

Διερεύνηση της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης των *Salvia spp* σε in vitro μοντέλο Alzheimer's

ΠΑΛΙΑΓΚΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΗ ΜΑΡΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ | 2024



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Διερεύνηση της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης των *Salvia spp* σε *in vitro* μοντέλο Alzheimer's

Παλιάγκα Αικατερίνη

Διπλωματική Εργασία Ειδίκευσης για το πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών «Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κυρίας Κωνσταντή Μαρίας.

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Κωνσταντή Μαρία (Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)

Αικατερίνη Αντωνίου (Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)

Γεώργιος Λεονταρίτης (Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)

Η παρούσα εργασία αποτελεί το αποτέλεσμα σκληρής δουλειάς ενός ολόκληρου χρόνου και την συμβολή πολλών ατόμων, τους οποίους ευχαριστώ θερμά.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κυρία Κωνσταντή Μαρία, για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος της ερευνητικής της ομάδας και να εργαστώ πάνω σε ένα τόσο ενδιαφέρον και σημαντικό θέμα, τη διερεύνηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τη νόσο Alzheimer's. Παράλληλα, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την βοήθεια και την καθοδήγηση την οποία απλόχερα μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κύριο Λεονταρίτη Γεώργιο, για την βοήθεια και τις συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κύριο Κοφινά Αριστείδη, για την καθοδήγησή του, αλλά και την επιμονή και υπομονή που υπέδειξε κατά την διάρκεια της εκπαίδευσής μου σε πειραματικές τεχνικές οι οποίες αφορούσαν τόσο την εν λόγω ερευνητική εργασία, όσο και άλλες, οι οποίες αν και δεν αποτέλεσαν αντικείμενο της εν λόγω ερευνητικής δουλειάς, αποτελούσαν αναπόσπαστο κομμάτι της ερευνητικής μας καθημερινότητας. Τέλος, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την συνεργασία μας, την βοήθειά και την καθοδήγησή του καθ' όλη την διάρκεια πραγματοποίησης των πειραμάτων μας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την βοήθεια την οποία με χαρά μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου η οποία είναι πάντα εκεί για εμένα, με στηρίζει, μου συμπαραστέκεται και με βοηθάει να πραγματοποιήσω τα όνειρα και τους στόχους μου.

Περίληψη	11
Summary	13
Κεφάλαιο 1	
1.1. AD (Alzheimer's Disease, AD)	15
1.2. Όψιμης έναρξης σποραδική AD (LOAD/sAD)	18
1.3. Πρώιμης Έναρξης AD (EOAD/ fAD)	18
1.4. Αιτίες και παράγοντες κινδύνου, που συμβάλουν στην εμφάνιση της νόσου Alzheimer's	18
1.4.1. Γήρανση	19
1.4.2. Γενετικοί παράγοντες κινδύνου	20
1.4.2.1. Πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein, APP)	20
1.4.2.2. Πρεσενιλίνη-1 (Presenilin-1, PSEN-1) και Πρεσενιλίνη-2 (Presenilin-2, PSEN-2)	20
1.4.2.3. Απολιποπρωτεΐνη E (Apolipoprotein E, ApoE)	21
1.4.2.4. ABCA1 (ATP Binding Cassette Transporter A1)	21
1.4.2.5. CLU (Clusterin) και BIN1 (Bridging Integrator 1)	22
1.4.2.6. ECSIT (Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathway)	22
1.4.2.7. ESR (Estrogen Receptor)	23
1.4.2.8. Άλλα γονίδια	23
1.4.3. Περιβαλλοντικοί παράγοντες	23
1.4.3.1. Ατμοσφαιρική ρύπανση	23
1.4.3.2. Διατροφή	24
1.4.3.3. Μέταλλα	24
1.4.3.4. Λοιμώξεις	25
1.4.4. Ιατρικοί Παράγοντες	25
1.4.4.1. Καρδιαγγειακές Νόσοι	26
1.4.4.2. Παχυσαρκία και Διαβήτης	26
1.5. Υποθέσεις για τη νόσο Alzheimer's	27
1.5.1. Χολινεργική Υπόθεση	27
1.5.2. Υπόθεση του β αμυλοειδούς (Αβ)	30

1.5.3. Υπόθεση της πρωτεΐνης tau (Microtubule-Associated Protein tau, MAPT)	36
1.5.4. Μιτοχονδριακή υπόθεση	39
1.5.4.1. Μιτοχονδριακή θραύση στην AD	41
1.5.4.2. Ελλαττωματική μιτοφαγία κατά την AD	42
1.5.5. Η υπόθεση της νευροφλεγμονής	45
1.5.5.1. Ο ρόλος των φλεγμονωδών μορίων στην AD	46
1.5.5.2. Σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία παίζουν ρόλο στη νευροφλεγμονή	47
1.5.6. Η υπόθεση της διαταραχής του μικροβιώματος του εντέρου	52
1.5.7. Η υπόθεση των μεταλλικών ιόντων	53
1.6. Θεραπευτικές προσεγγίσεις της AD	53
1.6.1. Αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης	55
1.6.1.1. Δονεπεζίλη (Donepezil)	56
1.6.1.2. Ριβαστιγμίνη (Rivastigmine)	56
1.6.1.3. Γαλανταμίνη (Galantamine, GAL)	57
1.6.2. Ανταγωνιστές NMDA (N-methyl d-aspartate)	57
1.6.2.1. Μεμαντίνη (Memantine)	58
1.6.3. Γονιδιακή θεραπεία	58
1.6.4. Ανοσοθεραπεία	60
1.6.5. Πεπτιδομιμητικά	62
1.6.6. Χηλικοί παράγοντες μετάλλων	63
1.6.7. Πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί (Chaperones)	64
1.6.7.1. Πρωτεΐνες Θερμικού σοκ (Hsps)	65
1.6.7.1.1. Hsp60	65
1.6.7.1.2. Hsp70	66
1.6.7.1.3. Hsp90	67
1.6.7.2. Vacuolar sorting protein 35 (VPS35)	68
1.6.7.3. OT1001	68
1.6.8. Theranostics	69
1.6.9. Προβιοτικά, Πρεβιοτικά και Άσκηση	71
1.6.10. Φυσικά εκχυλίσματα	72
1.6.11. Salvia (Sage)	72

1.6.11.1. Ενεργά συστατικά των ειδών Salvia	73
1.6.11.2. Η Salvia και οι φαρμακοδυναμικές επιδράσεις της στον εγκέφαλο	74
1.6.11.2.1. Salvia και Αβ	74
1.6.11.2.2. Salvia και χολινεργική δράση	75
1.6.11.2.3. Salvia και Νευροτροφίνες	75
1.6.11.2.4. Αντιοξειδωτικές δράσεις της Salvia	76
1.6.11.2.5. Αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα της Salvia	76
1.6.11.2.6. Αντικαταθλιπτικές και αγχολυτικές δράσεις της Salvia	77
1.6.11.3. Παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τη βιολογική ισχύ της Salvia	78
1.6.11.4. S. fruticosa	78

Κεφάλαιο 2

2.1. In vivo και in vitro μοντέλα Νευροτοξικότητα	80
2.2. Πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες νευρικών κυττάρων	83
2.3. Αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές	85
2.4. Κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος	87
2.5. Κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y	88
2.6. ESCs και iPSCs	93

Κεφάλαιο 3

3.1. Μεθοδολογία	97
3.1.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	97
3.1.2. Συλλογή και επεξεργασία της Salvia fruticosa	97
3.1.3. Εκχύλιση της Salvia fruticosa και απομόνωση κλασμάτων των δραστικών ενώσεων αυτής	97
3.1.4. Καλλιέργεια και Διαφοροποίηση των κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y	98
3.1.5. Απομόνωση πεπτιδίων Αβ από το υπερκείμενο κυτταροκαλλιιεργειών των κυττάρων 7PA2-CHO	100
3.1.6. Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των κλασμάτων της Salvia fruticosa	100
3.1.7. Έλεγχος της νευροπροστατευτικής και αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων της Salvia fruticosa	100

3.1.8. Βιωσιμότητα κυττάρων	101
3.1.9. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	102
3.2. Αποτελέσματα	103
3.2.1. Αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των κλασμάτων της <i>Salvia fruticosa</i>	103
3.2.2. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων της <i>Salvia fruticosa</i>	104
3.2.3. Αξιολόγηση της κυτταροπροστατευτικής δράσης των κλασμάτων της <i>Salvia fruticosa</i>	105
3.3. Συμπεράσματα	107
Παράρτημα	109
• APOE	109
• TREM2	109
• HLA	111
• CD33	113
• CR1	115
• MS4A	121
• ABCA7	125
• EPHA1	127
• Clasterin (CLU) ή APOJ	128
• BIN1	129
• PICALM	130
Κατάλογος Συντομογραφιών	132
Βιβλιογραφία	139

Η AD's αποτελεί τον πιο κοινό τύπο άνοιας μεταξύ των ηλικιωμένων ατόμων και συνιστά μια μη αντιστρεπτή, αργά προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσο. Η AD's επηρεάζει περιοχές του εγκεφάλου, όπως το μεταιχμιακό σύστημα και τον ενδορινικό φλοιό, που εμπλέκονται στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης. Μπορεί να διακριθεί σε δύο μορφές, την LOAD/sAD και την EOAD/fAD (Breijyeh Z. et al., 2020)(Amponsah E. A. et al., 2021). Διάφορες υποθέσεις έχουν διατυπωθεί κατά καιρούς γύρω από την παθογένεση της νόσου (χολινεργική υπόθεση, υπόθεση του Αβ-αμυλωειδούς, υπόθεση της πρωτεΐνης Ταυ, μιτοχονδριακή υπόθεση, υπόθεση της νευροφλεγμονής, υπόθεση της διαταραχής του μικροβιώματος του εντέρου και υπόθεση των μεταλλικών ιόντων), ενώ επίσης πολλοί είναι εκείνοι οι παράγοντες οι οποίοι αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της AD, όπως η ηλικία και το φύλο του ατόμου, διάφοροι γενετικοί παράγοντες, οι τραυματισμοί της κεφαλής, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο τρόπος ζωής, η παχυσαρκία, ο διαβήτης, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, καθώς και οι μολύνσεις (Breijyeh Z. et al., 2020).

Παρόλο που η AD's αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα δημόσιας υγείας, προς το παρόν υπάρχουν μόνο δύο κατηγορίες φαρμάκων, οι οποίες έχουν εγκριθεί για την θεραπεία της: οι αναστολείς του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (Δονεπεζίλη, Ριβαστιγμίνη, Γαλανταμίνη) και οι NMDA ανταγωνιστές (Μεμαντίνη). Ωστόσο, παρά τα θεραπευτικά τους αποτελέσματα τα φάρμακα αυτά προσφέρουν μόνο ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου, ενώ δεν είναι σε θέση να την θεραπεύσουν πλήρως, αλλά ούτε και να συμβάλλουν στην πρόληψη της εμφάνισής της (Breijyeh Z. et al., 2020). Μεγάλη προσπάθεια έχει καταβληθεί για την εύρεση νέων φαρμάκων για την θεραπεία την νόσου Alzheimer's, αλλά χωρίς επιτυχία, γεγονός το οποίο έκανε τους επιστήμονες να στραφούν στην αναζήτηση παραγόντων οι οποίοι, αν και δεν θεραπεύουν την νόσο, μπορούν να ανακουφίσουν τα συμπτώματα αυτής (Breijyeh Z. et al., 2020)(Khan S. et al., 2020). Διάφορες άλλες προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης, για την αντιμετώπιση της AD, όπως η γονιδιακή θεραπεία, η ανοσοθεραπεία, τα πεπτιδομιμητικά, διάφοροι χηλικοί παράγοντες, η στόχευση των HSPs, theranostics, τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά, καθώς επίσης και διάφορα φυτικά εκχυλίσματα, όπως αυτά που προέρχονται από τα φυτά του γένους *Salvia*. Παράλληλα, φαίνεται ότι η παρέμβαση σε διάφορους τομείς, όπως ο τρόπος ζωής (διατροφή, σωματική άσκηση, γνωστική εξάσκηση) και ο έλεγχος των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου, μπορεί να συμβάλει στην πρόληψη της εμφάνισης της AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

Τα φυτά του γένους *Salvia* διακρίνονται παραδοσιακά για τις αντιοξειδωτικές τους επιδράσεις και την ικανότητά τους να ενισχύουν τη λειτουργία του εγκεφάλου, να βελτιώνουν τη μνήμη και να καθυστερούν τη σχετιζόμενη με την ηλικία γνωστική εξασθένηση. Τα φυτά αυτά διαθέτουν διάφορα ενεργά συστατικά, όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, τερπενοειδή και πολυσακχαρίτες και ασκούν πληθώρα δράσεων, οι οποίες μπορούν να συμβάλουν στην αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer's. (Lopresti A. L., 2017). Ένα από τα υποψήφια είδη του γένους *Salvia* για τη θεραπεία της AD είναι η *Salvia fruticosa* Miller (*S. fruticosa*, Ελληνικό φασκόμηλο), ένα ενδογενές είδος της ανατολικής Μεσογείου το οποίο εμφανίζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές δράσεις, καθώς επίσης και δράση αντιχολινεστεράσης (Ververis A. et al., 2023).

Σκοπός της εν λόγω μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής αντιοξειδωτικής και νευροπροστατευτικής δράσης των κύριων δραστικών ενώσεων της *S. fruticosa* έναντι της προκαλούμενης από το H_2O_2 και το Αβ, αντίστοιχα, νευροτοξικότητας. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα *in vitro* μοντέλο AD, τα διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y. Η βιωσιμότητα των κυττάρων έναντι της επαγόμενης από H_2O_2 και το Αβ τοξικότητας αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμή MTS.

Η έρευνά μας έδειξε ότι, κανένα από τα κλάσματα της *S. fruticosa*, των οποίων η δράση αξιολογήθηκε, δεν είναι τοξικό για τα διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y, στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Από όλα τα κλάσματα της *S. Fruticosa*, τα οποία εξετάστηκαν, μόνο το FrV (20 μ M), το οποίο περιέχει καθαρό ροσμαρινικό οξύ, και το FrVII (10 μ g/ml), το οποίο περιέχει μίγμα φαινολικών ενώσεων, έδειξαν ότι διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση, ενώ μόνο το FrII (10 μ g/ml), το οποίο περιέχει μίγμα φαινολικών ενώσεων, και το FrX (5 μ g/ml), το οποίο περιέχει την φαινολική ένωση Scutellarin, εμφάνισαν νευροπροστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας από το Αβ. Ωστόσο, η *S. fruticosa* περιέχει και ορισμένες δραστικές ενώσεις, οι οποίες αντί να ασκούν νευροπροστατευτική δράση προάγουν την προκαλούμενη από το Αβ κυτταροτοξικότητα. Τέτοιες ενώσεις περιέχονται στο κλάσμα FrI (10 μ g/ml), το οποίο περιέχει μίγμα τερπενίων (διτερπένια και τριτερπένια), το FrII (10 μ g/ml), το οποίο περιέχει μίγμα τερπενίων (διτερπένια και τριτερπένια) και μεθοξυφλαβόνες, και το FrIII (5 και 10 μ g/ml), το οποίο περιέχει μίγμα τριτερπενίων και μεθοξυφλαβονών.

Alzheimer's disease is the most common type of dementia among elderly people and is an irreversible, slowly progressive neurodegenerative disease. Alzheimer's disease affects areas of the brain, such as the limbic system and the entorhinal cortex, which are involved in the processes of memory and learning, and can be distinguished in two forms, LOAD/sAD and EOAD/fAD (Breijyeh Z. et al., 2020)(Amponsah E. A. et al., 2021). Various hypothesis have been proposed over the years regarding the pathogenesis of the disease (the cholinergic hypothesis, the A β hypothesis, the Tau protein hypothesis, the mitochondrial hypothesis, the neuroinflammation hypothesis, the gut microbiome disruption hypothesis and the metal ions hypothesis), while there are also many factors that increase its risk (such as age, gender, various genetic factors, head injuries, cardiovascular diseases, lifestyle, obesity, diabetes, various environmental factors, as well as infections)(Breijyeh Z. et al., 2020).

Although Alzheimer's disease is a major public health issue, there are currently only two classes of drugs approved for its treatment, acetylcholinesterase enzyme inhibitors (Donepezil, Rivastigmine, Galantamine) and NMDA antagonists (Memantine). However, despite their therapeutic effects, these drugs offer only symptomatic treatment of the disease, while they are not able to cure the disease, or to prevent its occurrence (Breijyeh Z. et al., 2020). Much effort has been made for the discovery of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease, but without success. That made scientists turn to the research for agents that, although they do not cure the disease, can minimize its symptoms (Breijyeh Z. et al., 2020)(Khan S. et al., 2020). Various other approaches have also been used to treat AD, such as gene therapy, immunotherapy, peptidomimetics, various chelating agents, targeting HSPs, theranostics, probiotics and prebiotics, as well as various plant extracts, including those derived from the plants of genus *Salvia*. At the same time, it appears that changes in various areas, such as lifestyle (diet, physical exercise, cognitive training) and control of cardiovascular risk factors, can contribute to the prevention of AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

Salvia genus plants are traditionally distinguished for their antioxidant effects and their ability to enhance brain functioning, they improve memory and delay age-related cognitive decline. These plants have various active compounds, such as phenolic acids, flavonoids, terpenoids and polysaccharides, and exert many actions that can contribute to the treatment of Alzheimer's disease (Lopresti A. L., 2017). One of the species of *Salvia* suitable for the treatment of AD is *Salvia fruticosa* Miller (*S. fruticosa*, Greek sage), an endemic species of the eastern Mediterranean, which appears to have antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activities, as well as anticholinesterase activity (Ververis A. et al., 2023).

The purpose of this study was to examine the potential antioxidant and neuroprotective effect of the main active compounds of *S. fruticosa* against H₂O₂- and A β -induced neurotoxicity, respectively. For this purpose, an in vitro AD model, the SH-SY5Y human neuroblastoma cells differentiated into cholinergic neurons, was used. Cell viability against H₂O₂- and A β - induced toxicity were assessed using the MTS assay.

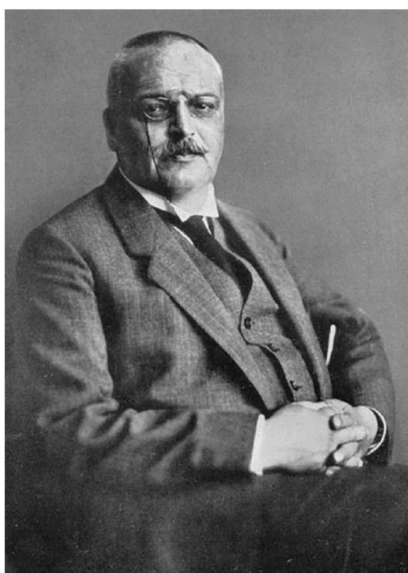
Our study indicated that none of the fractions of *S. fruticosa* at the concentrations tested was toxic for the differentiated cells. Of all the *S. fruticosa* fractions tested, only FrV (20

μM), which contained pure rosmarinic acid, and FrVII (10 $\mu\text{g/ml}$), which contained a mixture of phenolic compounds, appeared to have antioxidant activity. The FrII (10 $\mu\text{g/ml}$), containing a mixture of phenolic compounds, and FrX (5 $\mu\text{g/ml}$), containing the phenolic compound Scutellarin, appeared to display significant neuroprotective activity against the $\text{A}\beta$ -induced cytotoxicity. Notably, *Salvia fruticosa* contains some active compounds, that promoted the $\text{A}\beta$ -induced cytotoxicity including those of the fraction FrI (10 $\mu\text{g/ml}$), which contained a mixture of terpenes (diterpenes and triterpenes), FrII (10 $\mu\text{g/ml}$), which contained a mixture of terpenes (diterpenes and triterpenes) and methoxyflavones, and FrIII (5 and 10 $\mu\text{g/ml}$) containing a mixture of triterpenes and methoxyflavones.

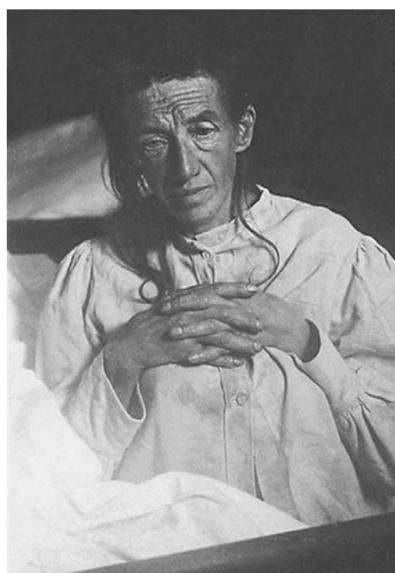
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1. AD (Alzheimer's Disease, AD)

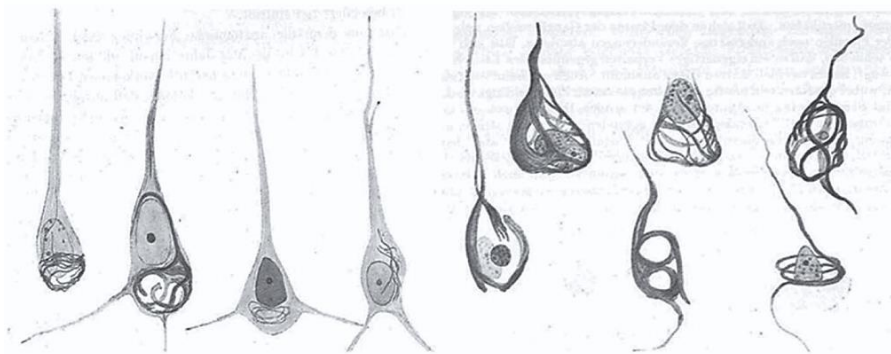
Η AD περιγράφηκε για πρώτη φορά ως «προ-γεροντική άνοια» το 1906 από τον Γερμανό ψυχίατρο Alois Alzheimer. Η νόσος πήρε το όνομά της από τον Emil Kraepelin, μέντορα του Alzheimer, ο οποίος αποκάλεσε για πρώτη φορά την ιατρική κατάσταση αυτή ως νόσο Alzheimer στην 8^η έκδοση του ψυχιατρικού του εγχειριδίου (Serý O. et al., 2013)(Breijyeh Z. et al., 2020)(Bondi M. W. Et al., 2017).



Early Stage



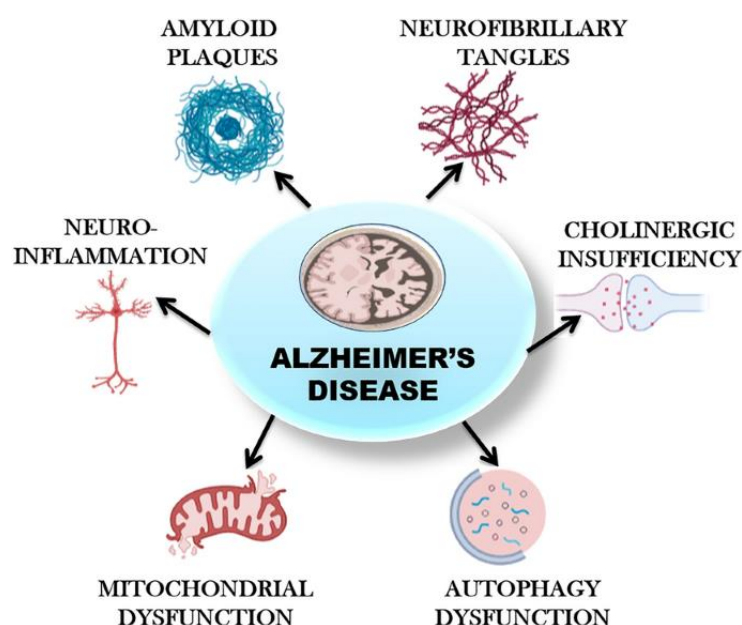
Late Stage



Εικόνα 1: Φωτογραφίες του Alois Alzheimer (πάνω αριστερά) και της ασθενούς του Auguste Deter (πάνω δεξιά). Σκίτσα των ιστοπαθολογικών παρασκευασμάτων (της Auguste Deter) της πρώιμης και όψιμης παθολογίας των νευροϊνιδιακών συσσωματωμάτων, όπως αυτά σχεδιάστηκαν από τον Alzheimer στο άρθρο του "Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters", 1911 (τροποποιημένη από Bondi M. W. Et al., 2017).

Ο Alois Alzheimer περιέγραψε τα συμπτώματα της εν λόγω νόσου το 1906 βασιζόμενος στα συμπτώματα τα οποία εμφάνισε μία 51 χρονών ασθενής του η Auguste Deter, η οποία βρισκονταν υπό την φροντίδα του στο κρατικό άσυλο της Φρανκφούρτης στη Γερμανία. Όταν η Auguste Deter πέθανε τον Απρίλιο του 1906, ο Alois Alzheimer πραγματοποίησε μεταθανάτιες ιστολογικές αναλύσεις στον εγκέφαλό της με την χρήση της τότε νέας ιστολογικής τεχνικής χρώσης αργύρου (silver staining histological technique) προκειμένου να εξετάσει τον εγκέφαλό της μικροσκοπικά. Μετά το πέρας των αναλύσεων αυτών ο Alzheimer παρατήρησε τις νευριτικές πλάκες, τα νευροϊνιδιακά συσσωματώματα και την αμυλοειδή αγγειοπάθεια, τα οποία επρόκειτο να καταστούν το σήμα κατατεθέν της νόσου AD (Bondi M. W. Et al., 2017)(Serý O. et al., 2013).

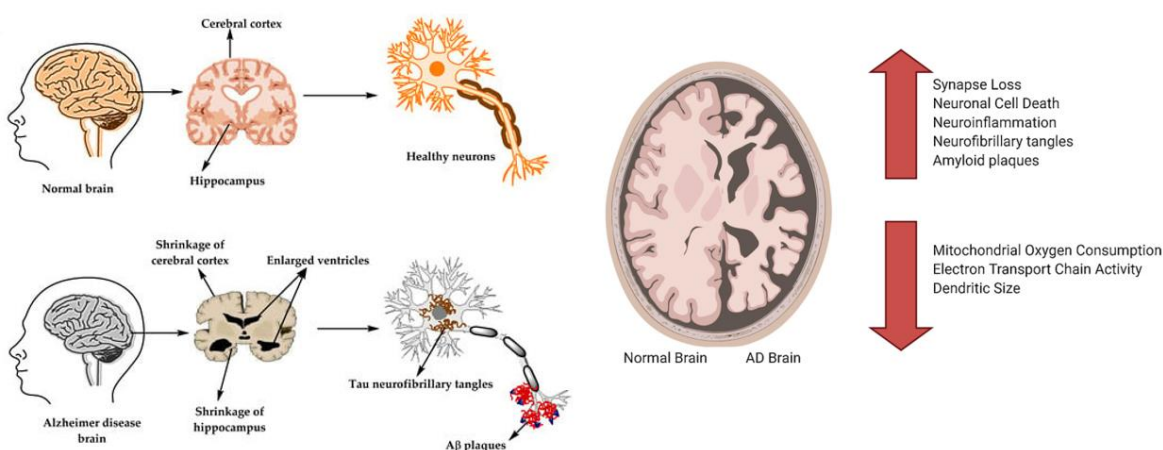
Η AD συνιστά τον πιο κοινό τύπο άνοιας μεταξύ των ηλικιωμένων ατόμων, καθώς αντιπροσωπεύει το 60-80% των περιπτώσεων, και μπορεί να οριστεί ως μία μη αντιστρεπτή αργά προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος. Επί του παρόντος, η AD επηρεάζει παγκοσμίως 35 εκατομμύρια ανθρώπους και ο αριθμός αυτός προβλέπεται σχεδόν να τριπλασιαστεί μέχρι το 2050. Η AD επηρεάζει περιοχές του εγκεφάλου, όπως το μεταιχμιακό σύστημα και ο ενδορινικός φλοιός, οι οποίες εμπλέκονται στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης (Breijyeh Z. et al., 2020) (Amponsah E. A. et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα τα οποία πάσχουν από την AD παρουσιάζουν προοδευτικές γνωστικές και συμπεριφορικές βλάβες, όπως η αδυναμία δημιουργίας νέων αναμνήσεων και η απώλεια σημαντικών παρελθοντικών αναμνήσεων. Στην νόσο Alzheimer φαίνεται να επηρεάζεται τόσο η δηλωτική (μνήμη η οποία μας επιτρέπει να ανακαλούμε συνειδητά γεγονότα, όπως ανθρώπους, τόπους και αντικείμενα, καθώς και την σημασία των γεγονότων αυτών) όσο και η μη δηλωτική μνήμη (μνήμη η οποία ανακαλείται ακούσια και η οποία ενέχεται στην εξάσκηση κινητικών αντανακλαστικών ή αντιληπτικών δεξιοτήτων)(John A. et al., 2021)(Kandel E. R. et al., 2016). Οι ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από την νόσο Alzheimer δυσκολεύονται να συλλογιστούν και να κατανοήσουν αφηρημένες έννοιες, ενώ επιπρόσθετα εμφανίζουν γλωσσική εξασθένηση. Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς μπορεί επίσης να αναπτύξουν κατάθλιψη, δυσκολία στον ύπνο και αυξημένο



Εικόνα 2: Παθοφυσιολογία της νόσου Alzheimer's (Dhapola R. et al., 2021).

άγχος. Η εξέλιξη της νόσου οδηγεί σε σημαντική μείωση των εκτελεστικών λειτουργιών, η οποία τελικά καθιστά τον ασθενή ανίκανο να φέρει εις πέρας τις καθημερινές του δραστηριότητες (John A. et al., 2021).

Πολλαπλές κυτταρικές αλλαγές εμπλέκονται στη ανάπτυξη της νόσου, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας νευρώνων, της συναπτικής απώλειας/βλάβης, του κατακερματισμού των μιτοχονδρίων, της αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών, της βλάβης του μιτοχονδριακού DNA, του πολλαπλασιασμού των αστροκυττάρων και των μικρογλοιακών κυττάρων, της ορμονικής ανισορροπίας, της αλλαγής των επιπέδων διαφόρων νευροδιαβιβαστών και τον σχηματισμό NFTs (Neurofibrillary Tangles) και γεροντικών πλακών. Αυτές οι αλλαγές παρατηρούνται πρωτίστως, σε περιοχές του εγκεφάλου, οι οποίες συνδέονται με τη μνήμη και τη μάθηση, συμπεριλαμβανομένου του ενδορινικού φλοιού, και εξαπλώνονται στον ιππόκαμπο, τον κροταφικό φλοιό, τον μετωπιαίο βρεγματικό φλοιό (frontoparietal cortex) και τελικά, στους υποφλοιώδεις πυρήνες. Στον εγκέφαλο κατά την AD παρατηρείται αύξηση του θανάτου των νευρικών κυττάρων, νευροφλεγμονή, σχηματισμός NFTs και πλακών Αβ (βήτα αμυλοειδείς πρωτεΐνες). Διάφοροι γενετικοί παράγοντες κινδύνου, η συναπτική απώλεια, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η απορρύθμιση διαφόρων microRNAs φαίνεται να συμβάλουν περεταίρω στην εξέλιξη της AD (John A. et al., 2021).



Εικόνα 3: Αριστερά απεικονίζεται δομή του εγκεφάλου και των νευρώνων σε έναν υγιή εγκέφαλο και σε έναν εγκέφαλο κατά την AD. Δεξιά απεικονίζονται οι συναπτικές και κυτταρικές αλλαγές οι οποίες παρατηρούνται κατά την AD. Η απεικόνιση συγκρίνει τον εγκέφαλο κατά την AD με έναν υγιή εγκέφαλο για να δείξει την απώλεια της εγκεφαλικής μάζας ως αποτέλεσμα της νόσου (τροποποιημένη από Breijyeh Z. et al., 2020)(τροποποιημένη από John A. et al., 2021).

Η AD ταξινομείται είτε ως όψιμης έναρξης AD (Late-onset Alzheimer's disease, LOAD) είτε ως πρώιμης έναρξης AD (Early-onset Alzheimer's disease, EOAD) με βάση την ηλικία έναρξης της νόσου. Η ηλικία έναρξης της LOAD είναι τα 65 έτη και χαρακτηρίζεται από μια προκλινική φάση, η οποία καλύπτει τουλάχιστον μία δεκαετία πριν από την εκδήλωση των κλινικών σημείων και συμπτωμάτων της νόσου. Αντίθετα, η ηλικία έναρξης της EOAD κυμαίνεται από τα 30 έως τα 65 έτη και αντιπροσωπεύει περίπου το 1-6% όλων των περιπτώσεων AD. Επιπρόσθετα, η AD ταξινομείται είτε ως σποραδική (sporadic AD, sAD), είτε ως οικογενής (familial AD, fAD) βάση του γενετικού προφίλ του ασθενούς (Amponsah E. A. et al., 2021).

1.2. Όψιμης έναρξης σποραδική AD (LOAD/sAD)

Η όψιμης έναρξης σποραδική AD αποτελεί την πιο κοινή μορφή της νόσου, είναι μη κληρονομική και η αιτιολογία της είναι πολυπαραγοντική. Η παθογένεση της όψιμης έναρξης sAD ρυθμίζεται τόσο από επιγενετικούς μηχανισμούς όσο και από γονίδια, τα οποία σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, όπως της APOE (apolipoprotein E), του TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), του HLA (human leucocyte antigen), της CD33 (cluster of differentiation 33), του CR1 (complement component receptor 1), της MS4A (membrane-spanning 4-domains subfamily A), της ABCA7 (ATP-binding cassette, subfamily A, member 7), του EPHA1 (ephrin type-A receptor 1), της APOJ (Apolipoprotein J ή CLU, Clusterin), της BIN1 (Myc box-dependent-interacting protein 1) και της PICALM (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein), τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυστιδιακή πρωτεϊνική μεταφορά (vesicular protein trafficking), τον μεταβολισμό των λιπιδίων και τη φλεγμονή (για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα εν λόγω γονίδια βλέπε Παράρτημα σελ. 109). Παράλληλα, σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, καθώς επίσης και ο τρόπος ζωής (Amponsah E. A. et al., 2021)(John A. et al., 2021)(Esquerda-Canals G. et al., 2017).

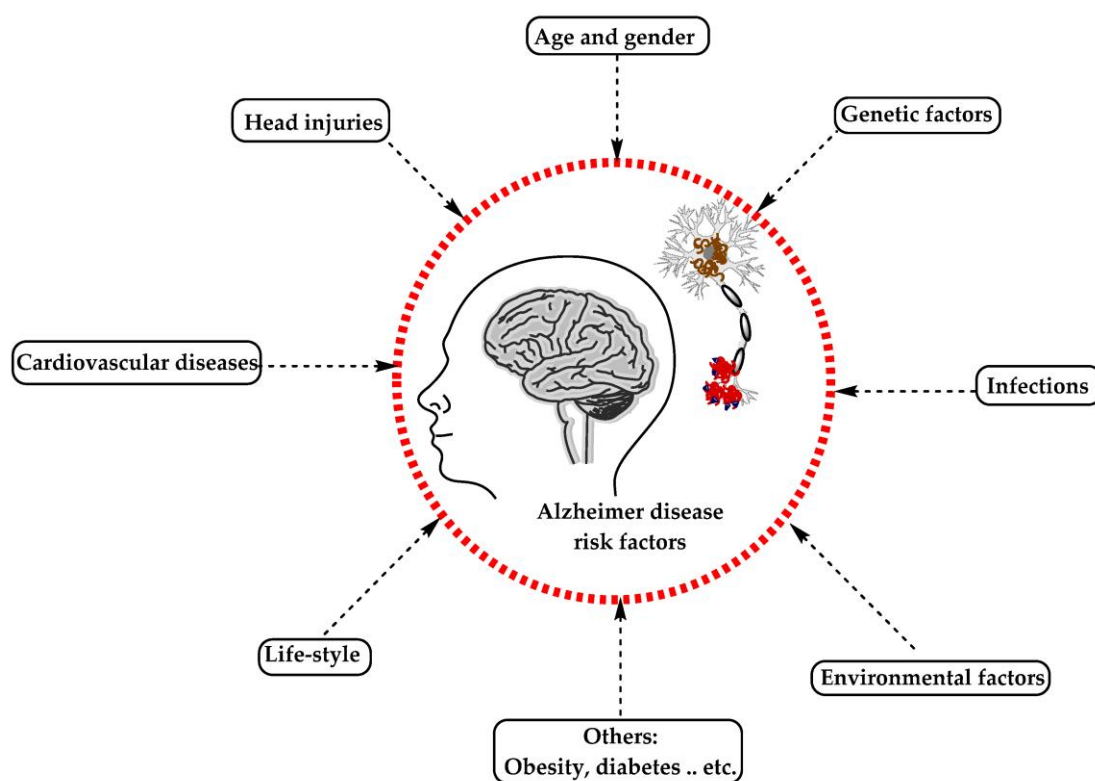
1.3. Πρώιμης Έναρξης AD (EOAD/ fAD)

Η οικογενής AD, η οποία είναι επίσης γνωστή ως αυτοσωμική επικρατής AD (Autosomal dominant Alzheimer's disease, ADAD), αποτελεί μια κληρονομική μορφή AD. Η fAD προκαλείται από μεταλλάξεις είτε στο γονίδιο της APP (Amyloid Precursor Protein) είτε στα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν την PSEN1 (Presenilin 1) ή την PSEN2 (Presenilin 2), οι οποίες αποτελούν ουσιώδη συστατικά του συμπλέγματος της γ-σεκρετάσης. Τα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν την APP, την PSEN1 και την PRES2 εντοπίζονται στους γενετικούς τόπους 21q21.3, 14q24.2 και 1q42.13, αντίστοιχα. Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί 51 παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο της APP, 219 μεταλλάξεις στο γονίδιο της PSEN1 και 16 μεταλλάξεις στο γονίδιο της PSEN2. Οι εν λόγω μεταλλάξεις οδηγούν σε αύξηση του συνολικού Αβ, τροποποίηση της αναλογίας Αβ42/Αβ40, και/ή τη συσσωμάτωση των Αβ (Esquerda-Canals G. et al., 2017)(Amponsah E. A. et al., 2021).

1.4. Αιτίες και παράγοντες κινδύνου, που συμβάλουν στην εμφάνιση της νόσου Alzheimer's

Η AD θεωρείται μία πολυπαραγοντική νόσος, η οποία συσχετίζεται με αρκετούς παράγοντες κινδύνου. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τροποποιητικούς και μη τροποποιητικούς παράγοντες κινδύνου. Οι τροποποιητικοί παράγοντες κινδύνου για την sAD περιλαμβάνουν τον διαβήτη τύπου 2 ή την παχυσαρκία και παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής του ατόμου όπως, το στρες, η ανθυγιεινή διατροφή, η έλλειψη σωματικής άσκησης, η κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα και η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους. Επιπρόσθετα, στους τροποποιητικούς παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται και οι παθήσεις των αγγείων, η κατάθλιψη, το εγκεφαλικό, η υπέρταση και οι τραυματισμοί της κεφαλής. Στους μη τροποποιητικούς παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται, η ηλικία του ατόμου, το φύλο ή οι γενετικοί πολυμορφισμοί, με τον γονότυπο της Απολιποπρωτεΐνης E4 να συνιστά τον

κυρίαρχο συνεισφορέα για την εμφάνιση όψιμης έναρξης σποραδικής AD (Breijyeh Z. et al., 2020)(John A. et al., 2021).



Εικόνα 4: Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.1. Γήρανση

Ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της AD θεωρείται ότι είναι η γήρανση. Έχει παρατηρηθεί ότι τα νεαρά άτομα σπάνια εμφανίζουν την εν λόγω νόσο, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις AD παρατηρείται όψιμη έναρξη, με τη νόσο να εμφανίζεται μετά την ηλικία των 65 ετών. Η γήρανση είναι μία πολύπλοκη και μη αναστρέψιμη διαδικασία, η οποία εκτυλίσσεται μέσω πολλαπλών οργάνων και κυτταρικών συστημάτων, κατά την οποία παρατηρείται μείωση του όγκου και του βάρους του εγκεφάλου, απώλεια συνάψεων και μεγέθυνση των κοιλιών σε συγκεκριμένες περιοχές, οι οποίες συνοδεύονται από εναποθέσεις γεροντικών πλακών (Senile Plaques, SP) και νευροϊνιδιακών συσσωματωμάτων (Neurofibrillary Tangles, NFTs). Επιπλέον, κατά τη γήρανση διάφορες καταστάσεις μπορεί να κάνουν την εμφάνισή τους, όπως ο υπομεταβολισμός της γλυκόζης, η δυσμοιόσταση της χοληστερόλης, η δυσλειτουργία των μιτοχondρίων, η κατάθλιψη και η γνωστική έκπτωση (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.2. Γενετικοί παράγοντες κινδύνου

Με τα χρόνια, διάφοροι γενετικοί παράγοντες ανακαλύφθηκαν, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της AD. Υπολογίζεται ότι το 70% των περιπτώσεων AD σχετίζεται με γενετικούς παράγοντες (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.2.1. Πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein, APP)

Η APP συνιστά μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο της APP, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21. Η APP διασπάται από την α-σεκρετάση, την β-σεκρετάση και την γ-σεκρετάση απελευθερώνοντας διάφορες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων το Αβ (Amyloid beta). Στο γονίδιο της APP έχουν εντοπιστεί μέχρι στιγμής τριάντα μεταλλάξεις, από τις οποίες οι εικοσιπέντε σχετίζονται με την εμφάνιση AD και οδηγούν σε συσσώρευση του Αβ σε αυξημένες ποσότητες. Ωστόσο, έχει εντοπιστεί και μία προστατευτική μετάλλαξη, η A673T, η οποία προστατεύει έναντι της εμφάνισης AD μειώνοντας την έκκριση του Αβ, του Αβ40 και του Αβ42.

Όλες οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο μόριο της APP αφορούν την περιοχή γύρω από τη θέση δράσης της σεκρετάσης. Η μετάλλαξη KM670/671NL έδειξε σε ζωικά μοντέλα ποντικών αύξηση των επιπέδων των αμυλοειδικών πλακών στον υπόκαμπο και τον φλοιό χωρίς όμως την παρουσία NFTs. Οι μεταλλάξεις A673V, D678H, D678N, E682K και K687N οδήγησαν σε φλοιική ατροφία, ενώ αντίθετα η μετάλλαξη E682K οδήγησε σε ατροφία του υποκάμπου. Παράλληλα, η μετάλλαξη A673V οδήγησε, εκτός από ατροφία του φλοιού, και σε παρουσία NFTs και Αβ, ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων, καθώς επίσης και σε απώλεια νευρώνων, σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταλλάξεις, που προαναφέρθηκαν, οι οποίες δεν εμφάνισαν αλλαγές στα επίπεδα του ενδοκυττάρου Αβ.

Άλλες μεταλλάξεις όπως οι T714I, V715A, V715M, V717I, V717L, L723P, K724N και I716V επηρεάζουν την περιοχή εκείνη της APP, την οποία αναγνωρίζει και διασπά η γ-σεκρετάση, επάγοντας αύξηση της αναλογίας Αβ42/Αβ40, ενώ οι μεταλλάξεις E693G, E693K, D694N και A692G επηρεάζουν τη θέση διάσπασης της α-σεκρετάσης και προκαλούν πολυμορφικά συσσωματώματα, τα οποία έχουν την ικανότητα να διαταράσσουν την ακεραιότητα της διπλοστιβάδας. Η μετάλλαξη E693delta είναι μία μετάλλαξη διαγραφής, η οποία ενισχύει το σχηματισμό του συναπτοτοξικού Αβ (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.2.2. Πρεσενιλίνη-1 (Presenilin-1, PSEN-1) και Πρεσενιλίνη-2 (Presenilin-2, PSEN-2)

Τα γονίδια των PSEN-1 και PSEN-2 εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 14 και 1, αντίστοιχα. Η PSEN-1 και η PSEN-2 είναι ομόλογες πρωτεΐνες, οι οποίες είναι όμοιες κατά 67%, με τη διαφορά τους να εντοπίζεται στο αμινοτελικό τους άκρο και την υδρόφιλη περιοχή τους. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις είναι αυτές της PSEN-1, οι οποίες ανέρχονται σε περισσότερες από 200, ενώ οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της PSEN-2 είναι πιο σπάνιες και ανέρχονται σε λιγότερες από 40.

Η PSEN-1 είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία ενεργοποιεί το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης και η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του Αβ από την APP. Η απαλοιφή (knockout) της PSEN-1 οδηγεί σε συναπτική δυσλειτουργία και βλάβη (impairment) στη μνήμη σε ποντίκια, γεγονός το οποίο φανερώνει το πόσο σημαντικό ρόλο κατέχει η PSEN-1 στη διατήρηση της μνήμης και των νευρώνων. Οι απλές μεταλλάξεις της PSEN-1 αφορούν την αντικατάσταση ενός αμινοξικού καταλοίπου, ενώ αντίθετα οι πιο σοβαρές μεταλλάξεις της

αφορούν την αντικατάσταση δύο αμινοξικών καταλοίπων. Οι εν λόγω μεταλλάξεις οδηγούν σε αύξηση του λόγου Αβ42/Αβ40 μειώνοντας τα επίπεδα του Αβ40.

Αντίθετα, οι μεταλλάξεις της PSEN-2 είναι σπάνιες, όπως προαναφέρθηκε, και συνεπώς διαδραματίζουν μικρότερο ρόλο στη σύνθεση του Αβ. Κάθε μετάλλαξη στο γονίδιο της PSEN-2 ενδέχεται να επιφέρει σημαντική επίδραση στο λόγο Αβ42/40, οδηγώντας στην εμφάνιση οικογενούς AD παρουσία των φυσιολογικών αλληλόμορφων της PSEN-1. Ορισμένες από τις μεταλλάξεις της PSEN-2, όπως οι N141I, T122P, M239V και M239I, προκαλούν σημαντική αύξηση της ενεργότητας της γ-σεκρετάσης, η οποία οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του Αβ42 και του λόγου Αβ42/40. Άλλες μεταλλάξεις της PSEN-2 είναι σπάνιοι πολυμορφισμοί, οι οποίοι δεν ασκούν καμία επίδραση στα επίπεδα του Αβ42 και του λόγου Αβ42/40 και συνεπώς δεν θεωρούνται ως παθολογικές μεταλλάξεις (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.2.3. Απολιποπρωτεΐνη E (Apolipoprotein E, ApoE)

Η πρωτεΐνη ApoE είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ, καθώς επίσης και στα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου, όπου χρησιμεύει ως προσδέτης (ligand) για τη μεσολαβούμενη από υποδοχέα ενδοκυττάρωση λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων όπως η χοληστερόλη, η οποία συνιστά ένα βασικό μόριο για τη διαδικασία παραγωγής μυελίνης και τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου.

Το γονίδιο της ApoE εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19, ενώ η ίδια διαθέτει τρεις ισομορφές ApoE2, ApoE3 και ApoE4, εξαιτίας SNPs (Single-nucleotide polymorphisms), που συνδέονται με τροποποίηση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου. Το ApoEε4 αλληλόμορφο αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου τόσο για την EOAD, όσο και για την LOAD συγκριτικά με τα αλληλόμορφα ApoEε2 και ApoEε3, τα οποία συσχετίζονται με σχετικά χαμηλότερο ρίσκο και προστατευτικό αποτέλεσμα, αντίστοιχα. Αντίθετα, το ApoEε4 αλληλόμορφο φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εναπόθεση Αβ με τη μορφή γεροντικών πλακών, ενώ επιπρόσθετα ευθύνεται για την εμφάνιση αμυλοειδικής εγκεφαλικής αγγειοπάθειας (Cerebral Amyloid Angiopathy, CAA). Παράλληλα, το ApoEε4 αλληλόμορφο έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση βλαβών στα αγγεία του εγκεφάλου, η οποία με τη σειρά της φαίνεται να οδηγεί στην παθογένεση της AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.2.4. ABCA1 (ATP Binding Cassette Transporter A1)

Ο ABCA1 είναι μέλος της ABC οικογένειας μεταφορέων, οι οποίοι ρυθμίζουν την εκροή/έκκριση χοληστερόλης στην κυκλοφορία, όπως οι απολιποπρωτεΐνες-AI (Apolipoproteins-AI, ApoAI), καθώς επίσης και την εκροή/έκκριση χοληστερόλης στον εγκέφαλο, όπως η ApoE. Επιπρόσθετα, ο ABCA1 διατηρεί σταθερή την ικανότητα λιπιδώσης της ApoE και λειτουργεί ως μεσολαβητής για την παραγωγή της HDL (High-density lipoprotein), ιδιότητες που αντικατοπτρίζουν το ρόλο του εν λόγω μεταφορέα στην αθηροσκλήρωση και τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Έρευνες σε ζωικά μοντέλα AD ποντικών έχουν δείξει ότι η έλλειψη του ABCA1 οδηγεί σε αύξηση των πλακών αμυλοειδούς και εξαλείφει την ικανότητα λιπιδώσης της ApoE. Στους ανθρώπους, μεταλλάξεις στο γονίδιο του ABCA1 έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου Tangier, η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα HDL και ApoAI στο πλάσμα, την εμφάνιση συσσωματωμάτων χοληστερόλης στους ιστούς και την εμφάνιση παθογένειας AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.2.5. CLU (Clusterin) και BIN1 (Bridging Integrator 1)

Σε αντίθεση με τα γονίδια της PSEN-1, της PSEN-2 και της APP, τα οποία αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση EOAD, τα γονίδια των CLU και BIN1 αποτελούν νέους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση LOAD.

Το γονίδιο της CLU εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 8 και κατά την AD φαίνεται να είναι ανοδικά ρυθμισμένο στον φλοιό και τον υπόκαμπο, καθώς επίσης και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Cerebrospinal Fluid, CSF) και το πλάσμα, καθιστώντας τον έναν πολλά υποσχόμενο βιοδείκτη για την AD. Η CLU μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο αλληλοεπιδρώντας με το Αβ και προωθώντας την κάθαρσή του. Ωστόσο, μπορεί να έχει και νευροτοξικό ρόλο μειώνοντας την κάθαρση του Αβ. Τα (ratio values) επίπεδα του Αβ είναι εκείνα, τα οποία θα καθορίσουν το αν η CLU κατέχει νευροπροστατευτικό ή νευροτοξικό ρόλο.

Η BIN1 είναι μία Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR) πρωτεΐνη προσαρμογέας, η οποία εμπλέκεται σε διάφορες λειτουργίες ενδοκυττάρωσης, όπως η δημιουργία/επαγωγή μεμβρανικής καμπυλότητας. Η BIN1 διαθέτει αρκετές ισομορφές, κάποιες από αυτές εντοπίζονται στον εγκέφαλο όπου αλληλεπιδρούν με διάφορες άλλες πρωτεΐνες όπως η Κλαθρίνη (clathrin), η Συναπτογιανίνη (synaptojanin) και η Αμφιφυσίνη 1 (amphiphysin 1), οι οποίες παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης των συναπτικών κυστιδίων. Η BIN1 αποτελεί τον δεύτερο πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση LOAD μετά την ApoE, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή Αβ, ενώ επιπρόσθετα φαίνεται να αποτελεί ρυθμιστή της tau και NFT παθολογίας (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.2.6. ECSIT (Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathway)

Η σημαντική αύξηση των συσσωματωμάτων Αβ στον AD εγκέφαλο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξειδωσης των πρωτεϊνών, αντικατοπτρίζοντας τον κρίσιμο ρόλο που διαθέτουν τα μιτοχόνδρια στην κυτταροτοξικότητα του Αβ και την παθογένεια της AD. Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί τον ECSIT εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και έχει συσχετιστεί με την αύξηση του ρίσκου εμφάνισης AD. Το εν λόγω γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη προσαρμογέα, η οποία λειτουργεί ως κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, καθώς επίσης και ως σηματοδοτική πρωτεΐνη και θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για τη σταθεροποίηση του μιτοχονδριακού αναπνευστικού συμπλέγματος. Επιπρόσθετα, η προσαρμοστική πρωτεΐνη εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του NF-κB (Nuclear Factor κB), των IRFs (Interferon Regulatory Factors) και της activating protein-1. Επίσης, εμπλέκεται στη σύζευξη (coupling) των μονοπατιών του TLR (immune toll-like receptor), του BMP (homeostatic bone morphogenetic pathway) και του TGF-β (transforming growth factor-beta).

Ο ECSIT αλληλεπιδρά με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, όπως οι LONP1 (Lon protease homolog) και GCDH (glutaryl-CoA dehydrogenase), οι οποίες εμπλέκονται στην ενδο-μιτοχονδριακή πρωτεόλυση και την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση αντίστοιχα, ακολουθούμενες από αλληλεπιδράσεις με τον σπόρο AD NOS3 (Nitric oxide synthase 3). Επιπλέον, φαίνεται ότι ο ECSIT εμφανίζει ορισμένες αλληλεπιδράσεις και με τα γονίδια της ApoE, της PSEN-1 και της PSEN-2, τα οποία εμπλέκονται στην AD. Οι προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις φαίνεται να υποστηρίζουν το ρόλο του ECSIT ως μοριακού συνδέσμου στο οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή και την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στην AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.2.7. ESR (Estrogen Receptor)

Η AD επηρεάζει τόσο τις γυναίκες όσο και τους άντρες, ωστόσο σχεδόν τα δύο τρίτα των περιπτώσεων της AD αφορούν γυναίκες, ενώ επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι οι γυναίκες οι οποίες πάσχουν από AD παρουσιάζουν χειρότερη διανοητική επιδείνωση (mental deterioration) συγκριτικά με τους άντρες. Παράλληλα, σε γενετικό επίπεδο, η παραλλαγή ορισμένων γονιδίων, όπως το αλληλόμορφο ApoE4, φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης AD στις γυναίκες, συγκριτικά με τους άντρες. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος εμφάνισης AD στις γυναίκες φαίνεται να σχετίζεται με την απώλεια των ορμονών των ωοθηκών κατά την εμμηνόπαυση, καθώς τα οιστρογόνα εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφόρων διεργασιών, που λαμβάνουν χώρα στον εγκέφαλο, όπως η νευροδιαβίβαση, η νευρωνική ανάπτυξη, η επιβίωση, η προστασία από το οξειδωτικό στρες, η μείωση των επιπέδων του πεπτιδίου Αβ και η εξασθένιση της υπερφωσφορυλίωσης της tau.

Τα οιστρογόνα ασκούν τη δράση τους μέσω των ERs (Estrogen Receptors), οι οποίοι μπορεί να είναι ενδοκυττάρια, διαμεμβρανικοί ή δεσμευμένοι στη μεμβράνη υποδοχείς. Οι δύο κύριοι υποτύποι των υποδοχέων των οιστρογόνων είναι ο ERα και ο ERβ, των οποίων τα γονίδια εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 6 και το χρωμόσωμα 14, αντίστοιχα. Οι υποδοχείς ERα εντοπίζονται στον υποθάλαμο και την αμυγδαλή, ενώ οι υποδοχείς ERβ εντοπίζονται στον υπόκαμπο και τον φλοιό. Η παρουσία SNPs (Single nucleotide polymorphisms) στα γονίδια των ERα και ERβ μπορεί να επηρεάσει τα εξωγενή οιστρογόνα σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας, καθώς επίσης και να επηρεάσει τη γνωστική γήρανση (cognitive aging). Τα PvuII (rs9340799) και XbaI (rs223493) είναι παραδείγματα SNPs, που εντοπίστηκαν στο γονίδιο του ERα και σχετίζονται με την AD και τη γνωστική εξασθένηση. Επιπρόσθετα, πολλοί SNPs, οι οποίοι εντοπίζονται στο γονίδιο του ERβ έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης AD στις γυναίκες (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.2.8. Άλλα γονίδια

Ο πολυμορφισμός του γονιδίου του VDR (Vitamin D Receptor) φαίνεται να σχετίζεται με την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης AD, καθώς ο πολυμορφισμός αυτός επηρεάζει την συγγένεια της βιταμίνης D για τον υποδοχέα της, οδηγώντας στην εμφάνιση νευρωνικής βλάβης, καθώς επίσης και στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι επιγενετικοί παράγοντες, όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών, καθώς και της χρωματίνης εμπλέκονται στην εμφάνιση AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.3. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η γήρανση και οι γενετικοί παράγοντες κινδύνου δεν μπορούν να εξηγήσουν όλες τις περιπτώσεις AD. Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου, όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση, η διατροφή, τα μέταλλα, οι λοιμώξεις καθώς και πολύ άλλοι μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες και φλεγμονή, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον κίνδυνο εμφάνισης AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.3.1. Ατμοσφαιρική ρύπανση

Ο όρος ατμοσφαιρική ρύπανση αναφέρεται στην τροποποίηση της φύσης της ατμόσφαιρας μέσω της εισαγωγής σε αυτήν χημικών, φυσικών ή βιολογικών ρύπων και έχει συσχετιστεί με καρδιαγγειακά και αναπνευστικά νοσήματα, ενώ πρόσφατα έχει συσχετιστεί και με την εμφάνιση AD. Τα NAAQSs (National Ambient Air Quality Standards) των ΗΠΑ έχουν ορίσει έξι ατμοσφαιρικούς ρύπους ως απειλή για την υγεία του ανθρώπου συμπεριλαμβανομένων του

όζοντος (O₃), των οξειδίων του αζώτου (NO_x), του μονοξειδίου του άνθρακα (CO), της σωματιδιακής ύλης (Particulate Matter, PM), του διοξειδίου του θείου (SO₂) και του μολύβδου. Έρευνες τόσο σε ζωικά όσο και σε κυτταρικά μοντέλα έδειξαν ότι η έκθεση σε υψηλά επίπεδα ατμοσφαιρικής ρύπανσης οδηγεί σε βλάβη του οσφρητικού βλεννογόνου, του οσφρητικού λοβού και του μετωπιαίου φλοιού, παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται κατά την AD. Επιπρόσθετα, σε άτομα, τα οποία εκτίθενται σε ατμοσφαιρικούς ρύπους έχει παρατηρηθεί σύνδεση μεταξύ του οξειδωτικού στρες, της νευροφλεγμονής και του νευροεκφυλισμού με την παρουσία υπερφωσφορυλιωμένης ταυ και πλακών Αβ στο μετωπιαίο φλοιό. Τέλος, η ατμοσφαιρική ρύπανση μπορεί να προκαλέσει αύξηση του σχηματισμού Αβ₄₂, συσσώρευση/συσσωμάτωση αυτού και εξασθένηση της γνωστικής λειτουργίας (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.3.2. Διατροφή

Έχει παρατηρηθεί ότι αρκετά διατροφικά συμπληρώματα, όπως τα αντιοξειδωτικά, οι βιταμίνες, οι πολυφαινόλες και τα ψάρια, μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης AD, ενώ αντίθετα τα κορεσμένα λιπαρά οξέα και η πρόσληψη τροφών υψηλής θερμιδικής αξίας έχουν συσχετιστεί με την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης AD.

Η επεξεργασία των τροφίμων οδηγεί σε διάσπαση των ευαίσθητων στη θερμότητα μικροθρεπτικών (βιταμίνη C και φυλλικό οξύ), την απώλεια μεγάλων ποσοτήτων νερού, καθώς και στο σχηματισμό τοξικών δευτερογενών προϊόντων (Advanced Glycation End Products, AGEs) από την μη-ενζυμική γλυκοζυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των νουκλεϊκών οξέων.

Τα AGEs διαθέτουν τοξική δράση, καθώς έχουν την ικανότητα να προκαλούν οξειδωτικό στρες και φλεγμονή μέσω της τροποποίησης της δομής και της λειτουργίας των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας και των σωματικών πρωτεϊνών. Μάλιστα, τα αυξημένα επίπεδα AGEs στον ορό έχουν συσχετιστεί με τη γνωστική έκπτωση και την εξέλιξη της AD. Ο υποδοχέας των AGEs (AGE receptor, RAGE) εντοπίζεται σε διάφορα σημεία του σώματος, συμπεριλαμβανομένων των μικρογλοιακών κυττάρων και των αστροκυττάρων. Φαίνεται ότι ο εν λόγω υποδοχέας υπερεκφράζεται στον εγκέφαλο ασθενών με AD και χρησιμεύει ως μεταφορέας, αλλά και ως επιφανειακός κυτταρικός υποδοχέας για το Αβ.

Ένας άλλος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση AD είναι και ο υποσιτισμός. Η ανεπάρκεια σε διάφορα θρεπτικά συστατικά, όπως το φυλλικό οξύ, η βιταμίνη B12 και η βιταμίνη D μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της γνωστικής λειτουργίας, γεγονός το οποίο σε συνδυασμό με τα προβλήματα, τα οποία αντιμετωπίζουν οι ασθενείς που πάσχουν από AD σχετικά με τη λήψη τροφής και την κατάποση, μπορεί να αυξήσει περαιτέρω τον κίνδυνο υποσιτισμού (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.3.3. Μέταλλα

Τα μέταλλα εντοπίζονται τόσο στη φύση όσο και σε βιολογικά συστήματα και μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, τα βιο-μέταλλα τα οποία ασκούν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες στους ζωντανούς οργανισμούς (χαλκός, ψευδάργυρος, σίδηρος) και τα τοξικά μέταλλα, τα οποία δεν έχουν καμία βιολογική λειτουργία (αλουμίνιο, μολύβδος).

Το αλουμίνιο χρησιμοποιείται ευρέως από τη βιομηχανία σε τρόφιμα, καλλυντικά, ιατρικά παρασκευάσματα, φάρμακα, καθώς και σε πληθώρα άλλων προϊόντων. Στο σώμα, το αλουμίνιο είναι σε θέση να συνδεθεί με την τρανσφερρίνη του πλάσματος, καθώς επίσης και

με μόρια κιτρικού, τα οποία αμφότερα μπορούν να δράσουν ως μόρια- μεσολαβητές για τη μεταφορά του αλουμινίου στον εγκέφαλο. Μελέτες έδειξαν ότι το αλουμίνιο συσσωρεύεται στο φλοιό, τον υπόκαμπο και σε περιοχές της παρεγκεφαλίδας όπου αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες προκαλώντας την μη σωστή αναδίπλωση αυτών, συσσωμάτωση αυτών, καθώς επίσης και την υπερφωσφορυλίωση πρωτεϊνών όπως η πρωτεΐνη tau, η οποία είναι χαρακτηριστική για την AD.

Ο μόλυβδος έχει την ικανότητα να ανταγωνίζεται βιο-μέταλλα, όπως το ασβέστιο, για τη θέση δέσμευσης αυτών, ενώ επιπρόσθετα έχει την ικανότητα να διέρχεται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ταχύτατα, όντας σε θέση να τροποποιεί τόσο την νευρωνική διαφοροποίηση όσο και τη συναπτογένεση, και να προκαλεί ποικίλες βλάβες. Οξεία έκθεση σε μόλυβδο φαίνεται να συσχετίζεται με την AD καθώς προκαλεί αύξηση της έκφρασης της β-σεκρετάσης και τη δημιουργία συσσωματωμάτων Αβ.

Το κάδμιο είναι ένα καρκινογόνο υδατοδιαλυτό μέταλλο, το οποίο διαθέτει την ικανότητα να διέρχεται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μπορεί να προκαλέσει νευρολογικές νόσους, όπως η AD. Τα ιόντα καδμίου φαίνεται να εμπλέκονται στη συσσώρευση των πλακών Αβ και την αυτο-συσσωμάτωση της πρωτεΐνης tau στον εγκέφαλο, κατά την AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.3.4. Λοιμώξεις

Οι χρόνιες λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος συνιστούν έναν ακόμα παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση AD, καθώς μπορούν να προκαλέσουν συσσώρευση πλακών Αβ και NFT (Breijyeh Z. et al., 2020). Ο ιός HSV-1 (Herpes simplex virus type 1) φαίνεται να ευθύνεται για την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης AD, όταν εντοπίζεται στον εγκέφαλο φορέων του αλληλόμορφου ε4 της APOE (Itzhaki R. F. et al., 2008). Ο ιός HSV-1 έχει την ικανότητα να αναπαράγεται στον εγκέφαλο, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης και την αύξηση της εναπόθεσης Αβ, με αποτέλεσμα την εμφάνιση βλαβών στους νευρώνες και τη σταδιακή ανάπτυξη της AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

Επιπρόσθετα, στην εμφάνιση AD φαίνεται να παίζουν ρόλο οι χρόνιες βακτηριακές λοιμώξεις. Για παράδειγμα, η συφιλιδική άνοια, η οποία προκαλείται από βακτήρια σπειροχαίτες (*Treponema pallidum*), τα οποία συσσωρεύονται στον εγκεφαλικό φλοιό προκαλώντας βλάβες παρόμοιες με τα NFTs, οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση καταστροφικών νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Επιπλέον, το βακτήριο *Chlamydia pneumoniae* μπορεί να προκαλέσει LOAD μέσω της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων και της κυτταροτοξικής μικρογλοίας, καθώς επίσης και μέσω της διατάραξης της ρύθμιση του ασβεστίου και της απόπτωσης, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της γνωστικής λειτουργίας και συνεπώς, αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.4. Ιατρικοί Παράγοντες

Τα ηλικιωμένα άτομα, που πάσχουν από την AD συνήθως παρουσιάζουν παράλληλα και άλλα νοσήματα, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι (Cardiovascular Diseases, CVDs), η παχυσαρκία, ο διαβήτης, τα οποία φαίνεται να συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.4.1. Καρδιαγγειακές Νόσοι

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα συνιστούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση AD. Καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης άνοιας λόγω της απώλειας νευρικού ιστού που αυτό προκαλεί, ενώ επιπρόσθετα επηρεάζουν την παθολογία του αμυλοειδούς και της πρωτεΐνης tau. Η κολπική μαρμαρυγή είναι επίσης σε θέση να προκαλέσει εμβολές, οι οποίες στη συνέχεια οδηγούν σε εγκεφαλικό επεισόδιο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την έκπτωση της μνήμης και των γνωστικών λειτουργιών. Η καρδιακή ανεπάρκεια επηρεάζει την αντλητική λειτουργία και συνεπώς, έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή παροχή αίματος τόσο στο σώμα όσο και στον εγκέφαλο. Η υποαιμάτωση του εγκεφάλου οδηγεί σε υποξία, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση νευρικών βλαβών.

Σύμφωνα με την υπόθεση της στεφανιαίας νόσου, η αθηροσκλήρωση, η περιφερική αρτηριακή νόσος, η υπο-αιμάτωση και οι εμβολές σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης AD. Η παραμελημένη υπέρταση σχετίζεται με την πάχυνση των αγγειακών τοιχωμάτων και τη στένωση του αυλού, οι οποίες αμφότερες μειώνουν τη ροή αίματος στον εγκέφαλο και σε χρόνιες περιπτώσεις είναι δυνατόν να προκαλέσουν εγκεφαλικό οίδημα, συνιστώντας παράγοντες κινδύνου τόσο για την εμφάνιση CVDs όσο και AD. Οι CVDs αποτελούν έναν τροποποιήσιμο παράγοντα κινδύνου της AD και συνεπώς, μπορεί να αποτελέσουν μία οδό για την πρόληψη και την καθυστέρηση της νόσου (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.4.4.2. Παχυσαρκία και Διαβήτης

Ο όρος παχυσαρκία χρησιμοποιείται για να περιγράψει την εναπόθεση υπερβολικού σωματικού λίπους σε άτομα λόγω της κατανάλωσης περισσότερων θερμίδων από όσες καίνε και μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τον δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI). Η αύξηση του σωματικού λίπους σχετίζεται με τη μειωμένη παροχή αίματος στον εγκέφαλο, η οποία προάγει την εγκεφαλική ισχαιμία, την απώλεια μνήμης και την αγγειακή άνοια.

Η παχυσαρκία, η ανθυγιεινή διατροφή, καθώς και άλλοι παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη (Impaired Glucose Tolerance, IGT) ή διαβήτη, τα οποία αμφότερα χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας, η οποία επηρεάζει τους περιφερικούς ιστούς και τα αιμοφόρα αγγεία. Η χρόνια υπεργλυκαιμία μπορεί να προκαλέσει γνωστική εξασθένηση ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης συσσώρευσης Αβ, του οξειδωτικού στρες, της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και της νευροφλεγμονής.

Η παχυσαρκία χαρακτηρίζεται από την αυξημένη έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών από τον λιπώδη ιστό, οι οποίες διεγείρουν τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα οδηγώντας σε τοπική και συστηματική φλεγμονή. Η φλεγμονή αυτή προάγει την αντίσταση στην ινσουλίνη, την υπερινσουλιναίμία και κατά συνέπεια, την υπεργλυκαιμία.

Η παχυσαρκία αποτελεί έναν πολύ γνωστό παράγοντα κινδύνου για τον διαβήτη τύπου 2, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, καθώς και για τον καρκίνο, που με τη σειρά τους αναγνωρίζονται ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση άνοιας και της AD. Η παρουσία φλεγμονής στον εγκέφαλο προκαλεί αύξηση της μικρογλοίας και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συναπτικής πλαστικότητας και την εξασθένηση της νευρογένεσης. Η μικρογλοία μπορεί να επιρρεάσει τον IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1) και να μπλοκάρει την ενδοκυττάρια σηματοδότηση ινσουλίνης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην νευρωνική υγεία. Επομένως, η αλλαγή στη δράση της ινσουλίνης μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση Αβ

και να μειώσει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης ταυ, τα οποία αμφότερα σχετίζονται με την εμφάνιση AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

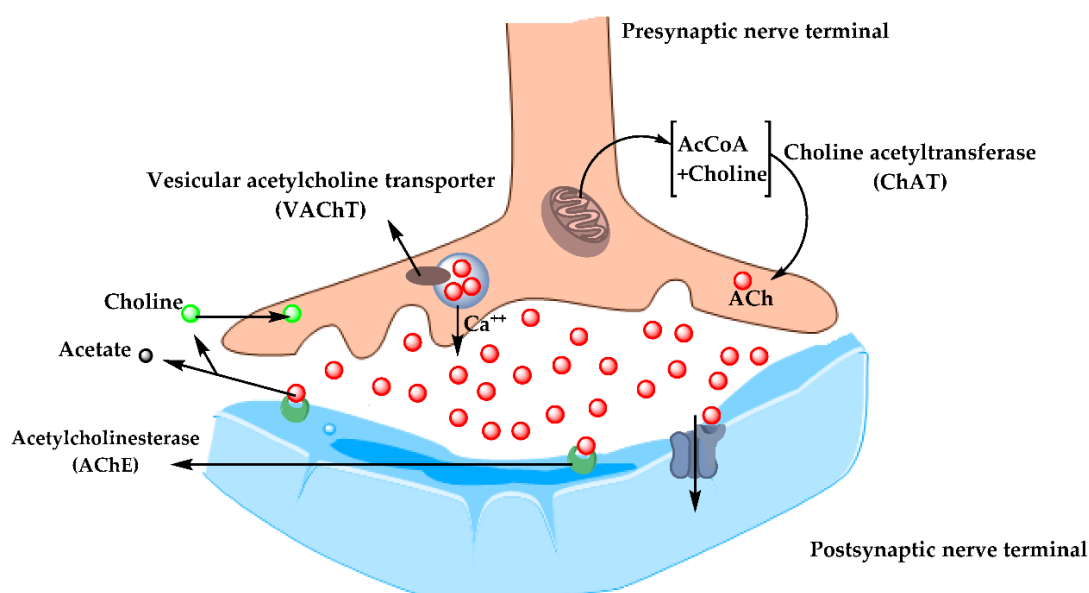
1.5. Υποθέσεις για τη νόσο Alzheimer's

Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις σχετικά με την παθογένεια της AD, όπως η χολινεργική υπόθεση, η υπόθεση του β αμυλοειδούς, η υπόθεση της πρωτεΐνης ταυ, η μιτοχονδριακή υπόθεση, η υπόθεση της νευροφλεγμονής, η υπόθεση της διαταραχής του μικροβιώματος του εντέρου και η υπόθεση των μεταλλικών ιόντων.

1.5.1. Χολινεργική Υπόθεση

Η ακετυλοχολίνη (Acetylcholine, ACh) αποτελεί έναν σημαντικό νευροδιαβιβαστή του εγκεφάλου και η δραστηριότητα αυτής εντοπίζεται σε ολόκληρο τον φλοιό, τα βασικά γάγγλια, καθώς επίσης και στον βασικό πρόσθιο εγκέφαλο (Hampel H. et al., 2018). Η ACh συντίθεται στο κυτταρόπλασμα των χολινεργικών νευρώνων από τη χολίνη και το ακετυλοσυνένζυμο A, μέσω της δράσης του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (Choline Acetyltransferase, ChAT), και στη συνέχεια μεταφέρεται στα συναπτικά κυστίδια μέσω του κυστιδιακού μεταφορέα της ακετυλοχολίνης (Vesicular Acetylcholine Transporter, VACHT)(Breijyeh Z. et al., 2020). Η περίσσεια ACh στη συναπτική σχισμή διασπάται/υδρολύεται από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (Acetylcholinesterase, AChE) σε χολίνη και οξικό οξύ. Η χολίνη μπορεί να επαναπροσληφθεί μέσω ενός μεταφορέα της χολίνης στον προσυναπτικό νευρώνα και να μετατραπεί εκ νέου σε ακετυλοχολίνη (Hampel H. et al., 2018)(Boison D., 2007).

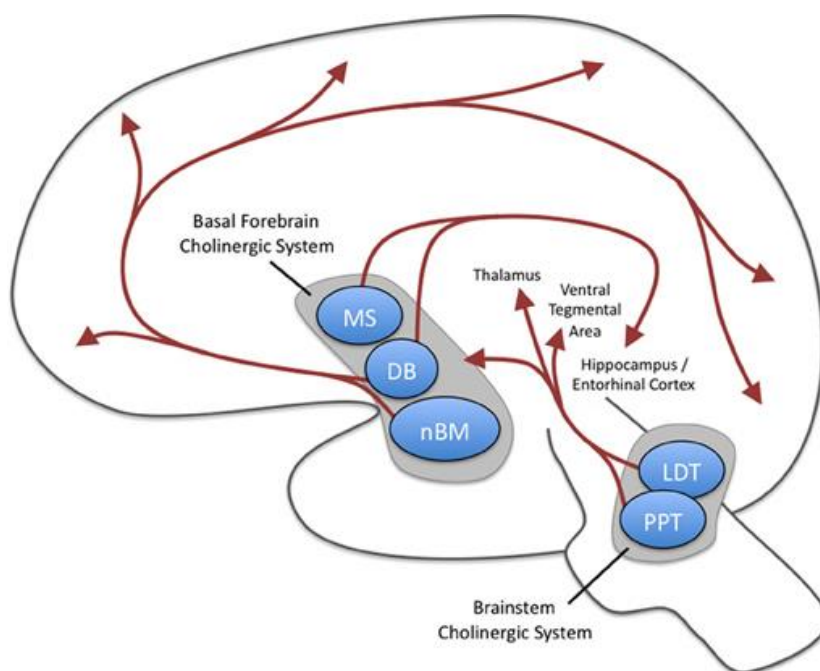
Στον εγκέφαλο η ACh εμπλέκεται σε πολλές κρίσιμες φυσιολογικές διεργασίες όπως η μνήμη, η μάθηση, η προσοχή, οι αισθητηριακές πληροφορίες, καθώς και άλλες. Στην AD πραγματοποιείται εκφυλισμός των χολινεργικών νευρώνων, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της γνωστικής λειτουργίας και την απώλεια της μνήμης (Breijyeh Z. et al., 2020).



Εικόνα 5: Διαδικασία σύνθεσης και μεταφοράς της ακετυλοχολίνης μεταξύ προσυναπτικών και μετασυναπτικών νευρικών τερματικών (Breijyeh Z. et al., 2020).

Η χολινεργική υπόθεση συνιστά μια από τις παλαιότερες υποθέσεις σχετικά με την παθογένεια της AD και βασίζεται στην χολινεργική δυσλειτουργία (Barage S. H. et al., 2015). Τη δεκαετία του 1970, αναφέρθηκε ότι τα νεοφλοιώδη και προσυναπτικά χολινεργικά ελλείμματα σχετίζονται με το ένζυμο ακετυλοχολινεράση της χολίνης, ένζυμο το οποίο όπως προαναφέρθηκε είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της ακετυλοχολίνης και ενέχει ουσιαστικό ρόλο στην γνωστική λειτουργία (Breijyeh Z. et al., 2020).

Έρευνες σε ανθρώπους, οι οποίες αξιολόγησαν τη νευροπαθολογική διάγνωση της AD έχουν δείξει ότι η χολινεργική βλάβη, η οποία εμφανίζεται ήδη από τα ασυμπτωματικά ή πρόδρομα στάδια της νόσου, είναι κυρίως προσυναπτική, παρά μετασυναπτική (Hampel H. et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η χολινεργική απώλεια βασίζεται στον εκφυλισμό των χολινεργικών νευρώνων του βασικού πυρήνα του Meynert (Nucleus Basalis of Meynert, NBM), ο οποίος αποτελεί την πηγή της φλοιώδους χολινεργικής νεύρωσης, καθώς και των αξόνων των εν λόγω νευρώνων, οι οποίοι προβάλλουν στο φλοιό του εγκεφάλου. Ο εκφυλισμός αυτός θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της εναπόθεσης πλακών αμυλοειδούς και NFTs στον NMB, που έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή προφλεγμονωδών συμβάντων σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου θεωρείται ότι είναι πιο ευαίσθητα στον προκαλούμενο από νευροϊνίδια νευροεκφυλισμό, καθώς επίσης και στο σχηματισμό NFTs (Khan S. et al., 2020)(Hampel H. et al., 2018).



Εικόνα 6: Κύριες χολινεργικές προβολές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα εντοπίζονται δύο ομάδες χολινεργικών προβολών το μεγαλοκυτταρικό χολινεργικό σύστημα του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου (Magnocellular basal forebrain cholinergic system) και το χολινεργικό σύστημα του εγκεφαλικού στελέχους (Brainstem cholinergic system). Το μεγαλοκυτταρικό χολινεργικό σύστημα του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου περιλαμβάνει νευρώνες οι οποίοι εντοπίζονται στον έσω διαφραγματικό πυρήνα (Medial Septal Nucleus, MS), στα κατακόρυφα και οριζόντια άκρα της διαγώνιας ζώνης του Broca (Diagonal Band of Broca, DB) και στον βασικό πυρήνα του Meynert (Nucleus Basalis Magnocellularis ή Nucleus Basalis of Meynert, nBM). Τα οριζόντια άκρα της DB και του nBM έχουν εκτεταμένες διάχυτες προβολές στον νεοφλοιό, στην βασεοπλάγια

αμυγδαλή και τον οσφρητικό λοβό (οι δύο τελευταίες προβολές δεν εμφανίζονται στην εικόνα αυτή). Ο MS και το κατακόρυφο άκρο της DB προβάλλουν στον υπόκαμπο και τον ενδορινικό φλοιό. Το χολινεργικό σύστημα του εγκεφαλικού στελέχους περιλαμβάνει τον σκελαιογεφυρικό πυρήνα της καλύπτρας (Pedunculopontine Tegmental Nucleus, PPT) και την πλάγια γεφυρική καλύπτρα (Laterodorsal Pontine Tegmentum, LDT) και διαθέτει προβολές κυρίως στον θάλαμο, αλλά και στην περιοχή του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου (Newman E. et al., 2012).

Πληθώρα ερευνών έχει αποκαλύψει και εδραιώσει εδώ και καιρό την ύπαρξη σχέσης μεταξύ των χολινεργικών ανωμαλιών και της παθολογίας του Αβ, που παρατηρούνται κατά την AD. Έτσι, έχει αναφερθεί ότι η φθίνουσα δραστηριότητα της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης σχετίζεται με τον αυξημένο αριθμό νευριτικών πλακών, που παρατηρούνται στους εγκεφάλους ασθενών με AD. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι οι προσυναπτικοί, αλλά και οι μετασυναπτικοί δείκτες χολινεργικής δραστηριότητας (όπως η ChAT και η AChE) ήταν μειωμένοι σε άτομα, τα οποία δεν έπασχαν από άνοια αλλά στους εγκεφάλους τους εντοπίστηκαν νευριτικές πλάκες. Η μείωση των εν λόγω δεικτών φάνηκε να είναι ακόμα πιο έντονη στην περίπτωση ατόμων, που έπασχαν από άνοια με παθολογικά επιβεβαιωμένη AD. Πειράματα σε ζώα έχουν αποκαλύψει ότι η χολινεργική εξάντληση προάγει την εναπόθεση Αβ και την παθολογία της ταυ με τρόπους, οι οποίοι συμβάλουν στην γνωστική εξασθένηση. Για παράδειγμα, έχουν αναφερθεί εκλεκτικές βλάβες σε χολινεργικούς νευρώνες του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου σε μοντέλα τρωκτικών της AD, οι οποίες σχετίζονται με αυξημένη εναπόθεση Αβ και αυξημένα επίπεδα υπερφωσφορυλιωμένης ταυ στον υπόκαμπο και το φλοιό (Hampel H. et al., 2018)(Orta-Salazar E. et al., 2014).

Το Αβ πιστεύεται ότι αναστέλλει τη χολινεργική νευροδιαβίβαση και προκαλεί ελάττωση της πρόσληψης χολίνης, καθώς και της απελευθέρωσης ACh. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χολινεργική συναπτική απώλεια και ο σχηματισμός ινιδίων αμυλοειδούς σχετίζονται με τη νευροτοξικότητα των ολιγομερών Αβ και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της AChE και του πεπτιδίου Αβ (Breijyeh Z. et al., 2020).

Κατά την AD παρατηρείται μείωση των επιπέδων της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης (ChAT), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη σύνθεση ACh, καθώς επίσης και της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE). Ωστόσο, παρά την συνολική μείωση των επιπέδων της ακετυλοχολινεστεράσης στον εγκέφαλο κατά την AD παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της γύρω από τις πλάκες Αβ. Η AChE πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με τα πεπτίδια Αβ προάγοντας τον σχηματισμό πλακών Αβ (Witzemann V., 2007)(Barage S. H., 2015)(García-Ayllón M. S. et al., 2010)(Khan S. et al., 2020).

Ως μέρος της χολινεργικής βλάβης, οι νικοτινικοί (ιονοτροπικοί) και μουσκαρινικοί (μεταβοτροπικοί) υποδοχείς της ACh που εντοπίζονται στον εγκεφαλικό φλοιό υφίστανται επίσης αλλαγές. Αν και οι περισσότερες μελέτες δείχνουν απώλεια νικοτινικών υποδοχέων στον εγκεφαλικό φλοιό (για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί μείωση των μετασυναπτικών νικοτινικών υποδοχέων στους νευρώνες του φλοιού), ωστόσο μπορεί να υπάρχει εξίσου σημαντική προσυναπτική απώλεια νικοτινικών υποδοχέων, οι οποίοι εντοπίζονται στους προερχόμενους από τον NBM εκφυλισμένους χολινεργικούς άξονες (Hampel H. et al., 2018).

Όσον αφορά τους μουσκαρινικούς υποδοχείς της ACh, οι οποίοι εντοπίζονται στον εγκεφαλικό φλοιό, παρατηρείται ότι κατά την AD οι μουσκαρινικοί υποδοχείς M1 (κυρίως μετασυναπτικοί) δεν είναι μειωμένοι, σε αντίθεση με τους μουσκαρινικούς υποδοχείς M2 (κυρίως προσυναπτικοί), οι οποίοι μειώνονται. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μετασυναπτικοί υποδοχείς M1 του εγκεφαλικού φλοιού μπορεί να είναι δυσλειτουργικοί (Hampel H. et al., 2018). Ως εκ τούτου, τα τροποποιημένα πρότυπα κατανομής νικοτινικών και μουσκαρινικών υποδοχέων στη AD είναι πιθανό να επηρεάσουν πολλές λειτουργίες του

εγκεφαλικού φλοιού και των μεταιχμιακών περιοχών μέσω διαταραχών της συναπτικής φυσιολογίας (Hampel H. et al., 2018).

Το χολινεργικό έλλειμμα μεταβάλλει επίσης τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, μέσω της απώλειας του μεσολαβούμενου από την ACh αγγειοκινητικού ελέγχου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, προκαλώντας εσφαλμένη μεταφορά μεταβολιτών μεταξύ διάμεσου υγρού και εγκεφαλονωτιαίου υγρού και παρεμποδίζοντας την απομάκρυνση των πλακών αμυλοειδούς, επιδεινώνοντας την κατάσταση της νόσου (Khan S. et al., 2020)(Hampel H. et al., 2018). Επιπλέον, παράγοντες όπως το έλλειμμα στην EAA (Excitatory Amino Acid) νευροδιαβίβαση, κατά το οποίο παρατηρείται σημαντική μείωση τόσο της συγκέντρωσης του γλουταμινικού όσο και της πρόσληψης του D-ασπαρτικού σε πολλές φλοιικές περιοχές AD εγκεφάλων, φαίνεται να συμβάλουν στην εξέλιξη της AD. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων της ACh, όπως η σκοπολαμίνη, προκαλεί αμνησία, η οποία μπορεί να αντιστραφεί με την χρήση ενώσεων, οι οποίες προάγουν των σχηματισμό Ach (Breijyeh Z. et al., 2020).

Συνοψίζοντας η χολινεργική υπόθεση βασίζεται σε τρεις έννοιες/γενικές ιδέες (Breijyeh Z. et al., 2020):

1. Μείωση των προσυναπτικών χολινεργικών δεικτών στον φλοιό του εγκεφάλου.
2. Σημαντικό νευροεκφυλισμό του βασικού πυρήνα του Meynert (Nucleus Basalis of Meynert, NBM) του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου, ο οποίος αποτελεί την πηγή της φλοιώδους χολινεργικής νευρώσεως.
3. Στον ρόλο των χολινεργικών ανταγωνιστών στη μείωση της μνήμης συγκριτικά με τους χολινεργικούς αγωνιστές, οι οποίοι έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα.

Επιπρόσθετα, η απώλεια της χολινεργικής λειτουργίας μπορεί να είναι αποτέλεσμα της έλλειψης συγκεκριμένων νευροτροφινών. Οι νευροτροφίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της νευρωνικής λειτουργίας και περιλαμβάνουν τον NGF (Nerve Growth Factor), τον BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), την NT-3 (Neurotrophin-3), την NT-4 ή αλλιώς NT-5 (Neurotrophin-4 ή Neurotrophin-5) και την NT-6 (Neurotrophin-6). Ο NGF παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διατήρηση του αισθητηριακού και συμπαθητικού νευρικού συστήματος, τη λειτουργία των χολινεργικών νευρώνων του κεντρικού νευρικού συστήματος, τη γνωστική λειτουργία, καθώς επίσης και τη μνήμη. Η μείωση των επιπέδων του NGF έχει ως αποτέλεσμα την συρρίκνωση των χολινεργικών νευρώνων και την ελάττωση της πυκνότητας των νευρικών ινών, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της χολινεργικής νευροδιαβίβασης. Επιπρόσθετα, σε AD εγκεφάλους έχει παρατηρηθεί απώλεια του υποδοχέα του NGF, TrKA, στον βασικό πρόσθιο εγκέφαλο και τον φλοιό. Τέλος, σε AD εγκεφάλους έχει αναφερθεί μείωση των επιπέδων του BDNF στον ιππόκαμπο και τον νεοφλοιό (Barage S. H. et al., 2015).

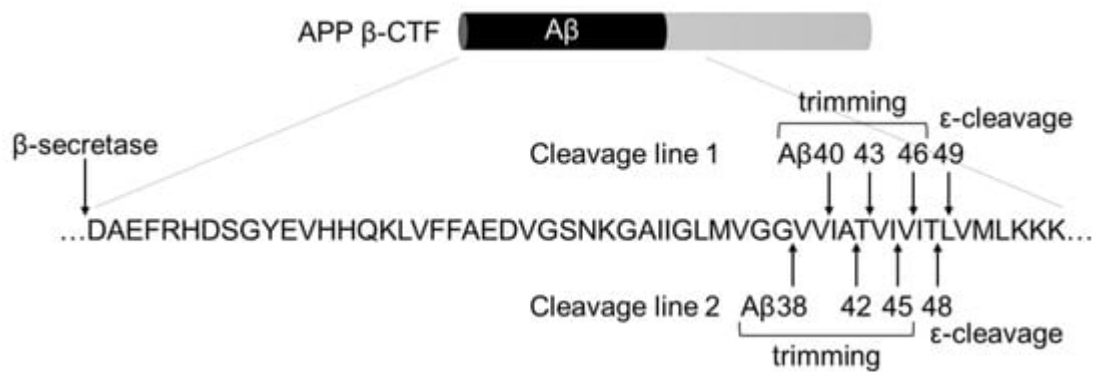
1.5.2. Υπόθεση του β αμυλοειδούς (Αβ)

Για δεκαετίες, ήταν γνωστό ότι η μη φυσιολογική εναπόθεση β-πτυχωτών φύλλων στο κεντρικό νευρικό σύστημα εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με την εμφάνιση άνοιας, οδηγώντας στην υπόθεση του β-αμυλοειδούς (Αβ). Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι οι πλάκες Αβ εναποτίθενται τόσο σε AD εγκεφάλους όσο και σε φυσιολογικούς εγκεφάλους κατά τη διαδικασία της γήρανσης, οδηγώντας στο ερώτημα κατά πόσο η εναπόθεση πλακών Αβ είναι υπεύθυνη για την έναρξη της AD ή όχι; Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί αρκετές εναλλακτικές υποθέσεις για την παθογένεση της μη κληρονομικής μορφής της AD, ωστόσο προς το παρόν η υπόθεση του Αβ παραμένει ο πιο αποδεκτός παθολογικός μηχανισμός για την κληρονομική

μορφή της AD. Η υπόθεση του Αβ προτείνει ότι η διάσπαση του Αβ, το οποίο προέρχεται από την APP (amyloid precursor protein) μέσω της δράσης της β- και γ- σεκρετάσης, μειώνεται με την ηλικία ή κάτω από παθολογικές συνθήκες οδηγώντας στη συσσώρευση πεπτιδίων Αβ (Αβ40 και Αβ42). Η αύξηση της αναλογίας Αβ42/Αβ40 επάγει το σχηματισμό αμυλοειδικών ινιδίων Αβ, με αποτέλεσμα την εμφάνιση νευροτοξικότητας, την επαγωγή της παθολογίας της ται και κατά συνέπεια, την πρόκληση νευρωνικού θανάτου και τον νευροεκφυλισμό. Παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη της AD είναι οι μεταλλάξεις αρκετών γονιδίων όπως εκείνων που κωδικοποιούν την APP, την PSEN-1 και την PSEN-2, οι οποίες έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν τον καταβολισμό και τον αναβολισμό του Αβ, οδηγώντας ταχύτατα στη συσσώρευση του Αβ και την ταχύτατη εξέλιξη του νευροεκφυλισμού (Breijyeh Z. et al., 2020).

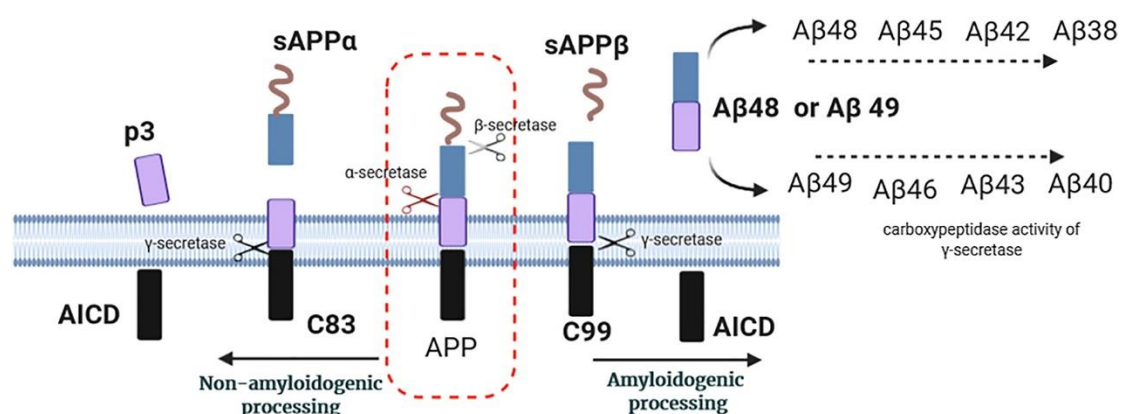
Η ανθρώπινη APP αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1987 από διαφορετικά εργαστήρια. Η APP είναι μία τύπου I διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια μεταφέρεται στο διαμέρισμα Golgi και συγκεκριμένα, στο δίκτυο του trans-Golgi (trans-Golgi network, TGN), όπου αποθηκεύεται σε σταθερή κατάσταση στην μεγαλύτερη συγκέντρωσή της. Το γονίδιο της APP εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21, έτσι τα άτομα τα οποία πάσχουν από το σύνδρομο Down (τρισωμία 21) και διαθέτουν ένα επιπλέον αντίγραφο του χρωμοσώματος 21, και συνεπώς και του γονιδίου της APP, εμφανίζουν EOAD/fAD καθώς σε αυτά παρατηρείται ανάπτυξη πλακών αμυλοειδούς. Το γονίδιο της APP περιέχει 19 εξόνια και εκτείνεται σε περισσότερες από 170 kb. Η APP έχει αρκετές ισομορφές οι οποίες είναι αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος των εξονίων του γονιδίου της APP 1-13, 13a και 14-18 (Serý O. et al., 2013)(Barage S. H. et al., 2015).

Υπάρχουν δύο μονοπάτια πρωτεολυτικής διάσπασης της APP, το αμυλοειδογενές και το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι. Στο αμυλοειδογενές μονοπάτι, η β-σεκρετάση, ή όπως αλλιώς είναι γνωστή η BACE1 (β-APP cleaving enzyme 1), κόβει την APP είτε μεταξύ των αμινοξέων 671/672, είτε μεταξύ των αμινοξέων 681/682 οδηγώντας στη δημιουργία δύο θραυσμάτων, ενός εξωκυττάριου θραύσματος του sAPPβ και ενός διαμεμβρανικού CT (C-terminal) θραύσματος 99 αμινοξικών καταλοίπων του C99 (ή β-secretase derived c-terminal fragment, β-CTF). Στη συνέχεια η γ-σεκρετάση, βασιζόμενη στην ε- θέση διάσπασης (εντοπίζεται κοντά στο όριο της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος), κόβει το C99 θραύσμα στα αμινοξέα 711-713 οδηγώντας στη δημιουργία της AICD (APP intracellular domain) και του πεπτιδίου Αβ48 ή του πεπτιδίου Αβ49. Η γ-σεκρετάση, μέσω της δραστηριότητάς της ως καρβοξυπεπτιδάση, διασπά διαδοχικά το Αβ48 σε Αβ45, Αβ42 και Αβ38, καθώς επίσης και το Αβ49 σε Αβ46, Αβ43 και Αβ40. Οι αναλογίες του Αβ40 προς το σύνολο των Αβ38 και Αβ42 προσδιορίζεται από την αρχική θέση ε-διάσπασης. Το αμυλοειδογενές μονοπάτι οδηγεί στην παραγωγή Αβ μήκους 38-43 αμινοξικών καταλοίπων. Στον εγκέφαλο οι δύο κύριες παραλλαγές του Αβ, που παράγονται είναι το Αβ40 και το Αβ42, με το Αβ40 να εμφανίζεται σε υψηλότερα επίπεδα από το Αβ42 (Barage S. H. et al., 2015)(Amponsah E. A. et al., 2021)(Ulaganathan S. et al., 2023)(Takami M. et al., 2012).



Εικόνα 7: Μοντέλο διάσπασης του APP β-CTF από την γ-σεκρετάση. Η διάσπαση του APP από την β-σεκρετάση οδηγεί στον σχηματισμό δύο θραυσμάτων του sAPPβ και του β-CTF. Το β-CTF στη συνέχεια διασπάται από την γ-σεκρετάση, μέσω ε-διάσπασης, οδηγώντας στην παραγωγή είτε του Aβ49 (1^η γραμμή διάσπασης), είτε του Aβ48 (2^η γραμμή διάσπασης). Στην συνέχεια τα θραύσματα αυτά διασπώνται περαιτέρω στα Aβ46, Aβ43, Aβ40 και στα Aβ45, Aβ42, Aβ38, αντίστοιχα (Suzuki R. et al., 2023).

Στο μη αμυλοειδογενές μονοπάτι, η APP υφίσταται πρώτα τη δράση της α-σεκρετάσης, η οποία οδηγεί στη δημιουργία δύο θραυσμάτων του εξωκυττάριου sAPPα και του διαμεμβρανικού 83 αμινοξικών καταλοίπων CT θραύσματος (C83). Στη συνέχεια, η γ-σεκρετάση κόβει το θραύσμα C38, οδηγώντας στη δημιουργία της AICD (APP intracellular domain) και του πεπτιδίου p3 (Amponsah E. A. et al., 2021). Κατά την AD, το αμυλοειδογενές μονοπάτι πρωτεολυτικής διάσπασης της APP είναι ανοδικά ρυθμισμένο σε σχέση με το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι πρωτεολυτικής διάσπασης της APP, οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγής Aβ40 και/ή Aβ42. Η ανοδική ρύθμιση του αμυλοειδογενούς μονοπατιού της πρωτεολυτικής διάσπασης της APP είναι αποτέλεσμα κυτταρικών διαδικασιών, οι οποίες αυξάνουν την ενεργότητα της β-σεκρετάσης, καθώς επίσης και μεταλλάξεων στο γονίδιο της APP και στο σχετιζόμενο με την γ-σεκρετάση σύμπλεγμα γονιδίων, το οποίο κωδικοποιεί την PSEN1 και PSEN2. Τέλος, εκτός από την πλασματική μεμβράνη, το Aβ είναι δυνατόν να παραχθεί επίσης και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στο δίκτυο του trans-Golgi, στα ενδοσώματα, καθώς επίσης και στα λυσοσώματα. Το εξωκυττάριο Aβ αποτελείται από 90% Aβ40 και 10% Aβ42, ενώ σχεδόν όλο το ενδοκυττάριο Aβ είναι αποκλειστικά Aβ42 (Amponsah E. A. et al., 2021).



Εικόνα 8: Το μη αμυλοειδογενές και το αμυλοειδογενές μονοπάτι πρωτεολυτικής διάσπασης της APP. Στο μη αμυλοειδογενές μονοπάτι, η α-σεκρετάση κόβει το APP οδηγώντας στον σχηματισμό ενός εξωκυττάριου θραύσματος του sAPPα και ενός διαμεμβρανικού θραύσματος του C83. Στην συνέχεια η γ-σεκρετάση κόβει το C83 οδηγώντας στην δημιουργία δύο άλλων θραυσμάτων του p3 και του AICD. Στο αμυλοειδογενές μονοπάτι, η β-σεκρετάση κόβει το APP οδηγώντας στην δημιουργία δύο θραυσμάτων ενός εξωκυττάριου θραύσματος του sAPPβ

και ενός διαμεμβρανικού θραύσματος του C99. Στην συνέχεια, το C99 κόβεται από την γ-σεκρετάση οδηγώντας στην δημιουργία των θραυσμάτων AICD και Aβ48 ή Aβ49. Τα θραύσματα Aβ48 και Aβ49 κόβονται περαιτέρω από την γ-σεκρετάση οδηγώντας στην δημιουργία μικρότερων πεπτιδίων Aβ (Amponsah E. A. et al., 2021).

Τα πεπτίδια Aβ κάτω από φυσιολογικές συνθήκες παράγονται πρωτίστως με τη μορφή μονομερών και διαθέτουν προστατευτικές λειτουργίες για τις συνάψεις. Τα πεπτίδια Aβ αποτελούνται από μία CT υδρόφοβη περιοχή (αμινοξικά κατάλοιπα 29-42). Το Aβ είναι διαλυτό και διαθέτει βραχείς περιοχές β-πτυχωτών φύλλων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, το πεπτίδιο Aβ υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές, οι οποίες οδηγούν στον σχηματισμό δομών πλούσιων σε β-πτυχωτά φύλλα, οι οποίες συσσωματώνονται δημιουργώντας ολιγομερή (διμερή, τριμερή, τετραμερή) πρωτοϊνίδια και αμυλοειδή ινίδια, τα οποία στην συνέχεια συσσωματώνονται επάγοντας τη δημιουργία των γεροντικών πλακών. Το πεπτίδιο Aβ42 είναι πιο επιρρεπές στη συσσωμάτωση σε σχέση με το πεπτίδιο Aβ40 (Amponsah E. A. et al., 2021)(Silva M. V. F. et al., 2019).

Τα συσσωματώματα Aβ ενεργοποιούν παθογόνους σηματοδοτικούς καταρράκτες σε διάφορα κύτταρα του εγκεφάλου, οδηγώντας στην υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau, τον σχηματισμό NFTs στους νευρώνες, την επαγωγή φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, την απώλεια νευρώνων και συνάψεων, καθώς επίσης και τον εκφυλισμό της λευκής ουσίας. Προκειμένου να επιβραδυνθεί ο σχηματισμός γεροντικών πλακών, το Aβ απομακρύνεται από την νευροπύλη [είναι ένας όρος ο οποίος χρησιμοποιείται για να ορίσει το πυκνό δίκτυο λεπτών γλοιακών προβολών, νευρωνικών προβολών (άξονες και δενδρίτες) και ινιδίων στην φαιά ουσία του εγκεφάλου] μέσω διαφόρων μηχανισμών. Τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα φαγοκυτταρώνουν τα πεπτίδια Aβ. Η πρωτεΐνη ApoE δεσμεύεται/προσδένεται στους υποδοχείς RAGE (Receptor for Advanced Glycation and Endproducts) και LRP1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1) διαμεσολαβώντας στην κάθαρση του Aβ μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Τέλος, το Aβ διασπάται στην νευροπύλη από την νεπριλυσίνη (Neprilysin, NEP, μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου η οποία εντοπίζεται κυρίως στον εξωκυττάριο χώρο) και το IDE (Insulin-Degrading Enzyme). Το Aβ συσσωρεύεται, όταν η εναπόθεση Aβ στον εγκέφαλο πραγματοποιείται ταχύτερα από την κάθαρση αυτού (Amponsah E. A. et al., 2021)(Silva M. V. F. et al., 2019)(Lorenzi D. D. et al., 2023)(Guttmann R. P. et al., 2011).

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου οι εναποθέσεις του πεπτιδίου Aβ επάγει τον σχηματισμό NFTs από την υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, έχουν προταθεί τέσσερις βασικοί μηχανισμοί (Silva M. V. F. et al., 2019).

1. Το πεπτίδιο Aβ προάγει την ενεργοποίηση συγκεκριμένων κινασών, όπως η GSK3β, οι οποίες καταλύουν την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau, οδηγώντας σε διαμορφωτικές αλλαγές και τον σχηματισμό των NFTs.
2. Η νευροφλεγμονή, η οποία προκαλείται από τις εναποθέσεις του πεπτιδίου Aβ οδηγεί στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυττοκινών, οι οποίες διεγείρουν την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau.
3. Μείωση της ικανότητας διάσπασης της πρωτεΐνης tau από το πρωτεάσωμα, σε μία διαδικασία η οποία προκαλείται από το πεπτίδιο Aβ.
4. Έλλειψη της αξονικής μεταφοράς, η οποία προάγεται από το πεπτίδιο Aβ οδηγεί σε ανεπαρκή εντοπισμό της πρωτεΐνης tau και του mRNA της, οδηγώντας σε υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau και συσσωμάτωση αυτής σε NFTs.

Εκτός των προαναφερθέντων, σημαντικό ρόλο στην υπόθεση του Αβ φαίνεται να παίζουν τα νευροπεπτίδια. Τα νευροπεπτίδια είναι νευρωνικά σηματοδοτικά μόρια, τα οποία δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα ως ορμόνες-μεταφορείς μηνυμάτων, νευροδιαβιβαστές ή ως νευροτροποποιητές. Τα νευροπεπτίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στις γνωστικές και συμπεριφορικές λειτουργίες. Μεταξύ αυτών, νευροπεπτίδια όπως η CRH (Corticotrophin-releasing Hormone), η Αγγιοτενσίνη II, η Σωματοστατίνη και το Νευροπεπτίδιο Υ επηρεάζουν την επεξεργασία της APP (Barage S. H. et al., 2015).

CRH (Corticotrophin-releasing Hormone)

Η CRH είναι ένα πεπτίδιο, το οποίο συνίσταται από 41 αμινοξέα. Διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της απόκρισης στο στρες επηρεάζοντας τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis, HPA Axis). Η CRH ασκεί την δράση της μέσω των υποδοχέων CRH-1 και CRH-2. Ο υποδοχέας CRH-1 κατανέμεται σε ολόκληρο τον εγκέφαλο, σε αντίθεση με τον υποδοχέα CRH-2, ο οποίος μπορεί να εμφανίζεται σε δύο παραλλαγές (με βάση το εναλλακτικό μάτισμα που λαμβάνει χώρα στο γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί τον εν λόγω υποδοχέα) τον CRH-2α, ο οποίος εκφράζεται στον εγκέφαλο, και τον CRH-2β, ο οποίος εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα στην καρδιά και τους σκελετικούς μύες. Έχει βρεθεί ότι ο υποδοχέας CRH-1 που εντοπίζεται στον ιππόκαμπο μεσολαβεί στη βελτίωση της μάθησης που προκαλείται από το στρες, σε αντίθεση με τον υποδοχέα CRH-2 του πλάγιου εμβόλιμου διαφράγματος ο οποίος μπορεί να βλάψει την διαδικασία της μάθησης. Επιπρόσθετα, έρευνες έχουν δείξει ότι η CRH του εγκεφαλονωτιαίου υγρού είναι μειωμένη σε ασθενείς με AD σε σχέση με υγιείς μάρτυρες ελέγχου του ίδιου φύλου και της ίδιας ηλικίας. Το ενδογενές νευροπεπτίδιο CRH διαθέτει νευροπροστατευτική δράση για τους νευρώνες οι οποίοι εκφράζουν τον υποδοχέα CRH-1 έναντι του οξειδωτικού κυτταρικού θανάτου. Αυτή η νευροπροστατευτική δράση συνοδεύεται από ενισχυμένη απελευθέρωση sAPPα σε clonal cells, καθώς επίσης και σε πρωτογενείς παρεγκεφαλιδικούς νευρώνες, με τρόπο εξαρτώμενο από τον υποδοχέα CRH-1, ο οποίος διαθέτει/ασκεί τροφική επίδραση για τα κύτταρα. Τα επίπεδα της CRH μπορεί να παίζουν ρόλο στην ρύθμιση αυξημένης έκφρασης ή δραστηριότητας της α-σεκρετάσης, ενώ καταστέλλουν την έκφραση ή την δραστηριότητα της β-σεκρετάσης. Συνεπώς, η CRH φαίνεται να ασκεί νευροπροστατευτικό ρόλο στην AD (Barage S. H. et al., 2015)(Lezoualc’h F. et al., 2000).

Αγγιοτενσίνη II

Η Αγγιοτενσίνη II παράγεται από την Αγγιοτενσίνη I (παράγεται από τη διάσπαση του Αγγιοτενσινογόνου από την Ρενίνη) μέσω της δράσης του Μετατρεπτικού Ενζύμου της Αγγιοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme, ACE). Η Αγγιοτενσίνη II ασκεί εύρος δράσης στην καρδιά, τους νεφρούς, το αγγειακό σύστημα, καθώς και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές συνθήκες. Η Αγγιοτενσίνη II ασκεί την δράση της μέσω δύο υποδοχέων του υποδοχέα AT1 και του υποδοχέα AT2. Η Αγγιοτενσίνη II φαίνεται να εμπλέκεται και στην AD. Πιο συγκεκριμένα, η πολύ μεγάλη/υπερβολική συγκέντρωση του εν λόγω νευροπεπτιδίου συνδέεται με την αύξηση της αρτηριακής πίεσης, την ενίσχυση της φλεγμονής του εγκεφάλου και όλους τους αναγνωρισμένους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της AD. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι οι ανταγωνιστές του υποδοχέα AT1 αναστέλλουν τέτοιες διαδικασίες. ICV (intracerebroventricular) χορήγηση Αγγιοτενσίνης II σε Sprague Dawley επίμυες οδηγεί σε σημαντική μείωση της παραγωγής Αβ, καθώς επίσης και σε σημαντική μείωση του mRNA και των επιπέδων της πρωτεΐνης β-σεκρετάσης. Το προαναφερθέν, καταδεικνύει τον κεντρικό ρόλο που κατέχει η Αγγιοτενσίνη II

στη διαδικασία της αμυλοειδογένεσης μέσω της ρύθμισης διαφόρων συστατικών του μονοπατιού επεξεργασίας της APP (Barage S. H. et al., 2015).

Σωματοστατίνη

Η Σωματοστατίνη (Somatostatin, SST) ή όπως αλλιώς είναι γνωστή SRIF (Somatotropin Release Inhibiting Factor) είναι ένα τετραπεπτίδιο, το οποίο εντοπίζεται σε δύο μορφές, την Σωματοστατίνη-14 (υποθαλαμικό πεπτίδιο το οποίο αποτελείται από 14 αμινοξικά κατάλοιπα και το οποίο έχει αναγνωριστεί ως αναστολέας της απελευθέρωσης/έκκρισης της αυξητικής ορμόνης και το οποίο ονομάστηκε παράγοντας αναστολής της Αυξητικής ορμόνης ή Σωματοστατίνη) και την Σωματοστατίνη-28 (αμινοτελικά εκτεταμένη μορφή της Σωματοστατίνης, η οποία αποτελείται από 28 αμινοξικά κατάλοιπα), οι οποίες κατανέμονται σε ολόκληρο το σώμα και ιδιαίτερα στον νευρικό ιστό του φλοιού, του υποθαλάμου, του εγκεφαλικού στελέχους, καθώς επίσης και του νωτιαίου μυελού. Η Σωματοστατίνη ασκεί ανασταλτική δράση σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, ενεργώντας ως μια κλασική ενδοκρινική ορμόνη, ως τοπικός (παρακρινικός) ρυθμιστής ή ως νευροδιαβιβαστής. Η δράση της ασκείται μέσω ενός συζευγμένου με πρωτεΐνη G υποδοχέα, ο οποίος διαθέτει πέντε διαφορετικούς υποτύπους SSTR1-5 (Somatostatin receptors 1-5). Έχει αναφερθεί ότι η Σωματοστατίνη επηρεάζει τις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης, ενώ τα επίπεδά της έχουν βρεθεί να είναι μειωμένα στον εγκέφαλο, αλλά και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με AD. Επιπρόσθετα, σε εγκεφάλους ασθενών με AD έχει βρεθεί, μετά θάνατον, ότι η περιεκτικότητα του SRIF ήταν σημαντικά μειωμένη στον μετωπιαίο φλοιό. Τέλος, η γενετική ανεπάρκεια της Σωματοστατίνης έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της δράσης και του εντοπισμού της νεπριλυσίνης του υποκάμπτου, καθώς επίσης και την αύξηση της ποσότητας του πεπτιδίου Αβ στον AD εγκέφαλο. Συνεπώς, η αύξηση της συγκέντρωσης της Σωματοστατίνης ή η χορήγηση αγωνιστών του υποδοχέα της Σωματοστατίνης στον εγκέφαλο μπορεί να συμβάλει στην κάθαρση του πεπτιδίου Αβ μέσω της ρύθμισης της νεπριλυσίνης στον AD εγκέφαλο (Barage S. H. et al., 2015)(Assan R., 1976)(Martinez V., 2013).

Νευροπεπτίδιο Υ

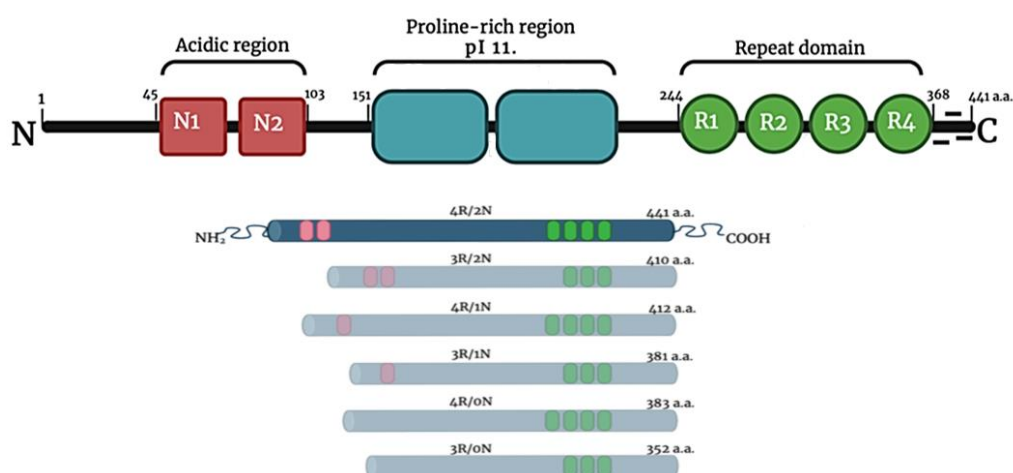
Το Νευροπεπτίδιο Υ (Neuropeptide Y, NPY) είναι ένα πεπτίδιο 36 αμινοξικών καταλοίπων το οποίο εκφράζεται ευρέως σε ολόκληρο το κεντρικό αλλά και το περιφερικό νευρικό σύστημα, όπου ασκεί μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες. Οι δράσεις του NPY διαμεσολαβούνται από τουλάχιστον τέσσερις υποτύπους συζευγμένων με πρωτεΐνη G υποδοχέων τους Y1, Y2, Y4 και Y5, με τους υποδοχείς Y1 και Y2 να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη έκφρασή τους στον εγκέφαλο, ενώ επίσης σε αυτόν εντοπίζονται σε χαμηλότερα επίπεδα και οι υποδοχείς Y4 και Y5. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα το Νευροπεπτίδιο Υ εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η προαγωγή της σίτισης, η αγχώλυση, η ενεργειακή ομοιόσταση και η ρύθμιση της απελευθέρωσης μιας ποικιλίας ορμονών. Στο περιφερικό νευρικό σύστημα, το εν λόγω πεπτίδιο αποθηκεύεται και απελευθερώνεται μαζί με την νοραδρεναλίνη και ασκεί αρκετές καρδιαγγειακές δράσεις συμπεριλαμβανομένων της αγγειοσυστολής και της ρύθμισης της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών. Εκτός από την συμμετοχή του σε φυσιολογικές λειτουργίες είναι γνωστό ότι ενέχει σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως το άγχος, ο χρόνιος πόνος και η νευροεκφυλιστική διαταραχή. Τα επίπεδα του Νευροπεπτιδίου Υ έχουν βρεθεί να είναι μειωμένα σε ασθενείς με AD, ενώ επιπρόσθετα έχει αναφερθεί μείωση της πυκνότητας του υποδοχέα του Νευροπεπτιδίου Υ στον κροταφικό φλοιό και τον υπόκαμπο κατά την AD. Η νεπριλυσίνη διασπά το Νευροπεπτίδιο Υ σε CTFs (C-terminal fragments) τα οποία προστατεύουν τα ανθρώπινα νευρικά κύτταρα από τις

νευροτοξικές επιδράσεις του Αβ (Barage S. H. et al., 2015)(Malmström R. E., 2002)(Enman N. M. et al., 2015).

1.5.3. Υπόθεση της πρωτεΐνης tau (Microtubule-Associated Protein tau, MAPT)

Οι πρωτεΐνες tau εντοπίζονται κυρίως στους νευρώνες και ανήκουν στην οικογένεια των σχετιζόμενων με τους μικροσωληνίσκους πρωτεϊνών. Στον άνθρωπο, το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη tau (MAPT gene) εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος/βραχίονα του χρωμοσώματος 17 και αποτελείται από 15 εξόνια. Τα εξόνια 2, 3 και 10 υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία 6 ισομορφών της πρωτεΐνης tau (Serý O. et al., 2013)(Barage S. H. et al., 2015).

Η πρωτεΐνη tau διαθέτει μια περιοχή δέσμευσης μικροσωληνίσκων (Microtubule Binding Domain, MBD) η οποία αποτελείται από τρεις ή τέσσερις εξαιρετικά διατηρημένες επαναλήψεις 18 αμινοξικών καταλοίπων τα οποία εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό (C-terminal) μισό της πρωτεΐνης. Η περιοχή αυτή της πρωτεΐνης tau φαίνεται να εμπλέκεται στον πολυμερισμό και τη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. Το αμινοτελικό άκρο (N-terminal) της πρωτεΐνης tau αποτελείται από υψηλά (highly) όξινα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία ακολουθούνται από μία βασική περιοχή πλούσια σε προλίνη, η οποία συνήθως καλείται περιοχή προσβολής. Η περιοχή προσβολής έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά τόσο με τα στοιχεία του κυτταροσκελετού, όσο και με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (Serý O. et al., 2013)(Barage S. H. et al., 2015).



Εικόνα 9: Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η δομή της μεγαλύτερης ισομορφής της πρωτεΐνης tau η οποία εκφράζεται στον ενήλικο ανθρώπινο εγκέφαλο. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το όξινο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, με μπλε χρώμα απεικονίζεται η περιοχή εκείνη του μορίου η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης και με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η περιοχή δέσμευσης μικροσωληνίσκων. Στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζονται οι δομές των έξι διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης tau, οι οποίες εκφράζονται στον ανθρώπινο ενήλικο εγκέφαλο (τροποποιημένη από Gil L. et al., 2021).

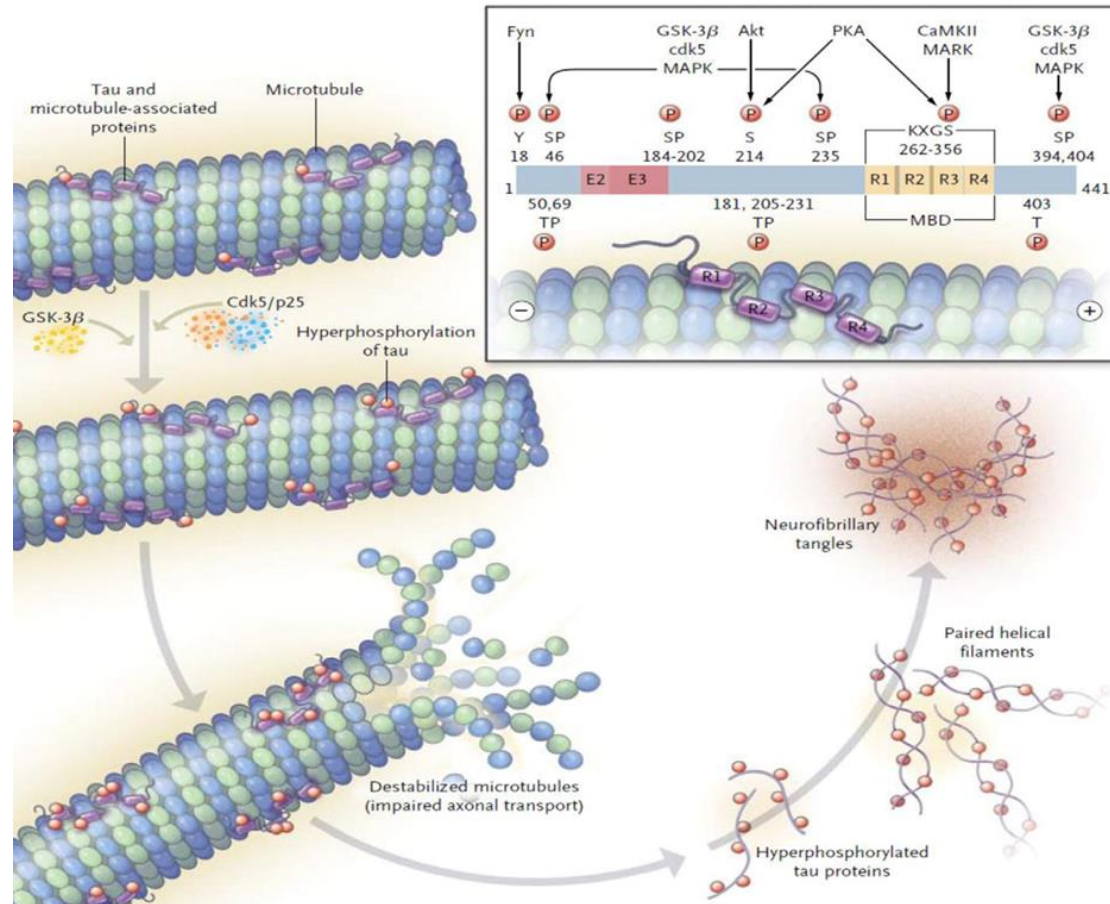
Η φυσιολογική πρωτεΐνη tau ενέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων και στην σταθεροποίηση του δικτύου των νευρωνικών μικροσωληνίσκων. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη tau προάγει την ανάπτυξη των νευριτών (αξόνων και δενδριτών) και τις αλληλεπιδράσεις με την μεμβράνη, ενώ επιπρόσθετα διευκολύνει την αγκύρωση των

ενζύμων και την αξονική μεταφορά των οργανιδίων στα νευρικά τερματικά. Η σύνδεση και συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων ρυθμίζεται μέσω της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης tau. Η ικανότητα σύνδεσης των μικροσωληνίσκων με την πρωτεΐνη tau ρυθμίζεται μεταμεταφραστικά μέσω της ρύθμισης της φωσφορυλίωσης σερίνης/θρεονίνης. Η περιοχή δέσμευσης μικροσωληνίσκων (MBD) της πρωτεΐνης tau αποτελείται από τέσσερεις επαναλήψεις αλληλουχιών (R1-R4) σερίνης (S) και θρεονίνης (T) οι οποίες ακολουθούνται από προλίνη (P). Αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα υπερφωσφορυλιώνονται από την GSK-3β (Glycogen synthase kinase-3β), την cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) και την υπομονάδα ενεργοποίησης της p25 ή την MAPK (Mitogen-activated protein kinase). Ομοίως, κινάσες (nonproline directed) οι οποίες δεν φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα προλίνης, όπως η Akt, η Fyn, η PKA (Protein kinase A), η CaMKII (Calcium-calmodulin protein kinase 2) και η MAPK (Microtubule affinity regulating kinases) εμπλέκονται επίσης στην υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau. Η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau οδηγεί σε μείωση της συγγένειας της εν λόγω πρωτεΐνης προς τους μικροσωληνίσκους (Serý O. et al., 2013)(Barage S. H. et al., 2015).

Υπό παθολογικές συνθήκες, έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων των υπερφωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών tau στο κυτταρόσωμα. Οι υπερφωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες tau έχουν την ικανότητα να πολυμερίζονται, καθώς επίσης και να προσελκύουν στα πολυμερή αυτά και φυσιολογικές πρωτεΐνες tau, και να σχηματίζουν ζευγαρωμένα ελικοειδή νημάτια (Paired Helical Filaments, PHF) και ευθεία νημάτια (Straight Filaments, SF) τα οποία αναφέρονται ως νευροϊνιδικά πλέγματα/κουβάρια/μπερδέματα (neurofibrillary tangles). Συσώρευση της ασυνήθιστα υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau δεν εντοπίζεται μόνο στο νευροϊνιδικά πλέγματα/κουβάρια/μπερδέματα, αλλά και στο κυτταρόπλασμα των νευρικών κυττάρων του εγκεφάλου, κατά την AD. Η απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας της tau, δηλαδή η απώλεια της ικανότητάς της να συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους, οδηγεί σε παθολογική διαταραχή των δομικών και ρυθμιστικών λειτουργιών του κυτταροσκελετού. Το προαναφερθέν έχει ως αποτέλεσμα την διατάραξη των φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών των νευρώνων, όπως η διατήρηση της κατάλληλης μορφολογίας των νευρικών κυττάρων και η αναστολή της αξονικής μεταφοράς, οδηγώντας σε συναπτική δυσλειτουργία και νευροεκφυλισμό. Μάλιστα, η αναστολή της αξονικής μεταφοράς φαίνεται να οδηγεί σε συσώρευση της APP στο κυτταρικό σώμα, ενώ επίσης φαίνεται να ευθύνεται για την πρόκληση οξειδωτικού στρες λόγω της εξασθενημένης μεταφοράς οργανιδίων όπως τα μιτοχόνδρια (Serý O. et al., 2013)(Barage S. H. et al., 2015).

Έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη tau εντοπίζεται εκτός των άλλων και στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Φαίνεται ότι, η διακίνηση και η πυκνότητα των μιτοχονδρίων σε υποκυτταρικές τοποθεσίες (συμπεριλαμβανομένων των συνάψεων) βάση των ενεργειακών απαιτήσεων και των απαιτήσεων για προσωρινή αποθήκευση του Ca^{2+} (Ca^{2+} buffering) των περιοχών αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την σωστή λειτουργία των νευρώνων. Έτσι, η κατανομή των μιτοχονδρίων στους άξονες και τους δενδρίτες των νευρώνων συσχετίζεται στενά με την προβλεπόμενη χρήση ενέργειας των περιοχών αυτών, ενώ η διακίνησή τους προς τις περιοχές αυτές είναι ταχύτατη. Η συναπτική δραστηριότητα είναι εκείνη η οποία ρυθμίζει την κινητικότητα και την μορφολογία των μιτοχονδρίων, ενώ επιπρόσθετα ελέγχει την κατανομή τους στους δενδρίτες και την «στρατολόγησή» τους στην βάση των δενδριτικών ακάνθων (dendritic spines). Αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης tau έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της διακίνησης των μιτοχονδρίων καθώς και άλλων οργανιδίων προς το + άκρο (εκτός του κυτταρικού κέντρου/σώματος) από την πρωτεΐνη μοριακό κινητήρα κινεσίνη. Έτσι στην περίπτωση αυτή, φαίνεται να κυριαρχεί η κατευθυνόμενη προς το – άκρο (προς το κέντρο

του κυττάρου) των οργανιδίων με την βοήθεια ενός κινητήρα που ομοιάζει με δυνεΐνη (dynein-like motor)(Serý O. et al., 2013)(Barage S. H. et al., 2015).



Εικόνα 10: Στο πάνω δεξιό μέρος της εικόνας απεικονίζεται η δομή της περιοχής δέσμευσης των μικροσωληνίσκων (MTBD) της πρωτεΐνης tau, καθώς επίσης και οι θέσεις φωσφορυλίωσης της tau. Η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau από την GSK-3β και την cdk5 οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων η οποία προκαλείται λόγω της αποκόλλησης των πρωτεϊνών tau από αυτούς και την αυτοσυσσωμάτωση αυτών σε PHF (Paired Helical Filaments)(Barage S. H. et al., 2015).

1.5.4. Μιτοχονδριακή υπόθεση

Τα μιτοχόνδρια συντίθενται κυρίως στο κυτταρικό σώμα των νευρώνων και στην συνέχεια μεταφέρονται στους άξονες και τους δενδρίτες, όπου παρέχουν ενέργεια για την επιτέλεση αρκετών συναπτικών λειτουργιών συμπεριλαμβανομένων της συναπτική διαβίβασης, την συναπτικής έκφυσης (outgrowth) και τον σχηματισμό των συναπτικών κυστιδίων. Σε περίπτωση που τα μιτοχόνδρια τα οποία εντοπίζονται στο κυτταρικό σώμα των νευρώνων καταστραφούν λόγω τοξικών προσβολών, της γήρανσης ή λόγω του Αβ και της φυσφορυλιωμένης tau, τότε όταν αυτά μεταφερθούν στα συναπτικά τερματικά δεν θα είναι σε θέση να παρέχουν την ενέργεια που απαιτείται, με αποτέλεσμα να προκαλείται συναπτικός εκφυλισμός (John A. et al., 2021).

Τα συναπτικά τερματικά θεωρούνται περιοχές υψηλής ενεργειακής ζήτησης, καθώς η συναπτική διαβίβαση απαιτεί υψηλά επίπεδα ATP προκειμένου να επιτελεστεί η εξωκυττάρωση των νευροδιαβιβαστών, καθώς επίσης και η ενίσχυση (potentiation) της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή. Επιπλέον, η ύπαρξη των μιτοχονδρίων στα συναπτικά τερματικά είναι απαραίτητη για την δέσμευση και απελευθέρωση Ca^{2+} κατά την μετατετανική ενίσχυση (Post-Tetanic Potentiation, PTP, αύξηση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών μετά από μια σύντομη, υψηλής συχνότητας σειρά δυναμικών ενέργειας). Συνεπώς, η αυξημένη μεταφορά υγείων μιτοχονδρίων στα συναπτικά τερματικά κρίνεται ιδιαίτερα απαραίτητη (John A. et al., 2021)(Powell C. M. et al., 2008).

Το Αβ συσσωρεύεται στα συναπτικά τερματικά βλάπτοντας την συναπτική λειτουργία. Επιπρόσθετα, το Αβ έχει την ικανότητα να εισέρχεται εντός των συναπτικών μιτοχονδρίων, προκαλώντας βλάβες σε αυτά. Η βλάβη αυτή φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στα συναπτικά μιτοχόνδρια σε σχέση με τα μιτοχόνδρια τα οποία εντοπίζονται στο κυτταρικό σώμα του νευρώνα. Τα κατεστραμμένα συναπτικά μιτοχόνδρια δεν είναι σε θέση να παρέχουν τα υψηλά ποσά ενέργειας που απαιτούνται στις συνάψεις, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε εξασθένηση της νευροδιαβίβασης και τελικά σε γνωστική βλάβη (John A. et al., 2021).

Η παρουσία του Αβ οδηγεί σε απορρύθμιση των μιτοχονδρίων, ιδιαίτερα εκείνων που εντοπίζονται στις νευρικές συνάψεις. Το Αβ φαίνεται ότι συνδέεται με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη μιτοχονδριακής σχάσης Drp1 (Dynamin Related Protein 1), η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), καθώς και με τις πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής μήτρας όπως η συνδεδεμένη με το Αβ αλκοολική αφυδρογονάση (Αβ-binding alcohol dehydrogenase) και η CypD (Cyclophilin D). Αυτές οι μη φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις έχουν ως αποτέλεσμα την υπερβολική παραγωγή ελεύθερων ριζών, ενισχύουν την θραύση των μιτοχονδρίων και επηρεάζουν την βιογένεση των μιτοχονδρίων, επηρεάζοντας τελικά την λειτουργία τους. Επιπρόσθετα, το Αβ αυξάνει την ικανότητα του ασβεστίου να εισέρχεται εντός του κυττάρου το οποίο αναγκάζει τα μιτοχόνδρια, έναν από τους ρυθμιστές ασβεστίου του κυττάρου, να προσλαμβάνουν επίσης ασβέστιο (John A. et al., 2021).

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην υγεία των κυττάρων, ειδικά λόγω του αυστηρού τρόπου με τον οποίο ρυθμίζουν τα επίπεδα του ασβεστίου. Στο προσυναπτικό άκρο, η συγκέντρωση ασβεστίου επάγει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από τα συναπτικά κυστίδια στα οποία είναι αποθηκευμένοι. Τα μιτοχόνδρια απομακρύνοντας το ασβέστιο από το προσυναπτικό άκρο, σταματούν την μετάδοση σήματος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η εισροή ασβεστίου θα πρέπει να ισούται με την εκροή αυτού, οδηγώντας σε χαμηλά επίπεδα ελεύθερου ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Η διατήρηση της

ισορροπίας (ομοιόσταση) των κυτταροπλασματικών επιπέδων του ασβεστίου θεωρείται ότι είναι ζωτικής σημασίας. Η ισορροπία αυτή διατηρείται με την βοήθεια ρυθμιστικών διαλυμάτων ασβεστίου (calcium buffers), αισθητήρων ασβεστίου και μεταφορέων ασβεστίου. Η εισροή ασβεστίου εντός των μιτοχονδρίων γίνεται με τρόπο εξαρτώμενο από την ενέργεια, ωστόσο η περίσσεια ασβεστίου στην μιτοχονδριακή μήτρα μπορεί να βλάψει τα μιτοχόνδρια (John A. et al., 2021).

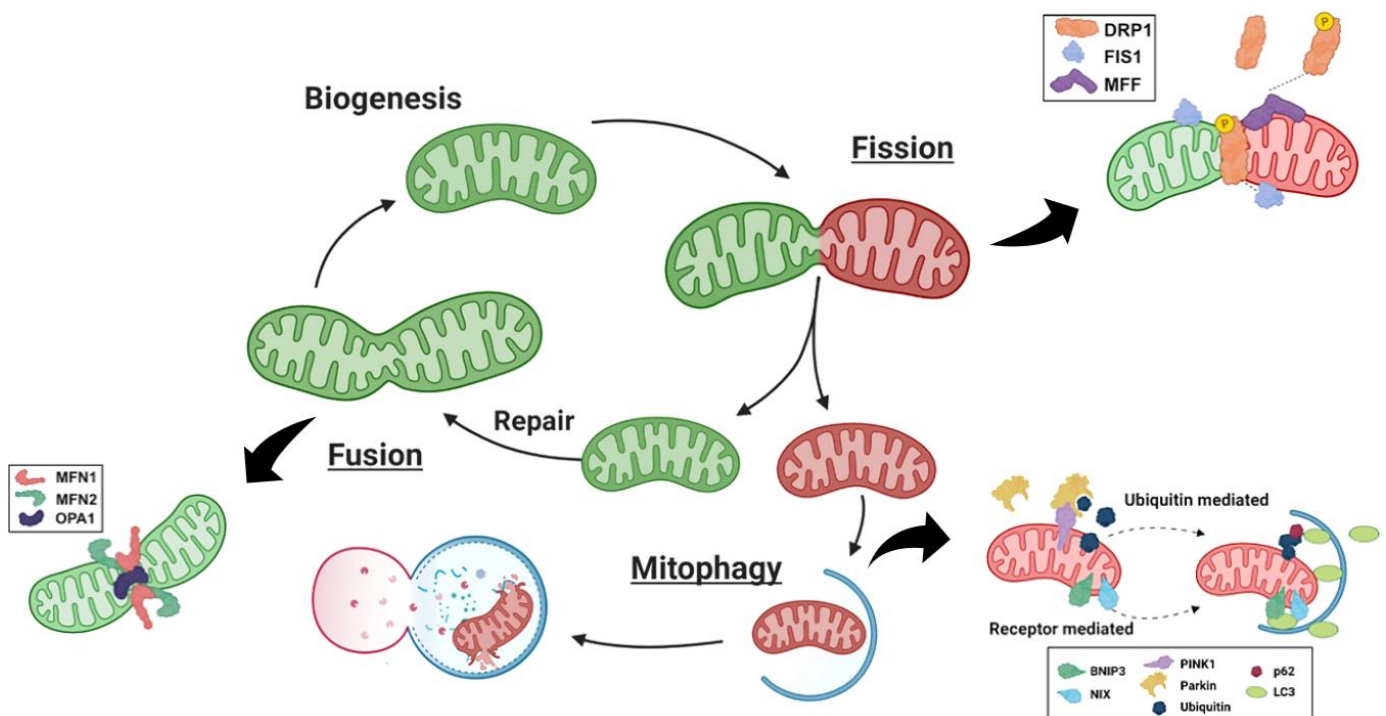
Η απόπτωση μπορεί να προκληθεί επίσης με την μεσολάβηση των μιτοχονδρίων. Εάν ένα κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση «δυσφορίας» ή το DNA έχει υποστεί βλάβη, τα μιτοχόνδρια απελευθερώνουν το κυτόχρωμα C επάγοντας την έναρξη της απόπτωσης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η μιτοχονδριακή «δυσφορία» αποτρέπει από το να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο, ωστόσο κατά την AD η μιτοχονδριακή «δυσφορία» μπορεί να μην είναι δυνατόν να αποτραπεί οδηγώντας στον θάνατο του κυττάρου (John A. et al., 2021).

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μία μεταβολική διαδικασία η οποία επιτελείται στα μιτοχόνδρια και η οποία οδηγεί στην δημιουργία βαθμίδωσης πρωτονίων με τελικό σκοπό την παραγωγή ATP, δηλαδή ενέργειας. Τα τρία βασικά μεταβολικά ένζυμα τα οποία ενεργοποιούνται από το ασβέστιο και τα οποία συμμετέχουν στην παραπάνω διαδικασία είναι η πυροσταφυλική αφυδρογονάση, η α-κετογλουταρική αφυδρογονάση και η ισοκιτρική αφυδρογονάση. Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση ενεργοποιείται μέσω εξαρτώμενης από το ασβέστιο αποφωσφορυλίωσης, ενώ η ενεργοποίηση των άλλων δύο μεταβολικών ενζύμων πραγματοποιείται μέσω δέσμευσης ασβεστίου (John A. et al., 2021).

Το VDAC1 (Voltage-Dependent Anion Channel 1) είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Είναι μία ζωτικής σημασίας πρωτεΐνη η οποία είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, ούτως ώστε τα μιτοχόνδρια να είναι ικανά να τροφοδοτούν με ενέργεια τις διάφορες κυτταρικές βιοδραστηριότητες. Το VDAC1 εμπλέκεται στην ρύθμιση της παραγωγής ενέργειας, στο μιτοχονδριακό οξειδωτικό στρες, στην μεταφορά Ca^{2+} , στον μεταβολισμό ουσιών, την απόπτωση, την μιτοχονδριακή αυτοφαγία (μιτοφαγία, mitophagy), καθώς και σε πολλές άλλες λειτουργίες (Hu H. et al., 2022). Όταν τα υψηλά επίπεδα Αβ αλληλεπιδρούν με το VDAC1 οδηγούν σε παύση της μεταφοράς μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μιτοχονδριακή δυσλειτουργία η οποία οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής ελεύθερων ριζών. Η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και κάθαρσης των ελεύθερων ριζών ευθύνεται για την δημιουργία οξειδωτικού στρες δείκτης του οποίου είναι η παραγωγή 8-υδροξουανοσίνης (η οποία παράγεται όταν οι ελεύθερες ρίζες «επιτίθενται» στις βάσεις γουανίνης του DNA και έχει την ικανότητα να συνδέεται με την Θυμίνη αντί της κυτοσίνης, και για αυτό το λόγο θεωρείται γενικά ως βιοδείκτης μεταλλαξιγένεσης ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες). Αυτή η αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών συνιστά όχι μόνο αυξημένη πηγή στρες για το σώμα, αλλά βλάπτει και τα ίδια τα μιτοχόνδρια. Το μιτοχονδριακό DNA εντοπίζεται πολύ κοντά στην θέση παραγωγής των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxidative Species, ROS), επομένως καταστρέφεται με μεγαλύτερη ευκολία. Σε αυτό συμβάλει επίσης το γεγονός ότι το μιτοχονδριακό DNA δεν διαθέτει ιστόνες, αλλά ούτε κάποιον επιδιορθωτικό μηχανισμό. Αυτή η μορφή συναπτικού οξειδωτικού στρες είναι χαρακτηριστική της AD (John A. et al., 2021)(Ock C. Y. et al., 2012).

1.5.4.1. Μιτοχονδριακή θραύση στην AD

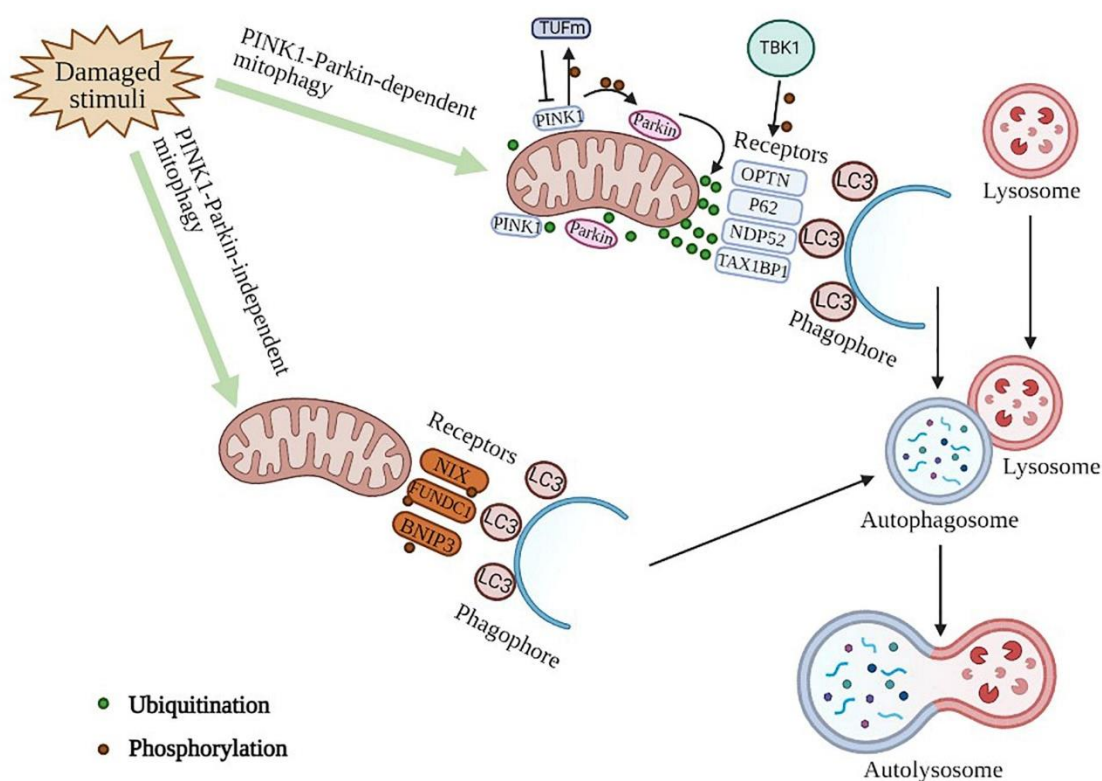
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα μιτοχόνδρια τα οποία εντοπίζονται εντός των κυττάρων διαίρουνται και συγχωνεύονται αντανανκλώντας τις μεταβολικές απαιτήσεις του κυττάρου. Τα μιτοχόνδρια μπορούν επίσης να οργανωθούν σε σωληνωτά δίκτυα ή να διααιρεθούν/χωριστούν σε ραβδοειδείς δομές προκειμένου να εισέλθουν σε στενές περιοχές των νευρώνων. Η σχάση ή η σύντηξη των μιτοχονδρίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό του κυττάρου, όπως η παραγωγή ελεύθερων ριζών, το οξειδωτικό στρες ή η ιοντική ομοιόσταση. Η σύντηξη, η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια τριών GTPασών, της mitofusin 1, της mitofusin 2 και της πρωτεΐνης οπτικής ατροφίας 1 (optic atrophy protein 1), επιτρέπει σε ένα μιτοχόνδριο να ανταλλάξει το περιεχόμενό του με ένα άλλο. Η σχάση, η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια της σχετιζόμενης με την δυναμίνη πρωτεΐνη 1 (Dynamin-related protein 1, Drp-1) και της Fis1 (Mitochondrial Fission Protein 1), προκαλεί την διάσπαση των μιτοχονδρίων. Οι Drp-1 και Fis1 διαμορφώνουν μια δακτυλιοειδή δομή η οποία συσφίγγει τα μιτοχόνδρια μέχρι αυτά να χωριστούν στα δύο. Έχει βρεθεί ότι η Drp1 αλληλεπιδρά τόσο με το Αβ όσο και με την φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau. Όταν η Drp1 αλληλεπιδρά με το Αβ προκαλεί μείωση της σύντηξης των μιτοχονδρίων και αύξηση της θραυσματοποίησης αυτών, ιδιαίτερα στην περιοχή των συνάψεων. Η αλληλεπίδραση της Drp1 με την φωσφορυλιωμένη tau επάγει αύξηση της δραστηριότητας/ενεργότητα της Drp1 GTPάσης, ενισχύοντας την θραυσματοποίηση των μιτοχονδρίων και ελαττώνοντας την μιτοχονδριακή λειτουργία. Η υπερβολική σχάση των μιτοχονδρίων οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ελαττωματική μιτοφαγία κατά την AD (John A. et al., 2021).



Εικόνα 11: Επισκόπηση της Μιτοχονδριακής Ομοιόστασης. Στην εικόνα γίνεται επίσης μια επισκόπηση των πρωτεϊνών εκείνων που συμμετέχουν στις διαδικασίες της μιτοχονδριακής σχάσης, σύντηξης, καθώς επίσης και εκείνων που συμμετέχουν στην διαδικασία της μιτοφαγίας (τροποποιημένη από Fisher C. R. et al., 2022).

1.5.4.2. Ελλαττωματική μιτοφαγία κατά την AD

Η ύπαρξη λειτουργικών μιτοχονδρίων είναι κρίσιμη για πολλές ενδοκυττάρειες διαδικασίες καθώς αποτελούν την κύρια πηγή ATP (ενέργειας), είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας και επιβίωσης και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία παρατηρείται όταν η μιτοχονδριακή βιογένεση είναι μειωμένη, όταν εντοπίζονται αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, όταν παρατηρείται μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων, καθώς επίσης και όταν παρατηρείται αλλοίωση της δραστηριότητας των οξειδωτικών πρωτεϊνών λόγω της συσσώρευσης ROS στα κύτταρα και τους ιστούς, τα οποία διαταράσσουν σημαντικά την κυτταρική μεταβολική ομοιόσταση και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Όταν εντός του κυττάρου κάνουν την εμφάνισή τους κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, μια επιλεκτική μορφή αυτοφαγίας, η οποία καλείται μιτοφαγία, θα τα απομακρύνει διασφαλίζοντας τη διατήρηση μιας υγιούς κοορτής μιτοχονδρίων.



Εικόνα 12: Μοριακοί μηχανισμοί μιτοφαγίας. PINK1-Parkin-εξαρτώμενη μιτοφαγία. Η PINK1 χρησιμεύει ως μοριακός αισθητήρας της μιτοχονδριακής υγείας, ανιχνεύει διαταραχές και σήματα για τη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση της Parkin, τα οποία στη συνέχεια μπορεί να ενισχυθούν με την ουβικιτινίωση των πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής επιφάνειας. Αυτές οι ουβικιτινιλωμένες πρωτεΐνες μπορούν στη συνέχεια να αναγνωριστούν από αυτοφαγικούς υποδοχείς οι οποίοι μετατρέπουν τα μιτοχόνδρια σε αυτοφαγοσώματα για αποικοδόμηση μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης τους με την πρωτεΐνη LC3 (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B). Η TBK1 [TANK (TRAF family member-associated NF-κB activator)-binding kinase 1] μπορεί να φωσφορυλιώσει τους αυτοφαγικούς υποδοχείς για να ενισχύσει τη μιτοφαγία. Ένας εξαρτώμενος από την PINK1 φωσφοδιακόπτης ο TUFm (Tu Translation Elongation Factor, Mitochondrial) ρυθμίζει την μετάβαση από την ενεργοποίηση στην καταστολή της μιτοφαγίας. PINK1-Parkin-ανεξάρτητη μιτοφαγία. Αυτή η διαδικασία διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες μιτοφαγικούς υποδοχείς, όπως NIX, FUNDC1, BNIP3, οι οποίοι διαθέτουν τη μοναδική ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την επεξεργασμένη LC3 ανεξάρτητα από την ουβικιτίνη (Zhu Cheng-long et al., 2021).

Η έναρξη της διαδικασίας της μιτοφαγίας πραγματοποιείται είτε μέσω της οδού που εξαρτάται από την PINK-1 [Phosphatase-tensin homologue (PTEN)-induced kinase-1] και την Παρκίνη (Parkin, E3 πρωτεϊνική λιγάση της ουβικιτίνης) είτε μέσω μίας οδού η οποία είναι

ανεξάρτητη από τις δύο αυτές πρωτεΐνες. Η μεσολαβούμενη από την PKA φωσφορυλίωση της Drp-1 στην Ser637 επάγει την αναστολή της οδηγώντας σε ελλαττωματική μιτοφαγία και αύξηση του νευροεκφυλισμού (Zhu Cheng-long et al., 2021)(John A. et al., 2021).

Στις συνάψεις νευρώνων προερχόμενων από ασθενείς με την AD έχει παρατηρηθεί ρήξη των κορυφών των πτυχώσεων της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, καθώς επίσης και αλλαγή στο μέγεθος και το σχήμα των μιτοχονδρίων σε σχέση με άτομα της ίδιας ηλικίας τα οποία δεν πάσχουν από την AD. Οι βλάβες των συναπτικών μιτοχονδρίων συνιστούν κυρίως ανοδικούς στόχους (upstream target) της AD και συνεπώς επηρεάζονται από το Αβ. Σε περίπτωση που τα μιτοχόνδρια είναι πολύ κατακερματισμένα μπορεί να εισέλθουν σε έναν «καταρράκτη» Κασπασών. Ειδικότερα, ο αυξημένος κατακερματισμός των μιτοχονδρίων μειώνει την μιτοφαγία οδηγώντας σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Στη συνέχεια η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία επάγει την απελευθέρωση του Κυτοχρώματος C και την ενεργοποίηση της Κασπάσης 9, η οποία εν συνεχεία ενεργοποιεί την Κασπάση 3 οδηγώντας σε έναν αποπτωτικό «καταρράκτη» (John A. et al., 2021).

Ένας αυξανόμενος όγκος στοιχείων υποδηλώνει ότι τα αυξημένα επίπεδα Αβ συμβάλλουν σε μιτοχονδριακές ανωμαλίες. Οι νευρώνες που προέρχονται από διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών της APP εμφανίζουν αλλοιωμένη μιτοχονδριακή δυναμική, μειωμένη διακίνηση και μειωμένη βιογένεση. Το Αβ έχει βρεθεί εντός των μιτοχονδριακών μεμβρανών και φαίνεται να αλληλεπιδρά με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, μέσω των οποίων το Αβ μπορεί να επηρεάσει τη δυναμική των μιτοχονδρίων, να αλλάξει την κινητικότητα των μιτοχονδρίων, να διαταράξει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, να αυξήσει την παραγωγή ROS, καθώς επίσης και να βλάψει τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Παρά την καλά τεκμηριωμένη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που προκαλείται από Αβ, δεν είναι γνωστό εάν η μιτοφαγία προκαλείται αποτελεσματικά κάτω από αυτές τις παθοφυσιολογικές συνθήκες. Για πρώτη φορά οι Ye X. et al. (2015) μελέτησαν τη διαμεσολαβούμενη από την Parkin μιτοφαγία σε μεταλλαγμένους νευρώνες hAPP, καθώς επίσης και σε εγκεφάλους ασθενών με την AD. Η έρευνά τους αποκάλυψε ότι η διαμεσολαβούμενη από την Parkin μιτοφαγία προκαλείται ισχυρά σε μεταλλαγμένους νευρώνες hAPP. Επιπρόσθετα, παρατήρησαν ότι απουσία αντιδραστηρίων διάχυσης ΔΨm* οι hAPP νευρώνες παρουσιάζουν αυξημένη στρατολόγηση κυτταροπλασματικής Parkin σε εκπολωμένα μιτοχόνδρια. Υπό παθοφυσιολογικές συνθήκες σχετιζόμενες με την AD, η μετατόπιση της Parkin συμβαίνει κυρίως στις σωματοδενδριτικές περιοχές του νευρώνα, μια τέτοια κατανομή σχετίζεται με μειωμένη πρόσθια (anterograde) και αυξημένη ανάδρομη (retrograde) μεταφορά των αξονικών μιτοχονδρίων. Η ενισχυμένη

* Το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (ΔΨm) είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της μιτοχονδριακής λειτουργίας. ΔΨm 100 έως 150 mV παράγεται από αντλίες πρωτονίων της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron Transport Chain, ETC) (Συμπλέγματα I, III και IV). Η ενέργεια που διατηρείται στο ΔΨm χρησιμοποιείται στην συνέχεια για την παραγωγή ATP από τη Μιτοχονδριακή Συνθετάση του ATP ή Σύμπλοκο V. Εκτός από τον κανονικό ρόλο του στην παραγωγή του ATP, το ΔΨm ρυθμίζει επίσης τη μεταφορά μεταβολιτών, την εισαγωγή πρωτεϊνών και την παραγωγή ROS. Επιπλέον, το ΔΨm παίζει ρόλο στον μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων, επιτρέποντας την απόρριψη δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων, ενώ επίσης φαίνεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση της γήρανσης (Choe M. et al., 2023). Πειραματικά έχει βρεθεί ότι, το Αβ αλληλεπιδρά με το CypD [Cyclophilin D, μιτοχονδριακή peptidyl-prolyl cis-trans isomerase γνωστή για τη ρύθμιση του mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore), ενός μη ειδικού μεγάλου πόρου αγωγιμότητας του οποίου το άνοιγμα οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο] επάγοντας την διάνοιξη του mPTP, οδηγώντας σε εκπόλωση (μειωμένο ΔΨm), μειωμένη ρυθμιστική ικανότητα μιτοχονδριακού Ca²⁺ και αυξημένη παραγωγή ROS, προκαλώντας έτσι νευρωνική βλάβη και γνωστική εξασθένηση (Calvo-Rodriguez M. et al., 2021)(Amanakis G. et al., 2020). Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι μέσω της οξεία εκπόλωση (depolarization) του ΔΨm με την χρήση αντιδραστηρίων διάχυσης ΔΨm (ΔΨm dissipation reagents) επάγεται η μεσολαβούμενη από την Parkin μιτοφαγία σε πολλούς μη νευρικούς κυτταρικούς τύπους, καθώς επίσης και σε νευρικές κυτταρικές σειρές (Ye X. et al., 2015).

μιτοφαγία επιβεβαιώθηκε περαιτέρω σε εγκεφάλους ασθενών οι οποίοι πάσχουν από την AD. Η ενίσχυση της μιτοφαγίας που παρατηρήθηκε συνοδεύτηκε από εξάντληση της κυτταροπλασματικής Parkin, η οποία ήταν αντίστοιχη της εξέλιξης της νόσου (John A. et al., 2021)(Ye X. et al., 2015).

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι υπό παθολογικές συνθήκες της AD παρατηρείται ισχυρή επαγωγή της μεσολαβούμενης από την Parkin μιτοφαγίας, λόγω της προκαλούμενης από το Αβ εκπόλωσης του ΔΨm των μιτοχονδρίων, η οποία συνοδεύεται από αυξημένη στρατολόγηση της Parkin στα εκπολωμένα μιτοχόνδρια. Παράλληλα, υπό τις συνθήκες αυτές παρατηρείται μετατόπιση της Parkin κυρίως στις σωματοδενδριτικές περιοχές των νευρώνων, κατανομή η οποία σχετίζεται με μειωμένη πρόσθια και αυξημένη ανάδρομη μεταφορά των αξονικών μιτοχονδρίων. Η ενίσχυση αυτή της μιτοφαγίας οδηγεί σε εξάντληση της κυτταροπλασματικής Parkin, αντίστοιχη της εξέλιξης της νόσου, η οποία οδηγεί σταδιακά στην μείωση της μιτοφαγίας και την συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων στους νευρώνες (Ye X. et al., 2015)(Choe M. et al., 2023)(Calvo-Rodriguez M. et al., 2021). Συνεπώς, η ανώμαλη συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων σε νευρώνες κατά την AD πιθανότατα μπορεί να αποδοθεί σε ανεπαρκή ικανότητα μιτοφαγίας, η οποία δεν επιτρέπει την εξάλειψη του αυξημένου αριθμού κατεστραμένων μιτοχονδρίων (John A. et al., 2021)(Ye X. et al., 2015).

Το 2018 οι Reddy et al. διερεύνησαν τις τοξικές επιδράσεις της μεταλλαγμένης APP (mutant APP, mAPP) του υποκάμπου και του Αβ σε πρωτογενείς νευρώνες υποκάμπου ποντικού (HT22) οι οποίοι εκφράζουν την Σουηδική μετάλλαξη της ανθρώπινης APP (AβPP_{Swe}, K670N/M671L). Παρατήρησαν την εμφάνιση αυξημένων επιπέδων mRNA και πρωτεϊνών των γονιδίων μιτοχονδριακής θραύσης/σχάσης (Drp1 και Fis1) και μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών των γονιδίων σύντηξης (Mfn1, Mfn2 και Opa1), βιογένεσης (PGC1α, NRF1, NRF2 και TFAM), αυτοφαγίας (ATG5 και LC3BI, LC3BII), μιτοφαγίας (PINK1 και TERT, BCL2 και BNIPBL), των συναπτικών γονιδίων (synaptophysin και PSD95), καθώς και των δενδριτικών γονιδίων (MAP2) σε mAPP-HT22 κύτταρα σε σχέση τα WT-HT22 κύτταρα. Επιπρόσθετα, παρατήρησαν σημαντική μείωση της επιβίωσης των κυττάρων mAPP-HT22, καθώς επίσης και αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της GTPάσης Drp1, στα εν λόγω κύτταρα. Τέλος, αποκάλυψαν ότι στα κύτταρα mAPP-HT22 παρατηρείται αυξημένος αριθμός μιτοχονδρίων, αλλά τα μιτοχόνδρια αυτά εμφάνισαν μειωμένο μήκος. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η συσσώρευση mAPP και Αβ στον υποκάμπο θεωρείται ότι ευθύνεται για την μη φυσιολογική μιτοχονδριακή δυναμική και την ελαττωματική βιογένεση, καθώς επίσης και την μείωση της MAP2, της αυτοφαγίας, της μιτοφαγίας και των συναπτικών πρωτεϊνών. Επίσης, ευθύνεται για την μείωση των δενδριτικών ακάνθων και τις μιτοχονδριακές δομικές και λειτουργικές αλλαγές οι οποίες παρατηρούνται στα mAPP κύτταρα υποκάμπου. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η συσσώρευση mAPP και Αβ προκαλεί μιτοχονδριακές βλάβες, συναπτικές και αυτοφαγικές/μιτοφαγικές ανωμαλίες στους νευρώνες του υποκάμπου, οδηγώντας σε νευρωνική δυσλειτουργία (Reddy P. H. et al., 2018)(John A. et al., 2021)(Esquerda-Canals G. et al., 2017). Το εργαστήριο του Reddy P. H. μελέτησε επίσης τις τοξικές επιδράσεις στον υποκάμπο του mAPP και του Αβ σε 12 μηνών APP διαγονιδιακό στέλεχος ποντικού (Tg2576) το οποίο εκφράζει την Σουηδική μετάλλαξη της APP με παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά τις μιτοχονδριακές βλάβες, συναπτικές και αυτοφαγικές/μιτοφαγικές ανωμαλίες στους νευρώνες του υποκάμπου, ενώ επιπρόσθετα παρατήρησαν διαταραχές στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης (John A. et al., 2021)(Manczak M. et al., 2018).

Οι Fang et al. (2019) ασχολήθηκαν επίσης με την μελέτη των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την εξασθένιση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης κατά την AD. Η έρευνά τους

παρείχε στοιχεία ότι η μιτοφαγία είναι εξασθενημένη στον ιππόκαμπο ασθενών που πάσχουν από την AD, σε νευρώνες προερχόμενους από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από άτομα ασθενείς με την AD, καθώς επίσης και σε ζωικά μοντέλα της AD. Τόσο σε Αβ, όσο και σε tau μοντέλα *Caenorhabditis elegans* της AD βρέθηκε ότι η διέγερση της μιτοφαγίας (μέσω συμπληρώματος NAD⁺, urolithin A και actinonin) αναστρέφει την εξασθένηση της μνήμης που παρατηρείται στα ζωικά μοντέλα αυτά μέσω των εξαρτώμενων από την PINK-1, την PDR-1 (Parkinson's disease-related-1 ή Parkin), ή του DCT-1 (DAF-16/FOXO-controlled germline-tumor affecting-1) μονοπατιών. Η μιτοφαγία μειώνει τα αδιάλυτα Αβ₁₋₄₂ και Αβ₁₋₄₀ και αποτρέπει την γνωστική εξασθένηση σε ένα μοντέλο ποντικού APP/PS1 μέσω της μικρογλοιακής φαγοκυττάρωσης των εξωκυττάρων πλακών Αβ και της καταστολής της νευροφλεγμονής. Επιπρόσθετα, η ενίσχυση της μιτοφαγίας καταργεί την σχετιζόμενη με την AD υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau σε ανθρώπινα νευρικά κύτταρα και αναστρέφει την εξασθένηση της μνήμης σε διαγονιδιακά tau ποντίκια και νηματώδεις. Τα ευρήματά τους αυτά υποδηλώνουν ότι η εξασθενημένη απομάκρυνση των ελλατωματικών μιτοχονδρίων αποτελεί ένα σημαντικό γεγονός στην παθογένεση της AD και ότι η μιτοφαγία θα μπορούσε να αποτελέσει μια πιθανή θεραπευτική παρέμβαση για την AD (John A. et al., 2021)(Fang E. F. et al., 2019).

Συνοψίζοντας, κατά την AD παρατηρείται ελαττωματική μιτοφαγία η οποία θεωρείται ότι είναι κυρίως αποτέλεσμα πρώτον της αυξημένης παραγωγής και συσσώρευσης Αβ και φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau και δεύτερον των μη φυσιολογικών αλληλεπιδράσεων του Αβ και της φωσφορυλιωμένης tau με την Drp1 και το VDAC, καθώς επίσης και λόγω των μειωμένων επιπέδων την PINK1 και της Parkin. Ως εκ τούτου, η μείωση των επιπέδων του Αβ, της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau και της Drp1 έχουν προταθεί ως μία αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση της AD (John A. et al., 2021).

1.5.5. Η υπόθεση της νευροφλεγμονής

Ο όρος φλεγμονή αναφέρεται στην αντίδραση που επάγεται έναντι οποιουδήποτε τραυματισμού ή μόλυνσης των κυττάρων ή των ιστών. Η φλεγμονή η οποία εντοπίζεται στην περιοχή του εγκεφάλου καλείται νευροφλεγμονή. Η νευροφλεγμονή θεωρείται ότι είναι άλλοτε ωφέλιμη και άλλοτε καταστροφική για τα νευρικά κύτταρα. Το παραπάνω οφείλεται στο γεγονός ότι η υπερβολική ενεργοποίηση των φλεγμονωδών μορίων είναι σε θέση να προκαλέσει βλάβη στα κύτταρα του εγκεφάλου. Η νευροφλεγμονή επάγει την ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων του εγκεφάλου, όπως τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα. Ο εγκέφαλος θεωρείται γενικά ότι είναι ένα «ανοσολογικά προνομιακό όργανο» καθώς τα περιφερειακά ανοσοκύτταρα δεν είναι σε θέση να διέλθουν σε αυτόν μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ωστόσο τα νευρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου θεωρείται ότι είναι σε θέση να αλληλεπιδρούν με την περιφερειακή ανοσία, αν και αυτό δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Dhapola R. et al., 2021).

Υπό φυσιολογικές, αλλά και υπό παθολογικές συνθήκες, τα νευρογλοιακά κύτταρα ασκούν ευνοϊκές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις όπως η φαγοκυττάρωση, η απελευθέρωση στεροειδών, η μείωση των ελεύθερων ριζών και η κυτταρική επιδιόρθωση. Η απελευθέρωση κυτοκινών, καθώς και η δημιουργία ελεύθερων ριζών μπορεί να προκαλέσουν τον θάνατο των νευρικών κυττάρων και συναπτική δυσλειτουργία. Συνεπώς, αν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ της ρύθμισης της προφλεγμονώδους και της αντιφλεγμονώδους λειτουργίας μπορεί να προκληθεί εγκεφαλική βλάβη (Dhapola R. et al., 2021).

Τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα αποτελούν τα δύο κύρια συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου, όπως προαναφέρθηκε, και ενέχουν βασικό ρόλο στην διαδικασία της νευροφλεγμονής. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα μικρογλοιακά κύτταρα ασκούν φαγοκυτταρική δράση απομακρύνοντας τους κατεστραμμένους νευρώνες και με αυτόν τον τρόπο προάγουν την επιδιόρθωση του ιστού στο σημείο της φλεγμονής. Τα αστροκύτταρα είναι υπεύθυνα για την αφαίρεση τυχών υπολειμμάτων από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ασκώντας νευροπροστατευτική δράση. Κατά την AD παρατηρείται συσσώρευση αυτών των κυττάρων γύρω από τα NFTs και τις γεροντικές πλάκες, τα οποία όταν βρίσκονται στην ενεργοποιημένη τους κατάσταση απελευθερώνουν κυτοκίνες, ιντερλευκίνες και χημειοκίνες, μόρια τα οποία δρουν ως προφλεγμονώδη συστατικά και ενισχύουν την νευροφλεγμονή στον εγκέφαλο (Dhapola R. et al., 2021).

Η ΑροΕ, η οποία αποτελεί έναν από τους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της AD όπως προαναφέρθηκε, ενέχει ανοσοτροποποιητική δράση. Αυτή η ικανότητα της ΑροΕ συνδέεται με τον TREM2, με την μεσολάβηση της μικρογλοίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η αύξηση των επιπέδων των κυτοκινών στον εγκέφαλο, όπως οι ιντερλευκίνες (Interleukins, ILs), ο TNFα (Tumour Necrosis Factor alpha) και η Cox-2 (Cyclooxygenase-2) συνδέονται στενά με την AD. Η μεσολαβούμενη από το Αβ παραγωγή κυτοκινών στον εγκέφαλο προάγει την δημιουργία ελεύθερων ριζών με την μεσολάβηση της μικρογλοίας. Η IL-1 η οποία απελευθερώνεται από τους νευρώνες, τα αστροκύτταρα και την μικρογλοία θεωρείται ότι εμπλέκεται στην εξέλιξη της AD. Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση IL-1 στον εγκέφαλο ασθενών με την AD. Η IL-1 φαίνεται να ενισχύει την μη φυσιολογική επεξεργασία της APP οδηγώντας στην παραγωγή Αβ, ενώ επιπρόσθετα διεγείρει την απελευθέρωση άλλων κυτοκινών και αυξάνει την δραστικότητα της NOS (Nitric oxide synthase), οδηγώντας σε νευροτοξικά αποτελέσματα (Dhapola R. et al., 2021).

1.5.5.1. Ο ρόλος των φλεγμονωδών μορίων στην AD

Οι ιντερλευκίνες είναι μόρια τα οποία εκκρίνονται από τα λευκοκύτταρα και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα οποία προάγουν την ενεργοποίηση της μεσολαβούμενης από τα T-λεμφοκύτταρα τοξικότητας, ενώ επιπρόσθετα αυξάνουν την δράση των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων. Οι ιντερλευκίνες διαθέτουν διάφορους υποδοχείς όπως της IL-6, της IL-1β, της IL-1α, της IL-9, της IL-17, της IL-15, της IL-16, της IL-12, της IL-18, της IL-4 και της IL-10. Οι υποδοχείς της IL-6 στην φυσιολογική τους συγκέντρωση φαίνεται να βοηθούν στην νευρωνική επιβίωση. Ωστόσο, η αυξημένη ενεργοποίηση της IL-6 μπορεί να οδηγήσει σε νευροεκφυλισμό. Έτσι, μεταλλάξεις της IL-6 φαίνεται ότι μπορούν να ενισχύσουν τον κίνδυνο εμφάνισης AD. Η IL-4 φαίνεται να μειώνει την κάθαρση του Αβ και συνεπώς ενισχύει την εναπόθεση Αβ και τον σχηματισμό γεροντικών πλακών. Η IL-10 διαθέτει την ικανότητα να καταστέλλει την δράση αρκετών προφλεγμονωδών μεσολαβητών και επομένως δρα ως αντιφλεγμονώδες μόριο. Η IL-18 ενεργοποιεί την παραγωγή ιντερφερόνης-γ. Δράσεις των ILs όπως ορισμένες από αυτές που προαναφέρθηκαν φαίνεται να σχετίζονται με την παθογένεση της AD, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας φλεγμονώδεις μεσολαβητές οι οποίοι οδηγούν σε νευροφλεγμονή, είτε άμεσα προκαλώντας οι ίδιες νευροτοξικότητα (Dhapola R. et al., 2021).

Η νευροφλεγμονή η οποία παρατηρείται κατά την AD πιστεύεται βασικά ότι καθορίζεται από την μικρογλοία. Τα олиγομερή Αβ και τα ινίδια είναι εξοπλισμένα να προετοιμάζουν τα μικρογλοιακά κύτταρα μέσω της επικοινωνίας με διάφορους υποδοχείς βελτιώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών όπως η IL-1, η IL-6, ο TNF-α, το C1q (Complement component 1q), καθώς και άλλων, καθιστώντας την μικρογλοία προοδευτικά ευάλωτη σε βοηθητικές ενισχύσεις (auxiliary

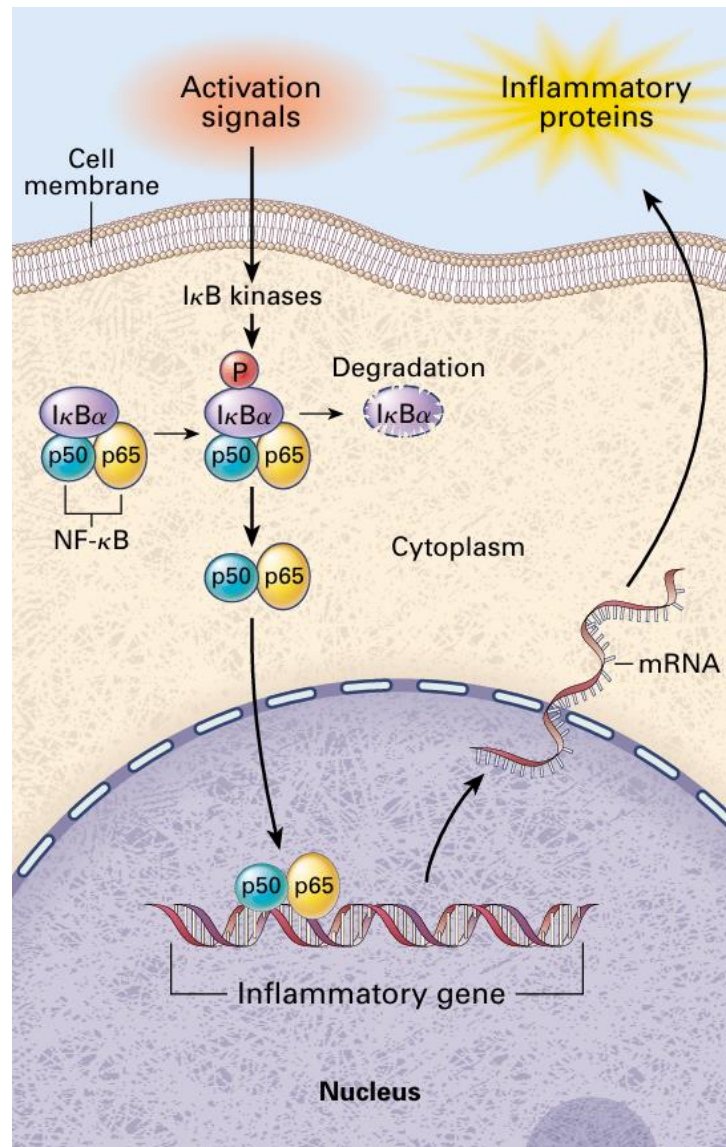
boosts), διεγείροντας την μικρογλοιακή ενεργοποίηση. Κατά την AD η συσσώρευση του Αβ επιφέρει διαρκή διέγερση της μικρογλοίας, προάγοντας την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών, γεγονός το οποίο ενισχύει περαιτέρω τα επίπεδα της ενεργοποιημένης μικρογλοίας. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες οι οποίες απελευθερώνονται από τα νευρογλοιακά κύτταρα είναι δύο τύπων, προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις. Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL-1, η IL-6 και ο TNF-α, ενισχύουν τη φλεγμονή, διαδικασία η οποία μεσολαβεί από την ενεργοποίησης της μικρογλοίας και την αύξηση του Αβ, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην προκαλούμενη από την φλεγμονή εξέλιξη της AD (Dhapola R. et al., 2021).

Οι χημειοκίνες είναι χημειοτακτικές κυτοκίνες οι οποίες δρουν ως μεσολαβητές της AD διεγείροντας τη χημειοταξία στον εγκέφαλο. Οι χημειοκίνες διακρίνονται σε τέσσερις οικογένειες (CXC, CC, CX3C και C ή α, β, γ και δ χημειοκίνες αντίστοιχα) βάση του αριθμού και των συσσωρεύσεων κυστεΐνης (number and cysteine buildups) στο N-τελικό τους άκρο. Η μικρογλοία, τα αστροκύτταρα, καθώς και οι νευρώνες αποτελούν τα κύτταρα εκείνα τα οποία είναι υπεύθυνα για την σύνθεση των χημειοκινών, καθώς και των υποδοχέων αυτών. Υπό φλεγμονώδεις συνθήκες ή παρουσία κάποιας νόσου παράγονται από το κεντρικό νευρικό σύστημα οι CCL2, CXCL8, CXCL10, CCL5 και CCL3 χημειοκίνες. Οι χημειοκίνες κατευθύνουν τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα στο σημείο της νευροφλεγμονής επιδεινώνοντας την τοπική φλεγμονή (Dhapola R. et al., 2021).

Σε ασθενείς που πάσχουν από την AD η ιντεγκρίνη Cd11b βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε ουδετερόφιλα τα οποία εντοπίζονται περιφερειακά, γεγονός το οποίο οδηγεί σε ενίσχυση της προσκόλλησης και της μετατόπισης των ουδετερόφιλων. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων ριζών στα περιφερειακά ουδετερόφιλα. Έχει διαπιστωθεί ότι τα ουδετερόφιλα είναι υπερδραστήρια στον εγκέφαλο κατά την AD. Το LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen -1) είναι μια ιντεγκρίνη η οποία είναι παρούσα στα ουδετερόφιλα των οποίων η δράση έχει αυξηθεί εξαιτίας των πεπτιδίων Αβ. Πιστεύεται ότι η διήθηση των ουδετερόφιλων ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από το LFA-1 και η εξάντληση των επιπέδων LFA-1 μειώνει τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων προς τον εγκέφαλο οδηγώντας σε μείωση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ταυ και βελτίωση των γνωστικών λειτουργιών σε ασθενείς με την AD (Dhapola R. et al., 2021).

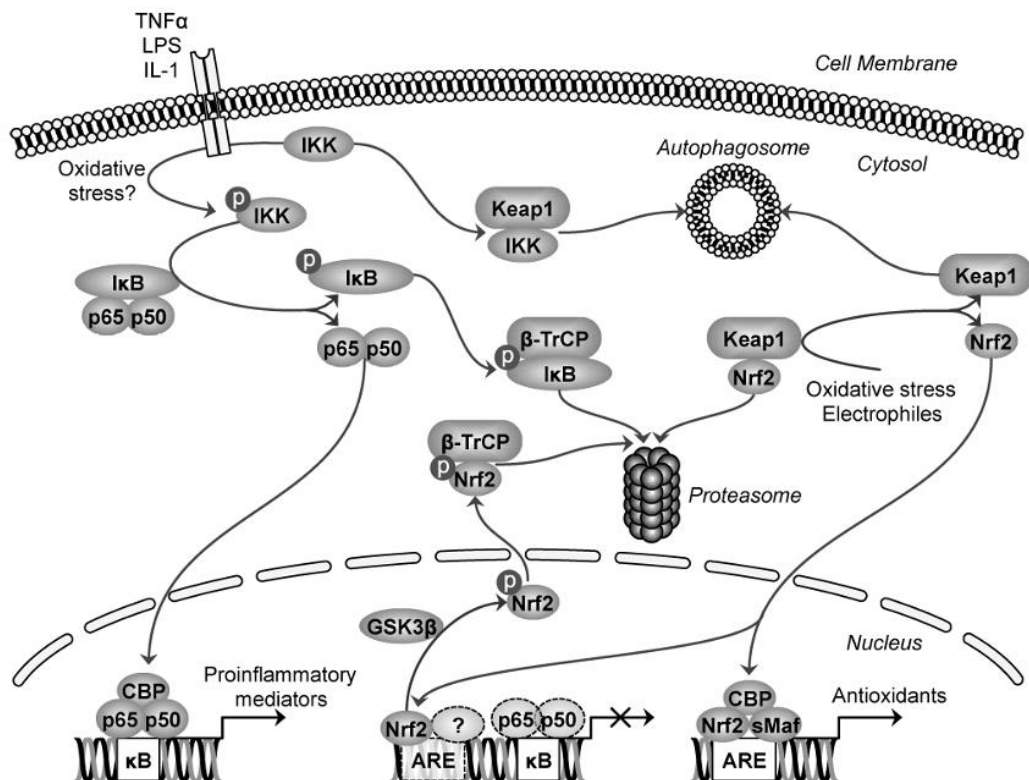
1.5.5.2. Σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία παίζουν ρόλο στη νευροφλεγμονή

Οι TLRs (toll-like receptors) είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση των μονοπατιών του NF-κΒ (Nuclear Factor κΒ), ενός μεταγραφικού παράγοντα ειδικού για τα Β-λεμφοκύτταρα. Η ενεργοποίηση του NF-κΒ ξεκινά τη φαγοκυττάρωση που προκαλείται από την μικρογλοία η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση κυτοκινών και ενεργοποιεί μόρια τα οποία απαιτούνται για τη λειτουργία της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης. Ο ΙκΒα (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α) ρυθμίζει τη δράση του NFκΒ μαζί με τη μετατόπισή του στον πυρήνα. Ο ΙκΒα είναι ένα ανασταλτικό μόριο το οποίο όταν αφαιρεθεί από τον NFκΒ οδηγεί στην ενεργοποίησή του. Οι TNF-α και IL-1β είναι επίσης σε θέση να ενεργοποιήσουν την οδό του NFκΒ. Η ουβικιτίνη αναστέλλει τον NF-κΒ, την αποικοδόμηση του ΙκΒ, την επεξεργασία των προδρόμων ουσιών του NFκΒ και την ενεργοποίηση της ΙΚΚ (ΙκΒ kinase).



Εικόνα 13: Η ενεργοποίηση του NF-κB περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση και την επακόλουθη πρωτεολυτική αποικοδόμηση της ανασταλτικής πρωτεΐνης IκBa από ειδικές κινάσες IκB. Το ελεύθερο NF-κB (ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από τις p50 και p65) στη συνέχεια εισέρχεται στον πυρήνα, όπου δεσμεύεται σε θέσεις κB στις περιοχές υποκινητή γονιδίων τα οποία εκφράζουν φλεγμονώδεις πρωτεΐνες όπως οι κυτοκίνες, ένζυμα και μόρια προσκόλλησης (Barnes P. J et al., 1997).

Στον εγκέφαλο, η σηματοδότηση NFκB εμφανίζεται κυρίως στα μικρογλοιακά κύτταρα, σε κάποιο βαθμό στα αστροκύτταρα και στα ολιγοδενδροκύτταρα, ωστόσο οι νευρώνες φαίνεται να στερούνται αυτής της σηματοδότησης. Ο Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor-2) αποτελεί έναν άλλος μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος ρυθμίζει διάφορες αντιοξειδωτικές οδούς. Η φλεγμονή που παρατηρείται κατά την AD οδηγεί στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες και αυξημένης ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και των αστροκυττάρων, η οποία οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα NFκB και αλλοιωμένη δράση του Nrf2. Πιστεύεται ότι ο Nrf2 αυξάνοντας την αντιοξειδωτική δράση μπορεί να μετριάσει τη δράση του NFκB, και συνεπώς μπορεί να έχει νευροπροστατευτικό ρόλο. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων ρυθμίζει την έκφραση του NFκB, η οποία με την σειρά της ρυθμίζεται από τον Nrf2 (Dhapola R. et al., 2021).

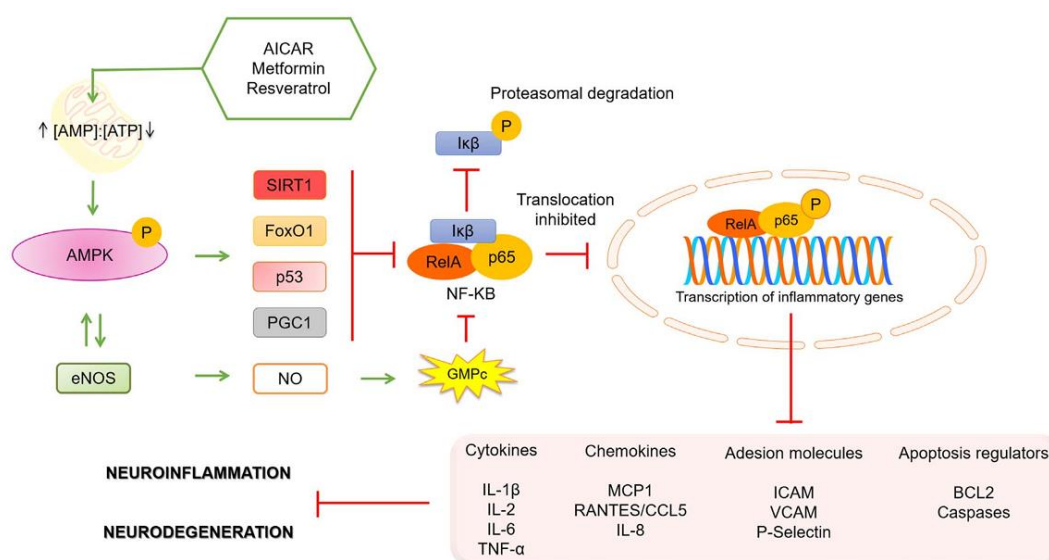


Εικόνα 14: Αλληλεπίδραση μεταξύ της ρύθμισης του Nrf2 και του NF-κB. Ο NF-κB (απεικονίζεται ως ετεροδιμερές p65/p50) δεσμεύεται στο κυτταρόπλασμα από το IκB. Σε απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα ή πιθανώς οξειδωτικό στρες, η IKK ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει το IκB, προκαλώντας διάσπαση του NF-κB ο οποίος στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προάγει τη μεταγραφή των προφλεγμονωδών γονιδίων δεσμευόμενος σε μοτίβα κB. Το φωσφορυλιωμένο IκB συνδέεται με το β-TrCP (Beta-transducin repeats-containing protein) και στοχεύετε για πρωτεασωμική αποικοδόμηση. Υπό κανονικές συνθήκες, το Nrf2 δεσμεύεται από το Keap1 στο κυτταρόπλασμα και επίσης στοχεύετε για πρωτεασωμική αποικοδόμηση. Μετά την ενεργοποίηση από οξειδωτικό στρες ή electrophiles, ο Nrf2 απελευθερώνεται από το Keap1 και μπορεί να μετατοπιστεί στον πυρήνα όπου σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με τις sMaf (small Maf proteins) και στην συνέχεια συνδέεται με στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Elements, ARE) για να προωθήσει τη μεταγραφή των αντιοξειδωτικών γονιδίων. Το Nrf2 μπορεί επίσης να συνδεθεί με γονίδια-στόχους του NF-κB και να καταστείλει τη μεταγραφή τους, σε μια διαδικασία που πιθανώς περιλαμβάνει συνεργάτες δέσμησης και δεν επηρεάζεται από την παρουσία ή την απουσία της αλληλουχίας ARE ή της δέσμησης NF-κB. Τόσο το NF-κB όσο και το Nrf2 ανταγωνίζονται για την CBP [CREB (Cyclic AMP Responsive Element Binding Protein)-Binding Protein], η οποία προάγει τη δέσμευση στο DNA. Ο ενεργοποιημένος Nrf2 μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την GSK3β, γεγονός το οποίο διευκολύνει τη σύνδεση με την β-TrCP και τη στοχεύει για πρωτεασωμική αποικοδόμηση. Το Keap1 αποικοδομείται μέσω αυτοφαγίας και μπορεί επίσης να δεσμεύσει και να διασπάσει το IKK μέσω αυτοφαγίας (Liddell J. R., 2017).

Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας οδηγεί στην επαγωγή της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase / Protein kinase B), η οποία εμπλέκεται στην απόπτωση και στην ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Η μετατόπιση του NFκB έχει επίσης την ικανότητα να προωθήσει την ενεργοποίηση της PI3K. Με τη σειρά της η PI3K ενεργοποιείται από την Akt μέσω διαφόρων downstream μονοπατιών. Ο mTOR (mammalian target of rapamycin) ανήκει επίσης στην οικογένεια των PI3 κινασών. Η ενεργοποίηση της PI3K οδηγεί στην ενεργοποίηση της Akt η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τον mTOR, μέσω φωσφορυλίωσης, επάγοντας εν συνεχεία την ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Ο mTOR ρυθμίζει περαιτέρω την δράση του NFκB. Έτσι, η αύξηση της ενεργοποίησης του mTOR τελικά οδηγεί σε ανάλογη αύξηση της δράσης του NFκB η οποία οδηγεί σε διέγερση της iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) και της Cox-2 (Cyclooxygenase-2) (Dhapola R. et al., 2021).

Φυσιολογικά η φλεγμονή στον εγκέφαλο σχετίζεται με δύο τύπους ενζύμων κυκλοξυγενάσης, τις *cox-1* και *cox-2*. Η *Cox-1* εντοπίζεται στους νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού και του υποκάμπου, ενώ η *Cox-2* υπερεκφράζεται λόγω της φλεγμονής τόσο στα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα, όσο και στους νευρώνες. Κατά την νευροφλεγμονή, οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές ενεργοποιούν την *Cox-2* η οποία συνθέτει και απελευθερώνει προσταγλανδίνες, μέσω της οδού του αραχιδονικού, οι οποίες διεγείρουν περαιτέρω τη μικρογλοία. Η προσταγλανδίνη E2 (Prostaglandin E2, PGE2) παράγεται κυρίως από τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα μακροφάγα και οι υποδοχείς της εντοπίζονται κυρίως στα μικρογλοιακά κύτταρα (Dhapola R. et al., 2021). Η δέσμευση της PGE2 στους υποδοχείς της οδηγεί στην παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών (προφλεγμονώδεις κυτοκίνες). Παράλληλα, η μεσολαβούμενη από την PGE2 απελευθέρωση νευροφλεγμονωδών μεσολαβητών (TNF- α , IL1 β , ROS, nitrite) μπορεί να προκαλέσει νευρωνικό θάνατο. Αύξηση των επιπέδων τόσο της COX-2, όσο και της PGE2 έχει βρεθεί ότι συνδέεται με την γνωστική εξασθένηση που παρατηρείται σε ασθενείς που πάσχουν από την AD (Sil S. et al., 2016).

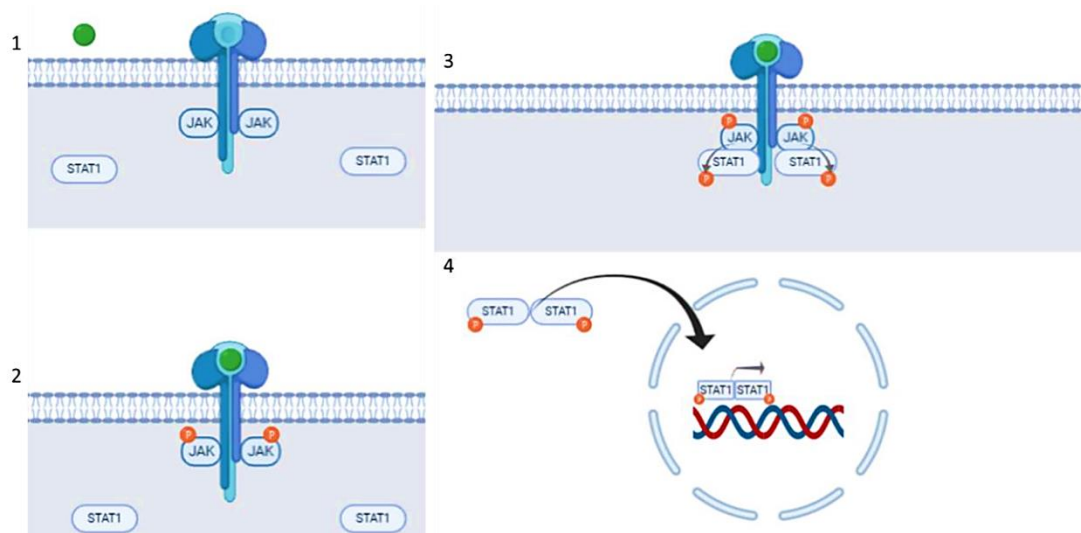
Η AMPK (AMP-activated protein kinase) πιστεύεται ότι κατέχει ωφέλιμο ρόλο στη νευροφλεγμονή μέσω της τροποποίησης του STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) και του αποκλεισμού της έκφρασης της ιντερφερόνης γ (Interferon γ , IFN γ), της iNOS και του TNF- α . Το AMPK προστατεύει επίσης τους νευρώνες από την διεγερτική τοξικότητα του γλουταμικού. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι οι ενεργοποιητές της AMPK οδήγησαν σε εξασθένηση της δράσης του NF κ B. Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση της AMPK θεωρείται επιζήμια, επομένως ο ακριβής ρόλος του AMPK δεν έχει ακόμα πλήρως διασαφηνιστεί. Ωστόσο, φαίνεται ότι η AMPK διαθέτει ευεργετικές δράσεις έναντι της εμφάνισης AD, συνεπώς η απορρύθμιση του εν λόγω μονοπατιού μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση AD (Dhapola R. et al., 2021)(Peixoto C. A. Et al., 2017).



Εικόνα 15: Ρόλος της AMPK στο μονοπάτι του NF- κ B (Peixoto C. A. Et al., 2017).

Οι λιποπολυσακχαρίτες μπορούν επίσης να επάγουν το μονοπάτι της MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) μαζί με το μονοπάτι NFκB. Η JNK (c-Jun N-terminal kinase), η ERK1/2 (Extracellular-signal-regulated kinase1/2) και η p38 είναι οι κύριες οδοί σηματοδότησης των MAPKs. Τα μονοπάτια MAPK εμπλέκονται κυρίως στη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης, του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης. Αντιφλεγμονώδη μόρια όπως η νευροτροπίνη μειώνουν την ενεργοποίηση των οδών p38, ERK και JNK αναστέλλοντας έτσι την οδό MAPK η οποία επάγει την εμφάνιση φλεγμονής. Έχει παρατηρηθεί ότι τα εν λόγω μονοπάτια είναι ενεργά σε ευάλωτους νευρώνες σε ασθενείς με την AD υποδηλώνοντας ότι τα MAPK μονοπάτια εμπλέκονται στην παθογένεση της AD (Dhapola R. et al., 2021)(Zhu X. et al., 2002).

Ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς που καθορίζουν τη μοίρα των γλοιακών κυττάρων είναι η οδός σηματοδότησης της JAK/STAT η οποία φαίνεται να επηρεάζεται από την υπερενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων. Έτσι, η οδός σηματοδότησης JAK/STAT (Janus kinase/ Signal transducers and activators of transcription) αποτελεί έναν από τους κρίσιμους παράγοντες οι οποίοι προάγουν τη νευροφλεγμονή σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η AD, κατά την οποία μάλιστα φαίνεται να μεταβάλλεται η λειτουργία της (Rusek M. et al., 2023). Η ιντερφερόνη γ συνδέεται με τους υποδοχείς ιντερφερόνης γ και ενεργοποιεί την κατάσταση M1 της μικρογλοίας μέσω της ενεργοποίησης της οδού JAK/STAT, η οποία ακολούθως οδηγεί στην απελευθέρωση διαφόρων κυτοκινών και χημειοκινών. Η φωσφορυλίωση του IRF3 (Interferon Regulatory Factor-3) οδηγεί στη δημιουργία ιντερφερόνης τύπου 1 (IFN-β), η οποία συνδεόμενη με τους υποδοχείς της ενεργοποιεί την οικογένεια κινασών janus, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την STAT. Η STAT στη συνέχεια εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί γονίδια διέγερσης ιντερφερόνης, οδηγώντας στην απελευθέρωση διαφόρων φλεγμονωδών μεσολαβητών (Dhapola R. et al., 2021).



Εικόνα 16: Οδός σηματοδότησης JAK/STAT. Ο κυτταρικός προσδέτης αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του προκαλώντας τον διμερισμό του. Η σύνδεση μεταξύ του προσδέτη και του υποδοχέα προκαλεί trans-φωσφορυλίωση της JAK. Η ενεργοποιημένη JAK προκαλεί φωσφορυλίωση του δεσμευμένου υποδοχέα σε κατάλοιπα τυροσίνης, σχηματίζοντας μια θέση σύνδεσης για την STAT. Στη συνέχεια, η JAK φωσφορυλιώνει την STAT η οποία διαχωρίζεται από τον υποδοχέα και σχηματίζει ομοδιμερή ή ετεροδιμερή μέσω αλληλεπιδράσεων SH2-περιοχής-φωσφοτυροσίνης (SH2-domain-phosphotyrosine). Αυτά τα διμερή μετατοπίζονται σε υποκινητές γονιδίων-στόχων, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων αυτών. Τα βήματα έχουν ως εξής: (1) Ο συνδέτης δεσμεύεται στον υποδοχέα, (2) η JAK αυτο-φωσφορυλιώνεται, (3) η STAT συνδέεται με την JAK η οποία την φωσφορυλιώνει, (4) η STAT σχηματίζει ομοδιμερές, το οποίο στην συνέχεια εισέρχεται στον πυρήνα, δεσμεύεται στο DNA και επάγει την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Rusek M. et al., 2023).

Το μονοξείδιο του αζώτου είναι ένα μόριο σηματοδότησης το οποίο συντίθεται από τρεις μορφές ενζύμων συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide Synthase, NOS), την νευρωνική NOS (neuronal NOS, nNOS), την ενδοθηλιακή NOS (endothelial NOS, eNOS) και την επαγώγιμη NOS (inducible NOS, iNOS). Η iNOS ενεργοποιείται στον εγκέφαλο, ιδιαίτερα στην μικρογλοία, μόνο κάτω από παθολογικές καταστάσεις οι οποίες συνοδεύουν την AD. Λιποπολυσακχαρίτες, ο TNFα, οι ιντερλευκίνες και η IFNγ είναι ικανές να διεγείρουν την iNOS. Κάτω από φυσιολογικά επίπεδα το NO είναι χρήσιμο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα αυξημένα επίπεδα NO μπορούν να προκαλέσουν νίτρωση αρκετών πρωτεϊνών στον εγκέφαλο οδηγώντας σε απόπτωση των νευρώνων. Περαιτέρω αύξηση στα επίπεδα της iNOS και του NO οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής ελεύθερων ριζών, γεγονός το οποίο συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση των κυτταροτοξικών επιδράσεων στα νευρικά κύτταρα (Dhapola R. et al., 2021).

1.5.6. Η υπόθεση της διαταραχής του μικροβιώματος του εντέρου

Ο εγκέφαλος και το έντερο διαθέτουν την ικανότητα για αμφίδρομη επικοινωνία μέσω του μεταβολικού άξονα εγκεφάλου-εντέρου. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει μια θετική συσχέτιση μεταξύ της AD και της μικροβιακής διαταραχής του εντέρου. Η διαταραχή της μικροχλωρίδας του εντέρου οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή δευτερογενούς κυτταροτοξικού χολικού οξέος, κυρίως δεοξυχολικού οξέος, το οποίο διαθέτει την ικανότητα να διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να εναποτίθεται στον εγκέφαλο οδηγώντας σε απόπτωση, δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), φλεγμονή και νευροεκφυλισμό. Εναλλακτικά, η δυσβίωση του μικροβιώματος του εντέρου προκαλεί συστηματική φλεγμονή, νευροφλεγμονή, αντίσταση στην ινσουλίνη, καταστάσεις οι οποίες σχετίζονται με την παθογένεση της AD, όπως προαναφέρθηκε. Τα μικρόβια του εντέρου επηρεάζουν το σχηματισμό, την απορρόφηση και τη μεταφορά της σερετονίνης και του GABA στον εγκέφαλο, επιπλέον ορισμένα βακτηριακά είδη επηρεάζουν τον σχηματισμό πλακών αμυλοειδούς οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον καταρράκτη φλεγμονής που παρατηρείται κατά την AD και ως εκ τούτου σχετίζονται με την ευαισθησία εμφάνισης της νόσου. Έτσι, ένα ελαττωματικό μικροβίωμα του εντέρου μαζί με άλλους παράγοντες μπορεί να συμβάλλει στην εξέλιξη της AD (Khan S. et al., 2020).

Το NO εκκρίνεται κατά την ενεργοποίηση των υποδοχέων N-Methyl-D-aspartate (NMDA) από το γλουταμικό και δρα ως πρωτεύων νευροδιαβιβαστής του νοραδρενεργικού, μη χολινεργικού και εντερικού νευρικού συστήματος. Τα μικρόβια του εντέρου όπως τα Bifidobacteria και οι Lactobacilli μετατρέπουν τα νιτρώδη και τα νιτρικά σε NO. Οι βάκιλοι του εντέρου και οι Streptomyces μπορούν επίσης να συνθέσουν NO με την βοήθεια της NOS. Η αλλαγή στη δράση οποιουδήποτε από αυτά τα μικρόβια του εντέρου μαζί με την αύξηση της πρόσληψης νιτρικών, μπορεί να οδηγήσει σε υπερπαραγωγή NO, το οποίο μπορεί να προκαλέσει αξονικό εκφυλισμό, νευροφλεγμονή και να οδηγήσει σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Khan S. et al., 2020).

Η αλλαγή στο μικροβίωμα μπορεί να οδηγήσει στην έκκριση ανοσογόνων λιποπολυσακχαριτών (Lipopolysaccharides, LPSs) και αμυλοειδών τα οποία διαθέτουν την ικανότητα να διαχέονται στον εγκέφαλο και να επιδεινώνουν τα συμπτώματα της AD. Ο RAGE (Receptor for advanced glycosylation products) μεσολαβεί στην εισροή αμυλοειδούς στον εγκέφαλο μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και ελέγχεται από πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperones) και από τις απολιποπρωτεΐνες E και J. Η LRP1 (Low-density lipoprotein receptor related protein 1) είναι γνωστό ότι ελέγχει την κάθαρση του αμυλοειδούς. Η εμφάνιση βλαβών σε αυτούς τους μηχανισμούς μεταφοράς συνδέεται με την εμφάνιση της AD. Επιπλέον, πρωτεΐνες που μοιάζουν με πρίον (prion) μπορούν να προκαλέσουν

διαενδοθηλιακή διείσδυση μονοκυττάρων ενισχύοντας τη φλεγμονή. Λόγω της αλλαγής στο μικροβίωμα του εντέρου και στη μεταφορά, τα αμυλοειδή που προέρχονται από βακτήρια μπορεί να διαρρεύσουν από τη γαστρεντερική διαδρομή και να αυξήσουν τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο TNFα, η IL10, η IL6, η IL17A, η IL12p40, η IL23p19 και η IL22. Το γεγονός αυτό μπορεί να αυξήσει περαιτέρω τα επίπεδα των ROS και να επάγει την ενεργοποίηση της σηματοδότηση του NF-kB. Αποτέλεσμα αυτού είναι η ανοδική ρύθμιση του προφλεγμονώδους miRNA-34a, προκαλώντας την προς τα κάτω ρύθμιση του TREM-2 (Trigger Receptor Expressed in Microglial/Myeloid Cell-2), το οποίο μπορεί να προκαλέσει εναπόθεση πεπτιδίου Αβ-42. Ορισμένα ιικά και βακτηριακά παθογόνα μπορούν επίσης να προκαλέσουν AD. Διαπιστώθηκε ότι ασθενείς μολυσμένοι με βακτήρια, όπως Chlamydia pneumonia, Borrelia burgdorferi και Helicobacter pylori, παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα Αβ-40 και Αβ-42 καθώς και αύξηση των επιπέδων των φλεγμονωδών μεσολαβητών που σχετίζονται με την AD (Khan S. et al., 2020).

1.5.7. Η υπόθεση των μεταλλικών ιόντων

Τέλος, έχει αναφερθεί η εύρεση συσσωρεύσεων μεταλλικών ιόντων σε εγκεφάλους ασθενών οι οποίοι έπασχαν από την AD. Μάλιστα, μεταλλικά ιόντα όπως ο χαλκός, ο σίδηρος και ο ψευδάργυρος φαίνεται να είναι αυξημένα κατά περίπου 5.7, 2.8 και 3.1 φορές, αντίστοιχα, σε AD εγκεφάλους σε σύγκριση με εγκεφάλους υγείων ατόμων. Τα μεταλλικά ιόντα αυτά δεν εμφανίζονται στην φυσιική τους κατάσταση αλλά ως σύμπλοκα αμυλοειδούς. Τα μεταλλικά ιόντα αυτά πιστεύεται ότι αντιδρούν με τις πλάκες αμυλοειδούς προκαλούν οξειδωτικό στρες και οδηγούν στον θάνατο τα γειτονικά κύτταρα εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος, συμβάλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση της AD (Ulaganathan S. et al., 2023).

1.6. Θεραπευτικές προσεγγίσεις της AD

Παρόλο που η AD αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα δημόσιας υγείας, προς το παρόν, υπάρχουν μόνο δύο κατηγορίες φαρμάκων, τα οποία έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία της νόσου, συμπεριλαμβανομένων των αναστολέων του ενζύμου χολινεστεράση (φυσικά, συνθετικά και υβριδικά ανάλογα) και των ανταγωνιστών NMDA (N-methyl d-aspartate)(Breijyeh Z. et al., 2020).

Αρκετές φυσιολογικές διεργασίες, οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά την AD οδηγούν στην καταστροφή εκείνων των κυττάρων, τα οποία παράγουν Ach μειώνοντας τη χολινεργική νευροδιαβίβαση στον εγκέφαλο. Οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης (Acetylcholinesterase inhibitors, AChEIs), οι οποίοι ταξινομούνται ως αναστρέψιμοι, μη αναστρέψιμοι και ψευδοαναστρέψιμοι, δρουν αναστέλλοντας τα ένζυμα χολινεστεράσης [AChE και BChE (Butyrylcholinesterase)] αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη διάσπαση της ACh, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων ACh στη συναπτική σχισμή (Breijyeh Z. et al., 2020).

Από την άλλη πλευρά, η υπερενεργοποίηση του NMDA-R (NMDA receptor) οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων εισροής Ca^{2+} , προάγοντας τον κυτταρικό θάνατο και τη συναπτική δυσλειτουργία. Οι ανταγωνιστές των NMDA-R αποτρέπουν την υπερενεργοποίηση του υποδοχέα και ως εκ τούτου αποτρέπουν την εισροή Ca^{2+} , αποκαθιστώντας την φυσιολογική του λειτουργία (Breijyeh Z. et al., 2020).

Οι δύο κατηγορίες φαρμάκων που προαναφέρθηκαν, φαίνεται να είναι αποτελεσματικές μόνο για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της AD (συμπτωματική θεραπεία), αλλά δεν είναι σε θέση να τη θεραπεύουν πλήρως ή να συμβάλουν στην πρόληψη της εμφάνισης της νόσου. Την τελευταία δεκαετία μόνο ελάχιστες κλινικές δοκιμές έχουν πραγματοποιηθεί για την AD, οι οποίες μάλιστα δεν ήταν επιτυχείς. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την κατανόηση της παθολογίας της AD και την ανάπτυξη επιτυχημένων θεραπευτικών προσεγγίσεων, οι οποίοι περιλαμβάνουν τον μη φυσιολογικό μεταβολισμό της πρωτεΐνης ταυ, το β-αμυλοειδές, την φλεγμονώδη απόκριση, την χολινεργική βλάβη και την βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (Breijyeh Z. et al., 2020). Έτσι, πρόσφατα αναπτύχθηκαν διάφορα φάρμακα, το καθένα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, με σκοπό την θεραπεία την νόσου (βλέπε Πίνακα 1). Ωστόσο, κανένα τους δεν κατάφερε να ολοκληρώσει με επιτυχία τις κλινικές δοκιμές. Για το σκοπό αυτό οι ερευνητές άρχισαν να αναπτύσσουν παράγοντες, οι οποίοι παρέχουν συμπτωματική ανακούφιση της AD (βλέπε Πίνακα 2)(Khan S. et al., 2020).

Πίνακας 1: Φάρμακα τα οποία αναπτύχθηκαν για την θεραπεία της AD (Khan S. et al., 2020).

Name of the Drug	Company	Mechanism of Action	Clinical Trial	Reason for Failure
Verubecestat	Merck	β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE 1) inhibitors	EPOCH trial APECS trial	No effect on slowing the progression of AD
Lanabecestat	Astra Zeneca & Eli Lilly	BACE 1 inhibitors	AMARANTH and DAYBREAK-ALZ	Failure of interim futility analysis
Atabecestat	Janssen	BACE 1 inhibitors	EARLY	Liver toxicity
Solanezumab	Eli Lilly	Monoclonal antibody for AB	EXPEDITION III (Phase III)	No positive effect on cognitive decline
Azeliragon	vTv Therapeutics	Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) inhibitor	STEADFAST (Phase III)	Lack of efficacy
Pioglitazone	Takeda and Zinfandel Pharmaceuticals	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR-γ)	-	-
Idalopirdine	Lundbeck & Otsuka	5HT6 antagonist	STARSHINE, STARBEAM, STARBRIGHT (Phase III)	Did not improve cognition

Πίνακας 2: Φάρμακα για την συμπτωματική ανακούφιση της AD τα οποία επί του παρόντος βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές (Khan S. et al., 2020).

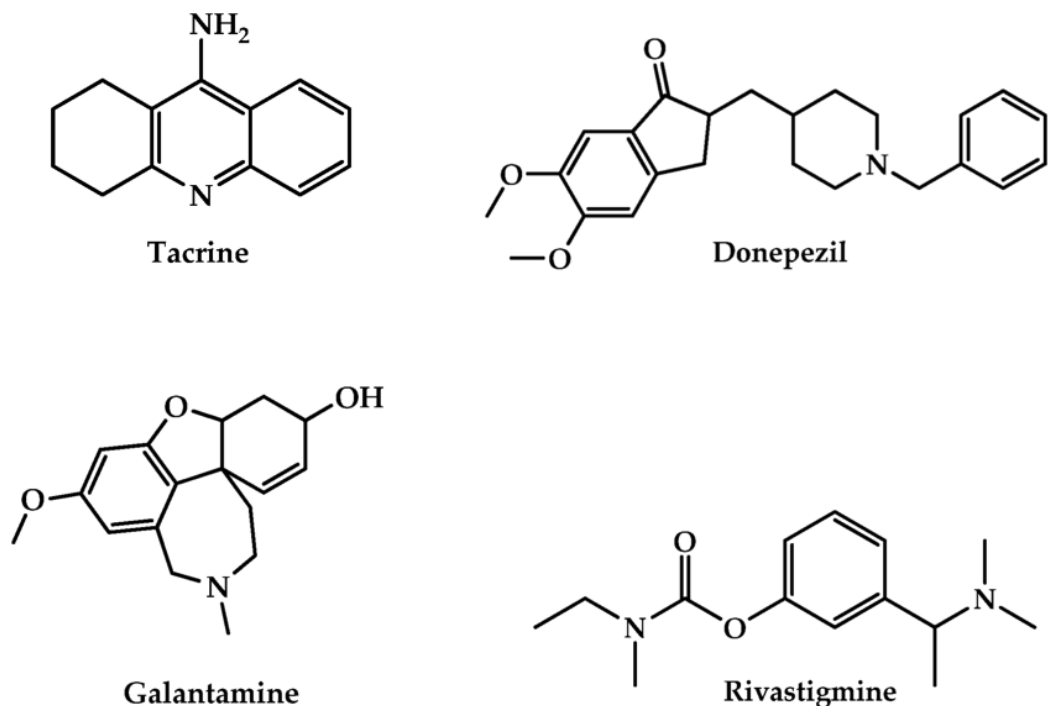
Name of the Drug	Company	Mechanism of Action	Clinical Trial	Symptoms to be Relieved
Brexiprazole	Otsuka & Lundbeck	D2 partial agonist	Phase III	agitation
Tetrahydrocannabinol	Johns Hopkins University	CB1/CB2 partial agonist	Phase II trials	
Nabilone	Sunnybrook Health Sciences Centre	semisynthetic cannabinoid derivative	small-scale phase III	
Pimavanserin	Acadia	selective 5-HT2A serotonin inverse agonist	phase II/III	psychotic
Suvorexant	Merck	dual antagonists of the orexin receptors	Phase III	insomnia
Lemborexant	Eisai	dual antagonists of the orexin receptors	Phase II	

Απεναντίας, οι περισσότεροι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου της AD, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις ή ο τρόπος ζωής, μπορούν να προληφθούν χωρίς ιατρική παρέμβαση. Μελέτες έδειξαν ότι η σωματική δραστηριότητα μπορεί να βελτιώσει την υγεία του εγκεφάλου και να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης AD ενεργοποιώντας την αγγείωση του εγκεφάλου, την πλαστικότητα, τη νευρογένεση και μειώνοντας τη φλεγμονή, μέσω της μείωσης της παραγωγής Αβ, οδηγώντας στη βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας σε ηλικιωμένα άτομα. Επιπλέον, η μεσογειακή διατροφή, η πνευματική/διανοητική δραστηριότητα και η ανώτερη εκπαίδευση μπορούν να μειώσουν την εξέλιξη της AD και την απώλεια μνήμης και να αυξήσουν την ικανότητα του εγκεφάλου και τις γνωστικές λειτουργίες. Αρκετές μελέτες αποκάλυψαν ότι παρέμβαση σε πολλούς τομείς, όπως ο τρόπος ζωής (διατροφή, άσκηση, γνωστική εξάσκηση), η καταστολή των συμπτωμάτων της AD και ο έλεγχος των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου, μπορούν να αυξήσουν ή να διατηρήσουν τη γνωστική λειτουργία, καθώς και να συμβάλουν στην πρόληψη της εμφάνισης νέων περιστατικών AD σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.1. Αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης

Σύμφωνα με τη χολινεργική υπόθεση, η AD οφείλεται στη μείωση της βιοσύνθεσης της ακετυλοχολίνης (ACh). Έτσι, η αύξηση των επιπέδων της ACh μέσω της αναστολής της AChE ενισχύει τη γνωστική λειτουργία, καθώς επίσης και τη λειτουργία των νευρικών κυττάρων. Η χρήση των αναστολέων AChE στοχεύει στην αναστολή της αποικοδόμησης της ACh στις συνάψεις, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση αυτής και την ενεργοποίηση των υποδοχέων της ACh. Η Τακρίνη (τετραϋδροαμινοακριδίνη, Tacrine, tetrahydroaminoacridine) αποτελεί το πρώτο εγκεκριμένο από τον FDA (Food and Drug Administration) φάρμακο αναστολέα AChE, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της AD. Ο εν λόγω αναστολέας δρα αυξάνοντας την συγκέντρωση ACh στους μουσκαρινικούς νευρώνες, ωστόσο αποσύρθηκε σχεδόν αμέσως από την αγορά λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης ανεπιθύμητων παρενεργειών, όπως η ηπατοτοξικότητα, καθώς επίσης και λόγω της έλλειψης ωφέλιμων αποτελεσμάτων, όπως διαπιστώθηκε σε αρκετές κλινικές δοκιμές (Breijyeh Z. et al., 2020).

Αργότερα, έκαναν την εμφάνισή τους αρκετοί άλλοι αναστολείς AChE, όπως η Δονεπεζίλη (Donepezil), η Ριβαστιγμίνη (Rivastigmine) και η Γαλανταμίνη (Galantamine), οι οποίες χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για τη συμπτωματική θεραπεία της AD. Μια άλλη στρατηγική που μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία της AD είναι η αύξηση της επαναπρόσληψης χολίνης και ως αποτέλεσμα, η αύξηση της σύνθεσης ακετυλοχολίνης στα προσυναπτικά άκρα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη στόχευση του μεταφορέα της χολίνης (CHT1), ο οποίος είναι υπεύθυνος για την παροχή χολίνης για την σύνθεση της ACh. Συνεπώς, η ανάπτυξη φαρμάκων, τα οποία να είναι ικανά να αυξήσουν την CHT1 στην πλασματική μεμβράνη μπορεί να αποτελέσει μελλοντικά ένα μέσο για την θεραπεία της AD (Breijyeh Z. et al., 2020).



Εικόνα 17: Απεικόνιση των χημικών δομών των εγκεκριμένων φαρμάκων για την συμπτωματική θεραπεία της AD (Tacrine, Donepezil, Galantamine και Rivastigmine) (τροποποιημένη από Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.1.1. Δονεπεζίλη (Donepezil)

Η Δονεπεζίλη συνιστά το κύριο φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται αυτή τη στιγμή για την θεραπεία της AD. Αποτελεί ένα παράγωγο ινδανοβενζυλοπιπεριδίνης (indanonebenzylpiperidine) και δεύτερης γενιάς αναστολέα AChE. Η Δονεπεζίλη συνδέεται με την ακετυλχολινεστεράση αναστρέψιμα και αναστέλλει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, οδηγώντας σε αύξηση της συγκέντρωσης ACh στις συνάψεις. Το εν λόγω φάρμακο φαίνεται να προκαλεί ανεκτές για τους ασθενείς ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ήπιες και παροδικές χολινεργικές παρενέργειες, οι οποίες σχετίζονται με το γαστρεντερικό και το νευρικό σύστημα. Η Δονεπεζίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της AD, όπως η βελτίωση της γνωστικής ικανότητας και της συμπεριφοράς, χωρίς όμως να παρατηρείται αλλαγή όσον αφορά την εξέλιξη της νόσου (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.1.2. Ριβαστιγμίνη (Rivastigmine)

Η ριβαστιγμίνη είναι ένας ψευδο-μη αναστρέψιμος αναστολέας των AChE και BuChE, που δρα δεσμεύοντας τις δύο ενεργές θέσεις της AChE (ανιονικές και estearic/στεατικές θέσεις), γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την πρόληψη της διάσπασης της ACh. Η BuChE εντοπίζεται κυρίως στα νευρογλοιακά κύτταρα και η δραστηρότητά της υπό φυσιολογικές συνθήκες συνιστά το 10% της δραστηρότητας της AChE. Αντίθετα κατά την AD, η δραστηρότητά της αυξάνεται σε 40-90%, ενώ συγχρόνως η δραστηρότητα της ACh μειώνεται, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η δράση της BuChE μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη μέτριας έως σοβαρής άνοιας. Η Ριβαστιγμίνη μεταβολίζεται στην περιοχή της σύναψης από τις AChE και BuChE. Ωστόσο, η διάσπασή της γίνεται πιο αργά σε σχέση με την ACh και για αυτόν τον λόγο καλείται ψευδο-μη αναστρέψιμος αναστολέας. Η ριβαστιγμίνη χρησιμοποιείται σε ήπιες έως μέτριες περιπτώσεις AD. Φαίνεται ότι βελτιώνει τις γνωστικές λειτουργίες και την επιτέλεση των καθημερινών δραστηριοτήτων. Η από του στόματος χορήγηση του φαρμάκου σχετίζεται

με ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η ναυτία, ο έμετος, η δυσπεψία, η εξασθένηση (asthenia), η ανορεξία και η απώλεια βάρους. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτές οι παρενέργειες αποτελούν τον κύριο λόγο διακοπής της λήψης του φαρμάκου, ωστόσο, μπορούν να αντιμετωπιστούν εγκαίρως και κατά συνέπεια το φάρμακο μπορεί να γίνει πιο ανεκτό. Η ριβαστιγμίνη μπορεί να χορηγηθεί επίσης μέσω διαδερμικών εμπλάστρων παρέχοντας ελεγχόμενη και συνεχή χορήγηση του φαρμάκου μέσω του δέρματος, με ενισχυμένη ανεκτικότητα και ικανοποίηση του φροντιστή. Επίσης, τα έμπλαστρα μπορούν να προσφέρουν χαμηλότερη δόση σε σύγκριση με τα χάπια, γεγονός, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των εμφανιζόμενων παρενεργειών. Οι περισσότεροι ασθενείς με AD υποφέρουν από απώλεια μνήμης και προβλήματα κατάποσης, τα οποία καθιστούν δύσκολη την χορήγηση από του στόματος φαρμάκων σε τακτική βάση. Επομένως, η χρήση διαδερμικών επιθεμάτων αποτελεί την καταλληλότερη μέθοδο για τη χορήγηση του φαρμάκου σε ασθενείς, που πάσχουν από AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.1.3. Γαλανταμίνη (Galantamine, GAL)

Η γαλανταμίνη αποτελεί ένα εκλεκτικό τριτογενές αλκαλοειδές ισοκινολίνης (tertiary isoquinoline alkaloid) και θεωρείται τυπικό φάρμακο πρώτης γραμμής για ήπιες έως μέτριες περιπτώσεις AD. Διαθέτει διπλό μηχανισμό δράσης, σύμφωνα με τον οποίον δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας της AChE, ενώ επιπρόσθετα μπορεί να ενεργοποιήσει τους νικοτινικούς υποδοχείς της ACh συνδεδεμένο αλλοστερικά στην α-υπομονάδα του υποδοχέα. Η γαλανταμίνη φαίνεται να βελτιώνει τα συμπεριφορικά συμπτώματα, την εκτέλεση καθημερινών δραστηριοτήτων και τη γνωστική απόδοση με καλή αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα, παρόμοια με άλλους αναστολείς της AChE. Πολλά συστήματα χορήγησης έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την βελτίωση της χορήγησης του φαρμάκου στον εγκέφαλο. Τα σωματίδια υδροξυαπατίτη, τα οποία περιέχουν δημήτριο (ceria-containing hydroxyapatite particles) έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιλεκτική χορήγηση του φαρμάκου στις προσβεβλημένες περιοχές του εγκεφάλου, ενώ τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (solid-lipid nanoparticles) και οι προσεγγίσεις νανογαλακτωματοποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη μεταφορά της γαλανταμίνης. Αμφότεροι οι τρόποι χορήγησης συνιστούν πολλά υποσχόμενες και ασφαλείς μεθόδους χορήγησης του φαρμάκου. Τέλος, έχουν αναπτυχθεί ρινικά GAL νανοσωματίδια συμπλόκου υδροβρωμιδίου/χιτοζάνης (nasal GAL hydrobromide/chitosan complex nanoparticles), τα οποία εμφανίζουν καλή φαρμακολογική αποτελεσματικότητα, ενώ επίσης και τα επιθέματα έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς για μια μορφή ελεγχόμενης απελευθέρωσης συγκεκριμένης δόσης του φαρμάκου (Breijyeh Z. et al., 2020).

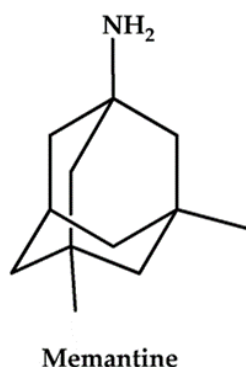
1.6.2. Ανταγωνιστές NMDA (N-methyl d-aspartate)

Ο NMDA-R πιστεύεται ότι κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην παθοφυσιολογία της AD. Η διέγερση του NMDA-R έχει ως αποτέλεσμα την εισροή Ca^{2+} ενεργοποιώντας την μεταγωγή σήματος, η οποία επάγει την μεταγραφική ενεργοποίηση εκείνων των γονιδίων, που σχετίζονται με την μακροχρόνια ενδυνάμωση (Long-Term Potentiation, LTP), η οποία θεωρείται ότι είναι σημαντική για τη συναπτική νευροδιαβίβαση, την πλαστικότητα και τον σχηματισμό της μνήμης. Η υπερβολική ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA προκαλεί ανώμαλο επίπεδο σηματοδότησης Ca^{2+} και υπερδιέγερση του γλουταμικού, το οποίο αποτελεί το κύριο διεγερτικό αμινοξύ στο κεντρικό νευρικό σύστημα, οδηγώντας σε διεγερτική τοξικότητα, συναπτική δυσλειτουργία, νευρωνικό θάνατο και εξασθένηση των γνωστικών λειτουργιών (Breijyeh Z. et al., 2020).

Αρκετοί μη συναγωνιστικοί NMDA-R ανταγωνιστές έχουν αναπτυχθεί και εισαχθεί σε κλινικές δοκιμές, ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές απέτυχαν λόγω χαμηλής αποτελεσματικότητας του φαρμάκου, αλλά και λόγω της εμφάνισης παρενεργειών. Η Μεμαντίνη (Memantine) αποτελεί το μόνο εγκεκριμένο φάρμακο αυτής της κατηγορίας, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής AD. Επιπλέον, αναπτύσσονται και άλλες ενώσεις μη συναγωνιστικών ανταγωνιστών των NMDA-R, όπως η RL-208 (3,4,8,9-tetramethyltetracyclo [4.4.0.0^{3,9}.0^{4,8}]dec-1-yl)methylamine hydrochloride), μια πολυκυκλική αμίνη, η οποία αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο φάρμακο για τη θεραπεία των γνωστικών προβλημάτων που σχετίζονται με την ηλικία και την AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.2.1. Μεμαντίνη (Memantine)

Η μεμαντίνη είναι ένας χαμηλής συγγένειας μη συναγωνιστικός ανταγωνιστής του NMDA-R. Η μεμαντίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής AD μόνη της ή σε συνδυασμό με AChEI. Το φάρμακο θεωρείται ότι είναι ασφαλές και καλά ανεκτό, ενώ επίσης έχει την ικανότητα να μπλοκάρει τον διεγερτικό υποδοχέα NMDA χωρίς να παρεμβαίνει στη φυσιολογική συναπτική διαβίβαση, καθώς η μεμαντίνη εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για τον NMDA-R και συνεπώς «εκτοπίζεται» ταχύτατα από αυτόν παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλουταμινικού, αποφεύγοντας έτσι την παρατεταμένη αναστολή του υποδοχέα, η οποία συνδέεται με την εμφάνιση αυξημένων παρενεργειών, ειδικά όσον αφορά τη μάθηση και τη μνήμη (Breijyeh Z. et al., 2020).



Εικόνα 18: Απεικόνιση της χημικής δομής της Μεμαντίνης (Memantine)(τροποποιημένη από Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.3. Γονιδιακή θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία στοχεύει στην αντιμετώπιση της πηγής μίας ασθένειας, δηλαδή στην επιδιόρθωση του ελαττωματικού DNA/γονιδίου/πρωτεΐνης στο οποίο οφείλεται η εκάστοτε ασθένεια, επιτρέποντας στα κύτταρα να διορθώσουν το πρόβλημα. Η γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει την εισαγωγή νέου γενετικού υλικού σε ζωντανά κύτταρα, η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια ιικών φορέων. Λόγω των πρόσφατων εξελίξεων όσον αφορά τις προσεγγίσεις που σχετίζονται με τη γονιδιακή θεραπεία με την χρήση ανασυνδυασμένων αδενο-συσχετιζόμενων ιών (recombinant Adeno-Associated Viruses, rAAVs), προβλέπεται να καταστεί δυνατή η θεραπεία ασθενειών στον άνθρωπο (Khan S. et al., 2020).

Η αποκάλυψη διαφόρων γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στην παθολογία της AD, άνοιξε τον δρόμο για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας στην αντιμετώπιση της AD. Σε μια προσπάθεια να προσδιοριστεί εάν οι εκφυλισμένοι νευρώνες, οι οποίοι παρατηρούνται κατά την AD, διατηρούν την ικανότητα να ανταποκρίνονται σε έναν αυξητικό παράγοντα του νευρικού συστήματος (Nerve Growth Factor, NGF), ο οποίος παρέχεται μετά την έναρξη της

νόσου, οι Tuszynski et al. (2015) υπέβαλαν δέκα ασθενείς με πρώιμη AD σε γονιδιακή θεραπεία κατά την οποία πραγματοποιήθηκε μεταφορά του γονιδίου που κωδικοποιεί τον NGF *ex vivo* ή *in vivo*. Τα ευρήματά τους έδειξαν θετική ανταπόκριση των εκφυλισμένων νευρώνων στον NGF, οι οποίοι εμφάνισαν κυτταρική υπερτροφία, αξονική εκβλάστηση και ενεργοποίηση δεικτών, οι οποίοι σχετίζονται με την λειτουργικότητα των νευρώνων. Η εν λόγω γονιδιακή θεραπεία οδήγησε σε εκβλάστηση των νευρώνων εξαιτίας του NGF, η οποία παρέμεινε για 10 χρόνια μετά τη μεταφορά του γονιδίου, ενώ η ίδια η θεραπεία θεωρήθηκε γενικά ασφαλής (Khan S. et al., 2020)(Tuszynski M. H. et al., 2015).

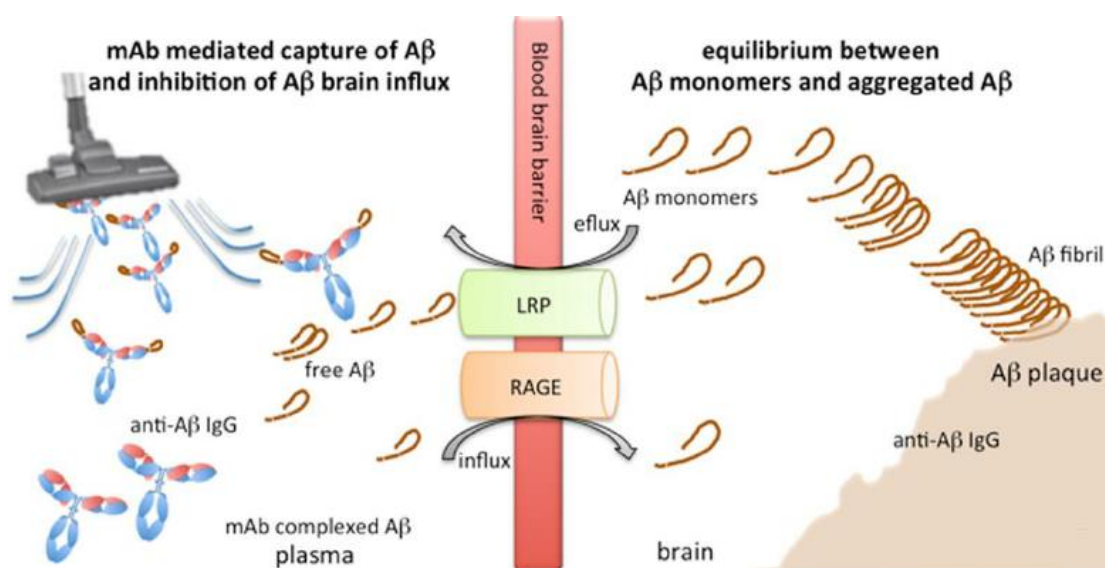
Σε μία άλλη μελέτη των Katsouri et al. (2016), οι επιστήμονες θέλοντας να διερευνήσουν το δυνητικό θεραπευτικό αποτέλεσμα του PGC-1α [PPARγ-coactivator-1α, αποτελεί συμπαραγοντας για μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο PPARγ (Peroxisome proliferator-activated receptor-γ) και εμπλέκεται στη ρύθμιση των μεταβολικών γονιδίων, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και τη μιτοχονδριακή βιογένεση, ενώ επίσης ρυθμίζει τη μεταγραφή του ενζύμου διάσπασης της β-APP, την BACE1] δημιούργησαν έναν φακοϊκό φορέα (lentiviral vector) για την έκφραση του ανθρώπινου PGC-1α και τη στόχευσή του μέσω στερεοταξικής μεταφοράς στον υποκάμφο και τον φλοιό διαγονιδιακών ποντικών APP23 στο προκλινικό στάδιο της νόσου. Η εν λόγω θεραπεία μείωσε την ανάπτυξη της AD. Τέσσερις μήνες μετά την χορήγηση της θεραπείας, τα ποντίκια APP23 που έλαβαν θεραπεία με hPGC-1α εμφάνισαν βελτιωμένη χωρική μνήμη και μνήμη αναγνώρισης ταυτόχρονα με σημαντική μείωση της εναπόθεσης Αβ, η οποία σχετίζεται με μείωση της έκφρασης της BACE1. Η υπερέκφραση του hPGC-1α μείωσε τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών και της μικρογλοιακής ενεργοποίησης. Αυτή η επίδραση συνοδεύτηκε από αξιοσημείωτη διατήρηση των πυραμιδικών νευρώνων στην περιοχή CA3 του υποκάμφο και αυξημένη έκφραση νευροτροφικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η επιλεκτική επαγωγή του γονιδίου PGC-1α σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου είναι αποτελεσματική στη στόχευση του νευροεκφυλισμού, που σχετίζεται με την AD και έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτική παρέμβαση για την αντιμετώπιση της AD (Khan S. et al., 2020)(Katsouri L. et al., 2016).

Πρόσφατα, οι Rafii et al. (2018) ανέφεραν τα αποτελέσματα μιας τυχαιοποιημένης κλινικής δοκιμής κατά την οποία πραγματοποιήθηκε ενδοεγκεφαλικά στερεοτακτικά καθοδηγούμενη γονιδιακή παράδοση του NGF με την χρήση αδενο-συσχετιζόμενων ιικών φορέων AAV2 [Adeno-Associated Viral Vector (Serotype 2)] σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια AD, με σκοπό τη μακροχρόνια παροχή νευροτροφικής υποστήριξης στους χολινεργικούς νευρώνες και την αποτροπή της γνωστικής εξασθένησης καθώς και τη μείωση των τυπικών βιοδεικτών της AD. Η χορήγηση NGF με τη χρήση των AAV2 φορέων ήταν εφικτή και καλά ανεκτή, ωστόσο δεν οδήγησε σε κλινικά αποτελέσματα (Khan S. et al., 2020)(Rafii M. S. et al., 2018).

Τον Ιούνιο του 2018, επιστήμονες στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας της Μασαχουσέτης ανακάλυψαν μια θεραπεία για την AD. Με την χρήση μια τεχνικής γενετικής αποκοπής (gene editing) κατάφεραν να μετατρέψουν το γονίδιο της APOE4, το οποίο θεωρείται ότι ευθύνεται για την δημιουργία των πεπτιδίων Αβ στον εγκέφαλο, σε γονίδιο της APOE3 (Khan S. et al., 2020).

1.6.4. Ανοσοθεραπεία

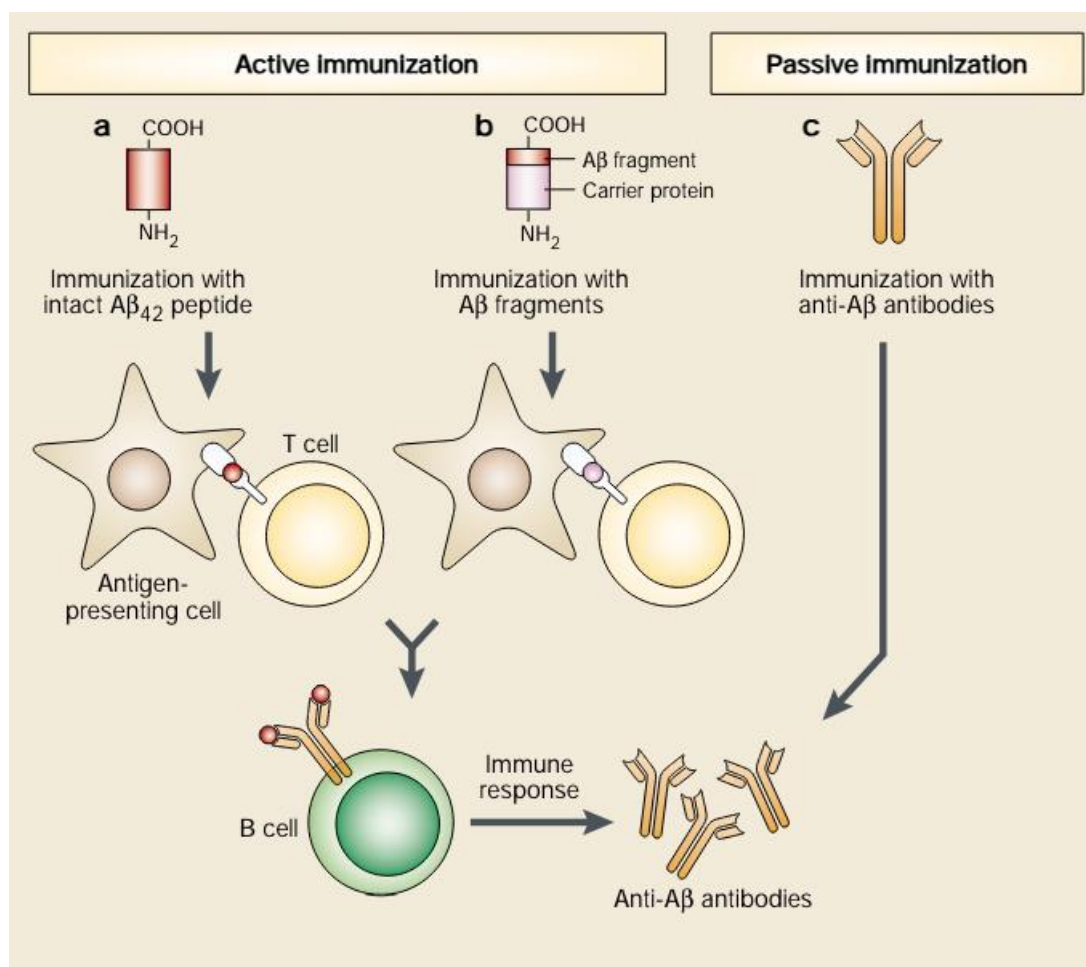
Διάφοροι μηχανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την ανοσοθεραπεία για το Αβ. Ο μηχανισμός διαλυτής ισορροπίας περιλαμβάνει αντισώματα, τα οποία εξουδετερώνουν και διαλυτοποιούν τις πλάκες Αβ τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όσο και περιφερειακά. Ο μηχανισμός φαγοκυττάρωσης βασίζεται στην οψωνοποίηση των πλακών Αβ, η οποία διεγείρει τη σχετιζόμενη με τη μικρογλοία φαγοκυττάρωση. Τα αντισώματα έχουν επίσης την ικανότητα να δεσμεύονται στον «σπόρο» του αμυλοειδούς, κατά τα αρχικά στάδια, και είναι σε θέση να εμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό του. Υπάρχουν αρκετοί άλλοι μηχανισμοί, όπως η άμεση μέθοδος (στην οποία η πλάκα Αβ είναι αποδεσμευμένη) και ο μηχανισμός περιφερικής βύθισης (αφαίρεση του Αβ από τον εγκέφαλο στο πλάσμα)(Khan S. et al., 2020).



Εικόνα 19: Μηχανισμός περιφερικής βύθισης. Τυπικά το Αβ μεταφέρεται μέσω του αιματοεγκεφαλικού και προς τις δύο κατευθύνσεις, δηλαδή και προς την περιφερειακή κυκλοφορία αλλά και προς τον εγκέφαλο μέσω των υποδοχέων LRP και RAGE, αντίστοιχα. Η ύπαρξη περιφερειακά anti-Aβ mAbs (π.χ. Solanezumab) οδηγεί στην σύλληψη του Αβ στην περιφερειακή κυκλοφορία, το οποίο τυπικά βρίσκεται σε σταθερή κατάσταση μεταξύ περιφέρειας και εγκεφάλου, και ως εκ τούτου δεν μπορεί πλέον να εισέλθει στον εγκέφαλο μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Συνεπώς παρατηρείται αυξημένη κάθαρση του Αβ καθώς και μειωμένη εισροή Αβ από το περιφερειακό αίμα στον εγκέφαλο λόγω του σχηματισμού συμπλόκων ανοσοσφαιρινών με το ελεύθερο Αβ στην περιφερειακή κυκλοφορία (Manoungou C. et al., 2013)

Σύμφωνα με την παθοφυσιολογία της AD, οι πλάκες Αβ αποτελούν τον πρωταρχικό στόχο για την πραγματοποίηση ανοσοθεραπείας. Διάφορες στρατηγικές ανοσοθεραπείας βρίσκονται υπό διερεύνηση για την AD, οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως την ενεργητική και την παθητική ανοσοποίηση. Ενεργός εμβολιασμός με το πεπτίδιο Αβ-42 μπορεί να διεγείρει τα Β-κύτταρα, τα Τ-κύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα επάγοντας ανοσοαπόκριση. Η ενεργός ανοσοποίηση με θραύσματα Αβ προσαρτημένα σε πρωτεΐνη φορέα, η οποία μοιάζει με επιτόπους βοηθητικών Τ-κυττάρων είναι μια άλλη προσέγγιση, η οποία χρησιμοποιείται για να διεγείρει τα Τ-κύτταρα οδηγώντας στην απελευθέρωση σηματοδοτικών κυτοκινών, οι οποίες επάγουν την απελευθέρωση αντισωμάτων από τα Β-κύτταρα. Άλλη μέθοδος ανοσοθεραπείας περιλαμβάνει παθητική χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων (monoclonal antibodies, mAb). Υπάρχουν διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία βρίσκονται υπό έλεγχο, τα οποία περιλαμβάνουν το bapineuzumab, το solanezumab, το gantenerumab, το crenezumab και το ronezumab, από τα οποία ορισμένα βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές φάσης 3. Ωστόσο, τα

περισσότερα από αυτά φαίνεται να έχουν σοβαρές παρενέργειες όπως οι σχετιζόμενες με το αμυλοειδές ανωμαλίες απεικόνισης (Amyloid related imaging abnormalities, ARIA), οι οποίες σχετίζονται με το αγγειογενές οίδημα ή υποδεικνύουν μικροαιμορραγία και αιμοσιδήρωση (Khan S. et al., 2020).



Εικόνα 20: Απεικόνιση των τριών διαφορετικών προσεγγίσεων οι οποίες χρησιμοποιούνται με σκοπό την παραγωγή αντισωμάτων έναντι το Αβ (Schenk D., 2002).

Διάφορα κατασκευασμένα αντισώματα ή αντισώματα δεύτερης γενιάς βρίσκονται στη φάση ανάπτυξης. Αυτά περιλαμβάνουν το BAN2401 (το οποίο δεσμεύεται επιλεκτικά σε μεγάλα διαλυτά πρωτοϊνίδια Αβ), το SAR255952 (το οποίο στοχεύει κυρίως τα διαλυτά πρωτοϊνίδια και τα ινώδη είδη του Αβ), το Aducanumab (το οποίο δεσμεύεται στο N-άκρο του Αβ₃₋₆), καθώς και άλλα. Τα αντισώματα αυτά είναι κυρίως κατασκευασμένα από τον άνθρωπο και διαθέτουν χαμηλή δεσμευτική δράση σε περιοχές Fcγ [Fragment Crystallizable Region (Constant) of IgG Immunoglobulins], περιοχές οι οποίες φαίνεται να εμπλέκονται κυρίως στις παρενέργειες, που παρατηρούνται κατά την χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων πρώτης γραμμής (Khan S. et al., 2020).

Πίνακας 3: Φάρμακα τα οποία βρίσκονται υπό διερεύνηση για την ενεργητική και την παθητική ανοσοθεραπεία της AD (Khan S. et al., 2020).

Name	Mechanism	Phase of Clinical Trial
ACI-24	Cause production of antibodies against A β without activating inflammatory cells.	Phase 1
ACI-35	Liposome based vaccine which generates antibodies against phosphorylated tau.	Phase 1
ABvac40	Targets C-terminus of A β 40	Phase 2
AADvac-1	Consist of Peptide (KDNIKHVPGGGS) which generate antibodies against tau.	Phase 3
CAD106	Virus based active vaccine which target A β without activating T cells.	Phase 2
LuAF20513 (engineered mixed peptide antigen)	Generate anti A β antibodies without microglial activation.	Phase 1
DNA based vaccine	Translation of A β based DNA leads to generation of antibodies.	Early stage of development
Passive Immunotherapeutic		
Drug	Mechanism	Phase of Clinical Trials
Aducanumab	Monoclonal antibody against A β	Phase 3
Crenezumab	Humanised monoclonal antibody which mainly identifies polymorphic form of A β	Phase 3
Gantenerumab	Binds to A β and induce phagocytosis by activating microglia.	Phase 3
BAN2401	Preferentially binds to soluble photofibrils of A β	Phase 2
Bapineuzumab (Humanised form of murine monoclonal antibody)	Target N- terminal region of A β	Failed in clinical trials
Solanezumab	Targets monomeric and non-fibrillary form of A β peptides	Phase 3
BIIB092	Targets N terminal fragment of tau	Phase 2
C2N 8E12	Targets extracellular tau aggregates.	Phase 2

1.6.5. Πεπτιδομιμητικά

Τα πεπτιδομιμητικά αποτελούν ανάλογα φυσικών πρωτεϊνών, τα οποία διαθέτουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με βιολογικούς στόχους επιδεικνύοντας ισοδύναμο ή ανώτερο βιολογικό αποτέλεσμα σε σχέση με την φυσιολογική πρωτεΐνη. Η πλειονότητα αυτών των πεπτιδίων μπορεί να διαχωριστεί σε πεπτίδια, τα οποία περιέχουν φυσικά ή τροποποιημένα αμινοξέα (Khan S. et al., 2020).

Τα πεπτομιμητικά (στην προκειμένη περίπτωση, οι πεπτιδικοί αναστολείς βλέπε παρακάτω) είναι δυνατόν να προέρχονται από την αλληλουχία του Αβ. Θα μπορούσαν επίσης να στοχεύσουν τη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau, καθώς και την ανθρώπινη β-σεκρετάση. Στην περίπτωση των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης tau και του πεπτιδίου Αβ οι κύριες θέσεις αναγνώρισης εντοπίζονται εντός του κεντρικού υδρόφοβου πυρήνα. Για την tau είναι η αμινοξική αλληλουχία VQIVYK ή VQIINK, ενώ για το Αβ είναι η αμινοξική αλληλουχία KLVFF. Τα πεπτιδομιμητικά αντιδρούν ή δεσμεύονται σε αυτές τις περιοχές και εμποδίζουν την περαιτέρω εξέλιξη της εναπόθεσής τους. Ορισμένα από αυτά έχουν επίσης την ικανότητα να διαλύουν τα ήδη υπάρχοντα συσσωματώματα των πρωτεϊνών αυτών (Khan S. et al., 2020).

Ως εκ τούτου, επειδή η αναστολή της συσσώρευσης των πρωτεϊνών αυτών δεν μπορεί από μόνη της να αποτρέψει την εμφάνιση της AD, αναπτύχθηκαν πολυλειτουργικά πεπτιδομιμητικά, τα οποία στοχεύουν άλλους παράγοντες που εμπλέκονται στην AD. Για παράδειγμα, το πολυλειτουργικό πεπτιδομιμητικό Thy-KSrVSrFSr(P5) (αναπτύχθηκε με βάση τη θέση αναγνώρισης KLVFF) αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα του Αβ. Το εν λόγω πεπτιδομιμητικό διεγείρει την αποικοδόμηση του Αβ ενεργοποιώντας τον μηχανισμό

αυτοφαγίας σε ένα μοντέλο ζύμης. Ένα άλλο παράδειγμα περιλαμβάνει το πολυλειτουργικό πεπτιδομιμητικό GHKSrVSrFsr(P6), το οποίο χηλικοποιεί τον Cu^{2+} ο οποίος απελευθερώνεται από το σύμπλοκο $\text{A}\beta 42\text{-Cu}^{2+}$, προστατεύοντας το πλασμιδιακό DNA καθώς και άλλα κύτταρα από την τοξικότητα που προκαλείται από τις ROS και τα μέταλλα (Khan S. et al., 2020).

Υπάρχουν διάφορα πεπτιδομιμητικά, τα οποία έχουν σχεδιαστεί κατά των συσσωματωμάτων του Αβ. Τα πεπτιδομιμητικά αυτά θα μπορούσαν να διακριθούν σε πεπτίδια, τα οποία στοχεύουν τον κεντρικό υδρόφοβο πυρήνα (KLVFFA) ή το c-άκρο του μορίου. Τα πεπτιδομιμητικά τα οποία στοχεύουν τον κεντρικό υδρόφοβο πυρήνα και τα οποία περιέχουν φυσικά αμινοξέα περιελάμβαναν το Αβ (15-22), το Αβ (16-23), το Αβ (17-24), το iΑβ11 (RDLPPFPVRID), το iΑβ5 (LPFFD), το iΑβ5p (Ac-LPFFD-amide), καθώς και άλλα. Τα πεπτιδομιμητικά τα οποία στοχεύουν τον κεντρικό υδρόφοβο πυρήνα και τα οποία περιέχουν τροποποιημένα αμινοξέα περιλαμβάνουν το PPI-368 [cholyI-(LVFFA) -OH], το PPI-433 [cholyI-(lvffa) -OH], το PPI457 [cholyI-(lvffa)-NH₂], το NH₂-K (Me-L) V (Me-F) F(Me-A) ECONH₂, το rgklvga, το kklvffarrrra, το kklvffa, καθώς και άλλα. Οι πεπτιδικοί αναστολείς οι οποίοι στοχεύουν στο C-άκρο και περιέχουν φυσικά αμινοξέα περιλαμβάνουν το Gly-Val-Val-Ile-Ala-NH₂, το Arg-Val-Val-Ile-Ala-NH₂, το Αβ(31-42), το Αβ(39-42), το Αβ(20-29), τις ταχυκινίνες (tachykinins), καθώς και άλλα. Ενώ οι πεπτιδικοί αναστολείς οι οποίοι περιέχουν τροποποιημένα αμινοξέα περιλαμβάνουν το Pr-IIGLA (propionyl-Ile-Ile-Gly-Leu amide), το RIIGLA, το Αβ(25-35) με Gly33 N-μεθυλιωμένη και Leu34 N-μεθυλιωμένη, N-μεθυλιωμένα εξαπεπτίδια (28-31), καθώς και άλλα (Khan S. et al., 2020).

1.6.6. Χηλικοί παράγοντες μετάλλων

Η αλληλεπίδραση των μετάλλων με το Αβ επάγει τη δημιουργία ROS, ενώ επιπρόσθετα οδηγεί σε μη φυσιολογική ομοιοστάση των ιόντων μετάλλων, η οποία συνδέεται με την παθογένεση της AD. Οι χηλικοί παράγοντες μετάλλων διαθέτουν την ικανότητα να διασπούν το σύμπλεγμα Αβ-μέταλλου, αποκαθιστώντας την ομοιοστάση των μεταλλικών ιόντων και ως εκ τούτου μειώνουν τη νευροτοξικότητά τους. Οι χηλικοί παράγοντες έχουν συνήθως χαμηλό μοριακό βάρος, μικρό μοριακό μέγεθος και ουδέτερο ή χαμηλό φορτίο γεγονός το οποίο τους επιτρέπει να διασχίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Οι χηλικοί παράγοντες δεν παρουσιάζουν ισχυρή ειδική δράση προς τα μεταλλικά ιόντα, καθώς αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε εξάντληση των επιπέδων τους, οδηγώντας σε μη φυσιολογική συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων (Khan S. et al., 2020).

Κατά την AD το επίπεδο των μεταλλικών ιόντων στον εγκέφαλο κυρίως του χαλκού, του σιδήρου και του ψευδαργύρου αυξάνεται σχεδόν 3 φορές σε σχέση με το φυσιολογικό τους επίπεδο. Αποτέλεσμα αυτού είναι, τα τρία αυτά μεταλλικά ιόντα να είναι εκείνα τα οποία θα πρέπει να στοχευθούν για χηλικοποίηση για την αντιμετώπιση της AD. Η Δεφεροξαμίνη (Deferoxamine, DFO) και η Δεφεριπρόνη (Deferiprone) είναι οι κύριοι χηλικοί παράγοντες μετάλλων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την χηλικοποίηση του σιδήρου. Οι παράγοντες αυτοί αντιμετωπίζουν την εξασθένηση της μνήμης που παρατηρείται λόγω του σιδήρου, ενώ επιπρόσθετα εμποδίζουν την παραγωγή ROS, καθώς και την τοξικότητα που προκαλείται από το μέταλλο. Υπάρχουν διάφορα ανάλογα, τα οποία στοχεύουν τα ιόντα χαλκού, αυτά περιλαμβάνουν την διθειοανθρακική πυρρολιδίνη (Pyrrolidine Dithiocarbonate, PDTC), τα παράγωγα πυριδίνης, τα παράγωγα της ανηγμένης βάσης Schiff, το Bis(hydrazide), το bis(thiosemicarbazones)(BTSC), τα πεπτίδια και οι πολυλειτουργικοί συνδέτες (Khan S. et al., 2020).

Η Κλιοκινόλη (Clioquinol), η οποία ανήκει στην τάξη της 8-υδροξυκινολίνης (8-hydroxyquinoline) έχει δείξει καλά αποτελέσματα όσον αφορά τη θεραπεία της AD. Αποτελεί έναν δισχιδή συνδέτη, ο οποίος διαθέτει δραστηριότητα 2:1 έναντι των ιόντων χαλκού και του ψευδαργύρου. Είναι γνωστό ότι μεταφέρει ιόντα μετάλλων από το εξωκυττάριο περιβάλλον προς το ενδοκυτταρικό περιβάλλον συμβάλλοντας στη διατήρηση της ισορροπίας των μεταλλικών ιόντων, ενώ επιπρόσθετα έχει την ικανότητα να διαλύει τα συσσωματώματα Αβ-Cu²⁺/Zn²⁺ (Khan S. et al., 2020).

Μια άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει το σχεδιασμό υβριδικών πολυλειτουργικών διαμορφωτών (Hybrid Multifunctional Modulators, HMM). Οι HMM αναστέλλουν την σχετιζόμενη με μεταλλικά ιόντα συσσώρευση του Αβ και αποτρέπουν τη μιτοχονδριακή βλάβη. Μεταξύ αυτών, ο TGR86 παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την αναστολή του Αβ απομονώνοντας το από ιόντα χαλκού, ακολουθούμενο από τον TGR88, τον TGR87 και τον Clq. Αυτοί συνδέονται κυρίως στο ²⁰FAEDVGSNKG²⁹ των ισομορφών Αβ-42. Ο TGR86 έχει την ικανότητα να σχηματίζει πρόσθετους δεσμούς υδρογόνου με την περιοχή Asn27, Lys28 και Ser26 του Αβ λόγω των οποίων εμφανίζει μέγιστη δραστηριότητα. Επιπρόσθετα, ο TGR86 φαίνεται να αυξάνει και την βιωσιμότητα των κυττάρων. Οι ROS αποτελούν έναν από τους κύριους, σχετιζόμενους με την AD, παράγοντες οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν νευροτοξικότητα, συνεπώς η χρήση χηλικών παραγόντων μετάλλων για την αντιμετώπισή τους θα μπορούσε να αποτελέσει την καλύτερη γραμμή θεραπείας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της νόσου στο μέλλον (Khan S. et al., 2020).

1.6.7. Πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί (Chaperones)

Μεταλλάξεις ή διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν στη μη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συσσωματωμάτων αυτών που είναι τοξικά και η συσσώρευσή τους φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η AD. Γενικά, τα κύτταρα διαθέτουν συστήματα ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών (Protein Quality Control Systems, PQC Systems) τα οποία είναι υπεύθυνα να αναστέλλουν την κακή αναδίπλωση των πρωτεϊνών πριν αυτές ασκήσουν τις τοξικές τους επιδράσεις. Με την ηλικία, αυτή η ισορροπία αλλάζει και οι λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες κατακλύζουν το σύστημα PQC, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί το σύστημα απόκρισης σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες του κυττάρου (Unfolded Protein Response, UPR), το οποίο επάγει την παύση της πρωτεϊνοσύνθεσης και αυξάνει την παραγωγή των πρωτεϊνών μοριακών συνοδών (Breijyeh Z. et al., 2020).

Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί είναι υπεύθυνες για τη σωστή λειτουργία και μεταφορά άλλων πρωτεϊνών στον κυτταρικό προορισμό τους. Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί εμπλέκονται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του συστήματος PQC. Ως εκ τούτου, τα μόρια αυτά θεωρούνται ως ένας πολλά υποσχόμενος στόχος για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Τα μόρια αυτά μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες (Breijyeh Z. et al., 2020):

1. Τις πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς, οι οποίες βοηθούν άλλες μη φυσικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες να αναδιπλωθούν ή να ξεδιπλωθούν, όπως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, Hsps) η υπερέκφραση των οποίων ενέχει νευροπροστατευτικά αποτελέσματα.
2. Τους φαρμακολογικούς συνοδούς, ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (ένζυμα ή μόρια συνδέτη-υποδοχέα ή επιλεκτικά δεσμευτικά μόρια), οι οποίοι προκαλούν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, σταθεροποιούν τη δομή τους και αποκαθιστούν τη λειτουργία τους.

3. Τους χημικούς συνοδούς, ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που διακρίνονται σε δύο ομάδες, τους ωσμωλύτες και τις υδρόφοβες ενώσεις. Τα μέλη και των δύο αυτών ομάδων δεν έχουν συγκεκριμένο μηχανισμό δράσης, ενώ επίσης προκειμένου να ασκήσουν την θεραπευτική τους δράση απαιτείται η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων αυτών των μορίων.

1.6.7.1. Πρωτεΐνες Θερμικού σοκ (Hsps)

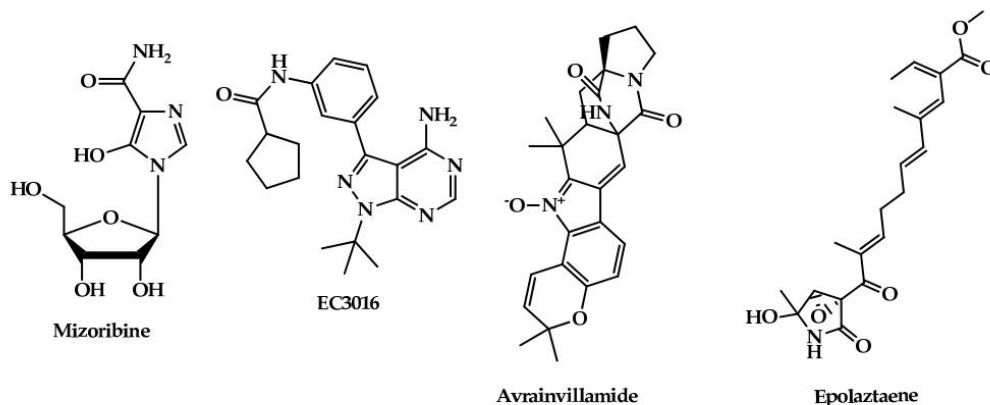
Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί μπορεί να είναι είτε ενδοκυττάριας, όπως στην περίπτωση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (π.χ. Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 και Hsp110), είτε εξωκυττάριας, όπως η Clusterin και η alpha-macroglobulin. Οι HSPs κατέχουν ουσιαστικό ρόλο στη διαδικασία αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και προστατεύουν τα κύτταρα από επιβλαβή σχετιζόμενα με το στρες γεγονότα. Υπάρχουν δύο οικογένειες Hsps:

- A. Οι κλασικές Hsps οι οποίες διαθέτουν μία θέση δέσμευσης για την ATP και οι οποίες έχουν μοριακό βάρος 60 kD ή περισσότερο. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει τις Hsp100, Hsp90, Hsp70 και Hsp60.
- B. Τις μικρές Hsps οι οποίες στερούνται θέσης δέσμευσης για την ATP και οι οποίες έχουν μοριακό βάρος 40 kD ή λιγότερο. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει τις αB-crystalline, Hsp27, Hsp20, HspB8 και HspB2/B3.

Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να βοηθήσουν άλλες Hsps στη λειτουργία αναδίπλωσής τους. Η αποτυχία αυτών των μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και πολλές άλλες καταστάσεις, οι οποίες προκαλούν βλάβη, απώλεια νευρώνων και εξέλιξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Διαφορετικές HSPs μπορούν να εμποδίσουν τη διαδικασία συσσωμάτωσης των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, όπως οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες Αβ και τau, και να προάγουν την αποικοδόμησή τους (Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.7.1.1. Hsp60

Η Hsp60 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Ο ρόλος της στην AD δεν είναι ξεκάθαρος. Ορισμένοι πιστεύουν ότι η πρωτεΐνη αυτή ενέχει προστατευτικό ρόλο, ενώ άλλοι πιστεύουν ότι έχει επιβλαβή επίδραση, καθώς η υπερέκφρασή της από την ενεργοποιημένη μικρογλοία επάγει την αύξηση προφλεγμονωδών παραγόντων όπως ο TLR-4 (toll-like receptor 4), οι οποίοι προάγουν τον νευρωνικό θάνατο. Επομένως, η αναστολή της ενεργοποιημένης μικρογλοίας και της έκφρασης της Hsp60 αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την πρόληψη νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Ενώσεις οι οποίες αναστέλλουν την Hsp60 είναι η Mizoribine (ανοσοκατασταλτικό) και η Pyrazolopyrimidine EC3016. Και οι δύο ενώσεις δρουν αναστέλλοντας τη δράση της ATPάσης της Hsp60 και αναστέλλοντας την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Από την άλλη πλευρά, η Anrainvillamide, ένας μυκητιασικός μεταβολίτης, και το Erolactaene, ένας βακτηριδιακός μεταβολίτης, δρουν δεσμεύοντας τα υπολείμματα κυστεΐνης της Hsp60 και αναστέλλουν τη δράση αναδίπλωσής της (Breijyeh Z. et al., 2020).

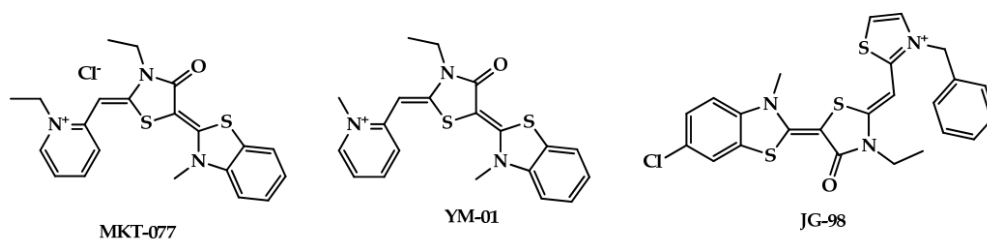


Εικόνα 21: Απεικόνιση της χημικής δομής της Mizoribine, της EC3016, της Avrainvillamide και του Epolaztaene (τροποποιημένη από Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.7.1.2. Hsp70

Μελέτες έχουν δείξει ότι η Hsp70 συνδέεται με το Αβ42 και αποτρέπει την αυτοσυσσώρευσή του. Η Hsp70 διαθέτει τόσο ενδοκυττάρια, όσο και εξωκυττάρια λειτουργία, η οποία φαίνεται να προστατεύει από τη νευροτοξικότητα που παρατηρείται λόγω του Αβ42 και τη συναπτική απώλεια. Η Hsp70 διαθέτει επίσης την ικανότητά να συνδέεται τόσο με την πρωτεΐνη tau, όσο και με την υπερφωσφορυλιωμένη της μορφή, αποτρέποντας τον σχηματισμό της, μειώνοντας τη συσσώρευση και προάγοντας τη δέσμευση της tau στους μικροσωληνίσκους. Η Hsp70 δρα ενεργοποιώντας τα μικρογλοιακά κύτταρα, το ένζυμο αποικοδόμησης της ινσουλίνης (Insulin-Degrading Enzyme, IDE) και τον TGF-β1 (Tumor Growth Factor-β1), επάγοντας την αποικοδόμηση των β-αμυλοειδών και αποτρέποντας την εξασθένηση της μνήμης. Κάποιες μελέτες σε ιστό AD εγκεφάλου έδειξαν συσχέτιση της υπερέκφρασης της Hsp70 και της παρουσίας ενεργοποιημένης γλοίας και «στρεσαρισμένων» νευρώνων, ενώ επιπρόσθετα βρέθηκε ότι η Hsp70 σχετίζεται με εξωκυττάρια εναποθέσεις, που παρατηρούνται κατά την AD (Breijyeh Z. et al., 2020).

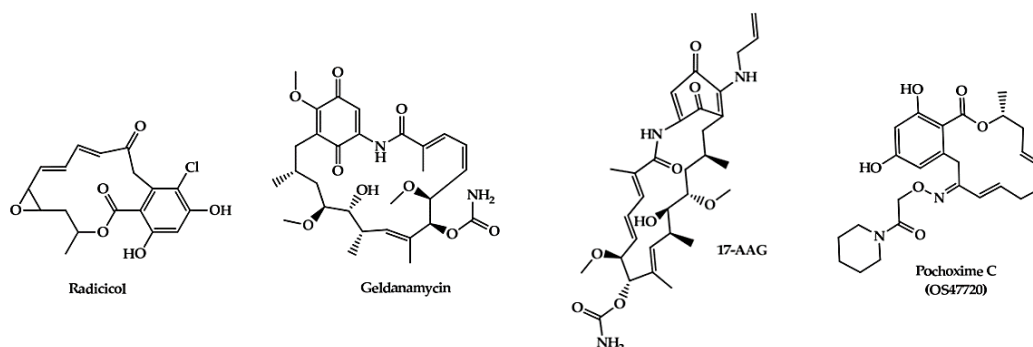
Φαρμακευτικές θεραπείες, οι οποίες στοχεύουν την Hsp70 (κυρίως αναφέρονται σε αντικαρκινικά φάρμακα, τα οποία αναστέλλουν τη θέση δέσμευσης της ATP στην Hsp70), θεωρούνται υποψήφιος για την θεραπεία της AD λόγω της ικανότητάς τους να μειώνουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης tau τόσο in vitro, όσο και ex vivo. Το MKT-077(1-ethyl-2-((Z)-((E)-3-ethyl-5-(3-methylbenzo[d]thiazol-2(3H)-ylidene)-4-oxothiazolidin-2-ylidene)methyl) pyridin-1-ium chloride), είναι μια αντικαρκινική ένωση ροδακυανίνης (rhodacyanine), η οποία συνδέεται με τη μορταλίνη, μια μιτοχονδριακή Hsp70, και δρα ως αντιπολλαπλασιαστικός παράγοντας, αλλά η χρήση αυτής της ένωσης σταμάτησε λόγω τοξικών ανεπιθύμητων ενεργειών και χαμηλής διείσδυσης μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Από την άλλη πλευρά, το YM-01, ένα πιο ισχυρό παράγωγο του MKT-077, αναπτύχθηκε με μία μόνο αντικατάσταση της αιθυλικής ομάδας στο πυριδινικό άζωτο του MKT-077 με μια μεθυλομάδα. Το JG-98 είναι επίσης ένα παράγωγο του MKT-077 με 60 φορές υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης για την Hsp70 από το YM-01 (Breijyeh Z. et al., 2020).



Εικόνα 22: Απεικόνιση της χημικής δομής του MKT-077, του YM-01 και του JG-98 (τροποποιημένη από Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.7.1.3. Hsp90

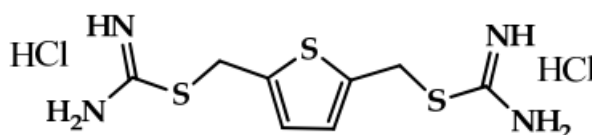
Η Hsp90 έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau. Η αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης tau μέσω της μείωσης των κινασών της tau, οι οποίες όταν υπερενεργοποιούνται ευθύνονται για την παθολογία της tau. Οι αναστολείς της Hsp90 χρησιμοποιούνται γενικά για τη θεραπεία του καρκίνου, ωστόσο πρόσφατα άρχισαν να θεωρούνται ως μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία για την AD. Η Radicicol (RDC) και η Geldanamycin (GA) αποτελούν δύο αναστολείς της Hsp90. Η GA είναι μια φυσική αντιμυκητιασική ένωση και αποτελεί τον πρώτο αναστολέα της Hsp90 που ανακαλύφθηκε. Οι μελέτες για τον εν λόγω αναστολέα διακόπηκαν λόγω της τοξικότητάς του. Από την άλλη πλευρά, το 17-AAG (17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin) αποτελεί ένα παράγωγο της GA, το οποίο όμως εμφανίζει χαμηλότερη τοξικότητα και καλύτερο φαρμακοκινητικό προφίλ και το οποίο έδειξε καλή βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας επάγοντας επιπλέον την ενεργοποίηση και άλλων HSPs, όπως της Hsp70. Επιπλέον, η χορήγηση του 17-AAG σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού οδήγησε σε μείωση των NFTs μέσω του έμμεσου αποκλεισμού της οδού φωσφορυλίωσης της tau. Το Pochoxime C (OS47720) αποτελεί ένα διαπερατό στο κεντρικό νευρικό σύστημα αναστολέα της Hsp90, ο οποίος εμφάνισε καλό προφίλ ασφάλειας και αποτελεσματικότητας όταν δοκιμάστηκε σε ένα μοντέλο ποντικού της AD. Μελέτες αποκάλυψαν ότι το OS47720 δρα ενισχύοντας τη συναπτική λειτουργία μέσω της ενεργοποίησης του HSF-1 (Heat Shock Factor 1), καθώς και μέσω εξαρτώμενων μεταγραφικών συμβάντων. Συνεπώς, η στόχευση των HSPs αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την ανάπτυξη φαρμάκων για τη μείωση των παθογόνων επιπέδων της πρωτεΐνης tau, καθώς και την αποκατάσταση της φυσιολογικής της ομοιόστασης (Breijyeh Z. et al., 2020).



Εικόνα 23: Απεικόνιση της χημικής δομής της Radicicol, της Geldanamycin, του 17-AAG και του Pochoxime C (OS47720) (τροποποιημένη από Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.7.2. Vacuolar sorting protein 35 (VPS35)

Η συσσώρευση πρωτεϊνών σε νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα οδηγεί σε διαταραχή της ομοιόστασης των κυτταρικών πρωτεϊνών. Το ενδοσωμικό-λυσosomal σύστημα είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά πρωτεϊνών για ανακύκλωση και αποικοδόμηση. Οποιαδήποτε δυσλειτουργία στο σύστημα αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών, όπως η AD. Το ρετρομερές είναι ένα σύμπλεγμα ρυθμιστικών πρωτεϊνών, το οποίο αποτελείται από την sorting nexin (SNX1, 2, 5, 6) και vacuolar sorting proteins (VPS 26, 29, 35), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά μορίων από τα ενδοσωμάτια στο δίκτυο trans-Golgi. Η απώλεια της λειτουργίας του ρετρομερούς έχει ως αποτέλεσμα την προς τα κάτω ρύθμιση του VPS35, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του σχηματισμού Αβ, να προκαλέσει γνωστικές βλάβες, καθώς και συναπτική δυσλειτουργία. Έρευνα, σκοπός της οποίας ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της υπερέκφρασης VPS35 σε εγκεφάλους ποντικών 3xTg στη λειτουργία της μνήμης, έδειξε ότι η υπερέκφραση της VPS35 οδήγησε σε σημαντική μείωση του πεπτιδίου Αβ και της νευροπαθολογίας της tau (διαλυτή, αδιάλυτη και φωσφορυλιωμένη tau), ενώ επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση της νευροφλεγμονής και βελτίωση της συναπτικής λειτουργίας. Επομένως, η VPS35 αποτελεί έναν σημαντικό πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για τη θεραπεία της AD. Ένα μικρό φαρμακολογικό μόριο συνοδός, παράγωγο της θειοφαινοθειουρίας (thiophenethiourea), το οποίο ονομάζεται R55 (thiophene-2,5-diylbis (methylene)dicarbamimidothioatedihydrochloride), μπορεί να ενισχύσει τη σταθερότητα και τη λειτουργία του ρετρομερούς αυξάνοντας τις πρωτεΐνες του ρετρομερούς, μετατοπίζοντας το AOO από το ενδόσωμα και μειώνοντας την παθογόνο επεξεργασία της APP, και συνεπώς μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό μόριο για νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Breijyeh Z. et al., 2020).



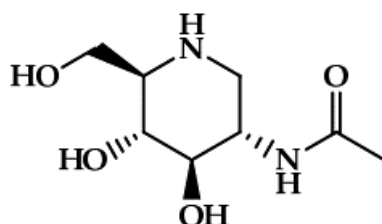
R55

Εικόνα 24: Απεικόνιση της χημικής δομής του R55 (τροποποιημένη από Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.7.3. OT1001

Μελέτες έδειξαν ότι η συσσώρευση γαγγλιοσιδών έχει συσχετιστεί με κακή αναδίπλωση και συσσώρευση πρωτεϊνών σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Μη φυσιολογικά επίπεδα monosialoganglioside (GM1, GM2 και GM3) έχουν αναφερθεί σε εγκεφάλους AD. Οι μεταλλαγμένες μορφές του Αβ, όπως η Ολλανδική μετάλλαξη APPE693Q, έδειξαν ευαισθησία στις ιδιότητες προ-συσσωμάτωσης του GM2 και του GM3, με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκων πεπτιδίων Αβ με γαγγλιοσίδες (ganglioside-bound Αβ (GAβ) peptide) η δημιουργία των οποίων επιταχύνει στην συνέχεια τη συσσώρευση πεπτιδίων Αβ. Η β-hexosaminidase (β-hex) είναι ένα λυσοσωμικό ένζυμο, το οποίο δρα καταβολίζοντας το γαγγλιοσίδιο GM2. Αύξηση της δραστηριότητάς του μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων του GM2 και της συσσώρευσης και συσσώματωσης του Αβ. Μικρά μόρια όπως οι φαρμακολογικοί συνοδοί

(Pharmacological Chaperones, PC) μπορούν επιλεκτικά να δεσμεύουν και να σταθεροποιούν πρωτεΐνες αγρίου τύπου και να αποκαθιστούν την κανονική αναδίπλωση τους. Το OT1001 είναι ένα iminosugar PC, το οποίο στοχεύει την β-hex αυξάνοντας το επίπεδό της στον εγκέφαλο και οδηγώντας σε μείωση της παθολογίας GAβ. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία φέρουν την Ολλανδική μετάλλαξη APPE693Q έδειξαν ότι το OT1001 έχει καλές φαρμακοκινητικές ιδιότητες, καλή ικανότητα διείσδυσης στον εγκέφαλο και ανεκτικότητα, με χαμηλότερες παρενέργειες. Αυτά καθιστούν την ένωση καλό υποψήφιο φάρμακο για την αύξηση της δράσης της β-hex (Breijyeh Z. et al., 2020).



OT1001

Εικόνα 25: Απεικόνιση της χημικής δομής του OT1001 (τροποποιημένη από Breijyeh Z. et al., 2020).

1.6.8. Theranostics

Το Theranostics αποτελεί την πιο πρόσφατη τεχνολογία, η οποία χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της AD. Η τεχνολογία αυτή συνδυάζει θεραπευτικά και διαγνωστικά εργαλεία αντί να τα χρησιμοποιεί μεμονωμένα. Οι νανοράβδοι χρυσού (Gold nanorods) συνδεδεμένοι/συζευγμένοι με δύο γνωστούς αναστολείς του Αβ (Αβ15-20 και polyoxometalates) είναι ικανές να ανιχνεύουν, να αναστέλλουν και να καταστρέφουν τα προσχηματισμένα συσσωματώματα Αβ μέσω της χρήσης της NIR (Near Infrared Radiation) ακτινοβολία. Ανάλογα με τη διαδικασία συσσωμάτωσης Αβ, η απορρόφηση των νανοράβδων χρυσού αλλάζει και ως εκ τούτου καθίσταται δυνατή η παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου (Khan S. et al., 2020).

Οι Dao et al. (2017) έχουν συνθέσει παράγωγα φαινοθειαζίνης, τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως ανιχνευτές φθορισμού κοντά στο υπέρυθρο, τα οποία εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με τις πλάκες αμυλοειδούς επιτρέποντας την ανίχνευσή τους τόσο στον εγκέφαλο, όσο και στον αμφιβληστροειδή ιστό διαγονιδιακών ποντικών. Αυτά τα παράγωγα έχουν επίσης την ικανότητα να αποτρέπουν τη συσσώρευση της πλάκας Αβ και να σπάνε τα ήδη σχηματισμένα ινίδια Αβ (Khan S. et al., 2020)(Dao et al., 2017).

Φορτισμένα μόρια όπως το (E)-4-(4-(dibutylamino)styryl)-1-(2-hydroxyethyl) quinolin-1-ium chloride (DBA-SLOH) παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τα συσσωματώματα Αβ και εμφανίζουν ενισχυμένο φθορισμό κατά τη σύνδεσή τους με αυτά. Το DBA-SLOH αποτρέπει αποτελεσματικά τη συσσώρευση θραυσμάτων Αβ1-40 και Αβ1-42 παρέχοντας θεραπευτικό αποτέλεσμα για την AD (Khan S. et al., 2020).

Οι Hultqvist G. et al. (2017) ανέπτυξαν μια σαΐτα (shuttle) εγκεφάλου για την ενεργό μεταφορά αντισωμάτων διαμέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μέσω μεσολαβούμενης από υποδοχείς διακυττάρωσης. Πιο συγκεκριμένα σύντηξαν μέσω ανασυνδυασμού δύο

μεταβλητά θραύσματα μονής αλυσίδας (single-chain variable fragments, scFv) του αντισώματος 8D3 (το οποίο είναι γνωστό ότι ενισχύει την πρόσληψη από τον εγκέφαλο) του υποδοχέα τρανσφερρίνης (Transferrin Receptor, TfR) στις ελαφριές αλυσίδες του mAb158, ενός αντισώματος, το οποίο δεσμεύεται επιλεκτικά με τα πρωτοϊνίδια Αβ. Λόγω αυτής της σύντηξης, η σαΐτα διαπερνά επιλεκτικά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και παραδίδει mAb158 στον εγκέφαλο, τα οποία λειτουργούν ως ανοσοθεραπεία έναντι του Αβ, αλλά επίσης και ως ραδιοσυνδέτης για διάγνωση μέσω PET (Positron Emission Tomography), βοηθώντας ταυτόχρονα στην αξιολόγηση της έκβασης της θεραπείας (Khan S. et al., 2020)(Hultqvist G. et al., 2017).

Τα μεταλλικά ιόντα είναι γνωστό ότι δρουν ως καταλύτες για το σχηματισμό πλακών Αβ, ενώ επίσης κατά κανόνα τα ιόντα αυτά είναι πάντα σε περίσσεια εντός του οργανισμού. Με βάση αυτή την παρατήρηση, οι Cui Z. et al. (2016) ανέπτυξαν έναν νανοανιχνευτή, ο οποίος μπορεί να ανιχνεύσει με ευαισθησία τη συγκέντρωση Cu^{2+} , ενώ ταυτόχρονα μπορεί να συλλάβει τον Cu^{2+} , τόσο in vitro όσο και in vivo. Ο νανοανιχνευτής αυτός (UCHQ) συνδυάζει δύο βασικά συστατικά: τα νανοσωματίδια ανοδικής μετατροπής (Upconversion Nanoparticles, UCNPs), τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την απεικόνιση της φωταύγειας ανοδικής μετατροπής (Upconversion Luminescence, UCL) του Cu^{2+} κατά την έκθεση αυτού στα 980 nm, και τον χηλικό παράγοντα 8-υδροξυκινολίνη-2-καρβοξυλικό οξύ (chelator-8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid, HQC), ο οποίος είναι υπεύθυνος για την χηλικοποίηση του Cu^{2+} και το θεραπευτικό αποτέλεσμα έναντι της AD. Οι χηλικοί παράγοντες δεσμεύουν την περίσσεια των ιόντων χαλκού στον εγκέφαλο και αναστέλλουν την απόπτωση που προκαλείται από τις πλάκες Αβ, ενώ επιπρόσθετα επιταχύνουν τον μη τοξικό δομικό μετασχηματισμό του Αβ (Khan S. et al., 2020)(Cui Z. et al., 2016).

Έχουν αναπτυχθεί μαγνητικά νανοσωματίδια (Magnetic Nanoparticles, MNPs) οξειδίου του σιδήρου συζευγμένα με Congo red/Rutin (Congo red/Rutin-MNPs), τα οποία όχι μόνο μπορούν να ανιχνεύσουν τις πλάκες αμυλοειδούς μέσω απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού, αλλά και να επιτύχουν ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων και να αποτρέψουν την οξειδωτική βλάβη (Khan S. et al., 2020).

Τα Theranostics περιλαμβάνουν επίσης κβαντικές κουκκίδες (Quantum dots, QDs), οι οποίες είναι νανοσωματίδια, τα οποία εμφανίζουν έντονο φθορισμό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις μοναδικές οπτικές και ηλεκτρονικές τους ιδιότητες. Τα QDs έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην απεικόνιση και τη διάγνωση, καθώς η εκπομπή από διαφορετικά QDs μπορεί να εκτιμηθεί ταυτόχρονα σε μία μόνο ανάλυση χρησιμοποιώντας ένα μήκος κύματος. Πρόσφατα υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη theranostics εφαρμογής των QDs ούτως ώστε να καταστεί δυνατή η ταυτόχρονη απεικόνιση, διάγνωση και θεραπεία (Khan S. et al., 2020).

Οι Xiao S. et al. (2016) σχεδίασαν GQDs (Graphene Quantum Dots) συζευγμένα με το νευροπροστατευτικό πεπτίδιο γλυκίνη-προλίνη-γλουταμινικό (GQDG), τα οποία χορήγησαν σε διαγονιδιακά ποντίκια APP/PS1. Παρατήρησαν ότι, η συσσώρευση των πλακών αμυλοειδούς μαζί με τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών μειώθηκε, ενώ τα επίπεδα των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών αυξήθηκαν, επιδεικνύοντας έτσι ισχυρές δυνατότητες ως θεραπεία για την AD (Khan S. et al., 2020)(Xiao S. et al., 2016). Τα μήκη κύματος τα οποία κυμαίνονται από 632,8 έως 400 nm, όπως το λείζερ χαμηλού επιπέδου, μπορούν να μειώσουν τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες σε διάφορες ασθένειες. Ωστόσο, αυτή η θεραπεία δεν είναι χρήσιμη, καθώς η ποσότητα του φωτός που διεισδύει πραγματικά στον εγκέφαλο είναι πολύ μικρή. Με τη χρήση της τεχνολογίας BRET-Qdots (Bioluminescence Resonance Energy

Transfer to Quantum Dots), αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί. Αυτές οι CdSe ή CdTe κβαντικές κουκκίδες λειτουργούν ως πηγή σχεδόν υπέρυθρης ακτινοβολίας και μπορούν να μειώσουν τη φλεγμονή που προκαλείται από την πλάκα αμυλοειδούς και το οξειδωτικό στρες σε ζωικά μοντέλα. Αυτή η θεραπεία με λέιζερ χαμηλού επιπέδου (Low Level Laser Therapy, LLLT) μπορεί να αξιοποιηθεί περαιτέρω για τη θεραπεία άλλων ασθενειών κατά τις οποίες παρατηρείται η ύπαρξη φλεγμονής και οξειδωτικού στρες (Khan S. et al., 2020).

1.6.9. Προβιοτικά, Πρεβιοτικά και Άσκηση

Η αλλαγή στη μικροχλωρίδα του εντέρου μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση AD, όπως προαναφέρθηκε, καθώς τα μικρόβια του εντέρου σχετίζονται με τη ρύθμιση των νευροδιαβιβαστών και της ανοσολογικής απόκρισης μέσω της αλληλεπίδρασής του εντέρου με τον εγκέφαλο, μέσω του μεταβολικού άξονα εγκεφάλου-εντέρου. Διάφορες μελέτες πραγματοποιούνται τόσο σε ζώα, όσο και σε ανθρώπους με σκοπό τον εντοπισμό των επιδράσεων των πρεβιοτικών και προβιοτικών στην AD (Khan S. et al., 2020).

Τα προβιοτικά διευκολύνουν την ανάπτυξη των μικροβίων του εντέρου με τη βοήθεια των πρεβιοτικών, τα οποία παρέχουν κατάλληλο περιβάλλον και θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξή του. Οι *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* αποτελούν τις δύο κύριες κατηγορίες μικροβίων του εντέρου. Προβιοτικά όπως το VSL#3 τα οποία περιέχουν οκτώ gram θετικά βακτήρια έδειξαν αύξηση στα *Actinobacteria* και *Bacteroidetes* σε ζωικά μοντέλα, ενώ η συμπλήρωση με *Bifidobacterium breve* στέλεχος A1 μειώνει την εξασθένηση της μνήμης, τη φλεγμονή των νευρώνων και τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε ζωικά μοντέλα (Khan S. et al., 2020).

Σε μία άλλη μελέτη, οι Abraham D. et al. (2019) χρησιμοποίησαν ένα διαγονιδιακό APP/PS1 στέλεχος ποντικού, το οποίο υπέβαλαν σε άσκηση (η οποία περιελάμβανε τρέξιμο σε διάδρομο για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα) και θεραπεία με το FRAMELIN, το οποίο αποτελείται από προβιοτικά, όπως το *Lactobacillus acidophilus* lysates και το *Bifidobacterium longum*, ωμέγα 3 λιπαρά οξέα και βιταμίνες (A, D, B1, B3, B6, B9, B12). Η έρευνα αυτή έδειξε ότι η τακτική σωματική άσκηση και τα συμπληρώματα προβιοτικών έχουν την ικανότητα να εμποδίσουν την περαιτέρω εξέλιξη της AD και να ανακουφίσουν τα συμπτώματά της (Khan S. et al., 2020) (Abraham D. et al., 2019).

Είναι γνωστό ότι η δυσβίωση της εντερικής μικροχλωρίδας στους ηλικιωμένους μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση σιωπηλής συστηματικής φλεγμονής και να προάγει την νευροφλεγμονή συμβάλλοντας κατά αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση της AD. Οι Leblhuber F. et al. (2018) θέλοντας να διαπιστώσουν αν η εξισορρόπηση του μικροβιώματος του εντέρου θα μπορούσε να επηρεάσει ευεργετικά τη φλεγμονή του εντέρου και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, πραγματοποίησαν μία μελέτη σε ανθρώπους, κατά την οποία οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε θεραπεία με προβιοτικά, τα οποία ανήκαν στα γένη *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. paracasei*) και *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium lactis* και *Bifidobacterium bifidum*) μαζί με *Lactococcus lacti*. Ενώ επιπρόσθετα τους χορηγήθηκε και βιταμίνη D. Η έρευνά τους αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση των εν λόγω προβιοτικών οδήγησε σε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Khan S. et al., 2020)(Leblhuber F. et al., 2018). Τέλος φαίνεται ότι, η χορήγηση προβιοτικών συμπληρωμάτων θα πρέπει να είναι ήπια και όχι πολύ εντατική, καθώς το αντίθετο μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της μικροχλωρίδας του εντέρου, η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και επακόλουθα στην πρόκληση νευροφλεγμονής (Khan S. et al., 2020).

1.6.10. Φυσικά εκχυλίσματα

Για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι φυσικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικοί παράγοντες για αρκετές παθολογικές ασθένειες, ενώ μάλιστα πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μπορούν να διαθέτουν και νευροπροστατευτική δράση. Μελέτες τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* έχουν δείξει ότι οι φυσικές ενώσεις διαθέτουν θεραπευτικό δυναμικό έναντι της AD, γεγονός το οποίο επέτρεψε σε ορισμένες από αυτές να εισέλθουν στα στάδια των κλινικών δοκιμών. Η νικοτίνη αποτελεί την πρώτη φυσική ένωση η οποία εισήχθη στις κλινικές δοκιμές για την AD, στη συνέχεια άλλες ενώσεις όπως οι βιταμίνες C, E και D κέρδισαν περισσότερη προσοχή και ενδιαφέρον λόγω του προστατευτικού τους ρόλου έναντι της νευροφλεγμονής και της οξειδωτικής βλάβης. Πρόσφατα, η βρουοστατίνη, ένα μακρολιδικό εκχύλισμα λακτόνης από το βρυόζωο *Bugula neritina*, αξιολογήθηκε και έδειξε ότι διαθέτει την ικανότητα να επάγει την δράση της α-σεκρετάσης, οδηγώντας σε μείωση της παραγωγής Αβ και βελτίωση της μνήμης και της μάθησης, σε ένα μοντέλο ποντικού της AD. Άλλες φυσικές ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στη παραδοσιακή ιατρική (όπως για παράδειγμα στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική) έδειξαν μεγάλες δυνατότητες στη θεραπεία της AD δρώντας με διάφορους μηχανισμούς (βλέπε Πίνακα 8)(Breijyeh Z. et al., 2020).

Πίνακας 4: Φυσικές ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στη παραδοσιακή ιατρική και ο μηχανισμός δράσης τους (Breijyeh Z. et al., 2020).

Natural Compounds	Mechanism of Action
Schisantherin A, Ginsenoside Rh2, and Angelica sinensis extracts	Aβ formation inhibitors
Shengmai (SM) formula, Uncarinic acid C, and Tanshinone IIA (TIIA) extract	Reduction of Aβ accumulation
Onjisaponin B, Notoginsenoside R1, and delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC)/cannabidiol (CBD)	Promotion of Aβ degradation
Rhynchophylline (RIN), INM-176 (ethanolic extract of <i>Angelica gigas</i>), <i>Houttuyniacordata</i> Thunb. (Saururaceae) water extracts, Huperzine A, and ethyl acetate extract from <i>Diospyros kaki</i> L.f	Inhibition of Aβ Neurotoxicity and reduce over-activation of microglial cells, neuroinflammation, oxidative stress, and disruption of calcium homeostasis, which lead to neuron loss
Tongmai Yizhi Decoction (TYD) (which includes six raw materials: safflower yellow (SY) from <i>Carthamustinctorius</i> L., ginsenoside from the fruit of <i>G. jasmminoides</i> J. Ellis, ginsenoside Rd from <i>Panax ginseng</i> C. A. Mey, crocin from <i>Crocus sativus</i> L., and quinones)	Inhibition of hyperphosphorylated tau protein and its aggregation

1.6.11. Salvia (Sage)

Το γένος *Salvia* (φασκόμηλο) αποτελεί το μεγαλύτερο γένος φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, το οποίο περιλαμβάνει πάνω από 900 είδη ανά τον κόσμο. Τα κοινά είδη περιλαμβάνουν το *S. officinalis* (κοινό φασκόμηλο), το *S. miltiorrhiza* (Κινεζικό φασκόμηλο), το *S. lavandulaefolia* (Ισπανικό φασκόμηλο), το *S. fruticosa* (Ελληνικό φασκόμηλο), το *S. sclarea* (clary sage) και το *S. hispanica* (chia). Ο όρος *Salvia officinalis* προέρχεται από τη λατινική λέξη που σημαίνει «θεραπεύω» και το συγκεκριμένο είδος φασκόμηλου χρησιμοποιείται ευρέως τόσο στην μαγειρική, όσο και σε διάφορες φαρμακευτικές παρασκευές.

Πολλά είδη *Salvia* είναι εγγενή της Μεσογειακής Ευρώπης και έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για τη θεραπεία μιας σειράς προβλημάτων, συμπεριλαμβανομένων των διαταραχών του πεπτικού και του κυκλοφορικού, της βρογχίτιδας, του βήχα, του άσθματος, των προβλημάτων μνήμης, της στηθάγχης, της φλεγμονής του στόματος και του λαιμού, της κατάθλιψης και της υπερβολικής εφίδρωσης.

Τα φυτά του γένους *Salvia* διακρίνονται παραδοσιακά για τις αντιοξειδωτικές τους επιδράσεις και την ικανότητά τους να ενισχύουν την λειτουργία του εγκεφάλου, βελτιώνουν τη μνήμη, επιταχύνουν τις αισθήσεις και καθυστερούν την σχετιζόμενη με την ηλικία γνωστική εξασθένηση (Lopresti A. L., 2017).

1.6.11.1. Ενεργά συστατικά των ειδών *Salvia*

Τα φυτά του γένους *Salvia* αποτελούν μια πλούσια πηγή πολυφαινολικών ενώσεων με περισσότερες από 160 ταυτοποιημένες πολυφαινόλες, οι οποίες περιλαμβάνουν μια σειρά από φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Αυτές οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του, το ροσμαρινικό οξύ, σαλβιανολικά οξέα (salvianolic acids), sagescoumarin, lithospermic acids, sagerinic acid και γυνναικικά οξέα. Τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν τη λουτεολίνη, την απιγενίνη, την ιστιδουλίνη, την καμπφερόλη και την κερσετίνη.

Τα φυτά του γένους *Salvia* είναι επίσης πλούσια σε αιθέρια έλαια, περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία τερπενοειδών, όπως η α και β -θουγιόνη, η καμφορά, η 1,8-κινεόλη, το α -χουμουλένιο, η β -καρυοφυλλίνη και η βιριδιφλορόλη. Επιπλέον, είναι πλούσια σε πηγές διτερπενίων και τριτερπενίων όπως το καρνοσικό οξύ, το ουρσολικό οξύ, η καρνοσόλη και οι τανσινόνες.

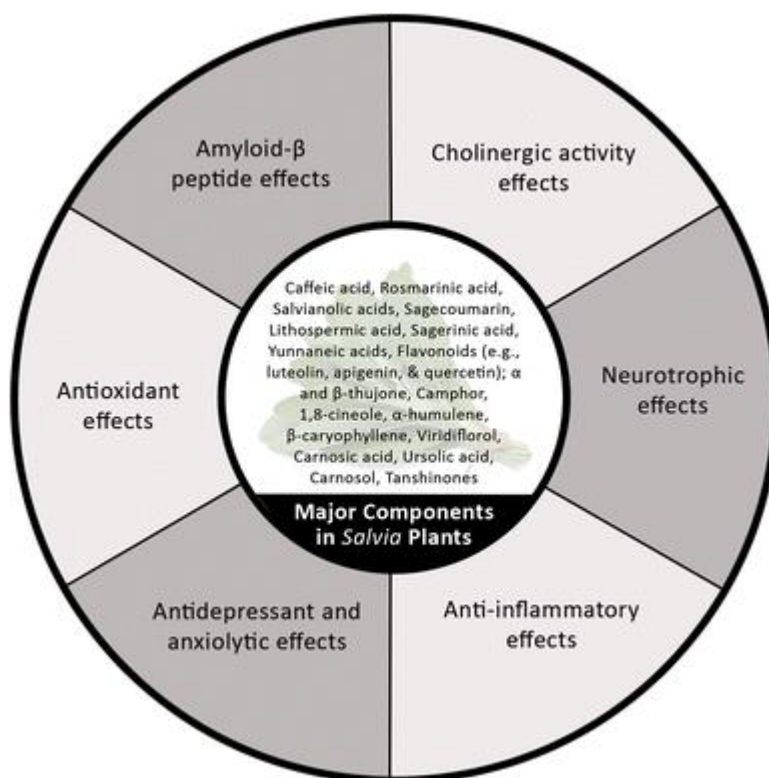
Η σύνθεση των πολυφαινολών και των τερπενοειδών μπορεί να ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ειδών *Salvia*. Για παράδειγμα, τα επίπεδα ροσμαρινικού οξέος είναι υψηλότερα στην *S. officinalis* σε σχέση με την *S. hyroleuka*. Τα επίπεδα θουγιόνης αναφέρονται επίσης ότι είναι υψηλότερα στο *S. officinalis* σε σύγκριση την *S. lavandulaefolia*. Οι τανσινόνες βρίσκονται στην *S. miltiorrhiza* και οι διάφορες μορφές γυνναικικών οξέων φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ των ειδών *Salvia* (Lopresti A. L., 2017).

Πίνακας 5: Κοινά ενεργά συστατικά των διαφορετικών ειδών του γένους *Salvia* (Lopresti A. L., 2017).

Phenolic acids	Caffeic acid, rosmarinic acid, salvianolic acids, sagescoumarin, lithospermic acid, sagerinic acid, yunnaneic acids
Flavonoids	Luteolin, apigenin, hispidulin, kaempferol, quercetin
Terpenoids	α and β -Thujone, camphor, 1,8-cineole, α -humulene, β -caryophyllene, viridiflorol, carnosic acid, ursolic acid, carnosol, tanshinones
Polysaccharides	Arabinogalactans, pectin

1.6.11.2. Η *Salvia* και οι φαρμακοδυναμικές επιδράσεις της στον εγκέφαλο

Λόγω του μεγάλου αριθμού διαφορετικών ενεργών συστατικών τα οποία διαθέτουν τα φυτά του γένους *Salvia* είναι σε θέση να επηρεάσουν πολλές και διαφορετικές οδούς οι οποίες εμπλέκονται στην γνωστική δραστηριότητα και απόδοση (Lopresti A. L., 2017).



Εικόνα 26: Κύρια συστατικά των ειδών του γένους *Salvia* και οι φαρμακοδυναμικές τους επιδράσεις στον εγκέφαλο (Lopresti A. L., 2017).

1.6.11.2.1. *Salvia* και Αβ

Η *Salvia miltiorrhiza* έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει τα ποντίκια από την προκαλούμενη από το Αβ νευροτοξικότητα αναστέλλοντας την αύξηση των επιπέδων του TNF-α, των επιπέδων της IL-6, καθώς και αναστέλλοντας την δράση της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) (Lopresti A. L., 2017). Οι τανσινόνες οι οποίες προέρχονται από το είδος *S. miltiorrhiza* μπορούν επίσης να προστατεύσουν από την επαγόμενη από το Αβ τοξικότητα μέσω της αναστολής της ανοδικής ρύθμισης της μεταγραφής και μετάφρασης των γονιδίων της iNOS (inducible nitric oxide synthase), της MMP2 (Matrix Metalloproteinase 2) και του nuclear transcription factor-κ (NF-κBp65) (Lopresti A. L., 2017) (Jiang P. et al., 2014).

Η μελέτη των Khodagholi F. et al. (2013), κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν επίμυες οι οποίοι είχαν λάβει Αβ μέσω ένεσης, έδειξε ότι τα συμπληρώματα τα οποία περιέχουν *S. sahendica*, ένα ενδημικό είδος *Salvia* του Ιράν, συμβάλουν στην εξασθένιση των ελλειμμάτων μνήμης που παρατηρούνται στα ζώα αυτά, μετρίασε την μείωση των επιπέδων της CREB (cAMP response element binding protein), της c-fos και της PGC-1α, η οποία παρατηρείται

λόγω του Αβ, κατά 58%, 62%, 57%, αντίστοιχα, και τέλος οδήγησε σε μείωση της παρατηρούμενης απόπτωσης (Lopresti A. L., 2017)(Khodagholi F. et al. 2013).

Σε ποντίκια τα οποία εκτέθηκαν σε οξεία χορήγηση Αβ, το ροσμαρινικό οξύ εμπόδισε την επαγόμενη από το Αβ νίτρωση των πρωτεϊνών (έμμεσος δείκτης βλάβης από υπεροξυνιτρώδη/ peroxynitrite) στον υπόκαμπο. Το ροσμαρινικό οξύ απέτρεψε επίσης τις βλάβες στην μνήμη που προκαλούνται από την τοξικότητα του Αβ. Προστατευτικές επιδράσεις από την τοξικότητα του Αβ έχουν επίσης παρατηρηθεί μετά τη χορήγηση σαλβιανολικού οξέος, του καρνοσικού οξέος και της κερκετίνης, τα οποία αποτελούν ενεργά συστατικά της *Salvia* (Lopresti A. L., 2017).

1.6.11.2.2. *Salvia* και χολινεργική δράση

Μελέτες in vitro και in vivo έχουν αποκαλύψει ότι αρκετά είδη *Salvia* και τα ενεργά συστατικά τους αποτελούν αποτελεσματικούς αναστολείς της AChE. Υδατικό εκχύλισμα της *S. officinalis* οδήγησε σε μείωση της δράσης της AChE σε ποντικούς, ενώ αναλύσεις in vitro αποκάλυψαν ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα του εν λόγω είδους *Salvia* έχουν την ικανότητα να μειώσουν την AChE, με την μεγαλύτερη επίδραση να ασκείται έναντι της BChE (Butyrylcholinesterase).

Σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε μέσω ένεσης πεπτίδιο Αβ, η προ-αγωγή με *S. sahendica* φαίνεται να μειώσει την δράση της AChE και βελτίωσε την μείωση της μνημονικής απόδοσης. Το αιθέριο έλαιο της *S. fruticosa* έδειξε επίσης αναστολή έναντι της AChE και παρόμοια ευρήματα αποκαλύφθηκαν και για το αιθέριο έλαιο της *S. lavandulaefolia*, αν και η παρατηρούμενη αναστολή της δράσης της AChE ήταν αποτέλεσμα αποκλειστικά της δράσης των μονοτερπενοειδών. Αναστολή της AChE έχει επίσης παρατηρηθεί και από την δράση των φαινολικών διτερπενίων, 7a-methoxygrosmanol και ισοροσμανόλη, τα οποία απομονώθηκαν από την *S. officinalis*. Τα ενεργά συστατικά, ροσμαρινικό οξύ, καρνοσικό οξύ και κερκετίνη, τα οποία βρίσκονται σε αρκετά είδη *Salvia* μπορούν επίσης να αναστείλουν τη δράση της AChE. Ενώ τέλος, και οι προερχόμενες από την *S. miltiorrhiza* τανσινόνες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την δράση τόσο της AChE, όσο και της BChE (Lopresti A. L., 2017).

1.6.11.2.3. *Salvia* και Νευροτροφίνες

Σε μια μελέτη, η χορήγηση της *S. miltiorrhiza* σε ποντίκια μετρίασε την προκαλούμενη από το Αβ μείωση του BDNF. Το ροσμαρινικό οξύ προστατεύει επίσης από ελλείμματα μνήμης τα οποία προκαλούνται από την απόφραξη της εγκεφαλικής αρτηρίας σε ποντίκια. Ένας μηχανισμός που προτάθηκε για να εξηγήσει τις νευροπροστατευτικές επιδράσεις του ροσμαρινικού οξέος ήταν ότι το ροσμαρινικό οξύ επάγει την αύξηση του BDNF. Σε επίμυες οι οποίοι εκτέθηκαν σε χρόνιο απρόβλεπτο στρες, η χορήγηση ροσμαρινικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση των επιπέδων του BDNF στον υπόκαμπο. Επιπλέον, πειράματα in vitro αποκάλυψαν ότι το ροσμαρινικό οξύ έχει την ικανότητα να αυξήσει τα επίπεδα του BDNF σε καλλιεργούμενα αστροκύτταρα.

Το καφεϊκό οξύ φαίνεται να μειώνει τον χρόνο ακινησίας των ποντικών στο τεστ αναγκαστικής κολύμβησης και να βελτιώνει την προκαλούμενη από το στρες μείωση των επιπέδων του mRNA του BDNF στον μετωπιαίο φλοιό. Ωστόσο, το καφεϊκό οξύ δεν τροποποίησε τα επίπεδα του BDNF σε περιοχές του εγκεφάλου ανώριμων (naïve) ποντικών, υποδεικνύοντας ότι κατά κύριο λόγο εξασθενεί την προς τα κάτω ρύθμιση της μεταγραφής του BDNF υπό συνθήκες στρες.

Το φλαβονοειδές λουτεολίνη εμφανίζει εξαιρετικά υψηλή δραστικότητα στην επαγωγή της σύνθεσης και της έκκρισης νευροτροφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του NGF, του GDNF (glial-derived neurotrophic factor) και του BDNF σε καλλιεργούμενα αστροκύτταρα. Υπήρξαν επίσης ορισμένες αναφορές ότι η κερσετίνη μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα του BDNF σε μοντέλα εγκεφαλικής βλάβης. Η παραγωγή του NGF, μιας άλλης νευροτροφίνης σημαντικής για την ανάπτυξη, τη συντήρηση και την επιβίωση των νευρώνων, έχει επίσης αποδειχθεί ότι ενισχύεται από το καρνοσικό οξύ, την καρνοσόλη, τις τανσινόνες και την κερσετίνη (Lopresti A. L., 2017).

1.6.11.2.4. Αντιοξειδωτικές δράσεις της *Salvia*

Τα φυτά του γένους *Salvia*, καθώς και τα μεμονωμένα συστατικά αυτών, διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Σε μια ανάλυση 10 ειδών *Salvia*, επιβεβαιώθηκε ότι όλα τα είδη εμφάνισαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Η έκταση της αντιοξειδωτικής δράσης διέφερε μεταξύ των ειδών και των μεθόδων εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν, με το αιθανολικό εκχύλισμα της *S. officinalis* να παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Έχει επιβεβαιωθεί ότι η *S. miltiorrhiza* μπορεί να μειώσει την παραγωγή ROS αναστέλλοντας τις οξειδάσες, μειώνοντας την παραγωγή υπεροξειδίου, αναστέλλοντας την οξειδωτική τροποποίηση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και βελτιώνοντας το μιτοχονδριακό οξειδωτικό στρες. Η *S. miltiorrhiza* αυξάνει επίσης τη δραστικότητα της καταλάσης, της MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της συζευγμένη ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου. Σε ένα ζωικό μοντέλο, το *S. officinalis* απέτρεψε τα προκαλούμενα από τον διαβήτη ελλείμματα στην μνήμη και την μάθηση, αναστέλλοντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων και ενισχύοντας τα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα.

Η πλειονότητα των αντιοξειδωτικών επιδράσεων της *Salvia* αποδίδεται στις φαινολικές ενώσεις, όπως το ροσμαρινικό οξύ, το σαλβιανολικό οξύ, η *sagecoumarin* και το *sagerinic acid*, οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρή δεσμευτική δράση έναντι των ριζών με περίπου 90% του DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) να καθαρίζεται από αυτές, υπό πειραματικές συνθήκες, με τα αποτελέσματά τους αυτά να ήταν σημαντικά μεγαλύτερα από τα αποτελέσματα που παρουσίασαν τα φλαβονοειδή της *Salvia*, λουτεολίνη και απιγενίνη. Σε μια άλλη *in vitro* μελέτη, το σαλβιανολικό οξύ L έδειξε ισχυρή δράση καθαρισμού ελεύθερων ριζών για τις ανιονικές ρίζες DPPH και υπεροξείδιο. Το σαλβιανολικό οξύ L αναγνωρίστηκε ως σημαντικά καλύτερος καθαριστής αυτών των ελεύθερων ριζών σε σχέση με το trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E), το καφεϊκό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ.

Τα μονοτερπένια 1,8-κινεόλη και α-πινένιο τα οποία εντοπίστηκαν στο αιθέριο έλαιο της *S. lavandulaefolia* ήταν επίσης ικανά να μετριάσουν την οξειδωτική βλάβη στα αστροκύτταρα αναστέλλοντας την παραγωγή των ROS και αυξάνοντας τις ενδογενείς αντιοξειδωτικές ενώσεις (όπως για παράδειγμα η γλουταθειόνη, η καταλάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η δράση και η πρωτεϊνική έκφραση της οξυγενάσης της αίμης 1). Το καρνοσικό οξύ και το ουρσολικό οξύ αποτελούν επίσης ισχυρά αντιοξειδωτικά (Lopresti A. L., 2017).

1.6.11.2.5. Αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα της *Salvia*

Ευρήματα τόσο από *in vitro* μελέτες, όσο και από *in vivo* έχουν δείξει ότι τα είδη του γένους *Salvia*, καθώς και τα συστατικά τους διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Τα αιθέρα ελαία της *S. officinalis* (τα οποία περιλαμβάνουν κυρίως 1,8-κινεόλη και καμφορά) φαίνεται ότι έχουν

την ικανότητα να αναστέλλουν σε σημαντικό βαθμό την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, η οποία διεγείρεται από LPS, σε μακροφάγα ποντικού. Η οξεία φλεγμονή που προκλήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση λαδιού τερεβινθίνης σε ποντίκια μειώθηκε σημαντικά από το βάμμα της *S. officinalis*, καθώς η χρήση του εν λόγω βάμματος μείωσε τα ολικά ποσοστά των λευκοκυττάρων και των μονοκυττάρων, ενώ επίσης μείωσε και την ενεργοποίηση των κυκλοφορούντων φαγοκυττάρων. Τα φαινορικά διτερπένια (καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ) τα οποία υπάρχουν στην *S. officinalis* έχουν την ικανότητα να μειώσουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και την παραγωγή προσταγλανδίνης E2 (PGE2) σε διεγερμένα από LPS μακροφάγα. Επιπρόσθετα, αυτά τα φαινορικά διτερπένια άμβλυναν σημαντικά τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης της iNOS, των κυτοκινών/ιντερλευκινών (IL-1a, IL-6) και των χημειοκινών συμπεριλαμβανομένων των CCL5/RANTES και CXCL10/IP-10.

Ένα μεθανολικό εκχύλισμα της *S. plebeiana*, και αρκετά από τα ενεργά συστατικά του, μείωσε σημαντικά τις φλεγμονώδεις διεργασίες που προκαλούνται από την *in vivo* έκθεση σε 12-O-tetradecanoylphorbol-12-acetate και την *in vitro* έκθεση σε ενεργοποιημένα από LPS μακροφάγα, μειώνοντας την απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου, κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), PGE2, καθώς και την έκφραση της iNOS.

Τα βιοενεργά συστατικά της *S. miltiorrhiza*, όπως οι τανσινόνες και τα σαλβιανολικά οξέα, έχουν επίσης αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις, καθώς έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την παραγωγή κυτοκινών και την δράση της iNOS. Παράλληλα, Έχουν την ικανότητα να αναστείλουν την COX-2, τον επαγόμενο από υποξία παράγοντα-1a (hypoxia-inducible factor-1a, HIF-1a) και την δράση του NF-κB. Επιπλέον, σε μια μελέτη, οι τανσινόνες που απομονώθηκαν από την *S. miltiorrhiza* ανέστειλαν σημαντικά την έκφραση των mRNA και των πρωτεϊνών των TNF-α, IL-1b και IL-8 σε μακροφάγα διεγερμένα από LPS. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν όσον αφορά τα συστατικά των φυτών *Salvia*, επιβεβαίωσαν ότι το καφεϊκό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και το ουρσολικό οξύ έχουν επίσης ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Lopresti A. L., 2017).

1.6.11.2.6. Αντικαταθλιπτικές και αγχολυτικές δράσεις της *Salvia*

Είναι γνωστό ότι η κατάθλιψη και το χρόνιο στρες μπορεί να έχουν καταστροφικές συνέπειες στη γνωστική απόδοση. Η AD εμφανίζει υψηλή συννοσηρότητα με την μείζονα κατάθλιψη και έχει αποδειχθεί ότι τα καταθλιπτικά συμπτώματα μπορεί να αποτελούν πρόδρομο της νόσου αυτής. Έτσι, παρεμβάσεις οι οποίες εμφανίζουν ευεργετικά αποτελέσματα στην κατάθλιψη και το άγχος είναι πιθανό να έχουν θετικές επιπτώσεις στην γνωστική απόδοση.

Η χορήγηση υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων της *S. elegans* και της *S. verticillata* έχει αποδειχθεί ότι ενέχει αντικαταθλιπτικά και αγχολυτικά αποτελέσματα σε ζωικά μοντέλα κατάθλιψης και άγχους. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και μετά τη χορήγηση αιθέριων ελαίων της *S. sclarea* και της *S. miltiorrhiza*. Μάλιστα τα αποτελέσματα της χορήγησης *S. sclarea* ήταν πιο έντονα σε σχέση με αυτά που προέκυψαν από τη χορήγηση αιθέριων ελαίων *Anthemis nobilis* (χαμομήλι), *Rosmarinus officinalis* (δεντρολίβανο) και *Lavandula angustifolia* (λεβάντα). Τα αγχολυτικά αποτελέσματα της *S. sclarea* παρεμποδίστηκαν σημαντικά από την προ-θεραπεία με ανταγωνιστές του υποδοχέα της ντοπαμίνης, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι οι αγχολυτικές δράσεις της *S. sclarea* οφείλονται στην ντοπαμινεργική της δράση. Αρκετά δραστικά συστατικά της *S. officinalis* φαίνεται να επηρεάζουν τη δράση των υποδοχέων βενζοδιαζεπίνης, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονών, της απιγενίνης, της ιστιδουλίνης και της σιρσιμαρινίνης, καθώς και τα διτερπένια, 7-methoxyrosmanol και galdosol.

Τα φαινολικά οξέα, το ροσμαρινικό οξύ και το καφεϊκό οξύ, διαθέτουν επίσης αντικαταθλιπτική και αγχολυτική δράση. Σε μια νευροφαρμακολογική ανάλυση, καμία από αυτές τις ουσίες δεν επηρέασε ούτε την πρόσληψη μονοαμινών στα συναπτοσώματα, ούτε τη δραστηριότητα της μιτοχονδριακής οξειδάσης των μονοαμινών στον εγκέφαλο ποντικών, υποδηλώνοντας ότι οι ενώσεις αυτές ασκούν τα αντικαταθλιπτικά τους αποτελέσματα μέσω μηχανισμών διαφορετικών από την αναστολή των μεταφορέων μονοαμίνης και οξειδάσης των μονοαμινών. Επιπλέον, το σαλβιανολικό οξύ B, από την *S. miltiorrhiza*, και η σαλβινорίνη A από την *S. divinorum* εμφάνισαν επίσης αντικαταθλιπτικά και αγχολυτικά αποτελέσματα σε ζωικά μοντέλα (Lopresti A. L., 2017).

1.6.11.3. Παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τη βιολογική ισχύ της *Salvia*

Οι τυπικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα των φυτικών θεραπειών περιλαμβάνουν την καλλιέργεια, τη συγκομιδή, τη συλλογή, την ξήρανση του φυτού, καθώς επίσης και τις μεθόδους εκχύλισης που χρησιμοποιούνται. Όσον αφορά την εκχύλιση, οι αναλογίες της ποσότητας δείγματος/φυτού προς τον διαλύτη, η θερμοκρασία του διαλύτη και η διάρκεια εμβάπτισης είναι επίσης σε θέση να επηρεάσουν την βιολογική ισχύ του εκχυλίσματος.

Εκτός των προαναφερθέντων, όσον αφορά τα φυτά του γένους *Salvia*, οι διαφορές στα ενεργά συστατικά που παρατηρείται μεταξύ των διαφορετικών ειδών *Salvia* είναι πιθανό να επηρεάσουν την δράση τους στις διάφορες βιολογικές διεργασίες και συνεπώς είναι πιθανό να επηρεάσουν την θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα. Ενώ τέλος, ακόμη και η εποχή της συλλογής των φυτών *Salvia* μπορεί να επηρεάσει την περιεκτικότητα του φυτού για τα διάφορα ενεργά συστατικά του (Lopresti A. L., 2017).

1.6.11.4. *S. fruticosa*

Η *Salvia fruticosa* Miller (Τουρκικό φασκόμηλο ή Ελληνικό φασκόμηλο), αποτελεί ένα ενδογενές είδος φυτού της ανατολικής Μεσογείου το οποίο ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae. Η *Salvia fruticosa* Miller διαθέτει διάφορες φαρμακευτικές ιδιότητες, όπως αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές, αντιπαρασιτικές, αντιοξειδωτικές, υπογλυκαιμικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιγλυκαιμικές, αντιχολινεστεράσης (αναστέλλει την δράση της AChE) και νευροπροστατευτικές. Επιπλέον, σε όλες τις μεσογειακές χώρες έχει χρησιμοποιηθεί ως φυτικό φάρμακο για την επίλυση μιας πληθώρας παθολογικών καταστάσεων, όπως πόνος στο στομάχι, δυσπεψία, διαβήτης, κρυολόγημα, κατάθλιψη, ουλίτιδα, δυσκοιλιότητα, δυσμηνόρροια, υπόταση και διάρροια. Η παρουσία συγκεκριμένων φυτοχημικών συστατικών, με αποδεδειγμένα ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία, όπως η 1,8-κινεόλη, η βορνεόλη, το π-κυμένιο και η καμφορά υποστηρίζει περαιτέρω και δικαιολογεί τις φαρμακευτικές ιδιότητες της *Salvia fruticosa* Mille (Ververis A. et al., 2023)(Gürbüz P. et al., 2021).

Τα είδη του γένους *Salvia* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά, όπως προαναφέρθηκε, για τη βελτίωση της γνωστικής ικανότητας και έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν πιθανή φυσική θεραπεία για τη AD, με την *Salvia fruticosa* Miller να αποτελεί ένα από το υποψήφια είδη *Salvia* για την θεραπεία της, η οποία όπως προαναφέρθηκε είναι γνωστό ότι διαθέτει αντιχολινεργική δράση (Gürbüz P. et al., 2021). Οι Mervic M. et al. (2022) σε μία έρευνά τους, η οποία είχε στόχο να αξιολογήσει και να συγκρίνει τις βιολογικές δράσεις επτά Μεσογειακών ειδών *Salvia*, διαπίστωσαν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού *S. fruticosa* διαθέτει σημαντική ικανότητα καθαρισμού ριζών DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) και NO. Επιπρόσθετα, διαπίστωσαν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα του εν λόγω είδος *Salvia* διαθέτει την

ικανότητα να αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων, διαθέτει αναγωγική ισχύ, εμφανίζει μέτριες ιδιότητες χηλικοποίησης του σιδήρου και τέλος διαθέτει την ικανότητα να αναστέλλει την δράση της AChE. Επίσης, έδειξαν ότι σε όλα τα είδη του φυτού *Salvia* που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένης της *S. fruticosa*, το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί το κυρίαρχο υδροξυκιναμικό οξύ, καθώς επίσης και ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των διαφορετικών ειδών *Salvia* σε ολικά φαινολικά οξέα, ολικές ταννίνες και ροσμαρινικό οξύ και της βιολογικής τους δράσης, καταδεικνύοντας την σημασία αυτών των ενώσεων στην αποτελεσματικότητα των διαφορετικών ειδών *Salvia* (Mervić M. et al., 2022).

Σε μία έρευνα των Gürbüz P. et al. (2021) η οποία σκοπό είχε την κατανόηση του μηχανισμού που κρύβεται πίσω από τις νευροπροστατευτικές επιδράσεις της έγχυσης *S. fruticosa* και της κύριας δραστικής του ένωσης το ροσμαρινικό οξύ, διερευνήθηκαν τα προστατευτικά αποτελέσματα της έγχυσης *S. fruticosa* και του ροσμαρινικού οξέος στην επαγόμενη από το Αβ1-42 κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα SH-SY5Y μαζί με την ενεργοποίηση της p-GSK-3β. Τέλος, αξιολογήθηκαν οι in vitro ανασταλτικές τους επιδράσεις έναντι των ενζύμων BACE-1 (β-secretase)(η αύξηση των επιπέδων της οποίας οδηγεί στη δημιουργία και συγκέντρωση τοξικών μορφών του Αβ στον εγκέφαλο με αποτέλεσμα την πρόκληση νευροεκφυλισμού), GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β) και CK-1δ (Casein Kinase-1δ), (κινάσες οι οποίες εμπλέκονται στον αποπτωτικό νευρωνικό κυτταρικό θάνατο, στην προκαλούμενη από το Αβ1-42 τοξικότητα και στην παθολογική συσσώρευση της πρωτεΐνης tau). Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση *S. fruticosa* σε καλλιεργημένους νευρώνες SH-SY5Y προσέφερε σημαντική προστασία έναντι της επαγόμενης από το Αβ1-42 κυτταροτοξικότητας, υπερτερώντας του ροσμαρινικού οξέος. Επιπρόσθετα, η χορήγηση της *S. fruticosa* οδήγησε σε αναστολή της GSK-3β, της CK-1δ και της β-σεκρετάσης, ενώ αύξησε τα επίπεδα p-GSK-3β. Συνεπώς, φαίνεται ότι *S. fruticosa* διαθέτει την ικανότητα να προλαμβάνει την προκαλούμενη από το Αβ1-42 νευροτοξικότητα και ο μηχανισμός μέσω του οποίου η *S. fruticosa* ασκεί την νευροπροστατευτική της δράση είναι πιθανόν να περιλαμβάνει την ρύθμιση της πρωτεΐνης p-GSK-3β (Gürbüz P. et al., 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. In vivo και in vitro μοντέλα Νευροτοξικότητας

Ο όρος νευροτοξικότητα περιγράφει την διαταραχή οποιασδήποτε λειτουργίας ή/και δομής του νευρικού συστήματος από μία εξωγενή ένωση ή από ένα μείγμα εξωγενών ενώσεων (Lopez-Suarez L. et al., 2022).

Η αξιολόγηση της νευροτοξικότητας μίας χημικής ένωσης βασίζεται πρωτίστως σε in vivo ζωικά μοντέλα τρωκτικών. Σύμφωνα με τον OECD (Organisation of Economic Co-operation and Development) η εκτίμηση της νευροτοξικότητας μίας χημικής ένωσης με την χρήση μοντέλων τρωκτικών ακολουθεί τρεις κατευθυντήριες γραμμές, οι οποίες καλύπτουν τα διαφορετικά στάδια της ζωής στα οποία μπορεί να λάβει χώρα η έκθεση στην υπό διερεύνηση χημική ένωση:

- OECD 424: Μελέτη νευροτοξικότητας σε (ενήλικα) τρωκτικά
- OECD 426: Μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας
- OECD 443: Μελέτη εκτεταμένης μιας γενιάς αναπαραγωγικής τοξικότητας

Ωστόσο, η χρήση των εν λόγω μοντέλων φαίνεται να είναι αρκετά χρονοβόρα και κοστοβόρα, γεγονός που σε συνδυασμό με την ανάγκη για δοκιμή μεγάλου αριθμού ενώσεων, οι οποίες ανταποκρίνονται στις νομοθετικές απαιτήσεις, και με ζητήματα που ανακύπτουν σχετικά με τις διαφορές μεταξύ των δύο ειδών (ανθρώπων και τρωκτικών) και ηθικών ανησυχιών σχετικά με την χρήση των ζώων, έχει οδηγήσει σε περιορισμό της χρήσης των ζωικών μοντέλων σε μελέτες νευροτοξικότητας.

Ο περιορισμός της χρήσης in vivo ζωικών μοντέλων είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη in vitro μοντέλων με σκοπό τον έλεγχο της νευροτοξικότητας διαφόρων χημικών ενώσεων. Τα μοντέλα αυτά, αν και δεν είναι σε θέση να περιγράψουν την φυσιολογία και πολυπλοκότητα της in vivo κατάστασης, ειδικά σε ότι αφορά την αξιολόγηση αισθητηριακών, γνωστικών ή συμπεριφορικών διαταραχών, συνιστούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο (Lopez-Suarez L. et al., 2022) για την μελέτη των μηχανιστικών μονοπατιών και των μορίων στόχων των νευροτοξικών ενώσεων, η οποία είναι δύσκολο να εκτελεστεί σε in vivo ζωικά μοντέλα (τα κύρια πλεονεκτήματα και περιορισμοί στη χρήση in vitro νευρωνικών μοντέλων για νευροτοξικολογικές μελέτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 6).

Πίνακας 6: Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των *in vitro* νευρωνικών συστημάτων για νευροτοξικολογικές μελέτες (Barbosa D. J. et al., 2015).

Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Μειωμένο κόστος	Έλλειψη ενσωματωμένων λειτουργιών
Αυστηρός έλεγχος της συγκέντρωσης των νευροτοξικών	Έλλειψη λειτουργίας αιματοεγκεφαλικού φραγμού
Έλεγχος του εξωκυττάριου περιβάλλοντος	Απουσία συστημικού ενδοκρινικού ελέγχου
Λιγότερα ηθικά ζητήματα (εκτός από όταν χρησιμοποιούνται ανθρώπινα εμβρυονικά κύτταρα)	Δύσκολος ο προσδιορισμός και η αναπαραγωγή των αντισταθμιστικών μηχανισμών που παρατηρούνται <i>in vivo</i>
Άμεση παρατήρηση και μέτρηση των κυτταρικών αποκρίσεων σε νευροτοξικά	Αποτυχία επεξήγησης της οδού χορήγησης, διανομής και βιομετατροπής του νευροτοξικού παράγοντα στο σώμα
Δυνατότητα σύγκρισης καμπυλών απόκρισης συγκέντρωσης για διαφορετικές ενώσεις	Αδυναμία αξιολόγησης τελικών σημείων συμπεριφοράς
Μελέτη των επιδράσεων των τοξικών ουσιών σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης και διαφοροποίησης	Άγνωστη συγκέντρωση στόχου
Εύκολα στη συντήρηση/διατήρηση και τον χειρισμό	Περιορισμένη ικανότητα μίμησης ετερογενών κυτταρικών αλληλεπιδράσεων
Έλεγχος του χρόνου έκθεσης	Έλλειψη της διατροφικής υποστήριξης που παρέχεται από την κυκλοφορία του αίματος
Δυνατότητα μελέτης ενός μόνο κυτταρικού τύπου	Οι συνθήκες <i>in vitro</i> στις οποίες αναπτύσσονται τα νευρωνικά συστήματα είναι ένα φτωχό υποκατάστατο για το περίπλοκο νευρωνικό περιβάλλον ολόκληρου του εγκεφάλου των ζώων
Υψηλότερη αναπαραγωγικότητα μεταξύ ανεξάρτητων πειραμάτων	
Παρατήρηση άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του νευροτοξικού παράγοντα και του σύστημα δοκιμής	
Ικανότητα αντιμετώπισης ερωτημάτων επιλεκτικής τοξικότητας μεταξύ των ειδών	
Ακριβής χρονική ανάλυση της αλληλουχίας των γεγονότων	

Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα *in vitro* συστήματα επιτρέπουν την διερεύνηση των μηχανιστικών διεργασιών υπό μεμονωμένες συνθήκες και διευκολύνουν τον χαρακτηρισμό του τρόπου δράσης των νευροτοξικών ενώσεων στους ιστούς στόχους εντοπίζοντας τις κυτταρικές και μοριακές αλλοιώσεις που προκαλούνται από την έκθεση σε αυτές (Barbosa D. J. et al., 2015). Παράλληλα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση πιθανών νευροτοξικών ενώσεων και την ταξινόμηση αυτών βάση της δυνατότητάς τους να προκαλούν βλάβη στο νευρικό σύστημα (Lopez-Suarez L. et al., 2022).

Θεωρείται γενικά αποδεκτό ότι τα *in vitro* μοντέλα συχνά παρέχουν μόνο μερικές απαντήσεις σε πολύπλοκες συνθήκες. Έτσι, οι *in vitro* μελέτες δεν είναι σε θέση να αντικαταστήσουν πλήρως τις *in vivo*, ωστόσο μπορούν να συμπληρώσουν τις τελευταίες, καθώς και να βοηθήσουν στην βελτίωση μελλοντικών *in vivo* μελετών νευροτοξικότητας. Για παράδειγμα, η μηχανιστική κατανόηση της δράσης των νευροτοξικών ενώσεων, η οποία προκύπτει από *in vitro* μελέτες, είναι πολύ σημαντική καθώς επιτρέπει των σχεδιασμό hypothesis-driven *in vivo* πειραμάτων ([Barbosa D. J. et al., 2015](#)).

Επί του παρόντος, υπάρχει μεγάλη ποικιλία *in vitro* μοντέλων νευροτοξικότητας τα οποία βασίζονται σε πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες (κυρίως προερχόμενες από τρωκτικά), αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές και επαγόμενα ή εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Καθένα από τα προαναφερθέντα μοντέλα έχει τα δικά του πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, γεγονός το οποίο καθιστά δύσκολη την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου. Ωστόσο, σημαντικά για την επιλογή του κατάλληλου *in vitro* μοντέλου νευροτοξικότητας θεωρείται ότι είναι τα τελικά σημεία τα οποία επρόκειτο να αξιολογηθούν στην εκάστοτε μελέτη ([Lopez-Suarez L. et al., 2022](#)).

2.2. Πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες νευρικών κυττάρων

Ο νευρικός ιστός αποτελεί ένα μείγμα πολλών και διαφορετικών κυτταρικών τύπων: νευρώνες, αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, μικρογλοιακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, περιαγγειακά κύτταρα, καθώς επίσης και από υποσύνολα αυτών. Αυτή η πολυπλοκότητα του νευρικού ιστού καθιστά ιδιαίτερα δύσκολο τον προσδιορισμό των κυττάρων τα οποία επηρεάζονται από μία φαρμακευτική ουσία, τοξικό παράγοντα ή από έναν συγκεκριμένο χειρισμό, ενώ επίσης δυσχεραίνει τον προσδιορισμό του αν το αποτέλεσμα που παρατηρείται συνιστά έμμεση ή άμεση δράση του φαρμάκου, τοξικού παράγοντα ή χειρισμού στα κύτταρα ενδιαφέροντος (Voloboueva L. et al., 2017).

Οι dissociated πρωτογενείς καλλιέργειες αποτελούν το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο in vitro μοντέλο στον τομέα της έρευνας της νευροτοξικότητας, εν μέρη καθώς μειώνουν την κυτταρική πολυπλοκότητα που περιγράφηκε προηγουμένως, ενώ επίσης επιτρέπουν τον πλήρη έλεγχο του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται τα κύτταρα. Στον Πίνακα 7, παρουσιάζονται ορισμένα επιπρόσθετα πλεονεκτήματα της χρήσης dissociated πρωτογενών καλλιεργειών ως in vitro μοντέλα νευροτοξικότητας, καθώς επίσης και ορισμένοι περιορισμοί που συνοδεύουν την χρήση του εν λόγω μοντέλου.

Πίνακας 7: Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της χρήσης dissociated πρωτογενών καλλιεργειών ως in vitro μοντέλα για μελέτες νευροτοξικότητας (Barbosa D. J. et al., 2015).

Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Πρόσβαση σε μεμονωμένα ζωντανά κύτταρα	Ετερογένεια του κυτταρικού πληθυσμού
Αυτού του τύπου οι καλλιέργειες επιτρέπουν την παρακολούθηση τόσο μορφολογικών όσο και ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών, τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν σε κύτταρο με κύτταρο βάση	Η οργάνωση του ιστού χάνεται ως αποτέλεσμα της διαδικασίας διάσπασης
Δυνατότητα άμεσης παρατήρησης των αναπτυσσόμενων αξόνων, του τρόπου διακλάδωσής τους και της συμπεριφοράς των αυξητικών κώνων	Απαιτείται ένα ζώο ως πηγής ιστού για κάθε παρασκεύασμα
Δυνατότητα λήψης και συσχέτισης βιοχημικών, μορφολογικών, ηλεκτροφυσιολογικών και μοριακών δεδομένων από ένα μόνο κύτταρο	Περιορισμένη ποσότητα βιολογικού υλικού από κάθε παρασκεύασμα
	Υψηλότερη ευαισθησία στις επιδράσεις των νευροτοξικών

Οι καλλιέργειες αυτές παρασκευάζονται απευθείας από εγκεφάλους ζώων. Ο ιστός διαχωρίζεται σε εναιώρημα μεμονωμένων κυττάρων μέσω ενζυμικών και μηχανικών μεθόδων και στην συνέχεια «απλώνεται» σε έναν δίσκο καλλιέργειας ή άλλη επιφάνεια. Η αποδοτικότητα της παραπάνω μεθόδου εξαρτάται από την τεχνική διάσπασης που θα επιλεγεί, από τον τύπο του υποστρώματος πάνω στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα, την

σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, καθώς επίσης και από τον τύπο του ιστού από τον οποίο προέρχονται τα υπό καλλιέργεια κύτταρα. Η παρουσία και η ποσότητα ορού και τροφικών παραγόντων, η τάση του οξυγόνου, η σύνθεση του υποστρώματος και η πυκνότητα της καλλιέργειας μπορούν να επηρεάσουν έντονα τη βιωσιμότητα και τη διαφοροποίηση (αποδιαφοροποίηση, διαδιαφοροποίηση, αναστολή διαφοροποίησης ή επαγωγή διαφοροποίησης) των καλλιεργούμενων κυττάρων (Voloboueva L. et al., 2017) (Barbosa D. J. et al., 2015).

Οι πρωτογενείς νευρωνικές καλλιέργειες προέρχονται συνήθως από πολλές διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές όπως ο ιππόκαμπος, ο φλοιός, το ραβδωτό και η παρεγκεφαλίδα, ενώ επίσης μπορεί να προέρχονται και από το περιφερειακό νευρικό σύστημα. Κατά κύριο λόγο ο ιστός που χρησιμοποιείται σε αυτές τις καλλιέργειες προέρχεται από τον εγκέφαλο εμβρύων επίμυων ή ποντικών, ενώ επίσης έχει χρησιμοποιηθεί και εγκεφαλικός ιστός προερχόμενος από έμβρυα ανθρώπου ή κοτόπουλου. Γενικά, απαιτείται η χρήση εμβρυϊκού ιστού καθώς σε αυτό το στάδιο οι νευρώνες είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητοι σε βλάβες κατά τη διαδικασία διάσπασης του ιστού, γεγονός το οποίο αποδίδεται στο μικρό μέγεθος σώματος, στην μη ακόμα ανάπτυξη εκτεταμένων αξονικών και δενδριτικών απολήξεων, καθώς επίσης και στην μη έντονη νεύρωσή τους. Επιπλέον, στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια οι νευρώνες είναι δυνατόν να εμφανίζουν μικρότερη εξάρτηση από τα κύτταρα στόχους τους για τροφική υποστήριξη (Barbosa D. J. et al., 2015).

Υπό ευνοϊκές συνθήκες, τέτοιες καλλιέργειες είναι δυνατό να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατά τα οποία τα κύτταρα αποκτούν τις περισσότερες ιδιότητες των ώριμων νευρώνων, αναπτύσσουν διακριτούς άξονες και δενδρίτες, σχηματίζουν συνάψεις με άλλους νευρώνες και εκφράζουν υποδοχείς και δίαυλους ιόντων χαρακτηριστικούς του εκάστοτε κυτταρικού τύπου. Αρκετά συχνά, τα κύτταρα αυτά είναι σε θέση να αναπτύξουν μια σημαντική αυθόρμητη ηλεκτρική δραστηριότητα, συμπεριλαμβανομένων των συναπτικών δυναμικών, ενώ όταν συγκαλλιεργούνται με ολιγοδενδροκύτταρα ή κύτταρα Schwann οι άξονες των κυττάρων αυτών υφίστανται μυελινοποίηση.

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι νευρώνες που λαμβάνονται με την μέθοδο αυτή φαίνεται να διατηρούν τις ατομικές τους ταυτότητες, πιθανώς ως αποτέλεσμα της μεταμιτωτικής φύσης τους και είναι δεσμευμένοι στο κυτταρικό τους πεπρωμένο (διαφοροποίηση) τη στιγμή που εισάγονται στην καλλιέργεια. Επομένως, θα μπορούσε να ειπωθεί γενικά ότι οι μορφολογικές και φυσιολογικές ιδιότητες αυτών των κυτταρικών πληθυσμών είναι αντίστοιχες με τα χαρακτηριστικά των κυττάρων *in vivo* (Voloboueva L. et al., 2017) (Barbosa D. J. et al., 2015).

2.3. Αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές

Οι αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές προέρχονται από κυτταρικές σειρές περιορισμένης διάρκειας ζωής (φυσιολογικά κύτταρα), οι οποίες υφίστανται γενετικές αλλαγές/ μεταλλάξεις οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση του δυναμικού αύξησής/ανάπτυξής (growth potential) τους και κατά συνέπεια καθιστούν τον πολλαπλασιασμό τους απεριόριστο (Barbosa D. J. et al., 2015) (Voloboueva L. et al., 2017). Επιπρόσθετα, αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές μπορούν να προκύψουν μέσω μετασχηματισμού ή αθανатоποίησης πρωτογενών κυττάρων με την χρήση ενός ογκογονιδίου, συνήθως ιικής προέλευσης ή με την χρήση κυττάρων προερχόμενα από όγκους του κυτταρικού τύπου ενδιαφέροντος (Voloboueva L. et al., 2017).

Οι αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές είναι εξαιρετικά χρήσιμες καθώς μπορούν να διατηρηθούν επ' αόριστον σε καλλιέργεια και να δημιουργήσουν έναν μεγάλο αριθμό των κυττάρων ενδιαφέροντος. Ωστόσο, έχουν ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα όπως το γεγονός ότι μακροχρόνια ανακαλλιέργεια των κυττάρων αυτών οδηγεί σε συσσώρευση γενετικών αλλοιώσεων. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι κατά την επαγωγή διαφοροποίησης τα κύτταρα αυτά δεν εμφανίζουν πλήρως τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης που χαρακτηρίζουν τις πρωτογενείς καλλιέργειες, αλλά ούτε αυτά που χαρακτηρίζουν τα εγκεφαλικά κύτταρα *in vivo*, αν και ορισμένες κυτταρικές σειρές εκφράζουν έναν αρκετά σταθερό φαινότυπο, χαρακτηριστικό πολύ σημαντικό για την αναπαραγωγιμότητα των πειραματικών ευρημάτων. Ένας άλλος σημαντικός περιορισμός των αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών είναι η δυσκολία πειραματικής αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης με σκοπό να ληφθεί ένας σταθερός πληθυσμός διαφοροποιημένων κυττάρων, γεγονός το οποίο έρχεται σε αντίθεση με την *in vivo* κατάσταση, καθώς τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα έχουν χάσει την ικανότητά τους να διαιρούνται (Barbosa D. J. et al., 2015) (Voloboueva L. et al., 2017). Στον Πίνακα 8, παρουσιάζονται ορισμένα επιπρόσθετα πλεονεκτήματα και περιορισμοί της χρήσης αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών ως *in vitro* μοντέλα νευροτοξικότητας.

Οι κυτταρικές σειρές μπορεί να αντιπροσωπεύουν νευρώνες, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος (π.χ. SH-SY5Y, Neuro-2A ή IMR-32), και γλοιακά κύτταρα, όπως οι ολιγοδενδριτικές κυτταρικές σειρές (π.χ. CG4, OLN-93 ή HOG), οι σειρές κυττάρων Schwann (π.χ. 33B, IMS32 ή NF1 T), οι αστροκυτταρικές κυτταρικές σειρές (π.χ. C6, SFME ή U87MG) ή οι μικρογλοιακές κυτταρικές σειρές (π.χ. HAPI, BV-2 ή CHME-5) (Barbosa D. J. et al., 2015).

Πίνακας 8: Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της χρήσης αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών ως *in vitro* μοντέλα για μελέτες νευροτοξικότητας (Barbosa D. J. et al., 2015).

Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Μια μεγάλη ποσότητα κυττάρων μπορεί εύκολα να αναπτυχθεί με την χρήση των αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών	Έλλειψη ρύθμισης της αύξησης/ανάπτυξης (growth) που παρατηρείται <i>in vivo</i>
Έχουν την ικανότητα να διατηρούν τις κύριες ιδιότητές τους με την πάροδο του χρόνου	Περιορισμός των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων ως αποτέλεσμα της υψηλής κυτταρικής ομοιογένειας
Μπορούν να πολλαπλασιάζονται στην καλλιέργεια για μεγάλες χρονικές περιόδους χωρίς επιμόλυνση	Υψηλή ανθεκτικότητα σε νευροτοξικές προσβολές συγκριτικά με τις πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες
Επιτρέπουν την πραγματοποίηση μελετών με ομοιογενείς πληθυσμούς νευρικών κυττάρων μη επιμολυσμένους με γλοιακά κύτταρα	Η γενετική επιδεκτικότητα και απόκριση σε έναν νευροτοξικό παράγοντα μπορεί να αλλάξει σε σχέση με τα πρωτογενή κύτταρα
Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που προέρχονται από αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές εμφανίζουν υψηλή ομοιογένεια	Πιθανή ανάπτυξη φαινοτυπικών αλλοιώσεων
Οι αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές μπορούν να αποθηκευτούν επ' αόριστον σε υγρό άζωτο και να χρησιμοποιηθούν όταν αυτό απαιτείται	Δεν διαθέτουν όλα τα χαρακτηριστικά των ενήλικων διαφοροποιημένων κυττάρων
Παρέχουν την δυνατότητα λήψης και συσχέτισης βιοχημικών, μορφολογικών, ηλεκτροφυσιολογικών και μοριακών δεδομένων από ένα μεμονωμένο κύτταρο	Δυσκολία στην πειραματική αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης με σκοπό την λήψη ενός σταθερού πληθυσμού διαφοροποιημένων κυττάρων
	Η πλειονότητα των αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς ούτως ώστε να εντοπιστούν όλες οι ιδιοσυγκρασιακές/ιδιόμορφες αλλαγές που επιβάλλονται από την γενετική χειραγώγηση και τα πολλαπλά passages (πολλαπλές ανακαλλιέργειες) των κυττάρων αυτών

2.4. Κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος

Η πρώτη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος εμφανίστηκε πριν από περισσότερα από 50 χρόνια. Οι εν λόγω κυτταρικές σειρές συνιστούν ένα καλό μοντέλο ανθρώπινων ανώριμων νευρώνων και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην νευρωνική λειτουργία και διαφοροποίηση.

Τα κύτταρα που εντάσσονται στις κυτταρικές σειρές ανθρώπινων νευροβλαστωμάτων έχουν την ικανότητα να συνθέτουν *in vitro* πρωτεΐνες χαρακτηριστικές του νευρωνικού φαινότυπου, όπως η χαρακτηριστική για τους νευρώνες ενολάση (neuron-specific enolase, NSE) και τα νευροϊνίδια (neurofilaments, NFs), υποδοχείς νευροδραστικών παραγόντων, καθώς επίσης και ένζυμα απαραίτητα για την βιοσύνθεση αρκετών νευροδιαβιβαστών (Barbosa D. J. et al., 2015), όπως η ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (Choline Acetyltransferase, ChAT: είναι το ένζυμο που καταλύει τη βιοσύνθεση της ακετυλοχολίνης) (Barbosa D. J. et al., 2015)(Witzemann V., 2007), η υδροξυλάση της τυροσίνης (Tyrosine Hydroxylase, TH: συνιστά το rate-limiting ένζυμο της σύνθεσης των κατεχολαμινών, ντοπαμίνη, επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη, και καταλύει την υδροξυλίωση της τυροσίνης σε L-DOPA) (Barbosa D. J. et al., 2015)(Daubner S. C. et al., 2011) και η β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (Dopamine beta-hydroxylase, DBH: είναι μια μονοοξυγενάση η οποία περιέχει χαλκό ρόλος της οποίας είναι η μετατροπή της ντοπαμίνης σε νορεπινεφρίνη στους νοραδρενεργικούς νευρώνες, στους αδρενεργικούς νευρώνες και στα κύτταρα χρωμαφίνης των επινεφριδίων/adrenal chromaffin cells) (Barbosa D. J. et al., 2015)(Weinschenker D., 2007).

Επιπλέον, τα εν λόγω κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται γρήγορα και να σχηματίζουν ομοιογενείς πληθυσμούς σε χημικά καθορισμένα μέσα, ενώ επίσης είναι σε θέση να κάνουν διαδικασίες που ομοιάζουν με νευριτικές (extend neuritic-like processes). Επιπρόσθετα, υπό την επίδραση διαφόρων φυσικών και χημικών παραγόντων μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* από ανώριμα σε ώριμα νευρικά κύτταρα, καθιστώντας δυνατή την μελέτη της εξέλιξης πολλών βιολογικών διεργασιών σε διαφορετικά στάδια της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος, είναι σημαντικό, και μερικές φορές δύσκολο, να γίνει διάκριση μεταξύ μορφολογικής διαφοροποίησης και κυτταροτοξικότητας (Barbosa D. J. et al., 2015).

2.5. Κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y

Μεγάλο μέρος των δεδομένων που υπάρχουν στην βιβλιογραφία έχουν ληφθεί με την χρήση της κυτταρικής σειράς ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y ([Barbosa D. J. et al., 2015](#)). Η εν λόγω κυτταρική σειρά συνιστά ένα από τα πρώτα *in vitro* μοντέλα, τα οποία αναπτύχθηκαν και έχουν χρησιμοποιηθεί εντατικά σε νευροτοξικές μελέτες. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διατηρηθούν ως νευροβλάστες ή να διαφοροποιηθούν προς κύτταρα, που μοιάζουν μορφολογικά με νευρώνες, επιτρέποντας τη διεξαγωγή μελετών τοξικότητας τόσο σε πολλαπλασιαζόμενα όσο και σε διαφοροποιημένα κύτταρα.

Η κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) είναι μια τριπλά κλωνοποιημένη υποσειρά της κυτταρικής σειράς SK-N-SH (ATCC® HTB-11™), η οποία καθιερώθηκε τη δεκαετία του 1970 από μεταστατική βιοψία μυελού των οστών προερχόμενη από ένα κορίτσι 4 ετών, το οποίο έπασχε από νευροβλάστωμα, όγκο προερχόμενο από τη νευρική ακρολοφία και πιο συγκεκριμένα από τα συμπαθητικά αδρενεργικά γάγγλια. Η εν λόγω κυτταρική σειρά περιλαμβάνει δύο μορφολογικά διακριτούς κυτταρικούς τύπους: α) τα κύτταρα, τα οποία μοιάζουν με νευροβλάστες (Τύπου N) και β) τα κύτταρα, τα οποία μοιάζουν με επιθηλιακά (Τύπου S), οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αλληλομετατρέπονται ([Lopez-Suarez L. et al., 2022](#)).

Τα κύτταρα SH-SY5Y όταν καλλιεργούνται είναι σε θέση να πολλαπλασιάζονται συνεχώς, κυρίως με τη μορφή προσκολλημένων κυττάρων, τα οποία μοιάζουν με νευροβλάστες. Ο κυτταρικός πληθυσμός που προκύπτει περιέχει τόσο τύπου N όσο και S τύπου κύτταρα, ωστόσο τα τελευταία βρίσκονται σε σχετικά χαμηλή αναλογία στον γενικό πληθυσμό συγκριτικά με τα τύπου N. Τα SH-SY5Y κύτταρα τύπου N έχουν πολυγωνικά κυτταρικά σώματα με μικρές νευριτικές διεργασίες ([Lopez-Suarez L. et al., 2022](#))([Ross R. A. et al., 1983](#)) και παρόλο που παρουσιάζουν κάποια δραστηριότητα υδροξυλάσης της τυροσίνης και β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης ως αποτέλεσμα της αδρενεργικής γαγγλιακής τους προέλευσης, δεν παρουσιάζουν τα μορφολογικά, βιοχημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ώριμων νευρώνων. Παρ' όλα αυτά παρουσιάζουν δείκτες των ανώριμων νευρώνων όπως η νεστίνη και μεταγραφικούς ρυθμιστές, όπως τα μέλη της οικογένειας αναστολέων πρωτεϊνών, οι οποίες δεσμεύονται στο DNA (DNA-binding protein inhibitor family, ID family), ID1, ID2 και ID3, ρόλος των οποίων είναι η αναστολή της διαφοροποίησης. Επιπρόσθετα, τα αδιαφοροποίητα κύτταρα SH-SY5Y μπορούν να διεγερθούν από την ακετυλοχολίνη και το κάλιο, ωστόσο στερούνται διεγερσιμότητας από το NMDA (N-methyl-D-aspartate, αγωνιστής των υποδοχέων γλουταμινικού NMDA)([Lopez-Suarez L. et al., 2022](#))([National Center for Biotechnology Information, 2023](#)), σε αντίθεση με τους νευρώνες πρωτογενών καλλιιεργειών, και το γλουταμινικό. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν τα αδιαφοροποίητα κύτταρα SH-SY5Y ένα όχι και τόσο κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της νευροτοξικότητας ή της νευροαναπτυξιακής τοξικότητας σε όλη της την έκταση. Ωστόσο τα κύτταρα αυτά μπορούν να αποτελέσουν ένα καλό μοντέλο για την μελέτη της επίδρασης νευροτοξικών παραγόντων στο ανώριμο νευρικό σύστημα.

Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά της κυτταρικής σειράς ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™)(Barbosa D. J. et al., 2015) (Lopez-Suarez L. et al., 2022).

Κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™)

Τριπλά κλωνοποιημένη υποσειρά της κυτταρικής σειράς SK-N-SH (ATCC® HTB-11™)

Συμπαθητική αδρενεργική γαγγλιακή προέλευση

Δύο μορφολογικά διακριτοί κυτταρικοί τύποι:

α) τα κύτταρα τα οποία ομοιάζουν με νευροβλάστες (Τύπου N)

β) τα κύτταρα τα οποία ομοιάζουν με επιθηλιακά (Τύπου S)

οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αλληλομετατρέπονται

Όταν καλλιεργούνται είναι σε θέση να πολλαπλασιάζονται συνεχώς, κυρίως με τη μορφή προσκολλημένων κυττάρων, τα οποία μοιάζουν με νευροβλάστες

Εκφράζουν DAT (Dopamine Transporter)

Εκφράζουν β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης και υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) ως αποτέλεσμα της αδρενεργικής γαγγλιακής τους προέλευσης

Δεν παρουσιάζουν τα μορφολογικά, βιοχημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ώριμων νευρώνων

Παρουσιάζουν δείκτες των ανώριμων νευρώνων όπως η νεστίνη και μεταγραφικούς ρυθμιστές, όπως οι ID1, ID2 και ID3, ρόλος των οποίων είναι η αναστολή της διαφοροποίησης

Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα SH-SY5Y μπορούν να διεγερθούν από την ακετυλοχολίνη και το κάλιο, ωστόσο στερούνται διεγερσιμότητας από το NMDA και το γλουταμινικό.

Μετά τη διαφοροποίηση, παρουσιάζουν λειτουργικό φαινότυπο ώριμου νευρώνα (βλέπε συνέχεια)

Περιορισμένη σύνθεση κατεχολαμινών (Dopamine (DA), Noradrenaline (NA)) ως αποτέλεσμα της ανεπάρκειας σε αποκαρβοξυλάση της διυδροξυφαινυλαλανίνης (Dihydroxyphenylalanine, DOPA)

Παρουσιάζουν ειδική πρόσληψη NA (Noradrenaline)

Εκφράζουν πρωτεΐνες των NFs (Neurofilaments)

Εκφράζουν υποδοχείς οπιοειδών, μουςκαρινικούς υποδοχείς και υποδοχείς του NGF (Nerve Growth Factor)

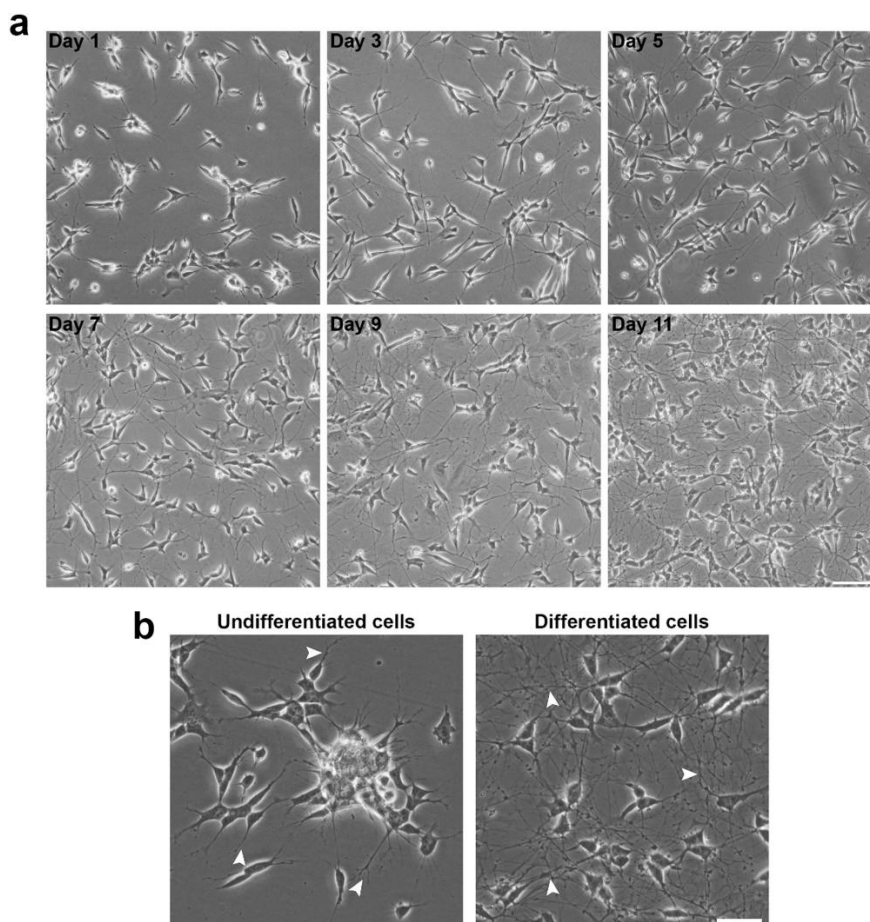
Μπορούν να διαφοροποιηθούν με τη χρήση διαφόρων παραγόντων διαφοροποίησης όπως:

- το RA (Retinoic Acid)
- το TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)
- ο BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor)
- το dBcAMP (dibutyl cyclic adenosine 5'-monophosphate)
- η σταυροσπορίνη (staurosporine)

ή μέσω της στέρησης υποστρωμάτων (π.χ. μείωση της περιεκτικότητας σε ορό του μέσου καλλιέργειας)

Τα κύτταρα SH-SY5Y είναι σε θέση να διαφοροποιηθούν με τη χρήση παραγόντων διαφοροποίησης, οι οποίοι επάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών προκαλώντας την έξοδο των τελευταίων από τον κυτταρικό κύκλο και την στροφή τους σε μορφολογία παρόμοια με αυτήν των πρωτογενών νευρώνων. Πιο συγκεκριμένα, τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα συγκριτικά με τα αδιαφοροποίητα SH-SY5Y κύτταρα εμφανίζουν μικρότερα

κυτταρικά σώματα, συχνά πολωμένα, με εκτεταμένους νευρίτες και διεγέρσιμες μεμβράνες με διακριτές ιδιότητες (όπως για παράδειγμα αγωγιμότητα καλίου) (Lopez-Suarez L. et al., 2022).



Εικόνα 27: (α) Εικόνες αντίθεσης φάσης κυττάρων SH-SY5Y σε διάφορα στάδια της διαδικασίας διαφοροποίησης. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε αγωγή με RA (10 μ M) για πέντε ημέρες, ακολουθούμενη από BDNF (50 ng/mL) για επιπλέον πέντε ημέρες για να επιτευχθεί η τελική διαφοροποίηση την ημέρα 11, (b) αδιαφοροποίητα και διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y (τροποποιημένη από David A. et al., 2021).

Κατά τη διαφοροποίηση, επάγεται η έκφραση αρκετών δεικτών των ώριμων νευρώνων όπως (Lopez-Suarez L. et al., 2022):

- Το NeuN (Neuronal Nuclei Antigen), επίσης γνωστό ως RBFox3 (RNA binding fox-1 homolog 3). Η πρωτεΐνη NeuN εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και το περιπυρηνικό κυτταρόπλασμα των περισσότερων νευρώνων και χρησιμεύει αποκλειστικά ως πυρηνικός νευρωνικός δείκτης μεταμιτωτικών νευρώνων, καθώς η έκφρασή της εντοπίζεται αποκλειστικά στο νευρικό ιστό και δεν έχει ανιχνευθεί σε μη νευρικούς ιστούς, αλλά ούτε στα νευρογλοιακά κύτταρα. Ο δείκτης NeuN αρχίζει να εκφράζεται κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυογένεσης σε μεταμιτωτικούς νευροβλάστες και συνεχίζει να εκφράζεται στους διαφοροποιημένους και τελικώς διαφοροποιημένους νευρώνες καθ' όλη την επακόλουθη οντογένεση (Lopez-Suarez L. et al., 2022) (Gusel'nikova V. V. et al., 2015).
- Η NSE (Neuron Specific Enolase) είναι ένα κυτταροειδικό ισοένζυμο του γλυκολυτικού ενζύμου ενολάση, το οποίο εντοπίζεται σε ώριμους νευρώνες και κύτταρα νευρωνικής προέλευσης. Η έκφραση της NSE συνιστά ένα όψιμο γεγονός στη νευρωνική διαφοροποίηση, καθιστώντας την έτσι έναν χρήσιμο δείκτη της νευρωνικής ωρίμανσης (Lopez-Suarez L. et al., 2022) (Isgrò M. A. et al., 2015).

- Συστατικά του κυτταροσκελετού των ώριμων νευρώνων και συναφείς πρωτεΐνες, όπως η τουμπουλίνη β-III (Tubulin beta-III, TUBB3), οι πρωτεΐνες των νευροϊνιδίων, η σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη 2 (Microtubule Associated Protein 2, MAP2) και η σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη Tau (Microtubule-associated protein tau, MART ή Tau)(Lopez-Suarez L. et al., 2022).
- Πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στην νευριτική έκφυση (outgrowth), όπως η σχετιζόμενη με την αύξηση/εκβλάστηση (growth) πρωτεΐνη 43 (Growth Associated Protein 43, GAP43)(Lopez-Suarez L. et al., 2022).
- Πρωτεΐνες, οι οποίες σχετίζονται με τη συναπτογένεση και τα συναπτικά κυστίδια, όπως η συναπτοφυσίνη, η πρωτεΐνη των συναπτικών κυστιδίων 2 (Synaptic Vesicle Protein 2, Sv2) και η σχετιζόμενη με τη σύναψη πρωτεΐνη 97 (Synaptic Associated Protein 97, SAP97)(Lopez-Suarez L. et al., 2022).

Παράλληλα, παρατηρείται μείωση της έκφρασης των ID1, ID2 και ID3 (DNA-binding protein inhibitor family, ID family), ρόλος των οποίων είναι η αναστολή της διαφοροποίησης, καθώς επίσης και του ειδικού για τους νευροβλάστες bHLH (basic helix-loop-helix) μεταγραφικού παράγοντα ASLC1 (Achaete-scute family bHLH transcription factor 1), ενώ παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των παραγόντων bHLH, που προάγουν τη διαφοροποίηση NEUROD1 (Neuronal Differentiation 1) και NEUROD6 (Neuronal Differentiation 6)(Lopez-Suarez L. et al., 2022).

Ο νευροδιαβιβαστικός φαινότυπος των διαφοροποιημένων κυττάρων εξαρτάται από τον χρησιμοποιούμενο παράγοντα διαφοροποίησης. Έτσι, όταν ως παράγοντας διαφοροποίησης χρησιμοποιείται το ρετινοϊκό οξύ (Retinoic Acid, RA) τα κύτταρα εμφανίζουν έναν πιο χολινεργικό φαινότυπο (Lopez-Suarez L. et al., 2022), χωρίς σημαντική διαφορά στην έκφραση του DAT και της TH, ενώ παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση της ChAT (Choline Acetyl Transferase) και του κυστιδιακού μεταφορέα μονοαμίνης (vesicular monoamine transporter)(Barbosa D. J. et al., 2015).

Αντίθετα, η χρήση άλλων παραγόντων διαφοροποίησης όπως το TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), μόνο του ή σε συνδυασμό με RA, και το dbcAMP (dibutyryl cyclic adenosine monophosphate) μπορεί να οδηγήσει αντίστοιχα σε περισσότερο ντοπαμινεργικούς-αδρενεργικούς ή αδρενεργικούς κυτταρικούς φαινότυπους (Lopez-Suarez L. et al., 2022).

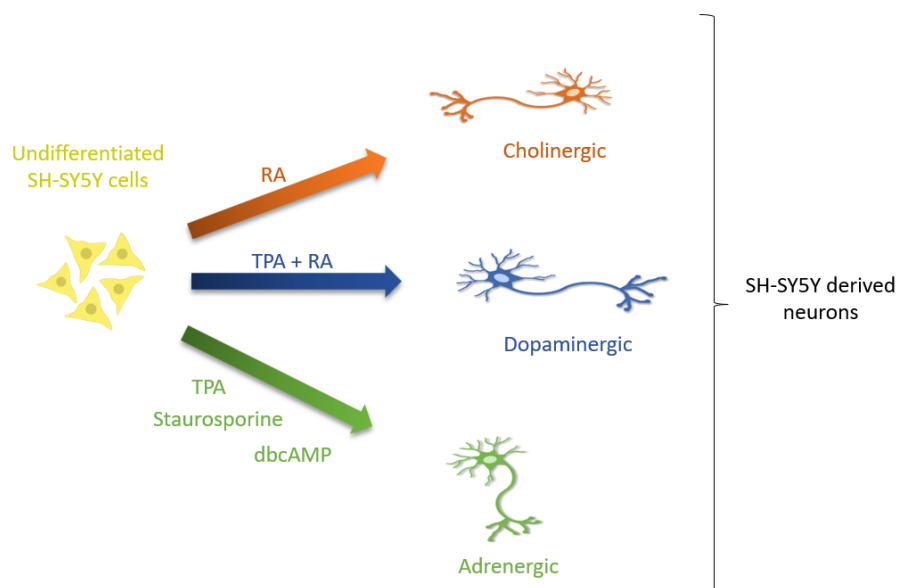
Αναλυτικότερα, τα SH-SY5Y κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται μόνο με τη χρήση του TPA εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση TH, NPY (Neuropeptide Y, σημαντικός νευροδιαβιβαστής, ο οποίος παράγεται στους αδρενεργικούς νευρώνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος) και NSE (Neuron-Specific Enolase), καθώς επίσης και αυξημένη βιοσύνθεση NA (Noradrenaline, σημαντικός νευροδιαβιβαστής, ο οποίος παράγεται στους αδρενεργικούς νευρώνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος), αποκτώντας αδρενεργικό νευρωνικό φαινότυπο.

Όταν τα SH-SY5Y κύτταρα διαφοροποιούνται με RA ακολουθούμενο από TPA αναπτύσσουν ειδικά ένα ντοπαμινεργικό φαινότυπο στον οποίο παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα έκφρασης DAT και TH, αλλά χαμηλότερα επίπεδα κυστιδιακού μεταφορέα μονοαμίνης, συγκριτικά με την αδιαφοροποίητη κατάστασή τους. Επιπλέον, η διαφοροποίηση με RA/TPA επάγει αύξηση της πυκνότητας των υποδοχέων ντοπαμίνης D2 και D3 στην επιφάνεια των διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y, ενώ επίσης αυξάνει την ικανότητα των εν λόγω κυττάρων να προσλαμβάνουν και να διατηρούν την DA συγκριτικά με την

αδιαφοροποίητη κατάστασή τους. Τέλος, τα διαφοροποιημένα με RA/TPA SH-SY5Y κύτταρα εμφανίζουν χαμηλότερη αντίσταση στις νευροτοξικές δράσεις των ντοπαμινεργικών τοξινών όπως το MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium), επιβεβαιώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τον ντοπαμινεργικό τους φαινότυπο.

Μεταξύ των διαφορετικών παραγόντων, που μπορούν να επάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y περιλαμβάνονται και οι ενώσεις της οικογένειας των νευροτροφινών, συμπεριλαμβανομένου του NGF και του BDNF. Παράλληλα, αρκετοί αυξητικοί παράγοντες όπως ο bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), ο IGF 1 (Insulin-like Growth Factor 1), ο προερχόμενος από την νευρογλοιακή κυτταρική γραμμή νευροτροφικός παράγοντας (glial cell line-derived neurotrophic factor) και ο ακτινωτός νευροτροφικός παράγοντας (ciliary neurotrophic factor), μπορούν επίσης να επάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y. Γενικά, τα κύτταρα SH-SY5Y φαίνεται να στερούνται λειτουργικών υποδοχέων νευροτροφινών, ωστόσο η προ-κατεργασία των κυττάρων αυτών με RA ρυθμίζει ανοδικά τους υποδοχείς νευροτροφινών, καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα SH-SY5Y ικανά να ανταποκριθούν στις νευροτροφίνες και να διαφοροποιηθούν.

Η σταυροσπορίνη αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα διαφοροποίησης των SH-SY5Y κυττάρων, ο οποίος επάγει τη διαφοροποίησή τους προς έναν ώριμο αδρενεργικό φαινότυπο, βασικά χαρακτηριστικά του οποίου αποτελούν η ανοδική ρύθμιση της ενεργότητας της TH, του DAT και του NPY, καθώς και η αυξημένη περιεκτικότητα σε NA. Τα SH-SY5Y κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται με την χρήση guanosine και guanosine 5'-triphosphate παρουσιάζουν ντοπαμινεργικό/αδρενεργικό φαινότυπο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από διακοπή του κυτταρικού κύκλου και αυξημένη έκφραση της TH και του DAT. Αντίθετα, η διαφοροποίηση των εν λόγω κυττάρων με dbcAMP οδηγεί σε έναν αδρενεργικό νευρωνικό φαινότυπο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από αυξημένη σύνθεση NA και έκφραση της TH (Barbosa D. J. et al., 2015).



Εικόνα 28: Διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y προς χολινεργικούς, ντοπαμινεργικούς και αδρενεργικούς φαινότυπους με την χρήση διαφόρων παραγόντων διαφοροποίησης (RA, TPA+RA, TPA ή Staurosporine ή dbcAMP αντίστοιχα).

2.6. ESCs και iPSCs

Επί του παρόντος, οι τοξικολογικές δοκιμές και οι μελέτες ανακάλυψης νέων φαρμάκων βασίζονται κατά κύριο λόγο σε *in vivo* ζωικά μοντέλα, καθώς επίσης και σε *in vitro* μοντέλα πρωτογενών κυτταροκαλλιιεργειών και αθανατοποιημένων κυτταρικών σειρών. Η χρήση των Εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (ESCs, Embryonic Stem Cells) και των Επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs, Induced pluripotent stem cells) υπόσχεται να ενισχύσει/βελτιώσει την ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμάκων, παρέχοντας απλά, αναπαραγώγιμα και οικονομικά αποδοτικά εργαλεία για τον έλεγχο της τοξικότητας των υπό ανάπτυξη φαρμάκων και την μελέτη των μηχανισμών και μονοπατιών που εμπλέκονται στην εκάστοτε νόσο (Deshmukh R. S. et al., 2012). Μάλιστα, η χρήση ανθρώπινης προέλευσης ESCs και iPSCs διαφοροποιημένων ως προς ανθρώπινους νευρωνικούς κυτταρικούς τύπους, ως *in vitro* μοντέλο για τον έλεγχο της ανθρώπινης νευροτοξικότητας και την ανακάλυψη νέων φαρμάκων καθίσταται ολοένα και πιο σημαντική (Costa L. G. et al., 2018) (Deshmukh R. S. et al., 2012), καθώς τα ζωικά μοντέλα δεν μιμούνται πάντα την ανθρώπινη φυσιολογία και ως εκ τούτου σε ορισμένες περιπτώσεις αδυνατούν να προβλέψουν τις δυσμενείς επιπτώσεις που μπορεί να έχει για παράδειγμα μία φαρμακευτική ουσία για τον άνθρωπο (Tukker A. M. et al., 2018).

Στην περίπτωση των διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος, το νευρικό σύστημα των τρωκτικών και του ανθρώπου μοιράζονται μια συντηρημένη δομή και έναν αριθμό εξελικτικά διατηρημένων ιδιοτήτων, εμφανίζουν ωστόσο ορισμένες κρίσιμες διαφορές όσον αφορά τη νευρογένεση και νευρωνικά μοτίβα τα οποία είναι κρίσιμα για την μελέτη των ανθρώπινων ασθενειών. Μελέτες RNA-seq έχουν αποκαλύψει ότι η έκφραση των διαύλων ιόντων, η συνθετάση νευροδιαβιβαστών και οι υποδοχείς των νευροδιαβιβαστών ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των ειδών. Επιπλέον, συγκεκριμένοι τύποι νευρώνων, οι οποίοι επηρεάζονται σε ορισμένες ασθένειες (π.χ. νευρώνες von Economo στην FTD-Frontotemporal dementia) εντοπίζονται μόνο στους ανθρώπους και σε άλλα μεγάλα θηλαστικά, αλλά όχι στα τρωκτικά. Έτσι, η αβεβαιότητα σχετικά με την ακρίβεια των ζωικών μοντέλων για τη μελέτη ασθενειών, που σχετίζονται με τον εγκέφαλο έχει οδηγήσει στη διάδοση των ανθρώπινων βλαστοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ESCs και των iPSCs, ως *in vitro* σύστημα για την αξιολόγηση της νευροτοξικότητας, υπό την προϋπόθεση ότι τα κατάλληλα πρωτόκολλα διαφοροποίησης μπορούν να δημιουργηθούν, παρακάμπτοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάγκη για «μετάφραση» μεταξύ των ειδών (Silva M. C. et al., 2017) (Tukker A. M. et al., 2018) (Xie J. et al., 2020).

Τέλος, σε αντίθεση με τις παραδοσιακές προσεγγίσεις (ζωικά μοντέλα και μοντέλα αθανατοποιημένων κυτταρικών σειρών) όπου το «ανθρώπινο πλαίσιο» εισάγεται αργά στην διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων (φάση κλινικών δοκιμών), η χρήση μοντέλων ανθρώπινων βλαστοκυττάρων επιτρέπει την εισαγωγή του «ανθρώπινου πλαισίου» νωρίς (φάση προκλινικών δοκιμών) στην διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στον όσο το δυνατόν πιο έγκαιρο/πρόωρο έλεγχο της αποτελεσματικότητας και τοξικότητας των υποψήφιων φαρμάκων. Παράλληλα, η χρήση ανθρώπινων βλαστοκυττάρων μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας καθώς η βελτίωση της κατανόησης της νόσου για κάθε ασθενή μπορεί να συμβάλει στην επιλογή των κατάλληλων ασθενών για μία κλινική δοκιμή, καθώς επίσης και να προβλέψει την ανταπόκριση σε μία θεραπεία (Silva M. C. et al., 2017).

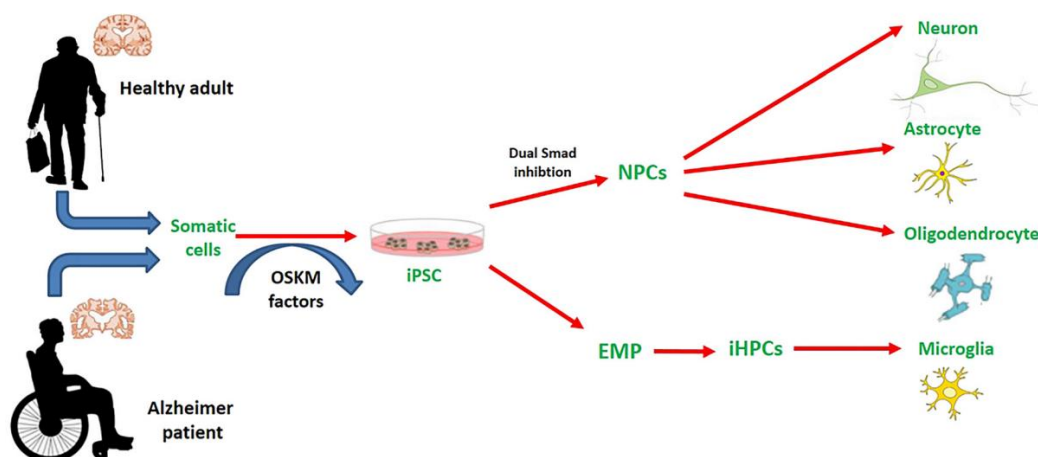
Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs, Embryonic Stem Cells) είναι πολυδύναμα κύτταρα, τα οποία προέρχονται/απομονώνονται από βλαστοκύστες ποντικών ή ανθρώπων, και πιο συγκεκριμένα από την εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM, Inner cell mass) αυτών. Έχουν την ικανότητα μακροπρόθεσμης αυτοανανέωσης και γι' αυτόν τον λόγο θεωρούνται ως τα μόνα αληθινά αθάνατα βλαστοκύτταρα, ενώ επιπρόσθετα εμφανίζουν φυσιολογικό διπλοειδή καρυότυπο. Με τη χρήση καθιερωμένων μεθόδων διαφοροποίησης των ESCs καθίσταται δυνατή η δημιουργία ποικιλίας διαφορετικών κυτταρικών σειρών, όπως για παράδειγμα νευρώνες, καρδιομυοκύτταρα, ηπατοκύτταρα και κύτταρα αίματος. Επί του παρόντος ένας αριθμός καθιερωμένων ESCs σειρών χρησιμοποιείται ολόένα και περισσότερο για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων και τον έλεγχο τοξικότητας (Deshmukh R. S. et al., 2012)(Shui G., 2011).

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs, Induced Pluripotent Stem Cells) μοιάζουν με τα ESCs όσον αφορά τη μορφολογία, το μεταγραφικό προφίλ, την επιγενετική κατάσταση αρκετών δεικτών πολυδυναμίας, καθώς και το δυναμικό διαφοροποίησής τους (Shui G., 2011)(Amponsah E. A. et al., 2021). Τα iPSCs εκφράζουν τους ακόλουθους δείκτες πολυδυναμίας: Sox2 [sex-determining region Y-box (Sox)-2], Nanog, Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), SSEA4 [stage-specific embryonic antigen (SSEA) 4], T cell receptor alpha locus (Tra)-1-60, Tra-1-81, τελομεράση και AP (alkaline phosphatase)(Amponsah E. A. et al., 2021). Τα iPSCs προέρχονται από σωματικά κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού, με αποτέλεσμα να αποφεύγουν ηθικά ζητήματα και ζητήματα ανοσοσυμβατότητας σε περιπτώσεις που τα τελευταία χρησιμοποιούνται για κυτταρική θεραπεία, τα οποία προκύπτουν από τη χρήση των ESCs.

Τα σωματικά κύτταρα επαναπρογραμματίζονται σε iPSCs (δηλαδή μετατρέπονται από ώριμα κύτταρα σε πολυδύναμα) μέσω μεταφοράς σε αυτά διαγονιδίων (τεχνητά γονίδια τα οποία περιέχουν όλα εκείνα τα στοιχεία, τα οποία είναι κρίσιμα για την έκφραση γονιδίων τα οποία προέρχονται από διαφορετικό είδος), με τη χρήση ιικών και μη ιικών φορέων, οι οποίοι περιέχουν παράγοντες επαναπρογραμματισμού όπως:

- παράγοντες Yamanaka ή παράγοντες OSKM: Oct3/4, Sox2, c-Myc και Klf4
- παράγοντες OSNL: Oct3/4, Sox2, Nanog και Lin-28
- μεταγραφικοί παράγοντες, που σχετίζονται με την πολυδυναμία όπως: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin-28 (LINeage-28), Nanog, Sall4 (spalt-like transcription factor 4 ή sal-like protein 4), Utf1 (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1), ESRRβ (oestrogen related receptor beta)
- γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο
- επιγενετικοί τροποποιητές
- miRNAs (microRNAs) (Nishu N. et al., 2020)(Deshmukh R. S. et al., 2012)(Shui G., 2011) (Silva M. C. et al., 2017)(Amponsah, E. A. et al., 2021)

Τα iPSCs είναι σε θέση να μετατραπούν/διαφοροποιηθούν σε μια ποικιλία διαφορετικών ολιγοδύναμων και τελικώς διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων με τη χρήση κατάλληλων χημικών ενώσεων και/ή ιικά εκφραζόμενων μεταγραφικών παραγόντων (Amponsah, E. A. et al., 2021).



Εικόνα 29: Στην εικόνα παρουσιάζονται τα στάδια που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των iPSC (προερχόμενων από υγιείς ενήλικες, καθώς και από ασθενείς με Alzheimer) σε νευρώνες, αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα, iPSCs: induced pluripotent stem cells, NPCs: neural progenitor cells, EMP: erythromyeloid progenitor cells, iHPCs: induced hematopoietic progenitor cells (τροποποιημένη από Amponsah, E. A. et al., 2021).

Πιθανά πλεονεκτήματα της χρήσης iPSCs:

- Μοντελοποίηση ανθρώπινων ασθενειών με τυποποιημένες καλλιέργειες κυττάρων (Deshmukh R. S. et al., 2012).
- Δυνατότητα πραγματοποίησης high throughput drug screening (Deshmukh R. S. et al., 2012).
- Ειδικά για τον ασθενή iPSCs μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της ανακάλυψης νέων φαρμάκων και να βοηθήσουν στην ταυτοποίηση φαρμάκων αποτελεσματικών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ασθενών (Deshmukh R. S. et al., 2012).
- Έγκαιρη δοκιμή (φάση προκλινικής δοκιμής) της δέσμευσης φαρμάκου-στόχου, της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου έναντι ανθρώπινου «στόχου» και της τοξικότητας αυτού σε ένα σχετικό με τη νόσο και ανθρώπινο κυτταρικό πλαίσιο, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της πιθανότητας επιτυχίας και την πιθανή μείωση του κόστους ανακάλυψης νέων φαρμάκων (Silva M. C. et al., 2017).
- Ο ex vivo εντοπισμός των ανταποκρινόμενων σε μια θεραπεία ασθενών με βάση την ανταπόκριση των ειδικών για τον εκάστοτε ασθενή iPSCs στη θεραπεία/φάρμακο πριν από την φάση II των κλινικών δοκιμών, θα μπορούσε να συμβάλει στην πραγματοποίηση κλινικών δοκιμών φάσης II με άτομα, τα οποία προβλέπεται να ανταποκριθούν στον υπό διερεύνηση φαρμακευτικό παράγοντα, με αποτέλεσμα την αύξηση της δύναμης των μελετών αποτελεσματικότητας φαρμάκων σε μικρότερους πληθυσμούς ασθενών και θα ελαχιστοποιούσε τις αρνητικές επιπτώσεις της έκθεσης των ασθενών σε αναποτελεσματικές θεραπείες. Επιπρόσθετα, το κόστος και το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη δημιουργία μιας τέτοιας κοορτής μελέτης βασιζόμενης σε iPSCs ασθενών (ικανή να προβλέψει τους ασθενείς εκείνους που θα ανταποκριθούν ή όχι σε μία θεραπεία) είναι σχετικά ασήμαντο συγκριτικά με το κόστος και την καθυστέρηση μιας αποτυχημένης κλινικής δοκιμής φάσης II ή φάσης III (Silva M. C. et al., 2017).
- Η in vitro καλλιέργεια συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων, όπως οι ανθρώπινοι νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα, τα οποία προέρχονται από iPSCs, είναι καθοριστική

ιδιαίτερα στο πλαίσιο διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπου η πρόσβαση στα φυσιολογικά και στα προσβεβλημένα από τη νόσο κύτταρα είναι εξαιρετικά περιορισμένη και υπάρχει η ανάγκη να διερευνηθεί η φυσιολογία και η απόκριση σε θεραπευτικούς παράγοντες συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων (Silva M. C. et al., 2017).

Περιορισμοί της χρήσης iPSCs:

- Οι μεταμιτωτικοί κυτταρικοί τύποι, οι οποίοι λαμβάνονται μέσω της κατευθυνόμενης διαφοροποίησης των iPSCs εξακολουθούν να είναι σχετικά ανώριμοι, βάση ενός αριθμού δεικτών γονιδιακής έκφρασης και φυσιολογικών δεικτών. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για ιστούς με περιορισμένο replicative turnover των κυττάρων, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα, στο οποίο πολύ διαφορετικοί εγκεφαλικοί κυτταρικοί τύποι ωριμάζουν κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου.
- Υπάρχει έλλειψη ισχυρής μεθοδολογίας για αναπαραγωγή, μεγάλης κλίμακας παραγωγή συγκεκριμένων σχετιζόμενων με την εκάστοτε ασθένεια κυτταρικών τύπων.
- Ένας άλλος απλός και πρακτικός περιορισμός στην έρευνα ανθρώπινων βλαστοκυττάρων για σκοπούς ανακάλυψης φαρμάκων είναι το σχετικά υψηλό κόστος των μέσων κυτταροκαλλιέργειας και των συμπληρωμάτων, μαζί με την τεχνογνωσία που απαιτείται για την αξιόπιστη δημιουργία robust καλλιεργειών.
- Παραμέληση δυνητικά σχετικών πτυχών του ιστού ενδιαφέροντος, οι οποίες σίγουρα μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα των θεραπευτικών παρεμβάσεων. Για παράδειγμα, οι αλληλεπιδράσεις κύτταρο με κύτταρο μεταξύ νευρωνικών υποτύπων και της γλοίας, η συναπτική διαβίβαση μεταξύ των νευρώνων και η ύπαρξη πολύπλοκων νευρωνικών δικτύων κρίσιμων για την υψηλή οργάνωση της εγκεφαλικής λειτουργίας (high order brain function) και η πλαστικότητα είναι δύσκολο να αναπαραχθούν πιστά με τη χρήση των ex vivo κυτταρικών μοντέλων (Silva M. C. et al., 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. Μεθοδολογία

3.1.1. Υλικά και Αντιδραστήρια

Η κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y η οποία χρησιμοποιείται για τους σκοπούς της εν λόγω μελέτης παραχωρήθηκε στο εργαστήριό μας από τον Dr. Θ. Μιχαηλίδη (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα), ενώ τα κύτταρα 7PA2-CHO, τα οποία απομονώθηκαν στο εργαστήριο του Dr. D. Selkoe (Πανεπιστήμιο Χάρβαρντ, Βοστώνη, ΗΠΑ), αποτελούν ευγενική παροχή του Dr. Κ. Βεκρέλλη (BRFAA, Αθήνα, Ελλάδα). Το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), το Ham's F-12 Nutrient Mixture, ο FBS (Fetal Bovine Serum), το PBS (Phosphate Buffered Saline) και η θρυψίνη αγοράστηκαν από την Gibco (Grand Island, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ), ενώ το retinoic acid $\geq 98\%$ (HPLC) powder (R2625-50 MG) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich. Για τις δοκιμές βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (G3581) το οποίο περιέχει μια νέα ένωση τετραζολίου, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS)] και ένα αντιδραστήριο σύζευξης ηλεκτρονίων PES (Phenazine Ethosulfate), το οποίο αγοράστηκε από την Promega (Madison, WI, ΗΠΑ). Όλες οι εξεταζόμενες ενώσεις διαλύθηκαν σε DMSO (Dimethyl sulfoxide), οδηγώντας στην δημιουργία stock διαλυμάτων, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Η τελική συγκέντρωση DMSO που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν 0,2% v/v.

3.1.2. Συλλογή και επεξεργασία της *Salvia fruticosa*

Τα εναέρια μέρη του φυτού *Salvia fruticosa* συλλέχθηκαν τον Ιούλιο του 2018 από το όρος Ψηλορείτης (Κρήτη, Ελλάδα) κοντά στο χωριό Ζαρός (Voucher specimens: KL 053) και επικυρώθηκαν από τον βοτανολόγο Dr. Ε. Καλπουτζάκη. Μετά την συλλογή του, το φυτικό υλικό ξηράνθηκε υπό σκιά και κονιοποιήθηκε με την χρήση μύλου άλεσης (ground mill).

3.1.3. Εκχύλιση της *Salvia fruticosa* και απομόνωση κλασμάτων των δραστικών ενώσεων αυτής

Όλα τα εκχυλίσματα και κλάσματα της *S. fruticosa* τα οποία χρησιμοποιούνται στην εν λόγω μελέτη έχουν ληφθεί από το εργαστήριο του Dr. Λ. Α. Σκαλτσούνη (Εθνικών και Καποδιστριακών Πανεπιστημίων Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα). Κατά την μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε από το εργαστήριο του Dr. Λ. Α. Σκαλτσούνη το φυτικό υλικό της *Salvia fruticosa* υποβλήθηκε σε εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE) χρησιμοποιώντας αιθανόλη ως διαλύτη εκχύλισης. 20 g των κονιοποιημένων εναέριων μερών της *S. fruticosa* εκχυλίστηκαν με 200 mL αιθανόλης για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με την χρήση λουτρού υπερήχων. Το υπερκείμενο διηθήθηκε και ο διαλύτης

εξατμίστηκε υπό κενό (στους 40°C) μέχρι ξηρού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές δίνοντας 2,02 g εκχυλίσματος *S. fruticosa* (10,1 % w/w).

Πίνακας 10: Σύσταση των κλασμάτων της *S. fruticosa* τα οποία απομονώθηκαν από το εργαστήριο του Dr. Λ. Α. Σκαλτσούνη (Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα) και τα οποία χρησιμοποιούνται για τους σκοπούς της εν λόγω μελέτης.

Κλάσμα	Σύσταση
Fr-I	Μίγμα τερπενίων (διτερπένια + τριτερπένια)
Fr-II	Μίγμα τερπενίων (διτερπένια + τριτερπένια) και μεθόξυ φλαβονών
FR-III	Μίγμα τριτερπενίων και μεθόξυ φλαβονών
Fr-IV	Ροσμαρινικό οξύ (κύριο) και τριτερπένιο (δευτερεύον)
Fr-V	Ροσμαρινικό οξύ (καθαρό)
Fr-VI	Ροσμαρινικό οξύ και μία φαινολική ένωση
Fr-VII	Μίγμα φαινολικών ενώσεων
Fr-VIII	Σάκχαρα και φαινολικές ενώσεις
Fr-IX	Σάκχαρα (κυρίως) και φαινολικές ενώσεις
Fr-X	Σάκχαρα (κυρίως) και φαινολική ένωση (Scutellarin)

3.1.4. Καλλιέργεια και Διαφοροποίηση των κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y

1. Κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y τα οποία καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri (10 cm) παρουσία μέσου ανάπτυξης αποτελούμενο από DMEM:F12 (1:1), FBS (10%), πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (1%) και L-γλουταμίνη (σε τελική συγκέντρωση 2 mM), επώαστηκαν στους 37°C, παρουσία 5% CO₂.
2. Αφού τα κύτταρα κάλυψαν το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου πραγματοποιήθηκε επανακαλλιέργεια και επώαση αυτών στους 37°C, παρουσία 5% CO₂.

Κατά την διαδικασία της επανακαλλιέργειας των κυττάρων:

- i. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απόρριψη του μέσου καλλιέργειας η οποία ακολουθήθηκε από δύο διαδοχικές πλύσεις με 2,5 ml (1X) PBS, οι οποίες σκοπό είχαν την απομάκρυνση του μέσου καλλιέργειας, καθώς και των άχρηστων παραπροϊόντων του μεταβολισμού των κυττάρων.
- ii. Στην συνέχεια, αφού απομακρύνθηκε πλήρως το PBS, προστέθηκε στα τρυβλία αυτά 1 ml θρυψίνη (1X) και πραγματοποιήθηκε επώαση αυτών στους 37°C, παρουσία 5% CO₂, για 2 min, με σκοπό την απομόνωση μεμονωμένων κυττάρων.
- iii. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε μηχανική ανατάραξη των τρυβλίων (χτυπώντας απαλά με τα χέρια τα τοιχώματα του τρυβλίου) η οποία σε συνδυασμό με την παρουσία της θρυψίνης συνέβαλε στην αποκόλληση των κυττάρων τόσο από άλλα κύτταρα (αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων) όσο και από την επιφάνεια του τρυβλίου, παρέχοντας την δυνατότητα απομόνωσης μεμονωμένων κυττάρων σε μορφή εναιωρήματος.
- iv. Έπειτα, προστέθηκαν στα τρυβλία αυτά, υπό κλίση, 9 ml μέσου αποτελούμενο από DMEM:F12 (1:1), FBS (10%), πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (1%) και L-γλουταμίνη (σε τελική συγκέντρωση 2 mM), προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη και να συλλεχθεί το άθροισμα των κυττάρων που περιέχονταν στο τρυβλίο σε μορφή εναιωρήματος.

- v. Από αυτό το κυτταρικό εναιώρημα συλλέχθηκαν 2 ml τα οποία στην συνέχεια προστέθηκαν σε ένα νέο τρυβλίο Petri (10 cm), το οποίο περιείχε ήδη 8 ml μέσο αποτελούμενο από DMEM:F12 (1:1), FBS (10%), πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (1%) και L-γλουταμίνη (σε τελική συγκέντρωση 2 mM). Έτσι πραγματοποιήθηκε αραίωση της αρχικής καλλιέργειας κατά πέντε φορές (1:5).
3. Στην συνέχεια αφού τα κύτταρα κάλυψαν ξανά το 80-90% του τρυβλίου πραγματοποιήθηκε μία διαδικασία αντίστοιχη αυτής της επανακαλλιέργειας με σκοπό την λήψη κυτταρικού εναιωρήματος των κυττάρων SH-SY5Y ούτως ώστε, ακολούθως, να πραγματοποιηθεί καλλιέργεια των κυττάρων αυτών με πυκνότητα σποράς 10^5 κύτταρα/well σε πιάτο 96 well. Πιο συγκεκριμένα:
 - i. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απόρριψη του μέσου καλλιέργειας η οποία ακολουθήθηκε από δύο διαδοχικές πλύσεις με 2,5 ml (1X) PBS.
 - ii. Στην συνέχεια, αφού απομακρύνθηκε πλήρως το PBS, προστέθηκε στα τρυβλία αυτά 1 ml θρυψίνη (1X) και πραγματοποιήθηκε επώαση αυτών στους 37°C, παρουσία 5% CO₂, για 2 min.
 - iii. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε μηχανική ανατάραξη των τρυβλίων (χτυπώντας απαλά με τα χέρια τα τοιχώματα του τρυβλίου).
 - iv. Έπειτα, προστέθηκαν στα τρυβλία αυτά, υπό κλίση, 5 ml μέσου αποτελούμενο από DMEM:F12 (1:1), FBS (10%), πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (1%) και L-γλουταμίνη (σε τελική συγκέντρωση 2 mM), προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη και να συλλεχθεί το άθροισμα των κυττάρων που περιέχονταν στο τρυβλίο σε μορφή εναιωρήματος.
 - v. Το κυτταρικό εναιώρημα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 2.500 rpm για 5 min σε θερμοκρασία 28°C.
 - vi. Στην συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο μέσω αναρρόφησης και το ίζημα, το οποίο περιείχε τα κύτταρα SH-SY5Y, επαναιωρήθηκε σε 5-6 ml μέσο, αποτελούμενο από DMEM:F12 (1:1), FBS (10%), πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (1%) και L-γλουταμίνη (σε τελική συγκέντρωση 2 mM), ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος.
 - vii. Έπειτα πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχονται στο προαναφερθέν κυτταρικό εναιώρημα με την χρήση πλάκας Neubauer και μετά από κατάλληλη αραίωση αυτού πραγματοποιήθηκε η επίστρωση 10^5 κυττάρων/well σε ένα 96 well πιάτο.
 - viii. Μετά την επίστρωση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε επώαση αυτών στους 37°C, παρουσία 5% CO₂, για 24h.
4. Η διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y σε χολινεργικούς νευρώνες πραγματοποιήθηκε με την χορήγηση σε αυτά ρετινοϊκού οξέος (5 μ M). Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα SH-SY5Y καλλιεργήθηκαν (με πυκνότητα σποράς 10^5 κύτταρα/well) σε μέσο διαφοροποίησης DMEM:F12 (1:1) χωρίς FBS, το οποίο περιείχε ρετινοϊκό οξύ (5 μ M), πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (1%) και L-γλουταμίνη (σε τελική συγκέντρωση 2 mM) για 4-5 ημέρες. Η αλλαγή του μέσου διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκε κάθε 48 ώρες.

3.1.5. Απομόνωση πεπτιδίων Αβ από το υπερκείμενο κυτταροκαλλιιεργειών των κυττάρων 7PA2-CHO

Τα κύτταρα 7PA2-CHO [7PA2 κύτταρα τα οποία προέρχονται από την ωοθήκη κινέζικου χάμστερ (Chinese hamster ovary, CHO) και τα οποία εκφράζουν σταθερά την μεταλλαγμένη ανθρώπινη APP] καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri (10 cm) με μέσο ανάπτυξης το οποίο περιείχε DMEM, FBS (10%), πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (1%), L-γλουταμίνη (σε τελική συγκέντρωση 2 mM) και G418 (100 µg/ml). Μετά από δύο «περάσματα», μεταφέρθηκαν σε μέσο χωρίς G418 για τουλάχιστον 24 ώρες και μετά από εκτεταμένη πλύση, επώαστηκαν όλη τη νύχτα σε 10 ml μέσο το οποίο περιείχε DMEM:F12 (1:1), 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και L-γλουταμίνη (σε τελική συγκέντρωση 2 mM). Το υπερκείμενο των κυττάρων, το οποίο περιείχε την APP και ένα μίγμα πεπτιδίων Αβ σε μορφή ολιγομερών, συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε προκειμένου να απομακρυνθούν τα κύτταρα και τα κυτταρικά υπολείμματα (Welzel A. T. et al., 2014). Το τελικό καθαρισμένο υπερκείμενο μοιράστηκε σε κλάσματα και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Το ίδιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του υπερκείμενου των ανώριμων καλλιιεργειών CHO (CHO-K1), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως control.

3.1.6. Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των κλασμάτων της *Salvia fruticosa*

Η πιθανή κυτταροτοξικότητα των κλασμάτων της *S. fruticosa* τα οποία χρησιμοποιούνται στην εν λόγω μελέτη αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας διαφοροποιημένα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (10⁵ κύτταρα/well), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε 96 well πιάτα. Μετά το πέρας των πέντε ημερών της διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y, το μέσο επώασης αντικαταστάθηκε από μέσο αποτελούμενο από DMEM:F12 (1:1) χωρίς FBS, το οποίο περιείχε πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (1%) και L-γλουταμίνη (τελική συγκέντρωση 2 mM). Τα διαφορετικά κλάσματα της *S. fruticosa* προστέθηκαν στα κύτταρα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Όλα τα κλάσματα της *S. fruticosa* διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO, σε τελική συγκέντρωση 0,2% v/v. Αφού προστέθηκαν τα διαφορετικά κλάσματα της *S. fruticosa*, τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C, παρουσία 5% CO₂ για 48 h. Μετά το πέρας των 48 ωρών, η βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία MTS.

3.1.7. Έλεγχος της νευροπροστατευτικής και αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων της *Salvia fruticosa*

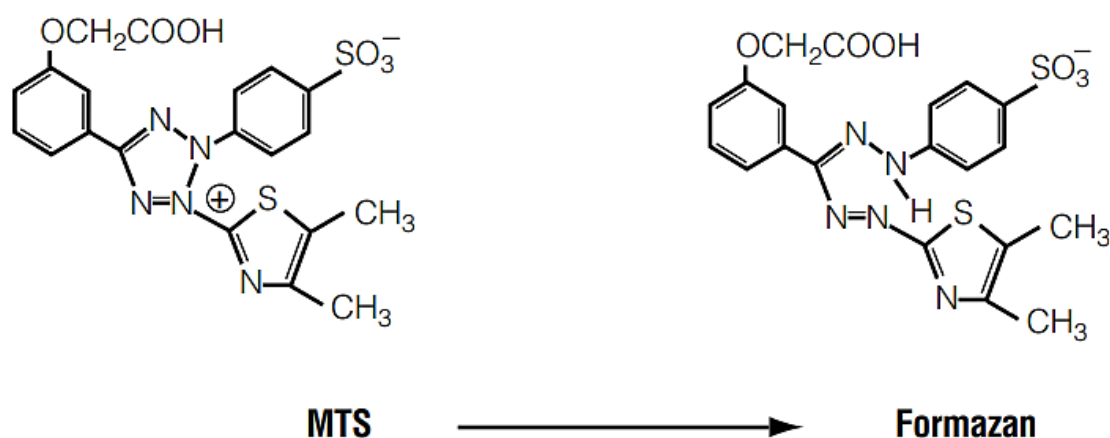
Η πιθανή νευροπροστατευτική (δράση κλασμάτων της *S. fruticosa* έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από το Αβ) και αντιοξειδωτική δράση (δράση κλασμάτων της *S. fruticosa* έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από το H₂O₂) των κλασμάτων της *S. fruticosa* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω μελέτη αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας διαφοροποιημένα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (10⁵ κύτταρα/well), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε 96 well πιάτα. Μετά το πέρας των πέντε ημερών της διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y, το μέσο διαφοροποίησης απορρίφθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν σε μέσο το οποίο περιείχε DMEM:F12 (1:1) χωρίς FBS, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (1%) και L-γλουταμίνη (σε τελική συγκέντρωση 2 mM), καθώς και τα υπό μελέτη κλάσματα της *S. fruticosa* σε διάφορες συγκεντρώσεις. Όλα τα κλάσματα της *S. fruticosa* διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO, σε τελική συγκέντρωση 0,2% v/v. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε αυτά είτε H₂O₂ (τελική συγκέντρωση 750 µM), είτε το υπερκείμενο των κυττάρων 7PA2-CHO (τελική συγκέντρωση

75% v/v), είτε το υπερκείμενο των CHO-K1 (τελική συγκέντρωση 75% v/v). Μετά από επώαση 48 ωρών στους 37°C, παρουσία 5% CO₂, η κυτταρική βιωσιμότητα αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία MTS.

3.1.8. Βιωσιμότητα κυττάρων

Η δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων CellTiter 96® AQueous One Solution αποτελεί μια χρωματομετρική μέθοδο για τον προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων σε αναλύσεις οι οποίες σκοπό έχουν τον προσδιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή της κυτταροτοξικότητας. Το αντιδραστήριο το οποίο χρησιμοποιείται για τους σκοπούς της εν λόγω δοκιμασίας είναι το CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (G3581) το οποίο περιέχει μια νέα ένωση τετραζολίου, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS)] και ένα αντιδραστήριο σύζευξης ηλεκτρονίων PES (phenazine ethosulfate), όπως προαναφέρθηκε (1).

Η ένωση MTS τετραζολίου (αντιδραστήριο Owen's) βιοανάγεται από τα κύτταρα σε ένα έγχρωμο προϊόν φορμαζάνης το οποίο είναι διαλυτό σε μέσο καλλιέργειας ιστών. Αυτή η μετατροπή πιθανώς επιτυγχάνεται από το NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) ή το NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) τα οποία παράγονται από ένζυμα αφυδρογονάσης σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα. Οι δοκιμές εκτελούνται με την προσθήκη μικρής ποσότητας του αντιδραστήριου CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent απευθείας στα wells της καλλιέργειας, η οποία ακολουθείται από επώαση των κυττάρων για 1-4 ώρες και στη συνέχεια καταγράφεται η απορρόφηση στα 490 nm με την χρήση μιας συσκευής ανάγνωσης 96 well πιάτων. Η ποσότητα του προϊόντος φορμαζάνης, η οποία μετράται μέσω της απορρόφησής του στα 490 nm, είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων τα οποία υπάρχουν στην καλλιέργεια (1).



Εικόνα 30: Χημική δομή του MTS και του προϊόντος φορμαζάνης (1).

Στην εν λόγω μελέτη, για την μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, προστέθηκαν 20 μl αντιδραστήριου CellTiter 96® AQueous One Solution σε 100 μl μέσου καλλιέργειας σε κάθε well του 96 well πιάτου, το οποίο περιείχε τα υπό εξέταση δείγματα (τελικός όγκος/well είναι 120 μl). Στην συνέχεια ακολούθησε επώαση στους 37°C, παρουσία 5% CO₂, για 90 min. Η

απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 492 nm. Όλες οι αναλύσεις MTS πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας δείγματα εις τριπλούν.

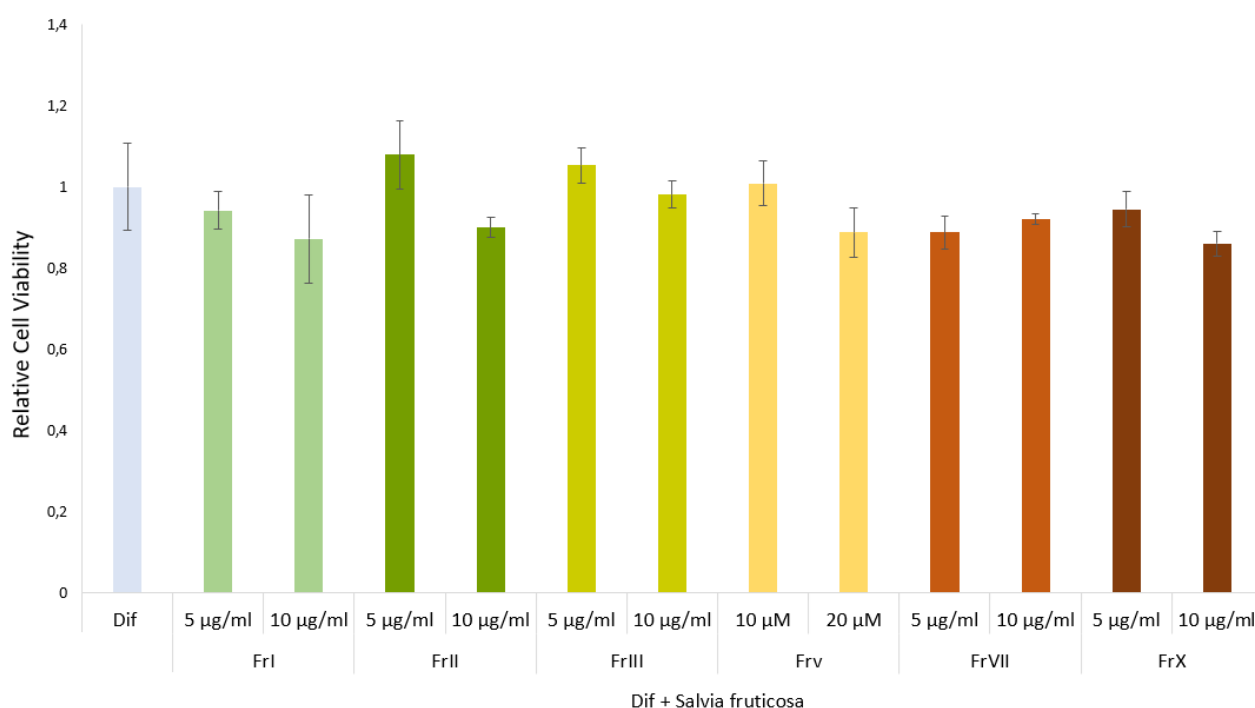
3.1.9. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων τα οποία συλλέχθηκαν στην εν λόγω μελέτη χρησιμοποιήθηκε η One-way ANOVA ακολουθούμενη από το Dunnett's post test (όταν ο σκοπός ήταν η σύγκριση μεταξύ της ομάδας control με όλες τις άλλες ομάδες/θεραπειών) ή το Tukey's post test (όταν ο σκοπός ήταν η σύγκριση μεταξύ όλων των διαφορετικών ομάδων/θεραπειών, ανά ζεύγη, συμπεριλαμβανομένης της ομάδας control). Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean $\pm$ rSEM(relative standard error of the mean).

3.2. Αποτελέσματα

3.2.1. Αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των κλασμάτων της *Salvia fruticosa*

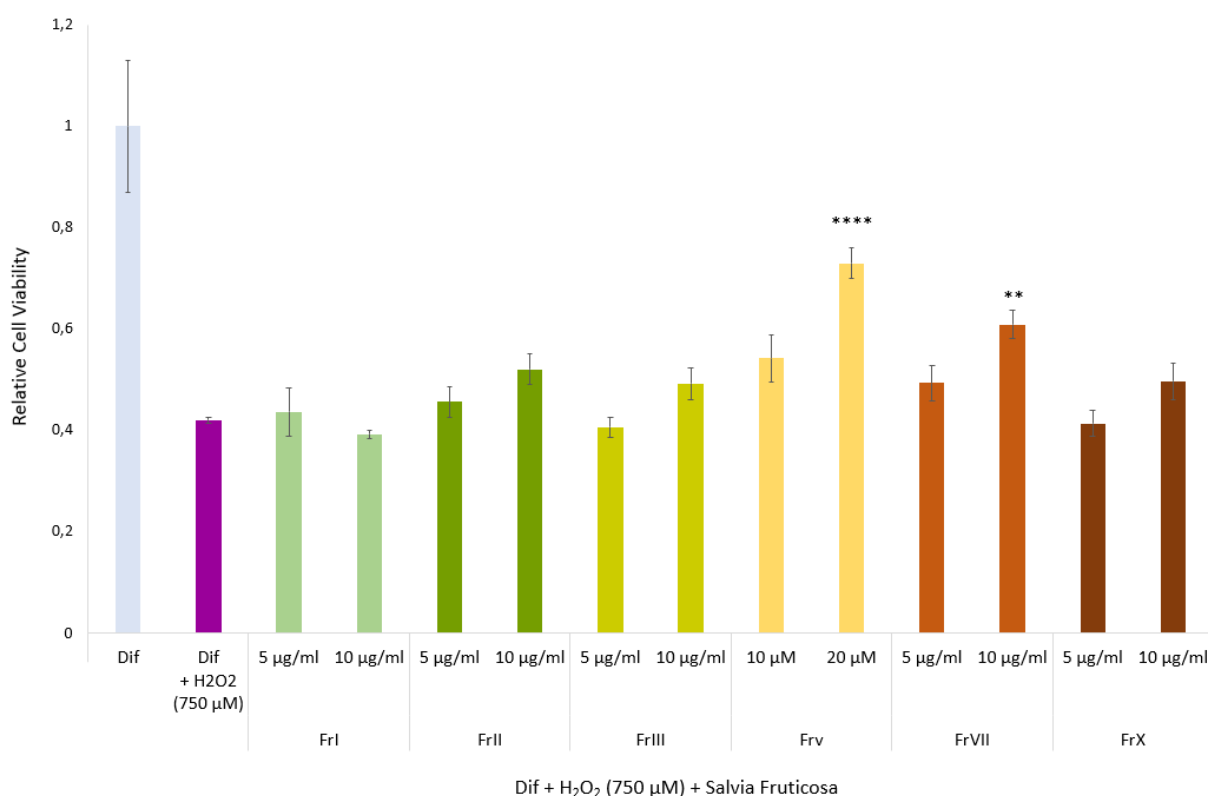
Για την αξιολόγηση της πιθανής κυτταροτοξικότητας των απομονωμένων κλασμάτων της *S. fruticosa*, διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη κλασμάτων για 48 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταροτοξική δράση των κλασμάτων FrI, FrII, FrIII, FrVII και FrX αξιολογήθηκε για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών τα 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$, ενώ η κυτταροτοξικότητα του κλάσματος FrV εξετάστηκε για συγκέντρωση 10 και 20 μM αυτού. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα της Εικόνας 31 κανένα από τα κλάσματα της *S. fruticosa* τα οποία εξετάστηκαν στην εν λόγω μελέτη δεν επηρέασε την βιωσιμότητα των διαφοροποιημένων κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y.



Εικόνα 31: Κυτταροτοξική δράση των κλασμάτων της *S. fruticosa*. Για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των κλασμάτων της *S. fruticosa*, διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη κλασμάτων για 48 ώρες. Η βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία MTS. Οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων θεραπείας και της ομάδας control [διαφοροποιημένα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y ή Dif (Differentiated) όπως παρουσιάζονται στο διάγραμμα αυτό] αξιολογήθηκαν με την χρήση της One-way ANOVA, ακολουθούμενη από το Dunnett's post test. $P < 0.005$ *, $P < 0.01$ **, $P < 0.001$ *** και $P < 0.0001$ ****. Οι τιμές απεικονίζονται ως $\text{mean} \pm \text{rSEM}$.

3.2.2. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων της *Salvia fruticosa*

Για την αξιολόγηση της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης των απομονωμένων κλασμάτων της *S. fruticosa*, διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη κλασμάτων (τα FrI, FrII, FrIII, FrVII και FrX εξετάστηκαν για συγκέντρωση 5 και 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ενώ το FrV εξετάστηκε για συγκέντρωση 10 και 20 μM), παρουσία H_2O_2 (τελική συγκέντρωση 750 μM), για 48 ώρες. Το H_2O_2 χρησιμοποιείται καθώς είναι ικανό να δημιουργήσει εξωγενείς ελεύθερες ρίζες και να προσομοιώσει τη βλάβη που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες στα νευρικά κύτταρα και συνεπώς επιτρέπει την διερεύνηση των νευροπροστατευτικών δράσεων διαφόρων ενώσεων, στην προκειμένη των διαφορετικών δραστικών ενώσεων οι οποίες περιέχονται στα κλάσματα της *S. fruticosa* (Li H. n. et al., 2018).



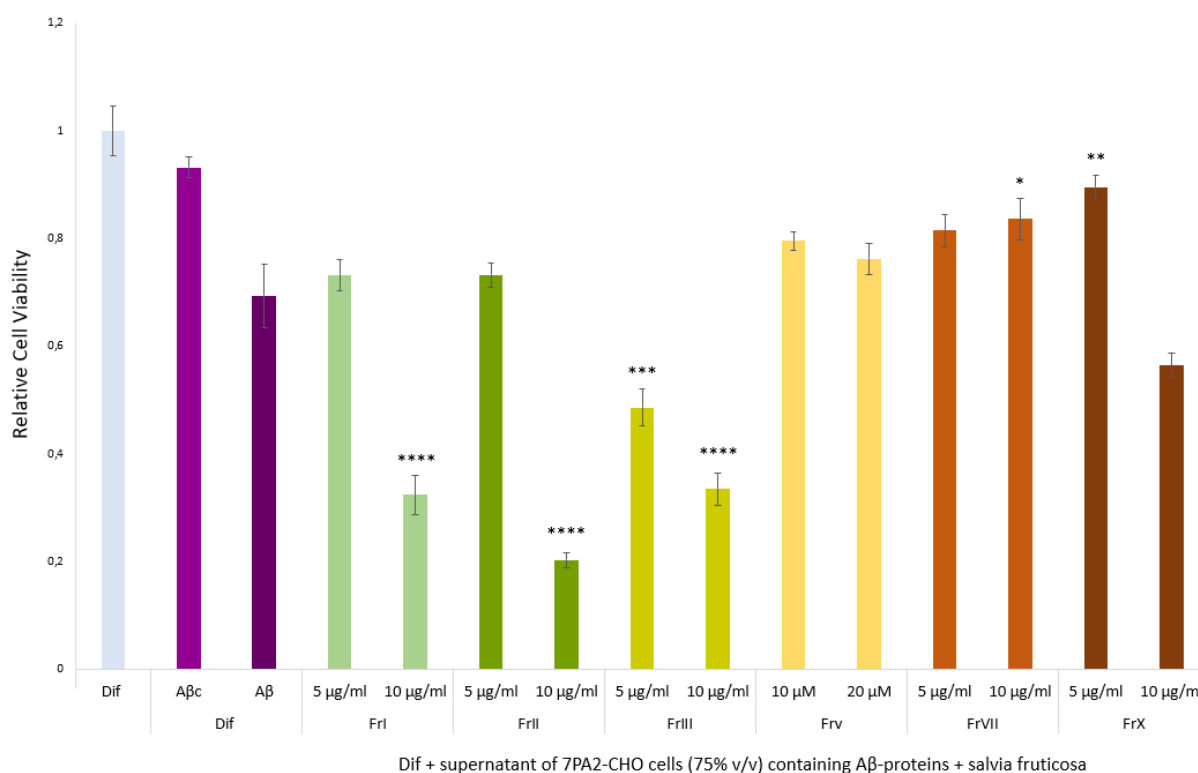
Εικόνα 32: Αντιοξειδωτική δράση των κλασμάτων της *S. fruticosa*. Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων της *S. fruticosa*, διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη κλασμάτων, παρουσία H_2O_2 (τελική συγκέντρωση 750 μM), για 48 ώρες. Η βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία MTS. Οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων θεραπείας και της ομάδας control [διαφοροποιημένα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y τα οποία επώαστηκαν με H_2O_2 (τελική συγκέντρωση 750 μM) ή Dif + H_2O_2 (750 μM) όπως παρουσιάζονται στο διάγραμμα αυτό] αξιολογήθηκαν με την χρήση της One-way ANOVA, ακολουθούμενη από το Dunnett's post test και το Tukey's post test. $P < 0.005$ *, $P < 0.01$ **, $P < 0.001$ *** και $P < 0.0001$ ****. Οι τιμές απεικονίζονται ως mean $\pm$ rSEM.

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 32, η έκθεση των διαφοροποιημένων σε χολινεργικούς νευρώνες κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y στα διαφορετικά κλάσματα της *S. fruticosa* δεν φαίνεται να απέτρεψε την προκαλούμενη από το H_2O_2 νευροτοξικότητα, με εξαίρεση το κλάσμα FrV (20 μM), το οποίο περιέχει καθαρό ροσμαρινικό οξύ, και το κλάσμα FrVII (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), το οποίο περιέχει μίγμα φαινολικών ενώσεων, τα οποία φαίνεται να ασκούν αντιοξειδωτική δράση, καθώς όπως φαίνεται από το διάγραμμα της Εικόνας 32 είναι ικανά να

αποτρέψουν την προκαλούμενη από το H_2O_2 νευροτοξικότητα. Μάλιστα, φαίνεται ότι το καθαρό ροσμαρινικό οξύ, σε συγκέντρωση 20 μM , ασκεί ελαφρώς ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το μίγμα φαινολικών ενώσεων, συγκέντρωσης 10 $\mu g/ml$, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική όπως προκύπτει από το Tukey's post test ($P=0.2932$).

3.2.3. Αξιολόγηση της κυτταροπροστατευτικής δράσης των κλασμάτων της *Salvia fruticosa*

Για την αξιολόγηση της πιθανής κυτταροπροστατευτικής δράσης των απομονωμένων κλασμάτων της *S. fruticosa*, διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη κλασμάτων (τα FrI, FrII, FrIII, FrVII και FrX εξετάστηκαν για συγκέντρωση 5 και 10 $\mu g/ml$, ενώ το FrV εξετάστηκε για συγκέντρωση 10 και 20 μM), παρουσία είτε του υπερκειμένου των κυττάρων 7PA2-CHO (τελική συγκέντρωση 75% v/v), είτε του υπερκειμένου των CHO-K1 (τελική συγκέντρωση 75% v/v), για 48 ώρες.



Εικόνα 33: Κυτταροπροστατευτική δράση των κλασμάτων της *S. fruticosa*. Για την αξιολόγηση της κυτταροπροστατευτικής δράσης των κλασμάτων της *S. fruticosa*, διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη κλασμάτων, παρουσία είτε του υπερκειμένου των κυττάρων 7PA2-CHO (τελική συγκέντρωση 75% v/v), είτε του υπερκειμένου των CHO-K1 (τελική συγκέντρωση 75% v/v), για 48 ώρες. Η βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία MTS. Οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων θεραπείας και της ομάδας control [διαφοροποιημένα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y τα οποία επώαστηκαν με το υπερκειμένο των κυττάρων 7PA2-CHO (τελική συγκέντρωση 75% v/v)] αξιολογήθηκαν με την χρήση της One-way ANOVA, ακολουθούμενη από το Dunnett's post test και το Tukey's post test. $P<0.005$ *, $P<0.01$ **, $P<0.001$ *** και $P<0.0001$ ****. Οι τιμές απεικονίζονται ως mean $\pm$ rSEM. Dif Aβ: διαφοροποιημένα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y τα οποία επώαστηκαν με το υπερκειμένο των κυττάρων 7PA2-CHO (τελική συγκέντρωση 75% v/v), Dif Aβc: διαφοροποιημένα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y τα οποία επώαστηκαν με το υπερκειμένο των CHO-K1 (τελική συγκέντρωση 75% v/v).

Όπως γίνεται φανερό από το διάγραμμα της Εικόνας 33, μόνο το κλάσμα FrVII (10 $\mu\text{g/ml}$), το οποίο περιέχει μίγμα φαινολικών ενώσεων, και το κλάσμα FrX (5 $\mu\text{g/ml}$), το οποίο περιέχει κυρίως σάκχαρα και την φαινολική ένωση Scutellarin, προστάτευσαν τα διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y έναντι της προκαλούμενης από το Αβ τοξικότητας. Μάλιστα, η ισχύς της κυτταροπροστατευτικής δράση του κλάσματος FrX (5 $\mu\text{g/ml}$) φαίνεται να είναι παρόμοια με αυτή του κλάσματος FrVII (10 $\mu\text{g/ml}$) της *S. fruticosa*, όπως προκύπτει από το Tukey's post test ($P = 0.9753$).

Αντίθετα, η επώαση των διαφοροποιημένων σε χολινεργικούς νευρώνες κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y με τα κλάσματα FrI (10 $\mu\text{g/ml}$)(μίγμα τερπενίων: διτερπένια και τριτερπένια), FrII (10 $\mu\text{g/ml}$)(μίγμα τερπενίων: διτερπένια και τριτερπένια και μεθόξυ φλαβονών) και FrIII (5 και 10 $\mu\text{g/ml}$)(μίγμα τριτερπενίων και μεθόξυ φλαβονών) όχι μόνο δεν συνέβαλε στην προστασία των νευρικών κυττάρων από την προκαλούμενη από το Αβ κυτταροτοξικότητα, αλλά οδήγησε σε επιδείνωση αυτής. Μάλιστα, η επιδείνωση της προκαλούμενης από το Αβ κυτταροτοξικότητας φαίνεται να είναι μεγαλύτερη όταν η επώαση των κυττάρων γίνεται με το FrIII (5 $\mu\text{g/ml}$) σε σχέση με το FrI (10 $\mu\text{g/ml}$), αλλά και σε σχέση με το FrII (10 $\mu\text{g/ml}$), όπως προκύπτει από το Tukey's post test ($P=0.0493^*$ και $P<0.0001^{****}$, αντίστοιχα). Ωστόσο, η ένταση της επιδείνωσης της προκαλούμενης από το Αβ κυτταροτοξικότητας δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ του FrI (10 $\mu\text{g/ml}$) και του FrII (10 $\mu\text{g/ml}$), μεταξύ του FrI (10 $\mu\text{g/ml}$) και του FrIII (10 $\mu\text{g/ml}$), μεταξύ του FrII (10 $\mu\text{g/ml}$) και του FrIII (10 $\mu\text{g/ml}$), καθώς και μεταξύ του FrIII (5 $\mu\text{g/ml}$) και του FrIII (10 $\mu\text{g/ml}$) όπως προκύπτει από το Tukey's post test ($P= 0.2942$, $P>0.9999$, $P=0.1986$ και $P=0.0808$, αντίστοιχα).

3.3. Συμπεράσματα

Η AD's αποτελεί τον πιο κοινό τύπο άνοιας μεταξύ των ηλικιωμένων ατόμων και συνιστά μια μη αντιστρεπτή, αργά προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσο η οποία επηρεάζει περιοχές του εγκεφάλου, όπως το μεταιχμιακό σύστημα και ο ενδορινικός φλοιός, οι οποίες εμπλέκονται στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης (Breijyeh Z. et al., 2020)(Amponsah E. A. et al., 2021).

Παρόλο που η AD's αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα δημόσιας υγείας, προς το παρόν υπάρχουν μόνο δύο κατηγορίες φαρμάκων οι οποίες έχουν εγκριθεί για την θεραπεία της νόσου, οι αναστολείς του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (Δονεπεζίλη, Ριβαστιγμίνη, Γαλανταμίνη) και οι NMDA ανταγωνιστές (Μεμαντίνη). Ωστόσο, παρά τα θεραπευτικά τους αποτελέσματα τα φάρμακα αυτά προσφέρουν μόνο συμπτωματική θεραπεία της νόσου, ενώ δεν είναι σε θέση να θεραπεύσουν πλήρως την νόσο, αλλά ούτε και να συμβάλλουν στην πρόληψη της εμφάνισης αυτής (Breijyeh Z. et al., 2020). Μεγάλη προσπάθεια έχει καταβληθεί για την εύρεση νέων φαρμάκων για την θεραπεία την νόσου Alzheimer's, αλλά χωρίς επιτυχία (Breijyeh Z. et al., 2020)(Khan S. et al., 2020). Διάφορες προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για την αντιμετώπιση την AD (όπως η γονιδιακή θεραπεία, η ανοσοθεραπεία, τα πεπτιδομιμητικά, διάφοροι χηλικοί παράγοντες κ.λ.π.), μεταξύ αυτών και διάφορα φυτικά εκχυλίσματα, όπως αυτά που προέρχονται από τα φυτά του γένους *Salvia*.

Τα φυτά του γένους *Salvia* διακρίνονται παραδοσιακά για τις αντιοξειδωτικές τους επιδράσεις και την ικανότητά τους να ενισχύουν την λειτουργία του εγκεφάλου, βελτιώνουν την μνήμη και καθυστερούν την σχετιζόμενη με την ηλικία γνωστική εξασθένηση. Τα φυτά αυτά διαθέτουν διάφορα ενεργά συστατικά, όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, τερπενοειδή και πολυσακχαρίτες, και ασκούν μια πληθώρα δράσεων οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer's. Πιο συγκεκριμένα, προστατεύουν έναντι της προκαλούμενης από το Αβ νευροτοξικότητας, αναστέλουν την AchE, διαθέτουν νευροτροφικά αποτελέσματα, ασκούν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, ενώ τέλος διαθέτουν αντικαταθλιπτικές και αγχολυτικές δράσεις (Lopresti A. L., 2017). Ένα από τα υποψήφια είδη του γένους *Salvia* για την θεραπεία της AD είναι η *Salvia fruticosa* Miller (*S. fruticosa*, Ελληνικό φασκόμηλο), ένα ενδογενές είδος της ανατολικής Μεσογείου το οποίο ανήκει στην οικογένεια των *Lamiaceae* και το οποίο εμφανίζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές δράσεις, καθώς επίσης και δράση αντιχολινεστεράσης (Ververis A. et al., 2023).

Σκοπός της εν λόγω μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής αντιοξειδωτικής και νευροπροστατευτικής δράσης των κύριων δραστικών ενώσεων της *S. fruticosa* έναντι της προκαλούμενης από το H_2O_2 και το Αβ, αντίστοιχα, νευροτοξικότητας. Τα δεδομένα τα οποία συλλέξαμε δείχνουν ότι κανένα από τα κλάσματα της *S. fruticosa*, των οποίων η δράση αξιολογήθηκε στην εν λόγω μελέτη, δεν είναι τοξικό για τα διαφοροποιημένα σε χολινεργικούς νευρώνες κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y, στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Από όλα τα κλάσματα της *S. fruticosa* τα οποία εξετάστηκαν, μόνο το FrV (20 μM), το οποίο περιέχει καθαρό ροσμαρινικό οξύ, και το FrVII (10 $\mu g/ml$), το οποίο περιέχει μίγμα φαινολικών ενώσεων, έδειξαν ότι διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση.

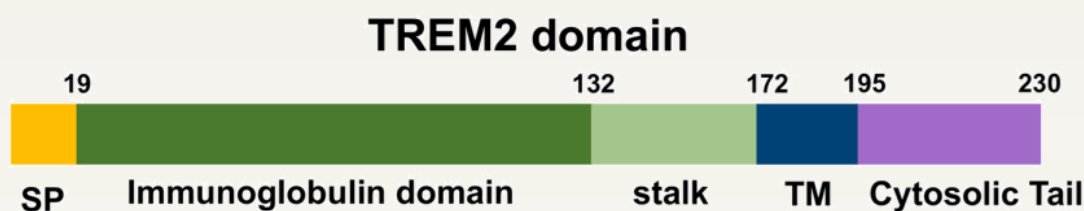
Τέλος, από όλα τα κλάσματα της *S. fruticosa* τα οποία εξετάστηκαν μόνο το FrII (10 $\mu\text{g/ml}$), το οποίο περιέχει μείγμα φαινολικών ενώσεων, και το FrX (5 $\mu\text{g/ml}$), το οποίο περιέχει κυρίως σάκχαρα και την φαινολική ένωση Scutellarin, εμφάνισαν νευροπροστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης από το Αβ κυτταροτοξικότητας. Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι η *S. fruticosa* περιέχει ορισμένες δραστικές ενώσεις οι οποίες αντί να ασκούν νευροπροστατευτική δράση φαίνεται να προάγουν την προκαλούμενη από το Αβ κυτταροτοξικότητα. Τέτοιες ενώσεις περιείχονταν στα κλάσματα FrI (10 $\mu\text{g/ml}$), FrII (10 $\mu\text{g/ml}$) και FrIII (5 και 10 $\mu\text{g/ml}$) τα οποία περιέχουν μίγμα τερπενίων (διτερπένια και τριτερπένια), μίγμα τερπενίων (διτερπένια και τριτερπένια) και μεθόξυ φλαβονών και τέλος μίγμα τριτερπενίων και μεθόξυ φλαβονών, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε ότι η επιδείνωση της προκαλούμενης από το Αβ νευροτοξικότητας που προκλήθηκε από το FrIII (μείγμα τριτερπενίων και μεθόξυ φλαβονών), σε συγκέντρωση αυτού 5 $\mu\text{g/ml}$, ήταν σημαντικά ισχυρότερη σε σχέση με την επιδείνωση που παρατηρήθηκε τόσο για το FrI (μείγμα τερπενίων: διτερπένια και τριτερπένια), όσο και για το FrII (μείγμα τερπενίων: διτερπένια και τριτερπένια και μεθόξυ φλαβονών), σε συγκέντρωση αυτών 10 $\mu\text{g/ml}$.

Συνολικά, τα ευρήματά μας καταδεικνύουν ότι ορισμένες δραστικές ενώσεις οι οποίες προέρχονται από αιθανολικά εκχυλίσματα του φυτού *S. fruticosa* διαθέτουν αντιοξειδωτικές (όπως το καθαρό ροσμαρινικό οξύ ή το μίγμα φαινολικών ενώσεων) και νευροπροστατευτικές δράσεις (όπως το μίγμα φαινολικών ενώσεων ή τα σάκχαρα σε συνδυασμό με την φαινολική ένωση Scutellarin), στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν, καθιστώντας τόσο τα εκχυλίσματα, όσο και ορισμένες δραστικές ενώσεις της *S. fruticosa* πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer's. Ωστόσο, οι νευροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της *S. fruticosa*, καθώς και η γενικότερη τοξικότητα αυτής για τον οργανισμό, θα πρέπει να αξιολογηθεί περεταίρω τόσο μέσω *in vivo* μελετών, όσο και μέσω κλινικών δοκιμών, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η *S. fruticosa* θα μπορούσε να αποτελέσει μία πιθανή ασφαλή θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer's σε ανθρώπους.

Παράρτημα

Το γονίδιο **APOE**, το οποίο κωδικοποιεί τον μεταφορέα λιπιδίου/χοληστερόλης απολιποπρωτεΐνη E, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και συνιστά τον μόνο καθιερωμένο γενετικό τύπο που επηρεάζει τον κίνδυνο ανάπτυξης όψιμης έναρξης σποραδική AD. Η ApoE παράγεται από τα αστροκύτταρα και τη μικρογλία και διαθέτει τρεις ισομορφές (E2, E3 και E4) οι οποίες κωδικοποιούνται από τρία αλληλόμορφα (ε2, ε3 και ε4), τα οποία εμφανίζονται παγκόσμια με συχνότητα 8,4%, 77,9% και 13,7% αντίστοιχα. Ωστόσο, η συχνότητα του ε4 αλληλόμορφου αυξάνεται δραματικά σε περίπου 40% σε ασθενείς με AD. Επιπλέον, η παρουσία του ε4 αλληλόμορφου όχι μόνο αυξάνει κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο τον κίνδυνο ανάπτυξης AD, αλλά και προβλέπει την ηλικία εμφάνισης της νόσου. Οι βιολογικοί μηχανισμοί με τους οποίους η ApoE4 επηρεάζει την παθογένεση της AD παραμένουν εν μέρη μη καθορισμένοι. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι παίζει κεντρικό ρόλο σε διάφορες διαδικασίες οι οποίες σχετίζονται με το AD, όπως το οξειδωτικό στρες, η συναπτική απώλεια, ο Αβ ολιγομερισμός και η μεσολαβούμενη από apoE/LRP1 (lipoprotein receptor-related protein 1) κάθαρση του Αβ, ενός πεπτιδίου το οποίο όταν συγκεντρώνεται στον εξωκυττάριο χώρο μεταξύ των νευρώνων δημιουργεί πλάκες και επάγει φλεγμονώδη απόκριση (John A. et al., 2021)(Esquerda-Canals G. et al., 2017).

Το γονίδιο **TREM2** εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.1 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 17 στον ποντικό. Το εν λόγω γονίδιο κωδικοποιεί ένα συμπληρωματικό DNA 693 bp το οποίο μεταφράζεται σε ένα πολυπεπτίδιο 230 αμινοξέων. Ο TREM2 αποτελεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας η οποία διαθέτει μια εξωκυττάρια περιοχή V-ανοσοσφαιρίνης, μια διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτοσολική ουρά, ενώ επίσης διαθέτει μια μικρή ενδοκυττάρια περιοχή η οποία δεν φέρει μοτίβα σηματοδότησης.

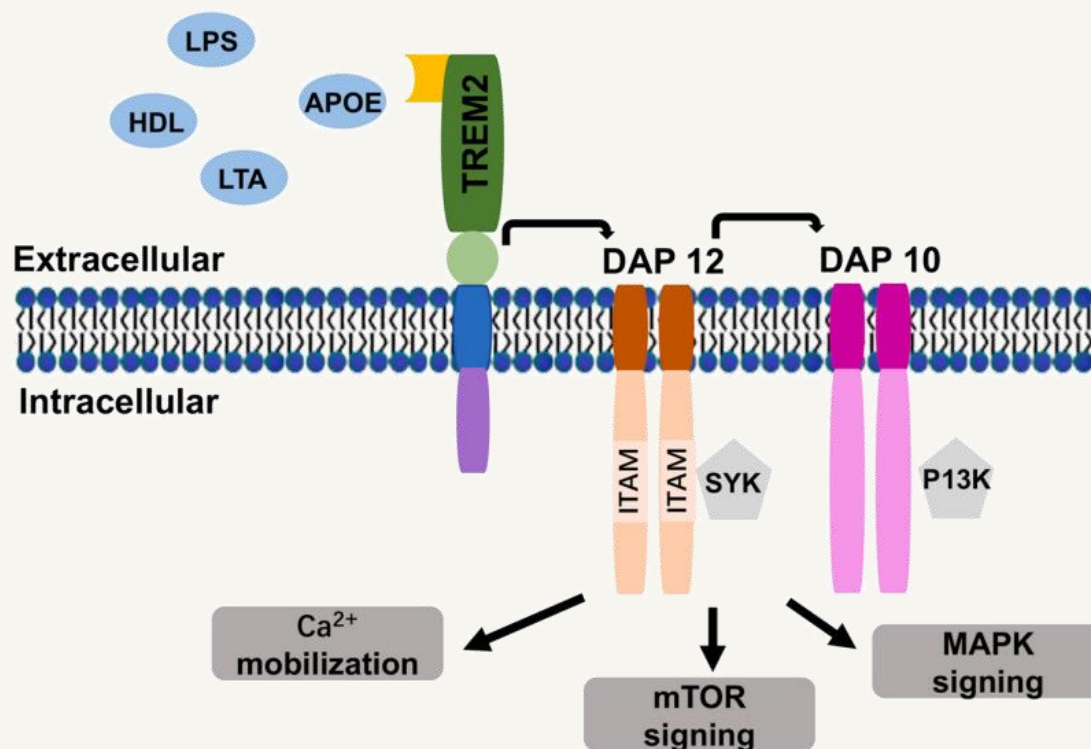


Εικόνα 34: Σχηματική απεικόνιση του TREM2. Οι αριθμοί υποδεικνύουν τα όρια των διαφορετικών περιοχών του TREM2. SP: signaling peptide, Tm: transmembrane (τροποποιημένη από Qin Q. et al., 2021).

Η εξωκυττάρια περιοχή του TREM2 μπορεί να συνδεθεί με LPSs (lipopolysaccharides), LTAs (lipoteichoic acids), HDLs και LDLs (high-density και low-density lipoproteins) και αρκετές απολιποπρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων η APOE. Επιπλέον, πρόσφατα το Αβ χαρακτηρίστηκε ως πρόσδεμα της TREM2 καθώς δεσμεύεται άμεσα με αυτήν ενεργοποιώντας την σηματοδότηση TREM2. Η διαμεμβρανική περιοχή της TREM2 σχετίζεται με την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη προσαρμογέα DAP 12 (DNAX-activation protein 12), η οποία απαιτείται για την έκφραση της TREM2 στην κυτταρική επιφάνεια, καθώς επίσης και για την ενδοκυττάρια μετάδοση σήματος.

Η σηματοδότηση της TREM2 μέσω της DAP12 έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση του ITAM (immuno-tyrosine activation motif) μέσω της στρατολόγησης της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης SYK (Spleen Tyrosine Kinase). Η TREM2 μπορεί επίσης να δράσει και μέσω του προσαρμογέα DAP10, ο οποίος προάγει την στρατολόγηση της PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). Η σηματοδότηση TREM2-DAP12-DAP10 πυροδοτεί έναν καταρράκτη σηματοδότησης

και επάγει ανοσολογική απόκριση, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση του ασβεστίου, την επαγωγή της mTOR (mammalian target of rapamycin) και MAPK (mitogen-activated protein kinase) σηματοδότησης και την ενεργοποίηση του ενεργειακού μεταβολισμού (energy metabolism).

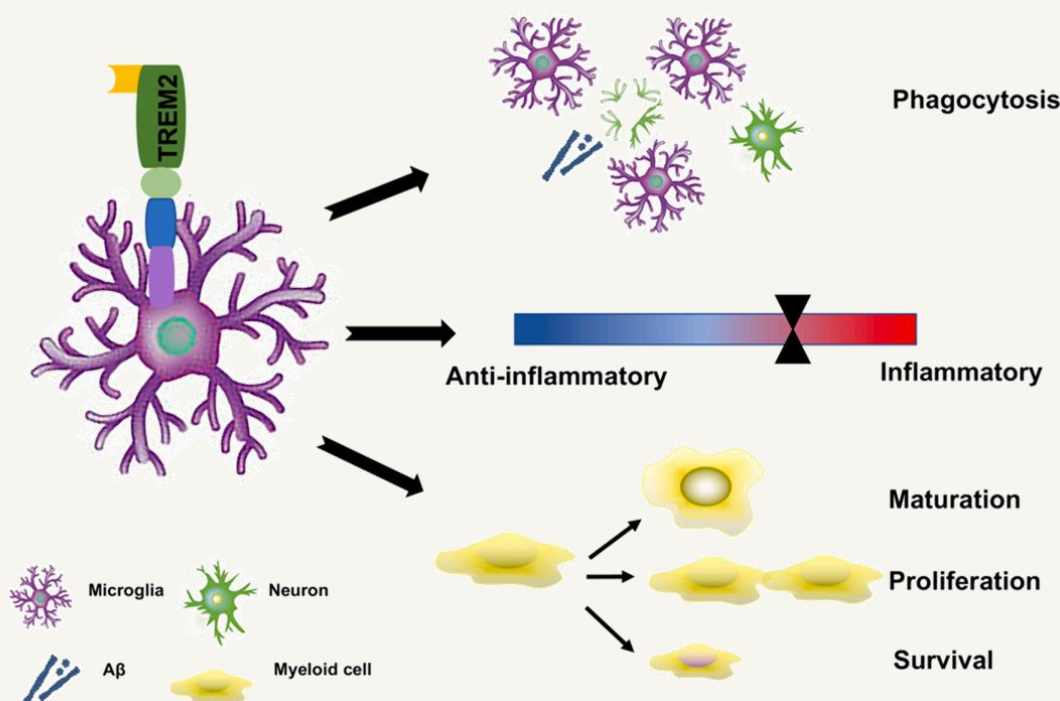


Εικόνα 35: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του TREM2, των μορίων με τα οποία αυτός συνδέεται, καθώς επίσης και της σηματοδότησής του. Τα μόρια προσδέτες του TREM2 όταν δεσμεύονται σε αυτόν επάγουν αλληλεπίδραση του TREM2 με τις DAP12 και DAP10, επάγοντας κινητοποίηση Ca^{2+} , ενεργοποίηση ιντεγκρίνης, αναδιάταξη του κυτταροσκελετού, σηματοδότηση mTOR και MAPK, καθώς επίσης και ενεργοποίηση του ενεργειακού μεταβολισμού (τροποποιημένη από Qin Q. et al., 2021).

Το γονίδιο της TREM2 εκφράζεται κυρίως στα μυελοειδή κύτταρα (κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα, τα μονοκύτταρα στη συνέχεια ωριμάζουν σε μακροφάγα στους διάφορους ιστούς, ενώ επίσης έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιηθούν προς δύο κατηγορίες αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων τα δενδριτικά κύτταρα στα λεμφοειδή όργανα και τα κύτταρα Langerhans στο δέρμα)(Kawamoto H. et al., 2004)(Qin Q. et al., 2021) και στα ιστοειδικά μακροφάγα και ρυθμίζεται από την φλεγμονή. Η έκφραση του TREM2 ποικίλλει ανά περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος, με την υψηλότερη έκφραση να παρατηρείται στον ιππόκαμπο, τον νωτιαίο μυελό και την λευκή ουσία. Στον εγκέφαλο, το TREM2 εκφράζεται έντονα από την μικρογλοία (Qin Q. et al., 2021).

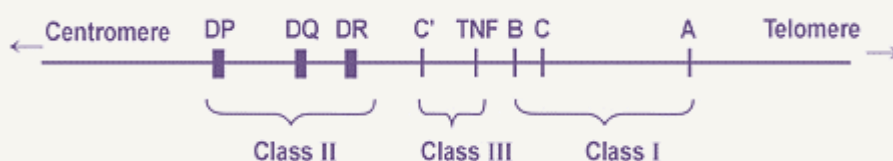
Ο TREM2 είναι απαραίτητος για την ανίχνευση της μικρογλοίας και την απόκριση σε συνθήματα νευροεκφυλισμού, ενώ ο ρυθμός έκφρασής του φαίνεται να σχετίζεται με τον ρυθμό φαγοκυττάρωσης. Έτσι, in vitro, όταν η έκφραση του TREM2 αυξάνεται, αυξάνεται επίσης και ο ρυθμός φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών νευρώνων, των κυτταρικών υπολειμμάτων και των βακτηρίων ή βακτηριακών προϊόντων. Αντίθετα, η απώλεια του TREM2 μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του ρυθμού φαγοκυττάρωσης. In vivo, TREM2-knockout ποντίκια παρουσιάζουν μειωμένη ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και των φαγοκυττάρων. Επιπρόσθετα, ο TREM2 ρυθμίζει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις της

μικρογλοίας. Γονίδια τα οποία σχετίζονται στενά με τον TREM2 εντοπίζονται τόσο σε αντιφλεγμονώδεις όσο και σε προφλεγμονώδεις ομάδες γονιδίων, στον εγκέφαλο, ενώ οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του TREM2 μετά την διέγερση του TLR (Toll-like receptor) έχουν επιβεβαιωθεί τόσο σε κυτταρικές σειρές, όσο και σε παθολογικά μοντέλα ποντικών. Τέλος, ο TREM2 έχει την ικανότητα να ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των μυελοειδών κυττάρων, ενώ επιπλέον αποτελεί βασικό παράγοντα επιβίωσης τους (Qin Q. et al., 2021).

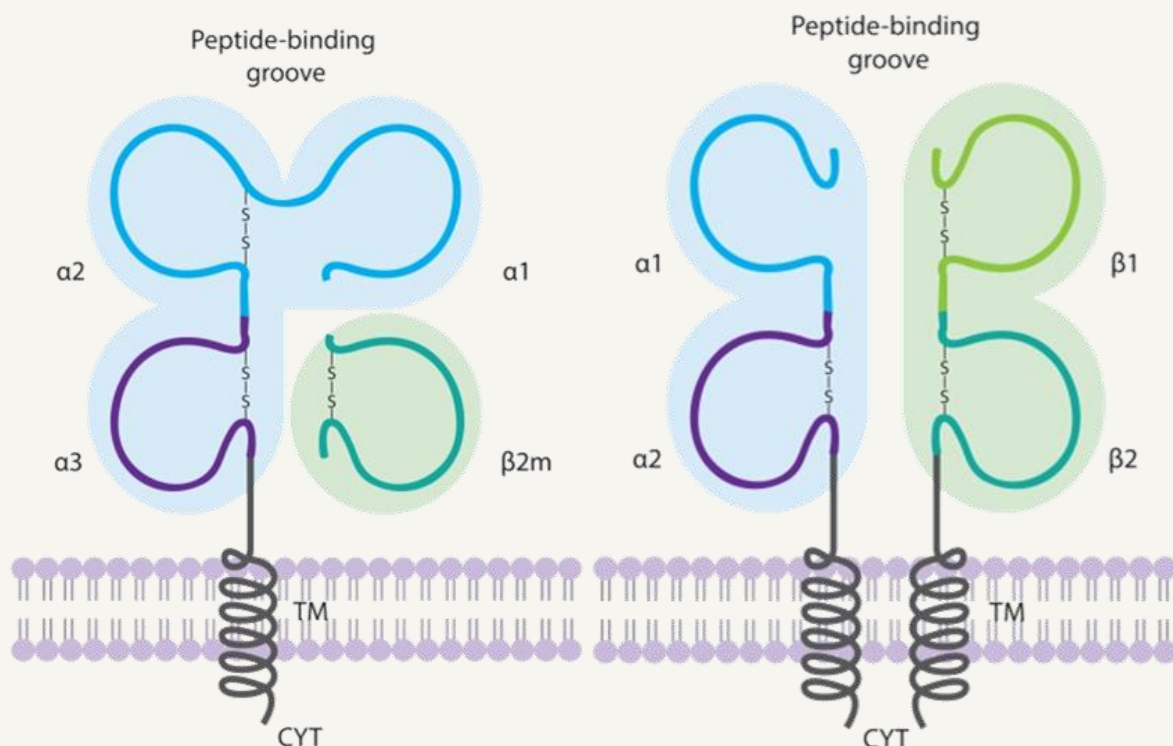


Εικόνα 36: Πιθανές λειτουργίες του TREM2. Ο TREM2 είναι απαραίτητος για τη μικρογλοία ούτως ώστε αυτή να ανιχνεύει και να ανταποκρίνεται σε συνθήματα νευροεκφυλισμού, ενώ η υπερέκφραση του φαίνεται να ενισχύει το ρυθμό φαγοκυττάρωσης. Ο TREM2 μπορεί να ρυθμίσει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και τη νευροπροστασία της μικρογλοίας και να ρυθμίσει την ωρίμανση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των μυελοειδών κυττάρων (τροποποιημένη από Qin Q. et al., 2021).

Το **HLA** αποτελεί την ανθρώπινη εκδοχή του MHC (Major Histocompatibility Complex). Το HLA συνιστά ένα σύμπλεγμα γονιδίων το οποίο εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 (6p21) και καταλαμβάνει έκταση περίπου 3600 kb DNA. Το HLA χωρίζεται σε τρεις περιοχές. Η περιοχή Τάξης I περιέχει τα γονίδια HLA-A, HLA-B και HLA-C, τα λεγόμενα κλασικά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν τις βαριές αλυσίδες (ή α αλυσίδες) των μορίων Τάξης I. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλοι γενετικοί τύποι σε αυτήν την περιοχή οι οποίοι ονομάζονται HLA-E, HLA-L, HLA-J, HLA-K, HLA-H και HLA-G, οι οποίοι κωδικοποιούν τα μη κλασικά μόρια HLA (Choo S. Y., 2007)(Cruz-Tapias P. et al., 2013).



Εικόνα 37: Σχηματική αναπαράσταση του συμπλέγματος γονιδίων του HLA το οποίο εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 6. C' :complement genes (τροποποιημένη από Choo S. Y., 2007).



Εικόνα 38: Δομή των μορίων HLA Τάξης I. Το σχήμα απεικονίζει τις διαφορετικές περιοχές του μορίου HLA-A2 Τάξης I. Η $\beta 2m$ ($\beta 2$ -microglobulin) αποτελεί την ελαφριά αλυσίδα του μορίου Τάξης I και κωδικοποιείται από γονίδιο το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 15, ενώ η αλυσίδα α συνιστά την βαριά αλυσίδα του μορίου Τάξης I και κωδικοποιείται από γονίδια τα οποία εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 6. Η αλυσίδα α αποτελείται από δύο περιοχές δέσμευσης πεπτιδίων ($\alpha 1$ και $\alpha 2$), μια περιοχή η οποία ομοιάζει με ανοσοσφαιρίνη ($\alpha 3$), μία διαμεμβρανική περιοχή (TM, transmembrane region) και μία κυτταροπλασματική ουρά (CYT, cytoplasmic tail)(τροποποιημένη από Cruz-Tapias P. et al., 2013).

Εικόνα 39: Δομή των μορίων HLA Τάξης II. Το σχήμα απεικονίζει τις διαφορετικές περιοχές του μορίου HLA-DR1 Τάξης II. Κάθε μία από τις αλυσίδες α και β διαθέτει τέσσερις περιοχές: την περιοχή σύνδεσης πεπτιδίου ($\alpha 1$ και $\beta 1$), την περιοχή που ομοιάζει με ανοσοσφαιρίνη ($\alpha 2$ και $\beta 2$), την διαμεμβρανική περιοχή (TM, transmembrane region) και την κυτταροπλασματική ουρά (CYT, cytoplasmic tail)(τροποποιημένη από Cruz-Tapias P. et al., 2013).

Η περιοχή Τάξης II αποτελείται από μια σειρά υποπεριοχών, καθεμία από τις οποίες περιέχει γονίδια A και B τα οποία κωδικοποιούν τις αλυσίδες α και β των μορίων HLA Τάξης II, αντίστοιχα. Συνολικά υπάρχουν τρεις οικογένειες μορίων HLA Τάξης II, οι HLA-DP, HLA-DQ και HLA-DR. Η οικογένεια γονιδίων DR αποτελείται από ένα μόνο γονίδιο DRA και εννέα γονίδια DRB (DRB1-9). Οι οικογένειες γονιδίων DP και DQ φέρουν η καθεμία από ένα εκφραζόμενο γονίδιο για τις α και β αλυσίδες, καθώς και επιπλέον μη εκφραζόμενα ψευδογονίδια. Τέλος, η περιοχή τάξης III δεν κωδικοποιεί μόρια HLA, αλλά περιέχει γονίδια ορισμένα από τα οποία κωδικοποιούν για συστατικά του συμπληρώματος (C2, C3, C4, C5, παράγοντας B), για την 21-υδροξυλάση, για τους TNFs (Tumor Necrosis Factors), καθώς επίσης και για πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins) όπως οι HSPA1B, HSPA1A και HSPA1L. Τα μόρια HLA Τάξης I εκφράζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων, ενώ τα μόρια HLA Τάξης II εκφράζονται μόνο σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα B λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα κύτταρα Langerhans, τα ενδοθηλιακά

κύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου. Κύρια λειτουργία των μορίων HLA Τάξης I και Τάξης II είναι να δεσμεύουν πεπτιδικά αντιγόνα και να τα παρουσιάζουν σε ειδικά για το αντιγόνο T λεμφοκύτταρα. Τα πεπτιδικά αντιγόνα που σχετίζονται με μόρια HLA Τάξης I είναι ενδογενή αντιγόνα τα οποία συντίθενται εντός του κυττάρου-στόχου (π.χ. κυτταρικές, μετασχηματισμένες ή ιικά επαγόμενες πρωτεΐνες) και αναγνωρίζονται από τα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CD8+). Αντίθετα, τα πεπτιδικά αντιγόνα που σχετίζονται με μόρια HLA Τάξης II συνιστούν εξωγενή αντιγόνα τα οποία ενδοκυτταρώνονται, αποικοδομούνται στο όξινο ενδοσωμικό διαμέρισμα και στην συνέχεια το σύμπλοκο πεπτιδίου-HLA Τάξης II μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια όπου αναγνωρίζεται από τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (CD4+)(Choo S. Y., 2007)(Cruz-Tapias P. et al., 2013).

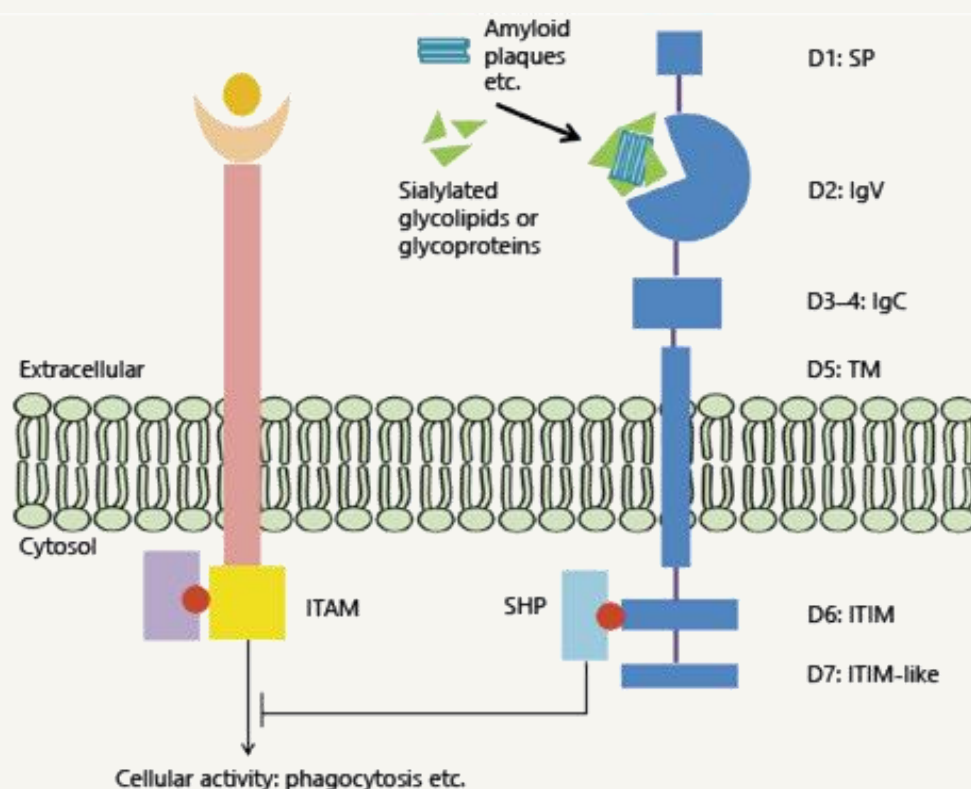
Το γονίδιο της **CD33** εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19q13.33 στον άνθρωπο και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 67 kDa. Στα θηλαστικά, η CD33 εκφράζεται σε αιμοποιητικά κύτταρα καθώς επίσης και στα φαγοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, των πρόδρομων μυελομονοκυττάρων (myelomonocytic precursors), των μακροφάγων, των μονοκυττάρων, των δενδριτικών κυττάρων και των μικρογλοιακών κυττάρων. Η CD33 ανήκει στην οικογένεια των λεκτινών που ομοιάζουν με Ig (Siglecs) οι οποίες δεσμεύουν το σιαλικό οξύ. Η ανθρώπινη CD33 συνδέεται κατά προτίμηση με το alpha-2,6-linked sialic acid (Zhao L., 2019).

Η CD33 συνιστά μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I της οποίας το αμινοτελικό άκρο εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο, ενώ το καρβοξυτελικό εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η CD33 αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας των Ig και συνεπώς διαθέτει περιοχές Ig, ενώ επίσης εμφανίζει δομή Ig πτύχωσης (fold). Η CD33 αποτελείται από επτά περιοχές (Zhao L., 2019):

- Την περιοχή D1 (domain 1) η οποία αναφέρεται σε ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (SP, Signal peptide).
- Την περιοχή D2 (domain 2) η οποία αποτελεί μία περιοχή δέσμησης IgV (IgV ligand binding domain), η οποία συνιστά την θέση δέσμησης προσδετών (ligands) που περιέχουν σιαλικό οξύ και θεωρείται ως η λειτουργική περιοχή της CD33.
- Τις περιοχές D3–4 (domain 3-4) οι οποίες αντιστοιχούν σε περιοχές IgC.
- Την περιοχή D5 (domain 5) η οποία αντιστοιχεί σε μία διαμεμβρανική (TM, Transmembrane) περιοχή.
- Την περιοχή D6 (domain 6) η οποία αντιστοιχεί σε ένα ITIM (immunotyrosine inhibitory motif) το οποίο εντοπίζεται κοντά στην μεμβράνη (membrane-proximal) και την περιοχή D7 η οποία αντιστοιχεί σε ένα απομακρυσμένο από την μεμβράνη (membrane-distal) ITIM-like motif. Το ITIM αποτελεί την κύρια περιοχή ανασταλτικής μεταγωγής σήματος στα κύτταρα. Το ITIM-like motif μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην βασιζόμενη στον immunoreceptor tyrosine ανασταλτική σηματοδότηση (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory signaling).

Η CD33 εκφράζεται αποκλειστικά στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπου και ασκεί σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των λειτουργιών των ανοσοκυττάρων. Στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, κυτταρικές διεργασίες όπως η φαγοκυττάρωση, η απελευθέρωση κιτοκίνης, η απόπτωση κ.λ.π., συν-ρυθμίζονται από υποδοχείς ενεργοποίησης οι οποίοι περιέχουν ITAM και από ανασταλτικούς υποδοχείς οι οποίοι περιέχουν ITIM. Όταν στον CD33 συνδεθεί το πρόσδεμά του επάγεται φωσφορλίωση της τυροσίνης, εντός του ITIM, η οποία δρα ως θέση σύνδεσης για SHPs (Src homology 2 domain-containing phosphatases). Αυτό οδηγεί σε αποφωσφορλίωση των κυτταρικών πρωτεϊνών, κατά συνέπεια ρυθμίζει προς τα

κάτω μονοπάτια σηματοδότησης ενεργοποίησης τα οποία περιλαμβάνουν/ξεκινούν με φωσφοριλίωση, όπως αυτά που προκαλούνται (induced) από ITAMs. Η CD33 συνιστά έναν ανασταλτικό υποδοχέα, ο οποίος μπορεί να ενεργοποιηθεί ιδιοσυστατικά από γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια τα οποία περιέχουν σιαλικό οξύ και τα οποία εντοπίζονται διαρκώς στις πλάκες αμυλοειδούς στον εγκέφαλο ασθενών με την νόσο Alzheimer. Ο ενεργοποιημένος CD33 υποδοχέας, στρατολογεί ανασταλτικές πρωτεΐνες όπως οι SHP φωσφατάσες μέσω της περιοχής ITIM, με αποτέλεσμα την αναστολή κυτταρικών λειτουργιών όπως η φαγοκυττάρωση. Συνεπώς, οι πλάκες αμυλοειδούς οι οποίες φέρουν γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια τα οποία περιέχουν σιαλικό οξύ είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τη σηματοδότηση της CD33 και στη συνέχεια να «κρυφτούν» (masked) έναντι της μικρογλοιακής αναγνώρισης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απόκρυψη νευριτικών πλακών, επιτρέποντας τους να αποφύγουν την ανοσολογική επιτήρηση, αποτρέποντας τη διαδικασία καθαρισμού τους από τα μικρογλοιακά κύτταρα, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε συσσώρευση του αμυλοειδούς (Zhao L., 2019).



Εικόνα 40: Σχηματική απεικόνιση της δομής της CD33. Η CD33 αποτελείται από επτά περιοχές: την περιοχή D1 (domain 1) η οποία αναφέρεται σε ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (SP, signal peptide), την περιοχή D2 (domain 2) η οποία αποτελεί μία περιοχή δέσμησης IgV (IgV ligand binding domain), τις περιοχές D3-4 (domain 3-4) οι οποίες αντιστοιχούν σε περιοχές IgC, την περιοχή D5 (domain 5) η οποία αντιστοιχεί σε μία διαμεμβρανική (TM, transmembrane) περιοχή, την περιοχή D6 (domain 6) η οποία αντιστοιχεί σε ένα ITIM (immunotyrosine inhibitory motif) και την περιοχή D7 η οποία αντιστοιχεί σε ένα membranedistal ITIM-like motif. Ο ανασταλτικός υποδοχέας CD33 μπορεί να ενεργοποιηθεί ιδιοσυστατικά από γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια τα οποία φέρουν σιαλικό οξύ και τα οποία εντοπίζονται διαρκώς (constantly) στις πλάκες αμυλοειδούς στον εγκέφαλο ασθενών με την νόσο Alzheimer. Το παραπάνω επάγει την φωσφοριλίωση της τυροσίνης, εντός του ITIM, η οποία δρα ως θέση σύνδεσης για SHPs (Src homology 2 domain-containing phosphatases). Αυτό οδηγεί σε αποφωσφοριλίωση των κυτταρικών πρωτεϊνών, κατά συνέπεια ρυθμίζει προς τα κάτω μονοπάτια σηματοδότησης ενεργοποίησης τα οποία ξεκινούν με φωσφοριλίωση (όπως αυτά που επάγονται από ITAMs) και τελικά οδηγεί σε αναστολή των κυτταρικών λειτουργιών, όπως η φαγοκυττάρωση (Zhao L., 2019).

Το γονίδιο του **CR1** εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 στον γενετικό τόπο 1q32 σε μία γενετική συστάδα γονιδίων σχετιζόμενων με το συμπλήρωμα, η οποία συχνά αποκαλείται RCA (regulators of complement activation) γονιδιακή συστάδα, της οποίας τα πρωτεϊνικά προϊόντα ανήκουν στην οικογένεια RCA (Crehan H. et al., 2012)(Zhu X. C., et al., 2015). Το γονίδιο υφίσταται σε τέσσερα συνεπικρατή αλληλόμορφα, διαφορετικών μεγεθών, και οι παραλλαγές του οφείλονται σε γενετικούς διπλασιασμούς και διαγραφές οι οποίες πραγματοποιούνται προ-μεταφραστικά. Τα διαφορετικά αλληλόμορφα είναι γνωστά με διάφορα ονόματα. Πιο συγκεκριμένα, τα τέσσερα αλληλόμορφα είναι γνωστά ως CR1-C ή CR1-F' (160 kDa), CR1-A ή CR1-F (190 kDa), CR1-B ή CR1-S (220 kDa) και CR1-D (250 kDa). Οι σχετικές συχνότητες των τεσσάρων αυτών αλληλομόρφων διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών, με τα πιο συχνά εμφανιζόμενα αλληλόμορφα να είναι τα CR1-A/F και CR1-B/S, ενώ τα αλληλόμορφα CR1-C/F' και CR1-D εμφανίζονται σπάνια σε όλους τους πληθυσμούς (Crehan H. et al., 2012).

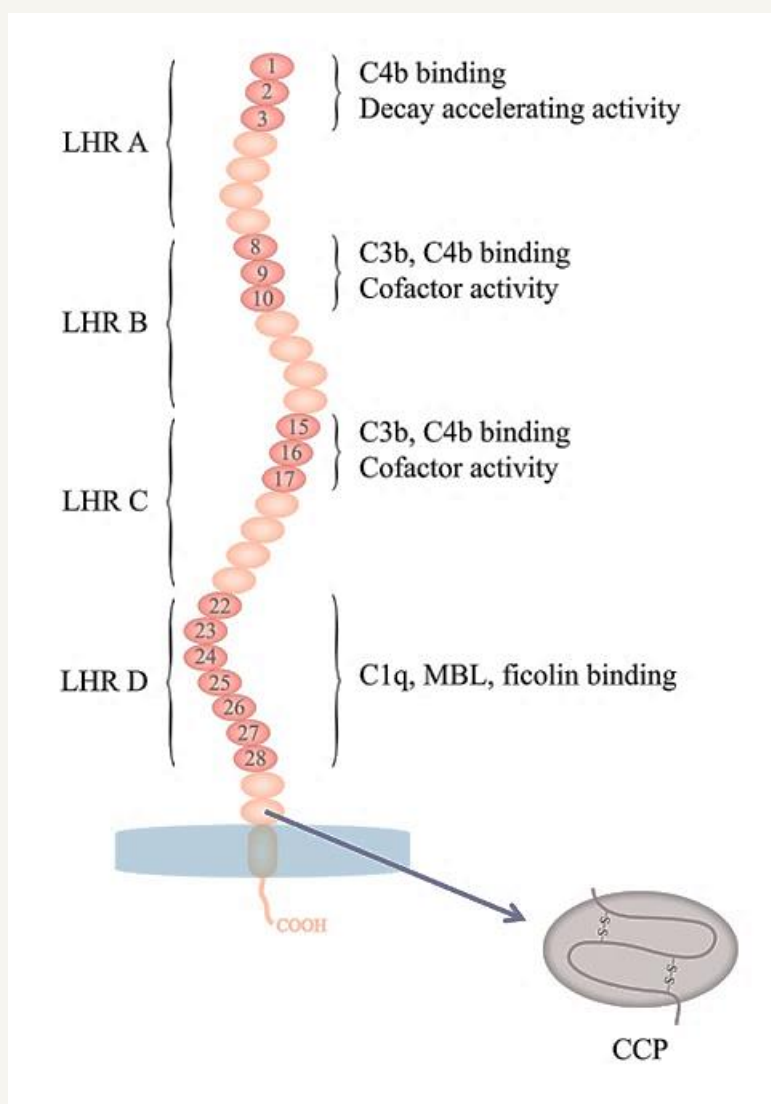
Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά των τεσσάρων διαφορετικών αλληλόμορφων του CR1 (τροποποιημένος από Crehan H. et al., 2012).

CR1 allele	Protein size (non-reducing conditions) (kDa)	SCR/CCP number	LHR number	Frequency			
				Caucasian	African American	Mexican	Asian Indian
CR1-C	160	23	3	Infrequent			
CR1-A	190	30	4	0.87	0.82	0.89	0.916
CR1-B	220	37	5	0.11	0.11	0.11	0.084
CR1-D	250	44	6	Infrequent			

Ο CR1 (επίσης γνωστός ως CD35 ή υποδοχέας C3b/C4b) είναι μία 200 kDa τύπου I διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας, η οποία αποτελείται από τέσσερις κύριες δομικές περιοχές, το σηματοδοτικό πεπτιδίο (41 αμινοξικών καταλοίπων), μια εξωκυττάρια περιοχή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα (25 αμινοξικών καταλοίπων) και τέλος από μία κυτταροπλασματική περιοχή (43 αμινοξικών καταλοίπων). Η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται κυρίως από 30 εξελικτικά συντηρημένες μονάδες (modules) CCP (complement control protein). Οι μονάδες CCP είναι επίσης γνωστές ως SCR (short consensus repeats) ή περιοχές sushi και εμφανίζουν μια εξαιρετικά συντηρημένη δομή η οποία αποτελείται από περίπου 60-70 αμινοξικά κατάλοιπα, συμπεριλαμβανομένων τεσσάρων καταλοίπων κυστεΐνης τα οποία σχηματίζουν εσωτερικούς (προς το εσωτερικό) δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα 28 αμινοτελικά CCP ομαδοποιούνται σε τέσσερις LHRs (long homologous repeats) A-D, όπου κάθε LHR περιλαμβάνει επτά SCR. Τα δύο CCPs τα οποία βρίσκονται πλησίον της διαμεμβρανικής περιοχής της CR1 δεν περιλαμβάνονται στις δομές LHR. Οι περιοχές LHR είναι εκείνες οι οποίες καθορίζουν τις διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα CR1 και κωδικοποιούν μια θέση δέσμευσης για το συστατικό του συμπληρώματος C3b/C4b, η οποία μερικές φορές καλείται site 2- hence (Santos-López J. et al., 2023)(Crehan H. et al., 2012)(Erdei A. et al., 2021) (Zhu X. C. et al., 2015).

Για τον υποδοχέα CR1 έχουν περιγραφεί τέσσερις διαφορετικές αλλοτυπικές (allotypic) μορφές με βάση το μοριακό βάρος και την γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης, των οποίων οι διαφορές εντοπίζονται στην εξωκυττάρια περιοχή του μορίου. Αν και οι διαφορές μεταξύ των αλληλόμορφων του CR1 φαίνονται μεγάλες, οι λειτουργικές διαφορές μεταξύ των πρωτεϊνών που προκύπτουν από αυτά είναι ανεπαίσθητες. Αύξηση του αριθμού των περιοχών LHRs (long homologous repeats) συνεπάγεται ότι τα μεγαλύτερα αλληλόμορφα (CR1-B/S και CR1-D) θα έχουν μία επιπλέον θέση δέσμευσης C3b/C4b. Αντίθετα, το μικρότερο αλληλόμορφο CR1-C/F' διαθέτει μόνο μία θέση δέσμευσης C3b/C4b, γεγονός το οποίο

φαίνεται να σχετίζεται με κάποιου είδους απώλεια λειτουργίας (Santos-López J. et al., 2023)(Crehan H. et al., 2012)(Erdei A. et al., 2021)(Zhu X. C. et al., 2015).



Εικόνα 41: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του ανθρώπινου CR1 (τροποποιημένη από Erdei A. et al., 2021).

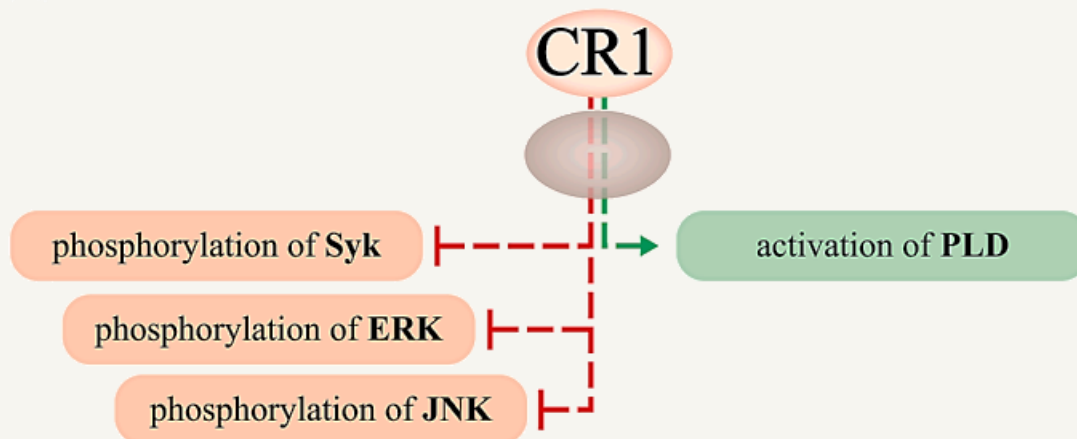
Ο CR1 διαθέτει τόσο λειτουργίες υποδοχέα όσο και ρυθμιστικές λειτουργίες. Έχει την ικανότητα να δεσμεύει θραύσματα του συμπληρώματος όπως τα C3b και C4b με υψηλή συγγένεια, καθώς επίσης και το iC3b με χαμηλή συγγένεια. Παράλληλα, έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με το συστατικό του συμπληρώματος C1q, την MBL (mannose binding lectin), καθώς επίσης και τον EBV (Epstein-Barr virus). Πολλαπλά CCPs διαφορετικών LHR είναι υπεύθυνα για τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις του CR1. Εκτός από τον ρόλο που διαδραματίζει σε διάφορες λειτουργίες των Β-λεμφοκυττάρων, ο CR1 που εκφράζεται στα εμπύρηννα κύτταρα, ως μέλος της υπερικογένειας CCR, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του καταρράκτη του συμπληρώματος (complement cascade) επιταχύνοντας την διάσπαση για τις C3/C5-convertases και δρώντας ως συμπαράγοντας για τη διαμεσολαβούμενη από τον παράγοντα Ι πρωτεολυτική διάσπαση του C3b και C4b σε iC3b/C3dg και iC4b/C4dg, αντίστοιχα.

Ο CR1 εκφράζεται σε μια ποικιλία ανθρώπινων κυτταρικών τύπων, ενώ ο κυτταρικός εντοπισμός του φαίνεται να επηρεάζει τις βιολογικές του λειτουργίες. Ο CR1 κυρίως εντοπίζεται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, όπου είναι υπεύθυνος για την Knops blood group (York and McCoy antigens), ενώ επιπρόσθετα εντοπίζεται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen-presenting cells, APC). Στα ερυθροκύτταρα των πρωτεύοντων, ο CR1 μεσολαβεί στην προσκόλληση και μεταφορά του ανοσοσυμπλέγματος (immune complex) στο ήπαρ και τον σπλήνα για φαγοκυττάρωση συμβάλλοντας στην κάθαρσή του. Στα λευκοκύτταρα, κύριος ρόλος του CR1 είναι η διοχέτευση της ανοσολογικής απάντησης έναντι ξένων αντιγόνων σε άλλους τύπους ανοσοκυττάρων οι οποίοι φέρουν υποδοχείς CR2, CR3 και CR4. Επιπρόσθετα, ο CR1 δρα ως αναστολέας του BCR (B-cell receptor) αποτρέποντας την ενεργοποίηση του B λεμφοκυττάρου. Παράλληλα, έχει ταυτοποιηθεί μια διαλυτή μορφή του CR1 ο sCR1 (Soluble complement receptor type 1) ο οποίος διαθέτει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Erdei A. et al., 2021)(Santos-López J. et al., 2023).

Πίνακας 12: Κυτταρικός εντοπισμός και λειτουργίες του ανθρώπινου CR1 (τροποποιημένος από Erdei A. et al., 2021).

Cell type	Function of CR1
B lymphocyte	inhibition of several functions, enhancement of antigen uptake and presentation
T lymphocyte	inhibition of proliferation, generation of regulatory T cells
follicular dendritic cell (FDC)	antigen retention
red blood cell (RBC)	immune complex clearance
monocyte, macrophage, basophil granulocyte, eosinophil granulocyte, neutrophil granulocyte, mast cell, endothelial cell, Langerhans cell, Kupffer cell	phagocytosis/endocytosis of complement opsonized particles
glomerular podocyte, neuron, microglia cell, astrocyte, natural killer (NK) cell	inhibition of complement activation

Η 25 αμινοξικών καταλοίπων κυτταροπλασματική ουρά του CR1 περιέχει ένα πιθανό μοτίβο φωσφορυλίωσης θρεονίνης. Διέγερση (triggering) του CR1 ενεργοποιεί την φωσφολιπάση D (phospholipase D, PLD), η οποία συνιστά το κύριο σήμα για την φαγοκυττάρωση των οψωνοποιημένων σωματιδίων του συμπληρώματος στα ανθρώπινα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα. Παρόλο που για την άμεση σηματοδότηση μέσω του CR1 στα ανθρώπινα B λεμφοκύτταρα δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα, φαίνεται ότι η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του CR1 και του BCR (B-cell receptor) επάγει αναστολή της φωσφορυλίωσης βασικών σηματοδοτικών μορίων τα οποία συνδέονται με τον BCR και συγκεκριμένα της Syk (Spleen tyrosine kinase) κινάσης της τυροσίνης, καθώς επίσης και τις MAPKs (mitogen-activated protein kinases) ERK (Extracellular signal-regulated kinase) και JNK (c-Jun N-terminal kinase)(Erdei A. et al., 2021).



Εικόνα 42: Εμπλοκή της CR1 σε ενδοκυττάρια σηματοδοτικά γεγονότα (τροποποιημένη από Erdei A. et al., 2021).

Για την εμφάνιση LOAD ζωτικό ρόλο φαίνεται να παίζει η κάθαρση του Αβ και όχι τόσο ο ρυθμός με τον οποίον αυτό συσσωρεύεται. Θεωρείται ευρέως αποδεκτό ότι ο CR1 συμβάλει στην εμφάνιση AD ρυθμίζοντας την κάθαρση του Αβ τόσο περιφερειακά, με την συμμετοχή των ερυθροκυττάρων, όσο και απευθείας στον εγκέφαλο. Παράλληλα, η κάθαρση του Αβ μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την βοήθεια των φαγοκυττάρων εφόσον είναι παρόντα αντισώματα έναντι του Αβ, τα οποία μπορεί να διέρχονται ή όχι τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Zhu X. C. et al., 2015).

Στον ορό το Αβ42 συνδέεται με τον E-CR1 (Erythrocyte-Complement Receptor Type 1), μέσο ενός ανεξάρτητου από αντισώματα μονοπατιού, και στη συνέχεια τα οψωνοποιημένα ανοσοσυμπλέγματα μεταφέρονται από τα ερυθροκύτταρα στο ήπαρ όπου πραγματοποιείται ο καταβολισμός και η απέκκρισή τους. Με τον τρόπο αυτόν μπορεί να αφαιρεθεί και το δεσμευμένο στο C3b Αβ (Zhu X. C. et al., 2015).

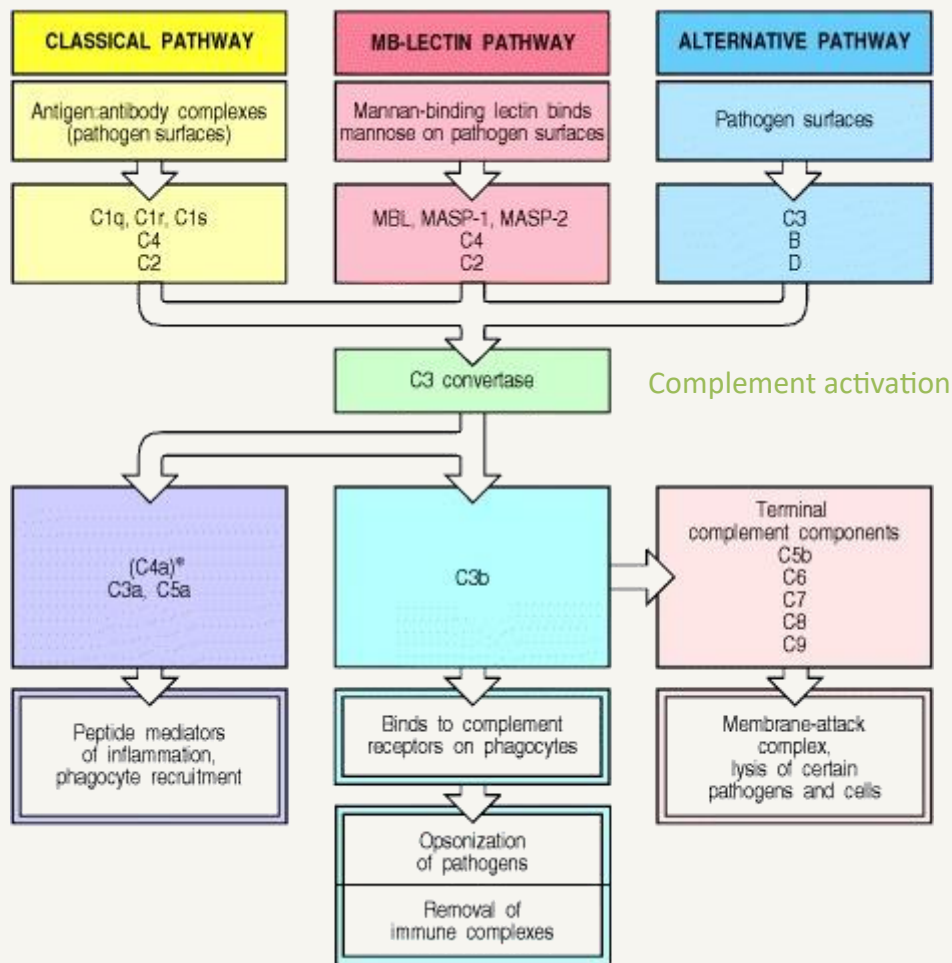
Η κάθαρση του Αβ 1-42 που εντοπίζεται στην κυκλοφορία εξαρτάται από την δέσμευση του C3b στον E-CR1. Έτσι, είναι πιθανό ότι η γενετική μεταβλητότητα που προκαλεί αλλοιώσεις στην δομή και την έκφραση του CR1 θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεταβολή του ρυθμού κάθαρσης του Αβ 1-42 (Crehan H. et al., 2012).

Η παρουσία του πεπτιδίου Αβ επάγει την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος, επάγοντας τη διάσπαση του C3 σε C3a και C3b. Τα υψηλά επίπεδα C3b πρέπει να «καθαριστούν» (απομακρυνθούν) από το σύστημα και η κάθαρση αυτή θεωρείται ότι είναι μεγαλύτερη όταν ο CR1 διαθέτει περισσότερες θέσεις δέσμευσης για το θραύσμα του συμπληρώματος C3b. Συνεπώς, η ταχύτητα κάθαρσης του C3b θα είναι μεγαλύτερη για τα μεγαλύτερου μήκους αλληλόμορφα του CR1 συγκριτικά με τα μικρότερου μήκους αλληλόμορφα. Έτσι, οι μεγαλύτερες μορφές του CR1 θα πρέπει να παρέχουν σχετική προστασία έναντι της ανάπτυξης AD λόγω της ικανότητάς τους να αμβλύνουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος, η οποία πιστεύεται ότι ενισχύει την παθολογία της AD. Ωστόσο, η υπόθεση αυτή έχει αμφισβητηθεί από ευρήματα, τα οποία

υποστηρίζουν ότι το μεγαλύτερο αλληλόμορφο του CR1 το CR1-B/S αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση AD, καθώς επάγει υπερβολική αναστολή του θραύσματος C3b του συμπληρώματος και ως εκ τούτου μειώνει την μεσολαβούμενη από το C3b οψωνοποίηση του πεπτιδίου Αβ 1-42 (Crehan H. et al., 2012).

Επιπρόσθετα, στην κάθαρση του Αβ από τον εγκέφαλο φαίνεται να παίζει ρόλο και ο CR1 που εντοπίζεται στην μικρογλοία. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η μικρογλοία είναι αντιδραστική, δηλαδή τα νευρογλοιακά κύτταρα αντιδρούν σε σήματα τα οποία προέρχονται από κατεστραμμένους ή νεκρούς νευρώνες επάγοντας την κάθαρση των κυτταρικών αποβλήτων και προάγοντας την αναγέννηση και την επιδιόρθωση των κατεστραμμένων νευρώνων (Zhu X. C. et al., 2015)(Streit W. J. et al., 1999). Κατά την AD η μικρογλοία εμφανίζει έναν πιο πρώιμο φαινότυπο και ενεργοποιείται κατά την ανοσολογική απάντηση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο C3b, ο οποίος συνιστά τον προσδέτη του CR1, παράγεται και καταστρέφεται αυθόρμητα. Ωστόσο, η παρουσία των πεπτιδίων Αβ ενεργοποιεί την C3 κονβερτάση η οποία στη συνέχεια διασπά το C3b σε C3bi, το οποίο περιβάλλει το Αβ και οδηγεί στη σύλληψη του Αβ από τα φαγοκύτταρα τα οποία εκφράζουν τον CR3 (υποδοχέα του C3bi). Ο blocked CR1 ρυθμίζει/καταστέλλει τη διάσπαση του C3b σε δύο θέσεις για την παραγωγή C3bi, αποτρέποντας την φαγοκυττάρωση, επηρεάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τον νευρωνικό θάνατο (Zhu X. C. et al., 2015).

Ο sCR1 πιστεύεται ότι είναι ένα τοπικά ενεργό μόριο, το οποίο είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό στην ρύθμιση του συμπληρώματος και διαθέτει εξαιρετικά αποτελεσματικές αντιφλεγμονώδεις δράσεις, όπως προαναφέρθηκε. Αποτελεί έναν ισχυρό τοπικό αναστολέα ο οποίος δρα στο κλασικό μονοπάτι του συμπληρώματος, στο μονοπάτι της λεκτίνης, καθώς επίσης και στο εναλλακτικό μονοπάτι του συμπληρώματος. Ο μηχανισμός δράσης του sCR1 είναι διπλός. Πρώτον βοηθάει στην διάσπαση των C3 κονβερτασών και δεύτερον στοχεύει τα C3b και C4b για αποικοδόμηση με σκοπό την αναστολή της υπερβολικής ενεργοποίησης του καταρράκτη του συμπληρώματος (Zhu X. C. et al., 2015).



Εικόνα 43: Υπάρχουν τρία μονοπάτια ενεργοποίησης του συμπληρώματος: 1) η κλασική οδός, η οποία ενεργοποιείται από το αντίσωμα ή από την άμεση σύνδεση του συστατικού C1q του συμπληρώματος στην επιφάνεια του παθογόνου, 2) η οδός MB-lectin (mannan-binding lectin), η οποία ενεργοποιείται από τη λεκτίνη που δεσμεύει τη μαννάνη, ένα φυσιολογικό συστατικό του ορού το οποίο δεσμεύει ορισμένα εγκλωβισμένα βακτήρια και 3) η εναλλακτική οδός, η οποία ενεργοποιείται απευθείας στις επιφάνειες των παθογόνων. Όλες αυτές οι οδοί δημιουργούν μια κρίσιμη ενζυμική δραστηριότητα η οποία με τη σειρά της δημιουργεί τα μόρια τελεστές του συμπληρώματος. Οι τρεις κύριες συνέπειες της ενεργοποίησης του συμπληρώματος είναι ο οψωνισμός των παθογόνων, η στρατολόγηση των κυττάρων της φλεγμονής και η άμεση θανάτωση των παθογόνων. Τα πρώιμα συμβάντα και των τριών οδών ενεργοποίησης του συμπληρώματος περιλαμβάνουν μια σειρά από αντιδράσεις διάσπασης οι οποίες καταλήγουν στο σχηματισμό του ενζύμου C3 κονβερτάση, η οποία διασπά το συστατικό C3 του συμπληρώματος σε C3b και C3a, ενώ επίσης σε συνδυασμό με το C3b σχηματίζει την C5 κονβερτάση η οποία διασπά το C5b σε C5a και C5b. Η παραγωγή της κονβερτάσης C3 είναι το σημείο στο οποίο οι τρεις οδοί συγκλίνουν και οδηγεί στην δημιουργούνται εκείνων των μορίων τα οποία αποτελούν τους κύριους τελεστές του συμπληρώματος. (τροποποιημένη από Janeway C. A. Jr et al., 2001)

Η οικογένεια **MS4A** (membrane-spanning 4-domains subfamily A) περιλαμβάνει 18 μόρια τα οποία κωδικοποιούνται από έναν γονιδιωματικό τόπο στο χρωμόσωμα 11q12 στον άνθρωπο και 23 μόρια τα οποία εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 19 στα ποντίκια (Mattiola I. et al., 2021). Τα γονίδια MS4A εκφράζονται κυρίως στα αιμοποιητικά κύτταρα, ωστόσο έχουν εντοπιστεί και σε άλλους ιστούς συμπεριλαμβανομένων αυτών του εγκεφάλου (Ma J. et al., 2015). Τα πρώτα τρία μέλη της οικογένειας, CD20/MS4A1, MS4A2 (FcεRIβ) και MS4A3 (HTm4), κλωνοποιήθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1980 με αρχές της δεκαετίας του 1990 και παρατηρήθηκε ότι εμφάνιζαν υψηλή ταυτότητα αλληλουχίας μεταξύ τους, υποστηρίζοντας την ύπαρξη ενός συμπλέγματος δομικά συγγενών πρωτεϊνών αποτελούμενες από τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές. Η ταυτοποίηση άλλων πρωτεϊνών με το συγκεκριμένο δομικό μοτίβο καθιέρωσε την οντότητα της οικογένειας MS4A (Mattiola I. et al., 2021).

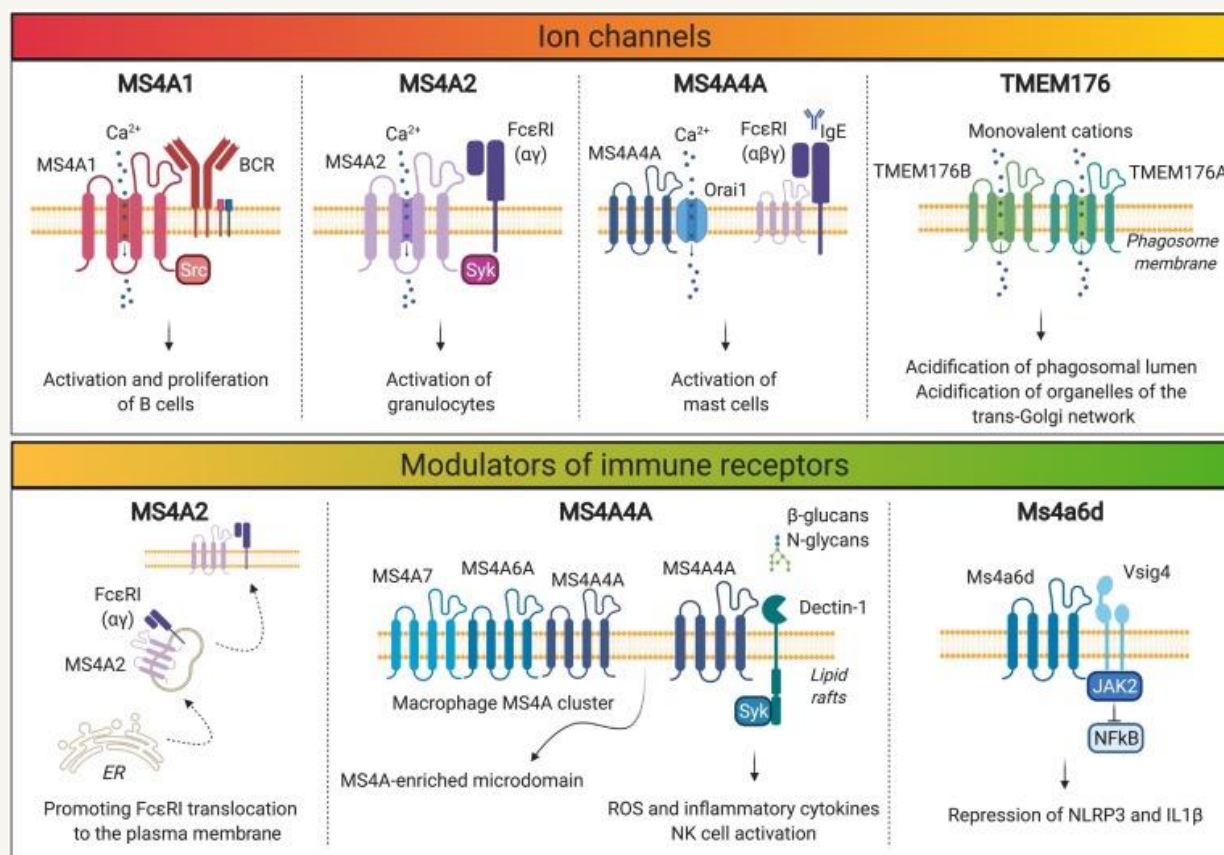
Πίνακας 13: Χαρακτηρισμός των μελών της οικογένειας MS4A: εντοπισμός, συνεργάτες και λειτουργίες (τροποποιημένος από Mattiola I. et al., 2021).

Gene	Human chromosome localization	Mouse chromosome localization	Expression	Partner	Function
MS4A1	11q12.2	19 8.19 cM	B cells ^{H,M}	B cell receptor	Ca ²⁺ ion channel
MS4A2	11q12.1	19 8.46 cM	Mast cells ^{H,M} ; basophils ^{H,M}	FcεRI (αγ)	Ca ²⁺ ion channel; FcεRI (αγ) chaperone
MS4A3	11q12.1	19 8.47 cM	Myeloid precursors ^{H,M} ; granulocytes ^M	ND	Ontogeny marker; regulator of cell cycle
MS4A4A	11q12.1	19A	Macrophages ^{H,M} ; mast cells ^H ; olfactory sensory neurons ^M	MSA46A/MS4A7	
				KIT	KIT trafficking regulator
				Dectin-1	Activator of Dectin-1-mediated Syk- dependent pathway
MS4A4E	11q12.2	19 8.27 cM	Hematopoietic cells ^H	ND	ND
MS4A5	11q12.2		Hematopoietic cells ^H	ND	ND
MS4A6A	11q12.2	Ms4a6d: 19 8.47 cM, cytoband B	Monocytes ^H /macrophages ^{H,M} ; olfactory sensory neurons ^M	MS4A4A	
				Vsig4	NLRP3 inflammasome regulator
MS4A6E	11q12.2		Brain ^H	ND	ND
MS4A7	11q12.2	19 8.43 cM, cytoband B	Monocytes/macrophages ^H ; HSC-derived microglia-like cells ^M ; olfactory sensory neurons	MS4A4A	Ontogeny marker
MS4A8B	11q12.2	Ms4a8a: 19A	Macrophages ^M ; olfactory sensory neurons ^M ; colonic epithelial cells ^{H,M}	ND	ND
MS4A10	11q12.2	19 7.44 cM, cytoband B	Colon ^M ; olfactory sensory neurons ^M	ND	ND
MS4A12	11q12.2	19 8.07 cM	Colon epithelial cells ^H	ND	Ca ²⁺ regulator
MS4A13	11q12.2	19 7.92 cM	Spermatozoa ^M	ND	ND
MS4A14	11q12.2	19 8.37 cM	Monocytes/macrophages ^H Testis ^R	ND	ND
MS4A15	11q12.2	19 7.47 cM	Olfactory sensor neurons ^M	ND	ND
MS4A18	11q12.2	19 7.50 cM	Testis ^H	ND	ND
TMEM176A	7q36.1	6 23.75 cM	Dendritic cells ^H	TMEM176B	Ca ²⁺ ion channel
TMEM176B	7q36.1	6 23.75 cM	Dendritic cells ^{H,M} ; T helper 17 cells ^{H,M} ; Group 3 innate lymphoid cells ^M	TMEM176A	Ca ²⁺ ion channel; NLRP3 inflammasome regulator

^aAbbreviations: ^H, human; ^M, mouse; ^R, rat; ND, not determined.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται από το σύμπλεγμα γονιδίων MS4A αποτελούνται από τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές, μία N- και μία C-τερματική περιοχή, από εξωκυττάριους βρόγχους, καθώς και από έναν ενδοκυττάριο βρόγχο (Ma J. et al., 2015). Η δομή αυτή (tetraspan) των πρωτεϊνών MS4A μοιάζει με αυτή των τετρασπανινών, υποδηλώνοντας ότι τα μέλη της οικογένειας MS4A διαθέτουν παρόμοιες λειτουργίες με τις τετρασπανίνες (πρωτεΐνες η δομή των οποίων διαθέτει τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές και οι οποίες μπορούν να κινηθούν πλευρικά και να αλληλεπιδράσουν με άλλα σχετιζόμενα με την κυτταροπλασματική μεμβράνη μόρια), συμπεριλαμβανομένης της αλληλεπίδρασης με και της διαμόρφωσης οδών σηματοδότησης για διαφορετικούς ανοσοϋποδοχείς, όπως οι PRRs (Pattern Recognition Receptors) και οι υποδοχείς Ig. Αυτή η λειτουργία είναι καλά εδραιωμένη για τα CD20/MS4A1, MS4A2 και MS4A4A. Αντίθετα, για τα περισσότερα άλλα μέλη της οικογένειας, τα πρότυπα έκφρασης, το δίκτυο των μοριακών εταίρων, καθώς και οι βιολογικές τους λειτουργίες παραμένουν σε μεγάλο βαθμό απροσδιόριστες (Mattiola I. et al., 2021).

Με βάση την τρέχουσα γνώση, μεταξύ άλλων πιθανών ρόλων, τα μόρια MS4A λειτουργούν είτε ως διάλυτοι ιόντων, είτε ως διαμορφωτές άλλων ανοσοϋποδοχέων, είτε και τα δύο (Mattiola I. et al., 2021). Έχει βρεθεί ότι οι MS4A1 και MS4A2 εμπλέκονται στον έλεγχο της συγκέντρωσης του ελεύθερου Ca^{2+} μέσω της ρύθμισης της εισροής Ca^{2+} και της κινητοποίησης αυτού από τις ενδοκυττάριες αποθήκες Ca^{2+} , διαδραματίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο ρόλο στην ρύθμιση της σηματοδότησης Ca^{2+} . Επιπρόσθετα, αρκετά μέλη της οικογένειας των MS4A, συμπεριλαμβανομένων των MS4A1, MS4A4 και MS4A4B, κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανοσία (Ma J. et al., 2015).



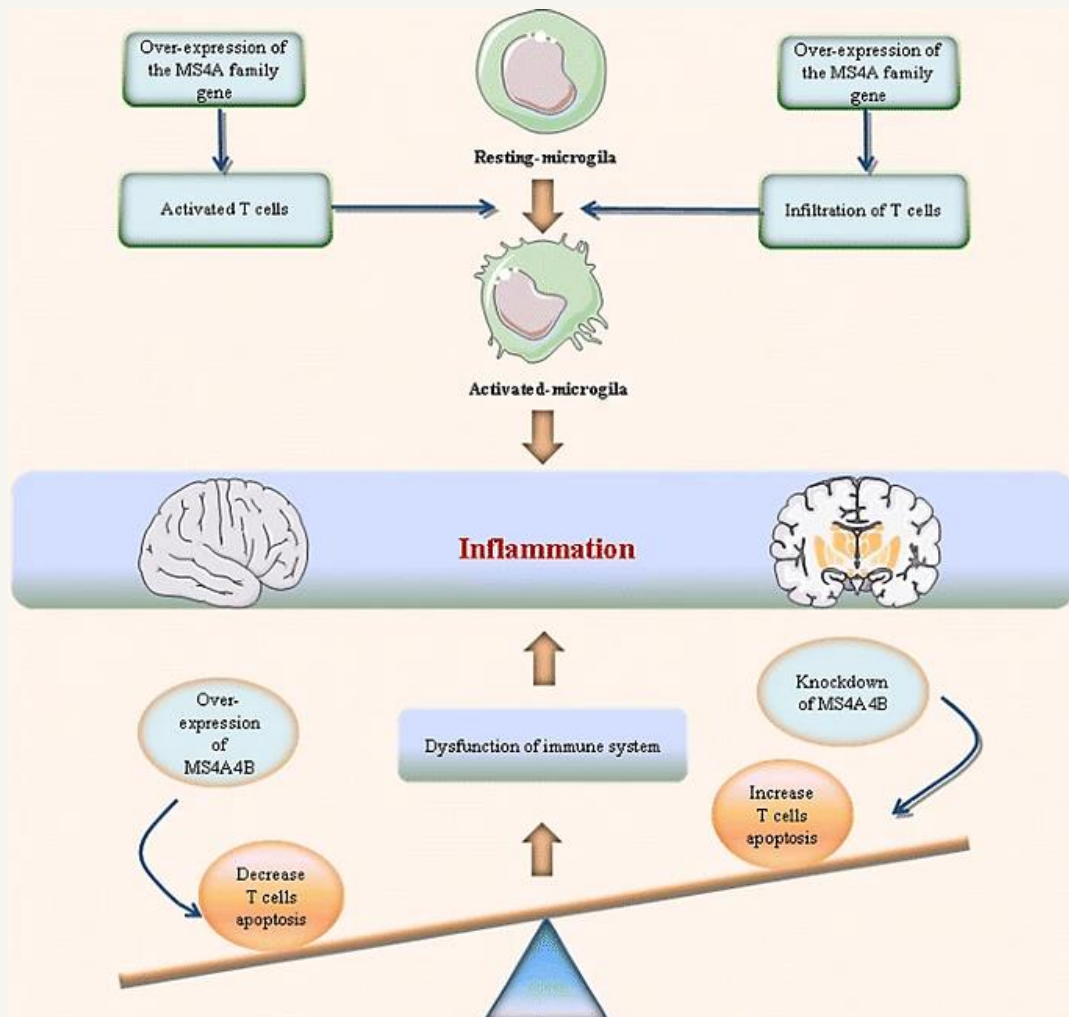
Εικόνα 44: Λειτουργίες των πρωτεϊνών της οικογένειας MS4A στην μεμβράνη αιμοποιητικών κυττάρων (Mattiola I. et al., 2021).

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί του συμπλέγματος γονιδίων MS4A έχουν συσχετιστεί με ανθρώπινες ασθένειες κατά τις οποίες παρατηρείται νευροεκφυλισμός, όπως η AD (Mattiola I. et al., 2021)(Ma J. et al., 2015). Στοιχεία υποδηλώνουν ότι η έκφραση των MS4A4A και MS4A6A ήταν αυξημένη στον εγκεφαλικό ιστό ασθενών με AD, προερχόμενο από την παρεγκεφαλίδα και τον μετωπιαίο φλοιό, με τα επίπεδα έκφρασης των εν λόγω πρωτεϊνών να σχετίζονται με την κατάσταση/πρόοδο της νόσου. Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι τα επίπεδα έκφρασης του MS4A6A συσχετίζονται με τις βαθμολογίες Braak tangle και Braak plaque, ενώ υψηλότερο επίπεδο έκφρασης MS4A6A στον βρεγματικό λοβό συσχετίστηκε με πιο προχωρημένη παθολογία AD στον εγκέφαλο ασθενών οι οποίοι πάσχουν από την νόσο. Πρόσφατα, τόσο η ανάλυση μικροσυστοιχιών όσο και η real-time PCR επιβεβαίωσαν ότι μια κοινή παραλλαγή cis-acting MS4A6A όχι μόνο συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης AD, αλλά συσχετίστηκε επίσης με αυξημένα επίπεδα έκφρασης MS4A6A στο αίμα και αύξηση του μεταγράψου V4-MS4A6A στο Περιοχή Brodmann 9 (Brodmann's area 9, BA9). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα MS4A4A και MS4A6A είναι επιζήμια για την παθολογία της AD, είτε μέσω γενετικής επιρροής είτε μέσω άλλων παραγόντων (Ma J. et al., 2015).

Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση του Αβ, στην υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau και στον νευρωνικό θάνατο, τα οποία με την σειρά τους οδηγούν σε νευροεκφυλισμό. Η απορρύθμιση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης του ασβεστίου παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της AD. Μάλιστα η απορρύθμιση της σηματοδότησης Ca^{2+} φαίνεται να οδηγεί σε μείωση της γνωστικής ικανότητας ακολουθούμενη από νευρωνικό θάνατο και εμφάνιση άνοια. Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες MS4A εμπλέκονται στον έλεγχο της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ελεύθερου Ca^{2+} μέσω της ρύθμισης όχι μόνο της εισροής Ca^{2+} , αλλά και μέσω της κινητοποίησης του Ca^{2+} από τα ενδοκυτταρικά αποθέματα, συνεπώς η δυσλειτουργία αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Ma J. et al., 2015).

Το ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζει τόσο τον εγκέφαλο όσο και τη συμπεριφορά μέσω πολλών μηχανισμών. Αν και ο ρόλος της οικογένειας γονιδίων MS4A δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί είναι γνωστό ότι αρκετά μέλη αυτής της οικογένειας, συμπεριλαμβανομένων των MS4A1, MS4A2 και MS4A4B, διαδραματίζουν ρόλο στην ανοσία. Στον εγκέφαλο υπό φυσιολογικές συνθήκες ανιχνεύεται μόνο μικρός αριθμός ενεργοποιημένων Τ κυττάρων, ωστόσο υπό νευροφλεγμονώδεις συνθήκες η διήθηση των Τ κυττάρων αυξάνεται. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο χαμηλός αριθμός Τ κυττάρων στον εγκέφαλο διατηρεί την κατάσταση «ηρεμίας» της μικρογλοίας, ενώ επίσης τα Τ κύτταρα αλληλεπιδρούν με τη μικρογλοία προκειμένου να ρυθμίσουν τη λειτουργία τους. Τα Τ κύτταρα, συγκεκριμένα τα Τ βοηθητικά κύτταρα τύπου 1 (T helper type 1 cells, Th1 cells) και τύπου 17 (T helper type 17 cells, Th17 cells), έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με την μικρογλοία επάγοντας την ενεργοποίησή της, τόσο in vitro όσο και in vivo, ενώ επιπλέον αυξάνουν την μικρογλοιακή παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Μέχρι σήμερα, πολλοί ερευνητές έχουν επιβεβαιώσει ότι η υπερέκφραση του γονιδίου της οικογένειας MS4A μπορεί να αυξήσει την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων. Η MS4A4B είχε βρεθεί ότι ρυθμίζει την απόπτωση και την επιβίωση των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων. Η αποσιώπηση της MS4A4B προάγει την απόπτωση των Τ κυττάρων, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση της MS4A4B οδηγεί σε μείωση της απόπτωση των Τ κυττάρων. Επιπλέον, αν και το MS4A2 δεν εκφράζεται στον εγκέφαλο, εκφράζεται στα μαστοκύτταρα τα οποία εισέρχονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα κατά την ανάπτυξη και συνεπώς θα μπορούσε να ρυθμίσει την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, καθώς και να επηρεάσει τη διακίνησή τους μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η διήθηση των Τ

κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε πόλωση της μικρογλοίας σε κλασικούς και εναλλακτικούς ενεργοποιημένους φαινοτύπους και κατά συνέπεια στην ενεργοποίηση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών στον εγκέφαλο. Συνεπώς, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας MS4A διαθέτουν ορισμένες λειτουργίες όσον αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο όπως είναι γνωστό κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην παθογένεση της AD (Ma J. et al., 2015).

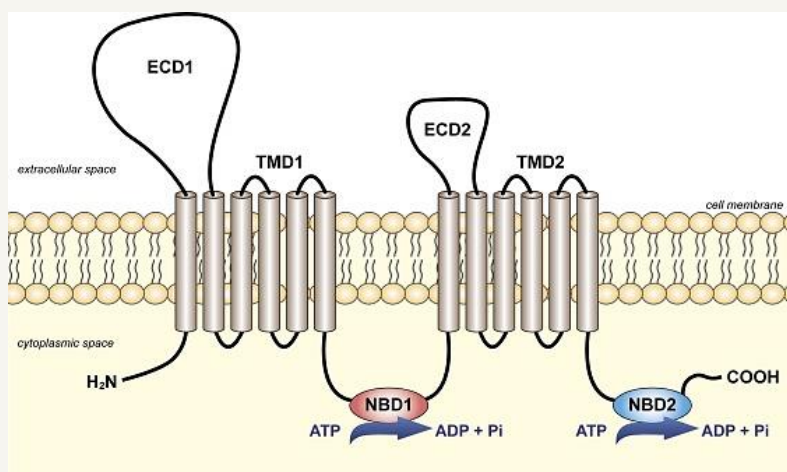


Εικόνα 45: Ρόλος της οικογένειας πρωτεϊνών MS4A στη φλεγμονή (Ma J. et al., 2015).

Το γονίδιο της **ABCA7** (ATP-binding cassette, subfamily A, member 7) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μεταφοράς ABCA7 και εντοπίστηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 2000. Η πρωτεΐνη μεταφορέας ABCA7 εκφράζεται ευρέως σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, του λεμφικού, των νεφρών και του εγκεφάλου, καθώς επίσης και στα μακροφάγα και τα αιμοπετάλια. Στον εγκέφαλο, η ABCA7 εκφράζεται στα BECs (Brain endothelial cells), στα περικύτταρα (χωρικά απομονωμένα συσταλτά κύτταρα τα οποία εντοπίζονται κατά διαστήματα κατά μήκος των τοιχωμάτων των τριχοειδών αγγείων και τα οποία στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι σημαντικά για το σχηματισμό των αιμοφόρων αγγείων, τη διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, τη ρύθμιση της εισόδου των ανοσοκυττάρων και τον έλεγχο της ροής του αίματος στον εγκέφαλο), στα αστροκύτταρα, στους νευρώνες και στα μικρογλοιακά κύτταρα (Chaves J. C. S. et al., 2024)(Attwell D. et al., 2016).

Υπάρχουν δύο ισομορφές του ABCA7, οι οποίες προκύπτουν ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος, η Τύπος II ABCA7 (πρωτεΐνη με 28 αμινοξέα στη N-τερματική ουρά αντί για τα 166 αμινοξέα που υπάρχουν στην πλήρους μήκους ABCA7) και η πλήρους μήκους ABCA7. Το μοτίβο έκφρασης των δύο αυτών ισομορφών είναι ιστο-εξαρτώμενο, ωστόσο και οι δύο ανιχνεύονται στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Επιπρόσθετα, οι δύο αυτές ισομορφές της ABCA7 φαίνεται να εμφανίζουν διαφορετικό κυτταρικό υποεντοπισμό με την πλήρους μήκους ABCA7 να ανιχνεύεται τόσο στην κυτταρική επιφάνεια, όσο και ενδοκυττάρια, ενώ η ισομορφή ABCA7 Τύπου II ανιχνεύεται μόνο στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Dib S. et al., 2021).

Η ABCA7 συνιστά έναν πλήρη μεταφορέα ABC και ως εκ τούτου αποτελείται από τέσσερις τομείς, δύο διαμεμβρανικές περιοχές (Transmembrane Domains, TMDs) οι οποίες συνδέονται με δύο κυτταροπλασματικές περιοχές δέσμευσης νουκλεοτιδίων (Nucleotide-Binding Domains, NBDs). Η σειρά των TMDs είναι μεταβλητή και θεωρείται ότι οι εν λόγω περιοχές είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση και τη μετατόπιση του υποστρώματος. Οι NBDs είναι εξαιρετικά συντηρημένες και διαθέτουν χαρακτηριστικά μοτίβα όπως τα Walker A και Walker B, τα οποία επιτρέπουν την δέσμευση και την υδρόλυση του ATP.



Εικόνα 46: Σχηματική αναπαράσταση των πλήρων μεταφορέων ABC της υποοικογένειας A. Δύο διαμεμβρανικές περιοχές (TMDs) συνδέονται με δύο κυτταροπλασματικές περιοχές δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBDs). Επιπλέον, τα μέλη της υποοικογένειας A χαρακτηρίζονται από δύο μεγάλες εξωκυτταρικές περιοχές (Extracellular Domain 1 και Extracellular Domain 2, ECD1 και ECD2)(Dib S. et al., 2021)

Ο μηχανισμός μεταφοράς των μεταφορέων ABC ελέγχεται μέσω της εναλλαγής της διαμόρφωσης του TMD, μέσω της οποίας ο μεταφορέας αλλάζει μεταξύ καταστάσεων προς τα μέσα και προς τα έξω, ενώ πρόσφατα προτάθηκαν και άλλοι εναλλακτικοί μηχανισμοί (Dib S. et al., 2021).

Σύγκριση των αλληλουχιών του μεταφορέας ABCA7 με άλλους μεταφορείς ABC έδειξαν υψηλή ομολογία του ABCA7 με τους μεταφορείς ABCA1 (54%), ABCA2 (45%), ABCA3 (41%) και ABCA4 (49%), οι οποίοι εμπλέκονται στη μεταφορά λιπιδίων. Συνεπώς, πιστεύεται ότι ο μεταφορέας ABCA7 είναι επίσης ικανός να μεταφέρει λιπίδια από τις κυτταρικές μεμβράνες σε λιποπρωτεΐνες (Dib S. et al., 2021).

Από το 2011, αρκετές δεκάδες γενετικές μελέτες έχουν αναφέρει την ύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου της ABCA7 σε δείγματα προερχόμενα από ασθενείς με την AD παγκοσμίως. Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι πολλές από αυτές τις παραλλαγές είναι υπεύθυνες για την αλλαγή της έκφρασης της ABCA7 στον εγκέφαλο κατά την AD.

Πίνακας 14: (Επι-)γενετικές παραλλαγές της ABCA7 και τα σχετιζόμενα με την AD αποτελέσματά τους. AD: Alzheimer's disease, GWAS: Genome-wide association studies, PTC: premature termination codon, SNP: single nucleotide polymorphism, VNTR: variable number tandem repeat (τροποποιημένη από Dib S. et al., 2021).

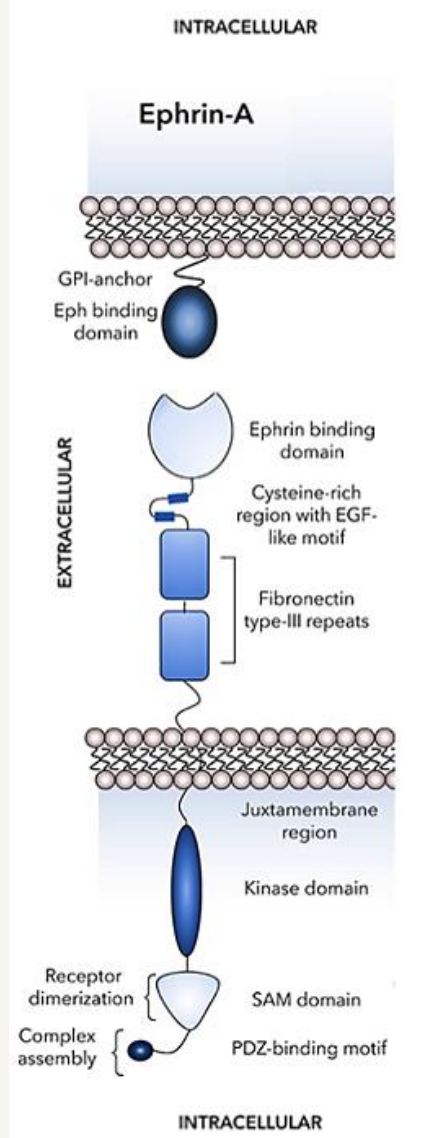
Variation	Interpretation	Reported Significant Effect of the Risk Allele	
Common Risk-Increasing Variants		Amyloid and Tau pathology	Brain Morphology and Clinical Symptoms
rs3764650	Intronic GWAS SNP, low predicted functional effect	- Increased neuritic plaque burden	- Cortical and hippocampal atrophy
		- Decreased CSF Aβ ₁₋₄₂ levels	- Later age at onset and shorter disease duration
rs4147929	Intronic GWAS SNP, low predicted functional effect		- Interaction on memory
			- Association with posterior cortical atrophy variant of AD
rs3752246	Missense GWAS SNP, predicted benign		- Memory decline for subjects who eventually developed MCI/LOAD
			- Cognitive declines in females
rs115550680	Intronic GWAS SNP, low predicted functional effect		- Lower immediate recall test and reduced rate of decline in symbol digit modalities test
rs78117248	Intronic GWAS SNP, low predicted functional effect		- Voxel-based morphometry in the left postcentral gyrus
			- Brain asymmetry in the hippocampus
rs142076058	Loss-of-function		- Increase of symptomatic AD compared to asymptomatic
ABCA7	Reduced ABCA7 expression, loss of exon 19 encoding an ATP-binding domain	- Increased amyloid deposition	- Decreased mean medial temporal lobe gray-patter density in dementia patients
		- Increased brain amyloidosis	- Interaction on memory
VNTR			
expansions			
Common Protective Variants		Amyloid and Tau pathology	Brain Morphology and Clinical Symptoms
rs72973581	Missense variant		
CpG Methylation		Amyloid and Tau pathology	Brain Morphology and Clinical Symptoms
cg02308560	Hypermethylation in AD, effect on ABCA7 unknown		
cg24402332			
cg04587220		- Increased brain amyloidosis and higher tau tangle density	
Rare Variants		Amyloid and Tau pathology	Brain Morphology and Clinical Symptoms
Missense and PTC variants	Loss-of-function for PTC variants. Unclear for missense variants.		

Ανάμεσα στα «δηλητηριώδη» αλληλόμορφα της ABCA7 τα οποία εντοπίστηκαν, και τα οποία είναι υπεύθυνα είτε για την πλήρη απώλεια της πρωτεϊνικής της λειτουργίας, είτε για την μείωση ή την ανοδική ρύθμιση αυτής, εντοπίστηκε και ένα προστατευτικό αλληλόμορφο της ABCA7. Αυτές οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της ABCA7 αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης AD κατά 80% σε πληθυσμούς αφρικανικής καταγωγής, ενώ φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο πρώιμης εμφάνισης AD κατά 100-400% στους πληθυσμούς ευρωπαϊκής καταγωγής (Dib S. et al., 2021).

Σε υγιείς εγκεφάλους, η ABCA7 εκφράζεται κανονικά από τους νευρώνες, τα νευρογλοιακά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, όπου μεσολαβεί στην κάθαρση του Αβ, καθώς και στην εκροή κυτταρικών και τοξικών λιπιδίων. Επειδή η παραγωγή του πεπτιδίου Αβ συνδέεται με τα επίπεδα κυτταρικών λιπιδίων, είναι πιθανό η ABCA7 να εμπλέκεται και στην ρύθμιση της σύνθεσης του Αβ. Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (Single nucleotide polymorphisms, SNPs), η γήρανση και η διατροφή είναι ικανά να επηρεάσουν τη λειτουργία και την έκφραση της ABCA7, μειώνοντας έτσι την κάθαρση του πεπτιδίου Αβ και την ανακύκλωση τοξικών λιπιδίων και προάγοντας εν συνεχεία την αύξηση του φορτίου του Αβ (Dib S. et al., 2021).

Ο **EPHA1** (Ephrin type-A receptor 1) αποτελεί έναν υποδοχέα κίνησης της τυροσίνης και παρά το γεγονός ότι είναι ο πρώτος από την οικογένεια των υποδοχέων EPH (Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma) ο οποίος ταυτοποιήθηκε παραμένει ο λιγότερο χαρακτηρισμένος. Η ενεργοποίηση της EPHA1 από τον αγκυροβολημένο στη μεμβράνη μέσω GPI (Glycosylphosphatidylinositol) προσδέτη Εφρίνη-A (GPI membrane-anchored ligand ephrin-A) οδηγεί σε εξαρτώμενη από την επαφή, αμφίδρομη σηματοδότηση μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Επιπλέον, οι υποδοχείς Eph μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με άλλους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας συμμετέχοντας σε σηματοδότηση ανεξάρτητης από τον προσδέτη Εφρίνης (Buhl E. et al., 2022).

Εικόνα 47: Βασική δομή των υποδοχέων EPHA και του προσδέματός τους. Οι υποδοχείς EPHA αποτελούνται από μια εξωκυττάρια δομή η οποία αποτελείται από μια περιοχή δέσμευσης της Εφρίνης συνδεδεμένη με δύο επαναλήψεις φιβρονεκτίνης τύπου III μέσω ενός πλούσιου σε κυστεΐνη μοτίβου το οποίο μοιάζει με EGF. Η παραμεμβρανική (juxtamembrane) περιοχή συνδέει το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα με την ενδοκυτταρική περιοχή κίνησης η οποία συνδέεται με μια περιοχή SAM (Sterile Alpha Motif) και ένα μοτίβο δέσμευσης PDZ. Δύο υπολείμματα τυροσίνης στην περιοχή της παραμεμβρανικής περιοχής μεσολαβούν στην αυτοφωσφορυλίωση. Οι υποδοχείς EPH συνδέονται με τους προσδέτες εφρίνης μέσω μιας εξωκυτταρικής περιοχής δέσμευσης EPH. Οι προσδέτες Ephrin-A είναι αγκυροβολημένοι μέσω GPI στην πλασματική μεμβράνη και σηματοδοτούν μέσω συν-υποδοχέων οι οποίοι δεν έχουν ακόμη πλήρως καθοριστεί (Darling T. K. et al., 2019).



Η σηματοδότηση EPH/ephrin παίζει σημαντικό ρόλο για την αναπτυξιακή μορφογένεση, την οργανογένεση, την αξονική καθοδήγηση, την κυτταρική μετανάστευση, τον προσδιορισμό της μοίρας των κυττάρων και τη συναπτική πλαστικότητα. Η διαταραχή της σηματοδότησης EPH/ephrin σχετίζεται με ογκογένεση, καθώς επίσης και με ανοσολογική απορρύθμιση και φλεγμονή, γεγονός το οποίο δυνητικά θα μπορούσε να οδηγήσει σε συσχέτιση των αλλαγών στη σηματοδότηση EphA1 με την νευροφλεγμονή που παρατηρείται κατά την AD. Πράγματι, η EPHA1 έχει εμπλακεί στη ρύθμιση της νευροφλεγμονώδους διαδικασίας και στην επίδραση της στην εξέλιξη της AD. Η μετάλλαξη EPHA1 P460L πιστεύεται ότι οδηγεί σε αυξημένη ομαδοποίηση των υποδοχέων η οποία δυνητικά έχει ως αποτέλεσμα έναν συστατικά ενεργό υποδοχέα, επηρεάζοντας την ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω των GTPασών της οικογένειας Rho και Ras και της δράσης Akt/mTORC1, ιδίως αυξάνοντας την ισορροπία του RhoA έναντι του Rac1 (Buhl E. et al., 2022).

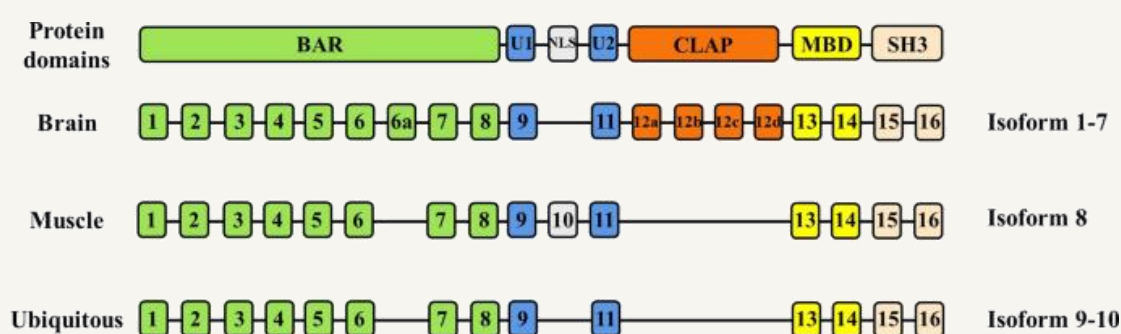
Η **Clusterin (CLU)** ή **APOJ (Apolipoprotein J)** είναι μια πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία κωδικοποιείται από ένα γονίδιο μονού αντιγράφου το οποίο εντοπίζεται στον γενετικό τόπο p21-p12 στο χρωμόσωμα 8, και η οποία έχει εμπλακεί σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Alzheimer (Foster E. M. et al., 2019). Η APOJ είναι μια πανταχού παρούσα και συστατικά εκφραζόμενη πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών (όπως αυτών των περιφερειακών οργάνων και του εγκεφάλου) και σωματικών υγρών (όπως το πλάσμα, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το σπερματικό υγρό και τα δάκρυα)(Foster E. M. et al., 2019)(Milinkeviciute G. et al., 2023).

Η ευρεία έκφρασή της συνοδεύεται από έναν αριθμό λειτουργιών συμπεριλαμβανομένης της αναστολής του συστήματος του συμπληρώματος, της λειτουργίας της ως πρωτεΐνη συνοδός, της μεταφοράς λιπιδίων, της ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης και των οδών κυτταρικού θανάτου και της ρύθμισης του οξειδωτικού στρες (Foster E. M. et al., 2019)(Milinkeviciute G. et al., 2023). Στον εγκέφαλο, η έκφραση της APOJ εντοπίζεται στα αστροκύτταρα και στους νευρώνες του φλοιού και του υποκάμπου, ωστόσο οι λειτουργίες της APOJ στον εγκέφαλο δεν είναι τόσο καλά κατανοητές. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της APOJ ρυθμίζεται προς τα πάνω σε εκφυλιστικές καταστάσεις, όπως κατά την AD, λόγω κυτταρικού και οξειδωτικού στρες ή λόγω της απορρύθμισης συγκεκριμένων οδών σηματοδότησης. Ωστόσο, η βιβλιογραφία παρέχει αντικρουόμενα αποτελέσματα ως προς το εάν η έκφραση του CLU συμβάλει στην βελτίωση ή την επιδείνωση του κυτταρικού στρες (Milinkeviciute G. et al., 2023). Αν και η APOJ είναι συνήθως μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη, έχει εντοπιστεί και ενδοκυττάρια υπό ορισμένες συνθήκες στρες (Foster E. M. et al., 2019).

Στην AD, τα επίπεδα CLU αυξάνονται στον εγκέφαλο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η APOJ έχει βρεθεί ότι συνδέεται με το Αβ και παίζει ρόλο στην εναπόθεση, καθώς και στην κάθαρση αυτού. Η APOJ φαίνεται να εντοπίζεται σε πλάκες Αβ, στα αγγεία κατά την CAA (Cerebral Amyloid Angiopathy), έχει βρεθεί να σχετίζεται με NFTs, καθώς και να αλληλεπιδρά με τροποποιημένα είδη της πρωτεΐνης tau, στον ανθρώπινο εγκέφαλο κατά την AD. Ωστόσο, η APOJ είναι πιθανό να εμπλέκεται και σε μονοπάτια μη σχετιζόμενα με το Αβ τα οποία θα μπορούσαν να αλλάξουν την ευαισθησία στην AD. Είναι σημαντικό ότι διαφορετικοί SNPs στο γονίδιο της APOJ μπορεί να ασκούν τα αποτελέσματά τους σε συνδυασμό με άλλους γενετικούς παράγοντες κινδύνου, όπως η APOE4, ο TREM2 και η BIN1. Επιπλέον, από το γονίδιο της APOJ παράγονται τουλάχιστον τρεις διαφορετικές ισομορφές mRNA της APOJ, με μία πρόσφατη έρευνα να προτείνει ότι οι διαφορετικές παραλλαγές του γονιδίου της APOJ μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στις αναλογίες των ισομορφών που παράγονται, οι οποίες

με τη σειρά τους θα μπορούσαν να επηρεάσουν την έκβαση της νόσου και να παίξουν ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της AD (Milinkeviciute G. et al., 2023).

Το γονίδιο της **BIN1** (Myc box-dependent-interacting protein 1 ή Bridging Integrator 1), ή όπως αλλιώς είναι γνωστή Αμφιφυσίνη 2 (Amphiphysin 2, AMPH2), έχει πρόσφατα αναγνωριστεί ως ο πιο σημαντικός γενετικός τόπος κινδύνου για την εμφάνιση LOAD/sAD, μετά την APOE (Tan M. S. et al., 2013). Το γονίδιο αυτό, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2q14 και αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ότι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με το Myc δρώντας ως ογκοκαταστολέας. Το γονίδιο BIN1 περιλαμβάνει 20 εξόνια, τα οποία μπορούν να χωριστούν σε τέσσερα σύνολα ανάλογα με τις ιδιότητές τους, το BAR, το unique (unique1 and unique2), τα brain-specific και protein-protein interaction sets (Gao P. et al., 2021).



Εικόνα 48: Απεικόνιση της δομής της ανθρώπινου BIN1/Amphiphysin2. Υπάρχουν πολλοί τύποι ισομορφών της BIN1 ειδικών για τους διαφορετικούς ιστούς. Οι αριθμοί 1 έως 20 αντιπροσωπεύουν τα 20 εξόνια του γονιδίου της BIN1 (τροποποιημένη από Gao P. et al., 2021).

Οι διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης BIN1 συνδέονται με διαφορετικές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή BAR μπορεί να συνδεθεί με τις λιπιδιακές μεμβράνες και να βοηθήσει στην ρύθμιση της καμπυλότητας της μεμβράνης, η οποία είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό σωληνωτών προβολών/προεξοχών της μεμβράνης (membrane tubulation), το σχηματισμό εκβλάστησης/κυστιδίων τόσο στους νευρώνες όσο και στα μη νευρικά κύτταρα και πιθανώς και για το σχηματισμό κυτταροπλασματικών ενδοσωμάτων. Η Unique region περιλαμβάνει το Unique1 (U1) και το Unique2 (U2) και η λειτουργία της δεν έχει ακόμα καθοριστεί, ωστόσο τα εξόνια αυτά είναι γνωστό ότι δεν σχετίζονται με την Αμφιφυσίνη. Η ειδική για τον εγκέφαλο περιοχή (brain-specific domain), γνωστή ως περιοχή CLAP (Clathrin and AP2-binding domain), έχει την ικανότητα να συνδέεται με την κλαθρίνη και την AP2. Συνεπώς, οι ιδιότητες αυτές της περιοχής CLAP επιτρέπουν στις ειδικές για τον εγκέφαλο ισομορφές να συμμετέχουν ειδικά στην ενδοκυττάρωση που προκαλείται από την κλαθρίνη. Η C-τερματική περιοχή της πρωτεΐνης BIN1, περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης Myc (Myc-Binding Domain, MBD) και την περιοχή SH3 (Src homology 3), η οποία είναι ενεργή σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Gao P. et al., 2021).

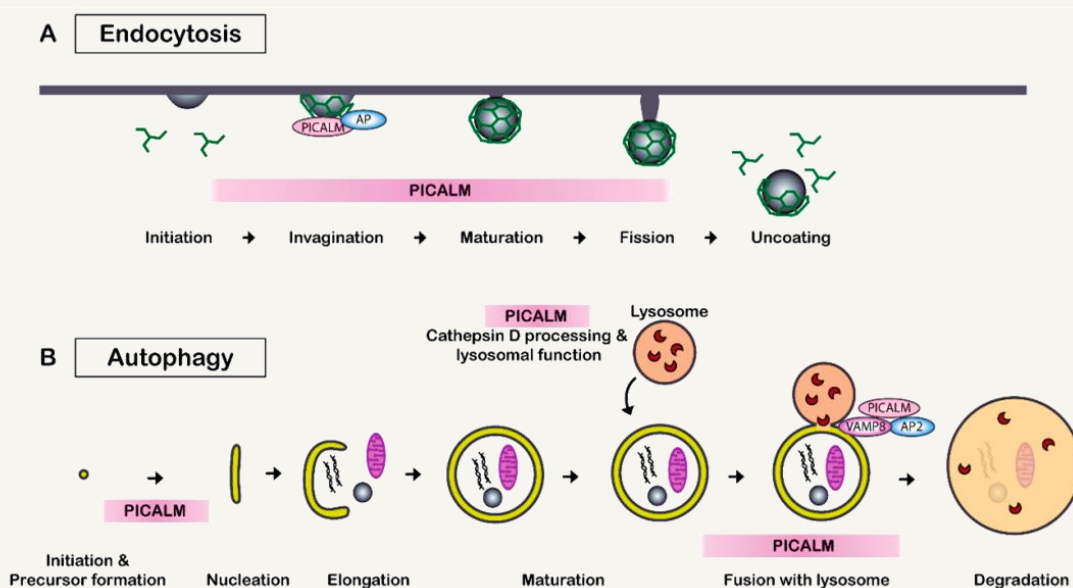
Η BIN1 αναγνωρίστηκε αρχικά ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη λόγω της αλληλεπίδρασής της με την ογκοπρωτεΐνη Myc. Η μη φυσιολογική έκφραση της BIN1 και η ανώμαλη αλληλεπίδραση BIN1-Myc μπορούν να επηρεάσουν την διαδικασία της προκαλούμενης από την Myc απόπτωσης. Η περιοχή SH3 μπορεί να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες οι οποίες διαθέτουν περιοχές πλούσιες σε προλίνη (Proline-Rich Domains, PRDs),

όπως η Δυναμίνη 2 και η τ au. Η αλληλεπίδραση της περιοχής SH3 με την Δυναμίνης 2 παίζει ρόλο στον σχηματισμό κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη (Gao P. et al., 2021).

Πολλές από τις λειτουργίες της πρωτεΐνης BIN1 προβλέπεται ότι μπορεί να έχουν διάφορες επιπτώσεις στην AD, μέσω πολλών διαφορετικών μηχανισμών (Gao P. et al., 2021). Η BIN1 επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης AD κυρίως μέσω της ρύθμισης της παθολογίας της πρωτεΐνης τ au, ωστόσο φαίνεται να εμπλέκεται και σε άλλες διαδικασίες οι οποίες σχετίζονται με την παθολογία της AD όπως η ενδοκυττάρωση βασικών μορίων τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι του Αβ, η φλεγμονή, η ομοιοστάση του ασβεστίου, η ρύθμιση της DDR (DNA Damage Response), η επιδιόρθωση του DNA και η απόπτωση (μαζί με τα E2F1, c-Myc και PARP-1)(Tan M. S. et al., 2013)(Ranganathan R. et al., 2023).

Το γονίδιο της **PICALM** (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11q14 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία διαθέτει την ικανότητα να στρατολογεί την κλαθρίνη και το AP2 (Adaptor Protein Complex 2) στην κυτταρική μεμβράνη. Το PICALM συμμετέχει στην μεσολαβούμενη από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωση και στην ενδοκυττάρια διακίνηση, ενώ επίσης καθορίζει την ποσότητα της μεμβράνης που πρόκειται να ανακυκλωθεί, πιθανώς ρυθμίζοντας το μέγεθος του κλωβού κλαθρίνης (Carmona S. et al., 2018).

Η PICALM είναι μια πανταχού παρούσα πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται στον εγκέφαλο, τους μύες, τα νεφρά, την ουροδόχο κύστη, τους συνδετικούς ιστούς, τον μυελό των οστών, τους λεμφικούς ιστούς, καθώς επίσης και στους ιστούς του μαστού και του πλακούντα. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο, η PICALM εκφράζεται σε αφθονία στα μικρογλοιακά κύτταρα, τα



Εικόνα 49: Η PICALM ρυθμίζει την ενδοκυττάρωση και την αυτοφαγία που προκαλείται από την κλαθρίνη. (Α) Η PICALM εμπλέκεται στην μεσολαβούμενη από κλαθρίνη ενδοκυττάρωση (Clathrin-Mediated Endocytosis, CME) ως προσαρμογέας κλαθρίνης διευκολύνοντας τον σχηματισμό κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη (Clathrin-Coated Vesicles, CCVs). Η αλληλεπίδραση μεταξύ του PICALM, των πρωτεϊνών προσαρμογής (Adaptor Proteins, APs) και της κλαθρίνης είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της μορφής και το μέγεθος των CCVs. Το PICALM αλληλεπιδρά με την AP2 στην πλασματική μεμβράνη και την AP1 στο δίκτυο trans-Golgi για να σχηματίσει CCVs. (Β) Η PICALM εμπλέκεται επίσης σε πολλά από τα στάδια της διαδικασίας αυτοφαγίας. Το PICALM εμπλέκεται στον σχηματισμό του αυτοφαγικού πρόδρομου στη σύντηξη αυτοφαγοσώματος-λυσοσώματος, στην ωρίμανση της Καθεψίνης D και στη λυσοσωμική λειτουργία (τροποποιημένη από Ando K. et al., 2022).

ολιγοδενδροκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους νευρώνες, τα αγγειακά τοιχώματα και τα κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος. Η PICALM παίζει ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, καθώς επίσης και στην κυτταρική ομοιόσταση. Πιο συγκεκριμένα, δρα ως προσαρμογέας κλαθρίνης στην μεσολαβούμενη από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωση και συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η ωρίμανση των ερυθροειδών (erythroid), η πρόσληψη της τρανσφερίνης, η ομοιόσταση των λιπιδίων, η αυτοφαγία, η νευρωνική πολικότητα, η νευριτική επιμήκυνση και η επαναπρόσληψη/ενδοκυττάρωση (turnover) των συναπτικών κυστιδίων (Ando K. et al., 2022).

Η πρωτεΐνη PICALM είναι σημαντική για την κάθαρση του Αβ μέσω διακυττάρωσης κατά μήκος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ενώ επιπρόσθετα ρυθμίζει την αυτοφαγία και την κάθαρση της πρωτεΐνης tau. Μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης PICALM βρέθηκαν σε εγκεφάλους κατά την AD, τα οποία είχαν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του Αβ και της πρωτεΐνης tau. Δύο SNPs τα οποία εντοπίζονται ανοδικά (upstream) του γονιδίου της PICALM, rs3851179 και rs541458, σχετίζονται με την μείωση του κινδύνου εμφάνισης LOAD. Το rs3851179 οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης PICALM και αυξημένη κάθαρση του Αβ και φαίνεται να σχετίζεται με πάχυνση του ενδορινικού φλοιού και εκφυλισμό του ιππόκαμπου. Το SNP rs541458 σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα του Αβ1-42 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Carmona S. et al., 2018).

Aβ	Amyloid beta
AAV2	Adeno-Associated Viral Vector (Serotype 2)
ABCA1	ATP Binding Cassette Transporter A1
ABCA7	ATP-binding cassette, subfamily A, member 7
ACh	Acetylcholine
AchE	Acetylcholinesterase
AChEIs	Acetylcholinesterase inhibitors
AD	Alzheimer's Disease
ADAD	Autosomal dominant Alzheimer's disease
AGEs	Advanced Glycation End Products
Akt	Protein kinase B
AMPH2	Amphiphysin 2
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	Alkaline phosphatase
AP2	Adaptor Protein Complex 2
APC	Antigen-presenting cells
ApoAI	Apolipoproteins-AI
APOE	apolipoprotein E
APOJ	Apolipoprotein J
APP	Amyloid Precursor Protein
APs	Adaptor Proteins
ARE	Antioxidant Response Elements
ARIA	Amyloid related imaging abnormalities
ARIA-E	Amyloid related imaging abnormalities associated with vasogenic edema
ARIA-H	Amyloid related imaging abnormalities indicate micro haemorrhage and hemosiderosis
ASLC1	Achaete-scute family bHLH transcription factor 1
β-CTF	β-secretase derived c-terminal fragment
β-hex	β-hexosaminidase
β-TrCP	Beta-transducin repeats-containing protein
BA9	Brodmann's area 9
BACE1	β-APP cleaving enzyme 1
BChE	Butyrylcholinesterase
BCR	B-cell receptor
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BECs	Brain endothelial cells
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bHLH	basic helix-loop-helix
BIN1	Myc box-dependent-interacting protein 1 ή Bridging Integrator 1
BMI	Body Mass Index

BMP	homeostatic bone morphogenetic pathway
BRET-Qdots	Bioluminescence Resonance Energy Transfer to Quantum Dots
BTSC	bis(thiosemicarbazones)
C1q	Complement component 1q
CAA	Cerebral Amyloid Angiopathy
CaMKII	Calcium–calmodulin protein kinase 2
CBP	CREB (Cyclic AMP Responsive Element Binding Protein)-Binding Protein
CCP	Complement Control Protein
CCVs	Clathrin-Coated Vesicles
CD33	cluster of differentiation 33
cdk5	cyclin-dependent kinase 5
ChAT	Choline Acetyltransferase
CHO	Chinese hamster ovary
CK-1δ	Casein Kinase-1δ
CLAP domain	Clathrin and AP2-binding domain
CLU	Clusterin
CME	Clathrin-Mediated Endocytosis
Cox-2	Cyclooxygenase-2
CR1	complement component receptor 1
CREB	cAMP response element binding protein
CRH	Corticotrophin-releasing Hormone
CSF	Cerebrospinal Fluid
CT	C-terminal
CTFs	C-terminal fragments
CVDs	Cardiovascular Diseases
CypD	Cyclophilin D
DA	Dopamine
DAP 12	DNAX-activation protein 12
DAT	Dopamine Transporter
DB	Diagonal Band of Broca
dbcAMP	dibutyryl cyclic adenosine monophosphate
DBH	Dopamine Beta-Hydroxylase
DCT-1	DAF-16/FOXO-controlled germline-tumor affecting-1
DDR	DNA Damage Response
DFO	Deferoxamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DOPA	Dihydroxyphenylalanine
DPPH	2,2-diphenylpicrylhydrazyl
Drp1	Dynamin Related Protein 1
EAA	Excitatory Amino Acid
EBV	Epstein-Barr virus
ECD1, ECD2	Extracellular Domain 1, Extracellular Domain 2
E-CR1	Erythrocyte-Complement Receptor Type 1
ECSIT	Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathway

EMP	Erythromyeloid progenitor cells
eNOS	endothelial NOS (Nitric Oxide Synthase)
EOAD	Early-onset Alzheimer's disease
EPH	Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma
EPHA1	Ephrin type-A receptor 1
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERK1/2	Extracellular-signal-regulated kinase1/2
ERs	Estrogen Receptors
ESCs	Embryonic Stem Cells
ESR	Estrogen Receptor
ESRR β	Oestrogen related receptor beta
ETC	Electron Transport Chain
fAD	familial AD
FBS	Fetal Bovine Serum
Fcy	Fragment Crystallizable Region (Constant) of IgG Immunoglobulins
FDC	follicular dendritic cell
Fis1	Mitochondrial Fission Protein 1
FDA	Food and Drug Administration
FTD	Frontotemporal dementia
GA	Geldanamycin
GA β peptide	Ganglioside-Bound A β peptide
GAL	Galantamine
GAP43	Growth Associated Protein 43
GCDH	glutaryl-CoA dehydrogenase
GDNF	glial-derived neurotrophic factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GQDs	Graphene Quantum Dots
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase-3 β
HDLs	high-density lipoproteins
HSF-1a	Hypoxia-Inducible Factor-1a
HLA	human leucocyte antigen
HPA Axis	Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis
HQC	chelator-8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid
HSF-1	Heat Shock Factor 1
Hsps	Heat Shock Proteins
HSV-1	Herpes simplex virus type 1
ICM	Inner cell mass
IDE	Insulin-Degrading Enzyme
ID family	DNA-binding protein inhibitor family
IFN γ	Interferon γ
IGF 1	Insulin-like Growth Factor 1
IGT	Impaired Glucose Tolerance
IgV	IgV ligand binding domain
iHPCs	Induced hematopoietic progenitor cells
I κ B α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α
IKK	I κ B kinase

ILs	Interleukins
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
IRF3	Interferon Regulatory Factor-3
IRFs	Interferon Regulatory Factors
IRS-1	Insulin Receptor Substrate 1
ITAM	immuno-tyrosine activation motif
ITIM	immunotyrosine inhibitory motif
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LC3	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
LDLs	low-density lipoproteins
LDT	Laterodorsal Pontine Tegmentum
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen -1
LHRs	long homologous repeats
Lin-28	LINEage-28
LLLT	Low Level Laser Therapy
LOAD	Late-onset Alzheimer's disease
LONP1	Lon protease homolog
LPSs	lipopolysaccharide
LRP1	lipoprotein receptor-related protein 1
LTAs	lipoteichoic acids
LTP	Long-Term Potentiation
mAb	monoclonal antibodies
MAP2	Microtubule Associated Protein 2
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPK	Microtubule affinity regulating kinases
MAPT	Microtubule-associated protein Tau
MBD	Microtubule Binding Domain
MBD	Myc-Binding Domain
MBL/ MB-lectin	mannose binding lectin
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNAs	microRNAs
MMP2	Matrix Metalloproteinase 2
MNPs	Magnetic Nanoparticles
MPP+	1-methyl-4-phenylpyridinium
mPTP	mitochondrial Permeability Transition Pore
MS	Medial Septal Nucleus
MS4A	membrane-spanning 4-domains subfamily A
mTOR	mammalian target of rapamycin
NA	Noradrenaline
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAAQSs	National Ambient Air Quality Standards
NBDs	Nucleotide-Binding Domains
NBM/nBM	Nucleus Basalis of Meynert
NEP	Neprilysin

NeuN	Neuronal Nuclei Antigen
NEUROD1	Neuronal Differentiation 1
NEUROD6	Neuronal Differentiation 6
NF-kB	Nuclear Factor kB
NFs	Neurofilaments
NFTs	Neurofibrillary Tangles
NGF	Nerve Growth Factor
NK	natural killer
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NMDAR	NMDA receptor
nNOS	neuronal NOS (Nitric Oxide Synthase)
NOS	Nitric oxide synthase
NOS3	Nitric oxide synthase 3
MnSOD	Manganese Superoxide Dismutase
NPCs	Neural progenitor cells
NPY	Neuropeptide Y
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor-2
NSE	Neuron-Specific Enolase
NT-3/NT-4/NT-5/NT-6	Neurotrophin-3/ Neurotrophin-4/ Neurotrophin-5/ Neurotrophin-6
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
OECD	Organisation of Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Pharmacological Chaperones
PDR-1	Parkinson's disease-related-1 ή Parkin
PDTC	Pyrrolidine Dithiocarbonate
PES	Phenazine Ethosulfate
PET	Positron Emission Tomography
PGC-1 α	PPAR γ -coactivator-1 α
PGE2	Prostaglandin E2
PHF	Paired Helical Filaments
PICALM	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
PINK-1	Phosphatase-tensin homologue-induced kinase-1
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PLD	phospholipase D
PM	Particulate Matter
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PPT	Pedunculopontine Tegmental Nucleus
PQC Systems	Protein Quality Control Systems
PRDs	Proline-Rich Domains
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PSEN-1	Presenilin-1
PSEN-2	Presenilin-2
PTP	Post-Tetanic Potentiation

QDs	Quantum dots
RA	Retinoic Acid
rAAVs	recombinant Adeno-Associated Viruses
RAGE	AGE receptor η Receptor for Advanced Glycation and Endproducts
RBC	red blood cell
RBFOX3	RNA binding fox-1 homolog 3
RCA	Regulators of Complement Activation
RDC	Radical
ROS	Reactive Oxidative Species
sAD	sporadic AD
Sall4	Spalt-like transcription factor 4 η sal-like protein 4
SAP97	Synaptic Associated Protein 97
SCR	short consensus repeats
sCR1	Soluble complement receptor type 1
scFv	single-chain variable fragments
SF	Straight Filaments
SH3	Src homology 3
SHPs	Src homology 2 domain-containing phosphatases
sMaf	small Maf proteins
SNPs	Single-nucleotide polymorphisms
SNX	Sorting Nexin
Sox2	Sex-determining region Y-box (Sox)-2
SP	Senile Plaques
SP	Signal peptide
SSEA4	Stage-specific embryonic antigen (SSEA) 4
SST	Somatostatin
SSTR1-5	Somatostatin receptors 1-5
STAT	Signal transducers and activators of transcription
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
Sv2	Synaptic Vesicle Protein 2
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TBK1	TANK [TRAF (Tumor necrosis factor receptor-associated factor) family member-associated NF- κ B activator]-binding kinase 1
TfR	Transferrin Receptor
TGF- β	transforming growth factor-beta
TGF- β 1	Tumor Growth Factor- β 1
TGN	trans-Golgi network
TH	Tyrosine Hydroxylase
Th1 cells	T helper type 1 cells
Th17 cells	T helper type 17 cells
TLR	immune toll-like receptor
TLR-4	toll-like receptor 4
TM	Transmembrane
TMDs	Transmembrane Domains

TNF α	Tumour Necrosis Factor alpha
TNFs	Tumor Necrosis Factors
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TREM2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TUBB3	Tubulin beta-III
TUFm	Tu Translation Elongation Factor, Mitochondrial
U1	Unique1
U2	Unique2
UAE	Ultrasound-Assisted Extraction
UCL	Upconversion Luminescence
UCNPs	Upconversion Nanoparticles
UPR	Unfolded Protein Response
Utf1	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
VACHT	Vesicular Acetylcholine Transporter
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VDAC1	Voltage-Dependent Anion Channel 1
VDR	Vitamin D Receptor
VPS	Vacuolar Sorting Proteins

- Abraham, D., Feher, J., Scuderi, G. L., Szabo, D., Dobolyi, A., Cservenak, M., Juhasz, J., Ligeti, B., Pongor, S., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., Higuchi, M., Suzuki, K., Boldogh, I., Radak, Z., 2019. Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer's disease in transgenic mice: Role of microbiome. *Experimental Gerontology*, vol. 115, pp. 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.12.005>
- Amanakis, G., Murphy, E., 2020. Cyclophilin D: An Integrator of Mitochondrial Function. *Frontiers in Physiology*, vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00595>
- Amponsah, E. A., Guo, R., Kong, D., Feng, B., He, J., Zhang, W., Liu, X., Du, X., Ma, Z., Liu, B., Ma, J., Cui, H., 2021. Patient-derived iPSCs, a reliable in vitro model for the investigation of Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, vol. 32, no. 4, pp. 379-402. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0065>
- Ando, K., Nagaraj, S., Küçükali, F., de Fisenne, M. -A., Kosa, A. -C., Doeraene, E., Lopez Gutierrez, L., Brion, J. -P., Leroy, K., 2022. PICALM and Alzheimer's Disease: An Update and Perspectives. *Cells*, vol. 11, no. 24, 3994. <https://doi.org/10.3390/cells11243994>
- Assan, R., 1976. La somatostatine: une nouvelle hormone [Somatostatin, a new hormone? (author's transl)]. *Diabete Metab.*, vol. 2, pp. 135-146. French. PMID: 795689.
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M., Dalkara, T., 2016. What is a pericyte?. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 36, Issue 2, pp. 451-455. <https://doi.org/10.1177%2F0271678X15610340>
- Barage, S. H., Sonawane, K. D., 2015. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, vol. 52, pp. 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Barbosa, D. J., Capela, J. P., de Lourdes Bastosa, M., Carvalho, F., 2015. In vitro models for neurotoxicology research. *Toxicology Research*, vol. 4, pp. 801-842. <https://doi.org/10.1039/c4tx00043a>
- Barnes, P. J., Karin, M., 1997. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine*, vol. 336, no. 15. <https://doi.org/10.1056/nejm199704103361506>
- Boison, D., 2007. Acetylcholinesterase. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60539-2>
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C., Salmon, D. P., 2017. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society*, vol. 23, Special Issue 9-10, pp. 818-831. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>
- Breijyeh, Z., Karaman, R., 2020. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, vol. 25, no. 24, 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>

- Buhl, E., Kim, Y. A., Parsons, T., Zhu, B., Santa-Maria, I., Lefort, R., Hodge, J. J. L., 2022. Effects of Eph/ephrin signalling and human Alzheimer's disease-associated EphA1 on *Drosophila* behaviour and neurophysiology. *Neurobiology of Disease*, vol. 170, 105752. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105752>
- Calvo-Rodriguez, M., Bacskai, B. J., 2021. Mitochondria and Calcium in Alzheimer's Disease: From Cell Signaling to Neuronal Cell Death. *Trends in Neurosciences*, vol. 44, no. 2, pp. 136-151. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.10.004>
- Carmona, S., Hardy, J., Guerreiro, R., 2018. Chapter 26 - The genetic landscape of Alzheimer disease. *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, vol. 148, pp. 395-408. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00026-0>
- Chaves, J. C. S., Dando, S. J., White, A. R., Oikari, L. E., 2024. Blood-brain barrier transporters: An overview of function, dysfunction in Alzheimer's disease and strategies for treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1870, Issue 2, 166967. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166967>
- Choe, M., Titov, D. V., 2023. Genetically encoded tool for manipulation of $\Delta\Psi_m$ identifies the latter as the driver of integrative stress response induced by ATP Synthase dysfunction. *bioRxiv [Preprint]*. <https://doi.org/10.1101/2F2023.12.27.573435>
- Choo, S. Y., 2007. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J.*, vol. 48, no. 1, pp. 11-23. <https://doi.org/10.3349/Ymj.2007.48.1.11>
- Costa, L. G., Aschner, M., Bowman, A. B., Richardson, J. R., 2018. Toxicology of the Nervous System. Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00206-3>
- Crehan, H., Holton, P., Wray, S., Pocock, J., Guerreiro, R., Hardy, J., 2012. Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. *Immunobiology*, vol. 217, Issue 2, pp. 244-250. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.017>
- Cruz-Tapias, P., Castiblanco, J., Anaya, J. M., 2013. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. *Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]*, Bogota (Colombia): El Rosario University Press, Chapter 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459467/>
- Cui, Z., Bu, W., Fan, W., Zhang, J., Ni, D., Liu, Y., Wang, J., Liu, J., Yao, Z., Shi, J., 2016. Sensitive imaging and effective capture of Cu^{2+} : Towards highly efficient theranostics of Alzheimer's disease. *Biomaterials*, vol. 104, pp. 158-167. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.056>
- Dao, P., Ye, F., Liu, Y., Du, Z. Y., Zhang, K., Dong, C. Z., Meunier, B., Chen, H., 2017. Development of Phenothiazine-Based Theranostic Compounds That Act Both as Inhibitors of β -Amyloid Aggregation and as Imaging Probes for Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci.*, vol. 8, Issue 4, pp. 798-806. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00380>

- Darling, T. K., Lamb, T. J., 2019. Emerging Roles for Eph Receptors and Ephrin Ligands in Immunity. *Frontiers in Immunology*, vol. 19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01473>
- Daubner, S. C., Le, T., Wang, S., 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 508, Issue 1, pp. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>
- Deshmukh, R. S., Kovács, K. A., Dinnyés, A., 2012. Drug discovery models and toxicity testing using embryonic and induced pluripotent stem-cell-derived cardiac and neuronal cells. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2012/379569>
- Dhapola, R., Hota, S. S., Sarma, P., Bhattacharyya, A., Medhi, B., Reddy, D. H., 2021. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, vol. 29, pp. 1669–1681. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00889-6>
- Dib, S., Pahnke, J., Gosselet, F., 2021. Role of ABCA7 in Human Health and in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 9, pp. 4603. <https://doi.org/10.3390/ijms22094603>
- Dravid, A., Raos, B., Svirskis, D., O'Carroll, S. J., 2021. Optimised techniques for high-throughput screening of differentiated SH-SY5Y cells and application for neurite outgrowth assays. *Scientific Reports*, vol. 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03442-1>
- Enman, N. M., Sabban, E. L., McGonigle, P., Van Bockstaele, E. J., 2015. Targeting the neuropeptide Y system in stress-related psychiatric disorders. *Neurobiology of Stress*, vol. 1, pp. 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.09.007>
- Erdei, A., Kovács, K. G., Nagy-Baló, Z., Lukácsi, S., Mácsik-Valent, B., Kurucz, I., Bajtay, Z., 2021. New aspects in the regulation of human B cell functions by complement receptors CR1, CR2, CR3 and CR4. *Immunology Letters*, vol. 237, pp. 42-57. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.06.006>
- Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., Villegas, S., 2017. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 57, no. 4, pp. 1171-1183. <https://doi.org/10.3233/jad-170045>
- Fang, E. F., Hou, Y., Palikaras, K., Adriaanse, B. A., Kerr, J. S., Yang, B., Lautrup, S., Hasan-Olive, M. M., Caponio, D., Dan, X., Rocktäschel, P., Croteau, D. L., Akbari, M., Greig, N. H., Fladby, T., Nilsen, H., Cader, M. Z., Mattson, M. P., Tavernarakis, N., Bohr, V. A., 2019. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, vol. 22, pp. 401–412. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0332-9>
- Fisher, C. R., Shaaeli, A. A., Ebeling, M. C., Montezuma, S. R., Ferrington, D. A., 2022. Investigating mitochondrial fission, fusion, and autophagy in retinal pigment epithelium from donors with age-related macular degeneration. *Scientific Reports*, vol. 12, 21725. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26012-5>

- Foster, E. M., Dangla-Valls, A., Lovestone, S., Ribe, E. M., Buckley, N. J., 2019. Clusterin in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Genetics, and Lessons From Other Pathologies. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00164>
- Gao, P., Ye, L., Cheng, H., Li, H., 2021. The Mechanistic Role of Bridging Integrator 1 (BIN1) in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 41, pp. 1431-1440. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00926-y>
- García-Ayllón, M. S., Riba-Llena, I., Serra-Basante, C., Alom, J., Boopathy, R., Sáez-Valero, J., 2010. Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma. *PLoS One*, vol. 5, Issue 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008701>
- Gil, L., Niño, S. A., Guerrero, C., Jiménez-Capdeville, M. E., 2021. Phospho-Tau and Chromatin Landscapes in Early and Late Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 19. <https://doi.org/10.3390/ijms221910283>
- Gürbüz, P., Dokumacı, A. H., Gündüz, M. G., Perez, C., Göger, F., Paksoy, M. Y., Yerer, M. B., Demirezer, L. Ö., 2021. In vitro biological activity of *Salvia fruticosa* Mill. infusion against amyloid β -peptide-induced toxicity and inhibition of GSK-3 β , CK-1 δ , and BACE-1 enzymes relevant to Alzheimer's disease. *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 29, Issue 3, pp. 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.01.007>
- Gusel'nikova, V. V., Korzhevskiy, D. E., 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, vol. 7, no. 2, pp. 42-47.
- Guttmann, R. P., Ghoshal, S., 2011. Thiol-protease oxidation in age-related neuropathology. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 55, Issue 2, pp. 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.017>
- Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J., Khachaturian, Z. S., 2018. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, vol. 141, Issue 7, pp. 1917–1933. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
- Hu, H., Guo, L., Overholser, J., Wang, X., 2022. Mitochondrial VDAC1: A Potential Therapeutic Target of Inflammation-Related Diseases and Clinical Opportunities. *Cells*, vol. 11, no. 19. <https://doi.org/10.3390/cells11193174>
- Hultqvist, G., Syvänen, S., Fang, X. T., Lannfelt, L., Sehlin, D., 2017. Bivalent Brain Shuttle Increases Antibody Uptake by Monovalent Binding to the Transferrin Receptor. *Theranostics*, vol. 7, Issue 2, pp. 308-318. <https://doi.org/10.7150/thno.17155>
- Isgrò, M. A., Bottoni, P., Scatena, R., 2015. Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Advances in Cancer Biomarkers*, pp. 125-143. Part of the *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 867, Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_9
- Itzhaki, R. F., Wozniak, M. A., 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's Disease: The Enemy Within. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 13, no. 4, pp. 393–405. <https://doi.org/10.3233/jad-2008-13405>

- Janeway, C. A. Jr, Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J., 2001. The complement system and innate immunity. *The Immune System in Health and Disease*, 5th edition, New York: Garland Science, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/> .
- Jiang, P., Li, C., Xiang, Z., Jiao, B., 2014. Tanshinone IIA reduces the risk of Alzheimer's disease by inhibiting iNOS, MMP-2 and NF- κ Bp65 transcription and translation in the temporal lobes of rat models of Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports*, vol. 10, no. 2, pp. 689-694. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2254>
- John, A., Reddy, P. H., 2021. Synaptic basis of Alzheimer's disease: Focus on synaptic amyloid beta, P-tau and mitochondria. *Ageing Research Reviews*, vol. 65. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101208>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., 2016. Βασικές Αρχές Νευροεπιστημών, Κεφάλαιο 62, ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π.Χ ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
- Katsouri, L., Lim, Y. M., Blondrath, K., Eleftheriadou, I., Lombardero, L., Birch, A. M., Mirzaei, N., Irvine, E. E., Mazarakis, N. D., Sastre, M., 2016. PPAR γ -coactivator-1 α gene transfer reduces neuronal loss and amyloid- β generation by reducing β -secretase in an Alzheimer's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 43, pp. 12292-12297. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606171113>
- Kawamoto, H., Minato, N., 2004. Myeloid cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 36, Issue 8, pp. 1374-1379. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.020>
- Khan, S., Barve, K. H., Kumar, M. S., 2020. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, vol. 18, Issue 11, pp. 1106-1125. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200528142429>
- Khodagholi, F., Ashabi, G., 2013. Dietary supplementation with *Salvia sahendica* attenuates memory deficits, modulates CREB and its down-stream molecules and decreases apoptosis in amyloid beta-injected rats. *Behavioural Brain Research*, vol. 241, pp. 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.11.026>
- Leblhuber, F., Steiner, K., Schuetz, B., Fuchs, D., Gostner, J. M., 2018. Probiotic Supplementation in Patients with Alzheimer's Dementia - An Explorative Intervention Study. *Current Alzheimer Research*, vol. 15, Issue 12, pp. 1106 - 1113. <http://dx.doi.org/10.2174/1389200219666180813144834>
- Lezoualc'h, F., Engert, S., Berning, B., Behl, C., 2000. Corticotropin-Releasing Hormone-Mediated Neuroprotection against Oxidative Stress Is Associated with the Increased Release of Non-amyloidogenic Amyloid β Precursor Protein and with the Suppression of Nuclear Factor- κ B. *Molecular Endocrinology*, vol. 14, Issue 1, pp. 147-159. <https://doi.org/10.1210/mend.14.1.0403>
- Li, H. n., Liu, Y., Zhang, Z. p., Wang, Z. p., Hao, J. z., Li, F. r., Fan, Z. f., Zou, L. b., Cheng, M. s., 2018. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship studies of hederacolchiside E and its derivatives as potential anti-Alzheimer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 143, pp. 376-389. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.040>

- Liddell, J. R., 2017. Interplay between Nrf2 and NF- κ B in Neuroinflammatory Diseases. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000489>
- Lopez-Suarez, L., Awabdh, S. A., Coumoul, X., Chauvet, C., 2022. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. *Neurotoxicology*, vol. 92, pp. 131–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.07.008>
- Lopresti, A. L., 2017. Salvia (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs R D*, vol. 17, pp. 53–64. <https://doi.org/10.1007/s40268-016-0157-5>
- Lorenzi D. D., Pintore L., 2023. CHAPTER 15 - Nervous system. *Canine and Feline Cytopathology (Fourth Edition)*, pp. 512-557. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-68368-5.00024-4>
- Ma, J., Yu, J.T., Tan, L., 2015. MS4A Cluster in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiology*, vol. 51, pp. 1240–1248. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8800-z>
- Malmström, R. E., 2002. Pharmacology of neuropeptide Y receptor antagonists: Focus on cardiovascular functions. *European Journal of Pharmacology*, vol. 447, Issue 1, pp. 11-30. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01889-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01889-7)
- Manczak, M., Kandimalla, R., Yin, X., Reddy, P. H., 2018. Hippocampal mutant APP and amyloid beta-induced cognitive decline, dendritic spine loss, defective autophagy, mitophagy and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, vol. 27, Issue 8, pp. 1332–1342. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy042>
- Martinez, V., 2013. Chapter 180 - Somatostatin. *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*, Academic Press, pp. 1320-1329. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00180-9>
- Mattiola, I., Mantovani, A., Locati, M., 2021. The tetraspan MS4A family in homeostasis, immunity, and disease. *Trends in Immunology*, vol. 42, Issue 9, pp. 764-781. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.07.002>
- Mavougou, C., K. Zimmerman, Schindowski, 2013. Immunotherapy with Anti-A β Monoclonal Antibodies in Alzheimer's Disease: A Critical Review on the Molecules in the Pipelines with Regulatory Considerations. *Frontiers in Clinical Drug Research - Alzheimer Disorders*, vol. 1, pp. 3-85. <https://doi.org/10.2174/9781608057221113010003>
- MerviĆ, M., Bival Štefan, M., Kindl, M., Blažeković, B., Marijan, M., Vladimir-Knežević, S., 2022. Comparative Antioxidant, Anti-Acetylcholinesterase and Anti- α -Glucosidase Activities of Mediterranean Salvia Species. *Plants*, vol. 11, no. 5, 625. <https://doi.org/10.3390/plants11050625>
- Milinkeviciute, G., Green, K. N., 2023. Clusterin/apolipoprotein J, its isoforms and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1167886>
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 22880, N-methyl-D-aspartic acid. Retrieved November 5, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-methyl-D-aspartic-acid>.

- Newman, E., Gupta, K., Climer, J., Monaghan, C., Hasselmo, M., 2012. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 6. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00024>
- Nishu, N., Masih, S., Kamal, S., Jain, P., Khan, Z. K., 2020. Chapter 23 - Transgenic animals in research and industry. *Animal Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, pp. 463-480. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00021-5>
- Ock, C. Y., Kim, E. H., Choi, D. J., Lee, H. J., Hahm, K. B., Chung, M. H., 2012. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 18, Issue 4, pp. 302-308. <https://doi.org/10.3748%2Fwjg.v18.i4.302>
- Orta-Salazar, E., Cuellar-Lemus, C. A., Díaz-Cintra, S., Feria-Velasco, A. I., 2014. Cholinergic markers in the cortex and hippocampus of some animal species and their correlation to Alzheimer's disease. *Neurología (English Edition)*, vol. 29, Issue 8, pp. 497-503. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2012.10.010>
- Peixoto, C. A., de Oliveira, W. H., da Racho Araújo, S. M., Santana Nunes, A. K., 2017. AMPK activation: Role in the signaling pathways of neuroinflammation and neurodegeneration. *Experimental Neurology*, vol. 298, Part A, pp. 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.08.013>
- Powell, C. M., Castillo, P. E., 2008. 4.36 - Presynaptic Mechanisms in Plasticity and Memory. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, Academic Press, pp. 741-769. <https://doi.org/10.1016/B978-012370509-9.00038-3>
- Qin, Q., Teng, Z., Liu, C., Li, Q., Yin, Y., Tang, Y., 2021. TREM2, microglia, and Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 195, 111438. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111438>
- Rafii, M. S., Tuszynski, M. H., Thomas, R. G., Barba, D., Brewer, J. B., Rissman, R. A., Siffert, J., Aisen, P. S., 2018. Adeno-Associated Viral Vector (Serotype 2)-Nerve Growth Factor for Patients With Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, vol. 75, pp. 834-841. <https://doi.org/10.1001%2Fjama.neuro.2018.0233>
- Ranganathan, R., Sapozhnikov, G., Ni, W., Li, S., Song, Y., 2023. Recent developments in the role of DNA damage response and understanding its implications for new therapeutic approaches in Alzheimer's disease. *Translational Medicine of Aging*, vol. 7, pp. 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2023.06.004>
- Reddy, P. H., Yin, X. L., Manczak, M., Kumar, S., Pradeepkiran, J. A., Vijayan, M., Reddy, A. P., 2018. Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, vol. 27, Issue 14, pp. 2502-2516. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy154>
- Ross, R. A., Spengler, B. A., Biedler, J.L., 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 71, no. 4, pp. 741-747.

- Rusek, M., Smith, J., El-Khatib, K., Aikins, K., Czuczwar, S. J., Pluta, R., 2023. The Role of the JAK/STAT Signaling Pathway in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: New Potential Treatment Target. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, Issue 1. <https://doi.org/10.3390/ijms24010864>
- Santos-López, J., de la Paz, K., Fernández, F. J., Vega, M. C., 2023. Structural biology of complement receptors. *Front. Immunol.*, vol. 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1239146>
- Schenk, D., 2002. Amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 3, pp. 824–828. <https://doi.org/10.1038/nrn938>
- Serý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L., Janout, V., 2013. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol.*, vol. 51, no. 1, pp. 1-9. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.34190>
- Shui, G., 2011. 5.44 - Development of In Vitro Neural Models for Drug Discovery and Toxicity Screening. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, pp. 565-572. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00513-4>
- Sil, S., Ghosh, T., 2016. Role of cox-2 mediated neuroinflammation on the neurodegeneration and cognitive impairments in colchicine induced rat model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroimmunology*, vol. 291, pp. 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.12.003>
- Silva, M. C., Cross, A., Brandon, N. J., Haggarty, S. J., 2017. 1.03 - Human iPSC Models in Drug Discovery: Opportunities and Challenges. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, Elsevier, pp. 48-73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12284-X>
- Silva, M. V. F., Loures, C. d. M. G., Alves, L. C. V., Souza, L. C. d., Borges, K. B. G., Carvalho, M. d. G., 2019. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, vol. 26, no. 33. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>
- Streit, W. J., Walter, S. A., Pennell, N. A., 1999. Reactive microgliosis. *Progress in Neurobiology*, vol. 57, Issue 6, pp. 563-581. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00069-0)
- Suzuki, R., Takahashi, H., Yoshida, C., Hidaka, M., Ogawa, T., Futai, E., 2023. Specific Mutations near the Amyloid Precursor Protein Cleavage Site Increase γ -Secretase Sensitivity and Modulate Amyloid- β Production. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 4, 3970. <https://doi.org/10.3390/ijms24043970>
- Takami, M., Funamoto, S., 2012. γ -Secretase-Dependent Proteolysis of Transmembrane Domain of Amyloid Precursor Protein: Successive Tri- and Tetrapeptide Release in Amyloid β -Protein Production. *International Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.1155/2012/2591392>
- Tan, M. S., Yu, J. T., Tan, L., 2013. Bridging integrator 1 (BIN1): form, function, and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, vol. 19, Issue 10, pp. 594-603. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.06.004>

- Tukker, A. M., Wijnolts, F. M. J., Aart de Groot, Westerink, R. H. S., 2018. Human iPSC-derived neuronal models for in vitro neurotoxicity assessment. *NeuroToxicology*, vol. 67, pp. 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.06.007>
- Tuszynski, M. H., Yang, J. H., Barba, D., U, H. S., Bakay, R. A., Pay, M. M., Masliah, E., Conner, J. M., Kobalka, P., Roy, S., Nagahara, A. H., 2015. Nerve Growth Factor Gene Therapy: Activation of Neuronal Responses in Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, vol. 72, pp. 1139-1147. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.1807>
- Ulaganathan, S., Pitchaimani, A., 2023. Spontaneous and familial models of Alzheimer's disease: Challenges and advances in preclinical research. *Life Sciences*, vol. 328, 121918. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121918>
- Ververis, A., Kyriakou, S., Ioannou, K., Chatzopoulou, P. S., Panayiotidis, M. I., Plioukas, M., Christodoulou, K., 2023. Chemical Profiling and Antioxidant and Anti-Amyloid Capacities of *Salvia fruticosa* Extracts from Greece. *Plants*, vol. 12, no. 18, 3191. <https://doi.org/10.3390/plants12183191>
- Voloboueva, L., Sun, X., Ouyang, Y.-B., Giffard, R.G., 2017. Cell Culture: Primary Neural Cells. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02425-1>
- Weinshenker, D., 2007. Dopamine Beta-Hydroxylase. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, pp. 1-15. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60505-7>
- Welzel, A. T., Maggio, J. E., Shankar, G. M., Walker, D. E., Ostaszewski, B. L., Li, S., Klyubin, I., Rowan, M. J., Seubert, P., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., 2014. Secreted Amyloid β -Proteins in a Cell Culture Model Include N-Terminally Extended Peptides That Impair Synaptic Plasticity. *Biochemistry*, vol. 54, Issue 24, pp. 3908-3921. <https://doi.org/10.1021/bi5003053>
- Witzemann, V., 2007. Choline Acetyltransferase. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, pp. 1-5. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60522-7>
- Xiao, S., Zhou, D., Luan, P., Gu, B., Feng, L., Fan, S., Liao, W., Fang, W., Yang, L., Tao, E., Guo, R., Liu, J., 2016. Graphene quantum dots conjugated neuroprotective peptide improve learning and memory capability. *Biomaterials*, vol. 106, pp. 741-747. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.021>
- Xie, J., Wettschurack, K., Yuan, C., 2020. Review: In vitro Cell Platform for Understanding Developmental Toxicity. *Frontiers in Genetics*, vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.623117>
- Ye, X., Sun, X., Starovoytov, V., Cai, Q., 2015. Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains. *Human Molecular Genetics*, vol. 24, Issue 10, pp. 2938–2951. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv056>
- Zhao, L., 2019. CD33 in Alzheimer's Disease – Biology, Pathogenesis, and Therapeutics: A Mini-Review. *Gerontology*, vol. 65, Issue 4, pp. 323-331. <https://doi.org/10.1159/000492596>

- Zhu, Cheng-long, Yao, Ren-qi, Li, Lu-xi, Li, Peng, Xie, Jian, Wang, Jia-feng, Deng, Xiao-ming, 2021. Mechanism of Mitophagy and Its Role in Sepsis Induced Organ Dysfunction: A Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664896>
- Zhu, X. C., Yu, J. T., Jiang, T., Wang, P., Cao, L., Tan, L., 2015. CR1 in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, vol. 51, pp. 753–765. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8723-8>
- Zhu, X., Lee H., Raina, A. K., Perry, G., Smith, M. A., 2002. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Alzheimer's Disease. *Neurosignals*, vol. 11, Issue 5, pp. 270-281. <https://doi.org/10.1159/000067426>

LINKS

1. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin (Ημερομηνία προσπέλασης 5/7/2024)

https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf?rev=d82fc3dda1554b26b9c253acae903164&sc_lang=en