



Sandra Skuja

**ALKOHOLA UN
NARKOTISKO VIELU
IZRAISĪTU CNS IZMAIŅU
MORFOLOĢISKĀ IZPĒTE**

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Specialitāte – morfoloģija

Rīga, 2014

Sandra Skuja

Alkohola un narkotisko vielu
izraisītu CNS izmaiņu
morfoloģiskā izpēte

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – morfoloģija

Rīga, 2014

Promocijas darbs izstrādāts: Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta Starpkatedru elektronmikroskopijas laboratorijā

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. habil. med. asociētā profesore **Valērija Groma**,
Rīgas Stradiņa universitāte,
Anatomijas un antropoloģijas institūts, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. habil. med. profesors **Jānis Vētra**,
Rīgas Stradiņa universitāte,
Anatomijas un antropoloģijas institūts, Latvija

Dr. med. vet. vadošā pētniece **Inese Zītare**,
LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas
zinātniskais institūts "Sīgra", Latvija

Dr. med. vet. profesore **Marina Aunapuu**,
Igaunijas Dzīveszinātņu universitāte, Tartu, Igaunija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2014. gada 6.oktobrī plkst.17.00 Rīgas Stradiņa universitātes Teorētiskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:
www.rsu.lv



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs veikts ar Eiropas sociālā fonda projekta
"Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei
Rīgas Stradiņa universitātē" finansiālu atbalstu

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. profesors **Elmārs Rancāns**

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	5
1. IEVADS	6
1.1. Darba mērķis.....	9
1.2. Darba hipotēzes	9
1.3. Darba uzdevumi.....	10
1.4. Darba novitāte.....	10
1.5. Darba struktūra un apjoms.....	11
1.6. Autora personīgais ieguldījums	11
1.7. Ētiskie aspekti.....	11
2. MATERIĀLS UN METODES.....	12
2.1. Izpētes materiāls un tā iedalījums grupās	12
2.2. Imūnhistoķīmijas metodes un imūnhistoķīmisko reakciju izvērtēšanas principi.....	14
2.3. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu statistiskā analīze.....	17
2.4. Materiāla apstrāde analīzei caurstarojošā elektronu mikroskopā.....	18
2.5. Materiāla apstrāde analīzei skenējošā elektronu mikroskopā un EDX.....	19
3. REZULTĀTI	20
3.1. Pārskata griezumam analīzes rezultāti.....	20
3.2. NSE imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti.....	20
3.3. GFAP imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti.....	20
3.4. Dzelzs histoķīmiskās noteikšanas rezultāti.....	21
3.5. CD68 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti.....	21
3.6. TGF-β1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti	21
3.7. NGFR imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti	22
3.8. SOD1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti	23
3.9. MMP9 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti.....	24
3.10. TUNEL reakcijas rezultātu analīze.....	25

3.11. Aknu audu SOD1 un TGF- β 1 imūnhistoķīmiskās izpētesrezultāti.....	26
3.12. Caurstarojošās elektronmikroskopijas rezultāti.....	26
3.13. Skenējošās elektronmikroskopijas rezultāti.....	30
3.14. Rentgenmikroanalīzes rezultāti	30
4. DISKUSIJA.....	31
5. SECINĀJUMI	40
6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU	42
7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA	46

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

CNS – centrālā nervu sistēma

CC – lat. *cortex cerebri* – smadzeņu garoza

CS – lat. *corpus striatum*

SN – lat. *substantia nigra*

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

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- β – (angl. transforming growth factor β) – transformējošais augšanas faktors beta

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

MMP – (angl. matrix metalloproteinase) – matricas metaloproteināze

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

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 pelēkā 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- β) loma neironu izdalīto neotropo faktoru regulācijā (Kriegelstein *et al.*, 2002); turklāt *in vitro* pētījumos apstiprināts, ka TGF- β 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 neurodeģeneratīvu 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 nātrijs (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.

1.1. 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.

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

1.3. Darba uzdevumi

1. Izmantojot gaismas mikroskopijas, imūnhistoķīmijas, elektronmikroskopijas un rentgenmikroanalīzes metodes, veikt *cortex cerebri*, *corpus striatum* un *substantia nigra* rajonu 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 metodi, 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 ultrastrukturālas 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.

1.4. Darba novitāte

Struktūras un ultrastrukturālas 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.

1.5. Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs uzrakstīts uz 161 lappuses latviešu valodā atbilstoši klasiskai darba struktūrai. Darbu veido 9 nodaļas: ievads; literatūras apskats; materiāli un metodes; rezultāti; diskusija; secinājumi; publikācijas un ziņojumi par pētījuma tēmu; literatūras saraksts; pievienots pielikums. Promocijas darba teksts papildināts ar 4 tabulām, 61 attēlu un 2 pielikumiem. Izmantotās literatūras sarakstā ir 337 literatūras avoti.

1.6. Autora personīgais ieguldījums

Autore personīgi piedalījies visās pētījuma stadijās, ieskaitot pētījuma plānojumu un marķieru izvēli. Autore personīgi veikusi literatūras izpēti, pētāmā materiāla atlasī, tā sagatavošanu izpētei gaismas un elektronu mikroskopos, veikusi imūnhistoķīmiskās reakcijas un preparātu analīzi gaismas un elektronu mikroskopos, kā arī datu apkopošanu, analīzi un aprakstu, ir darbā iegūto mikrofotogrāfiju autore.

1.7. Ētiskie aspekti

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

2. MATERIĀLS UN METODEDES

2.1. 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.

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 iespējamiem hroniskiem alkohola lietotājiem (Ji, 2012), 2) dūrienu pēdu esamību iespējamiem narkotisko vielu lietotājiem. 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. 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 izraisošu 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).

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 atlasē 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 ± 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 līdz 45 g. (90%), viena sieviete 22 g.v. (10%). Narkotisko vielu lietotāju vidējais vecums bija 34 ± 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 37g., sertificētam patanatomam izslēdzot sirds-asinsvadu, elpošanas sistēmas un aknu patoloģijas, kā arī papildus veicot atlasē smadzeņu un aknu audu morfoloģiskās analīzes rezultātā. Grupā iekļauti 10 vīrieši (83,3%) un 2 sievietes (16,7%). Kontroles grupā vidējais vecums bija 29 ± 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 iepļānota 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.

2.2. Imūnhistoķīmijas metodes un imūnhistoķīmisko reakciju izvērtēšanas principi

Pētījumā izmantotas ABC (StreptABC Complex/HRP Duet, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), HRP Polymer system (CellMarque, Rocklin, CA, USA) un EnVision vizualizācijas sistēmas (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 NGFR51) un anti-CD68 (DacoCytomation, Glostrup, Denmark, 1:50, klons PG-M1).

Oksidatīvā stresa izraisītu izmaiņu noteikšanai 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- β 1 (Novocastra, Newcastle, UK, Leica Biosystems, 1:40, klons TGFB17) un anti-MMP9 (Novocastra, Newcastle, UK, Leica Biosystems, 1:40, klons 15W2).

Skrīninga veidā izvēlētos smadzeņu audu gabaliņos TUNEL-pozitīvo šūnu iezīmēšanai izmantots In Situ Cell Death Detection Kit, POD marķieris, ieskaitot Enzyme solution, Label solution un Converter-POD (Roche, Mannheim, Germany).

Antigēna un antivielas reakcijas vizualizācijas nodrošināšanai tiek izmantotas 1) gan biotīnu saturošas sekundārās, gan terciālās antivielas, kas satur streptavidīnu un biotīna-mārrutku peroksidāzes šķīdumu standarta ABC sistēmas lietošanas gadījumā, 2) reakcijas amplifikators un polimēra iezīmētājs, ja izmantota HRP polimēru sistēma, 3) iezīmēts polimērs, kurš konjugēts ar sekundāro antivielu, izmantojot En Vision sistēmu. Vizualizācijas rezultāts atkarīgs no antigēna lokalizācijas šūnu membrānā, citoplazmā vai kodolā.

Parafīna griezumai deparafinizēti ksilolā, hidratēti spirta šķīdumos. Pēc tam 0,3% H₂O₂ saturošā metilspirta šķīdumā izturēti 20 – 40 minūtes, vai lietots šķīdums endogēno enzīmu nomākšanai (Dual Endogenous enzyme block). Antigēnu epitopu pieejamības nodrošināšanai stikliņi vārīti 0,01 M Na citrāta bufera šķīdumā 15 minūtes. 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 ražotāja rekomendācijām) un izturēti 12

stundas ledusskapī 2 – 6 °C temperatūrā. Pēc skalošanas PBS šķīdumā griezumi 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, 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. 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 augošas koncentrācijas spirta šķīdumos. Nobeigumā preparāti caurspīdināti ksilolā un pārklāti ar ieslēgšanas vidi (PERTEX, mounting medium for light microscopy, Histolab, Gothenburg, Sweden). Par imūnpozitīvām uzskatītas šūnas, kuras ar diaminobenzidīnu uzrādījušas brūnus reakcijas produktus. Preparāti ar attiecīgā epitopa jau zināmu pozitivitāti lietoti kā pozitīvā kontrole. Minēto preparātu paralēlie griezumi, kuros primārā anti viela aizstāta ar TRIS, izmantoti kā negatīvā kontrole.

TUNEL reakcijas veikšanai smadzeņu audu griezumi deparafinizēti, hidratēti spirta šķīdumos, izturēti 0,3% H₂O₂ saturošā metilspirta šķīdumā 40 minūtes. Tālāk audu griezumi ievietoti Na citrāta bufera šķīduma vannā un vārīti 15 minūtes. Audu griezumi 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 griezumi inkubēti ar konvertoru (Converter-POD solution) termostatā 37 °C 30 minūtes, skaloti un pārklāti ar DAB (10 minūtes). Šūnu kodolu kontrastkrāsošana veikta ar hematoksilīnu.

Perlsa reakcija Fe(III) noteikšanai veikta izlases veidā, ietverot gan hronisku alkohola un narkotisko vielu lietotāju, gan kontroles grupas materiālu.

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 endotelocītu un pericītu analīze. SOD1 un TGF- β 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 400 \times palielinājumā.

Intensitāte analizēta puskvantitatīvi, izmantojot šādu sistēmu: 0–negatīva reakcija, 1– vāja, 2– vidēja, 3– izteikta reakcija. TGF- β 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.

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- β , 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.

2.4. Materiāla apstrāde analīzei caurstarojošā elektronu mikroskopā

Smadzeņu audu materiāls elektronmikroskopiskajai analīzei sasmalcināts 1 mm^3 gabaliņos un fiksēts 2,5% glutāraldehīda šķīdumā 0,1 M fosfāta buferī 2 līdz 4 stundas $4\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrā. Papildu fiksācija veikta ar 1% osmijskābi 0,1 M fosfāta buferī 1 stundu $4\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrā. Pēc tam preparāts skalots fosfāta bufera šķīdumā bez saharozes, atūdeņots ar spirtu pieaugošā koncentrācijā. 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-dodeceny succinic anhydrite], NMA [methyl nadic anhydrite], Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) komponentu un acetona maisījumu. Pēc tam audu gabaliņi atstāti pa nakti istabas temperatūrā epoksīda sveķu maisījumā (bez katalizatora Epoxy embedding medium accelerator DPM-30 [2,4,6-Tris(dimethylamino-methyl)phenol]). Materiāls ieguldīts epoksīda sveķu maisījumā (ar katalizatoru) speciālās plastmasas kapsulās un ievietots termostatā $+60\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrā uz 24–48 stundām.

Ultraplānie griezumi (60 nm) griezti ar LKB ultramikrotomu, likti uz vara sietiņiem, kas pārklāti ar formvāra plēvēti. Analīze veikta ar JEOL firmas elektronu mikroskopu JEM 1011 (Japāna), palielinājums $\times 2000 - \times 40000$.

2.5. Materiāla apstrāde analīzei skenējošā elektronu mikroskopā un EDX

Audu autopsijas gabaliņi sākotnēji fiksēti atbilstoši metodei 2,5% glutāraldehīda šķīdumā un 1% osmijskābē. Pirms audu žāvēšanas kritiskajā punktā tie atūdeņoti pieaugošas koncentrācijas acetonā. Žāvēšana kritiskajā punktā ar žāvētāju (E3000, Agar Scientific Ltd, Anglija) nodrošināta ar ogļskābās gāzes (CO₂), attiecīga spiediena un ūdens temperatūras palīdzību. Sausie paraugi piestiprināti speciālam turētājam, tad pārklāti ar zelta vai oglekļa kārtiņu (attiecīgi analīzei SEM vai EDX) katoda putinātāja aparātā (JFC-1300, JEOL, Japāna). Sagatavotie audu turētāji ar paraugiem ievietoti skenējošā elektronu mikroskopā JSM-6490LV (JEOL, Japāna); SEI (sekundāro elektronu attēlošana) vai BSE (atstarotie sekundārie elektroni) režīmā pie 25kV liela sprieguma paraugi vērtēti 3,000× – 20,000× lielā palielinājumā.

3. REZULTĀTI

3.1. Pārskata griezumam analīzes rezultāti

Hroniskiem alkohola lietotājiem pārskata griezumam novēro galvas smadzeņu asinsvadu pilnasinību, perivazālas hemorāģijas, difūzu perivaskulāru tūska, bieži mīkstā smadzeņu apvalka fibrozi un perēkļveidīgus demielinizācijas rajonus baltajā vielā. Aknu analīze uzrāda perēkļainu vai totālu hepatocītu steatozi, bieži novēro hepatocītus, kas satur lielpilienu tauku ieslēgumus, t.s. tauku cistas citoplazmā. Novēro periportālu un portālu fibrozi, reizēm izteiktu cirozi. 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 hepatocītu un aknu fibrozi.

3.2. 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 SN un CS rajonos NSE imūnekspressija ir mainīga.

3.3. GFAP imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

Sakarā ar sarežģīto galvas smadzeņu telpisko struktūru, astrocītu diferenciacijai tika izmantots specifiskais astrocītu marķieris – monoklonālā anti-GFAP antivielā, izlases veidā izvēloties gadījumus no hronisku alkohola un narkotisko vielu lietotāju pētījuma grupām. Izteikta 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 GFAP intensitāte. GFAP ekspresija vērtējama kā difūza, to novēro gan šūnas ķermenī, gan izaugumos. Izteiktu GFAP ekspresijas intensitāti novēro astrocītu gala izaugumos pie asins kapilāriem.

3.4. Dzelzs histoķīmiskās noteikšanas rezultāti

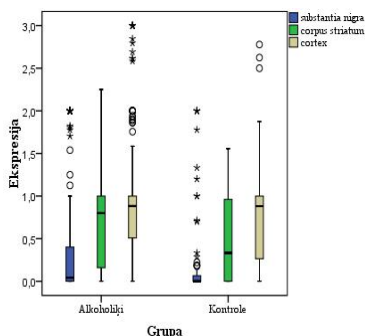
Perlsa reakcija tika veikta izlases veidā, ietverot gan hronisku alkohola un narkotisko vielu lietotāju gadījumus, gan kontroles grupas materiālu. Perlsa reakcijā šūnas ar dzelzi saturošām granulām novēro zilā krāsā. Izvēlētajos paraugos no hronisku alkohola lietotāju grupas Fe pozitīvas šūnas tika novērotas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

3.5. CD68 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

Izteiktu CD68 ekspresijas intensitāti novērojām gan pelēkajā, gan baltajā vielā hroniskiem alkohola lietotājiem visos izpētes smadzeņu rajonos. Bieži CD68 pozitīvas šūnas novēro asins kapilāru, arī neironu tuvumā.

3.6. TGF- β 1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

Salīdzinot TGF- β 1 ekspresijas mediānās vērtības hroniskiem alkohola lietotājiem un kontrolei neironos, tās ir augstākas SN un CS rajonos, CC atšķirības nenovēro (3.1.att.).



3.1. att. TGF-β1 ekspresija neironos alkohola lietotājiem un kontrolei visos smadzeņu izpētes rajonos

Zemākas TGF-β1 ekspresijas mediānās vērtības bija alkohola lietotāju grupā baltās vielas šķiedrās salīdzinot ar kontroli, attiecīgi: SN 0,95 (0,60; 1,50) un 1,40 (0,80; 2,10), ($p < 0,001$), CC 0,90 (0,60; 1,00) un 0,60 (0,90; 2,00), ($p < 0,001$). Narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, neironos augstākas mediānās vērtības novēro tikai CC rajonā: 1,20 (0,84; 2,66) un 0,88 (0,26; 1,00), ($p = 0,011$), līdzīgi augstākas tās bija arī, salīdzinot baltās vielas šķiedras: 0,90 (0,50; 1,60) un 1,40 (0,80; 2,10), ($p < 0,001$). Hroniskiem alkohola lietotājiem neironos TGF-β1 ekspresija statistiski ticami korelē ar SOD1 ekspresiju SN rajonā ($r = 0,199$, $p = 0,038$), CC rajonā turpretī novēro negatīvu korelāciju. Savukārt CS rajonā novēro negatīvu TGF-β1 korelāciju ar MMP9 ekspresiju ($r = -0,366$, $p < 0,001$) neironos. Hroniskiem alkohola lietotājiem novēro negatīvu TGF-β1 ekspresijas korelāciju ar MMP9 ekspresiju CS rajona baltās vielas šķiedrās ($r = -0,303$, $p = 0,004$), savukārt šeit pastāv pozitīva korelācija ar SOD1 ekspresiju ($r = 0,332$, $p = 0,005$).

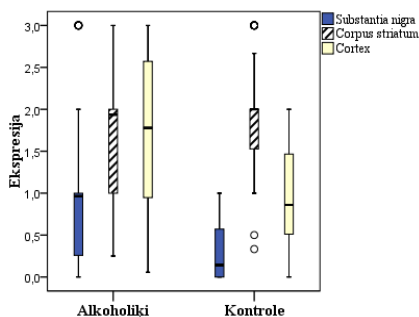
3.7. NGFR imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

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), $p = 0,037$).

3.8. SOD1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

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 (3.2.att.). Līdzīgi rezultāti iegūti, salīdzinot narkotisko vielu lietotājus un kontroli: SN 1,00 (0,40; 1,00) un 0,14 (0,00; 0,57), CC 2,22 (1,73; 2,79) un 0,86 (0,51; 1,47), $p < 0,001$. Rezultāti par SOD1 ekspresiju oligodendrocītos, astrocītos un neiropilā 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: 0,70 (0,50; 0,90) un 1,20 (0,80; 1,50), $p < 0,001$.

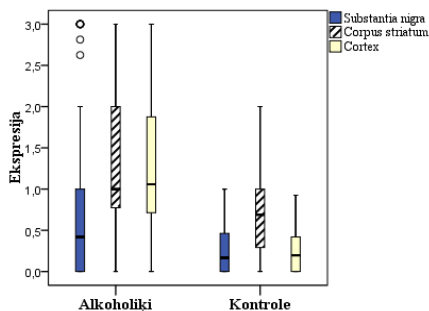


3.2. att. SOD1 ekspresija neironos alkohola lietotājiem un kontrolei visos smadzeņu izpētes rajonos

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

3.9. MMP9 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

Alkohola lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, augstākas MMP9 ekspresijas mediānās vērtības novērotas visu smadzeņu rajonu neironu perikarionos (3.3.att.).



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

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: ($r=0,298$, $p<0,001$) un ($r=0,376$, $p<0,001$), gan kontroles grupā: ($r=0,417$, $p=0,003$) un ($r=0,382$, $p=0,003$). Iegūtas statistiski ticamas pozitīvas SOD1 un MMP9 ekspresijas korelācijas visu smadzeņu izpētes rajonu neironos gan hronisku alkohola (SN ($r=0,532$, $p<0,001$), CS ($r=0,327$, $p<0,001$), un CC ($r=0,306$, $p<0,001$)), gan narkotisko vielu lietotāju (SN ($r=0,463$, $p<0,001$), CS ($r=0,269$, $p<0,001$) un CC ($r=0,323$, $p<0,001$)) grupās. SN rajonā alkohola lietotāju grupā iegūtas statistiski ticamas pozitīvas SOD1 un MMP9 ekspresijas korelācijas, izvērtējot

neironus un baltās vielas šķiedras ($r=0,316$, $p<0,001$), pretēji negatīvai korelācijai CS rajonā ($r= -0,183$, $p=0,021$). Ar imūnhistoķīmijas un statistikas metožu iegūtajām SOD1 un MMP9 ekspresijas korelācijām SN rajonā alkohola lietotāju grupā skaidrojamas izmaiņas šī rajona baltās vielas šķiedrās, kas konstatētas elektronmikroskopiskās analīzes ceļā. Negatīva SOD1 un MMP9 ekspresijas korelācija novērota, salīdzinot narkotisko vielu lietotāju neironus un baltās vielas šķiedras SN rajonā ($r= -0,413$, $p<0,001$).

Neironu imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas sadalījums dažādās alkohola lietotāju vecuma grupās: ar vecumu vāji korelē SOD1 SN neironos ($r=0,139$, $p=0,039$), citos smadzeņu 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- β 1 ekspresijai, turklāt SN rajonā vērtības samazinās līdz ar vecumu, bet CC – pieaug.

3.10. TUNEL reakcijas rezultātu analīze

Alkohola lietotāju grupā SN rajonā neatrod TUNEL-pozitīvus neironus atšķirībā no narkotisko vielu lietotāju grupas, kur novērota neliela TUNEL-pozitivitāte neironu kodolos (<5%, $n=20$). Vislielāko skaitu TUNEL-pozitīvo neironu alkohola lietotāju grupā novēro CS rajonā (20%, $n=70$), CC rajonā mazāk (10%, $n=10$). Augstāku TUNEL-pozitīvu glijas šūnu skaitu novēro SN rajona baltajā un pelēkajā vielā (5%, $n=20$) pretēji CS rajonam, kur novēro lielāku TUNEL-pozitīvu neironu skaitu (20%, $n=70$), salīdzinot ar glijas šūnām (5–10%, $n=70$). Izņēmums bija CC baltā viela, kur novēro visaugstāko TUNEL-pozitivitāti oligodendrocītos (30%, $n=10$).

3.11. Aknu audu SOD1 un TGF- β 1 imūnhistoķīmiskās izpētes rezultāti

Aknu audu analīzei ar anti-TGF- β 1 un anti-SOD1 antivielām tika izvēlēti atsevišķi gadījumi no alkohola lietotāju un kontroles grupām. Hroniskiem alkohola lietotājiem TGF- β 1 ekspresija hepatocītos variēja no vāji izteiktas līdz izteiktai. Savukārt SOD1 intensitātes pakāpe variēja no mēreni izteiktas līdz izteiktai. Kontroles grupā SOD1 un TGF- β 1 intensitāte variēja no vāji izteiktas līdz mēreni izteiktai.

3.12. Caurstarojošās elektronmikroskopijas rezultāti

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. Vairākumā gadījumu vērojams izteikts graudainais endoplazmatiskais tīkls ar regulāri izvietotām paralēlām cisternām 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 matrici 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 citoplazmas 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 normāli notiekošos sintēzes procesus perikariona rajonā. Izteiktas atšķirības neironu uzbūvē dažādos smadzeņu rajonos netika novērotas.

Novērojām aksonus, kuru citoplazma pārsvarā uzbriedusi. Raksturīgi, ka novērojami aksoni, kam iztukšota centrālā daļa, perifērijā saglabājušies citoplazmas un organellu fragmenti. Ir arī tādi, kur izteikti citoskeleta diedziņi. Abos iepriekš minētajos variantos aksonu citoplazmā novēroti lieli, uzbrieduši mitohondriji. Reizēm viens vai divi mitohondriji aizņem visu aksona šķēsgriezumu (3.4. B att.).

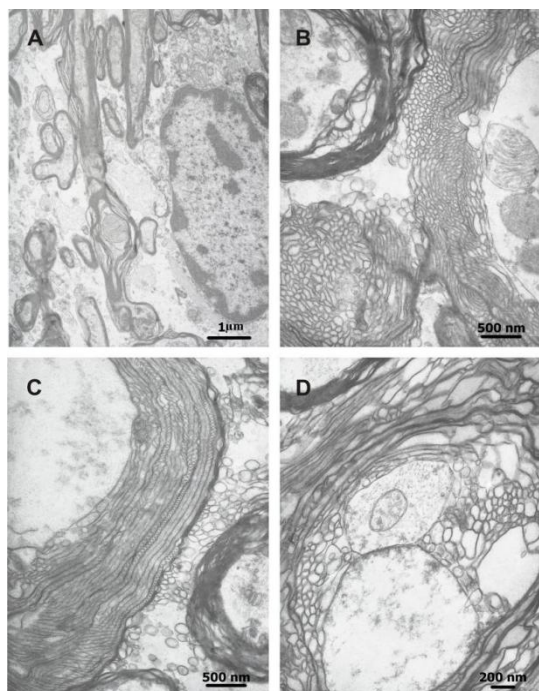
Novērojām salīdzinoši tumšāku dendrītu citoplazmu, kurā bieži uzbrieduši mitohondriji ar izmainītu kristu daudzumu un formu. Bieži redzam dendrītu gala izaugumus ar izmaiņām presinaptiskajā polā. Novēroti arī dendrīti, kuru citoplazmā redzami sinaptiskie pūslīši, izteikta pre- un post-sinaptiskā daļa ar sabiezinātām, elektronoptiski blīvām membrānām. Mitohondriji vidēji lieli, salīdzinoši tumšāki nekā aksonos, uzbrieduši.

Astrocītu kodols elektronoptiski gaišs, tajā neliels, tumšs kodoliņš. Maza izmēra hromatīna piciņas izvietotas vienmērīgi. Astrocītiem citoplazma iztukšota, tajā maz citoskeleta elementu. Uzbrieduši, vidēja izmēra mitohondriji, kas gan apaļi, gan neregulāras formas.

Novērojām oligodendrocītus ar apaļu kodolu, dažreiz ar viļņotu kodola membrānu. Kodols elektronoptiski tumšs, tajā izteikts liels tumšs kodoliņš, liela izmēra hromatīna sakopojumi izvietoti kodola perifērajā daļā. Ir kodoli, kas gaišāki, bet arī tajos tika novērots tumšs kodoliņš un perifērijā lokalizēti lieli heterohromatīna sakopojumi. Citoplazmas zona ap kodolu bieži iztukšota. Reizēm citoplazmā novēroti osmiofili ieslēgumi. Dažreiz novērojām izteikti paplašinātu graudaino endoplazmatisko tīklu ar īsām, vakuolizētām cisternām. Mitohondriji biežāk apaļi, vidēji lieli, tumši, uzbrieduši (3.4. A att.).

Ap aksoniem bieži novērots mielīna apvalks, kas zaudējis membrānu paralēlo novietojumu. Bieži mielīna apvalkā veidojas paplašinājumi ar citoplazmas ieslēgumiem vai bez tiem (3.4. C att.). Nereti novērojām mielīna membrānu ieloces, līdzīgas vakuolām, membrānas bieži krustojas (3.4. D att.). Sakrustotas membrānas novērojām gan mielīna apvalka ārējā daļā, gan vidusdaļā, retāk tuvu aksonam. Salīdzinoši kontroles gadījumos novērojām mielīna membrānu atslāņošanos, reti arī vakuolām līdzīgus paplašinājumus. Tomēr mielinētiem aksoniem skaidri iezīmējās apvalka kopējā paralēlā struktūra.

Mikrogliju novērojām tuvu asins kapilāriem. Šūnām elektronoptiski tumšs kodols, tā perifērijā izvietoti tumši heterohromatīna sakopojumi. Novērojām elektronoptiski tumšu citoplazmu; izteikti uzbriedušu graudaino endoplazmatisko tīklu ar stipri paplašinātām cisternām.

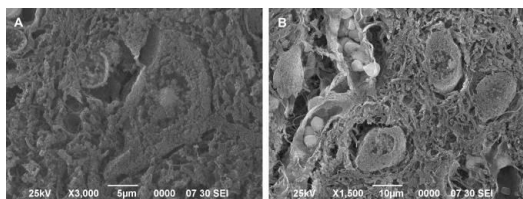


3.4. att. Ar hronisku alkohola lietošanu saistītas izmaiņas *corpus striatum* (A) un *substantia nigra* (B, C, D) rajonā. (A) Oligodendrocīta kodola fragments ar šauru citoplazmas daļu un īsām graudainā endoplazmatiskā tīkla cisternām, ribosomām, uzbriedušiem mitohondrijiem. (B) Dažādas pakāpes mielīna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

Endoteliālo šūnu raksturo saplacināta, variabla forma un elektronoptiski blīva citoplazma. Kodola apvalks viļņots. Endoteliālās šūnas virsma uzrāda neregulāras formas īsas mikrobārktstiņas, plazmatiskajā membrānā vidēji daudz nelieli pinocitotiski pūslīši. Citoplazmā reti, nelieli, reizēm uzbrieduši mitohondriji. Astrocītu kājiņas demonstrē lielus, uzbriedušus mitohondrijus, vakuolas un samazinātu citoskeleta elementu daudzumu.

3.13. Skenējošās elektronmikroskopijas rezultāti

Skenējošā elektronu mikroskopā analīzei izvēlēti smadzeņu 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 20 μm (3.5. A att.). Nervu šūnas citoplazmas daļa ir plaša. 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 (3.5. 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 7 μm . Oligodendrocīta kodols liels, aizņem praktiski visu citoplazmas daļu. Atradām salīdzinoši maz olidendroglijas šūnas, salīdzinot ar kopējo redzeslaukā esošo baltās vielas rajonu. Ir vērojams, ka endoteliocītus, kas izklāj asins kapilāru sienīgas, vieno cieši savstarpēji savienojumi.



3.5. att. (A) Neirona šūnas ķermenis ar izteiktu kodolu.
(B) Astrocīti asins kapilāra tuvumā

3.14. Rentgenmikroanalīzes rezultāti

Alkohola lietotāju SN 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. Bez tam, uz metodes jutības robežas, iespējams, novērojama magnija (Mg) un vara (Cu) klātbūtne.

4. 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 gan savstarpēji, gan ar kontroles paraugiem. Lai izvērtētu nervaudu elementu strukturālas pārmaiņas, kas radušās psihoaktīvo vielu ietekmē, CNS rajonu jutību un to oksidatīvo stāvokli, 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 iegūtie dati liecina, ka TGF- β 1 intensitāte neironos visos smadzeņu 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- β 1 ekspresiju alkohola ietekmes gadījumā. Kima un Piras pētījumos paaugstināts TGF- β 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). Interesanti, ka izvērtējot TGF- β 1 ekspresiju neiropīlā, ieguvām zemākas vērtības alkohola lietotājiem tikai SN rajonā, salīdzinot ar kontroles grupu. Līdzīgi, statistiski ticami atšķīrās TGF- β 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- β 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- β 1 ekspresija nervu šūnās hroniskos alkohola lietošanas gadījumos ir mēģinājums kompensēt samazināto TGF- β 1 līmeni SN un CC rajonu baltās vielas šķiedrās. Turklāt iespējams, ka paaugstinātā TGF- β 1 ekspresija nervu šūnās, ko izraisījis augsts oksidatīvā stresa līmenis, ietekmējis MMP9 ekspresiju (Horssen *et al.*, 2006, Mentlein *et al.*, 2012).

Interesanti, ka šajā pētījumā iegūtie rezultāti narkotisko vielu lietotājiem, salīdzinot ar kontroli, uzrāda statistiski ticamas TGF- β 1 ekspresijas atšķirības neironos tikai CC rajonā, kur, līdzīgi kā alkohola lietotājiem, mediānu vērtības bija augstākas. Šajā pētījumā iegūtie rezultāti, kas uzrāda izteiktas atšķirības TGF- β 1 ekspresijā SN rajona baltajā vielā hroniskiem alkohola un narkotisko vielu lietotājiem, liek spriest par katrai psihoaktīvo vielu grupai raksturīgo iedarbības ceļu un ietekmi.

Šajā pētījumā alkohola lietotājiem novērojām pozitīvu TGF- β 1 korelāciju ar SOD1 SN rajona neironos, turpretī CC rajonā attiecīgā korelācija bija negatīva. Negatīva TGF- β 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- β 1 un SOD1 korelācija, taču nav novērota TGF- β 1 un SOD1 korelācija ar MMP9. Šāda daudzfaktoru kombinēta iesaiste nervaudos notiekošajos procesos 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 latento TGF- β 1 proteīnu, izraisot tā paaugstinātu ekspresiju SN un CC neironos.

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. 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. Neironāla aktivitāte, saistīta ar neirotropīnu ekspresiju, sekrēciju un iedarbību, var ietekmēt sinaptisko nervu impulsa pārvadi, nodrošinot saikni starp nervu šūnu aktivitāti un sinaptisko plasticitāti (Berry *et al.*, 2012). Pētījumos pierādīta 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).

Pētījumā veicām kompleksu hronisko alkohola un narkotisko vielu lietotāju smadzeņu strukturālo komponentu imūnhistoķīmisku un elektronmikroskopisku izpēti garozas un zemgarozas rajonos, iegūtos datus salīdzinot ar kontroles grupas datiem. Lai precīzi noteiktu nervaudu struktūrelementu jutību, ko atspoguļo to oksidatīvais stāvoklis, veicām kompleksu histopatoloģisku novērtēšanu un datu statistisko analīzi. Konstatējām, ka morfoloģiskās analīzes rezultāti, tos statistiski analizējot, dod nozīmīgus rezultātus, izvērtējot psihoaktīvo vielu ietekmi CNS. Šajā pētījumā analizētajos alkohola 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. 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. Šajā pētījumā iegūti rezultāti, kur SOD1 imūnhistoķīmiskā analīze liecina par antioksidantu aktivitāti CNS bazālo gangliju un CC rajonā, ietverot pelēko un balto vielu (Sommavilla, 2012).

Antioksidantu trūkums/pārmērīgs daudzums hroniskiem alkohola un narkotisko vielu lietotājiem var veicināt neironu ievainojamību, saistītu ar oksidatīviem bojājumiem un neurodeģenerācijas procesu. Augsta aizsardzības aktivitāte novērota gan hronisku alkohola, gan narkotisko vielu lietotāju grupas neironos visos smadzeņu rajonos, kas analizēti šajā pētījumā (Maier and Chan, 2002). 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). Turklāt, balstoties uz šī 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. Kopumā secinām, ka veiktie novērojumi rosina domāt par to, ka endogēnā antioksidantu sistēma ir svarīgs šūnu uzvedības regulētājs ar mainīgu aktivitāti smadzeņu audos. Turklāt šajā pētījumā elektronmikroskopiski apstiprinot mitohondriju ultrastrukturālās izmaiņas neironos un glijas šūnās, ieguvām līdzīgus rezultātus kā Matsuda un kolēģu pētījumā (Matsuda *et al.*, 2009), kas apliecina, ka, mitohondriji ir īpaši reaktīvi šūnas organoīdi un, iespējams, mitohondriālā disfunkcija ir iemesls brīvo radikāļu izraisītam oksidatīvam stresam un tam sekojošai SOD aktivitātei. Līdzīgi SOD1 imūn ekspresijai, šajā pētījumā novērota augstāka MMP9 ekspresija alkohola un narkotisko vielu lietotāju neironos visos smadzeņu izpētes rajonos, salīdzinot ar kontroli. Šajā pētījumā novērotā paaugstinātā MMP9 ekspresija baltās vielas rajonos nav saistāma ar izteiktiem BBB bojājumiem, bet mielīna pārmaiņām, iespējams, mielīna proteīna degradāciju (Milward *et al.*, 2008). Paaugstinātā MMP9 ekspresija oligodendrocītos un mikroglijas šūnās korelē ar mielīna slāņa bojājumiem, kas ultrastrukturāli demonstrēti hroniskas alkohola lietošanas gadījumos. Kobajaši un līdzautori (Kobayashi *et al.*, 2008) demonstrē, ka MMP veicina perifēros mielīna

bojājumus mielīna bāzes proteīna (MBP) 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 matricēzes metaloproteināzes inhibitori (TIMP), tādējādi regulējot MMP. Tā kā novērojām izteiktu SOD1 ekspresiju astrocītos, kas norāda uz šo šūnu funkcionālā stāvokļa izmaiņām, tas ļauj domāt arī par MMP enzīma inhibējošās sistēmas izmaiņām (Mentlein et al., 2012; Morita-Fujimura et al., 2000). Interesants šī pētījuma atklājums ir palielinātās MMP9 reaktivitātes kolokalizācija un SOD1 imunoekspresijas paaugstināšanās, ko asociē ar ROS. Vienlaikus, precizējot reģionālas īpatnības hroniskiem alkohola lietotājiem, mēs atzīmējam, ka *substantia nigra* rajona baltās vielas atradnes ir nošķiramas no citiem šajā pētījumā iegūtajiem rezultātiem. Mēs novērojām izteiktu MMP9 ekspresijas pieaugumu līdz ar SOD1 imūnreaktivitātes samazināšanos salīdzinājumā ar kontroli. ROS klātbūtne norāda uz to, ka pārlietu liela MMP9 ekspresija spēlē nozīmīgu lomu ar hronisku psihoaktīvu vielu lietošanu saistītas brīvo radikāļu veidošanās laikā. Šajā pētījumā novērotā 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. Ļoti iespējams, ka baltās vielas tilpuma samazināšanās, kas uzrādīta hroniska alkoholisma gadījumā (De la Monte, 1998), notiek mikroglīalas aktivācijas un no tās izrietošu 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.

Interesanti, ka narkotisko vielu lietotājiem konstatēta negatīva MMP9 ekspresija endimocītos, kurpretī alkohola lietotājiem tā bija izteikti pozitīva. Tas ir saskaņā ar Tateno un Saito (Tateno and Saito, 2008) ziņojuma datiem, kur norādīts, ka izmaiņas laterālo ventrikulu rajonā, tai 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. 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 neironus 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, ko salīdzināšanas nolūkos izmantot 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- β 1 ekspresijas izmaiņas. Šajā pētījumā iegūtie 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; Herrman *et al.*, 2007; Gressner *et al.*, 2007). Par oksidatīvā stresa nozīmīgu lomu patoloģiskajos procesos, ieskaitot fibroģenēzi, liecina izteikti pozitīva SOD1 reakcija hepatocītos hroniskiem alkohola lietotājiem.

Neskatoties uz to, ka ar alkohola lietošanu saistītu bojājumu gadījumā CNS rodas selektīva ievainojamība, vēl joprojām trūkst detalizētas ultrastrukturālas informācijas, kas nozīmīga patogēno norišu izpratnei. Elektronmikroskopiski pētītas alkohola izraisītās CNS pārmaiņas galvenokārt atspoguļo informāciju par nervu šūnu bojājumiem (Khan *et al.*, 2001). Daļēji šī pētījuma dati 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. 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. Novērojām neregularitātes mielīna apvalkā un mielīnu membrānu šķelšanos. Aksolemmas tuvumā novērojām izteikti atšķirīgu formu paranodālās cilpas. Reizēm mielīna membrānās bija redzamas balonveida struktūras un membrānu krustošanās. Šulte un kolēģi (Schulte *et al.*, 2010) ziņo, ka pat relatīvi niecīgs alkohola lietotāju lokāls baltās vielas šķiedru mikrostruktūru bojājums ļauj spriest par saistību starp puslodēm, norādot uz anomālu funkcionālo asimetriju. Ziņots par novērotiem alkohola izraisītiem bojājumiem *corpus callosum* aksonu viengabalainībā (Wang *et al.*, 2010; Pfefferbaum *et al.*, 2010). Ultrastrukturāli novērotās mielīna slāņa anomālijas varētu izraisīt samazinātu vadīšanas ātrumu mielinizētajos aksonos alkoholisma gadījumos. Tā kā pētījumā analizētajiem mielinizētajiem aksoniem tikai retumis konstatēja degradāciju un dezintegrāciju mielīna slānī, nevar izslēgt šķiedru atjaunošanās iespēju.

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, vadījāmos 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 nozīmīgiem homeostāzes plasticitātes regulācijā. Slezaks un kolēģi (Slezak *et al.*, 2003) ziņoja par to, 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 neotropus 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. Šajā pētījumā iegūtie novērojumi varētu liecināt par astrocītu (vispārīgā nozīmē), un – īpaši – astrocītu šūnu izaugumu skaits samazinās vai tie ir daudz īsāki un ar reducētu zarojumu.

Narkotisko vielu lietotāju bazālo gangliju ultrastrukturāla analīze atklāj oligodendrocītu dažādo bojājumu pakāpi, ko izraisa ar klīniskām un instrumentālām metodēm apstiprināta intoksikācija (Stepens *et al.*, 2013). 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 Baumaņa 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. 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 SN rajonu, konstatējams mainīgs mitohondriju daudzums un izmēri, turklāt to bojāēja 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.

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. Izteiktās ultrastrukturālās izmaiņas astrocītos un to kājiņās, 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.

Veicot mikroanalīzi, konstatējām mainīgas Ca koncentrācijas SN pelēkās vielas rajonos hroniskiem alkohola lietotājiem. Tā kā zināms (Haydon and Carmignoto, 2006; Winship *et al.*, 2007), ka astrocītu aktivācija saistīta ar iekššūnu Ca izmaiņām, būtu nepieciešama turpmāka izpēte, salīdzinoši analizējot ķīmisko elementu izmaiņas dažādos smadzeņu rajonos.

5. 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 ciešu pozitīvu korelāciju *substantia nigra* rajonā 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- β 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.

6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

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.

Tēzes starptautiski citējamos 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

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 fibrozes gadījumā.// RSU zin. konf. materiāli, 2008, 203.lpp. // Stenda referāts.
4. Groma V., Zalcmāne V., Skuja S., Saulite 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., Saulite 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., Saulite 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., Saulite 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., āSteina E., Sondore Pīlpa 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-β1 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- β 1 ekspresijas raksturojums CNS insula, corpus striatum, un substantia nigra rajonos atkarību izraisīšu vielu lietošanas gadījumos.// RSU zin. konf. materiāli, 2013, 147.lpp. // Stenda referāts.
21. Skuja S., Groma V., Rāviņa K., Teteris O. Transforming Growth Factor- β 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, 50.lpp. // Stenda referāts.

7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Aschner M, Sonnewald U, Tan KH. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathology*, 2002; 12(4):475–481.
2. Badsberg Jensen G, Pakkenberg B. Do alcoholics drink their neurons away? *The Lancet*. 1993; 342(8881):1201–1204.
3. 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.
4. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*, 2001; 81(2):871–927.
5. Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clinic Proceedings*, 2005; 80(10):1326–1338.
6. Berry A, Bindocci E, Alleva E. NGF, Brain and Behavioral Plasticity. *Neural Plasticity*, 2012; 2012:784040.
7. 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.
8. 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.
9. Dauber W. *Pocket Atlas of Human Anatomy: Founded by Heinz Feneis*. 5th revised edition, 2007, 328–391.
10. De la Monte SM. Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Archives of Neurology*, 1988; 45(9):990–992.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

14. Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends in Neurosciences*, 2008; 31(7):361–370.
15. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comparative Hepatology*, 2007; 6:7.
16. Harper C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol and Alcoholism*, 2009; 44(2):136–140.
17. 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.
18. 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
19. 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.
20. Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005; 5(1):73–78.
21. Haydon PG, Carmignoto G. Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiological Reviews*, 2006; 86:1009–1031.
22. 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.
23. 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.
24. Jester JV, Huang J, Barry-Lane PA, Kao WW-Y, Petroll WM, Cavanagh HD. Transforming Growth Factor β -mediated corneal myofibroblast differentiation requires actin and fibronectin assembly. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1999; 40:1959–1967.
25. Ji C. Mechanisms of alcohol-induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries. *Biochemistry Research International*, 2012; 2012:216450.
26. 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.

27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Kosten TR, O'Connor PG. Management of drug and alcohol withdrawal. *The New England Journal of Medicine*, 2003; 348(18):1786–1795.
35. Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 2008; 60(4): 543–554.
36. 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.
37. Kril JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H. The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience*, 1997; 79(4):983–998.
38. Kruman II, Henderson GI, Bergeson SE. DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood). 2012; 237(7):740–747.

39. Maier CM, Chan PH. Role of Superoxide Dismutases in Oxidative Damage and Neurodegenerative Disorders. *The Neuroscientist*, 2002; 8(4):323–334.
40. 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.
41. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2000; 1(2):120–129.
42. Medana IM, Esiri MM. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain*, 2003; 126(3):515–530.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA*, 2004; 291(10):1238–1245.
47. 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.
48. 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.
49. Moselhy HF, Georgiou G, Kahn A. Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. *Alcohol and Alcoholism*, 2001; 36(5):357–368.
50. 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.

51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Piras F, Salani F, Bossù P, Caltagirone C, Spalletta G. High serum levels of transforming growth factor β 1 are associated with increased cortical thickness in cingulate and right frontal areas in healthy subjects. *Journal of Neuroinflammation*, 2012; 9:42.
55. 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.
56. 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.
57. Reynolds JN, Wickens JR. Dopamine-dependent plasticity of corticostriatal synapses. *Neural Networks*, 2002; 15(4-6):507–521.
58. Roussa E, Farkas LM, Krieglstein K. TGF-beta promotes survival on mesencephalic dopaminergic neurons in cooperation with Shh and FGF-8. *Neurobiology of Disease*, 2004; 16(2):300–310.
59. 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.
60. 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.
61. 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.

62. 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.
63. Slezak M, Pfrieder FW. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends in Neurosciences*, 2003; 26(10):531–553.
64. Somnavilla 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.
65. 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.
66. Sorra KE, Harris KM. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 2000; 10(5):501–511.
67. Spanagel R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiological Reviews*, 2009; 89(2):649–705.
68. 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 Manganeseemia changes, and Neuropathology. *European Journal of Neurology*, 2013; p1–7.
69. 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.
70. Syapin PJ. Brain Damage and Alcohol Dependence: How one may influence the other. *Alcoholism Treatment Quarterly*, 2011; 29: 132–145.
71. Tamrazi B, Almast J. Your brain on drugs: imaging of drug-related changes in the central nervous system. *Radiographics*. 2012; (3):701–719.
72. 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.
73. Tateno M, Saito T. Biological studies on alcohol-induced neuronal damage. *The Psychiatry Investigation*, 2008; 5:21–27.
74. 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.

75. 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.
76. 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.
77. van Horsen 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.
78. 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.
79. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005; 6(8):626–640.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. WHO. Alcohol and injuries: emergency department studies in an international perspective. 2009.
84. 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.
85. Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004; 5(6):483–494.
86. 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.
87. Wright JW, Harding JW. Contributions of Matrix Metalloproteinases to Neural Plasticity, Habituation, Associative Learning and Drug Addiction. *Neural Plasticity*, 2009; 2009: 579382.

88. 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.
89. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 2008; 57(2):178–201.