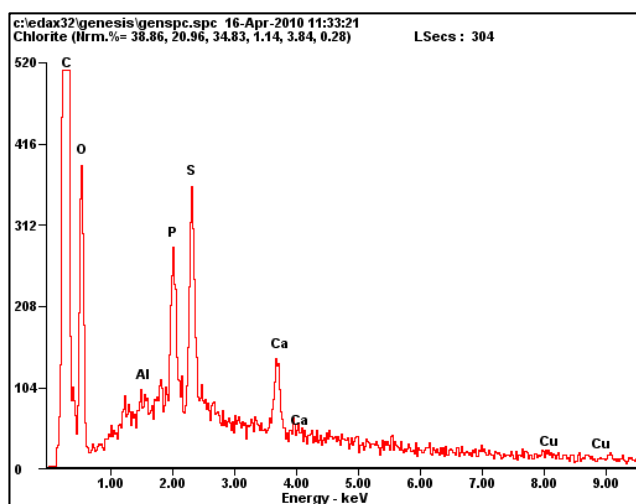


**4.40. att. (A) Neirona šūnas ķermenis ar izteiktu kodolu. (B) Astrocīti asins kapilāra tuvumā. (C) Oligodendrocīti ar perifēri novietotu, apaļu kodolu. (D) SN rajona pelēkās un baltās vielas rajoni**

Atradām salīdzinoši maz oligodendroglijas šūnas, salīdzinot ar kopējo redzeslaukā esošo baltās vielas rajonu (4.40. C att.). Ir vērojams, ka endoteliocītus, kas izklāj asins kapilāru sienas, vieno cieši savstarpēji savienojumi. Salīdzinot ar redzeslaukā redzamo šūnu ķermeņu apjomu, neiropils lokalizējas plašākā teritorijā (4.40. D att.).

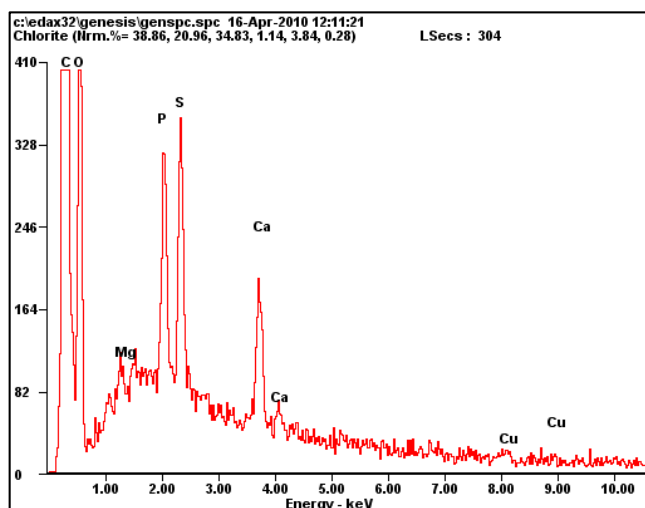
#### **4.4. Rentgenmikroanalīzes rezultāti**

Veicot mikroanalīzi SN pelēkās vielas rajonā, rentgenfluorescences spektros dominē paraugus veidojošo "pamata" ķīmisko elementu, oglekļa (C) un skābekļa (O) pīķi. Bez tam, mazākās koncentrācijās novērojami fosfors (P), sērs (S) un kalcijs (Ca), turklāt dažādi pelēkās vielas apgabali uzrāda atšķirīgu Ca līmeni. Atsevišķās vietās, iespējams, konstatē arī nelielus magnija (Mg) un alumīnija (Al) pīķus (4.41., 4.42. att.).



| Element | Wt %  | At %  |
|---------|-------|-------|
| C K     | 81.29 | 86.65 |
| O K     | 14.90 | 11.93 |
| Al K    | 00.14 | 00.07 |
| P K     | 01.08 | 00.45 |
| S K     | 01.55 | 00.62 |
| Ca K    | 00.69 | 00.22 |
| Cu K    | 00.34 | 00.07 |

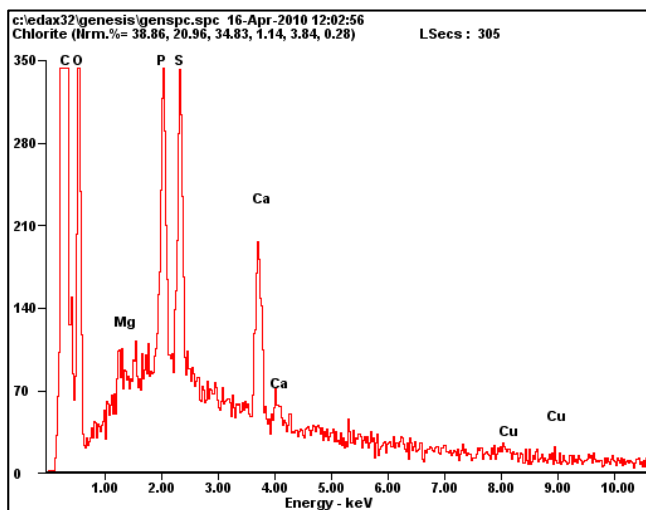
4.41. att. Rentgenfluorescences spektrs ķīmisko elementu mikroanalīzei SN pelēkās vielas rajonā



| Element | Wt %  | At %  |
|---------|-------|-------|
| C K     | 80.87 | 86.11 |
| O K     | 15.88 | 12.69 |
| Mg K    | 00.17 | 00.09 |
| P K     | 00.89 | 00.37 |
| S K     | 01.04 | 00.42 |
| Ca K    | 00.81 | 00.26 |
| Cu K    | 00.35 | 00.07 |

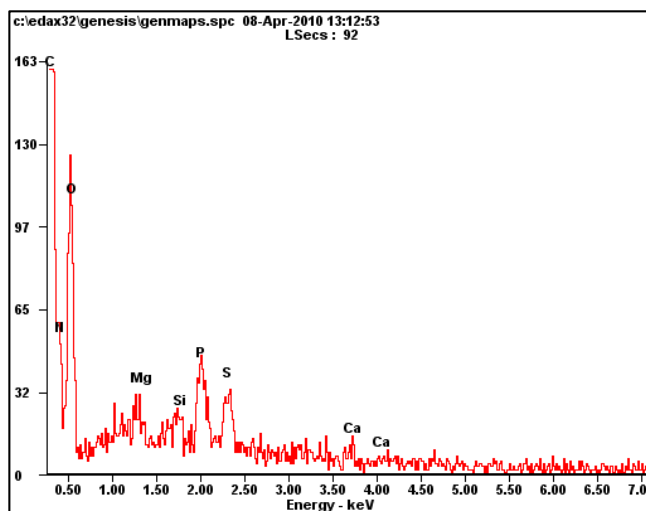
4.42. att. Rentgenfluorescences spektrs ķīmisko elementu mikroanalīzei SN pelēkās vielas rajonā

Šajā rajonā, analizējot atsevišķas nervu šūnas, novēro mainīgu ķīmisko elementu sadalījumu: novērojamas ievērojamas variācijas galveno sastāvā ietilpstošo ķīmisko elementu O, P, S un, it īpaši, Ca koncentrācijās (4.43., 4.44. att.). Bez tam, uz metodes jutības robežas, iespējams, novērojama magnija (Mg) un vara (Cu) klātbūtne.



| Element | Wt %  | At %  |
|---------|-------|-------|
| C K     | 83.30 | 88.31 |
| O K     | 12.93 | 10.29 |
| MgK     | 00.21 | 00.11 |
| P K     | 01.12 | 00.46 |
| S K     | 01.10 | 00.44 |
| CaK     | 01.02 | 00.32 |
| CuK     | 00.33 | 00.07 |

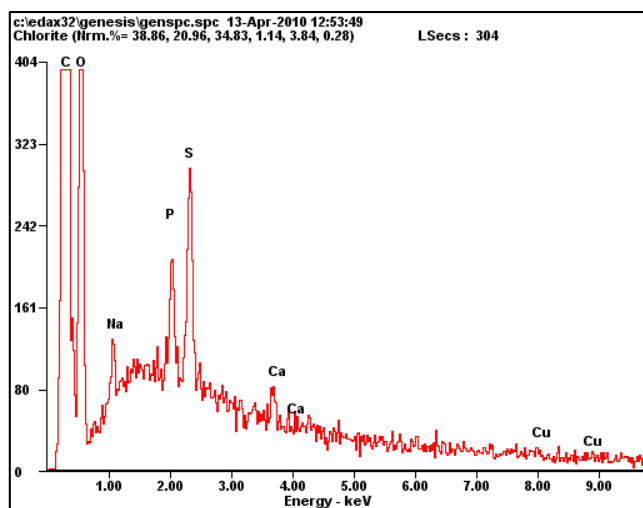
4.43. att. Rentgenfluorescences spektrs ķīmisko elementu mikroanalīzei SN rajona neironā



| Element | Wt%   | At%   |
|---------|-------|-------|
| CK      | 76.19 | 80.35 |
| NK      | 13.44 | 12.15 |
| OK      | 08.51 | 06.74 |
| MgK     | 00.20 | 00.11 |
| SiK     | 00.20 | 00.09 |
| PK      | 00.70 | 00.29 |
| SK      | 00.52 | 00.20 |
| CaK     | 00.24 | 00.07 |

4.44. att. Rentgenfluorescences spektrs ķīmisko elementu mikroanalīzei SN rajona neironā

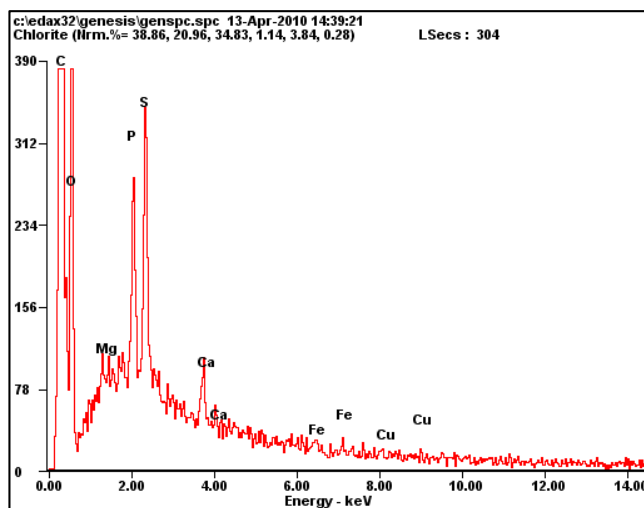
Salīdzinot SN pelēkās (4.41., 4.42. att.) un baltās vielas (4.45. att.) rajonus, konstatē ievērojami atšķirīgas Ca koncentrācijas – baltajā vielā tās ir ap 5 reizēm zemākas, turklāt augstākas koncentrācijas uzrāda Na.



| Element    | Wt %  | At %  |
|------------|-------|-------|
| <i>C K</i> | 83.63 | 87.78 |
| <i>O K</i> | 14.62 | 11.52 |
| <i>NaK</i> | 00.40 | 00.22 |
| <i>P K</i> | 00.37 | 00.15 |
| <i>S K</i> | 00.66 | 00.26 |
| <i>CaK</i> | 00.12 | 00.04 |
| <i>CuK</i> | 00.21 | 00.04 |

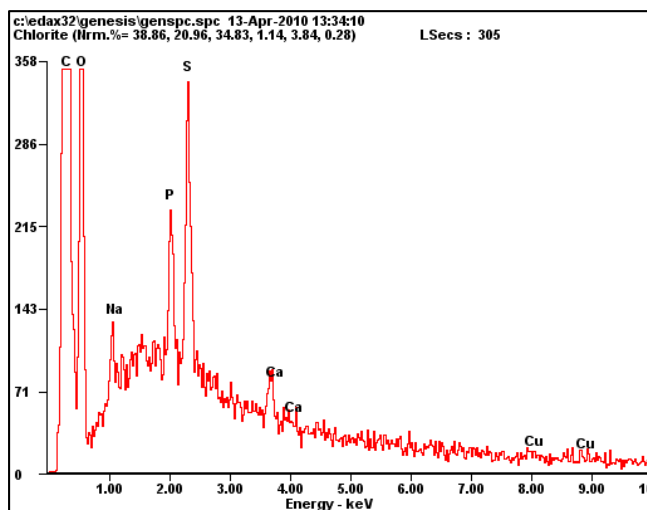
4.45. att. Rentgenfluorescences spektrs ķīmisko elementu mikroanalīzei SN rajona baltajā vielā

Analizējot asinsvadu ķīmisko elementu sastāvu, konstatē stipri mainīgus Ca līmeņus, kā arī nelielas, taču izmērāmas izmaiņas sēra (S) koncentrācijās (4.46., 4.47., 4.48. att.). Turklāt atsevišķos paraugos novēro nātriju (Na) (4.47. att.).



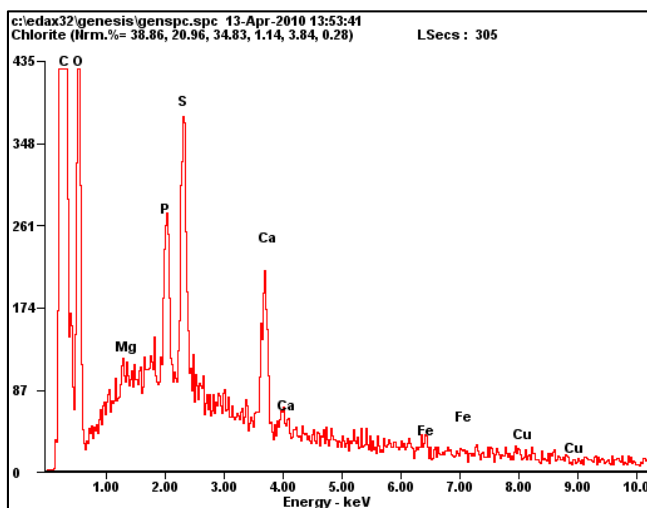
| Element    | Wt %  | At %  |
|------------|-------|-------|
| <i>C K</i> | 83.38 | 88.02 |
| <i>O K</i> | 13.80 | 10.94 |
| <i>MgK</i> | 00.19 | 00.10 |
| <i>P K</i> | 00.79 | 00.32 |
| <i>S K</i> | 01.10 | 00.44 |
| <i>CaK</i> | 00.26 | 00.08 |
| <i>FeK</i> | 00.21 | 00.05 |
| <i>CuK</i> | 00.27 | 00.05 |

4.46. att. Rentgenfluorescences spektrs ķīmisko elementu mikroanalīzei asinsvada sienīņā SN rajonā



| Element | Wt %  | At %  |
|---------|-------|-------|
| C K     | 87.71 | 91.13 |
| O K     | 10.42 | 08.13 |
| NaK     | 00.35 | 00.19 |
| P K     | 00.42 | 00.17 |
| S K     | 00.75 | 00.29 |
| CaK     | 00.14 | 00.04 |
| CuK     | 00.21 | 00.04 |

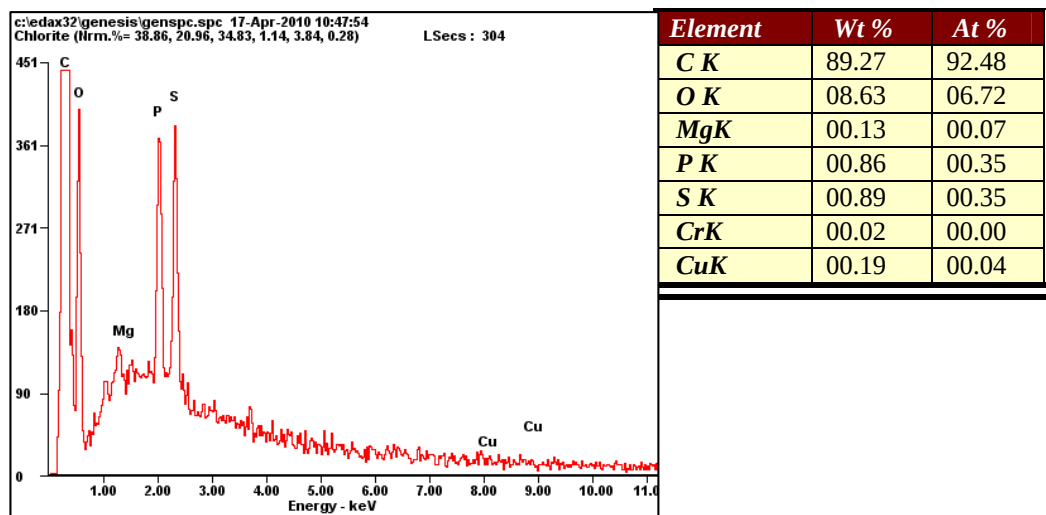
4.47. att. Rentgenfluorescences spektrs ķīmisko elementu mikroanalīzei asinsvada sienā SN rajonā



| Element | Wt %  | At %  |
|---------|-------|-------|
| C K     | 84.94 | 89.36 |
| O K     | 12.18 | 09.62 |
| MgK     | 00.12 | 00.06 |
| P K     | 00.61 | 00.25 |
| S K     | 01.03 | 00.40 |
| CaK     | 00.70 | 00.22 |
| FeK     | 00.19 | 00.04 |
| CuK     | 00.24 | 00.05 |

4.48. att. Rentgenfluorescences spektrs ķīmisko elementu mikroanalīzei asinsvada sienā SN rajonā

Mg, Fe, un Cu līnijas nav droši izšķiramas no signāla fona trokšņiem (4.46., 4.47., 4.48. att.). Magnija līmeni, kas, iespējams, ir virs signāla trokšņu robežas (atbilst 0.07 atomu %), var konstatēt asinsvada endotēlijā (4.49. att.).



4.49. att. Rentgenfluorescences spektrs ķīmisko elementu mikroanalīzei asinsvada endotēlijā SN rajonā

## 5. DISKUSIJA

Šajā pētījumā tika kompleksi – imūnhistoķīmiski un ultrastrukturāli – analizēti no alkohola atkarīgo un narkotisko vielu lietotāju trīs dažādiem smadzeņu rajoniem iegūti smadzeņu audu autopsiju paraugi, tos salīdzinot ar kontroles paraugiem. Lai izvērtētu nervaudu elementu jutību, ko atspoguļo to oksidatīvais stāvoklis, tika veikta kompleksa histopatoloģiska novērtēšana, pielietojot datu statistisko analīzi. Konstatēts, ka smadzeņu audu morfoloģiskā analīze kopā ar statistikas datiem ļauj izvērtēt smadzeņu audu un šūnu jutību hroniska alkoholisma un narkotisko vielu lietošanas gadījumos.

Pētījumā kā neironu diferencēšanas marķieris tika izmantota anti-NSE antivielā. CNS pētījumos NSE specifiskās lokalizācijas dēļ to bieži pielieto nervu šūnu noteikšanai, šādi precizējot tālāku smadzeņu audu izpēti (Lyck *et al.*, 2008). Pētījumā novērojām mainīgu NSE ekspresiju neironos un neiropīlā, tajā skaitā heterogēnu ekspresijas intensitāti gan kontroles grupas smadzeņu audos, gan alkohola un narkotisko vielu lietotāju izpētes materiālā.

Līdzīgi Šteinera un kolēģu (Steiner *et al.*, 2007), kā arī Likas un kolēģu (Lyck *et al.*, 2008) pētījumos, šajā pētījumā GFAP kā specifiskais astrocītu marķieris izmantots astrocītu lokalizācijas noteikšanai. Normā GFAP novēro fibrozajos astrocītos baltajā vielā un CC molekulārajā slānī, savukārt protoplazmatiskajos astrocītos, kas galvenokārt lokalizējas pelēkajā vielā, ir samērā nedaudz citoplazmas un salīdzinoši neliels daudzums GFAP filamentu (Eng and Ghirnikar, 1994). Hausmana un kolēģu pētījumā konstatētas zīmīgas izmaiņas astrocītu GFAP imūnreaktivitātē dažādos smadzeņu topogrāfiskajos rajonos gliozes gadījumā, ko var izsaukt starpdiedziņu sadalīšanās tūskas apstākļos vai paaugstināta GFAP sintēze (Hausmann *et al.*, 2000). GFAP ekspresija var pieaugt smadzeņu traumu un astrocītu hipertrofijas gadījumā (Eng *et al.*, 2000). Pētījumā novērotā izteiktā GFAP ekspresija alkohola lietotāju CS protoplazmatiskajos astrocītos varētu norādīt uz astrocītu hipertrofiju, kas saskan ar Peknija un Peknas datiem pārskata ziņojumā (Pekny and Pekna, 2004). Astrocīti ir galvenās CNS esošās glijas šūnas, to citoplazmā esošie mikrotubuļi, aktīna diedziņi un starpdiedziņi tieši piedalās sekretoro pūslīšu transportēšanā. Starpdiedziņu izmaiņas rada būtiskus traucējumus pūslīšu pārvietošanā, tādējādi izsaucot astrocītu-nervu šūnu komunikācijas izmaiņas. Noskaidrots, ka sekretoro pūslīšu vidējais pārvietošanās ātrums ir nozīmīgi zemāks astrocītos ar pētījuma gaitā depolimerizētiem starpdiedziņiem, pierādot starpdiedziņu iesaisti šajā procesā (Potokar *et al.*, 2007). Pierādīts, ka alkohols ietekmē iekaisuma

mediatoru un citokīnu sekrēciju astrocītos (Floreani *et al.*, 2010). Saskaņā ar šiem datiem, šajā pētījumā novērotās izmaiņas CS rajona GFAP imūnreaktivitātē varētu liecināt par alkohola ietekmei pakļauto astrocītu jutību – var tikt izraisītas šūnu citoskeleta izmaiņas, kā arī ar to saistīti iespējami sekretorās funkcijas traucējumi.

Pētījumi rāda, ka apkārtējās vides toksīni un endogēni proteīni var aktivēt mikroglijas šūnas, kas, atbrīvojot superoksīda radikāļus, var izraisīt neirotoksicitāti (Block *et al.*, 2007). Patoloģiju gadījumā mikroglijas šūnas iziet kompleksu daudzpakāpju aktivācijas ceļu, kļūstot par aktīvām imūnās reakcijas kontrolētājām smadzenēs. Mikroglijas šūnas var ekspresēt neiromediatoru receptorus, tādējādi ar lielu daudzumu signālceļu tās var komunicēt ar makroglijas šūnām un neironiem (Kettenmann *et al.*, 2011; Ramaglia *et al.*, 2012). Mikroglijas aktivācija var būt saistīta gan ar neironu aizsardzību, gan arī izraisīt neironu bojājumus. Ir atšķirīgi pētījumu dati par mikroglijas iesaisti hroniska alkohola lietošanas gadījumā (Ward *et al.*, 2009). Ir pētījumi, kas liecina, ka hroniskas alkohola lietošanas gadījumos, pieaugot iekaisuma citokīnu tumora nekrozes faktora alfa (TNF $\alpha$ ) un interleikīna-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) līmenim, tiek aktivēta mikroglija, norādot uz alkohola izraisītu iekaisuma reakciju smadzeņu audos (He and Crews, 2008). Šādu apgalvojumu apstiprināšanai būtu nepieciešama turpmāka izpēte.

TGF- $\beta$ 1 ir multifunkcionāls citokīns, kas regulē ECM veidošanos un tiek saistīts ar audu atjaunošanas spējām akūtu un hronisku smadzeņu bojājumu gadījumos (Bae *et al.*, 2011). Pētījumā iegūtie dati liecina, ka TGF- $\beta$ 1 intensitāte neironos visos izpētes rajonos bija augstāka hroniskiem alkohola lietotājiem, salīdzinot ar kontroli. Iegūtie dati ir pretēji Cippitelli pētījuma rezultātiem ar laboratorijas dzīvniekiem (Cippitelli *et al.*, 2010), kur neironos *gyrus dentatus* un hipokampa rajonos novēroja samazinātu TGF- $\beta$ 1 ekspresiju alkohola ietekmes gadījumā. Kima un Piras pētījumos paaugstināts TGF- $\beta$ 1 līmenis novērots asins plazmas paraugos alkohola lietotājiem (Kim *et al.*, 2009; Piras *et al.*, 2012), savukārt šī pētījuma rezultāti pierāda, ka hroniskas alkohola lietošanas gadījumā tas ir paaugstināts arī noteiktu smadzeņu rajonu audos. Līdzīgi kā Rousas un kolēģu pētījumā *in vitro* modeļos, tas liek domāt par šī daudzfunkcionālā faktora līdzdalību *in vivo*, iedarbojoties kā neironu aizsargājošam faktoram intoksikācijas gadījumos (Roussa *et al.*, 2004). Šajā pētījumā novērota atšķirīga dažādu smadzeņu rajonu šūnu un to izaugumu anti-TGF- $\beta$ 1 ekspresija, pierādot izteiktu atšķirību katra rajona atbildes reakcijā gan alkohola, gan narkotisko vielu ietekmes gadījumā. Šajā pētījumā, salīdzinot TGF- $\beta$ 1 ekspresiju alkohola lietotājiem ar kontroli, statistiski ticamas atšķirības novērotas SN un CS neironos, turklāt alkohola lietotājiem vērtības bija

augstākas, bet CC neironos šādas atšķirības nenovērojām. Interesanti, ka izvērtējot TGF- $\beta$ 1 ekspresiju neiropilā, ieguvām zemākas vērtības alkohola lietotājiem tikai SN rajonā, salīdzinot ar kontroles grupu. Līdzīgi, statistiski ticami atšķirās TGF- $\beta$ 1 ekspresija SN un CC baltās vielas šķiedrās, kur alkohola lietotājiem mediānās vērtības bija zemākas, salīdzinot ar kontroli. Citos izpētes rajonos šādas atšķirības nav novērotas. Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka paaugstināta TGF- $\beta$ 1 ekspresija neironos ne vienmēr korelē ar paaugstinātu tā ekspresiju nervu šūnu izaugumos, turklāt ir vērojamas izteiktas atšķirības, salīdzinot dažādus smadzeņu rajonus. Iespējams, ka šajā pētījumā novērotā paaugstinātā TGF- $\beta$ 1 ekspresija nervu šūnās hroniskos alkohola lietošanas gadījumos ir mēģinājums kompensēt samazināto TGF- $\beta$ 1 līmeni SN un CC rajonu baltās vielas šķiedrās. Turklāt iespējams, ka paaugstinātā TGF- $\beta$ 1 ekspresija nervu šūnās, ko izraisījis augsts oksidatīvā stresa līmenis, ietekmējis MMP9 ekspresiju (Horssen *et al.*, 2006, Mentlein *et al.*, 2012). Pārskata ziņojumā par kanabinoīdu un endokanabinoīdu ietekmētu iekaisumu smadzenēs aprakstīts, ka iekaisuma procesā iesaistīti divējādi – gan ar kanabinoīdu receptoriem saistītie, gan nesaistītie mehānismi, kā arī noskaidrota kanabinoīdu izraisīta imūnā atbildes reakcija un konstatēta ar to saistīta TGF- $\beta$ 1 paaugstināta sekrēcija perifērajās asinīs (Klein, 2005). Turklāt ir pētīts, kā kanabinoīdi modulē imūnās sistēmas šūnu, tajā skaitā limfocītu un makrofāgu, funkcionālo aktivitāti, izraisot citokīnu ekspresijas izmaiņas (Klein and Cabral, 2006). Kaut arī, līdzīgi kā alkohola lietošanas gadījumos, ir maz pētījumu par narkotisko vielu ietekmētu TGF- $\beta$ 1 ekspresiju smadzeņu audos, šī pētījuma rezultāti liek domāt par TGF- $\beta$ 1 iesaisti šādos gadījumos. Interesanti, ka šajā pētījumā iegūtie rezultāti narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, uzrāda statistiski ticamas TGF- $\beta$ 1 ekspresijas atšķirības neironos tikai CC rajonā, kur, līdzīgi kā alkohola lietotājiem, mediānu vērtības bija augstākas. Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, statistiski ticamas TGF- $\beta$ 1 ekspresijas atšķirības novērojām, salīdzinot SN neiropilū, kur, līdzīgi kā alkohola lietotājiem, mediānu vērtības bija zemākas, un baltās vielas šķiedrās, kur pretēji – novērojām augstākas mediānās vērtības. CC rajonā novērojām statistiski ticamas atšķirības, analizējot ekspresiju baltās vielas šķiedrās, turklāt, līdzīgi kā alkohola lietotājiem, mediānu vērtības bija zemākas nekā kontrolei. Šajā pētījumā iegūtie rezultāti, kas uzrāda izteiktas atšķirības TGF- $\beta$ 1 ekspresijā SN rajona baltajā vielā hroniskiem alkohola un narkotisko vielu lietotājiem, liek spriest par katrai toksisko vielu grupai raksturīgo iedarbības ceļu un ietekmi. Līdzīgi kā alkohola lietošanas gadījumos, šī pētījuma rezultāti par narkotisko vielu ietekmi baltās vielas rajonos liecina par izmainītu TGF- $\beta$ 1

ekspresijas līmeni un liek domāt par TGF- $\beta$ 1 iesaisti baltās vielas šķiedru un ECM pārmaiņās.

Šajā pētījumā alkohola lietotājiem novērojām pozitīvu TGF- $\beta$ 1 korelāciju ar SOD1 SN rajona neironos, turpretī CC rajonā attiecīgā korelācija bija negatīva. Šo rajonu neiroplā līdzīgas korelācijas novērotas starp TGF- $\beta$ 1 un MMP9. Negatīva TGF- $\beta$ 1 un MMP9 korelācija novērota alkohola lietotājiem CS rajona neironos, kā arī CS rajona baltās vielas šķiedrās. Interesanti, ka arī kontroles grupā novērota pozitīva TGF- $\beta$ 1 un SOD1 korelācija, taču nav novērota TGF- $\beta$ 1 un SOD1 korelācija ar MMP9. Šāda daudzfaktoru kombinēta iesaiste liecina par sarežģītu regulācijas mehānismu, un, līdzīgi kā Pages un kolēģu pārskata ziņojumā (Page-McCaw *et al.*, 2007), pētījumā iegūtie novērojumi norāda, ka MMP9 var aktivēt latentu TGF- $\beta$ 1 proteīnu, izraisot tā paaugstinātu ekspresiju SN un CC neironos. Turklāt iespējams, ka paaugstināto TGF- $\beta$ 1 ekspresiju nervu šūnās, ietekmējot MMP9 ekspresiju, izraisījis paaugstinātais oksidatīvais stress (Horssen *et al.*, 2006, Mentlein *et al.*, 2012).

Langa un kolēģu (Lang *et al.*, 2004) pārskata ziņojumā apkopoti dati par neirotropīniem norādot, ka tiem piemīt neiroaizsardzības efekts, savukārt oksidatīvais stress kā riska faktors minēts gadījumos, kad novēro pazeminātu NGF līmeni serumā alkohola izraisītas neiropātijas un Alcheimera slimības gadījumos. Šādam pazeminātam NGF līmenim seko pieaugoša NGF ekspresija, ko skaidro ar, iespējams, samazinātu NGF receptoru esamību hipokampa un CC rajonos *post mortem* pētījumos Alcheimera slimības gadījumos (Hock *et al.*, 2000). Šajā pētījumā iegūtie rezultāti uzrāda lielāku anti-NGFR pozitīvu neironu skaitu alkoholisma gadījumā gan CC, gan arī CS rajonos, taču samazināts anti-NGFR pozitīvu neironu daudzums, salīdzinot ar kontroli, novērots SN rajonā. Narkotisko vielu lietošanas gadījumos gan SN, gan CS rajonos NGFR pozitīvo neironu skaits bija augstāks, salīdzinot ar kontroli. Turpmāka šo rajonu izpēte būtu nepieciešama, analizējot anti-NGFR izmaiņas saistībā ar NGF ekspresijas izvērtējumu. Neironāla aktivitāte, saistīta ar neirotropīnu ekspresiju, sekrēciju un iedarbību, var ietekmēt sinaptisko pārvadi, nodrošinot saikni starp nervu šūnu aktivitāti un sinaptisko plasticitāti (Berry *et al.*, 2012). Henrija un kolēģu pētījumā ar eksperimentāliem dzīvniekiem ir imūnelektronmikroskopiski pētīta NGFR lokalizācija *nucleus caudatus* rajona gan nelielos mielinētajos, gan nemielinētajos aksonos un to terminālos (Henry *et al.*, 1994). Pierādīta arī mielīna asociētā glikoproteīna – aksonu reģenerācijas inhibitora – saistība ar NGFR, norādot, ka tam kā ko-receptoram ir potenciāli terapeitiska nozīme nervu šķiedru reģenerācijā (Wong *et al.*, 2002). Līdzīgi

dati iegūti, pētot perifēro nervu šķiedru remielinizācijas procesu un neirotropīnu iesaisti tajā (Notterpek, 2003). Šajā pētījumā iegūtie rezultāti liecina par variablu NGFR lokalizāciju smadzeņu rajonu baltās vielas šķiedrās gan alkohola, gan narkotisko vielu lietošanas gadījumos, uzrādot gan samazinātu (SN rajoni), gan palielinātu (CC rajoni) NGFR ekspresiju hroniskas alkohola lietošanas gadījumos, bet paaugstinātu (SN rajoni)—narkotisko vielu lietošanas gadījumos.

Šajā pētījumā analizētajos alkohola (4.1. tab.) un narkotisko vielu lietotāju smadzeņu reģionos parādīta atšķirīga aizsargājošās superoksīda dismutāzes ekspresija gan nervu šūnās, gan glijas šūnās, neitralizējot brīvos radikāļus bazālo gangliju un CC rajonos CNS. Turklāt, balstoties uz pētījuma rezultātiem gan par antioksidantu aktivitātes izmaiņām smadzeņu audos izpētes rajonos kopumā, gan, konkrēti, par SOD1 imūnreaktivitātes samazināšanos SN baltajā vielā, paralēli elektronmikroskopiski dokumentēti būtiski mielīna struktūras bojājumi. Tādējādi iegūti pierādījumi par nervaudu elementu selektīvu jutību alkohola iedarbības ietekmē.

SOD1 klātbūtne un plašā izplatība dažādos šūnu veidos CNS ir nozīmīga, iedarbīgi katalizējot superoksīda radikāļa  $O_2^-$  pārvēršanu ūdeņraža peroksīdā ( $H_2O_2$ ) un molekulārajā skābeklī, tāpēc šādi detalizēti pētījumi par endogēno antioksidantu sistēmu smadzeņu struktūrās ir nozīmīgi, lai noteiktu, vai antioksidantu trūkums/pārmērīgs daudzums var veicināt neironu ievainojamību attiecībā uz oksidatīvajiem bojājumiem, kā arī neurodeģenerācijas noriti. Enzīma imūnlokalizācija dažādos šūnu veidos, saskaņā ar literatūras datiem (Peluffo *et al.*, 2005; Yon *et al.*, 2008), vērojama kā atbildes reakcija uz oksidatīvā stresa izraisītām izmaiņām. Turklāt šajā pētījumā, elektronmikroskopiski apstiprinot mitohondriju ultrastrukturālās izmaiņas, ieguvām līdzīgus rezultātus kā Matsuda un kolēģu pētījumā (Matsuda *et al.*, 2009), kas apliecina, ka, iespējams, mitohondriālā disfunkcija ir iemesls brīvo radikāļu izraisītam oksidatīvam stresam un tam sekojošai SOD aktivitātei. Pētījumā ar dzīvniekiem konstatēta alkohola izraisīta izteikti izmainīta antioksidatīvās aizsardzības sistēmas aktivācija hipokampā un *striatum* rajonā (Sommavilla *et al.*, 2012). Līdzīgi ir šajā pētījumā iegūtie rezultāti, kur SOD1 imūnhistoķīmiskā analīze liecina par antioksidantu aktivitāti CNS bazālo gangliju un CC rajonā, ietverot pelēko un balto vielu. Salīdzinot ar kontroles grupu, alkohola lietotāju grupā novērojām augstāku SOD1 intensitāti neironos gan SN, gan CC rajonos. Salīdzinot alkohola lietotāju grupu ar kontroli, šo rajonu neironiem konstatētas arī statistiski ticamas SOD1 ekspresijas atšķirības. Interesanti, ka pelēkās vielas neiropilā konstatētas augstākas SOD1 ekspresijas mediānās vērtības visos izpētes rajonos alkohola lietotājiem,

salīdzinot tās ar ekspresiju katra rajona baltās vielas izaugumos. Visu izpētes rajonu baltās vielas oligodendrocītos novērojām gan paaugstinātu SOD1 intensitāti, gan ekspresiju, turklāt, salīdzinot oligodendrocītus ar astrocītiem gan baltajā vielā, gan pelēkajā vielā visos izpētes rajonos, hroniskiem alkohola lietotājiem oligodendrocītiem novērojām augstākas SOD1 ekspresijas mediānās vērtības (Ward *et al.*, 2009). Pretēji tam, kontroles grupas astrocītos, salīdzinot ar oligodendrocītiem, SOD1 ekspresija ticami pieauga pelēkajā vielā. Statistiski ticamas atšķirības SOD1 ekspresijā novērojām astrocītos, salīdzinot alkohola lietotāju un kontroles grupas balto un pelēko vielu visos izpētes rajonos, taču atšķirības neatradām, salīdzinot attiecīgos rādītājus grupu robežās (Gonthier *et al.*, 2004). Iegūtie dati liecina ne tikai par neironu spēju iesaistīties antioksidatīvajā aizsardzības sistēmā, bet arī par glijas šūnu, īpaši oligodendrocītu, spēju un nepieciešamību paaugstināt aizsardzību pret brīvo radikāļu iedarbību, ko izraisījusi alkohola lietošana (Ward *et al.*, 2009). Interesanti, ka, salīdzinot SOD1 ekspresijas mediānās vērtības baltās vielas šķiedrās un oligodendrocītos, oligodendroglijas šūnās tās novērojām augstākas, turpretī, šos rādītājus salīdzinot ar kontroli, augstākas vērtības novērojām tikai CS un CC rajonos, SN tās bija samazinātas (4.19. att.).

Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, neironos novērojām statistiski ticamas SOD1 ekspresijas atšķirības visos izpētes rajonos, turklāt SN un CC rajonu neironos mediānās vērtības narkomāniem bija augstākas, taču CS rajonā zemākas, salīdzinot ar kontroli (Maier and Chan, 2002). Līdzīgus datus ieguvām attiecīgi par neiropīļu pelēkās vielas rajonos. Iegūtie rezultāti, salīdzinot SOD1 ekspresiju neironos un to izaugumos, liecina par aizsardzības sistēmas aktivācijas nepieciešamību dažādos smadzeņu rajonos narkotisko vielu lietotājiem (Virmani *et al.*, 2010). Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, gan pelēkās, gan baltās vielas astrocītos un oligodendrocītos novēro augstāku SOD1 ekspresiju visos izpētes rajonos. Baltās vielas rajonu izaugumi uzrāda augstākas mediānās vērtības, analizējot SOD1 ekspresiju SN un CC rajonos. Šajā pētījumā iegūtie rezultāti liek domāt par dažādu smadzeņu elementu, tajā skaitā gan nervu šūnu, gan glijas šūnu atšķirīgu aizsardzības reakcijas spēju, atbildot uz brīvo radikāļu līmeņa paaugstināšanos (Ward *et al.*, 2009).

Literatūras datu analīze par nervaudu strukturālo elementu imūnreaktivitāti un smadzeņu ECM pārbūves kapacitāti rosina domāt, ka imūnhistoķīmijas metode ir piemērota MMP proteīna noteikšanai un telpiskai lokalizācijas noskaidrošanai. Imūnhistoķīmiska MMP9 lokalizācijas noteikšana ir piemērota, tomēr šādi nav iespējams atšķirt neaktīvu un aktīvu proteīna formu (Rosenberg, 2002). Šajā pētījumā tika novērota

augstāka MMP9 intensitāte alkohola un narkotisko vielu lietotāju neironos visos izpētes rajonos, salīdzinot ar kontroli. Ir zināms, ka multiplās sklerozes gadījumā novēro BBB bojājumus izraisošu MMP9 ekspresiju limfocītos un endoteliocītos. Citokīnu ietekmē notiek mikroglijas aktivācija un tai sekojoša mielīna apvalka degradācija un demielinizācija (Rosenberg, 2002). Šī pētījuma rezultāti attiecībā uz hroniskas alkohola lietošanas gadījumiem atšķiras no aprakstītajiem pierādījumiem par paaugstinātu MMP9 ekspresiju BBB šūnās multiplās sklerozes gadījumos. Reti atradām MMP9 ekspresiju endoteliocītos un pericītos. Neatradām iekaisuma šūnu infiltrātus.

MMP iesaistās audu pārbūves regulēšanā (Page-McCaw *et al.*, 2007). Mielīna veidošanās, kā arī de/remielinizācijas molekulārie mehānismi ir sarežģīti (Pereira *et al.*, 2012). Aprakstīti *in vitro* pētījumi par MMP spēju šķelt mielīna proteīnus (Milward *et al.*, 2008), kā arī pieejami ziņojumi par prionu proteīnu spēju parakrīni izraisīt aksonu demielinizāciju (Bremer *et al.*, 2010). Tādējādi konceptuāli nozīmīgi demonstrēts, ka demielinizācijas process var realizēties arī no aksona puses. Iespējams, ka parakrīni signālceļi spēj ietekmēt periaksonālas mielīna izmaiņas arī hroniskas alkohola lietošanas gadījumos. Pētījums ar eksperimenta dzīvniekiem parāda, ka, iztrūkstot MMP9 gēnam, išēmijas gadījumā tiek samazināta BBB un baltās vielas degradācija (Asahi *et al.*, 2001). Šajā pētījumā novērotā paaugstinātā MMP9 ekspresija baltās vielas rajonos (4.2. tab.) nav saistāma ar izteiktiem BBB bojājumiem, bet mielīna pārmaiņām, iespējams, mielīna proteīna degradāciju. Paaugstinātā MMP9 ekspresija oligodendrocītos un mikroglijas šūnās korelē ar mielīna slāņa bojājumiem, kas ultrastrukturāli demonstrēti hroniskas alkohola lietošanas gadījumos (4.3. tab., 4.36. att.). Tika novērota izteikta MMP9 ekspresija neironu aksonos. Iespējams, ka hroniskiem alkohola lietotājiem izteiktākas izmaiņas varētu noritēt mielīna bāzes proteīna (MBP), mielīna-asociētā glikoproteīna (MAG) un mielīna-oligodendrocīta glikoproteīna (MOG) lokalizācijas vietās. Tomēr šīs hipotēzes pierādīšanai nepieciešami papildu pētījumi.

Kobajaši un līdzautori (Kobayashi *et al.*, 2008) demonstrēja, ka MMP veicina perifēros mielīna bojājumus mielīna bāzes proteīna degradācijas ceļā, kas daļēji sakrīt ar šī pētījuma rezultātiem par paaugstinātu MMP9 aktivitāti un ar to saistītām mielinizācijas izmaiņām hroniskas alkohola lietošanas gadījumā. Pēc Mūra (Moore *et al.*, 2011) MMP darbību regulē astrocītu sekretēti endogēni TIMP, tādējādi regulējot MMP inhibēšanu. Papildus tam, MMP9 gadījumā inhibēšana tiek panākta, TIMP1 saistoties ar pro-MMP9, tādā veidā aizsargājot pro-MMP9 no MMP3 vadītas tā šķelšanas un no šim procesam sekojošas pro-MMP9 aktivācijas. Var pieņemt, ka šīm kaskādes tipa

reakcijām palīdz arī tādu membrānu tipa metaloproteināžu kā MMP14 (Mentlein *et al.*, 2012) darbība, un brīvie radikāļi, kā pieminēts agrāk (Morita-Fujimura *et al.*, 2000). Tā kā novērojām izteiktu SOD1 ekspresiju astrocītos, kas norāda uz šo šūnu funkcionālā stāvokļa izmaiņām, tas ļauj domāt arī par MMP enzīma inhibējošās TIMP sistēmas izmaiņām. Iespējams, ka MMP9, uz ko galvenokārt atsaucas kā uz ECM degradējošu proteāzi, spēj dažādos ceļos izraisīt mielīna bojājumus. Interesants šī pētījuma novērojums ir paaugstinātās MMP9 ekspresijas korelācija ar SOD1 imūnekspressijas paaugstināšanos, ko saista ar pieaugošu oksidatīvā stresa līmeni. Vienlaikus, precizējot smadzeņu rajonu īpatnības alkohola lietotājiem, mēs novērojām, ka ar SN rajonu saistītā baltās vielas struktūrelementu jutība atšķiras no citiem šajā pētījumā iesaistītajiem rajoniem. Mijiedarbība starp SOD1 un MMP9 pārlietu augstu ekspresiju, īpaši analizējot to aktivitāti baltās vielas rajonu oligodendrocītos un mikroglijas šūnās, neizslēdz iespēju, ka oksidatīvais stress un ar MMP saistītie procesi kontrolē mielīna slāņa izmaiņas un degradāciju. Iespējams, ka baltās vielas tilpuma samazināšanās hroniska alkoholisma gadījumā (De la Monte, 1988) notiek mikroglīālas aktivācijas un tai sekojošu mielīna izmaiņu dēļ. Neskatoties uz faktu, ka pētījumā nav tiešā veidā konstatēti ar MMP9 saistīti mielīna bojājumi, kopumā veiktie imūnhistoķīmiskie novērojumi par palielinātu MMP9 ekspresiju aplūkoto smadzeņu rajonu baltajā vielā, mikroglijā un oligodendrocītos ir saskaņā ar ultrastrukturālajām mielīna izmaiņām, ko apraksta šis pētījums. Kopumā secinām, ka veiktie novērojumi rosina domāt par to, ka endogēnā antioksidantu sistēma ir svarīgs šūnu uzvedības regulētājs ar mainīgu aktivitāti smadzeņu audos. Antioksidantu trūkums/pārmērīgs daudzums hroniskiem alkohola lietotājiem var ietekmēt neironu jutību, saistītu ar oksidatīviem bojājumiem, un neurodeģenerācijas procesu. MMP kontrolē šūnu izturēšanos un, pārbūvējot ECM, iedarbojas uz šūnu virsmas molekulām. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, kas ilustrē oksidatīvā stresa izraisītus hronisko alkohola lietotāju smadzeņu bojājumus un precizē MMP9 lomu šādu bojājumu gadījumā, var spriest par antioksidantu aktivitāti bazālajos ganglijos un CC uzbūves elementos.

Interesanti, ka narkotisko vielu lietotājiem konstatēta negatīva MMP9 ekspresija ependimocītos, turpretī alkohola lietotājiem tā bija izteikti pozitīva. Tas ir saskaņā ar Tateno un Saito (Tateno and Saito, 2008) ziņojuma datiem, kur norādīts, ka izmaiņas VL rajonā, tajā skaitā neuroģenēzes procesos, notiek hroniska alkohola iedarbības gadījumā un pierādītas gan *in vitro*, gan eksperimentos ar dzīvniekiem.

Dažādos smadzeņu rajonos novēroto TUNEL-pozitīvo šūnu skaits bija mainīgs. TUNEL-pozitivitāte neironu un glijas šūnās alkohola un atkarību izraisītu vielu lietošanas gadījumos norāda uz apoptozes procesiem. Savukārt TUNEL-pozitīvas endotēlija šūnas liecina par BBB komponentu bojājumiem. Aprakstīti pētījumi par plazmīna iesaistītu ECM komponenta lamināra degradāciju, izraisot nervu šūnu bojāeju hipokampa rajonā un tai sekojošu neurodeģenerāciju alkoholisma gadījumā (Skrzypiec *et al.*, 2009). Pētījumā ar dzīvniekiem konstatēts, ka neuroģenēze hipokampa rajonā tiek ietekmēta, alkohola izraisītam oksidatīvajam stresam izraisot jauno neironu bojāeju (Herrera *et al.*, 2003). Opioīdo receptoru aktivācija sekmē programmētu šūnu bojāeju *in vitro* pētījumos ar cilvēku un dzīvnieku neironu un mikroglijas šūnu kultūrām (Emeterio *et al.*, 2006). Lai arī pētījumos plaši aprakstīta ar neurodeģenerāciju saistīta šūnu bojāeja apoptozes ceļā, ir pētījumi, kas neapstiprina šūnu programmētu bojāeju CC rajonos hronisku alkohola lietotāju *post mortem* stadijās, liecinot par ierobežotām šūnu adaptācijas spējām šādā veidā (Johansson *et al.*, 2009). Pētījumā ar laboratorijas dzīvniekiem, analizējot *bulbus olfactorius* un CC rajonā TUNEL-pozitīvus neirus gaismas mikroskopā, ar tālāku analīzi elektronu mikroskopā, konstatēts, ka neurodeģenerāciju izraisa šūnu nekroze (Obernier *et al.*, 2002). Izvērtējot izveidoto grupu TUNEL-pozitivitātes rezultātus, iegūti dati, kas salīdzināšanas nolūkos izmantojami turpmākajos pētījumos par toksisku vielu izraisītiem smadzeņu bojājumiem un nervu šūnu bojāeju.

Šī pētījuma rezultāti liecina, ka visbiežākā aknu bojājuma izpausme hroniskiem alkohola lietotājiem ir steatoze un fibroze, vēlākā stadijā – ciroze. Salīdzinot ar kontroles grupu, šajā izpētes grupā novērotas gan SOD1, gan TGF- $\beta$ 1 ekspresijas izmaiņas. Novērotā paaugstinātā TGF- $\beta$ 1 ekspresija korelē ar fibrozes atradnēm aknu audos hroniskiem alkohola lietotājiem. Literatūras avotos minēti pētījumu rezultāti par plaušu un aknu audiem, kur paaugstinātā TGF- $\beta$ 1 ekspresija izraisa gan imunitātes samazināšanos, gan – regulējot ECM komponentes – izraisa fibrozi (Crews *et al.*, 2006). Izteikta TGF- $\beta$ 1 ekspresija alkohola lietotāju žultsvadu epitēlijā varētu liecināt par šī faktora nozīmi epitēlijšūnu proliferācijas regulācijas procesā. Pētījuma novērojumi sakrīt ar literatūrā minētajiem datiem par aknu zvaigžņveida šūnu pārveidi miofibroblastiem līdzīgajās šūnās, kā arī iesaistīšanos ECM veidošanā, līdz ar to iesaistoties aknu funkcionālo traucējumu un fibrozes attīstības procesos (Jester *et al.*, 1999; Herrmann *et al.*, 2007; Gressner *et al.*, 2007). Par oksidatīvā stresa nozīmīgu lomu fibroģenēzē liecina izteikti pozitīva SOD1 reakcija hepatocītos hroniskiem alkohola lietotājiem. Pētījumā

novērojām, ka SOD1 reakcijas produkts nevienmērīgi, taču izteikti lokalizējas saistaudu septās, bet mazāk izteikta reakcijas produkta lokalizācija vērojama portālā trakta saistaudos.

Hroniskas alkohola lietošanas ietekmes izpēte ir nozīmīgi progresējusi, tomēr alkohola lietošanas izraisīta patoģenēze vēl aizvien nav pilnībā izprasta. Ir veidoti pētījumu modeļi ar mērķi noskaidrot 1) galvenos stimulus cilvēka vēlmei patērēt alkoholu, 2) organisma reakciju uz alkoholu un 3) alkohola lietošanas kaitīgās sekas (Hommer *et al.*, 2001; Harper and Matsumoto, 2005). Neskatoties uz to, ka ar alkohola lietošanu saistītu bojājumu gadījumā CNS rodas selektīva ievainojamība, vēl joprojām trūkst detalizētas ultrastrukturālas informācijas, kas nozīmīga patoģēno norišu izpratnei. Elektronmikroskopiski pētītas alkohola izraisītās CNS pārmaiņas galvenokārt atspoguļo ultrastrukturālu informāciju par nervu šūnu bojājumiem (Khan *et al.*, 2001). Neironu darbībai nozīmīgu, glijas šūnu nodrošinātu lokālu vides apstākļu uzturēšana/saglabāšana ir mazāk pētīta. Vairākas pētnieku grupas fokusējušās uz vidussmadzeņu rajonā esošo dopamīnerģisko neironu izpēti, kā arī uz dopamīna līmeņa izmaiņu analīzi, kas atkarīga no astrocītu regulētas glutamāta uzņemšanas/izdalīšanas, secinot, ka glijas šūnas var būt nozīmīgi iesaistītas glutamāta signālpārneses ceļos un citotoksicitātes izraisītos procesos (Khan *et al.*, 2001; Gass and Olive, 2008). Tāpēc mēs izvēlējamies pētīt un salīdzināt gan neironu, gan glijas šūnu struktūrelementu izmaiņas trīs atšķirīgos smadzeņu rajonos hroniska alkoholisma un narkotisko vielu lietošanas gadījumos ultrastrukturālā līmenī.

Blomelejs un kolēģi (Blomeley *et al.*, 2011) aprakstīja elektrofizioloģisku pētījumu par etanola iedarbību uz dažādu apakštipu neironiem *striatum* rajonā un parādīja, ka etanolam ir tieša iedarbība uz starpneironiem, gan izraisot depolarizāciju, nomācot kālija transportu, gan hiperpolarizāciju, samazinot holīnerģisko neironu aktivitāti. Ziņots par etanola iedarbības pierādīšanu uz *striatum* izejošiem eferentiem ceļiem, izmainot holīnerģisko starpneironu somatodendrītiskajā rajonā esošo glicīna receptoru aktivitāti, kā arī par to, ka palielināts acetilholīna līmenis vada GABAerģisko neironu uzbudinājumu, kas savukārt samazina glutamāterģisko neurotransmisiju un rezultējas efferentas darbības funkciju samazinājumā (Wang *et al.*, 2010; Adermark *et al.*, 2011). Šādā veidā etanols varētu modulēt neironu mijiedarbību, kas nosaka informācijas pārvadi no CC uz *striatum*, iespējams, izraisot ar intoksikāciju asociēto izziņas spēju samazināšanos.

Spanagels (Spanagel, 2009) izteica viedokli, ka sistēmiskam alkohola lietojumam ir kopīga iedarbība gan uz *nucleus accumbens*, gan *tegmentum ventrale* rajonu

vidussmadzenēs un aferentiem vadīšanas ceļiem. Šī pētījuma novērojumi sakrīt ar Paulas-Barbosas, Gilmana un kolēģu, kā arī Hileja un kolēģu pētījumu rezultātiem (Paula-Barbosa *et al.*, 1985; Gilman *et al.*, 1998; Healey *et al.*, 2008). Etanols ietekmē sinaptisko plasticitāti *striatum* rajonā, tādējādi paplašinot alkohola iedarbības ierosināto bojājumu skarto smadzeņu rajonu sarakstu; turpmākajos pētījumos būtu nepieciešams koncentrēt izpēti veikšanu ne vien CC, CS un SN, bet arī citos rajonos.

Analīzei izvēlētajos smadzeņu rajonos nenovērojām ultrastrukturālus nervu šūnu bojājumus hroniskas alkohola lietošanas gadījumā. Tomēr šķiet, ka neironu izaugumi tiek skarti dažādos veidos. Šajā pētījumā vairumā gadījumu aksonālo deģenerāciju novēroja reti, bet hroniskiem alkohola lietotājiem mielīna slāņa bojājumi tika novēroti. Aksolemmas tuvumā novērojām izteikti atšķirīgu formu paranodālās cilpas. Reizēm mielīna membrānās bija redzamas balonveida struktūras un membrānu krustošanās. Pērtiķu (*Macaca mulatta*) smadzeņu audos veiktie kvantitatīvie ultrastrukturālie pētījumi uzrāda korelāciju starp oligodendrocītu un paranodālo zonu biežumu novecošanās gaitā (Peters and Sethares, 2004; Bowley *et al.*, 2010). Ziņots par novērotiem alkohola izraisītiem bojājumiem *corpus callosum* aksonu viengabalainībā (Wang *et al.*, 2010; Pfefferbaum *et al.*, 2010). Šulte un kolēģi (Schulte *et al.*, 2010) ziņo, ka pat relatīvi niecīgs alkohola lietotāju lokāls baltās vielas šķiedru mikrostrukturālo bojājums ļauj spriest par saistību starp puslodēm, norādot uz anomālu funkcionālo asimetriju. Pētījumā iegūtie novērojumi sniedz jaunu ieskatu iespējamajos signālu pārvades traucējumos alkohola iedarbībai pakļautos smadzeņu laukos, kuros normā vērojama vizuālo un motoro izaugumu viengabalainība. Ultrastrukturāli novērotās mielīna slāņa anomālijas varētu izraisīt samazinātu vadīšanas ātrumu mielinizētajos aksonos alkoholisma gadījumos.

Mijiedarbībai ar citiem neironiem nepieciešams dendrītu gala izaugumu tīklojums, kas nodrošina ļoti lielas platības virsmu informācijas saņemšanai. Šajā pētījumā alkohola lietotājiem novērotās ultrastrukturālās pārmaiņas atbilst rezultātiem, ko ieguva Tangs un kolēģi (Tang *et al.*, 2001). Tās ļauj spriest, ka deģeneratīvas izmaiņas dendrītos samazina sinaptisko uztveršanas platību un izmaina nervu šūnu mijiedarbību. Lai novērtētu pētījumā konstatētos dendrītu gala izaugumus, vadījāties pēc Sorras un Harisa publikācijas (Sorra and Harris, 2000). Novērojām arī retas gludā endoplazmatiskā tīkla cisternas, citoskeleta elementu daļas, ribosomas un faktisku mitohondriju trūkumu dendrītu gala izaugumos.

Astrocītus uzskata par nozīmīgām šūnām homeostāzes plasticitātes regulācijā. Slezaks un kolēģi (Slezak *et al.*, 2003) ziņoja, ka astrocīti izmaina sinaptisko savienojumu daudzumu tieši, sinaptisko signālu ceļā, vai netieši, modificējot neironu aksonu un dendrītu morfoloģiju. Zināms, ka astrocīti nodrošina neironiem nepieciešamo enerģiju, saista un metabolizē glutamātu un izdala neirotropus faktorus, kas nepieciešami nervu šūnu izaugumu zarošanai. Paplašinoties zināšanām par glijas šūnu nozīmīgumu smadzeņu funkcionēšanā, Fabriciuss un kolēģi (Fabricius *et al.*, 2007) izteica hipotēzi par nepieciešamību ilglaicīgas alkohola lietošanas gadījumā novērtēt glijas šūnu daudzumu, kā arī konstatēja, ka, salīdzinājumā ar kontroli, kopējais glijas šūnu daudzums alkohola lietotājiem statistiski būtiski neatšķiras. Pētījumā redzams, ka astrocītu (vispārīgā nozīmē), un, īpaši, astrocītu šūnu izaugumu skaits samazinās vai tie ir daudz īsāki un ar reducētu zarojumu.

Pētījumā parādīts, ka organellu bojājumiem neironos un glijas šūnās ir selektīvs raksturs ar skaidru mitohondriju iesaisti. Pētījuma rezultāti parāda mitohondrijus kā izteikti reaktīvas organellas. Uzskata, ka brīvos radikāļus producē daži ar etanolu saistīti mehānismi, sekojot Ca jonu ieplūdei šūnā un slāpekļa oksīda sintēzes aktivācijai, kā arī mitohondriālajai disfunkcijai, kas novērota alkohola lietotāju CC rajonā bojāta oksidatīvās fosforilācijas procesa un brīvo radikāļu masveida produkcijas dēļ (Goodlett and Horn, 2001). Mūsu pētījuma dati daļēji sakrīt ar Ikegami un kolēģu (Ikegami *et al.*, 2003) publicētiem novērojumiem par alkoholisma skartu cilvēku smadzeņu izmaiņām. Mums neizdevās ultrastrukturāli konstatēt apoptotiskus vai nekrotiskus bojājumus nervu šūnās. Ikegami un kolēģu veiktajā cilvēku smadzeņu izpētē novērotā TUNEL-pozitivitāte neironos varētu būt radusies no etanola inducētās slāpekļa oksīda pārprodukcijas vai ar mitohondriālo disfunkciju saistītā oksidatīvā stresa dēļ. Intensīvi tikusi pētīta strukturālā un bioķīmiskā autopsijas audu saglabāšana; bieži ziņots, ka vairums enzīmu autopsijas audu paraugos saglabājas (Harper *et al.*, 2003). Harper un kolēģi ziņoja, ka, ja smadzeņu audu paņemšanu, preparēšanu un uzglabāšanu uzmanīgi kontrolē, no autopsiju materiāla var ekstrahēt un tālāk ar modernu tehnoloģiju pielietojumu analizēt augstas kvalitātes nukleīnskābes un proteīnus. Šīs metodes jau izmantotas alkohola lietotāju baltās vielas tilpuma samazināšanās analīzei (Pfefferbaum *et al.*, 2009), kā arī ir nozīmīgas ar mielīnu asociēto gēnu regulācijas traucējumu identifikācijai hroniskiem alkohola lietotājiem (Lewohl *et al.*, 2001). Mūsu pētījuma rezultāti norāda uz mielīna membrānu neregularitāti un šķelšanos, kā arī uz dažādu paranodālo cilpu parādīšanos, kurām raksturīgi balonveida veidojumi un krustošanās. Tā

kā pētījumā analizētajiem mielinizētajiem aksoniem tikai retumis konstatējām degradāciju un dezintegrāciju mielīna slānī, nevar izslēgt atjaunošanās iespēju.

Nobeigumā var teikt, ka esam veikuši hronisku alkohola lietotāju trīs smadzeņu rajonu šūnu ultrastrukturālu izvērtējumu, lai pārbaudītu un salīdzinātu bojājumu selektivitāti šūnu līmenī attiecīgajiem rajoniem. No dažādiem smadzeņu rajoniem iegūtais audu materiāls, veicot ultrastrukturālu analīzi, norāda uz neironu un glijas šūnu izmaiņām, ko tradicionāli novēro hroniskiem alkohola lietotājiem. Tomēr būtu nepieciešama papildu izpēte, jo šajā morfoloģiskajā pētījumā neizdevās demonstrēt šūnu bojājumus, kas attiecīgi ultrastrukturālā līmenī pierādītu neironu un glijas šūnu bojāeju. Būtu nepieciešami turpmāki pētījumi, kas vērsti uz iespējamu reģenerācijas izpēti, un domājams, ka tie varētu būt koncentrēti uz glijas šūnu potenciāla novērtēšanu, kā arī uz dendrītisko gala izaugumu un dendrītu izaugumu/sinapšu izmaiņu izvērtēšanu alkohola lietotājiem.

Narkotisko vielu lietotāju bazālo gangliju ultrastrukturāla analīze atklāj oligodendrocītu dažādo bojājumu pakāpi, ko izraisa ar klīniskām un instrumentālām metodēm apstiprināta intoksikācija. Šajā pētījumā novērota mainīga oligodendrocītu reakcija – no nelielām izmaiņām līdz mielīna apvalka bojājumiem, kur bieži novēroti citoplazmas ieslēgumi, īpaši paranodālos rajonos. Šie novērojumi ir saskaņā ar Baumana un Pham-Dina (Baumann and Pham-Dinh, 2001) pētījuma rezultātiem, kur apstiprināts, ka pat nelieli mielīna apvalka bojājumi šajos rajonos būtiski ietekmē signālu pārvades spēju aksonā. Veikti pētījumi, kas apstiprina oligodendrocīta atkarīgo ātro aksonālo transportu (Edgar *et al.*, 2004); pētījumā novērotie neskaidras izcelsmes osmiofilie ieslēgumi tā citoplazmā varētu negatīvi ietekmēt šāda transpota realizāciju. Minētie ieslēgumi varētu būt cēlonis vismaz daļējam nervu šķiedru mielīna apvalka zudumam, kas apstiprināts arī klīniski (Stepens *et al.*, 2013). Mitohondriju uzbriešana un reducētās kristas norāda uz organellu jutību, kas saistīta ar šūnu bioenerģētikas procesu pārmaiņām un/vai programmētu šūnu bojāeju *globus pallidus* rajonā. Songa un kolēģu pētījumā (Song *et al.*, 2004) noskaidrots, ka dopamīnerģiskajos neironos, ieskaitot *substantia nigra* rajonu, konstatējams mainīgs mitohondriju daudzums un izmēri, turklāt to bojāeja saistīta ar šo neironu selektīvu jutību, kas apstiprināta pētījumā ar dzīvniekiem Parkinsona slimības gadījumā. Līdzīgas mitohondriju morfoloģiskās izmaiņas novērotas arī šajā pētījumā, kas apliecina glijas šūnu jutību narkotisko vielu, tajā skaitā metkatinona iedarbības gadījumā. Ašnera (Aschner, 2000) pārskata ziņojumā apkopoti dati par metālu izraisītu toksicitāti, Mn un Fe uzkrājoties gan astrocītos, gan

oligodendrocītos, un radot mitohondriālus bojājumus, kas rezultējas ar ekstrapiramidālās motorās sistēmas disfunkciju un virkni neirodeģeneratīvu saslimšanu. Šajā pētījumā iegūtie dati apstiprina mitohondriālās izmaiņas un mielīna apvalka bojājumus narkotisko vielu lietotājiem bazālo gangliju rajonos, lai arī mums neizdevās apstiprināt šo metālu klātbūtni glijas šūnās ar rentgenmikroanalīzes metodes palīdzību.

Saskaņā ar Veisa un kolēģu pārskata ziņojuma datiem (Weiss *et al.*, 2009), endoteliocītu plazmatiskajā membrānā novērojām vidēji daudz nelielus pinocitotiskus pūslīšus, tomēr šūnai raksturīgais, augstai metaboliskai aktivitātei atbilstošais mitohondriju daudzums nav konstatēts. Endoteliocītu citoplazmā novērotie retie nelieli, reizēm uzbriedušie mitohondriji liecina par izmainītu šūnas metabolismu. Saskaņā ar Vinklera un kolēģu (Winkler *et al.*, 2011) pārskata ziņojumu pericītiem ir īpaša loma, regulējot vaskulāro stabilitāti un angioarhitektūru. Šī pētījuma laikā iegūtie rezultāti par pericītu kodola apvalka un graudainā endoplazmatiskā tīkla izmaiņām liecina par toksisku vielu izraisītām adaptīva rakstura pārmaiņām pericītos. Izteiktās ultrastrukturālās izmaiņas astrocītos un to kājiņu rajonos, kas novērotas šajā pētījumā gan hronisku alkohola, gan narkotisko vielu lietotāju izpētes grupās, norāda uz šo šūnu īpašo jutību BBB struktūrā (Zlokovic, 2008). Dažādu neirovaskulārās vienības komponentu iesaiste, atbildot uz toksisku vielu iedarbību, liecina par kompleksi veidotu atbildes reakciju un selektīvu šūnu jutību. Noskaidrots, ka parkinsonisma sindroma attīstība saistāma, iespējams, ar Mn pārmērīgu uzkrāšanos SN rajonā, izraisot CNS bojājumus, tāpēc endoteliocītiem, bazālajai membrānai un astrocītiem, kas veido BBB, ir īpaša nozīme smadzeņu homeostāzes nodrošināšanā. Zināms, ka Mn var šķērsot BBB, tomēr precīzi šī procesa mehānismi nav noskaidroti (Bouchard *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Stepens *et al.*, 2008). Šajā pētījumā ar caurstarojošās elektronmikroskopijas metodes palīdzību pierādītas ultrastrukturālas izmaiņas BBB metkatinona lietotājiem pēc intravenozas Mn ievadīšanas, kura avots, visticamāk, ir kālija permanganāts. Tas netieši apstiprina iepriekš minēto pētījumu novērojumus par endoteliocītu un astrocītu izmaiņām, kas nodrošina atsevišķu smadzeņu rajonu selektīvu šī metāla uzņemību. Kaut arī precīzi Mn toksicitātes mehānismi nav zināmi, pētījumos noskaidrots, ka Mn akumulējas mitohondrijos un nelabvēlīgi ietekmē to funkcijas (Zhang *et al.*, 2003; Zwingmann *et al.*, 2004). Nav izzināts, kā Mn joni no gremošanas sistēmas iekļūst asinsritē, bet tam ir liela nozīme tālākā Mn līmeņa saglabāšanā ķermenī. Aknām ir nozīmīga loma Mn līmeņa regulēšanā *in vivo*. Mn izvadīšana no aknām atkarīga no Mn-olbaltumvielu kompleksa asins plazmā, tādējādi, regulējot Mn koncentrāciju

ķermenī, aknas var ietekmēt arī pārmērīgi augsto metāla līmeni smadzenēs (Roth, 2006). Iespējams, ka turpmāki pētījumi būtu nepieciešami, pārbaudot Mn koncentrācijas aknu audos šādos gadījumos, izmantojot rentgenmikroanalīzes metodi.

Veicot mikroanalīzi, konstatējām mainīgas Ca koncentrācijas gan SN pelēkās vielas rajonos, gan nervu šūnās. Tā kā zināms (Haydon and Carmignoto, 2006; Winship *et al.*, 2007), ka astrocītu aktivācija saistīta ar iekšēju Ca izmaiņām, būtu nepieciešama turpmāka izpēte, salīdzinoši analizējot ķīmisko elementu izmaiņas dažādos smadzeņu rajonos. Kollera un Hačinsona (Coller and Hutchinson, 2012) pētījums apliecina neirotoksisku alkohola iedarbības izpausmi, to daļēji saistot ar glutamāta izdali no astrocītiem, kas atkarīga no Ca jonu koncentrācijas līmeņa, savukārt eksperimenti liek domāt par voltāžas atkarīgo Ca kanālu jutību un iesaisti, kanabinoīdiem samazinot sinaptisko pārvadi (Iversen, 2003), kas apstiprina izpratnes par Ca jonu koncentrācijām nozīmīgumu. Galvenie faktori, kas ierobežoja mazu koncentrāciju elementu noteikšanas iespēju, bija starojuma detektora ierobežotā spektrālā izšķiršana (ap 150 meV Mn K līniju rajonā), elektronu bremzēšanās rentgenstarojuma radītais nepārtrauktais fons un parauga bojājumi elektronu kūļa iespaidā. Šie pēdējie divi traucējošie faktori nosaka to, ka zemu koncentrāciju vieglo elementu noteikšanai pasaulē pēdējos gados plaši izmanto sinhrotrona starojumu (Robison *et al.*, 2012; Dučić *et al.*, 2013).

Šajā pētījumā pamatotas trīs dažādu smadzeņu rajonu neironu un glijas šūnu atšķirīgās atbildes reakcijas alkohola un narkotisko vielu ietekmē, ar imūnhistoķīmisko metožu palīdzību un datu statistiskās apstrādes metožu pielietošanu pierādot astrocītu un oligodendrocītu īpašo jutību. Turklāt, izmantojot elektronmikroskopijas metodes, pierādītas aksonu mielīna apvalka izmaiņas SN un CC rajonu baltajā vielā.

## 6. SECINĀJUMI

1. Diferencētā smadzeņu garozas un zemgarozas kodolu nervu un glijas šūnu jutība ir zīmīga atradne *cortex cerebri*, *corpus striatum* un *substantia nigra* rajonos, kas apstiprināta struktūras un ultrastruktūras līmenī psihoaktīvu vielu lietošanas gadījumos.

2. Alkohola un narkotisko vielu lietošana izraisa oksidatīvo stresu, par ko liecina imūnhistoķīmiskās izmaiņas SOD1 ekspresijā, kas statistiski ticami paaugstināta – *substantia nigra* un *cortex cerebri* neironos un glijas šūnās, *corpus striatum* un *cortex cerebri* baltās vielas šķiedrās, bet savukārt samazināta – alkohola lietotāju *substantia nigra* rajona baltās vielas šķiedrās un glijas šūnās.

3. Psihoaktīvu vielu lietošana izraisa metaloproteināzes-9 vadītas pārbūves norises, par ko liecina imūnhistoķīmiskās MMP9 atradnes, un, kas pierādītas, nosakot paaugstinātu MMP9 ekspresiju CNS visos izpētes rajonos gan hronisko alkohola, gan narkotisko vielu lietotāju grupās.

4. Hroniskiem alkohola lietotājiem SOD1 un MMP9 ekspresijas ir mainīgas, uzrādot pozitīvu korelāciju *substantia nigra* rajona neironos un baltās vielas šķiedrās. Elektronmikroskopiski iegūtie apstiprinošie rezultāti par šī rajona baltās vielas šķiedru mielīna slāņa izmaiņām izmantojami, lai spriestu par hroniska alkohola lietošanas iedarbību uz CNS.

5. Uz ultrastrukturāliem novērojumiem balstīts šūnu citoplazmas organoīdu (īpaši endoplazmatiskā tīkla, mitohondriju un citoskeleta) izvērtējums ļauj spriest par astrocītu un oligodendrocītu īpašo jutību, kā arī neironu izmaiņām dendrītu zarojumā un sinapsēs atkarību izraisošu vielu lietošanas gadījumos.

6. Alkohola lietotājiem noteikta lokālā audu mediatoru TGF- $\beta$ 1 un NGFR līdzdalības nozīme neironu aizsardzībā, ko apstiprina to ciešā pozitīvā korelācija ar oksidatīvā stresa marķiera ekspresijas samazināšanos *substantia nigra* baltās vielas rajonā. Apstiprinājums, ka salīdzinoši mazāk TUNEL-pozitīvu astrocītu un oligodendrocītu kodolu atrasts *substantia nigra* baltās vielas rajonā, liecina par šūnu bojāejas īpatnībām šajā rajonā alkohola lietošanas gadījumos.

7. Pielietojot enerģiju dispersās rentgenmikroanalīzes metodi smadzeņu audu ķīmisko elementu analīzē, pierādīta šīs metodes nozīme, detektējot augstas koncentrācijas elementu sastāvu un nosakot "pamata" ķīmisko elementu, oglekļa (C) un skābekļa (O) pīķus. Bez tam iespējams noteikt mazākās koncentrācijās esošo fosforu (P), sēru (S) un kalciju (Ca); tas ļauj pētīt smadzeņu sinaptisko plasticitāti, nosakot Ca koncentrācijas izmaiņas un interpretējot rezultātus kopā ar TEM atradnēm.

## **7. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU**

### **7.1. Publikācijas starptautiski citējamās žurnālos**

1. Skuja S., Groma V., Kleina R. Chronic alcohol abuse is implicated in oxidative stress and changes in neurotrophic factor receptor expression in the human CNS. // Papers on Anthropology, 2011; 368 – 379.
2. Skuja S., Groma V., Smane L. Alcoholism and cellular vulnerability in different brain regions. // Ultrastructural Pathology, 2012; 36(1):40 – 47.
3. Stepens A., Groma V., Skuja S., Platkājis A., Aldiņš P., Ekšteina I., Mārtiņšone I., Bricis R., Donaghy M. The Outcome of the Movement Disorder in Methcathinone Abusers: Clinical, MRI, and Manganeseaemia Changes, and Neuropathology// European Journal of Neurology, 2013; 1 – 7.
4. Skuja S., Groma V., Rāviņa K., Tarasovs M., Cauce V., Teteris O. Protective reactivity and alteration of the brain tissue in alcoholics evidenced by SOD1, MMP9 immunohistochemistry and electron microscopy// Ultrastructural Pathology, 2013; 1 – 10.

### **7.2. Tēzes starptautiski citējamās žurnālos**

1. Groma V., Zalcmane V., Skuja S., Keiss J. Ultrastructural aspects of liver regeneration in chronic hepatitis C patients. // J Hepatol., 2008; 48(2), S194. /tēzes.

### **7.3. Kongresu un konferenču tēzes**

1. Groma V., Zalcmane V., Skuja S. Elektronmikroskopija: iespējas, nozīme un perspektīvas veselību apdraudošo faktoru un to iedarbības izpēte.// RSU zin. konf. materiāli, 2007, lpp.108. // Mutiska prezentācija.
2. Groma V., Zalcmane V., Skuja S. Biology of quiescent and activated hepatic stellate cell (HSC) studied by use of electron microscopy.//Proc.Baltic Morphology 4th Scientific Conference, 2007, p39. // Mutiska prezentācija.

3. Groma V., Zalcmāne V., Skuja S., Keiāšs J., Sondore V. Kolagēno āķķiedru analīze aknu daiviņā fibrozēs gadījuma.// RSU zin.konf.materiāli, 2008, 203.lpp. // Stenda referāts.
4. Groma V., Zalcmāne V., Skuja S., Saulīte L., Keiss J. Stellate cells in disease and embryogenesis: comparative histochemical and ultrastructural study.// XXVIITH International Congress of the international academy of pathology, 2008, p.257. // Stenda referāts.
5. Groma V., Zalcmāne V., Skuja S., Saulīte L., Keiss J. Ultrastructural aspects of liver restoration capability in case of chronic hepatitis C.//Proc. UltraPath XIV, 2008, 2p. // Mutiska prezentācija.
6. Groma V., Zalcmāne V., Skuja S., Saulīte L. Comparative ultrastructural aspects of enigmatic hepatic stellate cells with a special interest to developmental peculiarities.//Proc. UltraPath XIV, 2008, 3p.// Mutiska prezentācija.
7. Groma V., Zalcmāne V., Skuja S. Structural and functional characterization of mitochondria exposed to some exogenous and endogenous factors.// RSU zin. konf. materiāli, 2009, 84.lpp. // Stenda referāts.
8. Skuja S., Groma V., Saulīte L., Stepens A., Liguts V. Ultrastructural study of the human basal ganglia in intravenous drug users exposed to methcathinone.// Baltic Morphology 5th Scientific Conference, 2009, p.25 – 26. // Stenda referāts.
9. Skuja S., Groma V., Roga S. Cu/Zn superoksīda dismutāzes (SOD1) aktivitātes izvērtējums CNS bazālo gangliju rajonā. // RSU zin. konf. materiāli, 2010, 108. lpp. // Stenda referāts.
10. Leidere-Reine A., Groma V., Skuja S., Bērze L., Keiāšs J. Lipīdu nogulsneāšanās klīniski morfoloģisks novērtējums nealkohola steatohepatīta un hroniska vīrushepatīta C slimniekiem. // RSU zin.konf.materiāli, 2010, 171.lpp. // Stenda referāts.
11. Vasilevskis E., Skuja S., Vābels G., Evansa I., Miāčuks A., Šteina E., Sondore Pīlīpa A., Vanags I., Jansons H., Groma V. Brachial plexus and vascular bundle compression and tension deformation during the hyperabduction of the arm. A joint meeting with the European Society of regional anaesthesia and pain therapy, 2010. // Stenda referāts.
12. Skuja S., Groma V., Teteris O., Ivulāns J., Martinova I., Pogule G. Ultrastructure of the neurons and glia in the human basal ganglia and substantia nigra.//UltraPath XV congress, USA, 2010, CD-ROM veidā.// Mutiska prezentācija.

13. Skuja S., Groma V., Teteris O., Kleina R., Pogule G., Smane L. CNS subventrikulāro rajonu izpēte hroniska alkoholisma gadījumos.// RSU zin. konf. materiāli, 2011, 175.lpp. // Stenda referāts.
14. Smane L., Groma V., Ozoliņš V., Skuja S. Bērnu aknu audu fibroģenēzes izpēte. // RSU zin.konf.materiāli, 2011, 136.lpp. // Stenda referāts.
15. Skuja S, Groma V, Stepens A. Addiction-caused ultrastructural changes in human striatum.//Microscopy Conference 2011, Kiel, Germany. 2.lpp. // Stenda referāts.
16. Skuja S, Groma V, Kleina R, Zaķe T. An immunohistochemical study of alcohol-induced changes in the human CNS.// Baltic Morphology VI, Tartu, 2011, 74.lpp. // Stenda referāts.
17. Skuja S., Groma V., Teteris O., Stepens A., Pogule G. Asins-smadzeņu barjeras elektronmikroskopiska izpēte dažādos CNS rajonos toksisku vielu ietekmes gadījumos.// RSU zin. konf. materiāli, 2012, 89.lpp. // Stenda referāts.
18. Skuja S., Groma V., Teteris O. „Ultrastructural examination of the neurovascular unit in striatum in case of alcohol exposure” UltraPath XVI, 2012, p79. // Mutiska prezentācija.
19. Skuja S., Groma V., Teteris O. Cu/Zn Superoxide Dismutase, Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Immunoexpression In Cerebral Cortex And Subcortex Regions In Alcoholics.//ICHC 14th, 2012, p152. // Stenda referāts.
20. Skuja S., Groma V., Teteris O., Pogule G., Rāviņa K. TGF- $\beta$ 1 ekspresijas raksturojums CNS insula, corpus striatum, un substantia nigra rajonos atkarību izraisošu vielu lietošanas gadījumos.// RSU zin. konf. materiāli, 2013, 147.lpp. // Stenda referāts.
21. Skuja S., Groma V., Rāviņa K., Teteris O. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Immunoexpression In Cerebral Cortex And Basal Ganglia Regions In Case Of Chronic Alcoholism.// 25th European Congress of Pathology, 2013, p234 – 235. // Stenda referāts.
22. Skuja S., Groma V. Elemental analysis and its applications in the human brain studies.// Baltic Morphology VII, Riga, 2013, p50 // Stenda referāts.

## 8. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006; 7(1):41 – 53.
2. Abdul Muneer PM, Alikunju S, Szlachetka AM, Mercer AJ, Haorah J. Ethanol impairs glucose uptake by human astrocytes and neurons: protective effects of acetyl-L-carnitine. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 2011; 3(1):48 – 56.
3. Abernathy K, Chandler LJ, Woodward JJ. Alcohol and the prefrontal cortex. *International Review of Neurobiology*, 2010; 91:289 – 320.
4. Adermark L, Clarke RB, Olsson T, Hansson E, Söderpalm B, Ericson M. Implications for glycine receptors and astrocytes in ethanol-induced elevation of dopamine levels in the nucleus accumbens. *Addiction Biology*, 2011; 16(1):43 – 54.
5. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *The American Journal of Gastroenterology*, 2004; 99(6):1160 – 1174.
6. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 1989; 12(10):366 – 375.
7. Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, 1990; 13(7):266 – 271.
8. Aloe L, Tuveri MA, Guerra G, Pinna L, Tirassa P, Micera A, Alleva E. Changes in human plasma nerve growth factor level after chronic alcohol consumption and withdrawal. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 1996; 20(3):462 – 465.
9. Ambrósio AF, Soares-Da-Silva P, Carvalho CM, Carvalho AP. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochemical Research*, 2002; 27(1-2):121 – 130.
10. Aranyosiova M, Michalka M, Kopani M, Rychly B, Jakubovsky J, Velic D. Microscopy and chemical imaging of Behcet brain tissue. *Applied Surface Science*, 2008; Vol. 255, Issue 4, 15,1584 – 1587.
11. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 2010; 468(7323):557 – 561.
12. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *The Journal of Neuroscience*, 2001; 21(19):7724 – 7732.
13. Aschner M. Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environmental Health Perspectives*, 2000; 108:429 – 432.
14. Aschner M, Allen JW, Mutkus LA, Cao C. Ethanol-induced swelling in neonatal rat primary astrocyte cultures. *Brain Research*, 2001; 900(2):219 – 226.
15. Aschner M, Sonnewald U, Tan KH. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathology*, 2002; 12(4):475 – 481.
16. Augustine JR. Circuitry and functional aspects of the insular lobe in primates including humans. *Brain research. Brain research reviews*, 1996; 22(3):229 – 244.
17. Badsberg Jensen G, Pakkenberg B. Do alcoholics drink their neurons away? *The Lancet*. 1993; 342(8881):1201 – 1204.
18. Bae JJ, Xiang YY, Martinez-Canabal A, Frankland PW, Yang BB, Lu WY. Increased transforming growth factor- $\beta$ 1 modulates glutamate receptor expression in the hippocampus. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 2011; 3(1):9 – 20.

19. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 2004; 16(1):1 – 13.
20. Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *The Journal of Neuroscience*, 2007; 27(31):8161 – 8165.
21. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*, 2001; 81(2):871 – 927.
22. Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clinic Proceedings*, 2005; 80(10):1326 – 1338.
23. Berry A, Bindocci E, Alleva E. NGF, Brain and Behavioral Plasticity. *Neural Plasticity*, 2012; 2012:784040.
24. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007; 8:57 – 69.
25. Blomeley CP, Cains S, Smith R, Bracci E. Ethanol affects striatal interneurons directly and projection neurons through a reduction in cholinergic tone. *Neuropsychopharmacology*, 2011; 36(5):1033 – 1046.
26. Boche D, Cunningham C, Gauldie J, Perry VH. Transforming growth factor-beta 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2003; 23(10):1174 – 1182.
27. Bolam JP, Hanley JJ, Booth PAC, Bevan MD. Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*, 2000; 196(Pt 4):527 – 542.
28. Bonsi P, Cuomo D, Martella G, Madeo G, Schirinzi T, Puglisi F, Ponterio G, Pisani A. Centrality of striatal cholinergic transmission in Basal Ganglia function. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2011; 5:6.
29. Bouchard M, Mergler D, Baldwin M, Sassine MP, Bowler R, MacGibbon B. Blood Manganese and Alcohol Consumption Interact on Mood States Among Manganese Alloy Production Workers. *NeuroToxicology*, 2003; 24(4-5):641 – 647.
30. Bowley MP, Cabral H, Rosene DL, Peters A. Age changes in myelinated nerve fibers of the cingulate bundle and corpus callosum in the rhesus monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 2010; 518(15):3046 – 3064.
31. Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 2005; 29(11 Suppl):121S – 131S.
32. Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave KA, Weis J, Aguzzi A. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nature Neuroscience*, 2010; 13(3):310 – 318.
33. Bühler M, Mann K. Alcohol and the human brain: a systematic review of different neuroimaging methods. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 2011; 35(10):1771 – 1793.
34. Butt AM, Ransom BR. Visualization of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of lucifer yellow and horseradish peroxidase. *Glia*, 1989; 2(6):470 – 475.
35. Butterworth RF. Metal toxicity, liver disease and neurodegeneration. *Neurotoxicity Research*, 2010; 18(1):100 – 105.
36. Cadete-Leite A, Pereira PA, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Nerve growth factor prevents cell death and induces hypertrophy of basal forebrain cholinergic neurons in rats withdrawn from prolonged ethanol intake. *Neuroscience*, 2003; 119(4):1055-1069.
37. Cantuti-Castelvetri I, Keller-McGandy CE, Albers DS, Beal MF, Vonsattel JP, Standaert DG, Augood SJ. Expression and activity of antioxidants in the brain in progressive supranuclear palsy. *Brain Research*, 2002; 930(1-2):170 – 181.
38. Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, 2001; 103(1):203 – 218.

39. Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of Toxicology*, 2009; 83(6):519 – 548.
40. Celis JE (ed). *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd edn, San Diego: Academic Press. 1994; vol 2, part 6—Histochemistry, p 239 – 255.
41. Celis JE (ed). *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd edn, San Diego: Academic Press. 1994; vol 2, part 8—Immunocytochemistry, p 347 – 399.
42. Celis JE (ed). *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd edn, San Diego: Academic Press. 1994; vol 3, part 4, section E—Electron Microscopy, pp 103 – 205.
43. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, Adams SE, Gearing AJ. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *Journal of Neuroimmunology*, 1997; 72(2):155 – 161.
44. Chwiej J, Szczerbowska-Boruchowska M, Lankosz M, Wojcik S, Falkenberg G, Stegowski Z, Setkowicz Z. Preparation of tissue samples for X-ray fluorescence microscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2005; 60(12):1531 – 1537.
45. Cippitelli A, Damadzic R, Frankola K, Goldstein A, Thorsell A, Singley E, Eskay RL, Heilig M. Alcohol-induced neurodegeneration, suppression of transforming growth factor-beta, and cognitive impairment in rats: prevention by group II metabotropic glutamate receptor activation. *Biological Psychiatry*, 2010; 67(9):823 – 830.
46. Collier JK, Hutchinson MR. Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacology & Therapeutics*, 2012; 134(2):219 – 245.
47. Cousins MS, Roberts DC, de Wit H. GABA(B) receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings. *Drug and Alcohol Dependence*, 2002; 65(3):209 – 220.
48. Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo G, Wheeler M, Zou J. Cytokines and alcohol. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 2006; 30(4):720 – 730.
49. Crews FT, Nixon K. Alcohol, neural stem cells, and adult neurogenesis. *Alcohol Res Health*. 2003; 27(2):197 – 204.
50. Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006; 1763, 7,747 – 758.
51. Dauber W. *Pocket Atlas of Human Anatomy: Founded by Heinz Feneis*. 5th revised edition, 2007, 328 – 391.
52. De la Monte SM. Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Archives of Neurology*, 1988; 45(9):990 – 992.
53. DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI. Microstructure of the neocortex: comparative aspects *Journal of Neurocytology*, 2002; 31(3 – 5):299 – 316.
54. DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, 1990; 13(7):281 – 285.
55. DeLong MR, Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of Neurology*, 2007; 64 (1):20 – 24.
56. DeVito WJ, Stone S, Shamgochian M. Ethanol increases the neurotoxic effect of tumor necrosis factor-alpha in cultured rat astrocytes. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 2000; 24(1):82 – 92.
57. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 2007; 14(11):1189 – 1197.
58. Diehl AM. Liver disease in alcohol abusers: clinical perspective. *Alcohol*, 2002; 27(1):7 – 11.
59. Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience*, 2010; 11(11):735 – 746.

60. Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Research*, 2005; 1038(2):208 – 215.
61. Dore-Duffy P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 2008; 14(16):1581 – 1593.
62. Dučić T, Barski E, Salome M, Koch JC, Bähr M, Lingor P. X-ray fluorescence analysis of iron and manganese distribution in primary dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, 2013; 124(2):250 – 261.
63. Duran-Vilaregut J, del Valle J, Manich G, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C. Role of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in striatal blood-brain barrier disruption in a 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2011; 37(5):525 – 537.
64. Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA, Griffiths IR. Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *The Journal of Cell Biology*, 2004; 166(1):121 – 131.
65. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007; 35(4):495 – 516.
66. Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science*, 2010; 330(6005):779 – 782.
67. Emeterio EP, Tramullas M, Hurlé MA. Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. *Journal of Neuroscience Research*, 2006; 83(7):1352 – 1361.
68. Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathology*, 1994; 4(3):229 – 237.
69. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969 – 2000). *Neurochemical Research*, 2000; 25(9-10):1439 – 1451.
70. Everitt BJ, Belin D, Economidou D, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2008; 363(1507):3125 – 3135.
71. Fabricius K, Pakkenberg H, Pakkenberg B. No changes in neocortical cell volumes or glial cell numbers in chronic alcoholic subjects compared to control subjects. *Alcohol and Alcoholism*, 2007; 42(5):400 – 406.
72. Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, Double KL. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 2005; 75(2):109 – 124.
73. Fein G, Di Sclafani V, Cardenas VA, Goldmann H, Tolou-Shams M, Meyerhoff DJ. Cortical gray matter loss in treatment-naïve alcohol dependent individuals. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2002; 26(4):558 – 564.
74. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology*, 2001; 3(11):E255 – 263.
75. Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends in Neurosciences*, 2008; 31(7):361 – 370.
76. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000; 408(6809):239 – 247.
77. Fischer W, Wictorin K, Björklund A, Williams LR, Varon S, Gage FH. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature*, 1987; 329(6134):65 – 68.
78. Floreani NA, Rump TJ, Abdul Muneer PM, Alikunju S, Morsey BM, Brodie MR, Persidsky Y, Haorah J. Alcohol-induced interactive phosphorylation of Src and toll-like

- receptor regulates the secretion of inflammatory mediators by human astrocytes *The Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2010; 5(4):533 – 545.
79. Franke H. Influence of chronic alcohol treatment on the GFAP-immunoreactivity in astrocytes of the hippocampus in rats. *Acta Histochemica*, 1995; 97(3):263 – 271.
  80. Franke H, Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 2001; 70(2-3):291 – 303.
  81. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012; (2012):1 – 11.
  82. Garcia CM, Darland DC, Massingham LJ, D'Amore PA. Endothelial cell-astrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004; 152(1):25 – 38.
  83. Gass JT, Olive MF. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochemical Pharmacology*, 2008; 75(1):218 – 265.
  84. Gericke CA, Schulte-Herbrüggen O, Arendt T, Hellweg R. Chronic alcohol intoxication in rats leads to a strong but transient increase in NGF levels in distinct brain regions. *Journal of Neural Transmission*, 2006; 113, 7, 813 – 820.
  85. Gerjevic LN, Liu N, Lu S, Harrison-Findik DD. Alcohol Activates TGF-Beta but Inhibits BMP Receptor-Mediated Smad Signaling and Smad4 Binding to Hcpidin Promoter in the Liver. *International Journal of Hepatology*, 2012; 2012:459278.
  86. Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 2010; 11(2):87 – 99.
  87. Gijbels K, Proost P, Masure S, Carton H, Billiau A, Opdenakker G. Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *Journal of Neuroscience Research*, 1993; 36(4):432 – 440.
  88. Gilman S, Koeppe RA, Adams KM, Junck L, Kluin KJ, Johnson-Greene D, Martorello S, Heumann M, Bandekar R. Decreased striatal monoaminergic terminals in severe chronic alcoholism demonstrated with (+)[11C]dihydrotetabenazine and positron emission tomography. *Annals of Neurology*, 1998; 44(3):326 – 333.
  89. Gomes FC, Sousa Vde O, Romão L. Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2005; 23(5):413 – 424.
  90. Gonthier B, Signorini-Allice N, Soubeyran A, Eysseric H, Lamarche F, Barret L. Ethanol can modify the effects of certain free radical-generating systems on astrocytes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2004; 28:526 – 534.
  91. González A, Salido GM. Ethanol alters the physiology of neuron-glia communication. *International Review of Neurobiology*, 2009; 88:167 – 198.
  92. González-Hernández T, Rodríguez M. Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 2000; 421(1):107 – 135.
  93. Goodlett CR, Horn KH. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Research & Health*, 2001; 25(3):175 – 184.
  94. Grahn JA, Parkinson JA, Owen AM. The cognitive functions of the caudate nucleus. *Progress in Neurobiology*, 2008; 86(3):141 – 155.
  95. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 2004; 305(5684):626 – 629.
  96. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comparative Hepatology*, 2007; 6:7.
  97. Groma V, Zalcman V. Šūna: uzbūve, funkcijas, molekulārie pamati. Rīgas Stradiņa universitāte, 2012; 262 lpp.

98. Gupta VK. CSD, BBB and MMP-9 elevations: animal experiments versus clinical phenomena in migraine. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2009; 9(11):1595 – 1614.
99. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 2007; 10(11):1387 – 1394.
100. Harper C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol and Alcoholism*, 2009; 44(2):136 – 140.
101. Harper C, Corbett D. Changes in the basal dendrites of cortical pyramidal cells from alcoholic patients – a quantitative Golgi study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1990; 53(10):856 – 861.
102. Harper C, Dixon G, Sheedy D, Garrick T. Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the New South Wales Tissue Resource Centre. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2003; 27(6):951 – 961.
103. Harper C, Kril J. Patterns of neuronal loss in the cerebral cortex in chronic alcoholic patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 1989; 92(1):81 – 89.
104. Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005; 5(1):73 – 78.
105. Hartung HP, Kieseier BC. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, 2000; 107(2):140 – 147.
106. Hausmann R, Riess R, Fieguth A, Betz P. Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *The International Journal of Legal Medicine*, 2000; 113(2):70 – 75.
107. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews*, 2005; 57(2):173 – 185.
108. Haydon PG, Carmignoto G. Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiological Reviews*, 2006; 86:1009 – 1031.
109. He J, Crews FT. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Experimental Neurology*, 2008; 210(2):349 – 358.
110. Healey JC, Winder DG, Kash TL. Chronic ethanol exposure leads to divergent control of dopaminergic synapses in distinct target regions. *Alcohol*, 2008; 42(3):179 – 190.
111. Heaton MB, Paiva M, Madorsky I, Mayer J, Moore DB. Effects of ethanol on neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, endogenous antioxidants, and reactive oxygen species in neonatal striatum: relationship to periods of vulnerability. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003; 140, 2, 237 – 252.
112. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002; 3(4):291 – 301.
113. Henry MA, Westrum LE, Bothwell M, Press S. Electron microscopic localization of nerve growth factor receptor (p75)-immunoreactivity in pars caudalis/medullary dorsal horn of the cat. *Brain Research*, 1994; 642(1-2):137 – 145.
114. Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003; 100(13):7919 – 7924.
115. Herrero MT, Barcia C, Navarro JM. Herrero MT, Barcia C, Navarro JM. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nervous System*, 2002; 18(8):386 – 404.
116. Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2007; 11(4):704 – 722.
117. Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, Javoy-Agid F, Agid Y. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *International Society for Neurochemistry*, 1991; 56(2):446 – 451.

118. Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Archives of Neurology*, 2000; 57(6):846 – 851.
119. Hof PR, Sherwood CC. Morphomolecular neuronal phenotypes in the neocortex reflect phylogenetic relationships among certain mammalian orders. *The Anatomical Record Part A Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 2005; 287(1):1153 – 1163.
120. Hoffmann. The Human Frontal Lobes and Frontal Network Systems: An Evolutionary, Clinical, and Treatment Perspective. *Neurology*, 2013; 1 – 34.
121. Hommer D, Momenan R, Kaiser E, Rawlings R. Evidence for a gender-related effect of alcoholism on brain volumes. *The American Journal of Psychiatry*, 2001; 158(2):198 – 204.
122. Hoover JE, Strick PL. Multiple output channels in the basal ganglia. *Science*, 1993; 259(5096):819 – 821.
123. Horssen J, Bö L, Dijkstra CD, de Vries HE. Extensive extracellular matrix depositions in active multiple sclerosis lesions. *Neurobiology of Disease*, 2006; 24(3):484 – 491.
124. Hsieh HL, Wang HH, Wu WB, Chu PJ, Yang CM. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF- $\kappa$ B pathways. *Journal of Neuroinflammation*, 2010; 7:88.
125. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *The Annual Review of Neuroscience*, 2001; 24:677 – 736.
126. Ikegami Y, Goodenough S, Inoue Y, Dodd PR, Wilce PA, Matsumoto I. Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. *Neuroscience Letters*, 2003; 349(3):201 – 205.
127. Ishitsuka K, Ago T, Arimura K, Nakamura K, Tokami H, Makihara N, Kuroda J, Kamouchi M, Kitazono T. Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: a role of pericytes for neuroprotection. *Microvascular Research*, 2012; 83(3):352 – 359.
128. Iversen L. Cannabis and the brain. *Brain*, 2003; 126(6):1252 – 1270.
129. Jellinger K, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MB. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section*, 1990; 2(4):327 – 340.
130. Jester JV, Huang J, Barry-Lane PA, Kao WW-Y, Petroll WM, Cavanagh HD. Transforming Growth Factor  $\beta$ -mediated corneal myofibroblast differentiation requires actin and fibronectin assembly. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1999; 40:1959 – 1967.
131. Ji C. Mechanisms of alcohol-induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries. *Biochemistry Research International*, 2012; 2012:216450.
132. Johansson S, Ekström TJ, Marinova Z, Okvist A, Sheedy D, Garrick T, Harper C, Kuzmin A, Yakovleva T, Bakalkin G. Dysregulation of cell death machinery in the prefrontal cortex of human alcoholics. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2009; 12(1):109 – 115.
133. Johansson S, Strömberg I. Guidance of Dopaminergic Neuritic Growth by Immature Astrocytes in Organotypic Cultures of Rat Fetal Ventral Mesencephalon. *The Journal of Comparative Neurology*, 2002; 443:237 – 249.
134. Johnson F, Giulivi C, Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005; 26(4-5):340 – 352.
135. Johnston AL, Lun X, Rahn JJ, Liacini A, Wang L, Hamilton MG, Parney IF, Hempstead BL, Robbins SM, Forsyth PA, Senger DL. The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PloS Biology*, 2007; 5(8): e212.
136. Kaczmarek L, Lapinska-Dzwonek J, Szymczak S. Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *The EMBO Journal*, 2002; 21(24):6643 – 6648.

137. Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American Journal of Psychiatry*, 2005; 162(8):1403 – 1413.
138. Kamann S, Flaig MJ, Korting HC. Hydroxyethyl starch-induced itch: Relevance of light microscopic analysis of semi-thin sections and electron microscopy. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2007; 5(3):204 – 208.
139. Kametani K. Detection of aluminium by energy dispersive X-ray microanalysis at high accelerating voltages with semi-thin sections of biological sample. *Journal of Electron Microscopy* (Tokyo), 2002; 51(4):265 – 274.
140. Kessler FH, Woody G, Portela LV, Tort AB, De Boni R, Peuker AC, Genro V, von Diemen L, de Souza DO, Pechansky F. Brain injury markers (S100B and NSE) in chronic cocaine dependents. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2007; 29(2):134 – 139.
141. Kessova IG, Ho YS, Thung S, Cederbaum AI. Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase. *Hepatology*, 2003; 38(5):1136 – 1145.
142. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 2011; 91(2):461 – 553.
143. Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes and Infection*, 1999; 1(15):1255 – 1263.
144. Khan ZU, Koulen P, Rubinstein M, Grandy DK, Goldman-Rakic PS. An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001; 98(4):1964 – 1969.
145. Kim A, Zamora-Martinez ER, Edwards S, Mandyam CD. Structural reorganization of pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex of alcohol dependent rats is associated with altered glial plasticity. *Brain Structure and Function*, 2014.
146. Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *The Journal of Neuroscience*, 2003; 23(25):8733 – 8742.
147. Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006; 39(4):339 – 345.
148. Kim YK, Lee BC, Ham BJ, Yang BH, Roh S, Choi J, Kang TC, Chai YG, Choi IG. Increased transforming growth factor-beta1 in alcohol dependence. *Journal of Korean medical science*, 2009; 24(5):941 – 944.
149. Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *The New England Journal of Medicine*, 1988; 318(14):876 – 880.
150. Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, 2005; 5(5):400 – 411.
151. Klein TW, Cabral GA. Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *The Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2006; 1(1):50 – 64.
152. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*; 2005; 41(6):1313 – 1321.
153. Kobayashi H, Chattopadhyay S, Kato K, Dolkas J, Kikuchi S, Myers RR, Shubayev VI. MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2008; 39(4):619 – 627.
154. Kocatürk PA, Akbostanci MC, Tan F, Kavas GÖ. Superoxide dismutase activity and zinc and copper concentrations in Parkinson's disease. *Pathophysiology*, 2004; 7(1):63 – 67.
155. Kosten TR, O'Connor PG. Management of drug and alcohol withdrawal. *The New England Journal of Medicine*, 2003; 348(18):1786 – 1795.

156. Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 2008; 60(4): 543 – 554.
157. Krieglstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *Journal of Physiology-Paris*, 2002; 96(1-2):25 – 30.
158. Krieglstein K, Suter-Crazzolara C, Fischer WH, Unsicker K. TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. *The EMBO Journal*, 1995; 14(4): 736 – 742.
159. Kril JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H. The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience*, 1997; 79(4):983 – 998.
160. Kruman II, Henderson GI, Bergeson SE. DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 2012; 237(7):740 – 747.
161. Lang UE, Jockers-Scherübl MC, Hellweg R. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations. *The Journal of Neural Transmission*, 2004; 111(3):387 – 411.
162. Lange SC, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A, Norenberg MD. Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochemical Research*, 2012; 37(11):2569 – 2588.
163. Lee SR, Tsuji K, Lee SR, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *The Journal of Neuroscience*, 2004; 24(3):671 – 678.
164. Lewohl JM, Dodd PR, Mayfield RD, Harris RA. Application of DNA microarrays to study human alcoholism. *Journal of Biomedical Science*, 2001; 8(1):28 – 36.
165. Lin TK, Cheng CH, Chen SD, Liou CW, Huang CR, Chuang YC. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Promote Apoptotic Cell Death in the Striatum via Cytochrome c/Caspase-3 Signaling Cascade Following Chronic Rotenone Intoxication in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012; 13(7):8722 – 8739.
166. Lindenau J, Noack H, Possel H, Asayama K, Wolf G. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia*, 2000; 29:25 – 34.
167. Linseman DA. Targeting oxidative stress for neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009; 11(3):421 – 424.
168. Liu X, Sullivan KA, Madl JE, Legare M, Tjalkens RB. Manganese-Induced Neurotoxicity: The Role of Astroglial-Derived Nitric Oxide in Striatal Interneuron Degeneration. *Toxicological Sciences*, 2006; 91(2):521 – 531.
169. Liu Y, Teige I, Birnir B, Issazadeh-Navikas S. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Natural Medicine*, 2006; 12(5):518 – 525.
170. Luciano M, Saunders-Pullman R. Substance abuse and movement disorders. *Current Drug Abuse Reviews*, 2009; 2(3):273 – 278.
171. Lyck L, Dalmau I, Chemnitz J, Finsen B, Schröder HD. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2008; 56(3):201 – 221.
172. Maier CM, Chan PH. Role of Superoxide Dismutases in Oxidative Damage and Neurodegenerative Disorders. *The Neuroscientist*, 2002; 8(4):323 – 334.
173. Makwana M, Jones LL, Cuthill D, Heuer H, Bohatschek M, Hristova M, Friedrichsen S, Ormsby I, Bueringer D, Koppius A, Bauer K, Doetschman T, Raivich G. Endogenous transforming growth factor beta 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS. *The Journal of Neuroscience*, 2007; 27(42):11201 – 11213.
174. Mamidipudi V, Wooten MW. Dual role for p75NTR signaling in survival and cell death: Can intracellular mediators provide an explanation? *Journal of Neuroscience Research*, 2002; 68(4) 373 – 384.

175. Mancinelli R, Barlocchi E, Palminiello S, Saso L. Oxidative stress and brain diseases: Biomarkers and analytical methodologies. *Indian Journal of Biotechnology*. 2011; 10: 395 – 403.
176. Mann K, Agartz I, Harper C, Shoaf S, Rawlings RR, Momenan R, Hommer DW, Pfefferbaum A, Sullivan EV, Anton RF, Drobles DJ, George MS, Bares R, Machulla HJ, Mundle G, Reimold M, Heinz A. Neuroimaging in alcoholism: ethanol and brain damage. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 2001; 25(5):104S – 109S.
177. Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR, Nixon K. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. *Neurobiology of Disease*, 2013; 54:239 – 2351.
178. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2000; 1(3):169 – 178.
179. Matsuda S, Umeda M, Uchida H, Kato H, Araki T. Alterations of oxidative stress markers and apoptosis markers in the striatum after transient focal cerebral ischemia in rats. *The Journal of Neural Transmission*, 2009; 116(4):395 – 404.
180. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2000; 1(2):120 – 129.
181. Matute C, Domercq M, Sánchez-Gómez MV. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia*, 2006; 53(2):212 – 224.
182. Maunsbach AB. 1994. Cell biology: Fixation of cells and tissues for transmission electron microscopy. Ed. Celis JE, Acad. Press, Inc., SD, 2:105 – 116.
183. Maunsbach AB. 1994. Cell biology: Embedding of cells and tissues for ultrasrtuctural and immunocytochemical analysis. Ed. Celis J.E., Acad. Press, Inc., SD, 2:117 – 125.
184. Medana IM, Esiri MM. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain*, 2003; 126(3):515 – 530.
185. Mentlein R, Hattermann K, Held-Feindt J. Lost in disruption: Role of proteases in glioma invasion and progression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012; 1825(2):178 – 185.
186. Meyer C, Meindl-Beinker NM, Dooley S. TGF-beta signaling in alcohol induced hepatic injury. *Frontiers in Bioscience*, 2010; 15:740 – 749.
187. Michaluk P, Wawrzyniak M, Alot P, Szczot M, Wyrembek P, Mercik K, Medvedev N, Wilczek E, De Roo M, Zuschratter W, Muller D, Wilczynski GM, Mozrzymas JW, Stewart MG, Kaczmarek L, Wlodarczyk J. Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *Journal of Cell Science*, 2011; 124(Pt 19):3369 – 3380.
188. Middleton FA, Strick PL. Basal-ganglia 'projections' to the prefrontal cortex of the primate. *Cerebral Cortex*, 2002; 12(9):926 – 935.
189. Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Andrew M, Overholser JC, Jurjus G, Stockmeier CA, Rajkowska G. Glia pathology in the prefrontal cortex in alcohol dependence with and without depressive symptoms. *Biological Psychiatry*, 2002; 52(12):1121 – 1133.
190. Miller R, King MA, Heaton MB, Walker DW. The effects of chronic ethanol consumption on neurotrophins and their receptors in the rat hippocampus and basal forebrain. *Brain Research*, 2002; 950(1-2):137 – 147.
191. Miller RH, Raff MC. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *The Journal of Neuroscience*, 1984; 4(2):585 – 592.
192. Milroy CM, Parai JL. The histopathology of drugs of abuse. *Histopathology*. 2011; 59(4):579 – 593.
193. Milward E, Kim KJ, Szklarczyk A, Nguyen T, Melli G, Nayak M, Deshpande D, Fitzsimmons C, Hoke A, Kerr D, Griffin JW, Calabresi PA, Conant K. Cleavage of myelin associated glycoprotein by matrix metalloproteinases. *Journal of Neuroimmunology*, 2008; 193(1-2):140 – 148.
194. Mitchell JM, O'Neil JP, Janabi M, Marks SM, Jagust WJ, Fields HL. Alcohol consumption induces endogenous opioid release in the human orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Science Translational Medicine*, 2012; 4 (116):116ra6.

195. Mizoguchi H, Yamada K, Nabeshima T. Matrix metalloproteinases contribute to neuronal dysfunction in animal models of drug dependence, Alzheimer's disease, and epilepsy. *Biochemistry Research International*, 2011; 2011:681385.
196. Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA*, 2004; 291(10):1238 – 1245.
197. Moore CS, Milner R, Nishiyama A, Frausto RF, Serwanski DR, Pagarigan RR, Whitton JL, Miller RH, Crocker SJ. Astrocytic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) promotes oligodendrocyte differentiation and enhances CNS myelination. *Journal of Neuroscience*, 2011; 31(16):6247 – 6254.
198. Mori S, Leblond CP. Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 1970; 139(1):1 – 28.
199. Mori S, Leblond CP. Identification of microglia in light and electron microscopy. *Journal of Comparative Neurology*, 1969; 135(1):57 – 80.
200. Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Gasche Y, Copin JC, Chan PH. Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2000; 20(1):130 – 138.
201. Moselhy HF, Georgiou G, Kahn A. Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. *Alcohol and Alcoholism*, 2001; 36(5):357 – 368.
202. Mussack T, Biberthaler P, Kanz KG, Heckl U, Gruber R, Linsenmaier U, Mutschler W, Jochum M. Immediate S-100B and neuron-specific enolase plasma measurements for rapid evaluation of primary brain damage in alcohol-intoxicated, minor head-injured patients. *Shock*, 2002; 18(5):395 – 400.
203. Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *The Journal of Biochemistry*, 2001; 130(2):169 – 175.
204. Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH. T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain*, 2001; 124(11):2203 – 2214.
205. Nixon K, Morris SA, Liput DJ, Kelso ML. Roles of neural stem cells and adult neurogenesis in adolescent alcohol use disorders. *Alcohol*, 2010; 44(1):39 – 56.
206. Notterpek L. Neurotrophins in myelination: a new role for a puzzling receptor. *Trends in Neurosciences*, 2003; 26(5):232 – 234.
207. Obernier JA, Bouldin TW, Crews FT. Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 2002; 26(4):547 – 557.
208. Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, 2002; 69(6):698 – 707.
209. Oldenburg IA, Ding JB. Cholinergic modulation of synaptic integration and dendritic excitability in the striatum. *Current Opinion in Neurobiology*, 2011; 21(3):425 – 432.
210. Olsson B, Zetterberg H, Hampel H, Blennow K. Biomarker-based dissection of neurodegenerative diseases. *Progress in Neurobiology*, 2011; 95(4):520 – 534.
211. Omlin FX, Webster HD, Palkovits CG, Cohen SR. Immunocytochemical localization of basic protein in major dense line regions of central and peripheral myelin. *The Journal of Cell Biology*, 1982; 95(1):242 – 248.
212. Ong WY, Garey LJ. Ultrastructural characteristics of human adult and infant cerebral cortical neurons. *Journal of Anatomy*, 1991; 175:79 – 104.
213. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007; 8(3):221 – 233.
214. Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain research. Brain research reviews*, 1995; 20(1):191 – 127.

215. Paula-Barbosa MM, Tavares MA. Long term alcohol consumption induces microtubular changes in the adult rat cerebellar cortex. *Brain Research*, 1985; 339(1):195 – 199.
216. Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *The Journal of Pathology*, 2004; 204(4):428 – 437.
217. Peluffo H, Acarin L, Faiz M, Castellano B, Gonzalez B. Cu/Zn superoxide dismutase expression in the postnatal rat brain following an excitotoxic injury. *Journal of Neuroinflammation*, 2005; 2,1,12.
218. Pereira A Jr, Furlan FA. Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Progress in Neurobiology*, 2010; 92(3):405 – 420.
219. Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends in Neurosciences*, 2012; 35(2):123 – 134.
220. Perl DP, Good PF. Comparative techniques for determining cellular iron distribution in brain tissues. *Annals of Neurology*, 1992; (32):76 – 81.
221. Peters A. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: a review. *Journal of Neurocytology*, 2002; 31(8-9):581 – 593.
222. Peters A. The effects of normal aging on myelinated nerve fibers in monkey central nervous system. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2009; 3:11.
223. Peters A, Palay SL, Webster HD. The fine structure of the nervous system: The cells and their processes. Hoeber Medical Division, Harper & Row (New York), 1970; 198 p.
224. Peters A, Sethares C. Oligodendrocytes, their progenitors and other neuroglial cells in the aging primate cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 2004; 14(9):995 – 1007.
225. Pfefferbaum A, Rosenbloom M, Rohlfing T, Sullivan EV. Degradation of association and projection white matter systems in alcoholism detected with quantitative fiber tracking. *Biological Psychiatry*, 2009; 65(8):680 – 690.
226. Pfefferbaum A, Rosenbloom MJ, Fama R, Sassoon SA, Sullivan EV. Transcallosal white matter degradation detected with quantitative fiber tracking in alcoholic men and women: selective relations to dissociable functions. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 2010; 34(7):1201 – 1211.
227. Piras F, Salani F, Bossù P, Caltagirone C, Spalletta G. High serum levels of transforming growth factor  $\beta$ 1 are associated with increased cortical thickness in cingulate and right frontal areas in healthy subjects. *Journal of Neuroinflammation*, 2012; 9:42.
228. Potokar M, Kreft M, Li L, Daniel Andersson J, Pangrsic T, Chowdhury HH, Pekny M, Zorec R. Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic*, 2007; 8(1):12 – 20.
229. Ramaglia V, Hughes TR, Donev RM, Ruseva MM, Wu X, Huitinga I, Baas F, Neal JW, Morgan BP. C3-dependent mechanism of microglial priming relevant to multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012; 109(3):965 – 970.
230. Ramirez T, Tong M, Chen WC, Nguyen QG, Wands JR, de la Monte SM. Chronic alcohol-induced hepatic insulin resistance and endoplasmic reticulum stress ameliorated by peroxisome-proliferator activated receptor- $\delta$  agonist treatment. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2013; 28(1):179 – 187.
231. Rasakham K, Schmidt HD, Kay K, Huizenga MN, Calcagno N, Pierce RC, Spires-Jones TL, Sadri-Vakili G. Synapse density and dendritic complexity are reduced in the prefrontal cortex following seven days of forced abstinence from cocaine self-administration. *PLoS One*, 2014;9(7):e102524.
232. Raz A, Frechter-Mazar V, Feingold A, Abeles M, Vaadia E, Bergman H. Activity of pallidal and striatal tonically active neurons is correlated in mptp-treated monkeys but not in normal monkeys. *The Journal of Neuroscience*, 2001; 21(3):RC128.
233. Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet*, 2009; 373(9682):2223 – 2233.

234. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 1963; 17:208 – 212.
235. Reynolds JN, Wickens JR. Dopamine-dependent plasticity of corticostriatal synapses. *Neural Networks*, 2002; 15(4-6):507 – 521.
236. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist*, 2006; 289(1):3 – 8.
237. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in Neurosciences*, 1997; 20(12):570 – 577.
238. Rinvik E, Grofová I. Observations on the fine structure of the substantia nigra in the cat. *Experimental Brain Research*, 1970; 11(3):229 – 248.
239. Robison G, Zakharova T, Fu S, Jiang W, Fulper R, Barrea R, Marcus MA, Zheng W, Pushkar Y. X-ray fluorescence imaging: a new tool for studying manganese neurotoxicity. *PLoS One*. 2012; 7(11):e48899.
240. Rosenberg GA. Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2012; 32(7):1139 – 1151.
241. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *The Lancet Neurology*, 2009; 8(2):205 – 216.
242. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist*, 2002; 8(6):586 – 595.
243. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*, 2002; 39 (3):279 – 291.
244. Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Research*, 2001; 893(1-2):104 – 112.
245. Roth JA. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biological Research*, 2006; 39:45 – 57.
246. Rothwell JC. The motor functions of the basal ganglia. *Journal of Integrative Neuroscience*, 2011; 10(3):303 – 315.
247. Roussa E, Farkas LM, Kriegelstein K. TGF-beta promotes survival on mesencephalic dopaminergic neurons in cooperation with Shh and FGF-8. *Neurobiology of Disease*, 2004; 16(2):300 – 310.
248. Royds JA, Timperley WR, Taylor CB. Levels of enolase and other enzymes in the cerebrospinal fluid as indices of pathological change. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1981; 44(12):1129 – 1135.
249. Saito A, Tominaga T, Chan PH. Neuroprotective role of neurotrophins: relationship between nerve growth factor and apoptotic cell survival pathway after cerebral ischemia. *Current Atherosclerosis Reports*, 2005; 7(4):268 – 273.
250. Sängård K, Zetterberg H, Blennow K, Hansson O, Minthon L, Londos E. Cerebrospinal fluid total tau as a marker of Alzheimer's disease intensity. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 2010; 25(4):403 – 410.
251. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 2008; 21(1):172 – 188.
252. Schacht JP, Anton RF, Randall PK, Li X, Henderson S, Myrick H. Stability of fMRI striatal response to alcohol cues: a hierarchical linear modeling approach. *Neuroimage*, 2011; 56(1):61 – 68.
253. Schmechel DE, Marangos PJ, Martin BM, Winfield S, Burkhart DS, Roses AD, Ginns EI. Localization of neuron-specific enolase (NSE) mRNA in human brain. *Neuroscience Letters*, 1987; 76(2):233 – 238.
254. Schneider F, Habel U, Wagner M, Franke P, Salloum JB, Shah NJ, Toni I, Sulzbach C, Hönig K, Maier W, Gaebel W, Zilles K. Subcortical correlates of craving in recently

- abstinent alcoholic patients. *The American Journal of Psychiatry*, 2001; 158(7):1075 – 1083.
255. Schulte T, Müller-Oehring EM, Rohlfing T, Pfefferbaum A, Sullivan EV. White matter fiber degradation attenuates hemispheric asymmetry when integrating visuomotor information. *The Journal of Neuroscience*, 2010; 30(36):12168 – 12178.
  256. Seetharaman SV, Prudencio M, Karch C, Holloway SP, Borchelt DR, Hart PJ. Immature copper-zinc superoxide dismutase and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), 2009; 234(10):1140 – 1154.
  257. Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006; 7(3):194 – 206.
  258. Seo JH, Miyamoto N, Hayakawa K, Pham LD, Maki T, Ayata C, Kim KW, Lo EH, Arai K. Oligodendrocyte precursors induce early blood-brain barrier opening after white matter injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 2013; 123(2):782 – 786.
  259. Serpa RFB, Jesus EFO, Anjos MJ, Oliveira LF, Marins LA, Carmo MGT, Corrêa Junior JD, Rocha MS, Lopes RT, Martinez AMB. Topographic Trace-Elemental Analysis in the Brain of Wistar Rats by X-ray Microfluorescence with Synchrotron Radiation. *Analytical Sciences*, 2008; 24(7):839 – 842.
  260. Seshi B, True L, Carter D, Rosai J. Immunohistochemical characterization of a set of monoclonal antibodies to human neuron-specific enolase. *American Journal of Pathology*, 1988; 131(2):258 – 269.
  261. Sharott A, Moll CK, Engler G, Denker M, Grün S, Engel AK. Different subtypes of striatal neurons are selectively modulated by cortical oscillations. *The Journal of Neuroscience*, 2009; 29(14):4571 – 4585.
  262. Shimizu H, Watanabe E, Hiyama TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, Yanagawa Y, Obata K, Noda M. Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na<sup>+</sup>] sensing. *Neuron*, 2007; 54(1):59 – 72.
  263. Siegmund SV, Dooley S, Brenner DA. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Digestive Diseases*, 2005; 23(3-4):264 – 274.
  264. Sillanauke P, Kalela A, Seppä K, Höyhty M, Nikkari ST. Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of alcohol abusers. *European Journal of Clinical Investigation*, 2002; 32(4):225 – 229.
  265. Skrzypiec AE, Maiya R, Chen Z, Pawlak R, Strickland S. Plasmin-mediated degradation of laminin gamma-1 is critical for ethanol-induced neurodegeneration. *Biological Psychiatry*, 2009; 66(8):785 – 794.
  266. Slezak M, Pfrieder FW. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends in Neurosciences*, 2003; 26(10):531 – 553.
  267. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *The Annual Review of Neuroscience*, 2001; 24:1217 – 1281.
  268. Somavilla M, Sánchez-Villarejo MV, Almansa I, Sánchez-Vallejo V, Barcia JM, Romero FJ, Miranda M. The effects of acute ethanol exposure and ageing on rat brain glutathione metabolism. *Free Radical Research*, 2012; 46(9):1076 – 1081.
  269. Song DD, Shults CW, Sisk A, Rockenstein E, Masliah E. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Experimental Neurology*, 2004; 186(2):158 – 172.
  270. Sorra KE, Harris KM. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 2000; 10(5):501 – 511.
  271. Spanagel R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiological Reviews*, 2009; 89(2):649 – 705.
  272. Spano MS, Fadda P, Fratta W, Fattore L. Cannabinoid-opioid interactions in drug discrimination and self-administration: effect of maternal, postnatal, adolescent and adult exposure to the drugs. *Current Drug Targets*, 2010; 11(4):450 – 461.

273. Stacchiotti A, Lavazza A, Ferroni M, Sberveglieri G, Bianchi R, Rezzani R, Rodella LF. Effects of aluminium sulphate in the mouse liver: similarities to the aging process. *Experimental Gerontology*, 2008; 43(4):330 – 338.
274. Steiner J, Bernstein HG, Biela H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neuroscience*, 2007; 8:2.
275. Stephens A, Groma V, Skuja S, Platkājis A, Aldiņš P, Ekšteina I, Mārtiņšone I, Bricis R, Donaghy M. The Outcome of the Movement Disorder in Methcathinone Abusers: Clinical, MRI, and Manganese changes, and Neuropathology. *European Journal of Neurology*, 2013; p1 – 7.
276. Stephens A, Logina I, Liguts V, Ph.D., Aldiņš P, Ekšteina I, Platkājis A, Mārtiņšone I, Tērauds E, Rozentāle B, Donaghy M. A Parkinsonian Syndrome in Methcathinone Users and the Role of Manganese. *The New England Journal of Medicine*, 2008; 358:1009 – 1017.
277. Sullivan EV, Deshmukh A, De Rosa E, Rosenbloom MJ, Pfefferbaum A. Striatal and forebrain nuclei volumes: contribution to motor function and working memory deficits in alcoholism. *Biological Psychiatry*, 2005; 57(7):768 – 776.
278. Sun AY, Sun GY. Ethanol and oxidative mechanisms in the brain. *Journal of Biomedical Science*, 2001; 8(1):37 – 43.
279. Surmeier DJ, Plotkin J, Shen W. Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Current Opinion in Neurobiology*, 2009; 19(6):621 – 628.
280. Syapin PJ. Brain Damage and Alcohol Dependence: How one may influence the other. *Alcoholism Treatment Quarterly*, 2011; 29: 132 – 145.
281. Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 2002; 22(3):920 – 930.
282. Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Neuroscience*, 2006; 9(2):260 – 267.
283. Takeuchi Y, Miki T, Liu JQ, Ohta K, Warita K, Matsumoto Y, Suzuki S, Tamai M, Ameno K, Bedi KS, Yakura T. Morphological evidence of an altered process of synaptic transcytosis in adult rats exposed to ethanol. *Alcohol and Alcoholism*, 2012; 47(6):671 – 676.
284. Tamrazi B, Almast J. Your brain on drugs: imaging of drug-related changes in the central nervous system. *Radiographics*. 2012; (3):701 – 719.
285. Tang Y, Pakkenberg B, Nyengaard JR. Myelinated nerve fibres in the subcortical white matter of cerebral hemispheres are preserved in alcoholic subjects. *Brain Research*, 2004; 1029(2):162 – 167.
286. Tateno M, Saito T. Biological studies on alcohol-induced neuronal damage. *The Psychiatry Investigation*, 2008; 5:21 – 27.
287. Taupin P, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of Neuroscience Research*, 2002; 69(6):745 – 749.
288. Tepper JM, Lee CR. GABAergic control of substantia nigra dopaminergic neurons. *Progress in Brain Research*, 2007; 160:189 – 208.
289. Tepper JM, Martin LP, Anderson DR. GABAA receptor-mediated inhibition of rat substantia nigra dopaminergic neurons by pars reticulata projection neurons. *The Journal of Neuroscience*, 1995; 15(4):3092 – 3103.
290. Teutsch H.F. 2005 .The modular microarchitecture of human liver. *Hepatology*, 42:317 – 325.
291. Todd G, Noyes C, Flavel SC, Della Vedova CB, Spyropoulos P, Chatterton B, Berg D, White JM. Illicit stimulant use is associated with abnormal substantia nigra morphology in humans. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56438.

292. Trantham-Davidson H, Burnett EJ, Gass JT, Lopez MF, Mulholland PJ, Centanni SW, Floresco SB, Chandler LJ. Chronic alcohol disrupts dopamine receptor activity and the cognitive function of the medial prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 2014;34(10):3706 – 18.
293. Ullén F. Is activity regulation of late myelination a plastic mechanism in the human nervous system? *Neuron Glia Biology*, 2009; 5(1 – 2):29 – 34.
294. Unsicker K, Kreiglstein K. TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival. *Molecular and cellular biology of neuroprotection in the CNS*. Ed. C. Alzheimer, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002; 353 – 374.
295. Uranova NA, Vostrikov VM, Orlovskaya DD, Rachmanova VI. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophrenia Research*, 2004; 67(2-3):269 – 275.
296. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 2009; 7(1):65 – 74.
297. Vallés SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathology*, 2004; 14(4):365 – 371.
298. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002; 118(2):211 – 215.
299. Viggiano A, Viggiano D, Viggiano A, De Luca B. Quantitative histochemical assay for superoxide dismutase in rat brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2003; 51, 7, 865 – 871.
300. Virmani A, Ali SF, Binienda ZK. Neuroprotective strategies in drug abuse-evoked encephalopathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010; 1199:52 – 68.
301. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, 2009; 56(Suppl 1):3 – 8.
302. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005; 6(8):626 – 640.
303. Wang J, Lanfranco MF, Gibb SL, Yowell QV, Carnicella S, Ron D. Long-lasting adaptations of the NR2B-containing NMDA receptors in the dorsomedial striatum play a crucial role in alcohol consumption and relapse. *The Journal of Neuroscience*, 2010; 30(30):10187 – 10198.
304. Ward RJ, Crichton RR, Taylor DL, Della Corte L, Srai SK, Dexter DT. Iron and the immune system. *Journal of Neural Transmission*, 2011; 118(3):315 – 328.
305. Ward RJ, Lallemand F, de Witte P. Biochemical and neurotransmitter changes implicated in alcohol-induced brain damage in chronic or 'binge drinking' alcohol abuse. *Alcohol and Alcoholism*, 2009; 44(2):128 – 135.
306. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *The Journal of Cell Biology*, 1958; 4:475 – 478.
307. Watts LT, Rathinam ML, Schenker S, Henderson GI. Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death. *Journal of Neuroscience Research*, 2005; 80(5):655 – 666.
308. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009; 1788(4):842 – 857.
309. Weller IV, Cohn D, Sierralta A, Mitcheson M, Ross MG, Montano L, Scheuer P, Thomas HC. Clinical, biochemical, serological, histological and ultrastructural features of liver disease in drug abusers. *Gut*, 1984; 25(4):417 – 423.
310. WHO. Alcohol and injuries: emergency department studies in an international perspective. 2009.

311. Wichmann T, Kliem MA. Neuronal activity in the primate substantia nigra pars reticulata during the performance of simple and memory-guided elbow movements. *Journal of Neurophysiology*, 2004; 91(2):815 – 827.
312. Wick W, Platten M, Weller M. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *Journal of Neuro-Oncology*, 2001; 53(2):177 – 185.
313. Wilson LE, Torbenson M, Astemborski J, Faruki H, Spoler C, Rai R, Mehta S, Kirk GD, Nelson K, Afdhal N, Thomas DL. Progression of liver fibrosis among injection drug users with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2006; 43(4):788 – 795.
314. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature Neuroscience*, 2011; 14(11):1398 – 1405.
315. Winship IR, Plaa N, Murphy TH. Rapid Astrocyte Calcium Signals Correlate with Neuronal Activity and Onset of the Hemodynamic Response In vivo. *The Journal of Neuroscience*, 2007; 27(23):6268 – 6272.
316. Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004; 5(6):483 – 494.
317. Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM. A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nature Neuroscience*, 2002; 5(12):1302 – 1308.
318. Wright JW, Harding JW. Contributions of Matrix Metalloproteinases to Neural Plasticity, Habituation, Associative Learning and Drug Addiction. *Neural Plasticity*, 2009; 2009: 579382.
319. Yelnik J. Modeling the organization of the basal ganglia. *Revue Neurologique (Paris)*, 2008; 164(12):969 – 976.
320. Yin HH, Knowlton BJ. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006; 7(6):464 – 476.
321. Yon JM, Baek IJ, Lee SR, Kim MR, Lee BJ, Yun YW, Nam SY. Immunohistochemical identification and quantitative analysis of cytoplasmic Cu/Zn superoxide dismutase in mouse organogenesis. *Journal of Veterinary Science*, 2008; 9(3): 233 – 240.
322. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005; 6(12):931 – 944.
323. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 2001; 2(7):502 – 511.
324. Yu SP, Canzoniero LM, Choi DW. Ion homeostasis and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001; 13(4):405 – 411.
325. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 2000; 407(6805):802 – 809.
326. Yumoto S, Kakimi S, Ohsaki A, Ishikawa A. Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009; 103(11):1579 – 1584.
327. Zalcmane V, Groma V. 2004. Šūnas ultrastruktūra. Rīga, RSU, 279 lpp.
328. Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Molecular Pathology*, 2001; 54(6):414 – 418.
329. Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004; 5(11):863 – 873.
330. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002; 33(3):337 – 349.
331. Zemtsova I, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schrör K, Häussinger D. Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology*, 2011; 54(1):204215.

- 332. Zhang H, Adwanikar H, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ. Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. *Neuroscientist*, 2010; 16(2):156 – 170.
- 333. Zhang S, Zhou Z, Fu J. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environmental Research*, 2003; 93:149 – 157.
- 334. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 2008; 57(2):178 – 201.
- 335. Zozulya A, Weidenfeller C, Galla HJ. Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier in vitro. *Brain Research*, 2008; 1189:1 – 11.
- 336. Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell AS. Brain Energy Metabolism in a Sub-Acute Rat Model of Manganese Neurotoxicity: An Ex Vivo Nuclear Magnetic Resonance Study Using [1-13C] Glucose. *NeuroToxicology*, 2004; 25:573 – 587.
- 337. Гайер Г. 1974. Электронная гистохимия. Мир, Москва, 448.

## 9. PIELIKUMS

### Ētikas komitejas atļauja

Veidlapa Nr E-9 (2)

#### RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007  
Tel.67409137

| Komitejas sastāvs              | Kvalifikācija | Nodarbošanās   |
|--------------------------------|---------------|----------------|
| 1. Asoc. prof. Olafs Brūvers   | Dr.miss.      | teologs        |
| 2. Docente Santa Purviņa       | Dr.med.       | farmakologs    |
| 3. Asoc. prof. Voldemārs Arnis | Dr.biol.      | rehabilitologs |
| 4. Asoc. prof. Viesturs Liguts | Dr.med.       | toksikologs    |
| 5. Profesore Regīna Kleina     | Dr.med.       | patanatoms     |
| 6. Asoc. prof. Guntars Pupelis | Dr.med.       | ķirurgs        |

Pieteikuma iesniedzējs: Sandrs Skuja  
RSU Doktorantūras nodaļa

Pētījuma nosaukums: Toksisku vielu izraisītu CNS izmaiņu morfoloģiskā izpēte.

Iesniegšanas datums: 03.12.2009.

#### Pētījuma protokols:

(X) Pētījuma veids: kompleksi tiks izmantota gaismas mikroskopijas metode, imūnhistoķīmijas metode, caurstarojošā un skenējošā elektromikroskopijas metode, ķīmisko elementu rentgenmikroanalīzes metode

(X) Pētījuma populācija: 50 parafīna bločiņi no CNS

(X) Informācija par pētījumu:

(X) Piekrišana dalībai pētījumā:

#### Citi dokumenti:

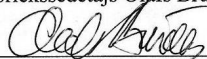
1. Anketu paraugs
2. Nosūtījuma veidlapa
3. Pētījuma autores CV
4. Darba vadītājas CV
5. SIA Rīgas Austrumu KUS Patoloģijas centra direktora piekrišana
6. Rīgas pašvaldības SIA „Rīgas 1. slimnīca” Patoloģijas nodaļas vadītājas piekrišana
7. RSU AAI direktores piekrišana

**Lēmums:** piekrist biomedicīniskajam pētījumam

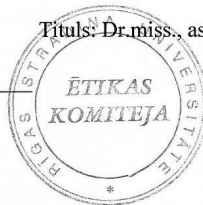
Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers

Tituls: Dr.miss., asoc.prof.

Paraksts



Ētikas komitejas sēdes datums: 17.12.2009.



## Pētījumā iekļautās grupas

| Nr. | Hroniski alkohola lietotāji | Narkotisko vielu lietotāji | Kontroles grupa    |
|-----|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
|     | nr./dzimums/vecums          | nr./dzimums/vecums         | nr./dzimums/vecums |
| 1.  | 3616 vīr 64g                | 3499 vīr 45 g              | 3778 vīr 34g       |
| 2.  | 3618 vīr 50g                | 828 vīr 45g                | 3825 vīr 27g       |
| 3.  | 3642 vīr 49 g               | 3724 vīr 31g               | 3843 vīr 23g       |
| 4.  | 3727 vīr 46g                | 3824 vīr 31g               | 3871 vīr 32g       |
| 5.  | 3728 vīr 53g                | 3884 vīr 31g               | 3895 vīr 37g       |
| 6.  | 3729 vīr 43g                | 3926 vīr 45g               | 3905 vīr 26g       |
| 7.  | 3730 vīr 37g                | 3864 vīr 23g               | 3942 siev 22g      |
| 8.  | 3731 vīr 64g                | 3965 vīr 22 g              | 3948 siev 25g      |
| 9.  | 3732 vīr 35g                | 3966 vīr 35g               | 3953 vīr 26g       |
| 10. | 3734 vīr 48g                | 3845 siev 36g              | 3957 vīr 17g       |
| 11. | 3738 vīr 47g                |                            | 3959 vīr 37g       |
| 12. | 3777 vīr 49 g               |                            | 3968 vīr 34g       |
| 13. | 3810 vīr 47g                |                            |                    |
| 14. | 3811 vīr 54g                |                            |                    |
| 15. | 3823 vīr 48g                |                            |                    |
| 16. | 3835 vīr 55g                |                            |                    |
| 17. | 3844 vīr 43g                |                            |                    |
| 18. | 3842 vīr 60g                |                            |                    |
| 20. | 3863 vīr 63g                |                            |                    |
| 21. | 3936/3937 vīr 49g           |                            |                    |
| 22. | 3938 vīr 33g                |                            |                    |
| 23. | 3940 vīr 45g                |                            |                    |
| 24. | 3941 vīr 33g                |                            |                    |
| 25. | 3943 vīr 33g                |                            |                    |
| 26. | 3946 vīr, 55g               |                            |                    |
| 27. | 3951 vīr 66g                |                            |                    |
| 28. | 3952 vīr 30g                |                            |                    |
| 29. | 3954 vīr 50g                |                            |                    |
| 30. | 3955 vīr 38g                |                            |                    |
| 31. | 3956 vīr 63g                |                            |                    |
| 32. | 3961 vīr 36 g               |                            |                    |
| 33. | 3962 vīr 49 g               |                            |                    |
| 34. | 3963 vīr 35 g               |                            |                    |
| 35. | 3617 siev 60g               |                            |                    |
| 36. | 3733 siev 56 g              |                            |                    |
| 37. | 3812 siev 59g               |                            |                    |
| 38. | 3846 siev 50g               |                            |                    |
| 39. | 3939 siev 60g               |                            |                    |
| 40. | 3944 siev 34g               |                            |                    |
| 41. | 3945 siev, 48g              |                            |                    |
| 42. | 3949 siev 45g               |                            |                    |
| 43. | 3950 siev 60g               |                            |                    |
| 44. | 3846 siev 50g               |                            |                    |
| 45. | 3960 siev 44g               |                            |                    |
| 46. | 3964 siev 45g               |                            |                    |

## **PATEICĪBAS**

Īpašs paldies manai darba vadītājai asociētai profesorei Valērijai Gromai par vispusīgu atbalstu vienmēr un visur, ieguldīto laiku un padomiem promocijas darba izstrādes un rakstīšanas laikā.

Sirsnīgs paldies profesoram Ojāram Teterim par atbalstu un palīdzību izpētes materiāla ieguvē.

Pateicos profesorei Regīnai Kleinai par atsaucību un ieteikumiem darba tapšanas laikā.

Paldies lektorei Vinitai Caucei par palīdzību un padomiem, veicot datu statistisko apstrādi.

Sirsnīgs paldies manai skolotājai, ilggadējai Starpkatedru Elektronmikroskopijas laboratorijas vad. pētniecei Valdai Zalcmanei par darba pieredzes nodošanu, labestību un „pleca sajūtu”, kā arī kolēģiem Lidijai Saulītei – par atbalstu un konsultācijām pētnieciskā materiāla sagatavošanā, Aloizijam Patmalniekam – par pūlēm tehniskās aparatūras nodrošināšanā.

Paldies visiem AAI kolēģiem par smaidu un uzmundrinājumiem.

Vislielākais paldies maniem tuvajiem par atbalstu šī darba tapšanas laikā.