



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

*«Μελέτη της επίδρασης των αντιδιαβητικών παραγόντων στις
συνάψεις των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου και του πιθανού
τους ρόλου στην αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer»*

ΑΝΔΡΕΑΣ Π. ΚΑΤΣΕΝΟΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

*«Μελέτη της επίδρασης των αντιδιαβητικών παραγόντων στις
συνάψεις των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου και του πιθανού
τους ρόλου στην αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer»*

ΑΝΔΡΕΑΣ Π. ΚΑΤΣΕΝΟΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης του κ. Κάτσενου Ανδρέα: 2-11-2020

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 949^α/30-11-2020

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Πέσχος Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία

Μέλη:

Βεζυράκη Πατρώνα, Καθηγήτρια Φυσιολογίας

Κονιτσιώτης Σπυρίδων, Καθηγητής Νευρολογίας

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. 970^α/29-6-2021

Επιβλέπων:

Τσάμης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας

Μέλη:

Βεζυράκη Πατρώνα, Καθηγήτρια Φυσιολογίας

Πέσχος Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-1-2021

«Μελέτη της επίδρασης της ινσουλίνης και των αντιδιαβητικών παραγόντων στις συνάψεις των πυραμιδικών κυττάρων του ιππόκαμπου και του ρόλου τους στην αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer»

Τροποποίηση τίτλου θέματος: Γ.Σ. αριθμ. 1085^α/13-2-2024

«Μελέτη της επίδρασης των αντιδιαβητικών παραγόντων στις συνάψεις των πυραμιδικών κυττάρων του ιππόκαμπου και του πιθανού τους ρόλου στην αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1095^α/23-4-2024

1. Τσάμης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Πέσχος Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Βεζυράκη Πατρώνα, Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Σίμος Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Φυσιολογία του Ανθρώπου του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Κονιτσιώτης Σπυρίδων, Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Λεονταρίτης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Λαμπρακάκης Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής Νευροφυσιολογίας Κεντρικού Νευρικού Συστήματος του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 15-5-2024

Ιωάννινα 22-5-2024

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

Αικατερίνη Λαγού

Αφιερώσεις

*Στους Γονείς μου,
Παναγιώτη και Ευαγγελία
στην αδελφή μου, Κωνσταντίνα
στους παππούδες μου, Κωνσταντίνο και Αρετή*

Στον Πατέρα μου.

Πρόλογος

Ο Γαλαξίας μας αποτελείται από ένα γιγαντιαίο συγκρότημα εκατοντάδων δισεκατομμυρίων άστρων. Σε μία γωνιά του γαλαξία και μακριά από το κέντρο του υπάρχει ένας μικρός γαλάζιος πλανήτης ο οποίος περιφέρεται γύρω από ένα μέτριο άστρο. Ο πλανήτης αυτός είναι η Γη, όπου οι κατάλληλες συνθήκες επέτρεψαν το σχηματισμό, την ανάπτυξη και την εξέλιξη πολύπλοκων οργανικών ενώσεων οι οποίες εξελίχθηκαν σε ζώντες οργανισμούς. Τα τελευταία λίγα εκατομμύρια χρόνια, ένα είδος κατάφερε να εξελιχθεί ταχύτατα και να επικρατήσει σε όλα τα άλλα δημιουργώντας έναν προηγμένο πολιτισμό. Το είδος αυτό είναι το ανθρώπινο. Οι άνθρωποι αναζητούν την κατανόηση των φυσικών νόμων και διαδικασιών οι οποίοι διέπουν ολόκληρο το σύμπαν. Για το σκοπό αυτό, δημιούργησαν εξελιγμένες μηχανές με τις οποίες εξερευνούν τη φύση γύρω τους τόσο στη Γη, όσο και έξω από αυτή, στο αχανές διάστημα.

Το είδος μας διαφοροποιήθηκε καθώς έχει την ανάγκη για γνώση και κατανόηση. Όλα τα παραπάνω επιτεύχθηκαν καθώς το είδος μας, διαθέτει το πιο πολύπλοκο βιολογικό όργανο στο σύμπαν. Η τεράστια πολυπλοκότητά του και η δυνατότητά του να επεξεργάζεται τεράστιους όγκους πληροφοριών οδήγησε στην ανάπτυξη ανώτερων πνευματικών λειτουργιών. Το όργανο αυτό είναι ο εγκέφαλος.

Οι αρχαίοι Έλληνες και πιο συγκεκριμένα ο Ιπποκράτης, θεωρούσε ότι η έδρα της διανόησης, της κρίσης και των συναισθημάτων είναι ο εγκέφαλος. Αιώνες αργότερα ο Leonardo da Vinci και Andreas Vesalius, πραγματοποίησαν λεπτομερείς ανατομικές περιγραφές του νευρικού συστήματος στον άνθρωπο και προσπάθησαν να διατυπώσουν τις φυσικές ερμηνείες των εγκεφαλικών λειτουργιών. Λίγο αργότερα, στις αρχές του 20^{ου} αιώνα επήλθε μια επανάσταση για τις νευροεπιστήμες. Ο Ιταλός ιατρός Camillo Golgi επινόησε μια πρωτοποριακή τεχνική χρώσης των νευρικών ιστών που φέρει το όνομά του. Κατ' αυτόν τον τρόπο αποκάλυψε το υπόβαθρο όλων των λειτουργιών του νευρικού συστήματος. Λίγο Αργότερα ο Ramon y Cajal, κατάφερε να περιγράψει και να αποτυπώσει με λεπτομέρεια τις μικροσκοπικές δομές του εγκεφάλου. Οι μελέτες του αποκάλυψαν ότι ο βασικός λίθος του εγκεφάλου είναι ο νευρώνας και επιπλέον αποτύπωσε με εξαιρετική λεπτομέρεια τη λειτουργία των κυττάρων με βάση τη μορφολογία του.

Με την πάροδο των ετών και με την εξέλιξη των επιστημών έγινε δυνατή η λεπτομερέστερη ανάλυση των ανώτερων εγκεφαλικών λειτουργιών όπως η μάθηση και η μνήμη, οι οποίες βασίζονται στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις του ΚΝΣ, και πιο συγκεκριμένα στις αλληλεπιδράσεις του υποκάμπου.

Με την αύξηση του μέσου όρου ζωής του ανθρώπινου είδους αλλά και υπό την επίδραση γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων έχουν έρθει στο προσκήνιο νόσοι οι οποίες επηρεάζουν το ΚΝΣ. Μια τέτοια είναι και η νόσος Alzheimer, η οποία αποτελεί την μια προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος αγνώστου αιτιολογίας, η οποία εκτιμάται ότι προκαλεί άνοια σε περισσότερα από 25 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία που να μπορεί να σταματήσει ή να καθυστερήσει τον εκφυλισμό που προκαλεί η AD. Επομένως, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών παραγόντων για τη θεραπεία της νόσου και προς αυτή την κατεύθυνση καταβάλλεται παγκοσμίως μεγάλη ερευνητική προσπάθεια. Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες, τόσο κλινικές όσο και πειραματικές, δείχνουν ότι οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές εμφανίζουν συνυπάρχουσα μεταβολική δυσλειτουργία, η οποία μπορεί να επιδεινώσει τα νευρολογικά συμπτώματα. Επιδημιολογικές μελέτες και αποτελέσματα που έχουν προκύψει από ζωικά μοντέλα υποδηλώνουν μια σύνδεση μεταξύ της αντίστασης στην ινσουλίνη με την ανώμαλη εγκεφαλική ομοιόσταση της ινσουλίνης και την εμφάνιση της παθολογίας της AD, όπως οι πλάκες Αβ και οι νευροϊνιδιακοί κόμβοι της υπερφωσφορυλιωμένης Ταυ πρωτεΐνης. Είναι επομένως λογικό ότι τα μεταβολικά μονοπάτια μπορεί να αποτελούν από μόνα τους πολλά υποσχόμενους θεραπευτικούς στόχους για τις νευροεκφυλιστικές νόσους.

Παρά τις ερευνητικές προσπάθειες, οφείλουμε να αντιληφθούμε τις δυσκολίες των εγχειρημάτων αυτών, καθώς ο ανθρώπινος εγκέφαλος λόγω της εξαιρετικής πολυπλοκότητας των νευρωνικών δικτύων είναι λιγότερο γνωστός και κατανοητός από το παρατηρούμενο αστρονομικό σύμπαν.

Έφτασε, λοιπόν, εκείνη η στιγμή, που πρέπει να γραφούν αυτές οι λέξεις της ολοκλήρωσης ενός πονήματος. Μια διδακτορική διατριβή, η οποία ξεκίνησε με λίγη γνώση και πολύ ενθουσιασμό, συνέχισε με πολλή μελέτη και κάποια ψήγματα απογοήτευσης για την δυσκολία κατανόησης της πολυπλοκότητας της λειτουργίας του εγκεφάλου και ολοκληρώθηκε με απόλυτη ικανοποίηση για την κατάκτηση ικανοποιητικού μέρους της άπειρης γνώσης γύρω από την «μνήμη και τη μάθηση». Σε αυτή την πορεία βρέθηκαν άνθρωποι, που αγκάλιασαν αυτή την προσωπική θέληση να μάθω κάτι παραπάνω για τον εγκέφαλο, και στις παρακάτω λίγες γραμμές, επιθυμώ να τους ευχαριστήσω.

Πρώτα από όλους, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω εκ βάθρων τον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, τον επίκουρο Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Τσάμη. Η μεταλαμπάδευση της γνώσης για το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα με ενθουσιασμό και εγκυρότητα, αποτέλεσε για μένα την οδηγό εκείνη δύναμη για να μελετήσω περισσότερο, να σκέφτομαι περισσότερο επιστημονικά και να γίνομαι καλύτερος. Το ήθος και ο γενναιόδωρος

χαρακτήρας του με συγκινεί και ευελπιστώ στο μέλλον να μπορέσω να του ανταποδώσω έστω και μερικά από εκείνα που ο ίδιος έκανε για εμένα. Ελπίζω η επιλογή του να είμαι μέλος της ερευνητικής του ομάδας, να τον έχει δικαιώσει στο πέρας αυτής της εργασίας.

Στη συνέχεια, επιθυμώ να ευχαριστήσω εκ βαθέων τον Καθηγητή Φυσιολογίας, Διευθυντή του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Κοσμήτορα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ Δημήτριο. Πέσχο. Θεωρώ ότι αν ένας άνθρωπος αγγίξει τη σεμνότητα, την διορατικότητα και το ήθος του, τότε έχει κατακτήσει τις ύψιστες ανθρώπινες αξίες. Η ικανότητά του να διακρίνει το ερευνητικό κενό και να γνωρίζει πώς θα το απαντήσει, αποτελούν πραγματικό στοιχείο ακαδημαϊκής εμπειρίας. Τον ευχαριστώ που αγκάλιασε την προσπάθεια και την παρουσία μου στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και που πάντα ήταν παρόν στην κάθε δυσκολία και με την εγγενή του ευγένεια κατάφερνε πάντα να μας οδηγεί στην λύση.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομότιμη Καθηγήτρια και τέως Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, κα. Πάτρα Βεζυράκη, για την απόλυτη υποστήριξή της από την πρώτη ημέρα που επισκέφτηκα το Εργαστήριο Φυσιολογίας. Πέραν της τεράστιας ερευνητικής της δύναμης και πορείας, διαθέτει εκείνη την ικανότητα - νοητική και συναισθηματική - να κατανοεί τις δυσκολίες και τους ανθρώπους και μέσα από την ευφυΐα της να τους οδηγεί στην λύση. Την ευχαριστώ για όλα όσα έχει κάνει για εμένα.

Φυσικά, σε όλη αυτή την προσπάθεια δεν υπήρξα μόνος. Γι' αυτό οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Σίμο, που μου δίδαξε νέες τεχνικές και έλυσε άπειρες απορίες, αλλά και γιατί καταφέρνει να κατεβαίνει από την έδρα και να διδάσκει ως φίλος και ως πραγματικός συνεργάτης. Τον ευχαριστώ βαθύτατα!

Ευχαριστώ ολόψυχα τους συναδέλφους και φίλους μου -Αθηνά και Νίκο-, που μοιραζόμαστε τον ίδιο χώρο και τις ίδιες ανησυχίες. Και επίσης, την Ειρήνη, την Μαρία, την Ευτέρπη για το υποστηρικτικό τους πνεύμα και την φιλία τους, αλλά και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Λάμπρο Λάκκα για την αμέριστη υποστήριξή του κατά την τελική ευθεία της ολοκλήρωσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Έλενα, η οποία στάθηκε αφορμή για να ξεκινήσει αυτό το υπέροχο ταξίδι. Την ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου, για την υποστήριξη και την αγάπη την οποία απλόχερα μου χάρισε όλα αυτά τα χρόνια αλλά και την επιμονή, την υπομονή και την πίστη της σε εμένα ακόμη και σε στιγμές που ο ίδιος είχα χάσει την εμπιστοσύνη στον εαυτό μου.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στους σημαντικότερους ανθρώπους της ζωής μου, τα πρότυπά μου, και τους πυλώνες της ζωής μου, τους γονείς μου -Παναγιώτη και Ευαγγελία-,

για την αστήρευτη δύναμη και την καρτερικότητά τους καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου, καθώς και την αδελφή μου Κωνσταντίνα γιατί ήταν πάντοτε εκεί παρόντες ώστε να με στηρίζουν υλικά και ψυχικά με όλη τους την αγάπη, στη χαρά και την απογοήτευση και που πιστεύουν σε μένα.

Ολοκληρώνοντας τις ευχαριστίες μου, θα ήθελα με ιδιαίτερη συγκίνηση και αγάπη, να αφιερώσω την διδακτορική μου διατριβή στον πατέρα μου Παναγιώτη, ο οποίος δεν βρίσκεται πλέον κοντά μου, αλλά είμαι σίγουρος ότι από κάπου εκεί ψηλά θα είναι υπερήφανος και χαρούμενος για εμένα, όπως την ημέρα της παρουσιάσής μου...

Δεν χρειάζονται πολλά λόγια, απλά:

Σας ευχαριστώ πολύ για όλα....

Ανδρέας Κάτσεων

Βιολόγος, MSc.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	16
Κεφάλαιο 1: Γενικά στοιχεία για τη νόσο Alzheimer	16
1.1 Ιστορική αναδρομή	16
1.2. Γενικά στοιχεία	18
1.3. Νόσος Alzheimer (AD)	18
1.4. Αιτιολογία της νόσου Alzheimer	20
1.4.1. Η αμυλοειδική υπόθεση	21
1.4.2. Η υπόθεση των πολλαπλών μεταβολών στη νευροδιαβίβαση.....	25
1.4.3. Η υπόθεση του οξειδωτικού στρες	27
1.5. Οι αρχές λειτουργίας των νευρώνων.....	28
1.5.1. Το δυναμικό μεμβράνης	30
1.5.2. Η ηλεκτροχημική κλίση και η παθητική μεταφορά ιόντων	31
1.5.3. Η κίνηση των ιόντων διαμέσου των διαύλων.....	33
1.5.4. Το δυναμικό ηρεμίας	34
1.5.5. Οι τασεοελεγχόμενοι δίαυλοι Na^+ έχουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση δυναμικών ενέργειας	37
1.6. Τα νευρωνικά δίκτυα στον ενήλικο ιππόκαμπο	39
1.6.1. Βασικές γνώσεις για τη νευροφυσιολογία του ιπποκάμπου	40
1.6.2. Το κύκλωμα του ιπποκάμπου	41
1.6.3. Ο ρόλος της μορφολογίας των νευρώνων στην AD.....	44
1.6.4. Νευροφυσιολογικές και μορφολογικές αλλαγές στην AD	48
1.6.5. Πειραματικά μοντέλα της AD.....	52
1.6.6. Διάγνωση της AD.....	53
1.6.7. Θεραπευτικές προσεγγίσεις απέναντι στην AD.....	55
2. Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2 και AD.....	59
2.1. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (T2DM)	59
2.1.1. Συσχέτιση T2DM με AD	60
2.1.2. Αντιδιαβητικοί παράγοντες στην αντιμετώπιση της AD.....	63
2.2.2. Νέας γενιάς αντιδιαβητικοί παράγοντες με νευροπροστατευτικές ιδιότητες.....	70
3. Νανοτεχνολογία	83
3.1.1. Εφαρμογές της νανοτεχνολογίας την ιατρική	86
3.1.2. Αλληλαεπίδραση Νανομορίων με Βιομόρια και Θεραπεία	87
3.1.3. Ιεραρχικά Πορώδη Υλικά (HPCs).....	88
3.1.4. Πορώδη Υλικά ως φορείς φαρμακευτικών παραγόντων	89
3.1.5. Η χρήση των HPCs στην αντιμετώπιση της AD	90

4. Σκοπός της εργασίας	92
5. Υλικά και μέθοδοι.....	93
5.1. Νομικό πλαίσιο.....	93
5.2. Κυτταρικές σειρές (<i>In Vitro</i>)	93
5.2.1. NIH/3T3	93
5.2.2. Πρωτογενείς καλλιέργειες πυραμιδικών κυττάρων του υποκάμπου	94
5.2.3. Συμπεριφορικές δοκιμασίες (<i>In Vivo</i>)	102
6. Αποτελέσματα	107
6.1. Εμπαγλιφλοζίνη.....	107
6.2. Σιταγλιπτίνη.....	117
6.3. Δαπαγλιφλοζίνη	119
6.4. HPC- Δαπαγλιφλοζίνη.....	127
6.5. Ομάδες πειραματοζώων	130
6.5.1. Morris Water Maze Test.....	132
6.5.2. Y- maze Test	136
7. Συζήτηση	139
8. Συμπεράσματα	148
9. Περίληψη	149
10. Βιβλιογραφία.....	153

1. Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1: Γενικά Στοιχεία για την νόσο Alzheimer (AD).

1.1. Ιστορική αναδρομή.

Ο Alois Alzheimer (1864-1915) Γερμανός ψυχίατρος και νευροπαθολόγος, ήρθε για πρώτη φορά σε επαφή με την ασθενή Auguste Deter στις 26 Νοεμβρίου 1901, κατά τη διάρκεια της θητείας του ως ήταν βοηθός ιατρού στο ψυχιατρικό ίδρυμα της Φρανκφούρτης (**Εικόνα 1**). Η Deter, ηλικίας 51 ετών, είχε εισαχθεί την προηγούμενη ημέρα στην κλινική από τον σύζυγό της. Για διάστημα οκτώ μηνών εμφάνιζε σταδιακά αλλαγές στην προσωπικότητά της. Η ασθενής παρουσίαζε ανεξέλεγκτη συμπεριφορά, κατηγορώντας ξαφνικά τον σύζυγό της για μοιχεία, ενώ παράλληλα με τις παραισθήσεις, η μνήμη της προοδευτικά άρχισε να εξασθενεί και επιπλέον αντιμετώπιζε δυσκολίες στην οργάνωση του νοικοκυριού καθώς και στην προετοιμασία του φαγητού. Συχνά βρισκόταν σε σύγχυση ακόμη και σε οικείες καταστάσεις κι επιπλέον ανέπτυξε φόβο για ανθρώπους που γνώριζε καλά. Έγινε αδικαιολόγητα ζηλότυπη απέναντι στον σύζυγό της και κατά περιόδους φανταζόταν ακόμη και ότι κάποιος ήθελε να τη δολοφονήσει με αποτέλεσμα να παρουσιάζει έντονα ξεσπάσματα. Στην κλινική, η Ντέτερ ήταν χωρικά και χρονικά αποπροσανατολισμένη και σε γενικότερη σύγχυση, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα άγχους αλλά και απροθυμία να συνεργαστεί με το προσωπικό του ιδρύματος. Ο ίδιος ο Alzheimer επέβλεπε τη φροντίδα της και λάμβανε το λεπτομερές κλινικό της ιστορικό. Παρά την ικανότητά της να εκφέρει το όνομά της, ανταποκρινόταν στο όνομα του συζύγου της κι επιπλέον δεν μπορούσε να γράψει το όνομά της εφόσον της το ζητούσαν. Μπορούσε να αναγνωρίσει και να ονομάσει διαφορετικά αντικείμενα όπως το μολύβι, το κλειδί και το τσιγάρο. Ωστόσο, όταν ρωτήθηκε για το είδος του φαγητού που έτρωγε κατά τη διάρκεια ενός γεύματος, απάντησε ότι έτρωγε "σπανάκι", αν και τα γεύματα ήταν διαφορετικά. Επιπλέον δεν ήταν σε θέση να θυμηθεί πλήρως τα αντικείμενα που είχε παρατηρήσει. Όταν της ήταν δύσκολο απαντήσει στις ερωτήσεις που έθετε ο Alzheimer, δήλωνε επανειλημμένα: "Κατά κάποιον τρόπο, έχασα τον εαυτό μου". Κατά τη διάρκεια των βραδινών ωρών, τα συμπτώματα γίνονταν εντονότερα.

Ο Alzheimer δεν είχε συναντήσει ποτέ στο παρελθόν ασθενή με τέτοιου είδους συμπτωματολογία. Εντυπωσιάστηκε από την περίπτωση της Deter και αποφάσισε να την εξετάσει πιο προσεκτικά. Για να μάθει περισσότερα για την πάθηση της ασθενούς, ο Alzheimer της έπαιρνε συστηματικά συνεντεύξεις και κατέγραφε τις απαντήσεις της σε λεπτομερή πρωτόκολλα. Όταν της απηύθυνε συγκεκριμένες ερωτήσεις, εκείνη συχνά τις

απέφευγε ή οι απαντήσεις της δεν σχετίζονταν με τις ερωτήσεις του. Όταν μιλούσε αυθόρμητα, χρησιμοποιούσε συχνά παραφράσεις και απρεπείς εκφράσεις ή ακολουθίες φράσεων σε λανθασμένους και ακατανόητους συνδυασμούς. Σε γενικές γραμμές, ονομάτιζε σωστά τα αντικείμενα που της έδειχνε ο Alzheimer, αλλά ορισμένα εξ αυτών δεν τα αναγνώριζε και δεν ήταν σε θέση να τα χρησιμοποιήσει.

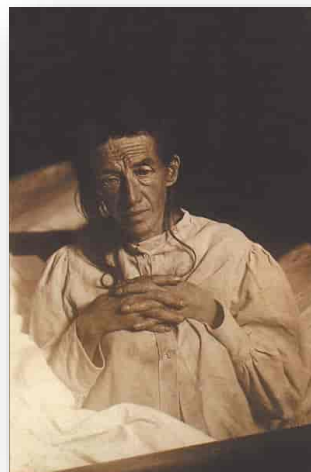
Η περίπτωση της Deter, όπως καταγράφηκε από τον Alzheimer, περιγράφει με ακρίβεια τα κλινικά συμπτώματα πολλών ασθενών που πάσχουν από την AD: η ολοένα και μεγαλύτερη έκπτωση της μνήμης της και πιο συγκεκριμένα η αδυναμία να δημιουργήσει αναμνήσεις για πρόσφατα γεγονότα, η μειωμένη κατανόηση, η απρόβλεπτη συμπεριφορά και η ψυχοκοινωνική ανικανότητα, ο αποπροσανατολισμός, και η προοδευτικά αναπτυσσόμενη αφασία. Συνολικά, τα συμπτώματά της ταιριάζουν με το φάσμα των συμπτωμάτων που σχετίζονται με την AD ακόμη και σήμερα.

Ο Alzheimer περιέγραψε λεπτομερώς τη πορεία και τις επιμέρους χαρακτηριστικά της έκπτωσης της μνήμης στα ιατρικά της αρχεία. Περιέγραψε τα συμπτώματά της ως μια προοδευτική γνωστική διαταραχή με τοπικά νευρολογικά συμπτώματα, ψευδαισθήσεις, παραισθήσεις και με ψυχοκοινωνική ανικανότητα.

Τελικά, η ασθενής έχασε κάθε γνωστική ικανότητα και υπέκυψε από σηψαιμία και πνευμονία στις 8 Απριλίου 1906 σε ηλικία 55 ετών. Ο εγκέφαλος της ασθενούς στάλθηκε από τη Φρανκφούρτη στο Μόναχο μαζί με τα ιατρικά αρχεία. Ο Αλτσχάιμερ αποφάσισε να πραγματοποιήσει αμέσως βιοψία του εγκεφάλου της.

Ο Alois Alzheimer παρατήρησε και κατέγραψε ορισμένες σημαντικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στον εγκέφαλό της. Αυτές είναι οι αμυλοειδικές ή νευριτικές πλάκες και οι νευροϊνιδιακοί κόμβοι ή δεμάτια, όροι οι οποίοι χρησιμοποιούνται και σήμερα και αποτελούν αντικείμενο συνεχούς ερευνητικής προσπάθειας στη διερεύνηση της παθοφυσιολογία της νόσου.

Στις 3 Νοεμβρίου του ίδιου έτους ο Alzheimer, παρουσίασε την περίπτωση της ανωτέρω ασθενούς στο 37^η Συνάντηση Ψυχιάτρων της Νοτιοδυτικής Γερμανίας, χαρακτηρίζοντας τα ευρήματα ως «μια περίεργη νόσο του εγκεφαλικού φλοιού» (1–3).



Εικόνα 1: Αριστερά ο Γερμανός ψυχίατρος και νευροπαθολόγος Alois Alzheimer. Δεξιά η Auguste Deter πρώτη καταγεγραμμένη ασθενής με νόσο Alzheimer.

1.2. Γενικά στοιχεία.

Η άνοια αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες αιτίες θανάτου και αναπηρίας καθώς προκαλεί σταδιακή απώλεια των γνωστικών λειτουργιών και επηρεάζει σημαντικά την καθημερινή ζωή. Πρόσφατες εκτιμήσεις δείχνουν ότι υπάρχουν περίπου 44 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως που ζουν με άνοια, με τον αριθμό αυτό να προβλέπεται να τριπλασιαστεί έως το 2050. Ενώ η συχνότητα της άνοιας φαίνεται να μειώνεται στις δυτικές χώρες, ειδικά στους άνδρες, αναμένεται να αυξηθεί σε χώρες με χαμηλότερο εισόδημα. Αυτό οφείλεται στην αύξηση των καρδιαγγειακών παθήσεων, της υπέρτασης και του διαβήτη τύπου 2 (4). Η νόσος Alzheimer αποτελεί τη συχνότερη αιτία άνοιας, αντιπροσωπεύοντας το 50%-75% των κρουσμάτων, προσβάλλοντας τους μεγαλύτερους σε ηλικία ανθρώπους, με παρατηρούμενο διπλασιασμό στον επιπολασμό της νόσου κάθε 5 χρόνια μετά την ηλικία των 65 ετών (5).

1.3. Νόσος Alzheimer (AD).

Η νόσος Αλτσχάιμερ (AD) αποτελεί μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή, και τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα πρόκλησης άνοιας, έχοντας σημαντικό αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής των ασθενών.

Η AD χαρακτηρίζεται από προοδευτική ανάπτυξη της παθολογίας στα τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και προσβάλλει επιλεκτικά τους νευρώνες σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, ιδίως στο φλοιό, τον ιππόκαμπο, την αμυγδαλή, τον βασικό

αμυγδαλοειδή πυρήνα και τον πρόσθιο θάλαμο. Στις προσβεβλημένες περιοχές του εγκεφάλου, η δυσλειτουργία και ο θάνατος των νευρώνων συνδέονται με κυτταροσκελετικές ανωμαλίες, που οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα συναπτικών πρωτεϊνών στις περιοχές του εγκεφάλου όπου προβάλλουν οι νευρώνες. Αυτά τα παθολογικά χαρακτηριστικά παρουσιάζουν συγκεκριμένα πρότυπα και επηρεάζουν συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, ακόμη και συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Τα πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου επηρεάζονται ιδιαίτερα, ιδίως στις περιοχές CA1 και CA2 (6,7). Η παθολογική εξέλιξη της νόσου ακολουθεί προϋούσα πορεία, αρχικά εντοπίζεται στον ιπποκάμπο ενώ στα τελικά στάδιά της, επεκτείνεται και κατακλύζει ολόκληρο τον εγκέφαλο. Ο ιπποκάμπος αποτελεί μια σύνθετη εγκεφαλική δομή, διακριτή για τη χαρακτηριστική μορφή σχήματος S, ο οποίος βρίσκεται βαθιά εντός του κροταφικού λοβού και αποτελείται από πυκνά συσσωρευμένους νευρώνες (8). Ο ιπποκάμπος διαδραματίζει σημαίνων ρόλο στις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης (9). Παράλληλα, χαρακτηρίζεται ως ιδιαιτέρως ευαίσθητος σε ποικίλα βλαπτικά ερεθίσματα, γεγονός που τον καθιστά ευάλωτο. Επιπλέον, η επιστημονική βιβλιογραφία τεκμηριώνει τη σύνδεση της δυσλειτουργίας του με διάφορες νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές (10). Την τελευταία δεκαετία, η ερευνητική δραστηριότητα έχει επικεντρωθεί τόσο στην αποκάλυψη της παθοφυσιολογίας της νόσου Alzheimer όσο και στην κατανόηση του ρόλου του ιπποκάμπου σε αυτή.

Τα δυο κύρια παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer περιλαμβάνουν **1) εξωκυττάρια εναποθέσεις πλακών β-αμυλοειδούς** και **2) ενδοκυττάρια νευροϊνιδιακά πλέγματα της υπερφωσφορυλιωμένης Ταυ πρωτεΐνης** (6,7,11). Οι βλάβες του κυτταροσκελετού των νευρώνων οδηγούν στον σχηματισμό νευροϊνιδιακών δεματίων (Neurofibrillary Tangles, NFTs), τα οποία έχουν κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου. Ο κυτταροσκελετός αποτελεί ένα δίκτυο ινιδίων ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της κυτταρικής δομής, την ενδοκυττάρια μεταφορά πρωτεϊνών και οργανιδίων, καθώς και για τη μεταφορά τους κατά μήκος του νευράξονα (7). Η δημιουργία των νευροϊνιδιακών δεματίων αποδίδεται σε συσσωρεύσεις δυσδιάλυτων, υπερφωσφορυλιωμένων ισομορφών της πρωτεΐνης ταυ, η οποία, υπό φυσιολογικές συνθήκες, παραμένει διαλυτή και συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού. Τα νευροϊνιδιακά δεμάτια έχουν την ικανότητα, να περιτυλίσσονται το ένα γύρω από το άλλο προς σχηματισμό ζευγών ελικοειδών νημάτων (paired helical filament, PHF) και να συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα, στους άξονες και στους δενδρίτες των νευρικών κυττάρων (6,7). Οι αλλοιώσεις του κυτταροσκελετού που προκαλούνται κατά την διαδικασία αυτή, διαταράσσουν τη φυσιολογική μεταφορά κατά μήκος του νευράξονα, οδηγώντας σε δυσλειτουργία των

συναπτικών διεργασιών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιβίωση των νευρώνων. Τα κύτταρα οδηγούνται στο θάνατο και τα νευροϊνδιακά δεμάτια του εξωκυττάριου χώρου, συναθροίζονται εντός των νευρώνων (7,12). Στον εγκέφαλο ασθενών με AD, η υπερφωσφορυλιωμένη tau πρωτεΐνη αποτελεί το κύριο συστατικό των παθολογικών αυτών δομών (7).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των εγκεφαλικών περιοχών που επηρεάζονται από τη νόσο είναι ο σχηματισμός νευριτικών ή γεροντικών πλακών (Senile Plaques, SP). Οι πλάκες αυτές είναι εξωκυττάριες εναποθέσεις β-αμυλοειδούς (Αβ), οι οποίες περιβάλλονται από τους παθολογικούς νευράξονες, καθώς και από αποφυάδες αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων (6,7). Η διαδικασία παθογένεσης των νευριτικών πλακών πυροδοτείται από την λανθασμένη πρωτεολυτική διάσπαση της πρόδρομης αμυλοειδικής πρωτεΐνης (amyloid precursor protein, APP), μιας αναπόσπαστης κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης, μέσω της δράσης των ενζύμων β- και γ-σεκρετάσης. Τα ένζυμα αυτά διασπούν την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς σε διάφορα θραύσματα αμινοξέων: 43, 45, 46, 48, 49 και 51, τα οποία καταλήγουν στις ιδιαίτερα τοξικές τελικές μορφές Αβ40 και Αβ42 (6,7). Υπάρχουν διάφοροι τύποι μονομερών του Αβ, συμπεριλαμβανομένων μεγάλων, αδιάλυτων αμυλοειδικών ινών τα οποία μπορούν να συσσωρευτούν για να σχηματίσουν τις πλάκες β αμυλοειδούς και διαλυτών ολιγομερών που μπορούν να εξαπλωθούν σε όλο τον εγκέφαλο. Το Αβ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νευροτοξικότητα και τη νευρική λειτουργία, επομένως, η συσσώρευση πυκνότερων πλακών στον υπόκαμπο, την αμυγδαλή και τον εγκεφαλικό φλοιό μπορεί να προκαλέσει τη διέγερση των αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων, βλάβη στους άξονες αλλά και στους δενδρίτες, συναπτική δυσλειτουργία, καθώς και γνωστικές διαταραχές (6,7).

1.4. Αιτιολογία της νόσου Alzheimer.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να ταξινομηθεί η AD σε δύο κύριους τύπους: την κληρονομική ή οικογενή AD και τη σποραδική AD. Στην κληρονομική ή οικογενή AD, εμφανίζονται μεταλλάξεις σε τρία βασικά γονίδια:

- i. το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (APP),
- ii. το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρεσενιλίνη 1 (PSEN1) και
- iii. το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρεσενιλίνη 2 (PSEN2).

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά, προκαλούν την σπάνια (<0,5%) κληρονομική ή οικογενή μορφή της AD (fAD) και τα κλινικά συμπτώματα λαμβάνουν χώρα νωρίτερα από τη σποραδική μορφή της νόσου, σε ηλικία συνήθως μεταξύ των 30 και 50 ετών (12).

Η σποραδική μορφή της νόσου, πιθανώς να οφείλεται στις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδογενών και εξωγενών παραγόντων δηλαδή γενετικών και περιβαλλοντικών.. Περίπου το 70% του κινδύνου εμφάνισης της νόσου αποδίδεται σε γενετικούς παράγοντες. Σημαντικός για την σποραδική μορφή της AD φαίνεται να είναι ο ρόλος του γονιδίου APOE, το οποίο φέρει τρεις παραλλαγές, τις: ε2, ε3 και ε4. Φαίνεται ότι σε ομοζυγωτία για την παραλλαγή ε4 παρουσιάζεται τριπλάσια πιθανότητα διάγνωσης της σποραδικής μορφή της AD από ότι οι μη φορείς του γονιδίου ε4 (13).

Επιπλέον, βασικό ρόλο στην παθογένεση της AD διαδραματίζουν οι φλεγμονώδεις διεργασίες, οι διαταραχές μεταβολισμού της χοληστερόλης και η δυσλειτουργία στις οδούς ανακύκλωσης των ενδοσωμικών κυστιδίων. Κάθε ένα από αυτά τα σχετικά κοινά γονίδια κινδύνου προσδίδουν το καθένα μόνο έναν αμελητέο κίνδυνο, όταν όμως συνδυάζονται μπορούν να οδηγήσουν μέχρι και σε διπλασιασμό της πιθανότητας ανάπτυξης της σποραδικής μορφής της AD (14).

Οι κυρίαρχες υποθέσεις της ανάπτυξης της AD περιγράφονται παρακάτω.

1.4.1. Η αμυλοειδική υπόθεση.

Το πεπτίδιο του β-αμυλοειδούς (Αβ), προσδιορίστηκε για πρώτη φορά από τα αιμοφόρα αγγεία των μηνίγγων ασθενών με AD καθώς και ατόμων με σύνδρομο Down.(15) Το ίδιο πεπτίδιο ένα χρόνο αναγνωρίστηκε ως το πρωταρχικό συστατικό των νευριτικών (γεροντικών) πλακών του εγκεφαλικού ιστού σε ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από AD (16). Η επακόλουθη κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρόδρομη αμυλοειδική πρωτεΐνη (APP) αλλά και ο εντοπισμός της στο χρωμόσωμα 21, συνδυαστικά με την προγενέστερη αναγνώριση ότι η τρισωμία 21 (σύνδρομο Down) οδηγεί στη νευροπαθολογία της AD, έθεσαν το θεμέλιο λίθο για την πρόταση ότι η συσσώρευση Αβ είναι το πρωταρχικό γεγονός στην παθογένεση της AD. Επιπλέον, η ταυτοποίηση των μεταλλαγών του γονιδίου APP και οι οποίες προκαλούν κληρονομική εγκεφαλική αιμορραγία με αμυλοείδωση (Dutch type), κατέδειξε ότι οι μεταλλάξεις αυτές του APP έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν εναπόθεση του β- αμυλοειδούς σε μεγάλο βαθμό και εκτός του εγκεφαλικού παρεγχύματος (17).

Σε σύντομο χρονικό διάστημα, ανακαλύφθηκαν οι πρώτες γενετικές μεταλλάξεις του γονιδίου APP που προκαλούν την AD. Ταυτόχρονα ανακαλύφθηκε ότι το Αβ αποτελούσε ένα φυσιολογικό προϊόν του μεταβολισμού της APP καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής και τα επίπεδά του, μπορούσαν να μετρηθούν στο καλλιεργητικό υλικό, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο πλάσμα γεγονός που έδωσε στους επιστήμονες τη δυνατότητα να διαπιστώσουν άμεσα τις

βιοχημικές ανωμαλίες που προκαλούνται από τις μεταλλάξεις της APP. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις συγκεντρώνονται σε θέσεις εντός της APP ή πολύ κοντά σε αυτές, όπου κανονικά διασπώνται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα πρωτεάσες που ονομάζονται α-, β- και γ-σεκρετάσες. Σύμφωνα με αυτό, οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στην παραγωγή Αβ, ευνοώντας την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP, από την β- ή γ-σεκρετάση. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις της APP στο εσωτερικό της αλληλουχίας του Αβ μπορούν να αυξήσουν την συσσωμάτωση του Αβ σε αμυλοειδικά ινίδια. Κατά την τελευταία δεκαετία, η κλωνοποίηση των πρωτεϊνών πρεσενιλίνης (PS) και η απόδειξη ότι οι μεταλλάξεις στις PS1 και PS2 οι οποίες προκαλούν την AD ενισχύουν την επεξεργασία της APP προς σχηματισμό του Αβ, φέρουν την αμυλοειδική υπόθεση στο προσκήνιο πληθώρας ερευνητικών προσπαθειών που αφορούν στην AD (18).

Πέραν της κλωνοποίησης των PS1 και PS2 και την ανακάλυψη ότι μεταβάλλουν τον μεταβολισμό της APP μέσω άμεσης επίδρασης στο πρωτεολυτικό ένζυμο της γ-σεκρετάσης, υπήρξαν τέσσερις εννοιολογικά σημαντικές παρατηρήσεις που υποστηρίζουν σθεναρά την υπόθεση του αμυλοειδούς. Πρώτον, οι μεταλλάξεις που αφορούν στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ταυ προκαλούν σοβαρή εναπόθεση της πρωτεΐνης αυτής σε μορφή νευροϊνιδιακών κόμβων στον εγκέφαλο, αλλά όχι εναπόθεση αμυλοειδούς. Αυτό σημαίνει ότι ακόμη και οι σοβαρότερες συνέπειες της μεταβολής της ταυ -επιθετική δημιουργία νευροϊνιδιακών κόμβων που οδηγούν σε θανατηφόρο νευροεκφυλισμό- δεν αρκούν για να προκαλέσουν τη δημιουργία των πλακών β-αμυλοειδούς οι οποίες είναι χαρακτηριστικές της AD.. Έτσι, οι νευροϊνιδιακοί κόμβοι του αγρίου τύπου ταυ που παρατηρούνται στους εγκεφάλους ασθενών με AD είναι πιθανό να έχουν σχηματιστεί και εναποτεθεί μετά τις αλλαγές στον μεταβολισμό του Αβ και τον αρχικό σχηματισμό πλακών, παρά προγενέστερα. Δεύτερον, διαγονιδιακοί μύες, οι οποίοι υπερεκφράζουν και τα δύο μεταλλάγματα της ανθρώπινης APP αλλά και το μετάλλαγμα για την ανθρώπινη ταυ υφίστανται αυξημένο σχηματισμό ταυ-θετικών νευροϊνιδιακών κόμβων (σε σύγκριση με μύες που υπερεκφράζουν μόνο ταυ), ενώ η δομή και ο αριθμός των αμυλοειδικών πλακών τους παραμένουν πρακτικά αμετάβλητα. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι η τροποποιημένη επεξεργασία της APP λαμβάνει χώρα πριν από τις μεταβολές της ταυ στον παθογενετικό καταρράκτη της AD. Κατά συνέπεια η τοξικότητα του Αβ εξαρτάται από την ταυ. Τρίτον, η διασταύρωση διαγονιδιακών πειραματικών μοντέλων (μύες) APP με πειραματόζωα τα οποία εμφανίζουν ανεπάρκεια της απολιποπρωτεΐνης E (apoE) μειώνει σε σημαντικό βαθμό την εγκεφαλική εναπόθεση του Αβ στους απογόνους, παρέχοντας ισχυρές ενδείξεις ότι ο παθογενετικός ρόλος της γενετικής ποικιλομορφίας στον γενετικό τόπο apoE είναι πολύ πιθανό να περιλαμβάνει το μεταβολισμό του Αβ (39). Τέλος, ολοένα και περισσότερα στοιχεία

δείχνουν ότι η γενετική παραλλακτικότητα στον καταβολισμό και την κάθαρση του Αβ μπορεί να συμβάλλει στον κίνδυνο εμφάνισης της AD. Συνολικά, τα τέσσερα αυτά ευρήματα επιβεβαιώνουν την άποψη ότι η συσσώρευση της πρωτεΐνης Αβ στον εγκέφαλο είναι η πρωταρχική επιρροή στη ανάπτυξη της AD και ότι η υπόλοιπη πορεία της νόσου, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού των νευριϊνδιακών κόμβων *tau*, προκύπτει από την ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της κάθαρσης του Αβ (19).

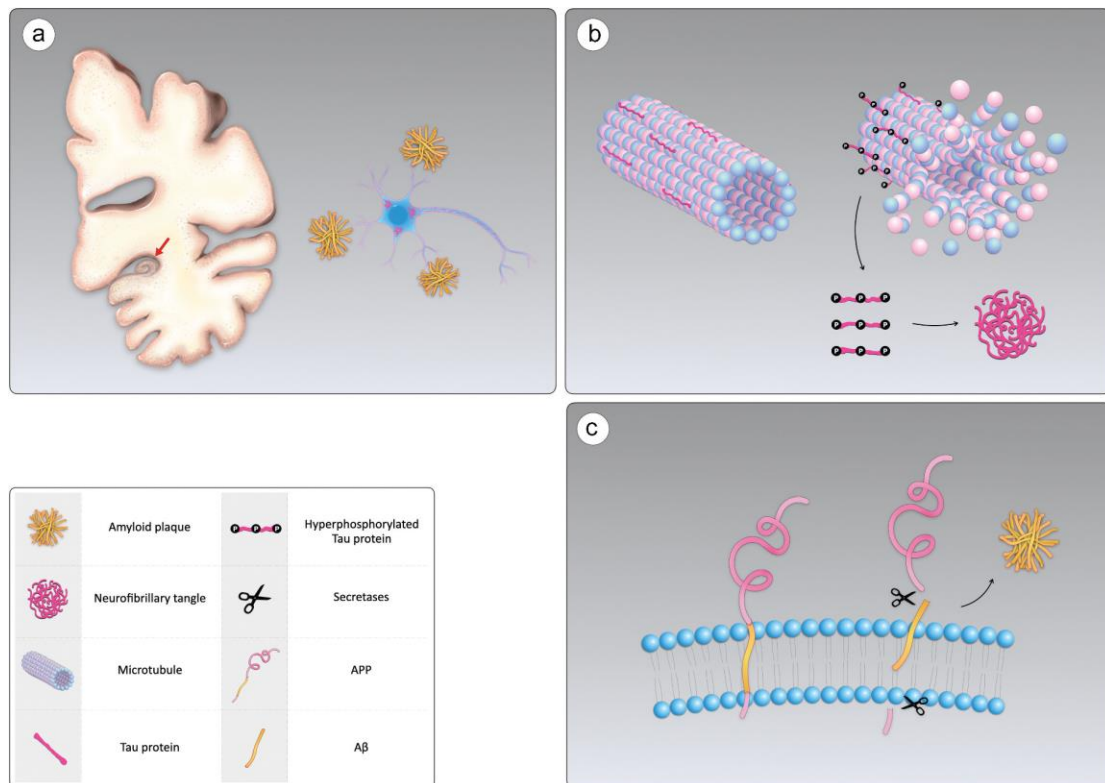
Παρά το γεγονός ότι η αμυλοειδική υπόθεση προσφέρει ένα ευρύ πλαίσιο για την εξήγηση της παθογένειας της AD, προς το παρόν δεν είναι τόσο λεπτομερής και ορισμένες παρατηρήσεις δεν ταιριάζουν εύκολα με την απλούστερη εκδοχή της υπόθεσης. Η πιο συχνά διατυπωμένη αντίρρηση είναι ότι ο αριθμός των εναποθέσεων Αβ στον εγκέφαλο δεν συσχετίζεται στενά με τον βαθμό γνωστικής εξασθένησης που βίωσε ο ασθενής κατά τη διάρκεια της ζωής του. Πράγματι, ορισμένοι άνθρωποι χωρίς συμπτώματα AD έχουν πολλές εναποθέσεις Αβ στον εγκεφαλικό φλοιό. Ωστόσο, οι τελευταίες είναι σχεδόν αποκλειστικά διάχυτης μορφής πλάκες αμυλοειδούς που δεν σχετίζονται με την νευριτική και γλοιϊκή παθολογία της γύρω περιοχής. Επιπλέον, ο βαθμός της άνοιας που προκαλείται από την AD συσχετίζεται πολύ καλύτερα με το Αβ που προσδιορίζεται βιοχημικά παρά με τον ιστολογικά προσδιοριζόμενο αριθμό των πλακών, ενώ η συγκέντρωση των διαλυτών μορίων Αβ (που δεν είναι ορατά με την ανοσοϊστοχημεία) φαίνεται να συσχετίζεται με την έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών (19).

Σε σημαντικό βαθμό, η αμυλοειδική υπόθεση, παραμένει αμφιλεγόμενη εξαιτίας της έλλειψης ορισμού ενός συγκεκριμένου *in vivo* νευροτοξικού είδους Αβ και της απουσίας προσδιορισμού της φύσης των επιπτώσεών του στη νευρωνική λειτουργία. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν στοιχεία τα οποία υποδεικνύουν ότι τα διαλυτά ολιγομερή του Αβ, αλλά όχι τα μονομερή ή τα αδιάλυτα ινίδια αμυλοειδούς, μπορεί να ευθύνονται για τη συναπτική δυσλειτουργία που παρατηρείται στους εγκεφάλους ασθενών με AD αλλά και σε πειραματικά μοντέλα AD. Τα μεταβλητά ενδιάμεσα προϊόντα κατά τη δημιουργία των ινιδίων από το συνθετικό Αβ -γνωστά και ως AD diffusible ligands (ADDLs) ή πρωτοϊνίδια- προκαλούν ανεπαίσθητη βλάβη στους νευρώνες. Το γεγονός ότι τέτοιες προϊνδιακές συσσωρεύσεις ενδέχεται να είναι νευροτοξικές *in vivo* φαίνεται εύλογο, καθώς υπάρχουν συναπτικές, ηλεκτροφυσιολογικές και συμπεριφορικές αλλαγές σε νεαρά διαγονιδιακά ποντίκια APP πριν από το σχηματισμό πλάκας. Ωστόσο, η παρουσία μιγμάτων συσσωρεύσεων Αβ, από μονομερή έως και ώριμα ινίδια, στους εγκεφάλους των μεταλλαγμένων μυών και των ανθρώπων με AD, δυσκολεύει την απόδοση της προκληθείσας συναπτοτοξικότητας στο ένα ή στο άλλο είδος Αβ.

Ένα ακόμη εύρημα είναι ότι τα διαγονιδιακά πειραματικά μοντέλα που υφίστανται προοδευτική εναπόθεση του Αβ συχνά δεν παρουσιάζουν σαφή απώλεια νευρώνων. Οι λόγοι για την αποτυχία των μυών, που εκφράζουν μόνο ένα διαγονίδιο APP, να παρουσιάσουν νευροϊνιδιακή εκφύλιση με ακολουθούμενη νευρωνική απώλεια, δεν είναι ακόμη αποσαφηνιστεί, αλλά υπάρχουν αρκετές πιθανές εξηγήσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τις διαφορές των στελεχών των πειραματοζώων στη ευπάθεια των νευρώνων, την απουσία ανθρώπινων μορίων tau σε αυτούς τους μύες, την έλλειψη όλων των ανθρώπινου τύπου φλεγμονωδών παραγόντων (για παράδειγμα, ορισμένων κυτταροκινών) και την σχετικά μικρή διάρκεια έκθεσης στο Αβ.

Η νευροϊνιδιακή εκφύλιση των κυτταρικών σωμάτων και των νευραξόνων τους αυξάνεται προϋούσης της ηλικίας στον άνθρωπο και ότι οι αλλαγές αυτές προηγούνται των μορφολογικά ανιχνεύσιμων αμυλοειδών πλακών. Ωστόσο, τα αρχικά περιστατικά που εξετάστηκαν σε νεκροτομικό υλικό, (περιστατικά στα οποία βασίστηκε ο ορισμός της νευροπαθολογίας Braak Stage I) ήταν στην πραγματικότητα μη- ανοϊκά ηλικιωμένα άτομα και είναι αδύνατο να γνωρίζουμε αν οι νευροϊνιδιακές αλλαγές που εμφάνιζαν αντιπροσώπευαν τον πρόδρομο της AD. Πράγματι, πρόσφατες αναλύσεις υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός νευροϊνιδιακών αλλοιώσεων κατά την μέση ηλικία μπορεί συχνά να αντιπροσωπεύει μια διαδικασία ξεχωριστή από εκείνη της AD. Επιπλέον, μελέτες ασθενών με σύνδρομο Down, που απεβίωσαν σε διάφορες ηλικίες, καταδεικνύουν ότι η εναπόθεση Αβ προοικονομεί τον σχηματισμό νευροϊνιδιακών συσσωματωμάτων στη διαταραχή αυτή.

Συνοψίζοντας, καμία από τις αδυναμίες που θεωρούνται σήμερα ως αδυναμίες της αμυλοειδικής υπόθεσης δεν παρέχει έναν σοβαρό λόγο ώστε να εγκαταλείψουμε την ιδέα αυτή, αν και όλες μαζί σίγουρα υποδεικνύουν σημαντικά κενά στην κατανόηση της νόσου (20).



Εικόνα 2: Παθοφυσιολογία της νόσου του Alzheimer. α) Διαγραμματική απεικόνιση μιας μετωπιαίας τομής του δεξιού ημισφαίριου του εγκεφάλου στην AD, με εκτεταμένη συσσώρευση αμυλοειδικών πλακών στον υποκάμπειο σχηματισμό (βέλος) και στον νεοφλοιό. Η ενδοκυττάρια συσσώρευση νευροϊνιδιακών δεσμών στους νευρώνες και η εξωκυττάρια εναπόθεση αμυλοειδών πλακών είναι τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου. β) Η πρωτεΐνη Ταυ, ένα συστατικό δέσμευσης μικροσωληνίσκων, προάγει τον πολυμερισμό και τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων. Στην AD, η υπερφωσφορυλίωση της Ταυ έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της Ταυ από τους μικροσωληνίσκους, οδηγώντας στο σχηματισμό νευροϊνιδιακών δεσμών. γ) Η αμυλοειδογενετική οδός οδηγεί στη διάσπαση της APP από τη β-σεκρετάση και το σύμπλοκο γ-σεκρετάσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία Αβ και το σχηματισμό αμυλοειδών πλακών. AD Νόσος Alzheimer, APP: πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς, Αβ: αμυλοειδές-β. (Katsenos, 2022)

1.4.2. Η υπόθεση των πολλαπλών μεταβολών στην νευροδιαβίβαση.

Πριν από χρόνια, σε ασθενείς με AD, παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης στο εγκεφαλικό φλοιό, καθώς και πολυάριθμες μεταβολές στους νευροδιαβιβαστές και στα συνθετικά τους ένζυμα συμπεριλαμβανομένης και της μορφολογίας των νευρώνων, που παράγουν αυτούς τους νευροδιαβιβαστές. Αυτές οι αλλαγές έχουν τεκμηριωθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες για ανάπτυξη της AD. Μολονότι τα χαμηλά επίπεδα της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης του ιππόκαμπου και του φλοιού,

καθώς και η συρρίκνωση και απώλεια προβλητικών χολινεργικών νευρώνων στον βασικό πρόσθιο εγκέφαλο διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην προοδευτική έκπτωση της μνήμης, υπάρχουν και άλλοι οι προβλητικοί νευρώνες που παράγουν άλλους νευροδιαβιβαστές μονοαμινών (νορεπινεφρίνη, σεροτονίνη και ντοπαμίνη) και νευρώνες του φλοιού που παράγουν γλουταμικό, GABA, σωματοστατίνη, νευροπεπτίδιο Υ, απελευθερωτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης κλπ και επηρεάζονται στην AD. Ως αποτέλεσμα, οι προσπάθειες βελτίωσης των αμνησιακών και γνωσιακών συμπτωμάτων των ασθενών με θεραπείες μόνο με χολινεργικά φάρμακα έφεραν μικρή επιτυχία. Στην πραγματικότητα, κάθε μεμονωμένη νευριτική πλάκα (που φέρει Αβ) στον φλοιό στο πλαίσιο της AD μπορεί να περιέχει εκφυλισμένους νευράξονες με διαφορετικές νευροδιαβιβαστικές ιδιαιτερότητες. Επιπλέον, ο φαινότυπος των νευριτών που σχετίζονται με τις πλάκες σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου τείνει να αντανakλά τη φυσιολογική κατανομή των κυτταρικών σωμάτων και των αξόνων που εκφράζουν τον νευροδιαβιβαστή. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η διαδικασία παραγωγής νευριτικών πλακών πιθανόν να περιλαμβάνει ίνες εσωτερικών και προβλητικών νευρώνων με έναν μη ειδικό τρόπο κατανομής, παρά το γεγονός ότι πολλοί νευρώνες παραμένουν ανεπηρέαστοι. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η AD δεν ακολουθεί το μοντέλο της νόσου του Parkinson, κατά την οποία τα κλινικά σημεία είναι απόρροια ενός μόνο ελλειμματικού νευροδιαβιβαστικού συστήματος. Κατανοούμε, συνεπώς, ότι είναι αδύνατον να οδηγηθούμε σε θεραπεία της AD μόνο με θεραπευτικές προσεγγίσεις που υποκαθιστούν έναν μόνο νευροδιαβιβαστή (21).

Η κατανόηση ότι πολλές λειτουργικές και μορφολογικές ιδιότητες των νευρώνων μεταβάλλονται κατά την AD οδήγησε στην ανάγκη να εμβαθύνουμε στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που υποκινούν τις πρώιμες νευρωνικές δυσλειτουργίες και τον νευρωνικό θάνατο στην AD. Πολλοί ερευνητές επέλεξαν να προσεγγίσουν το πρόβλημα μελετώντας τη δημιουργία των κλασσικών νευροπαθολογικών αλλοιώσεων που συμβαίνουν σε έναν μεγάλο αριθμό περιοχών του εγκεφάλου. Παρόλο που, η χρησιμότητα της μελέτης των αλλοιώσεων που συμβαίνουν στους ιστούς, ως μέθοδος για την διαλεύκανση της παθογένειας και του καθορισμού της θεραπείας, συχνά επικρίνεται, πληθώρα ανακαλύψεων τονίζουν την δυναμική αυτού του τρόπου προσέγγισης για την διαλεύκανση των πρώιμων μηχανισμών ανάπτυξης της AD (22).

Ο κεντρικός ρόλος που διαδραματίζει το γλουταμικό, το οποίο αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ, στη μνήμη και τη μάθηση, έχει οδηγήσει την έρευνα στην διαλεύκανση πιθανών διαταραχών της γλουταμεργικής διαβίβασης στην AD. Οι ποικίλες συναπτικές δράσεις του γλουταμικού ασκούνται στα κύτταρα-στόχους μέσω ενός τύπου

υποδοχέων, που διακρίνονται στους ιονοτρόπους υποδοχείς (iGluR) και τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς (mGluR), στους οποίους το γλουταμικό επηρεάζει τους ενδοκυττάριους δευτερογενείς αγγελιοφόρους. Η AD χαρακτηρίζεται από ελλείμματα κατά τη γλουταμεργική διαβίβαση, καθώς παρατηρείται κυρίαρχη έλλειψη των αντίστοιχων πυραμιδικών νευρώνων. Αυτό οδηγεί σε ελάττωση των υποδοχέων AMPA και των υποδοχέων NMDA στην AD. Τέλος, έχει γίνει φανερό ότι μεταβοτροπικοί υποδοχείς γλουταμικού των νευρικών κυττάρων και της έλλειψης γλουταμεργικής διαβίβασης συμβάλλουν στην δυσλειτουργία των νευρώνων και την εκφύλισή τους που παρατηρούνται στην AD (22).

1.4.3. Η υπόθεση του οξειδωτικού στρες.

Αρκετά πειραματικά δεδομένα έχουν στοιχειοθετήσει αναφορικά με την εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στον παθογενετικό μηχανισμό στην AD. Η έννοια του οξειδωτικού στρες αναφέρεται σε μια κατάσταση κατά την οποία η παραγωγή των οξειδωτικών μορίων ξεπερνά τις ενδογενείς αντιοξειδωτικές ικανότητες του κυττάρου, οδηγώντας σε οξειδωτική βλάβη των ιστών. Σε μια τέτοια κατάσταση μπορεί να οδηγηθεί ο οργανισμός είτε με αυξημένη παραγωγή κυτταρικών οξειδωτικών ή/και με μειωμένες συγκεντρώσεις κυτταρικών αντιοξειδωτικών, όπως η γλουταθειόνη, η βιταμίνη E, το ασκορβικό οξύ, το σύστημα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η καταλάση. Η υπερπαραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου, όπως το υπεροξείδιο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το οξείδιο του, είναι εμφανής στην AD και θεωρείται ότι διαμεσολαβεί την κυτταρική βλάβη καθώς και το σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης.

Οι νευρώνες του ιππόκαμπου και του φλοιού επίμυων και ανθρώπου σε καλλιέργειες παρουσιάζουν ευαισθησία στα συσσωρευμένα ινίδια Αβ και η τοξικότητα αυτή μπορεί να προληφθεί μέσω των αντιοξειδωτικών. Το Αβ επάγει το σχηματισμό ασυνήθιστα υψηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου και αζωτούχων αντιδραστικών μορίων αλλά και την εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών που παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην καταστροφή και τη θανάτωση των νευρώνων. Στον εγκεφαλικό ιστό ασθενών με AD, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα δεικτών του οξειδωτικού στρες, συμπεριλαμβανομένων των οξειδωμένων πρωτεϊνών, των λιπιδίων της μεμβράνης, του DNA και της ανοσοαντιδραστικότητας της νιτροτυροσίνης. Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά, συμπεριλαμβανομένης της βιταμίνης E, της ιδεβενόνης, του ουρικού οξέος και της γλουταθειόνης, φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση έναντι της νευροτοξικότητας που προκαλεί το Αβ *in vitro*. Ορισμένες από αυτές τις ενώσεις έδειξαν επίσης ευεργετικά αποτελέσματα σε ασθενείς με AD, επιβραδύνοντας την εξέλιξη της νόσου.

Οι βιοχημικές οδοί, μέσω των οποίων το Αβ προκαλεί άμεση νευροτοξικότητα, περιλαμβάνουν την εξαρτώμενη από το Αβ παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου, ριζών υπεροξυλίου και υπεροξειδίου που με τη σειρά τους μπορεί να ξεκινήσουν έναν καταρράκτη δευτερογενών αντιδράσεων μεταξύ ριζών και άλλων βιομορίων. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν μαζική είσοδο ασβεστίου στα νευρικά κύτταρα. Για παράδειγμα, παρουσία μετάλλων όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος ή ο σίδηρος που υπάρχουν στις νευρικές πλάκες και μπορεί να διευκολύνουν την επιδείνωση, το υπεροξείδιο του υδρογόνου θα παράγει το ισχυρό οξειδωτικό και την ρίζα υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να σχηματιστούν μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα για τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (RAGE) ή των υποδοχέων τύπου 2-scavenger, οι οποίοι ανταποκρίνονται στη δέσμευση του Αβ διεγείροντας την ενεργοποίηση των οξειδασών NADH. Αν και τα νιτριδινεργικά μόρια, όπως το μονοξείδιο του αζώτου, υπερπαραγονται και μπορούν να συμβάλλουν στην παθογένεια της AD, είναι πιθανό ότι η παραγωγή τους εξαρτάται από την ενεργοποίηση δευτερογενών φλεγμονωδών μηχανισμών που περιλαμβάνουν τη δράση των ενεργοποιημένων γλοιακών κυττάρων, τα οποία μπορεί να αποτελούν σημαντική πηγή NO. Μια άλλη πτυχή που πρέπει να εξεταστεί, είναι η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στα εγκεφαλικά κύτταρα που προέρχεται από το μεταβολισμό του σιδήρου, το οποίο μπορεί να είναι υπεύθυνο για τη μεταβολή των μηχανισμών μεταγωγής σήματος στα νευρικά κύτταρα και την επαγωγή της νευροεκφύλισης (23).

1.5. Οι αρχές λειτουργίας των νευρώνων.

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των νευρώνων διαφέρει από εκείνες άλλων κυττάρων ως προς τη φύση, την πυκνότητα και την κατανομή των πρωτεϊνών από τις οποίες αποτελείται. Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που ονομάζονται ιοντικοί δίαυλοι, επιτρέπουν την παθητική κίνηση των ιόντων κατά μήκος των μεμβρανών και κατ' επέκτασιν τη διάδοση ηλεκτρικών σημάτων στο νευρικό σύστημα. Τα ιόντα Na^+ , K^+ , Ca^{2+} και Cl^- φαίνεται να είναι υπεύθυνα για τη νευρωνική δράση και επικοινωνία.

Ανεξάρτητα από το είδος του οργανισμού, τα ιόντα καλίου (K^+) είναι τα κυρίαρχα κατιόντα του ενδοκυττάριου υγρού και τα ιόντα νατρίου (Na^+) είναι τα κυρίαρχα κατιόντα του εξωκυττάριου υγρού. Τα κύρια ανιόντα του ενδοκυττάριου υγρού αποτελούν οργανικά μόρια, όπως, για παράδειγμα, τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (γλουταμικό και

ασπαρτικό), πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, φωσφορικά άλατα. Αντίστοιχα, στο εξωκυττάριο υγρό τα κυρίαρχα ανιόντα είναι ιόντα χλωρίου (Cl^-).

Παρατηρείται επίσης μια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων ενδοκυττάριου και εξωκυττάριου Ca^{2+} . Τα ιόντα Ca^{2+} είναι παρόντα στο κυτταρόπλασμα ως «ελεύθερα» ιόντα Ca^{2+} σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (10^{-8} έως 10^{-7} M) και ως δεσμευμένα ιόντα Ca^{2+} (συνδεδεμένα με πρωτεΐνες που δεσμεύουν Ca^{2+}). Τα ιόντα Ca^{2+} κατανέμονται επίσης σε οργανίδια ικανά να δεσμεύουν το ασβέστιο, τα οποία περιλαμβάνουν το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, όπου αποτελούν τις ενδοκυτταρικές αποθήκες Ca^{2+} . Τα ελεύθερα ενδοκυτταρικά ιόντα Ca^{2+} που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι και μετατρέπουν την ηλεκτρική δραστηριότητα στους νευρώνες σε βιοχημικά συμβάντα, όπως η εξωκυττάρωση. Τα ιόντα Ca^{2+} που είναι συνδεδεμένα με πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος ή υπάρχουν σε αποθήκες οργανιδίων δεν είναι ενεργά ιόντα Ca^{2+} . Μόνο τα «ελεύθερα» ιόντα Ca^{2+} έχουν ρόλο στις όποιες λειτουργίες. Παρά την άνιση κατανομή των ιόντων στην πλασματική μεμβράνη, τα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια μέσα είναι ουδέτερα ιοντικά διαλύματα, λόγω του ότι ανιόντα, όπως το HCO_3^- , το PO_4^{2-} , τα αμινοξέα και τα νουκλεϊκά οξέα, δεν διαπερνούν την κυτταροπλασματική μεμβράνη (24).

Η διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ δύο διαμερισμάτων ονομάζεται βαθμίδωση συγκέντρωσης. Οι μετρήσεις των συγκεντρώσεων Na^+ , K^+ , Ca^{2+} και Cl^- , έδειξαν ότι οι βαθμιδώσεις συγκέντρωσης για τα ιόντα είναι σταθερές στο ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο υγρό. Αυτό έχει δοκιμαστεί πειραματικά με μέτρηση των ιοντικών ροών. Όταν οι πρωτεΐνες απουσιάζουν από μια συνθετική διπλοστιβάδα λιπιδίων, δεν εμφανίζονται κινήσεις ιόντων σε αυτήν την καθαρά λιπιδική μεμβράνη. Λόγω της κεντρικής υδρόφοβης περιοχής της, η διπλοστιβάδα λιπιδίων έχει χαμηλή διαπερατότητα σε υδρόφιλες ουσίες όπως ιόντα, νερό και πολικά μόρια. Εν ολίγοις, η λιπιδιακή διπλοστιβάδα είναι ένα εμπόδιο για τη διάχυση των ιόντων και των περισσότερων πολικών μορίων. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες εκτείνονται σε όλο το πλάτος της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Έχουν υδρόφοβες περιοχές περιέχουν πολλά μη πολικά αμινοξέα και υδρόφιλες περιοχές που περιέχουν πολλά πολικών αμινοξέων. Ορισμένες υδρόφοβες περιοχές οργανώνονται μέσα στη διπλοστιβάδα ως διαμεμβρανικές α-έλικες, ενώ οι πιο υδρόφιλες περιοχές έρχονται σε επαφή με το υδατικό ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο υγρό (25,26).

Οι ιοντικοί δίαυλοι έχουν τρισδιάστατη δομή που οριοθετεί έναν υδατικό πόρο από τον οποίο μπορούν να περάσουν ορισμένα ιόντα. Κάθε δίαυλος μπορεί να βρίσκεται σε τουλάχιστον δύο διαφορετικές καταστάσεις: κλειστός και ανοιχτός. Η μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή κατάσταση, ελέγχεται αυστηρά από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά:

- 1) Την αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης.
- 2) Η δέσμευση ενός εξωκυττάριου συνδέτη, όπως ένας νευροδιαβιβαστής και ονομάζονται, επίσης, δίαυλοι υποδοχέα ή ιοντοτρόποι υποδοχείς.
- 3) Τη δέσμευση ενός ενδοκυτταρικού συνδέτη, όπως τα ιόντα Ca^{2+} .
- 4) Μηχανικά ερεθίσματα, όπου αυτοί οι υποδοχείς ονομάζονται μηχανοϋποδοχείς.

Η απόκριση του διαύλου στα συγκεκριμένα ερεθίσματά του (gating) είναι ένα απλό άνοιγμα ή κλείσιμο του πόρου. Ο πόρος έχει τη σημαντική ιδιότητα της επιλεκτικής διαπερατότητας, επιτρέποντας σε κάποια μερικά μικρά ιόντα να ρέουν παθητικά σύμφωνα με τις ηλεκτροχημικές βαθμιδώσεις τους, δίνοντας σήματα στο νευρικό σύστημα (25).

1.5.1. Το δυναμικό μεμβράνης.

Εάν μια γυάλινη πιπέτα με λεπτή σπή (συνήθως ονομάζεται μικρο-ηλεκτρόδιο), συνδεδεμένη με έναν ενισχυτή σε σύστημα καταγραφής, όπως ένας παλμογράφος, διαπεράσει την μεμβράνη ενός ζωντανού νευρικού κυττάρου και φτάσει στο κυτταρόπλασμα, τότε μπορεί να καταγράψει τη διαφορά δυναμικού μεταξύ του κυτταροπλάσματος και το εξωκυττάριου υγρού. Στην πραγματικότητα, το εσωτερικό διαμέρισμα του κυττάρου φαίνεται να φέρει πιο αρνητικό δυναμικό σε σχέση με το εξωτερικό, το οποίο και λαμβάνεται ως μηδενικό δυναμικό (ηλεκτρόδιο αναφοράς). Το δυναμικό της μεμβράνης (V_m) είναι η διαφορά μεταξύ του δυναμικού του εσωτερικού του κυττάρου και του εξωκυττάριου υγρού ($V_m = V_i - V_o$). Αυτό το αρνητικό δυναμικό ονομάζεται δυναμικό ηρεμίας μεμβράνης (V_{rest}).

Στο ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο υγρό, η συγκέντρωση των θετικών είναι ίση με αυτή των αρνητικών ιόντων. Ωστόσο, υπάρχει μια πολύ μικρή περίσσεια θετικών και αρνητικών ιόντων που συσσωρεύονται σε κάθε πλευρά της μεμβράνης. Σε κατάσταση ηρεμίας, μια μικρή περίσσεια αρνητικών ιόντων συσσωρεύεται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης, ενώ μια μικρή περίσσεια θετικών ιόντων συσσωρεύεται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Αυτό δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο φύλλων της μεμβράνης: η εξωτερική πλευρά είναι πιο θετικό σε σχέση με την εσωτερική, γεγονός που καθιστά το $V_m = V_i - V_o$, αρνητικό. Αυτό που είναι ιδιαίτερο στη μεμβράνη των νευρώνων (και όλων των διεγέρσιμων κυττάρων) είναι ότι το V_m ποικίλλει. Μπορεί να είναι περισσότερο αρνητικό ή υπερπολωμένο ή λιγότερο αρνητικό (εκπολωμένο) ή ακόμα και θετικό (επίσης, εκπολωμένο). Σε κατάσταση ηρεμίας, το V_m είναι στο εύρος -80 έως -50mV ανάλογα με τον νευρώνα. Αλλά όταν οι νευρώνες είναι ενεργοί, το V_m ποικίλλει μεταξύ των ακραίων τιμών -90mV και +30 mV (27).

1.5.2. Η ηλεκτροχημική κλίση και η παθητική μεταφορά ιόντων.

Για να μπορέσει να προβλέψει κανείς την κατεύθυνση της παθητικής διάχυσης του ιόντων διαμέσω ενός ανοιχτού διαύλου, τόσο η βαθμίδωση συγκέντρωσης του ιόντος όσο και το δυναμικό της μεμβράνης πρέπει να είναι γνωστά. Το αποτέλεσμα αυτών των δύο δυνάμεων ονομάζεται ηλεκτροχημική κλίση. Η βαθμίδωση συγκέντρωσης ενός συγκεκριμένου ιόντος είναι η διαφορά συγκέντρωσης του ιόντος αυτού μεταξύ των δύο πλευρών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα ιόντα κινούνται παθητικά μέσω ανοιχτών διαύλων από το μέσο με υψηλότερη συγκέντρωση προς το μέσο με χαμηλότερη συγκέντρωση. Για παράδειγμα όταν το δυναμικό της μεμβράνης είναι μηδενικό ($V_m \sim 0mV$), δεν υπάρχει διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο όψεων της μεμβράνης, επομένως τα ιόντα θα διαχέονται σύμφωνα με τη βαθμίδα συγκέντρωσής τους μόνο. Δεδομένου ότι οι εξωκυττάρειες συγκεντρώσεις Na^+ , Ca^{2+} και Cl^- είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες ενδοκυττάρειες, αυτά τα ιόντα θα διαχέονται παθητικά προς το ενδοκυττάριο μέσο αποτέλεσμα της κλίσης συγκέντρωσής τους (όταν οι διάλυτοι Na^+ , Ca^{2+} και Cl^- είναι ανοιχτοί). Αντίθετα, το K^+ θα μετακινηθεί από το ενδοκυττάριο υγρό στο εξωκυττάριο (όταν είναι ανοιχτοί οι διαπερατοί διάλυτοι K^+). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τόσο η βαθμίδωση της συγκέντρωσης όσο και το δυναμικό της μεμβράνης καθορίζουν την κατεύθυνση διάχυσης των ιόντων μέσω ενός ανοιχτού διαύλου. Δεδομένου ότι η βαθμίδωση της συγκέντρωσης είναι σταθερή για κάθε ιόν, η κατεύθυνση και το μέγεθος της διάχυσης ποικίλλει ανάλογα με το δυναμικό της μεμβράνης. Το αποτέλεσμα αυτών των δύο δυνάμεων, της συγκέντρωσης και των διαβαθμίσεων δυναμικού, είναι η ηλεκτροχημική κλίση.

Η τιμή του δυναμικού της μεμβράνης όπου η δύναμη της συγκέντρωσης που τείνει να κινήσει ένα συγκεκριμένο ιόν προς μία κατεύθυνση εξισορροπείται ακριβώς από την ηλεκτρική δύναμη που τείνει να κινήσει το ίδιο ιόν προς την αντίστροφη κατεύθυνση αποτελεί το «δυναμικό ισορροπίας» του ιόντος (E_{ion}) ή το δυναμικό αντιστροφής του ιόντος (E_{rev}). Το E_{ion} μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας την εξίσωση Nernst:

$$E_{ion} = (RT/zF) \ln ([ion]_e/[ion]_i)$$

όπου R είναι η σταθερά ενός ιδανικού αερίου ($8.314 \text{ VCK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T είναι η απόλυτη θερμοκρασία σε Κέλβιν ($273,16 + \text{η θερμοκρασία σε } ^\circ\text{C}$), F είναι η σταθερά Faraday ($96500C \text{ mol}^{-1}$), z είναι το ιοντικό σθένος και $[ion]$ είναι η συγκέντρωση του ιόντος στον εξωκυττάριο (e) ή στο ενδοκυττάριο (i) χώρο. Αυτό δίνει: $E_{ion} = (58/z) \log_{10} ([ion]_e/[ion]_i)$. Από την ανωτέρω εξίσωση και τις συγκεντρώσεις του πίνακα 2.1, μπορούν να υπολογιστούν τα δυναμικά ισορροπίας για κάθε ιόν:

$$E_{Na} = (58/1) \log_{10} (140/14) = +58mV.$$

$$E_K = (58/1) \log_{10} (3/160) = -84mV.$$

$$E_{Ca} = (58/1) \log_{10} (1/10^{-4}) = +116mV.$$

$$E_{Cl} = (58/-1) \log_{10} (150/14) = -58mV.$$

Πίνακας 1: Κατανομή των συγκεντρώσεων των κυριότερων ιόντων εκατέρωθεν της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Ιόν	Ενδοκυττάριο υγρό (mM)	Εξωκυττάριο υγρό (mM)
Na⁺	5-20	130-160
K⁺	130-160	4-8
Ca²⁺	50-1000nM	1,2-4
Mg²⁺	10-20	1-5
Cl⁻	1-60	100-140
HCO₃⁻	1-3	20-30

Αυτές οι εξισώσεις έχουν τις ακόλουθες έννοιες. Εάν οι μόνοι διάλυτοι που ανοίγουν σε μια μεμβράνη είναι αυτοί του K⁺, τότε πραγματοποιείται εκροή των ιόντων K⁺, γεγονός που θα οδηγήσει στην υπερπόλωση της μεμβράνης μέχρι εκείνο το σημείο όπου V_m=E_K=-84mV, ένα δυναμικό στο οποίο η καθαρή ροή του K⁺ είναι μηδενική, καθώς τα ιόντα K⁺ έχουν ακριβώς την ίδια τάση να διαχέονται προς το ενδοκυττάριο μέσο ανάλογα με την κλίση συγκέντρωσής τους παρά να κινούνται προς την αντίστροφη κατεύθυνση ανάλογα με το δυναμικό της μεμβράνης. Σε αυτό το δυναμικό, η εκροή του K⁺ θα αντισταθμιστεί ακριβώς από την εισροή του K⁺ και το δυναμικό της μεμβράνης θα παραμείνει σταθερό στο V_m = E_K όσο οι διάλυτοι K⁺ μένουν ανοικτοί. Τώρα, εάν είναι ανοιχτά μόνο οι διάλυτοι Na⁺, το δυναμικό της μεμβράνης θα κινηθεί προς το V_m=+58mV, το δυναμικό στο οποίο η καθαρή ροή του Na⁺ είναι μηδενική. Παρομοίως, όταν V_m=E_{Cl}=-60mV, τα ιόντα Cl⁻ θα έχουν την ίδια τάση να κινούνται σύμφωνα με τη διαφορά της συγκέντρωσης παρά προς την αντίστροφη κατεύθυνση που θα επέβαλε το δυναμικό της μεμβράνης. Έτσι η καθαρή ροή του Cl⁻ είναι μηδενική. Αντίθετα, όταν το V_m είναι διαφορετικό από το E_{Cl}, η καθαρή ροή του Cl⁻ δεν είναι μηδενική. Αυτό ισχύει για όλα τα άλλα ιόντα: όταν το V_m είναι διαφορετικό από το E_{ion}, υπάρχει μια καθαρή ροή αυτού του ιόντος. Μπορούμε να συμπεράνουμε, λοιπόν, ότι όταν V_m= E_{ion}= 0, δεν υπάρχει διάχυση αυτού του συγκεκριμένου ιόντος. Αντίθετα, όταν το V_m είναι διαφορετικό από το E_{ion}, τότε

υπάρχει μια παθητική διάχυση αυτού του ιόντος μέσω ενός ανοιχτού διαύλου. Η διαφορά $V_m - E_{ion}$ ονομάζεται ηλεκτροχημική κλίση και είναι η δύναμη που κάνει το ιόν να κινείται μέσα από έναν ανοιχτό δίαυλο (27).

1.5.3. Η κίνηση των ιόντων διαμέσου των διαύλων.

Για να γνωρίζουμε την κατεύθυνση παθητικής διάχυσης ενός συγκεκριμένου ιόντος και πόσα από αυτά τα ιόντα διαχέονται ανά μονάδα χρόνου, πρέπει να μετρηθούν η κατεύθυνση και η ένταση της καθαρής ροής των ιόντων (αριθμός γραμμομορίων ανά δευτερόλεπτο) μέσω ενός ανοιχτού διαύλου. Η καθαρή ροή (f_{net}) ιόντων δεν είναι εύκολο να μετρηθεί και γι' αυτό το λόγο προτιμάται καλύτερα να υπολογίζεται το ιοντικό ρεύμα.

Η παθητική διάχυση ιόντων μέσω ενός ανοιχτού διαύλου είναι η κίνηση φορτισμένων σωματιδίων μέσω μιας αντίστασης R . Η κίνηση φορτισμένων σωματιδίων μέσω μιας αντίστασης είναι ένα ιοντικό ρεύμα. Το ρεύμα που προκύπτει από τη διέλευση ιόντων μέσα από έναν δίαυλο ονομάζεται «μονοκαναλικό ρεύμα» ή «μοναδιαίο ρεύμα» του ιόντος. Η σχέση μεταξύ f_{net} και i_{ion} είναι:

$$i_{ion} = f_{net} z F$$

όπου το πλάτος του ιόντος εκφράζεται σε Ampère (A) που είναι Coulombs ανά δευτερόλεπτο ($C s^{-1}$), F είναι η σταθερά Faraday (96 500 C), z είναι το σθένος του ιόντος (+1 για το Na^+ και K^+ , -1 για το Cl^- και +2 για το Ca^{2+}), και f_{net} είναι η καθαρή ροή του ιόντος σε $mol s^{-1}$.

Γενικά, τα ρεύματα εκφράζονται ακολουθώντας νόμο του Ohm: $\Delta V = IR$, όπου I είναι το ρεύμα που ρέει μέσω μιας αντίστασης R και ΔV είναι η διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο άκρων της αντίστασης. Για τα ρεύματα που μεταφέρονται από ιόντα χρησιμοποιούνται αντίστοιχα οι όροι i_{ion} , r_{ion} , αντίστοιχα. Το ΔV για τα βιολογικά συστήματα είναι η δύναμη που κάνει τα ιόντα να κινούνται προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Αποτελεί την ηλεκτροχημική κλίση για το εξεταζόμενο ιόν και ονομάζεται, επίσης, οδηγός δύναμη και αποτυπώνεται αλγεβρικά με τον τύπο: $\Delta V = V_m - E_{ion}$.

Σύμφωνα με το νόμο του Ohm, το ρεύμα i_{ion} που διαπερνά έναν δίαυλο υπολογίζεται αλγεβρικά από το τύπο: $V_m - E_{ion} = i_{ion} r_{ion}$ και από αυτό προκύπτει ότι: $i_{ion} = (V_m - E_{ion})(1/r_{ion}) = \gamma_{ion}(V_m - E_{ion})$. Το γ_{ion} ονομάζεται αγωγιμότητα του διαύλου και είναι ένα μέτρο της ευκολίας ροής των ιόντων μέσω του πόρου του διαύλου, ενώ η αντίσταση εκφράζεται σε Ohms (Ω), η αγωγιμότητα εκφράζεται σε Siemens (S). Κατά σύμβαση το i_{ion} είναι αρνητικό όταν αντιπροσωπεύει μια προς τα εντός του κυττάρου ροή θετικά φορτισμένων σωματιδίων (κατιόντα), ενώ το i_{ion} είναι θετικό όταν αντιπροσωπεύει μια προς το εξωτερικό του κυττάρου ροή θετικών φορτίων. Είναι γενικά της τάξης των

picoAmperes ($1\text{pA} = 10^{-12}\text{A}$). Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, το γ_{ion} κυμαίνεται μεταξύ 10 και 150 pS, ανάλογα με τον τύπο του διαύλου (27).

Σε φυσιολογικές συνθήκες, πολλοί δίαυλοι του ίδιου τύπου είναι ανοικτοί ταυτόχρονα στην μεμβράνη του νευρικού κυττάρου. Ας υποθέσουμε ότι μόνο ένας τύπος διαύλου είναι ανοικτός στη μεμβράνη, για παράδειγμα δίαυλοι Na^+ , τότε το συνολικό ρεύμα I_{Na} που διασχίζει τη μεμβράνη τη στιγμή t είναι το άθροισμα των μοναδιαίων ρευμάτων i_{Na} τη στιγμή t :

$$I_{Na} = Np_o i_{Na}$$

όπου N είναι ο αριθμός των διαύλων Na^+ που υπάρχουν στη μεμβράνη, p_o είναι η πιθανότητα οι δίαυλοι Na^+ να είναι ανοικτοί τη στιγμή t (το Np_o είναι επομένως ο αριθμός των ανοιχτών διαύλων Na^+ στη μεμβράνη τη στιγμή t), και το i_{Na} είναι το μοναδιαίο ρεύμα Na^+ . Πιο γενικά:

$$I_{ion} = Np_o \gamma_{ion}$$

Κατά συνέπεια, η συνολική αγωγιμότητα της μεμβράνης για ένα συγκεκριμένο ιόν είναι:

$$G_{ion} = Np_o \gamma_{ion}$$

και από το $i_{ion} = \gamma_{ion}(V_m - E_{ion})$ προκύπτει ότι:

$$I_{ion} = G_{ion}(V_m - E_{ion})$$

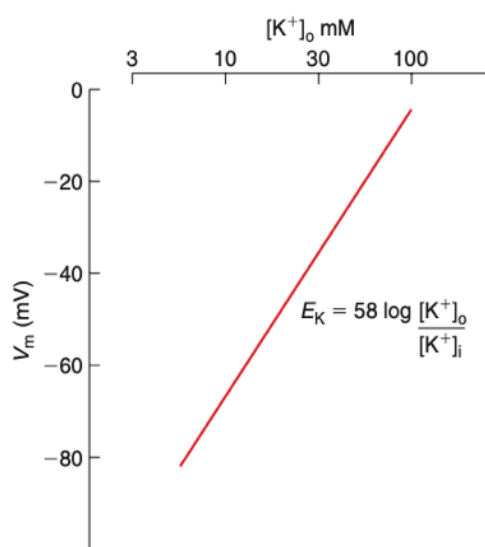
Το I_{ion} και το i_{ion} μπορούν να μετρηθούν πειραματικά. Το i_{ion} είναι το ρεύμα που υπολογίζεται από ένα κομμάτι μεμβράνης όπου υπάρχει μόνο ένας δίαυλος συγκεκριμένου τύπου, ενώ το I_{ion} είναι το ρεύμα που υπολογίζεται από μια ακέραια κυτταρική μεμβράνη, όπου βρίσκονται N δίαυλοι ίδιου τύπου.

1.5.4. Το δυναμικό ηρεμίας.

Όταν ο νευρώνας δεν διεγείρεται, το δυναμικό της μεμβράνης του ονομάζεται δυναμικό ηρεμίας (V_{rest}). Για ορισμένους νευρώνες, το V_{rest} είναι σταθερό (σιωπηλοί νευρώνες), ενώ για άλλους νευρώνες κάτι τέτοιο δεν ισχύει (π.χ. νευρώνες βηματοδότη). Σε αυτό το σημείο, θα εξετάσουμε τους νευρώνες με το σταθερό V_{rest} . Σε συνθήκες ηρεμίας, η κυτταρική μεμβράνη είναι ελάχιστη διαπερατή σε Na^+ , Cl^- και Ca^{2+} ενώ είναι διαπερατή σε K^+ . Ποιο είναι το δυναμικό μεμβράνης μιας διαπερατής μεμβράνης μόνο από ιόντα K^+ ; Αυτή η κατάσταση μπορεί να ελεγχθεί πειραματικά μετρώντας τις ιοντικές ροές με ραδιενεργούς ιχνηθέτες μέσω μιας κυτταροπλασματικής μεμβράνης όπου οι δίαυλοι K^+ είναι οι μόνοι ανοικτοί δίαυλοι. Το K^+ κινείται προς τα έξω ακολουθώντας τη βαθμίδωση της συγκέντρωσής του (η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του K^+ είναι περίπου 50 φορές μεγαλύτερη από την εξωκυττάρια): τα θετικά φορτία αφαιρούνται έτσι από το ενδοκυττάριο υγρό και υπάρχει συσσώρευση αρνητικών φορτίων στην ενδοκυττάρια πλευρά της μεμβράνης και θετικά

φορτία στο εξωτερικό φύλλο της μεμβράνης. Αυτά τα θετικά φορτία θα αντιταχθούν σε περαιτέρω κινήσεις του K^+ προς τα έξω μέχρι να επιτευχθεί μια ισορροπία όταν η βαθμίδωση συγκέντρωσης για το K^+ ακυρώσει την κίνηση που ασκείται από την ηλεκτρική κλίση. Αυτό είναι εξ ορισμού το δυναμικό ισορροπίας E_K . Ως εκ τούτου, στο $V_m = E_K$, αν και το K^+ συνεχίζει να κινείται μέσα και έξω από το κύτταρο, δεν υπάρχει καθαρή αλλαγή στη συγκέντρωσή του σε όλη τη μεμβράνη. Σε μια φυσιολογική κατάσταση, η ακριβής τιμή του E_K είναι άγνωστη αφού η ακριβής $[K^+]_i$ είναι άγνωστη. Όταν το $V_{rest} = -80/-70mV$, αν και φαίνεται κοντά στο E_K , μπορεί να μην είναι ίσο με το E_K .

Ένας τρόπος για να ελέγξουμε αν το $V_{rest} = E_{K+}$ είναι ο παρακάτω: η εξίσωση του Nernst που εφαρμόζεται για το K^+ , υποδεικνύει ότι μια 10πλάσια αλλαγή στην αναλογία συγκέντρωσης θα πρέπει να μεταβάλλει το δυναμικό της μεμβράνης ενός νευρώνα κατά 58mV. Αυτή η σχέση μπορεί να ελεγχθεί σε πειράματα στα οποία η εξωκυττάρια συγκέντρωση αυτού του ιόντος μεταβάλλεται και το δυναμικό της μεμβράνης υπολογίζεται με ένα μικροηλεκτρόδιο. Σε ένα ημιλογαριθμικό διάγραμμα της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ ($[K^+]_o$) – τετμημένη- σε σχέση με το δυναμικό της μεμβράνης (V_m) - τεταγμένη- θα πρέπει αυτή η μεταβολή να δεικνύεται με μια ευθεία που φέρει κλίση 58mV ανά 10πλάσια αλλαγή στο $[K^+]_o$ (**Εικόνα 3**). Αυτή η κατάσταση συναντάται σπάνια σε νευρώνες, αλλά φαίνεται να είναι πιο κοινή για τα νευρογλοιακά κύτταρα. Στην περίπτωση των νευρώνων, η μη γραμμικότητα αυτής της γραφικής παράστασης παρατηρείται συχνά, ιδιαίτερα σε χαμηλή εξωκυττάρια συγκέντρωση K^+ ($[K^+]_o$). Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν ότι το K^+ είναι ένα πολύ σημαντικό ιόν για τον καθορισμό της τιμής του V_{rest} , υποδεικνύοντας παράλληλα ότι και άλλα ιόντα πρέπει παίζουν σημαντικό ρόλο.



Εικόνα 3: Θεωρητικό διάγραμμα της σχέσης E_K με την εξωκυττάρια συγκέντρωση K^+ . Προσαρμογή από το σύγγραμμα *Cellular and Molecular Neurophysiology*, Constance Hammond, Third Edition, 2008.

Δεδομένου ότι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του Na^+ δεν είναι αμελητέα, αυτό σημαίνει ότι αυτό το ιόν μπορεί να συσσωρευτεί μέσα στο κυτταρόπλασμα, πιθανόν λόγω του μάλλον θετικού $E_{\text{Na}}=+75\text{mV}$, έναντι ενός πολύ αρνητικού V_{rest} , δημιουργώντας μια ηλεκτροχημική κλίση ευνοϊκή για την είσοδο του Na^+ . Ομοίως, η ασύμμετρη κατανομή του Cl^- υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο του στον προσδιορισμό του V_{rest} . Προκειμένου να ληφθούν υπόψη διάφορα ιοντικά είδη είναι χρήσιμο να εισαχθεί αυτό που συνήθως ονομάζεται εξίσωση *Goldman–Hodgkin–Katz (GHK)*, που προέρχεται από την εξίσωση Nernst:

$$V_{\text{rest}} = 58 \log \times \frac{p_K[\text{K}^+]_o + p_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_o + p_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_i}{p_K[\text{K}^+]_i + p_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_i + p_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_o}$$

όπου p είναι ο συντελεστής διαπερατότητας (cm s^{-1}) για κάθε ιοντικό είδος. Η σχετική συμβολή κάθε είδους ιόντων στην τάση ηρεμίας σταθμίζεται από τη διαπερατότητα αυτού του ιόντος. Σημειώστε ότι εάν η διαπερατότητα ηρεμίας σε Na^+ και Cl^- είναι πολύ χαμηλή, η εξίσωση GHK μοιάζει πολύ με την εξίσωση Nernst για το K^+ . Κατά την εφαρμογή της εξίσωσης GHK στα νευρικά κύτταρα, πρέπει να γίνουν οι ακόλουθες παραδοχές:

- i. Η κλίση τάσης κατά μήκος της μεμβράνης είναι ομοιόμορφη με την έννοια ότι αλλάζει γραμμικά μέσα στη μεμβράνη.
- ii. Η συνολική καθαρή ροή ρεύματος κατά μήκος της μεμβράνης είναι μηδενική καθώς τα ρεύματα που παράγονται από μεμονωμένα ιοντικά είδη εξισορροπούνται.
- iii. Η μεμβράνη βρίσκεται σε σταθερή κατάσταση, καθώς δεν υπάρχει χρονοεξαρτώμενη αλλαγή στην ιοντική ροή ή στην πυκνότητα του διαύλου. Αυτό προφανώς δεν ισχύει για συνθήκες μη σταθερής κατάστασης ταχέως μεταβαλλόμενου δυναμικού μεμβράνης όπως παράγεται όταν ένα νευρικό κύτταρο εκτοξεύει δυναμικά ενέργειας.
- iv. Οποιοσδήποτε ρόλος των ενεργών μηχανισμών μεταφοράς αγνοείται.
- v. Τα ιόντα που είναι μονοσθενή κατιόντα ή ανιόντα δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με μόρια νερού. Το πρώτο σημείο δεν ισχύει εάν υπάρχει μετρήσιμη διαπερατότητα σε δισθενή κατιόντα, όπως το Ca^{2+} . Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα ιόντα μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους μέσα στον ίδιο δίαυλο.
- vi. Ο ρόλος των επιφανειακών φορτίων της μεμβράνης αγνοείται. Αυτό είναι ένας σχετικά σημαντικός περιορισμός επειδή η κυτταρική μεμβράνη περιέχει αρνητικά φορτία στο εσωτερικό και το εξωτερικό της στρώμα (υπολείμματα αμινοξέων των πρωτεϊνών της μεμβράνης που είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα). Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από αυτά τα φορτία μπορεί να επηρεάσει τις κινητικές ιδιότητες των ιοντικών διαύλων. Η

προσθήκη δισθενών κατιόντων όπως Ca^{2+} ή Mg^{2+} οδηγεί σε διαλογή αυτών των φορτίων και επακόλουθες αλλαγές στις ιδιότητες του διαύλου.

vii. Η κινητικότητα κάθε ιόντος και ο συντελεστής διάχυσής του (D) εντός της μεμβράνης πάχους (δ) είναι σταθερός.

viii. Τα ιόντα δεν δεσμεύονται σε συγκεκριμένες θέσεις στη μεμβράνη και η συγκέντρωσή τους μπορεί να εκφραστεί με γραμμικούς συντελεστές κατανομής ($\beta = c_{\text{membrane}}/c_{\text{solution}}$). Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα ιόντα μπορούν να συνδεθούν σε θέσεις μέσα στους διαύλους και να επηρεάσουν την κινητική τους.

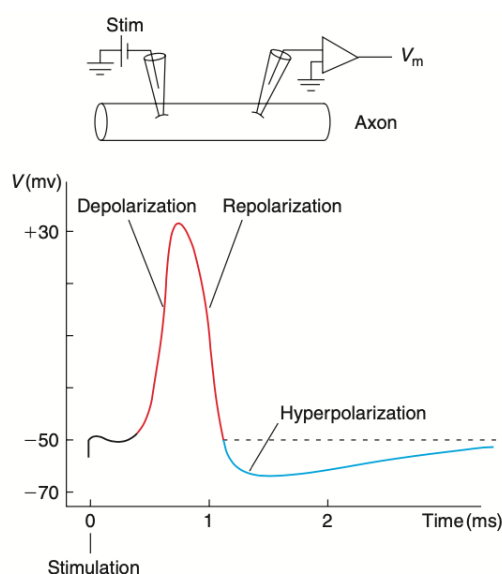
ix. Οι ιοντικές ενεργότητες μπορούν να αντικατασταθούν από τις συγκεντρώσεις τους (28).

1.5.5. Οι τασοελεγχόμενοι διάυλοι Na^+ έχουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση δυναμικών ενέργειας.

Η ιοντική βάση για τη διέγερση των νευρών αποσαφηνίστηκε για πρώτη φορά στον γιγάντιο άξονα του καλαμαριού από τους Hodgkin και Huxley (1952) χρησιμοποιώντας την τεχνική της καθήλωσης τάσης (voltage clamp technique). Έκαναν τη βασική παρατήρηση ότι δύο ξεχωριστά, εξαρτώμενα από την τάση ρεύματα, αποτελούν τη βάση του δυναμικού ενέργειας: ένα πρώιμο παροδικό προς τα μέσα ρεύμα Na^+ που εκπολώνει τη μεμβράνη και ένα καθυστερημένο προς τα έξω ρεύμα K^+ που ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την επαναπόλωση. Αυτό οδήγησε σε μια σειρά πειραμάτων που κατέληξαν σε μια ποσοτική περιγραφή της δημιουργίας και διάδοσης των παλμών στον άξονα του καλαμαριού (29). Αργότερα, οι Sakmann και Neher, χρησιμοποιώντας την τεχνική του patch clamp, κατέγραψαν τη δραστηριότητα των τασοελεγχόμενων διαύλων Na^+ και K^+ , που είναι υπεύθυνοι για την έναρξη και τη διάδοση του δυναμικού ενέργειας.

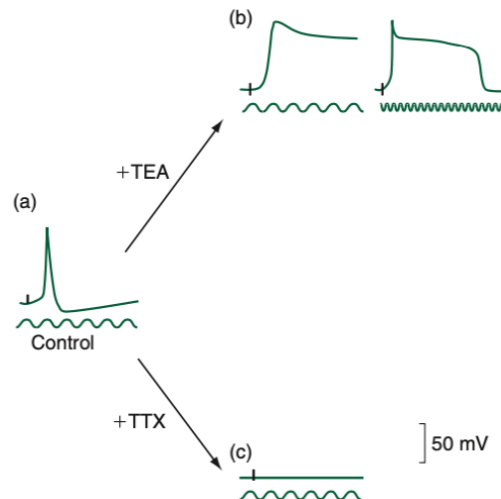
Το δυναμικό ενέργειας είναι μια ξαφνική και παροδική εκπόλωση της μεμβράνης. Τα δυναμικά ενέργειας μπορούν έχουν διαφορετικά πλάτη και χρόνους διάρκειας. Στα σώματα και τους άξονες των νευρώνων, τα δυναμικά ενέργειας έχουν μικρή διάρκεια και μεγάλο πλάτος: και αυτά καλούνται δυναμικά ενέργειας εξαρτώμενα από το Na^+ . Σε άλλα σώματα νευρικών κυττάρων, σε καρδιακά κύτταρα των κοιλιών και στα τελικά κομβία του νευράξονα, τα δυναμικά ενέργειας έχουν μεγαλύτερη διάρκεια με ένα plateau που είναι συνέχεια της αρχικής κορυφής και αυτά καλούνται $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - εξαρτώμενα δυναμικά ενέργειας. Τέλος, σε ορισμένους δενδρίτες και ενδοκρινικά κύτταρα, τα δυναμικά ενέργειας έχουν μεγάλη διάρκεια και μικρό πλάτος και αυτά καλούνται Ca^{2+} - εξαρτώμενα δυναμικά ενέργειας. Τα δυναμικά ενέργειας έχουν κοινές ιδιότητες, αλλά και διαφορές. Για παράδειγμα, όλα ξεκινούν

ως απόκριση σε μια μεμβράνη που έχει εκπολωθεί, ενώ άλλα, για παράδειγμα φέρουν διαφορές στον τύπο των ιόντων που εμπλέκονται, το πλάτος, τη διάρκειά τους κ.λ.π.(29) Η δραστηριότητα του γιγάντιου άξονα του καλαμαριού καταγράφεται με ένα ενδοκυτταρικό ηλεκτρόδιο με την τεχνική καθήλωση τάσης, παρουσία θαλασσινού νερού ως εξωκυτταρίου διαλύματος. Όταν το εξωκυττάριο διάλυμα αλλάζει από θαλασσινό νερό σε διάλυμα χωρίς Na^+ , το πλάτος και ο χρόνος ανόδου της φάσης εκπόλωσης του δυναμικού ενέργειας μειώνεται σταδιακά και γρήγορα, έως ότου μετά από 8 δευτερόλεπτα ο τρέχων παλμός δεν μπορεί πλέον να προκαλέσει δυναμικό ενέργειας (29).



Εικόνα 4: Το δυναμικό ενέργειας του γιγαντιαίου άξονα του καλαμαριού. Το δυναμικό ενέργειας καταγράφεται ενδοκυτταρικά στον γιγαντιαίο άξονα του καλαμαριού σε δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης σε απόκριση σε εκπολωτικό παλμό ρεύματος. Υποδεικνύονται οι διάφορες φάσεις του δυναμικού ενέργειας. Προσαρμογή από το σύγγραμμα *Cellular and Molecular Neurophysiology*, Constance Hammond, Third Edition, 2008.

Επιπλέον, στο θαλασσινό νερό ελέγχου, η τετροδοτοξίνη (TTX), ένας ειδικός αποκλειστής των τασοελεγχόμενων διαύλων Na^+ , μπλοκάρει πλήρως την έναρξη του δυναμικού ενέργειας, επιβεβαιώνοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο των ιόντων Na^+ . Από την άλλη, η εφαρμογή του χλωριούχου τετρααιθυλαμμωνίου (TEA), ενός αναστολέα των διαύλων K^+ , παρατείνει σημαντικά τη διάρκεια του δυναμικού ενέργειας χωρίς να επηρεάζει το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης. Το δυναμικό ενέργειας που αντιμετωπίζεται με TEA έχει μια αρχική κορυφή που ακολουθείται από ένα plateau και η παράταση μερικές φορές είναι 100 φορές ή μεγαλύτερη (30).



Εικόνα 5: Επιδράσεις της τετροδοτοξίνης (TTX) και του χλωριούχου τετρααιθυλαμμωνίου (TEA) στο δυναμικό δράσης του γιγαντιαίου άξονα του καλαμαριού. (α) Δυναμικό ενέργειας ελέγχου. (β) Η εφαρμογή TEA επιμηκύνει το δυναμικό ενέργειας (αριστερά), το οποίο στη συνέχεια πρέπει να παρατηρηθεί σε διαφορετική χρονική κλίμακα (δεξί ίχνος). (γ) Η TTX καταργεί εντελώς την έναρξη του δυναμικού ενέργειας. Προσαρμογή από το σύγγραμμα *Cellular and Molecular Neurophysiology*, Constance Hammond, Third Edition, 2008.

Οι παλμοί ρεύματος εκπόλωσης εφαρμόζονται μέσω του ενδοκυτταρικού ηλεκτροδίου καταγραφής, στο επίπεδο ενός νευρικού σώματος ή νευράξονα. Παρατηρούμε ότι σε ένα ορισμένο επίπεδο εκπόλωσης της μεμβράνης που ονομάζεται δυναμικό κατωφλίου ή ουδικό δυναμικό, καταγράφεται μόνο μια ωμική παθητική απόκριση και ότι όταν η μεμβράνη είναι εκπολωμένη ακριβώς πάνω από τον ουδό, καταγράφεται ένα δυναμικό ενέργειας, του οποίου το πλάτος δεν αυξάνει αν αυξηθεί η ένταση του παλμού του διεγερτικού ρεύματος.

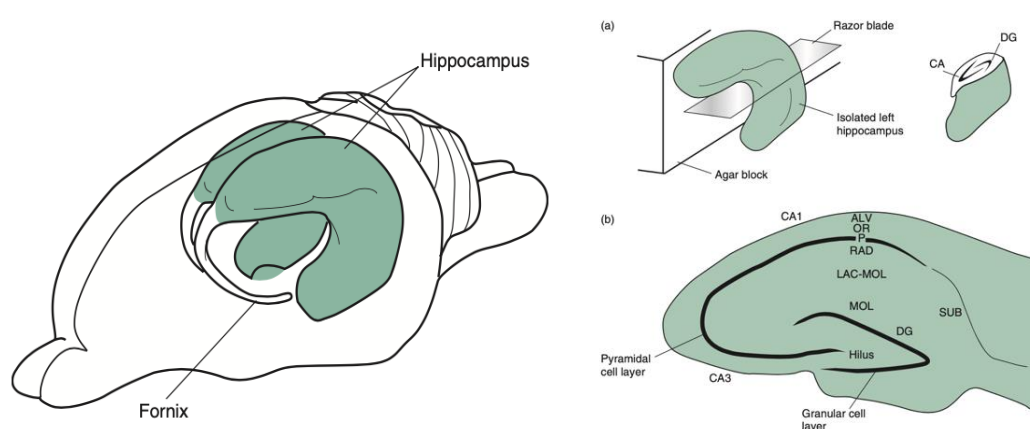
Αυτά εξηγούν ότι το δυναμικό ενέργειας υπακούει στον κανονά «όλον ή ουδέν». Μόλις ξεκινήσει, το δυναμικό δράσης διαδίδεται κατά μήκος του άξονα με ταχύτητα που κυμαίνεται από 1 έως 100ms^{-1} ανάλογα με τον τύπο του νευράξονα. Οι ενδοκυτταρικές καταγραφές σε διάφορες αποστάσεις από το σώμα δείχνουν ότι το πλάτος του δυναμικού ενέργειας δεν μειώνεται.

1.6. Τα νευρωνικά δίκτυα στον ενήλικο ιππόκαμπο.

Ο ιππόκαμπος αποτελεί μέρος του μεταιχμιακού συστήματος και είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία, επεξεργασία και αποθήκευση των συναισθημάτων και πτυχών της μάθησης και της μνήμης. Στον επίμυ είναι μια δομή ραχιαία-κοιλιακή και ουραία δομή, ενώ στα πρωτεύοντα εντοπίζεται αυστηρά στον κροταφικό λοβό.

Ο ιππόκαμπος αποτελείται από δύο αλληλοσυνδεόμενες ημισεληνοειδείς περιοχές: το κέρας του Ammon (cornu ammonis) και την οδοντωτή έλικα (DG, επίσης αποκαλούμενη fascia

dentata). Σε στεφανιαία τομή, το κέρασ του Ammon του αρουραίου μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω σε δύο περιοχές, CA1 και CA3 (CA για cornu ammonis). Στον άνθρωπο υπάρχουν άλλες δύο υποδιαιρέσεις, η CA2 και η CA4. Η CA2 βρίσκεται μεταξύ της CA1 και της CA3 ενώ η CA4 παρεμβάλλεται στην οδοντωτή έλικα. Το κέρασ του Ammon και η οδοντωτή έλικα περιέχουν ένα στρώμα κύριων νευρώνων που είναι νευρώνες προβολής (τύπου Golgi I): τα πυραμιδικά κύτταρα και τα κοκκώδη κύτταρα, αντίστοιχα. Σε κάθε περιοχή υπάρχουν πολυάριθμοι τοπικοί διάμεσοι νευρώνες (Golgi τύπου II). Τα κύρια κύτταρα χρησιμοποιούν ένα διεγερτικό αμινοξύ ως νευροδιαβιβαστή, ενώ οι διάμεσοι νευρώνες χρησιμοποιούν το GABA (31).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του εντοπισμού των δύο ιπποκάμπων στο εσωτερικό του εγκεφάλου επίμυος και της δομής του ιπποκάμπου επίμυος. (α) Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου παρασκευής φέτας (hippocampal slice). (β) Μικροφωτογραφία (σχέδιο) φωτεινού πεδίου μιας εγκάρσιας τομής του ιπποκάμπου, χρωματισμένης με τη μέθοδο Nissl, η οποία χρωματίζει τα νευρωνικά σωμάτια και τους εγγύς δενδρίτες (λόγω της παρουσίας της συσκευής Golgi). gr, κοκκώδες κύτταρο- pyr, πυραμιδικό κύτταρο- SUB, υπόθεμα. Προσαρμογή από το σύγγραμμα *Cellular and Molecular Neurophysiology*, Constance Hammond, Third Edition, 2008

1.6.1. Βασικές γνώσεις για την νευροφυσιολογία του ιπποκάμπου.

Στους πυρήνες του κεντρικού νευρικού συστήματος υπάρχουν διάφοροι τύποι νευρώνων: νευρώνες προβολής (Golgi τύπου I) των οποίων οι άξονες προβάλλουν σε νευρώνες που βρίσκονται εκτός του πυρήνα, και τοπικοί διάμεσοι νευρώνες (Golgi τύπου II) των οποίων οι άξονες προβάλλουν σε νευρώνες που βρίσκονται εντός του πυρήνα. Αυτοί οι τύποι νευρώνων συνδέονται μεταξύ τους (ενδογενείς συνδέσεις), δηλαδή σχηματίζουν ένα

δίκτυο. Κάθε δίκτυο δέχεται προσαγωγές από νευρώνες που βρίσκονται σε άλλους πυρήνες (εξωγενείς συνδέσεις).

Στον νεοφλοιό και τον ιππόκαμπο, οι νευρώνες τύπου Golgi I είναι τα πυραμιδικά κύτταρα, στον παρεγκεφαλιδικό φλοιό είναι τα κύτταρα Purkinje και στο ραβδωτό σώμα είναι οι μεσαίοι ακανθώδεις νευρώνες (medium spiny neurons). Τα πυραμιδικά κύτταρα είναι γλουταμεργικά, ενώ τα κύτταρα Purkinje και οι μεσαίοι ακανθώδεις νευρώνες είναι GABAεργικοί. Εκτός από αυτά τα κύρια κύτταρα, σε όλους αυτούς τους πυρήνες υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία τοπικών GABAεργικών διαμέσων νευρώνων.

Στον ιππόκαμπο του ελεύθερα κινούμενου αρουραίου, καταγράφονται διάφοροι τύποι ταλαντώσεων από πληθυσμούς νευρώνων *in vivo* (εξωκυττάρια καταγραφές). Για παράδειγμα, μια ρυθμική αργή δραστηριότητα που ονομάζεται "θήτα" (theta) (5-10Hz) καταγράφεται κατά τη διάρκεια της εξερευνητικής συμπεριφοράς, όπως η μυρωδιά, η εκγύμναση και το περπάτημα, και της παράδοξης φάσης του ύπνου- μόλις το ζώο μένει ακίνητο, ή κατά τη διάρκεια καταναλωτικών συμπεριφορών ή ύπνου αργών κυμάτων, καταγράφονται διαλείποντα αιχμηρά κύματα (SPW) στο δενδριτικό επίπεδο του CA1-CA3. Αυτές οι ταλαντώσεις είναι ταλαντώσεις δικτύου.

Οι νευρωνικές ταλαντώσεις έχουν δύο κύριες προελεύσεις. Μπορεί να είναι ενδογενείς (=intrinsic) στον νευρώνα, όταν προκύπτουν από την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη ρευμάτων που είναι ενδογενείς στη μεμβράνη, όπως συμβαίνει στους θαλαμικούς και υποθαλαμικούς νευρώνες. Μπορούν να είναι εξωγενείς όταν προκύπτουν από τη δραστηριότητα μιας ομάδας διασυνδεδεμένων νευρώνων, από τη δραστηριότητα των συνάψεών τους, όπως συμβαίνει για τους νευρώνες του ιππόκαμπου (32).

1.6.2. Το κύκλωμα του ιπποκάμπου.

Το κέρας του Ammon είναι μια καμπύλη δομή και φέρει ιστολογική οργάνωση πέντε επιπέδων. Λόγω του σχήματος U, οι στιβάδες (και τα πυραμιδικά κύτταρα) είναι ανάποδα στο CA1 σε σύγκριση με το CA3. Τα κύρια κύτταρα, τα πυραμιδικά, έχουν το σώμα τους ευθυγραμμισμένο σε ένα λεπτό στρώμα που ονομάζεται στρώμα πυραμιδικών κυττάρων (pyramidal cell layer). Το όνομα των κυττάρων αυτών προέρχεται από το σαφές πυραμιδικό σχήμα του δενδριτικού τους πεδίου. Το κυτταρικό σώμα έχει διάμετρο 20μm και από αυτό εκφύονται τρεις κύριοι δενδρίτες, ένας κορυφαίος και δύο βασικοί. Οι κορυφαίοι δενδρίτες των πυραμοειδών κυττάρων σχηματίζουν την ακτινωτή στιβάδα (stratum radiatum) και εισέρχονται στην μοριώδη βοθρίωδη στιβάδα (stratum lacunosum moleculare). Οι βασικοί δενδρίτες διακλαδίζονται στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens). Οι

δενδρίτες έχουν πολυάριθμες άκανθες. Στην CA3, το εγγύς τμήμα των κορυφαίων δενδριτών των πυραμιδικών κυττάρων παρουσιάζει γιγάντιες ακίδες (thorny excrescences) που αποτελούν τα μετασυναπτικά στοιχεία των συνάψεων με τα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας. Οι άξονες των πυραμιδικών κυττάρων διατρέχουν την λευκή ουσία που ονομάζεται σκάφη (stratum alveus), όπου κινούνται πολυάριθμες παράπλευρες ίνες πριν εγκαταλείψουν τον ιππόκαμπο (31).

Η δραστηριότητα των πυραμιδικών κυττάρων διαμορφώνεται όχι μόνο από εξωγενείς επιδράσεις αλλά και από ενδογενείς που προέρχονται από τοπικούς ανασταλτικούς διάμεσους νευρώνες. Τέσσερις κύριοι τύποι ανασταλτικών διάμεσων νευρώνων έχουν περιγραφεί στο κέρας του Ammon, όλοι GABAεργικοί. Έχουν τα κυτταρικά τους σώματα στα πέντε στρώματα των περιοχών CA που βρίσκονται από το εξωτερικό προς το εσωτερικό τμήμα του ιπποκάμπου: την κυψελιδωτή στιβάδα (stratum alveole (ALV)), την στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens (OR)), την στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων (stratum pyramidale (p)), την ακτινωτή στιβάδα (stratum radiatum (RAD)) και την μοριώδη βοθριωδή στιβάδα (stratum lacunosum moleculare (LAC-MOL)). Οι διάμεσοι νευρώνες ταξινομούνται ανάλογα με τη θέση ή τις θέσεις τερματισμού τους στους πυραμιδικούς νευρώνες (31,33).

- Τα καλαθοειδή κύτταρα (basket cells (BC)) νευρώνουν το σώμα και τους εγγείς δενδρίτες που βρίσκονται στην στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων και την ακτινωτή στιβάδα. Τα κυτταρικά σώματα των καλαθοειδών κυττάρων βρίσκονται την στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων.

- Τα διαστρωματικά κύτταρα (bistratified cells (BiC)) νευρώνουν τόσο τους κορυφαίους όσο και τους βασικούς δενδρίτες στο εγγύς τμήμα τους που βρίσκονται στην ακτινωτή στιβάδα και την στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων. Τα κυτταρικά σώματα των διαστρωματικών κυττάρων βρίσκονται στο όριο της ακτινωτής στιβάδας και της στιβάδας των πολύμορφων κυττάρων.

- Τα κύτταρα που βρίσκονται στην στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων και την μοριώδη βοθριωδή στιβάδα (Oriens-lacunosum moleculare (O-LMC)) νευρώνουν τους απομακρυσμένους κορυφαίους δενδρίτες που βρίσκονται στην μοριώδη βοθριωδή στιβάδα. Τα κυτταρικά σώματα των O-LMC βρίσκονται στην στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων.

- Τα αξο-αξονικά κύτταρα (AAC), που ονομάζονται επίσης κύτταρα δίκην πολυέλαιου (=chandelier cells), νευρώνουν αποκλειστικά το αρχικό τμήμα του άξονα, ενώ τα κυτταρικά τους σώματα βρίσκονται στην στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων.

Η οδοντωτή έλικα είναι επίσης μια καμπύλη δομή, με σχήμα U και οργάνωση τριών στρωμάτων. Τα κύρια κύτταρα που ονομάζονται κοκκώδη κύτταρα έχουν το σώμα τους πυκνά συσκευασμένο σε ένα λεπτό στρώμα, τη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων. Τα σώματα έχουν μικρή διάμετρο (14-18μm) και είναι ωοειδή. Οι δενδρίτες εκφύονται από τον κορυφαίο πόλο των σωμάτων και σχηματίζουν τη μοριακή στιβάδα. Οι άξονες, που ονομάζονται βρυώδεις ίνες (=mossy fibers), έχουν μικρή διάμετρο (0,5μm) και δεν έχουν μυελίνη. Εκφύονται από τον βασικό πόλο των σωμάτων, διαιρούνται στην πολυμορφική στιβάδα της οδοντωτής έλικας στη σύνδεσή της με την περιοχή CA4 (hilus) σε πολυάριθμες παράπλευρες ίνες που έρχονται σε επαφή με τοπικούς διάμεσους νευρώνες και διασχίζουν το hilus για να πραγματοποιήσουν συνάψεις με τα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής CA3. Στην οδοντωτή έλικα (DG) έχουν περιγραφεί οι ίδιοι τέσσερις τύποι διάμεσων νευρώνων με αυτούς που βρίσκονται στο κέρασ του Άμμωνα. Οι διάμεσοι νευρώνες που βρίσκονται στην πυραμιδική στιβάδα στην CA, βρίσκονται στην κοκκώδη στιβάδα στην DG. Παρομοίως, οι διάμεσοι νευρώνες που βρίσκονται στην στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων της CA βρίσκονται στο hilus της DG και εκείνοι που βρίσκονται στην ακτινωτή στιβάδα της CA βρίσκονται στο μοριώδη στιβάδα της DG (31).

Το κύριο κύκλωμα στο εσωτερικό του υποκάμπειου σχηματισμού περιλαμβάνει τα κύρια κύτταρα: τα κοκκώδη κύτταρα της DG, τα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 και τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3. Όλα αυτά τα κύτταρα χρησιμοποιούν ένα διεγερτικό αμινοξύ ως νευροδιαβιβαστή. Πρώτον, τα κοκκώδη κύτταρα προβάλλουν στα πυραμιδικά κύτταρα CA3. Ο άξονάς τους (που ονομάζονται βρυώδεις ίνες) απολήγουν στο εγγύς τμήμα των κορυφαίων δενδριτών της CA3, σε γιγάντιες άκανθες (=giant spines). Αυτή η περιορισμένη ζώνη προβολής σχηματίζει το stratum lucidum (LUC), μια υποστιβάδα της ακτινωτής στιβάδας που υπάρχει μόνο στην περιοχή CA3. Οι συνάψεις μεταξύ των βρυωδών ινών και των δενδριτικών ακάνθων των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 είναι γιγαντιαίες συνάψεις. Με τη σειρά τους, τα CA3 πυραμιδικά κύτταρα στέλνουν τις αξονικές παράπλευρες ίνες, που ονομάζονται παράπλευρες ίνες Schaffer, στα CA1 πυραμιδικά κύτταρα, στο άπω τμήμα των κορυφαίων δενδριτών τους, στο επίπεδο της μοριώδους βοθριωδούς στιβάδας. Σε στεφανιαίες τομές *in vitro*, όλα αυτά τα κυκλώματα είναι παρόντα, καθώς οργανώνονται στο εγκάρσιο επίπεδο (34).

Επιπλέον, τα πυραμιδικά κύτταρα των περιοχών CA3 και CA1 προβάλλουν τοπικές αξονικές παράπλευρες ίνες που έρχονται σε επαφή με τοπικούς διάμεσους νευρώνες. Ομοίως, τα κοκκώδη κύτταρα προβάλλουν αξονικές παράπλευρες ίνες που νευρώνουν

τοπικά τους διάμεσους. Επιπλέον, στην CA3, τα πυραμιδικά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με διεγερτικές επαναλαμβανόμενες παράπλευρες ίνες.

Επομένως, τα τοπικά κυκλώματα επικάθονται στο κύριο «τρινευρωνικό/τρισυναπτικό» διεγερτικό κύκλωμα. Οι δύο κύριες οδοί που μεταφέρουν προσαγωγές πληροφορίες στον υπόκαμπο είναι η διατιτραίνουσα οδός που προέρχεται από τον ενδορρινικό φλοιό και η ψαλίδα του εγκεφάλου που προέρχεται από το μέσο διάφραγμα και τον πρόσθιο θάλαμο. Επιπλέον, οι δύο υπόκαμποι διασυνδέονται μεταξύ τους με την συνδεσμική οδό (=commissural pathway).

1.6.3. Ο ρόλος της μορφολογίας των νευρώνων στην AD.

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από δύο κύριες κατηγορίες κυττάρων: τους νευρώνες (ή νευρικά κύτταρα) και τα νευρογλοιακά κύτταρα (ή τη νευρογλοία). Τα νευρογλοιακά κύτταρα διαδραματίζουν «υποστηρικτικό» ρόλο, παρέχοντας σταθερότητα και δομική συνοχή στον εγκέφαλο. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, οι βασικοί τύποι νευρογλοιακών κυττάρων περιλαμβάνουν τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα, ενώ στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) εντοπίζονται τα κύτταρα Schwann. Τα ολιγοδενδροκύτταρα στο ΚΝΣ και τα κύτταρα Schwann στο ΠΝΣ είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μυελίνης, συμβάλλοντας στη δημιουργία των ελύτρων μυελίνης τα οποία περιβάλλουν τους νευράξονες. Από την άλλη, τα αστροκύτταρα, τα οποία έχουν χαρακτηριστικό αστεροειδές σχήμα και εκτεταμένους ποδίσκους στις αποφυάδες τους, παίζουν καθοριστικό ρόλο στον σχηματισμό και τη διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Οι νευρώνες, ως οι κύριες λειτουργικές μονάδες του νευρικού συστήματος, είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση σημάτων. Χαρακτηρίζονται από μοναδικές μορφολογικές, συνδετικές και λειτουργικές ιδιότητες που τους επιτρέπουν να ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στις απαιτήσεις της νευρωνικής επικοινωνίας (35).

Ένας τυπικός νευρώνας αποτελείται από τρία βασικά μέρη: το κυτταρικό σώμα, τους δενδρίτες και τον νευράξονα. Η νόσος Alzheimer σχετίζεται με μεταβολές στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των νευρώνων, επηρεάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη συναπτική πλαστικότητα (36,37). Μελέτες έχουν δείξει ότι η γνωστική εξασθένηση σε ασθενείς με νόσο Alzheimer συνδέεται με μη φυσιολογική ηλεκτροφυσιολογική δραστηριότητα των νευρικών κυττάρων, καθώς και με ποιοτικές αλλά και ποσοτικές τροποποιήσεις στους δενδρίτες και στις δενδριτικές άκανθες (36,38). Οι δενδρίτες είναι λεπτές προεκτάσεις που εκφύονται από το κυτταρικό σώμα των νευρώνων και λειτουργούν ως σημεία υποδοχής για τα σήματα που προέρχονται από άλλους νευρώνες. Με τη

διακλάδωσή τους σε πρωτογενείς, δευτερογενείς κτλ, αυξάνουν την επιφάνεια υποδοχής, διευκολύνοντας την πρόσληψη σημάτων. Επιπλέον, μικρές προεξοχές, κομβοειδούς σχήματος, γνωστές ως δενδριτικές άκανθες προβάλλουν από τους δενδρίτες, παρέχοντας επιπλέον επιφάνεια μεμβράνης για την υποδοχή σημάτων. Οι δενδριτικές άκανθες, οι οποίες αποτελούν μετασυναπτικές περιοχές των περισσότερων διεργετικών συνάψεων, σχηματίζουν τα σημεία επαφής μεταξύ των νευρώνων. Αυτές οι μικροσκοπικές δομές παίζουν καθοριστικό ρόλο στις νευρωνικές συνδέσεις, επηρεάζοντας άμεσα τη συναπτική λειτουργία και, κατ' επέκταση, τη συνολική νευρωνική επικοινωνία (38).

Οι δενδριτικές άκανθες κατηγοριοποιούνται με βάση το μέγεθος και το σχήμα τους στις ακόλουθες κύριες κατηγορίες: 1) “filopodia”, 2) “stubby”, 3) “thin”, και 4) “mushroom” (38,39). Επιπλέον, έχουν περιγραφεί και άλλες μορφές, όπως οι “spine head protrusion” και “cup-shaped”, οι οποίες είναι λιγότερο γνωστές και σπανιότερες όσον αφορά στις μελέτες που εστιάζουν στη μορφολογική ανάλυση των ακανθών (39). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι δενδριτικές άκανθες υφίστανται συνεχείς μεταβολές, καθιστώντας αυτές τις κατηγορίες προσωρινές. Η κατηγορία “filopodia” περιλαμβάνει λεπτές, επιμήκεις προεκβολές που εκφύονται από τους δενδρίτες, χωρίς σαφώς ορατή κεφαλή. Αυτές οι άκανθες θεωρούνται οι πλέον δυναμικές, παίζοντας σημαντικό ρόλο κατά την πρώιμη μεταγεννητική ανάπτυξη, ενώ η συμμετοχή τους μειώνεται στη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Πρόκειται για τις μικρότερες σε μέγεθος άκανθες, οι οποίες ενδέχεται να αποτελούν πρόδρομες μορφές των “mushroom” ακανθών. Η κατηγορία “stubby” χαρακτηρίζεται από την απουσία διακριτού λαιμού ή κεφαλής και έχει υποθεθεί ότι μπορεί να αντιπροσωπεύει μια μορφή “mushroom” άκανθας χωρίς ανεπτυγμένο λαιμό. Στην κατηγορία “thin” περιλαμβάνονται άκανθες με μακρύ λαιμό και μικρή κεφαλή. Αυτές σχηματίζουν λειτουργικές συνάψεις λιγότερο συχνά συγκριτικά με τις “mushroom” άκανθες, ενώ η ασταθής δομή τους ενισχύει τη συναπτική πλαστικότητα. Τέλος, οι “mushroom” άκανθες χαρακτηρίζονται από λεπτό λαιμό και ευμεγέθη κεφαλή. Αναγνωρίζονται ως οι κύριες δομές που συμβάλλουν στην εδραίωση της μνήμης. Στους ενήλικους εγκεφάλους, οι άκανθες αυτής της κατηγορίας αντιπροσωπεύουν περίπου το 65% του συνολικού πληθυσμού των ακανθών. Διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαμόρφωση της μετασυναπτικής πυκνότητας (postsynaptic density), καθώς σχηματίζουν μεγάλα πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα που περιλαμβάνουν κανάλια ιόντων, υποδοχείς νευροδιαβιβαστών, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, συνδετικές πρωτεΐνες και ενδοκυττάρια σηματοδοτικές πρωτεΐνες (40).

Οι δενδριτικές άκανθες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων, καθώς αυτή διαμεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από τον αριθμό των

γλουταμινεργικών υποδοχέων. Οι σχετικές αλλαγές συνοδεύονται από μορφολογικές τροποποιήσεις τόσο στο σχήμα όσο και στον αριθμό των ακανθών, αναδεικνύοντας την ουσιαστική συμβολή τους στη συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων (41). Ο σχηματισμός νέων ακανθών καθώς και η ποικιλία στη μορφολογία τους εξαρτάται από τη νευρωνική διέγερση, κατά τη διάρκεια ερεθισμάτων όπως η μάθηση, η μνήμη, ή ακόμη και παθολογικές συνθήκες. Οι μορφολογικές αλλαγές των ακανθών συνδέονται με την αναδιοργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού, η οποία παίζει κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση των δομών αυτών (41). *In vitro* μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες νευρώνων έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια του μηχανισμού μακροπρόθεσμης ενδυνάμωσης (Long-term potentiation, LTP), το μέγεθος των κεφαλών των ακανθών αυξάνεται, ενώ παράλληλα σταθεροποιούνται πρόσφατα σχηματισθείσες άκανθες (42). Σε διάφορα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, παρατηρείται ότι οι προβλητικοί νευρώνες στους εγκεφάλους νεαρών ατόμων εμφανίζουν υψηλότερη πυκνότητα δενδριτικών ακανθών σε σύγκριση με εγκεφάλους ενηλίκων (43,44). Κατά τη διάρκεια της νεαρής ηλικίας, τα νευρωνικά δίκτυα υπόκεινται σε τροποποιήσεις, οι οποίες εν μέρει καθοδηγούνται από την ανάγκη σχηματισμού νέων συνάψεων. Με την πάροδο του χρόνου, οι δενδριτικές άκανθες, ως δυναμικές δομές, μειώνονται σε πυκνότητα. Η μείωση αυτή σχετίζεται είτε με την απώλεια υφιστάμενων ακανθών είτε με τη μειωμένη παραγωγή νέων, είτε με το συνδυασμό και των δύο παραγόντων. Επιπρόσθετα, μορφολογικές και μορφομετρικές αλλαγές στις δενδριτικές άκανθες έχουν καταγραφεί σε περιπτώσεις νευρολογικών διαταραχών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών, επισημαίνοντας τη συμβολή τους στη νευροπαθολογία (41,45). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε νεκροτομικό υλικό ασθενών με ήπια νόσο Alzheimer ή ήπια γνωστική διαταραχή (Mild Cognitive Impairment, MCI), παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον αριθμό των συνάψεων στην περιοχή CA1 του υποκάμπου σε σύγκριση με υγιείς εγκεφάλους (46). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη που χρησιμοποιήθηκε νεκροτομικό υλικό εγκεφάλου από πέντε ασθενείς με νόσο Alzheimer, η ενδοκυττάρια διάχυση της ειδικής χρωστικής Lucifer yellow έδειξε ότι τα νευροϊνιδιακά πλέγματα, αποτελούμενα από υπερφωσφορυλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης tau – χαρακτηριστικό εύρημα της νόσου – συνδέονται με προοδευτική εκφύλιση των δενδριτικών ακανθών (47). Πληθώρα *in vitro* χουν διερευνήσει τις επιδράσεις των κύριων παθοφυσιολογικών μηχανισμών της νόσου Alzheimer χρησιμοποιώντας πειραματικά μοντέλα (48). Στη μελέτη των Shankar et al., μελετήθηκε η επίδραση των μονομερών και ολιγομερών β-αμυλοειδούς (Aβ) σε τομές υποκάμπου. Τα αποτελέσματα έδειξαν σοβαρή αλλά αναστρέψιμη προοδευτική μείωση στην πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών στις τομές που εκτέθηκαν σε

ολιγομερές Αβ, σε σύγκριση με τομές χωρίς Αβ ή με την παρουσία μόνο μονομερούς Αβ (49). Επιπρόσθετα, σε μελέτη που χρησιμοποίησε ποντίκια ηλικίας 12 μηνών με γενετικό μοντέλο νόσου Alzheimer (Tg2576), τα οποία υπερεκφράζουν την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP), πυραμιδικά κύτταρα από τομές εγκεφαλικού φλοιού εμφάνισαν αύξηση στο μήκος των δενδριτών αλλά παράλληλη μείωση στην πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών σε σύγκριση με υγιή ποντίκια της ίδιας ηλικίας (50). Σε μοντέλο ποντικίου της νόσου Alzheimer το οποίο υπερεκφράζει το μεταλλαγμένο γονίδιο Presenilin 1 (PS1) – το οποίο αποτελεί κρίσιμο συστατικό του συμπλέγματος γ-σεκρετάσης, του ενζύμου που διασπά το Αβ από την πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς – παρατηρήθηκε ηλικιακά εξαρτώμενη μεταβολή στην πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών. Πιο συγκεκριμένα σε νεαρά ποντίκια (4-5 μηνών) με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, καταγράφηκε αυξημένη πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών στους πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιππόκαμπου. Ωστόσο, σε μεγαλύτερης ηλικίας ποντίκια (8-10 μηνών), παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον αριθμό των ακανθών της κατηγορίας “ramified” (51). Σε ακόμη μία μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε ένα διαφορετικό μοντέλο της νόσου Alzheimer (Apoε4), οι πυραμιδικοί νευρώνες της περιοχής CA1 παρουσίασαν σημαντική μείωση στο μήκος των δενδριτών, καθώς και στη πυκνότητα και τον όγκο των κεφαλών των ακανθών, σε σύγκριση με υγιή νευρικά κύτταρα (52). Επιπλέον, σε μια μορφολογική μελέτη πυραμιδικών νευρώνων που χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο μυός P301L pR5, το οποίο εκφράζει υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau, καταγράφηκε αξιοσημείωτη μείωση στο μήκος των δενδριτών. Παρά το γεγονός ότι δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον συνολικό αριθμό των ακανθών μεταξύ των μυών P301L pR5 και των υγιών, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στις άκανθες των κατηγοριών “stubby” και “filopodia” στους μύες οι οποίοι έφεραν τη μετάλλαξη. Οι συγγραφείς ωστόσο της μελέτης τόνισαν την αντίφαση των ευρημάτων τους σε σχέση με άλλες πειραματικές έρευνες, υποδεικνύοντας ότι η εμφάνιση της παθολογίας μπορεί να εξαρτάται από την ηλικία στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο ποντικίου (53). Σε πρόσφατη μελέτη των Rolland et al., καταγράφηκε μείωση της πυκνότητας των δενδριτικών ακανθών σε νευρικά κύτταρα τα οποία έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP). Η μείωση αυτή ήταν ανάλογη της απόστασης των εναποθέσεων ολιγομερών Αβ από τα νευρικά κύτταρα. Επιπλέον, εκτός από τις μορφολογικές μεταβολές στη συναπτική πλαστικότητα, παρατηρήθηκαν σημαντικές ηλεκτροφυσιολογικές διαταραχές στα νευρικά κύτταρα λόγω της παρουσίας του Αβ, τόσο σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων όσο και σε τομές εγκεφαλικού φλοιού και ιππόκαμπου (54). Τέλος, σε πυραμιδικούς νευρώνες ποντικών με την μετάλλαξη APP/PS1 – ένα από τα

πλέον γνωστά πειραματικά μοντέλα για τη νόσο Alzheimer, καταγράφηκε σημαντική μείωση στο μήκος και την επιφάνεια των δενδριτών, καθώς και στον αριθμό των ακανθών, σε σύγκριση με νευρικά κύτταρα υγιών ποντικών (37). Αξιοσημείωτο είναι ότι η συνδυαστική ανάλυση ηλεκτροφυσιολογικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των νευρικών κυττάρων στη νόσο Alzheimer προσφέρει μια πιο λεπτομερή και τεκμηριωμένη κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της νόσου. Αυτή η ολοκληρωμένη προσέγγιση είναι κρίσιμη για τον σχεδιασμό φαρμακευτικών θεραπειών που στοχεύουν συγκεκριμένα μοριακά μονοπάτια.

1.6.4. Νευροφυσιολογικές και μορφολογικές αλλαγές στην AD.

Τα νευρικά κύτταρα έχουν διακριτές μοριακές, μορφολογικές, συνδεσμικές και λειτουργικές ιδιότητες και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να τροποποιούν τη δραστηριότητά τους ως απόκριση σε ενδογενή ή εξωγενή ερεθίσματα, ανακατασκευάζοντας την αρχιτεκτονική, τις λειτουργίες και τις συνδέσεις τους.(35) Το χαρακτηριστικό αυτό είναι γνωστό ως νευρωνική πλαστικότητα (neuronal plasticity) και αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα του νευρικού συστήματος (55,56). Έχει αποδειχθεί ότι η παθολογία της AD σχετίζεται με ανώμαλη νευρωνική διεγερσιμότητα μαζί με μεταβολές στη συναπτική πλαστικότητα (synaptic plasticity) (36,37). Αυτή η ανώμαλη ηλεκτρική δραστηριότητα, που προκαλείται από τη συναπτική αποσύνθεση, αποτελεί το κύριο παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό της γνωστικής δυσλειτουργίας. Οι μεταβολές αυτές αντικατοπτρίζονται σε ποσοτικές και ποιοτικές τροποποιήσεις στους δενδρίτες και τις δενδριτικές άκανθες. Κατά συνέπεια, ο συνδυασμός των μορφολογικών χαρακτηριστικών και της αξιολόγησης των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των νευρώνων παρέχει ολοκληρωμένες πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη της παθοφυσιολογίας της AD (36,38). Αξιολογώντας τις επιδράσεις των μονομερών και ολιγομερών Αβ σε φέτες υποκάμπου επίμυων φυλής Sprague Dawley (SD), οι Shankar et al. παρατήρησαν σημαντική αλλά αναστρέψιμη, προοδευτική μείωση της πυκνότητας των δενδριτικών ακανθών σε φέτες με ολιγομερή Αβ, ενώ οι φέτες ελέγχου και οι φέτες με μονομερή Αβ δεν παρουσίασαν καμία διαφορά. Πρόσθετες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές σε πυραμιδικούς νευρώνες του υποκάμπου με Αβ ολιγομερή, χρησιμοποιώντας whole-cell διαμόρφωση, έδειξαν αμετάβλητη χωρητικότητα της μεμβράνης, αλλά μειωμένη αντίσταση ηρεμίας της μεμβράνης και μειωμένο πλάτος mEPSCs (49).

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και οι φυσιολογικές ιδιότητες διερευνήθηκαν σε ένα διαφορετικό μοντέλο μυός με AD, ηλικίας 12 μηνών, το Tg2576, που υπερεκφράζει

μεταλλαγμένο APP, σε σύγκριση με το αντίστοιχο του αγρίου τύπου. Ανεξάρτητα από τον περιορισμένο αριθμό των ζώων που συμπεριλήφθηκαν, τα πυραμιδικά κύτταρα της στιβάδας 3 από φέτες του μετωπιαίου φλοιού παρουσίασαν αύξηση του δενδριτικού μήκους και του όγκου, αλλά μείωση της πυκνότητας των ακάνθων, ενώ η πολυπλοκότητα του δενδριτικού δέντρου καθώς και ο συνολικός αριθμός των ακάνθων δεν έφεραν καμία διαφορά. Είναι ενδιαφέρον ότι οι whole-cell καταγραφές των διαγονιδιακών νευρώνων δεν παρουσίασαν καμία διαφορά σε σύγκριση με τους νευρώνες αγρίου τύπου σχετικά με τις ποσοτικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης, τα αυθόρμητα EPSCs, το δυναμικό ενέργειας και τις συχνότητες πυροδότησης. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η διατήρηση των ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων των πυραμιδικών νευρώνων από Tg2576 μύες σε σύγκριση με τη μειωμένη πυκνότητα των δενδριτικών ακάνθων, μπορεί να αποδοθεί στον αυξημένο δενδριτικό όγκο, καθώς και στη χαμηλή έκφραση και την σοβαρότητα της παθολογίας που επιφέρει Αβ σε αυτό το πειραματικό μοντέλο (50).

Μια νεότερη μελέτη με έντονο ενδιαφέρον, διερεύνησε τη συσχέτιση μεταξύ των μορφολογικών αλλοιώσεων και των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των πυραμιδικών νευρώνων CA1 καθώς και τη σχέση τους με τη γνωστική απώλεια στην AD. Η ανάλυση επικεντρώθηκε σε βιοψίες εγκεφάλου από ασθενείς με AD σε συνδυασμό με ποντίκια APP/PS1 knock-in (APP/PS1-KI) ηλικίας μεταξύ 3 και 6 μηνών. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια εξαρτώμενη από την ηλικία μείωση της νευρωνικής και συναπτικής πυκνότητας στην στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων στην περιοχή CA1 σε ποντίκια ηλικίας 6 μηνών με APP/PS1-KI. Ωστόσο, το μήκος των ακανθών συρρικνώθηκε και η διάμετρος του αυχένα των ακάνθων αυξήθηκε στους Tg μύες και στους ασθενείς με AD. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα δεν αναφέρονταν στους νεότερους μύες, καθώς οι μορφολογικές αλλοιώσεις των ακάνθων προέκυψαν πριν από τη μείωση της πυκνότητας των συνάψεων και των νευρώνων. Επιπλέον, η ηλεκτροφυσιολογική ανάλυση με whole-cell διαμόρφωση των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 σε 8 ποντίκια ελέγχου και 8 ποντίκια APP/PS1-KI αποκάλυψε αμετάβλητο πλάτος ή συχνότητα των mEPSPs. Αντίθετα, η εφαρμογή ηλεκτρικής διέγερσης προκάλεσε χαμηλότερο LTP σε Tg μύες ηλικίας 3 μηνών. Αυτό συνδέθηκε με μεταβολές της μορφολογίας των ακάνθων πριν παρατηρηθεί η απώλεια συναπτικών και κυτταρικών δομών σε μεγαλύτερα πειραματικά μοντέλα (57). Αφαίρεση γιατί επαναλαμβάνεται και ποιο κατω ακριβώς.

Μια πρόσθετη μελέτη που περιλάμβανε μύες που υπερεκφράζουν το μεταλλαγμένο PS1 (mutPS1), αποκάλυψε αυξημένη μεταφορά νευροδιαβιβαστών μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα NMDA σε νεαρούς μύες, αν και η επίδραση αυτή μειώθηκε σε μεγαλύτερους ηλικίας μύες που έφεραν την μεταλλαγή mutPS1 και σε αντίστοιχης ηλικίας μύες αγρίου

τύπου που υπερεκφράζουν ανθρώπινο PS1 (hPS1). Οι αλλαγές που περιγράφηκαν στους νεαρούς μεταλλαγμένους μύες συνδέθηκαν περαιτέρω με σημαντικά αυξημένη πυκνότητα δενδριτικών ακάνθων στους πυραμιδικούς νευρώνες CA1, ενώ στους μεσήλικες μύες που υπερεκφράζουν για τα hPS1 και mutPS1, ο αριθμός των διακλαδισμένων ακάνθων μειώθηκε. Έτσι, η μείωση των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων συνοδεύτηκε από την ηλικιακή εξαρτώμενη υπερέκφραση του PS1, αλλά και η αύξηση της πυκνότητας των ακάνθων δεν διατηρήθηκε στους ηλικιωμένους μύες, με τα κύρια αποτελέσματα να υποδεικνύουν μη φυσιολογική συναπτική πλαστικότητα και στα νεότερα ζώα (51). Σύμφωνα με μια άλλη μορφολειτουργική αξιολόγηση των CA1 πυραμιδικών νευρώνων από μύες με μετάλλαξη P301L pR5, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του συνολικού δενδριτικού μήκους, ιδιαίτερα στους απομακρυσμένους κορυφαίους δενδρίτες και στον αριθμό των απομακρυσμένων κορυφαίων δενδριτικών κομβίων. Παρόλο που δεν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα στον συνολικό αριθμό αιχμών μεταξύ των μεταλλαγμένων μυών και των μυών αγρίου τύπου, οι μύες P301L pR5 παρουσίασαν μεγάλη αύξηση των πεπαχυσμένων και κοντών ακάνθων και των φιλοποδίων (filopodia) στα εγγύς, μεσαία και άπω διαμερίσματα του κορυφαίου δενδριτικού δέντρου. Μεταξύ διαφόρων νευροφυσιολογικών εγγενών ιδιοτήτων, όπως το πλάτος, η διάρκεια των EPSPs και η ενδυνάμωση των συζευγμένων παλμών (PPF), που παρέμειναν αμετάβλητες, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση, μετά από περίοδο 10 λεπτών, στο πλάτος των field EPSPs λόγω διέγερσης υψηλής συχνότητας (HFS), καθώς και στον ουδό πυροδότησης δυναμικού ενέργειας στους νευρώνες pR5. Επιπλέον, διαπιστώθηκε αυξημένο ρεύμα από των διορθωτικών προς τα έξω διαύλων καλίου στους πυραμιδικούς νευρώνες με μεταλλαγμένη την tau πρωτεΐνη. Δεδομένης της εξαρτώμενης από την ηλικία επαγωγής μέτριας tau-πάθειας του μοντέλου μυός pR5, οι συγγραφείς τόνισαν ορισμένα αντιφατικά αποτελέσματα σε σχέση με άλλες μελέτες και την πιθανότητα πολλοί νευρώνες να μην εξέφραζαν τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη tau (53). Η μελέτη των Rolland et al., έδειξε ότι η εφαρμογή εξωκυττάρων ολιγομερών Αβ μείωσε σημαντικά τις συχνότητες των sEPSPs των διαύλων AMPA/kainate, που προέκυψαν από τη μειωμένη νευρωνική διεγερσιμότητα, αλλά δεν άλλαξε τα πλάτη των sEPSPs των διαύλων AMPA/kainate σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων του φλοιού. Επιπλέον, τα πλάτη και οι συχνότητες των eEPSPs των διαύλων NMDA μειώθηκαν παρουσία εξωκυττάρων ολιγομερών Αβ, με το τελευταίο να παρουσιάζει δοσοεξαρτώμενη επίδραση, καθώς μείωση των συχνοτήτων καταγράφηκε και σε χαμηλότερη συγκέντρωση Αβ. Παρόμοια επίδραση καταγράφηκε εξαιτίας και ενδοκυττάρων ολιγομερών Αβ που μείωσαν τα πλάτη των eEPSC των διαύλων NMDA, αλλά όχι τις συχνότητες των eEPSC των διαύλων NMDA και τα πλάτη των eEPSC των διαύλων AMPA/kainate σε πρωτογενείς

φλοιώδεις νευρώνες και φέτες φλοιού. Αυξημένα επίπεδα εκκρινόμενης Αβ στον εξωκυττάριο χώρο από μεταλλαγμένους για την APP νευρώνες διατάραξαν τη συναπτική λειτουργία των γειτονικών υγιών νευρώνων, προκαλώντας μείωση της πυκνότητας των δενδριτικών ακάνθων ανάλογη με την απόσταση από τον μεταλλαγμένο για την APP νευρώνα. Σε μια διέγερση θ-ριπής, η εφαρμογή ολιγομερών Αβ μείωσε το LTP σε φέτες ιπποκάμπου της περιοχής CA1 από μύες αγρίου τύπου και η επίδραση μπορούσε να αντιστραφεί παρουσία ενεργής β-σεκρετάσης. Οι συγγραφείς υπογράμμισαν τον ζωτικό ρόλο της έκθεσης των εξωκυττάρων ολιγομερών Αβ στην κατεργασία του APP μέσω της αμυλοειδογενούς οδού (54).

Μια μελέτη που πραγματοποίησε *in vivo* whole-cell patch clamp, αποκάλυψε νευρωνική υπερδιεγερσιμότητα σε πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου από μύες APP/PS1. Οι διαγονιδιακοί πυραμιδικοί νευρώνες είχαν αυξημένη συχνότητα δυναμικού ενέργειας, ενώ η εκρηκτική πυροδότηση (bursting firing) ήταν το κυρίαρχο μοτίβο ενεργοποίησης. Ομοίως, η αντίσταση εισόδου στο σώμα ήταν αυξημένη, με τα παραπάνω αποτελέσματα να έρχονται σε συμφωνία με πειράματα σε φέτες ιπποκάμπου της περιοχής CA1 από μύες APP/PS1 με αντίστοιχη ηλικία. Μορφολογικά, οι πυραμιδικοί νευρώνες από τους μύες APP/PS1 παρουσίασαν σημαντική μείωση του δενδριτικού μήκους και της επιφάνειας, καθώς και του αριθμού των δενδριτικών διακλαδώσεων σε σύγκριση με τους όμοιας ηλικίας μύες αγρίου τύπου. Παρόλο που η πυκνότητα των διακλαδώσεων των ακάνθων στη μοριώδη βοθρίωδη στιβάδα μειώθηκε σημαντικά, η πυκνότητα των ακάνθων διατηρήθηκε στην ακτινωτή στιβάδα και στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (37).

Συσσωρευμένα στοιχεία περιλαμβάνουν την παρουσία Αβ με συναπτική καταστολή και απώλεια δενδριτικών ακάνθων. Πειράματα *in vitro* σε οργανοτυπικές καλλιέργειες πυραμιδικών νευρώνων της περιοχής CA1 διαμολυσμένων με cDNA που κωδικοποιεί για την APP και το EGFP αποκάλυψαν 31% μείωση της πυκνότητας των δενδριτικών ακάνθων σε σύγκριση με αυτά του ελέγχου. Επίσης, η επώαση των κυττάρων με συνθετικό Αβ₁₋₄₂ για 7 ημέρες έδειξε τα ίδια αποτελέσματα. Σε επίπεδο σύναψης, η γλουταμεργική συναπτική διαβίβαση ήταν κατεσταλμένη λόγω της παραγωγής Αβ. Τα αυξημένα επίπεδα Αβ προκάλεσαν μείωση των υποδοχέων AMPA, η οποία μεταφράστηκε σε συναπτική καταστολή σε σύγκριση με τον έλεγχο και παρουσίασε αυξημένα συναπτικά ρεύματα που μεσολαβούνταν από υποδοχείς AMPA. Τα δεδομένα αυτά αποκάλυψαν τη σημασία των υποδοχέων AMPA στη μορφολογία των νευρώνων και στις συνάψεις (58).

1.6.5 Πειραματικά μοντέλα της AD.

Τα ζωικά μοντέλα αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για την αξιολόγηση νέων θεραπευτικών στρατηγικών για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών, καθώς και για τη μελέτη των παθολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στις διαδικασίες των νόσων. Λόγω της έλλειψης πλήρους κατανόησης της αιτιολογίας της AD, όλα τα διαθέσιμα μοντέλα εμφανίζουν περιορισμούς, οι οποίοι πρέπει να λαμβάνονται προσεκτικά υπόψη κατά τη χρήση τους. Δεν υπάρχουν φυσικά μοντέλα της AD, οπότε το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας διεξάγεται με μοντέλα που προσομοιάζουν τους φαινοτύπους όπως τα διαγονιδιακά μοντέλα πειραματοζώων, αλλά και εκείνα στα οποία η επαγωγή της συμπτωματολογίας της νόσου γίνεται με χημικούς παράγοντες. Πολυάριθμα είδη πειραματόζων έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μοντελοποίηση διαφόρων πτυχών της AD. Αρχικά, ο επίμυς ήταν το είδος που προτιμήθηκε, αλλά κατά την τελευταία δεκαετία η αυξανόμενη γνώση των προηγμένων γενετικών τεχνικών που αναπτύχθηκαν στον μυ, σε συνδυασμό με την ανακάλυψη γονιδιακών μεταλλάξεων που προκαλούν τις οικογενείς μορφές της AD, επέτρεψαν τη δημιουργία ενός αυξανόμενου αριθμού διαγονιδιακών μοντέλων μυών. Τα τελευταία χρόνια, όμως, ο επίμυς επανέρχεται ως μοντέλο για τη μελέτη της AD. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι γι' αυτό, όπως η αλληλουχία του γονιδιώματός του, οι πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία τροποποίησης του γονιδιώματός του καθώς και η φτωχή προβλεπτική ικανότητά των μοντέλων μυών ως προς την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό (59).

Τα διαγονιδιακά μοντέλα τρωκτικών (Tg) στοχεύουν στην αναπαραγωγή των παθολογικών και συμπεριφορικών χαρακτηριστικών των ασθενών με AD, με την ελπίδα να διερευνήσουν τα μακρά και σε μεγάλο βαθμό σιωπηλά προδρομικά στάδια της νόσου. Ο Cohen και οι συνεργάτες του δημιούργησαν ένα μοντέλο αρουραίου Tg (TgF344-AD) το οποίο εκφράζει την ανθρώπινη πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (APP) με τη σουηδική μετάλλαξη και τη μεταλλαγμένη ανθρώπινη πρεσενιλίνη-1 χωρίς το εξώνιο 9 (PSEN1dE9). Πολλές μελέτες έχουν πρόσφατα καταδείξει την υπόσχεση του αρουραίου TgF344-AD για τη μοντελοποίηση και τον εμπλουτισμό της κατανόησης των παθολογικών και γνωστικών αλλαγών που σχετίζονται με την ανθρώπινη AD. Συγκεκριμένα, οι αρουραίοι TgF344-AD αναπτύσσουν διαλυτά ολιγομερή του β-αμυλοειδούς (Aβ) που αργότερα συσσωρεύονται σε πλάκες Aβ, καθώς και ενδογενή υπερφωσφορυλιωμένη tau η οποία οδηγεί σε δομές που μοιάζουν με νευροϊνιδικά συσσωματώματα και αναπτύσσονται με τρόπο που εξαρτάται από την ηλικία. Επιπλέον, το μοντέλο αυτό παρουσιάζει νευροφλεγμονή, εγκεφαλοαγγειακή

δυσλειτουργία, μειωμένη συναπτική μετάδοση και απώλεια νευρώνων στις περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη AD (60–63).

Όπως προαναφέρθηκε, εκτός από τα διαγονιδιακά μοντέλα τρωκτικών για τη μελέτη της AD, υπάρχουν και μοντέλα στα οποία η συμπτωματολογία της νόσου έχει επαχθεί με χημικό τρόπο. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα, είναι μέσω της επαγωγής της υφιστάμενης παθολογίας με τη χρήση χλωριδίου του αργίλου (AlCl_3). Το AlCl_3 χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για την επαγωγή της άνοιας σε πολυάριθμα ζωικά μοντέλα. Το αργίλιο είναι μια καλά μελετημένη νευροτοξίνη και αφορά την εξέλιξη πολλών νευρολογικών παθήσεων. Το αργίλιο μπορεί να δράσει ως συνδετικός παράγοντας της πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς και έχει ως αποτέλεσμα τον ολιγομερισμό της, επάγοντας έτσι τη νευροτοξικότητα. Επιπλέον, έχει ήδη αναφερθεί ότι η συνεχής έκθεση σε AlCl_3 θα μπορούσε να προκαλέσει άνοια σε αρουραίους του στελέχους Wistar (64).

1.6.6 Διάγνωση της AD.

Η έγκαιρη ανίχνευση είναι καθοριστικής σημασίας στις περισσότερες ασθένειες, ιδίως στη AD, καθώς μελέτες έδειξαν ότι η έγκαιρη παρέμβαση συνεπάγεται καλύτερη πρόγνωση (65). Η διάγνωση μπορεί να περιπλέκεται λόγω των πρώιμων συμπτωμάτων που μπορούν να αναφερθούν μόνο από τους ασθενείς και τους φροντιστές, καθώς η AD δεν είναι εύκολα ανιχνεύσιμη και δεν ελέγχεται συστηματικά στην κλινική πρακτική. Μια κατευθυντήρια γραμμή υπό την καθοδήγηση των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας και της Εταιρείας Alzheimer αναφέρει ότι η AD μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια, το προκλινικό όπου υπάρχουν ενδείξεις συσσώρευσης αμυλοειδούς ή αλλαγές στα νευρικά κύτταρα αλλά δεν υπάρχουν σημαντικά κλινικά συμπτώματα, την ήπια γνωστική εξασθένηση όπου τα συμπτώματα απώλειας μνήμης και άλλων προβλημάτων στη συλλογιστική πορεία είναι μεγαλύτερα από το φυσιολογικό για την ηλικία και τη μόρφωση του ασθενούς, αλλά δεν επηρεάζουν την ανεξαρτησία του και το τελικό στάδιο που είναι η επιβεβαιωμένη άνοια Alzheimer (66). Η διαγνωστική εξέταση είναι ζωτικής σημασίας, καθώς είναι σε θέση να προσδιορίσει το επίπεδο σοβαρότητας των ασθενών με AD, ενώ παράλληλα λειτουργεί ως σημείο ένδειξης για την παρακολούθηση της εξέλιξης των συμπτωμάτων στο μέλλον.

Εάν υπάρχει υποψία ότι ένα άτομο πάσχει από AD, ο ιατρός συνήθως ακολουθεί μια ενιαία κατευθυντήρια γραμμή για να επιβεβαιώσει τη διάγνωση. Το πρώτο βήμα είναι η διενέργεια νευροψυχολογικής εξέτασης για τον προσδιορισμό του συγκεκριμένου τύπου και επιπέδου γνωστικής εξασθένησης που παρουσιάζει ο ασθενής. Ορισμένες δοκιμασίες θα αποκαλύψουν επίσης τα πλεονεκτήματα και τις διατηρούμενες ικανότητες του ασθενούς.

Αυτές οι πληροφορίες είναι ζωτικής σημασίας, καθώς βοηθούν στη δημιουργία ενός σχεδίου θεραπείας στο μέλλον. Οι δοκιμασίες χορήγησης αναπτύχθηκαν μέσω ερευνών που μελετούν τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη μνήμη, την προσοχή, τη συγκέντρωση, τη συλλογιστική και την ικανότητα επίλυσης προβλημάτων εκτός από την εκμάθηση νέων πληροφοριών. Οι τύποι νευροψυχολογικών αξιολογήσεων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της AD περιλαμβάνουν :

- την Κλίμακα Αξιολόγησης της AD- Γνωστική (ADAS-Cog),
- την Κλίμακα Αξιολόγησης της Συμπεριφορικής Παθολογίας στην AD (BEHAVE-AD),
- την Αυτοματοποιημένη Κλίμακα Νευροψυχολογικών Δοκιμών του Cambridge (CANTAB) και
- την Κλίμακα Αξιολόγησης της Άνοιας - 2 (DRS-2).

Οι δοκιμασίες που θα διεξαχθούν θα επικεντρωθούν στην προσοχή του ασθενούς, τα χαρακτηριστικά συμπεριφοράς, τη γλώσσα, την εκτελεστική λειτουργία και τις δεξιότητες μνήμης (67). Θα διενεργηθεί επίσης μια τυπική εξέταση αίματος και ούρων για να αποκλειστούν άλλες πιθανές αιτίες απώλειας μνήμης ή σύγχυσης που σχετίζονται με άλλες ιατρικές παθήσεις, όπως διαταραχή του θυρεοειδούς, ανεπάρκεια βιταμίνης B12 ή κατάθλιψη. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι η κύρια αιτία της AD οφείλεται στην ταχεία πρόοδο του εκφυλισμού των νευρώνων, επομένως ο καλύτερος τρόπος παρακολούθησης είναι μέσω απεικονιστικών εξετάσεων του εγκεφάλου. Οι ιατροί συστήνουν συνήθως τη διενέργεια μαγνητικής τομογραφίας (MRI) για λεπτομερή απεικόνιση του εγκεφάλου, αξονικής τομογραφίας (CT) για εγκάρσια τομή του εγκεφάλου και τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET), η οποία θα απεικονίσει το πρότυπο μεταβολικών αλλαγών που υποδεικνύουν εκφυλισμό των νευρικών κυττάρων. Στη μαγνητική τομογραφία μπορεί να παρατηρηθεί ένας ευαίσθητος δείκτης της AD που είναι η ατροφία του μέσου κροταφικού λοβού και μπορεί να υποδεικνύει την εξέλιξη της νόσου (68). Υπάρχουν τρεις τύποι απεικόνισης PET, ωστόσο μόνο οι σαρώσεις PET φθοριοδεοξυγλυκόζης που απεικονίζουν περιοχές με ανεπαρκή μεταβολισμό της γλυκόζης χρησιμοποιούνται συνήθως στην κλινική πρακτική. Από την άλλη πλευρά, οι απεικονίσεις PET Amyloid και Tau PET εφαρμόζονται κυρίως στην έρευνα, ώστε να μετρηθεί το φορτίο των εναποθέσεων αμυλοειδούς και των νευροϊνιδιακών ινιδίων αντίστοιχα (69). Αν και ο γενετικός έλεγχος είναι επίσης διαθέσιμος, δεν συνιστάται συνήθως για την αξιολόγηση της AD, με εξαίρεση τους ασθενείς υψηλού κινδύνου που είναι γνωστό ότι έχουν ισχυρό οικογενειακό ιστορικό Πρώιμης Έναρξης AD (EOAD). Επιπλέον, οι ασθενείς παραπέμπονται επίσης σε γενετικό αναλυτή για να συζητήσουν τις επιλογές τους πριν υποβληθούν σε οποιαδήποτε γενετική εξέταση, καθώς τα τελικά αποτελέσματα μπορεί

κάλλιστα να αλλάξουν τη ζωή τους. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει καμία αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή για την AD, είναι σημαντικό να εντοπιστούν οι παράγοντες κινδύνου της AD, ιδίως στα προκλινικά και προδρομικά στάδια της νόσου, με στόχο τη μοντελοποίηση της πορείας της νόσου, εκτός από την ανάπτυξη νέων στόχων για την έγκαιρη παρέμβαση στη νόσο. Μελέτη έχει δείξει ότι πριν από την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων, μπορεί να παρατηρηθεί ένα προδιαγεγραμμένο μοτίβο της πορείας της νόσου. Η έγκαιρη παρέμβαση μπορεί να διαταράξει αυτόν τον καταρράκτη και να αποτελέσει το κλειδί για τη διακοπή της εξέλιξης της AD (70).

1.6.7 Θεραπευτικές προσεγγίσεις απέναντι στην AD.

Ο σχεδιασμός πολλών φαρμακευτικών σκευασμάτων ξεκίνησε εδώ και μεγάλο χρονικό διάστημα για την καταπολέμηση των επιδεινούμενων επιδράσεων που επιφέρει η AD στη μνήμη και τη γνωστική λειτουργία του ατόμου. Τα φάρμακα αυτά δημιουργήθηκαν αρχικά με βάση τη χολινεργική και τη γλουταματεργική υπόθεση. Η χολινεργική υπόθεση είναι η παλαιότερη θεωρία που προτάθηκε για να εξηγήσει την αιτιολογία και τους μηχανισμούς πίσω από τα νευροψυχιατρικά συμπτώματα που συνδέονται με την AD, η οποία υποθέτει την απώλεια των χολινεργικών νευρώνων και των ενζυμικών λειτουργιών στην αμυγδαλή, το βασικό πρόσθιο εγκέφαλο, το φλοιό και τις περιοχές του υποκάμπειου σχηματισμού στο ΚΝΣ ως καθοριστικούς παράγοντες (71,72). Η μείωση των νικοτινικών υποδοχέων $\alpha 7$ ή $\alpha 4\beta 2$ της ακετυλοχολίνης (nAChRs) και των μουσκαρινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης M2 (mAChRs) στους προσυναπτικούς και μετασυναπτικούς νευρώνες θεωρείται επίσης υπεύθυνη για την εξέλιξη της AD (73,74). Η γαλανταμίνη, η ριβαστιγμίνη και η δονεπεζίλη είναι μεταξύ των αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης (ChEIs) που έχουν εγκριθεί ως συνήθης φαρμακευτική αγωγή για την παρεμπόδιση της υδρολυτικής δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) στην ακετυλοχολίνη (ACh) και την ενίσχυση του χολινεργικού συστήματος (75). Αυτό εξασφαλίζει την επιτυχή σύνδεση της ACh με τους nAChRs και τους mAChRs, η οποία συμβάλλει στη διατήρηση των επιπέδων της ACh, ακολουθούμενη από ρύθμιση της νευροδιαβίβασης. Η μεμαντίνη, από την άλλη πλευρά, στοχεύει στον υποδοχέα γλουταμινικού N-μεθυλ-δασπαρτικού (NMDA) για να αποτρέψει την εισροή ενδοκυττάρου ασβεστίου (Ca^{2+}) και την επακόλουθη διεγερτικοτοξικότητα που προκαλεί εκφύλιση των νευρώνων στη AD (76). Η αποτελεσματικότητα των ChEIs και της μεμαντίνης στην ενίσχυση της χολινεργικής λειτουργίας έχει διερευνηθεί επανειλημμένα σε διάφορες διπλά τυφλές, τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές και έχει αναφερθεί σε συστηματικές ανασκοπήσεις (77,78).

Αποδείχθηκε ότι οι ασθενείς με AD μετά την πρόσληψη ChEIs και μεμαντίνης σημείωσαν πρόοδο στη γνωστική λειτουργία, όπως υποδεικνύεται από τα εργαλεία γενικής αξιολόγησης.

I. Γαλανταμίνη.

Η γαλανταμίνη είναι ένας ανταγωνιστικός και αντιστρεπτός αναστολέας που δεσμεύεται δυναμικά στην αλλοστερική περιοχή των nAChRs (79,80). Περισσότερες από μία συστηματικές ανασκοπήσεις έχουν διατυπώσει την κλινική σημασία της γαλανταμίνης κατά της ήπιας έως μέτριας μορφής AD. Σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου, οι ασθενείς με AD στους οποίους χορηγήθηκε δόση 24 mg και 32 mg γαλανταμίνης ημερησίως παρουσίασαν αυξημένη γνωστική απόδοση, όπως υποδεικνύεται από τον επιτευχθέντα μέσο όρο 2,9 και 3,1 μονάδων αντίστοιχα (81). Η μεταγενέστερη αξιολόγηση των γνωστικών ικανοτήτων των ασθενών μετά από 24 mg/ημέρα γαλανταμίνης κατέδειξε ελπιδοφόρα και ομοιόμορφα αποτελέσματα καθ' όλη τη διάρκεια των 6 έως 12 μηνών. Οι ασθενείς που υποβλήθηκαν στην ίδια ευέλικτη κλιμάκωση της δόσης της γαλανταμίνης (24-32 mg/ημέρα) σε διάστημα 4 εβδομάδων, ανέφεραν επίσης υψηλότερη επάρκεια στη διαχείριση βασικών καθημερινών δραστηριοτήτων σε βασικό και οργανικό επίπεδο (82). Παρ' όλα αυτά, τα ανεπιθύμητα προβλήματα υγείας, τα οποία είναι κυρίως ναυτία και γαστρεντερικά, εξακολουθούν να είναι παρόντα σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών, γεγονός που τους ωθεί να εγκαταλείψουν τα θεραπευτικά οφέλη και τη διαδικασία της θεραπείας.

II. Ριβαστιγμίνη.

Η ριβαστιγμίνη, δρα ως ένας τύπος αργά αναστρέψιμου καρβαμικού αναστολέα έναντι τόσο της AChE όσο και της βουτυρυλοχολινεστεράσης (BuChE), οι οποίες είναι κυρίως έντονες στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό του πάσχοντος από την AD εγκεφάλου (83,84). Σε μια μελέτη διάρκειας 26 εβδομάδων εξετάστηκαν οι κλινικές επιδράσεις που άσκησαν σταθερές δόσεις ριβαστιγμίνης (3, 6, 9 mg/ημέρα) στη μεταβολική δραστηριότητα του εγκεφάλου 27 ατόμων με ήπια έως μέτρια πιθανή AD (85). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου που προέκυψαν με τη χρήση τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων με χρήση 18F-φθοροδεοξυγλυκόζης (FDG-PET), υπήρξε στατιστικά σημαντική βελτίωση ($p < 0,01$) στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με ριβαστιγμίνη, όπως φαίνεται από την αύξηση του μεταβολισμού του υπόκαμπου (32,5%) σε σύγκριση με τη μη σημαντική μείωση στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν (6,4%) και στους ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο (4,1%) (86). Τα άτομα που συμπεριλήφθηκαν ήταν όλα ηλικιωμένα με μέση ηλικία 75 ετών και διαγνωσμένα με ήπια έως μέτρια AD. Μετά από 26 εβδομάδες θεραπείας με

ριβαστιγμίνη, παρατηρήθηκαν υψηλότερες συνολικές βαθμολογίες γνωστικής αξιολόγησης στους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε από του στόματος χορήγηση ριβαστιγμίνης (6-12 mg/ημέρα) ή διαδερμικών σκευασμάτων επιθέματος (9,5 mg/ημέρα) σε σύγκριση με εκείνους που τοποθετήθηκαν στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Είναι ενδιαφέρον ότι ορισμένες από τις δοκιμές δεν ανέφεραν αλλαγές όσον αφορά τη συμπεριφορά. Παρόλο που η ριβαστιγμίνη παρήγαγε ικανοποιητικά γνωστικά αποτελέσματα, οι ασθενείς που έλαβαν ριβαστιγμίνη ανέφεραν διπλάσιες πιθανότητες να εμφανίσουν ορισμένες παρενέργειες, όπως ναυτία, ζάλη και έμετο, με εκείνους που έλαβαν κάψουλες να έχουν ελαφρώς υψηλότερο κίνδυνο σε αντίθεση με εκείνους που προτιμούν τα δερματικά επιθέματα.

III. Δονεπεζίλη.

Η δονεπεζίλη, επίσης γνωστή ως υδροχλωρική δονεπεζίλη, είναι ένας μη ανταγωνιστικός και αναστρέψιμος αναστολέας της AChE που έχει εγκριθεί εδώ και αρκετά χρόνια και συγκεκριμένα από το 1996 για τη συμπτωματική θεραπεία της ήπιας έως μέτριας μορφής AD (87). Μια μελέτη στην Ιαπωνία αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα της θεραπείας 24 εβδομάδων με δονεπεζίλη (5 mg/ημέρα) σε 268 ασθενείς που έπασχαν από ήπια έως μέτρια AD (88). Οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με δονεπεζίλη παρουσίασαν σημαντική αύξηση στις συνολικές βαθμολογίες τόσο των πρωτογενών όσο και των δευτερογενών μετρήσεων, γεγονός που υποδηλώνει την προφανή γνωστική βελτίωση που παρουσιάζει αυτό το φάρμακο. Σε μια άλλη μελέτη διάρκειας 6 μηνών, 208 ασθενείς με πιθανή AD ή AD με εγκεφαλοαγγειακή νόσο οι οποίοι επιλέχθηκαν από 27 οίκους ευγηρίας στις Ηνωμένες Πολιτείες για να υποβληθούν σε θεραπεία με δονεπεζίλη με σκοπό τον προσδιορισμό της κλινικής αποτελεσματικότητας και του προφίλ ασφάλειας του φαρμάκου. Τα προκαταρκτικά δεδομένα έδειξαν ότι οι ανταποκριθέντες στη δονεπεζίλη παρουσίασαν σταθερή ή βελτιωμένη νοητική λειτουργία, όπως καταδεικνύεται από τη μέση μεταβολή από την αρχική τιμή της Κλινικής Αξιολόγησης Άνοιας και της Εξέτασης Πνευματικής Κατάστασης (MMSE) σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Επιπλέον, η μελέτη παρείχε επίσης πρόσθετα πλεονεκτήματα ως προς το ότι η χρήση της δονεπεζίλης σημειώνεται ότι είναι ανεξάρτητη από παράγοντες όπως η ηλικία, οι συνυπάρχουσες ασθένειες και η υψηλή ταυτόχρονη φαρμακευτική αγωγή. Τα οφέλη της δονεπεζίλης στη θεραπεία των έντονων νευροψυχιατρικών συμπτωμάτων της AD αποτέλεσαν επίσης στόχο μιας ανοικτής, προοπτικής μελέτης. Μόνο στους ασθενείς που δεν εμφάνισαν ανεπιθύμητες ενέργειες ή γνωστική επιδείνωση επιτράπη να προχωρήσουν σε άλλη θεραπεία 6 εβδομάδων με δονεπεζίλη σε υψηλότερη δόση (10 mg/ημέρα). Η συνεχής χορήγηση δονεπεζίλης

αποκάλυψε σημαντική μείωση των βαθμολογιών στα Νευροψυχιατρικά ευρήματα (NPI) και NPI-Distress, σε σύγκριση με την αρχική αξιολόγηση 6 εβδομάδων και την ομάδα εικονικού φαρμάκου. Ως αποτέλεσμα, οι περαιτέρω έρευνες σχετικά με τη δονεπεζίλη είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικές, καθώς το φάρμακο αυτό ασκεί καλή αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα σε ασθενείς με ήπια έως μέτριας βαρύτητας AD (89,90).

IV. Μεμαντίνη.

Σε σύγκριση με άλλες ChEIs, η μεμαντίνη έλαβε έγκριση κυκλοφορίας από τον FDA το 2003 για την αντιμετώπιση κυρίως της μέτριας έως σοβαρής AD. Η μεμαντίνη ταξινομείται ως μη ανταγωνιστικός ανταγωνιστής του υποδοχέα NMDA, ο οποίος δρα μέσω της παρεμπόδισης της ενεργοποίησης των διαύλων ιόντων NMDA κατά προτεραιότητα, γεγονός που μπορεί να επιτευχθεί με τον έλεγχο της προσλαμβανόμενης δοσολογίας (91,92). Με τη μείωση της διαπερατότητας των διαύλων ιόντων NMDA στο Ca^{2+} , διαταράσσεται δυνητικά η απελευθέρωση παραγόντων που προκαλούν απόπτωση με αποτέλεσμα τη διαμεσολάβηση της φυσιολογικής νευρωνικής δραστηριότητας (93). Παραδόξως, οι κλινικές δοκιμές με τη χρήση της μεμαντίνης για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής AD απέτυχαν να ανταποκριθούν στις προσδοκίες, καθώς το δοκιμαζόμενο φάρμακο απλώς καθυστέρησε την εξέλιξη της γνωστικής επιδείνωσης (94). Οι περισσότερες ερευνητικές προσεγγίσεις επικεντρώθηκαν στη σύγκριση της θεραπευτικής ανταπόκρισης που παρουσίασε η μεμαντίνη όσον αφορά τη μονοθεραπεία και τη συνδυαστική θεραπεία που περιλάμβανε άλλους ChEIs. Για παράδειγμα, η μονοθεραπεία με μεμαντίνη μόνο ανέφερε κλινικά οφέλη που εκφράζονταν από τις βαθμολογίες που λαμβάνονταν από τις αξιολογήσεις της γνωστικής λειτουργίας, της συμπεριφοράς, των διαταραχών, των δραστηριοτήτων της καθημερινής ζωής και της συνολικής λειτουργίας (95). Μια άλλη διπλά τυφλή, πολυεθνική μελέτη 24 εβδομάδων έδειξε ομοίως ότι η παρατεταμένη χορήγηση μεμαντίνης (20 mg/ημέρα) προκαλεί υψηλή αποτελεσματικότητα και προφίλ ανοχής σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή AD (96). Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές που καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η συνδυαστική θεραπεία που περιλαμβάνει τη μεμαντίνη και άλλους ChEIs μπορεί ενδεχομένως να επιβραδύνει ή να αποτρέψει την εμφάνιση της AD (97,98). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η μασιτινίμπη, ένας αναστολέας της κινάσης τυροσίνης K1T, η οποία χορηγήθηκε ως πρόσθετη θεραπεία σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια AD που είχαν λάβει θεραπεία με μεμαντίνη και/ή ChEIs 6 μήνες πριν. Η μεμαντίνη αναφέρθηκε ότι σχετίζεται με βελτίωση του γνωστικού ελλείμματος στην AD και αποδεκτή ανοχή. Συνολικά, η θεραπεία με τη μεμαντίνη προέβλεπε ένα ελπιδοφόρο μέλλον για τη μέτρια έως σοβαρή AD, ωστόσο θα πρέπει να

διεξαχθούν πολλές έρευνες με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος για να επικυρωθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της κατανάλωσης αυτού του φαρμάκου (99).

Κεφάλαιο 2:

Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2 και AD.

2.1. Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (T2DM).

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (T2DM) αποτελεί ένα ολοένα αυξανόμενο πρόβλημα υγείας παγκοσμίως, στενά συνδεδεμένο με την παχυσαρκία. Τα άτομα με T2DM αντιμετωπίζουν υψηλούς κινδύνους τόσο για μικροαγγειακές επιπλοκές, όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η νεφροπάθεια και η νευροπάθεια, όσο και για μακροαγγειακές επιπλοκές, όπως οι καρδιαγγειακές συννοσηρότητες, λόγω της υπεργλυκαιμίας και των επιμέρους συνιστωσών του μεταβολικού συνδρόμου που σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως για παράδειγμα η παχυσαρκία, η ανθυγιεινή διατροφή, η σωματική αδράνεια καθώς και γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν στις πολλαπλές παθοφυσιολογικές διαταραχές που σχετίζονται με διαταραχή της ομοιόστασης της γλυκόζης στον T2DM (100).

Εδώ και περισσότερο από μισό αιώνα έχει αναγνωριστεί η σχέση μεταξύ της αντίστασης στην ινσουλίνη και του διαβήτη τύπου 2 καθώς όχι μόνο συνιστά έναν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για τη δημιουργία του διαβήτη κι επιπλέον αποτελεί θεραπευτικό στόχο αποτελεί επίσης θεραπευτικό στόχο από τη στιγμή που συνυπάρχει υπεργλυκαιμία (101).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη και η διαταραγμένη έκκριση ινσουλίνης παραμένουν οι βασικές διαταραχές του T2DM, αλλά στη δυσλειτουργία του μεταβολισμού της γλυκόζης συμβάλλουν τουλάχιστον άλλες έξι παθοφυσιολογικές δυσλειτουργίες. Οι πολλαπλές παθογενετικές διαταραχές που παρουσιάζονται στον T2DM υπαγορεύουν ότι για τη διατήρηση της νορμογλυκαιμίας απαιτούνται πολλαπλοί αντιδιαβητικοί παράγοντες, που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό. Η θεραπεία πρέπει όχι μόνο να είναι αποτελεσματική και ασφαλής αλλά και να βελτιώνει την ποιότητα ζωής (100).

Σε αντίθεση με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (**T1DM**), στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (**T2DM**) δεν παρατηρείται αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης. Τα συμπτώματα του

T2DM σχετίζονται κυρίως με τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και μπορεί να περιλαμβάνουν πολυφαγία, πολυδιψία, ξηροστομία, κνησμό, καθώς και αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων ή μυκητιάσεων. Παρ' όλα αυτά, ο T2DM συχνά παραμένει ασυμπτωματικός για μεγάλο χρονικό διάστημα, καθώς η υπεργλυκαιμία αναπτύσσεται σταδιακά και μπορεί να μην είναι αρκετά έντονη ώστε να προκαλέσει εμφανή συμπτώματα. Η διάγνωση του T2DM, καθώς και οι πρώιμες διαταραχές που προαναγγέλλουν την εμφάνιση της νόσου (όπως ο προδιαβήτης), βασίζονται στον εντοπισμό αυξημένων επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Εκτός από την υιοθέτηση αλλαγών στον τρόπο ζωής – όπως η βελτίωση της διατροφής και η τακτική φυσική δραστηριότητα – η θεραπευτική προσέγγιση είναι πολύπλευρη και περιλαμβάνει φαρμακευτικές παρεμβάσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση διγουανιδίων (π.χ. μετφορμίνη), σουλφονουλουριών, θειαζολιδινεδιόνων, μιμητικών ινκρετινών, καθώς και των SGLT2i. Τα φάρμακα αυτά μπορούν να χορηγηθούν είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυαστικές θεραπείες, με στόχο την αποτελεσματική διαχείριση της νόσου. (102,103).

2.1.1. Συσχέτιση T2DM με AD.

Συγκεντρωτικά δεδομένα από ερευνητικές μελέτες της τελευταίας δεκαετίας αναδεικνύουν τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου Alzheimer σε ασθενείς με T2DM (104,105). Με βάση αυτά τα δεδομένα, οι Rorbach-Dolata και Piwowar, το 2019, εισήγαγαν τον όρο «Διαβήτης Τύπου 3» περιγράφοντας τη νόσο Alzheimer ως μια νευρομεταβολική διαταραχή που απορρέει από τον T2DM και επισημαίνοντας τους κοινούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που συνδέουν τις δύο παθήσεις (106). Παρόλα αυτά, τα μονοπάτια που υποστηρίζουν τη συσχέτιση μεταξύ της AD και του T2DM παραμένουν ελλιπώς χαρακτηρισμένα και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Ένα σημαντικό κοινό εύρημα μεταξύ των δύο νόσων είναι τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End Products, AGEs). Η σύνδεση των AGEs με τον T2DM και τη νόσο Alzheimer έχει τεκμηριωθεί ήδη από τη δεκαετία του 1990 (107,108). Τα AGEs σχηματίζονται μέσω αυθόρμητων, μη ενζυματικών αντιδράσεων γλυκοζυλίωσης, οι οποίες λαμβάνουν χώρα μεταξύ πρωτεϊνών και αναγωγικών σακχάρων, όπως η γλυκόζη, που αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας του εγκεφάλου (109). Κατά τη διαδικασία αυτή, αντιδράσεις συμπύκνωσης μεταξύ αναγωγικών σακχάρων και των αμινομάδων των πρωτεϊνών οδηγούν στον σχηματισμό αναστρέψιμων βάσεων Schiff, με το ποσοστό αυτών των αντιδράσεων να εξαρτάται από τη συγκέντρωση της διαθέσιμης γλυκόζης. (110). Οι βάσεις Schiff υφίστανται αναδιάταξη με την πάροδο του χρόνου, σχηματίζοντας σταθερότερα ενδιάμεσα προϊόντα γνωστά ως προϊόντα

Amadori. Αυτά τα πρώιμα προϊόντα υποβάλλονται σε περαιτέρω χημικές τροποποιήσεις μέσω αντιδράσεων αναδιάταξης, αφυδάτωσης ή διάσπασης, οδηγώντας τελικά στον σχηματισμό των AGEs. Η συσσώρευση των AGEs εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα πρωτοταγών αμινομάδων, την παρουσία αναγωγικών σακχάρων στο περιβάλλον και τον χρόνο ημιζωής της τροποποιημένης πρωτεΐνης. Ο αριθμός των AGEs αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, ενώ μειώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης επανέρχονται στα φυσιολογικά όρια (111). Η παραγωγή AGEs επιταχύνεται κατά τη φυσιολογική γήρανση και έχει αναδειχθεί ανοσοϊστοχημικά η παρουσία τους στις πλάκες β-αμυλοειδούς και στα νευροϊνιδιακά πλέγματα σε ασθενείς με AD (112). Η υπεργλυκαιμία που παρατηρείται στους διαβητικούς ασθενείς ευνοεί τη δημιουργία AGEs, τα οποία εμπλέκονται άμεσα στην παθογένεση της AD (112).

Πέρα από τη συσσώρευση των AGEs, κοινά παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά του T2DM και της AD περιλαμβάνουν τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Η αντίσταση στην ινσουλίνη, που χαρακτηρίζει τον T2DM, καθώς και οι μεταβολές στον λιπώδη ιστό, το ήπαρ, το πάγκρεας και το αγγειακό σύστημα, προκαλούν τροποποιήσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα (113). Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν μεταβολές στα επίπεδα κυτταροκινών και χημειοκινών, αλλαγές στον πληθυσμό των ανοσοποιητικών κυττάρων, καθώς και αυξημένη απόπτωση και ίνωση. Η φλεγμονή αποτελεί κεντρικό παθολογικό χαρακτηριστικό του T2DM και φαίνεται ότι έχει στενή συσχέτιση με την AD (114,115). Η φλεγμονώδης απόκριση στο νευρικό σύστημα συμβάλλει σημαντικά στην παθολογία της AD, προάγοντας τη συσσώρευση πλακών β-αμυλοειδούς, την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau, την πρόκληση οξειδωτικού στρες και τις αλλαγές στη συναπτική πλαστικότητα (116–118). Η αντίσταση στην ινσουλίνη, χαρακτηριστικό γνώρισμα του T2DM, συμβάλλει στην πρόκληση οξειδωτικού στρες στον οργανισμό, γεγονός που οδηγεί σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση τη φλεγμονώδους απόκρισης. Ο εγκέφαλος, λόγω των υψηλών ενεργειακών του απαιτήσεων και της συνεχούς ανάγκης του για οξυγόνο, είναι ιδιαίτερα ευάλωτος σε διαταραχές της ομοιόστασής του. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί υπεροξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών, συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδριακών, καθώς και βλάβες σε δομικές πρωτεΐνες και ένζυμα, οδηγώντας σε μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις της δομής και της λειτουργικότητάς τους. Συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών έχει εντοπιστεί στον ιππόκαμπο, καθώς και στους μετωπιαίους και κροταφικούς λοβούς ασθενών με ήπια γνωστική εξασθένηση υποδεικνύοντας ότι το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης και της παθολογίας **AD** (118).

Προκλινικές και κλινικές μελέτες για τον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων της AD επικεντρώνονται στην αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας των μιτοχονδρίων, των λυσοσωμάτων και γενικότερα στη βελτίωση των μεταβολικών διεργασιών του οργανισμού (119). Η ινσουλίνη, για παράδειγμα, παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης των θρεπτικών ουσιών και στη λειτουργία του εγκεφάλου ως νευροτροφικός παράγοντας. Ωστόσο, τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης έχουν συσχετιστεί με τη συσσώρευση πλακών β-αμυλοειδούς (Αβ), που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της AD, καθώς και με τον μειωμένο μεταβολισμό της γλυκόζης στον εγκέφαλο (100,120–122).

Επί του παρόντος, δεν έχει αναπτυχθεί αποτελεσματική θεραπεία για την AD, γεγονός που υπογραμμίζει την επείγουσα ανάγκη για περαιτέρω έρευνα με στόχο την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων και την κατανόηση πτυχών της νόσου που παραμένουν αδιευκρίνιστες. Η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της AD και του T2DM έχει καταστήσει την αναζήτηση κοινών παθοφυσιολογικών αρχών που διέπουν τις δύο ασθένειες πεδίο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια (123). Με βάση τη στενή αυτή σχέση, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του T2DM θα μπορούσαν επίσης να επιδείξουν προληπτικές ή θεραπευτικές ιδιότητες απέναντι στην AD (124). α αντιδιαβητικά φάρμακα, πέρα από τη μείωση της υπεργλυκαιμίας και τη βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη, ρυθμίζουν τις μεταβολικές λειτουργίες των κυττάρων, μειώνουν τη φλεγμονή των ιστών και περιορίζουν το οξειδωτικό στρες που οδηγεί στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (124). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να επηρεάσουν θετικά τη μεταβολική δραστηριότητα των νευρικών κυττάρων. Ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι πολλά αντιδιαβητικά φάρμακα ενισχύουν την επιβίωση των νευρώνων και συμβάλλουν στη σημαντική βελτίωση της μνήμης (125,126). Λαμβάνοντας υπόψη τα κοινά παθολογικά χαρακτηριστικά και τους μοριακούς μηχανισμούς που μοιράζονται οι δύο ασθένειες, πολλές νέες θεραπευτικές στρατηγικές βασίζονται στη χρήση αντιδιαβητικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση της AD (125,127). Σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία, φάρμακα όπως η μετφορμίνη, η λιραγλουτίδη και η δαπαγλιφλοζίνη διερευνώνται τόσο σε προκλινικές μελέτες όσο και σε κλινικές δοκιμές, προκειμένου να αξιολογηθεί η καταλληλότητά τους ως θεραπευτικές λύσεις για την AD (127–129).

2.1.2. Αντιδιαβητικοί παράγοντες στην αντιμετώπιση της AD.

I. Ινσουλίνη.

Η ινσουλίνη και οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες 1 και 2 (IGF-1 και IGF-2) δρουν μέσω δύο συγγενικών υποδοχέων για τον έλεγχο διαφορετικών φυσιολογικών

διεργασιών σε ολόκληρο το σώμα. Η ινσουλίνη προσδένεται με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα ινσουλίνης (IR) και με χαμηλή συγγένεια στον υποδοχέα IGF-1 (IGF-1 R), ρυθμίζοντας τον συστηματικό μεταβολισμό (130,131). Οι IGF-1 και IGF-2 προσδένονται με μεγαλύτερη συγγένεια στον IGF-1 R και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως αυξητικοί παράγοντες στις διαδικασίες ανάπτυξης των ιστών. Οι IR και IGF-1 R εκφράζονται ευρέως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και σχετίζονται με τον έλεγχο του μεταβολισμού και την ενεργειακή ομοιόσταση, την ανάπτυξη του εγκεφάλου και άλλες νευρωνικές διεργασίες, όπως οι γνωστικές λειτουργίες (129,132,133). Ο ιππόκαμπος αποτελεί μία από τις περιοχές του εγκεφάλου που παρουσιάζει την υψηλότερη πυκνότητα IRs, οι οποίοι επηρεάζουν τη συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων υπό την επίδραση της ινσουλίνης (134). Η διαταραχή της σηματοδότησης ινσουλίνης/IGF-1 στον εγκέφαλο, όπως η μειωμένη ευαισθησία του εγκεφάλου στην IR και η υπερφωσφορυλίωση της IR, έχει συσχετιστεί με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης κατάθλιψης, άγχους, γνωστικής εξασθένησης και, τελικώς στην AD. Μελέτες σε ασθενείς με AD έχουν καταδείξει μειωμένη έκφραση τόσο της IR όσο και του IGF-1 R στον εγκέφαλο (135–139).

Προκλινικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ινσουλίνης θα μπορούσε να αντιστρέψει την αύξηση του β αμυλοειδούς στον εγκέφαλο που προκλήθηκε από την πλούσια σε λιπαρά δίαιτα (HFD) και να βελτιώσει τη γνωστική λειτουργία σε μοντέλα τρωκτικών με AD (APP/ PS1 και 3xTg-AD) (140,141). Επίσης, η γνωσιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από την ενδοκοιλιακή στρεπτοζοτοκίνη (STZ) μπορεί να αναστραφεί με τη χορήγηση ενός αναλόγου της ινσουλίνης μακράς δράσης, το οποίο αποδείχθηκε ότι αυξάνει τα επίπεδα των IR στον ιππόκαμπο (141). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η ενδοϊπποκαμπική χορήγηση ινσουλίνης ήταν σε θέση να αντιστρέψει τη διαταραχή της μνήμης που προκαλείται από το β αμυλοειδές και να ενεργοποιήσει την ERK κινάση του ιππόκαμπου και την MAPK κινάση, οι οποίες διαμεσολαβούν στον θάνατο των νευρικών κυττάρων μέσω της απόπτωσης (142).

Στον άνθρωπο, κλινικά δεδομένα έχουν καταδείξει ότι η άμεση χορήγηση ινσουλίνης θα μπορούσε να έχει προστατευτικά αποτελέσματα σε ασθενείς με AD (143). Ωστόσο, η συστηματική χορήγηση ινσουλίνης συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο υπογλυκαιμίας και φτωχή διείσδυση στο ΚΝΣ, ενώ η ενδορινική χορήγηση με αυξημένη αποτελεσματικότητα, επιτρέποντας στην ινσουλίνη να περάσει από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB) και να κατανεμηθεί απευθείας στον εγκέφαλο (144,145). Μια μικρή, τυχαίοποιημένη, μελέτη με 25 συμμετέχοντες έδειξε ότι 20 μονάδες ινσουλίνης (UI) μέσω ρινικής οδού, δύο φορές την ημέρα για 21 ημέρες σε ασθενείς με πρώιμη AD ή ασθενείς με ήπια γνωστική εξασθένηση

(MCI), είχε ως αποτέλεσμα την υψηλότερη διατήρησή των λεκτικών πληροφοριών και την αυξημένα επίπεδα προσοχής σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (146). Η επίδραση της ινσουλίνης στις γνωστικές λειτουργίες ήταν δόσοεξαρτώμενη, με την καλύτερη επίδραση στα 20 και όχι στα 40 UI. Σε μια πιο πρόσφατη κλινική δοκιμή, αποτελούμενη από 104 ενήλικες με MCI (n = 64) και ήπια έως μέτρια AD (n = 40), η ενδορινική χορήγηση 20 UI για 4 μήνες έδειξε καλύτερα αποτελέσματα στην καθυστέρηση των γνωστικών ελλειμμάτων σε σύγκριση με τα 40 UI (147).

Παρόλο που οι διαταραχές του μεταβολισμού της ινσουλίνης συσχετίζουν την AD με τον T2DM, τα προκλινικά και κλινικά δεδομένα είναι ανεπαρκή για την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων σχετικά με τη δυνητική επίδραση της ινσουλίνης στη θεραπεία της AD, οπότε η συνέχιση της έρευνας είναι θεωρείται μείζονος σημασίας.

II. Μετφορμίνη.

Η μετφορμίνη αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο από του στόματος φάρμακο για τη θεραπεία του T2DM. Ανήκει στην κατηγορία των διγουανιδών και δρα ως αντιπεργλυκαιμικός παράγοντας, μειώνοντας την ενδογενή παραγωγή γλυκόζης και αυξάνοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη (148). Προκλινικές και κλινικές έρευνες έχουν διεξαχθεί προκειμένου να διαπιστωθούν οι θεραπευτικές προοπτικές του στη AD. Αρκετές ερευνητικές προσπάθειες έχουν διερευνήσει το ρόλο της μετφορμίνης στον εγκέφαλο, εστιάζοντας κυρίως στην επίδρασή της στην έκφραση της πρόδρομης αμυλοειδικής πρωτεΐνης (APP) και στην εξέλιξη των πλακών β αμυλοειδούς, καθώς και στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau.(149) Έχουν επίσης περιγραφεί διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί της εμπλοκής της μετφορμίνης στην παθολογία της AD, φανερώνοντας τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητές της και υποδεικνύοντας τον νευροπροστατευτικό της ρόλο (150,151).

Η προχορήγηση της μετφορμίνης (100 mg ανά kg σωματικού βάρους) άσκησε νευροπροστατευτική δράση σε αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκε ενδοϊπποκαμικά με ένεση με β αμυλοειδές στην διατρεφόμενη οδό και στην οδοντωτή έλικα και οι οποίοι ακολουθούσαν διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, καθώς όχι μόνο απέτρεψε τη μείωση των νευρωνικών διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών (EPSP) αλλά μάλιστα τα αύξησε.(152) Ωστόσο, το πλάτος των κορυφών του πληθυσμού των κοκκωδών κυττάρων στην οδοντωτή έλικα δεν μεταβλήθηκε σημαντικά με την προχορήγηση της μετφορμίνης (152). Οι Hettich et al. κατέδειξαν μειωμένη δραστηριότητα και χαμηλά επίπεδα της β-σεκρετάσης (BACE) σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων του φλοιού υπό την επίδραση 2,5 mM

μετφορμίνης για 1 έως 24 ώρες (153). Ένα πανομοιότυπο αποτέλεσμα διαπιστώθηκε *in vivo*, σε μύες του στελέχους C57BL/6 J άγριου τύπου (WT) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 0,03 M μετφορμίνης για 2 εβδομάδες. Σε αυτό το πείραμα, η θεραπεία με τον αντιδιαβητικό παράγοντα, οδήγησε στη μείωση των β καρβοξυτελικών θραυσμάτων, ενός από τα πρόδρομα υποστρώματα για την παραγωγή πεπτιδίων Αβ, σε ένα μοντέλο ανθρώπινης κυτταρικής σειράς, που υπερεκφράζει τη σουηδική μετάλλαξη (Swedish mutation) της APP. Μία επιπλέον μελέτη έδειξε ότι η χρόνια χορήγηση (6 εβδομάδες) 200 mg μετφορμίνης ανά kg σωματικού βάρους σε διαβητικά ζώα κατέληξε σε μείωση της εισροής Αβ διαμέσου του Αιματοεγκεφαλικού Φραγμού (BBB), ενώ βελτίωσε τη γνωστική εξασθένηση σε συμπεριφορικές δοκιμασίες (153). Η μετφορμίνη μείωσε επίσης σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων των AGEs, τα οποία εμπλέκονται στη μεταφορά του Αβ διαμέσου του BBB, καθώς και στα τα επίπεδα των παθολογικών Αβ1-40 και Αβ1-42 στον ιππόκαμπο (149). Πειράματα σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων του φλοιού διαγονιδιακών μυών WT οι οποίοι φέρουν το ανθρώπινο γονίδιο της πρωτεΐνης Ταυ, η χρήση της μετφορμίνης μείωσε τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Ταυ μέσω του μονοπατιού mTOR/PP2A (154). Επιπροσθέτως έχει φανεί ότι η μετφορμίνη ενεργοποιεί την μεσολαβούμενη από συνοδά μόρια αυτοφαγία (Chaperon Mediated Autophagy), ενός τύπου αυτοφαγίας ο οποίος είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με πληθώρα νευροεκφυλιστικών νόσων, συμπεριλαμβανομένης και της AD. Η ενεργοποίηση της CMA από τη μετφορμίνη οδήγησε στην αποικοδόμηση του υποστρώματός της APP καθώς και του Αβ, υποδεικνύοντας έναν πιθανό μηχανισμό νευροπροστασίας για την αντιμετώπιση της παθολογίας της AD (155). Μελέτες σε ομόζυγους διαβητικούς μύες με τη μετάλλαξη (db/db) η οποία τους οδηγεί σε διαβητική εγκεφαλοπάθεια με χαρακτηριστικό την υπερφωσφορυλιωμένη Ταυ, κατέδειξαν ότι η μακροχρόνια χορήγηση της μετφορμίνης για 8 εβδομάδες οδήγησε στη μείωση των υπερφωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών Ταυ μέσω της αυτοφαγίας και βελτίωση της μνήμης των db/db ποντικών σε συμπεριφορικές δοκιμασίες αλλά χωρίς αξιοσημείωτη αλλαγή στα επίπεδα του β-αμυλοειδούς (154).

Εκτός από το θεραπευτικό δυναμικό της μετφορμίνης σε ζωικά μοντέλα, η επιστημονική δραστηριότητα έχει επίσης εστιαστεί στην κλινική χρησιμότητά της για τους ασθενείς με ενδείξεις AD ή ήπια γνωστική εξασθένηση (MCI). Για να διερευνηθεί η επίδραση της μετφορμίνης καθώς και των διαφόρων αντιδιαβητικών παραγόντων προηγούμενης γενιάς, διεξήχθησαν πληθώρα κλινικών μελετών με ενθαρυντικά αποτελέσματα. Μια μελέτη κοόρτης με βάση τον πληθυσμό, η οποία περιελάμβανε 718 Μεξικανοαμερικανούς ηλικίας 60 ετών και άνω με ΣΔΤ2, στους οποίους 118 ασθενείς έλαβαν θεραπεία με μετφορμίνη. Η

αξιολόγηση της φυσικής δραστηριότητας των ασθενών πραγματοποιήθηκε με ερωτηματολόγια σχετικά με τις δραστηριότητες της καθημερινής ζωής, ενώ η γνωστική λειτουργία αξιολογήθηκε με την σύντομη εξέταση της νοητικής κατάστασης και με μια δοκιμασία ανάκλησης λίστας λέξεων με καθυστέρηση. Μετά από μια περίοδο παρακολούθησης δύο ετών, παρατηρήθηκε μείωση της σωματικής και γνωστικής λειτουργικότητας στους ασθενείς με T2DM. Η έκπτωση αυτή μειώθηκε με τη χρήση αντιδιαβητικών φαρμάκων, είτε ως μονοθεραπεία είτε ως συνδυασμένη θεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της μετφορμίνης στο 20% των ασθενών· ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η επίδραση αυτή ήταν ακόμη πιο έντονη σε ασθενείς με μεγαλύτερη διάρκεια νόσου (156). Επιπλέον, σε μια τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή κλινική δοκιμή, αποτελούμενη από 145 συμμετέχοντες με ΣΔ, η μετφορμίνη σε συνδυασμό με γλιβενκλαμίδα ή ροσιγλιταζόνη φάνηκε να ενισχύει τη λειτουργική μνήμη. Η αξιολόγηση διενεργήθηκε στην αρχή της μελέτης και την εβδομάδα 24, με τη χρήση της Δοκιμασίας Αντικατάστασης Ψηφιακών Συμβόλων, της Δοκιμασίας Ακουστικής Λεκτικής Μάθησης Rey και της Δοκιμασίας Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (157). Οι Hsu et al. διεξήγαγαν μια άλλη μελέτη κοόρτης, στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με και χωρίς ΣΔ, και έδειξαν ότι οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με 500 mg μετφορμίνης ημερησίως εμφάνισαν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης άνοιας σε σύγκριση με εκείνους που δεν έλαβαν καμία φαρμακευτική αγωγή. Ειδικότερα, ο συνδυασμός μετφορμίνης και σουλφονυλουρίας μείωσε τον κίνδυνο άνοιας κατά 35% σε διάστημα οκτώ ετών (158). Μια πιλοτική δοκιμή που συμπεριέλαβε 80 ασθενείς με MCI, υπέρβαρους ή παχύσαρκους με μη ρυθμισμένο διαβήτη, έδειξε ευεργετική επίδραση της μετφορμίνης σε γνωστικές και λειτουργικές δοκιμασίες, όπως η κλίμακα αξιολόγησης της νόσου Alzheimer- γνωσιακή υποκλίμακα (ADAS-Cog) και η δοκιμασία επιλεκτικής υπενθύμισης Buschke (BSRT), ενώ ο βιοδείκτης Αβ₄₂ στο πλάσμα δεν μειώθηκε (126). Μια άλλη κλινική μελέτη η οποία διερεύνησε την επίδραση της μετφορμίνης σε 20 ασθενείς με ήπια γνωστική εξασθένηση και πρόωμη AD για 8 εβδομάδες χρησιμοποίησε γνωστικές δοκιμασίες, βιοδείκτες και νευροαπεικόνιση. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική βελτίωση στις ικανότητες μάθησης, μνήμης και προσοχής, παρά τους περιορισμούς της μελέτης, όπως το μικρό δείγμα και ο σύντομος χρόνος παρακολούθησης, καθώς και η συνταγογράφηση διαφορετικών δόσεων μετφορμίνης στους ασθενείς που συμμετείχαν (125).

Πέραν όμως των προαναφερομένων, αρκετές μελέτες παρατήρησης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μετφορμίνη δεν είχε θετική επίδραση στην παθογένεια της AD και ότι αύξησε τον κίνδυνο εμφάνισης της AD (159–161). Στο μια μεγάλη μελέτη ελέγχου ασθενών

που περιλάμβανε πάνω από επτά χιλιάδες άτομα με άνοια, ο κίνδυνος ανάπτυξης AD δεν συσχετίστηκε με τη μακροχρόνια χρήση άλλων αντιδιαβητικών φαρμάκων (σουλφονουλourίες, θειαζολιδινεδιόνες και ινσουλίνη), ενώ ο κίνδυνος ήταν μεγαλύτερος όταν χρησιμοποιούνταν μετφορμίνη (159). Οι Moore et al., σε μια διασταυρούμενη μελέτη, ανέλυσαν τη σχέση μεταξύ της χρήσης μετφορμίνης, των επιπέδων βιταμίνης B12 και της συμπληρωματικής χορήγησης ασβεστίου και βιταμίνης B12. Η γνωστική λειτουργία αξιολογήθηκε με τη Σύντομη Εξέταση της Νοητικής Κατάστασης (MMSE) σε ασθενείς με T2DM και AD, MCI ή με άθικτες γνωστικές λειτουργίες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι διαβητικοί ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με μετφορμίνη είχαν χειρότερες γνωστικές λειτουργίες, ωστόσο η επίδραση αυτή μπορούσε να αντιστραφεί με τη χορήγηση συμπληρωμάτων ασβεστίου και βιταμίνης B12. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι η περιστασιακή σχέση μεταξύ της χρήσης μετφορμίνης και της ανάπτυξης AD διαμεσολαβείται από την αναστολή της πρόσληψης της βιταμίνης B12 από τον άπω ειλεό (160). Μια ακόμη μελέτη κοόρτης παρατήρησης, με 12ετή παρακολούθηση και περισσότερους από τέσσερις χιλιάδες ασθενείς με ΣΔ στην Ταϊβάν, έδειξε ότι η έκθεση στη μετφορμίνη αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου του Πάρκινσον και άνοιας όλων των αιτιών, συμπεριλαμβανομένης της AD, μετά από προσαρμογή για διάφορους ενοχοποιητικούς παράγοντες (161).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μετφορμίνη βρίσκεται επί του παρόντος σε κλινική δοκιμή φάσης III, στην οποία συμμετέχουν περίπου 370 υπέρβαροι ή παχύσαρκοι ασθενείς με MCI (ClinicalTrials.gov, NTC04098666). Η μελέτη θα εξετάσει τη δραστηριότητα της μετφορμίνης στην πρόληψη της AD, με τη χρήση γνωστικών δοκιμασιών και μετρήσεων όπως οι αλλαγές στον όγκο της υπερτονικότητας της λευκής ουσίας, το φορτίο αμυλοειδούς και Ταυ στον εγκέφαλο, καθώς και οι βιοδείκτες αμυλοειδούς και Ταυ στο πλάσμα (162). Εκτεταμένες ερευνητικές προσπάθειες σχετικά με τη μετφορμίνη υποδεικνύουν τις νευροπροστατευτικές της ιδιότητες, ωστόσο τα τρέχοντα αποτελέσματα είναι αντιφατικά, κυρίως λόγω διαφόρων περιορισμών που υπάρχουν σε κάθε μελέτη, με διαφορές στις μεθοδολογίες.

III. Σουλφονουλourίες.

Οι σουλφονουλourίες (SUs) είναι μια παλαιότερη κατηγορία αντιδιαβητικών, η οποία συνιστάται σήμερα λιγότερο από τις κατευθυντήριες οδηγίες για τον T2DM. Οι SUs διεγείρουν την έκκριση ινσουλίνης μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους ευαίσθητους στο ATP διαύλους καλίου στο πάγκρεας δρώντας ως παράγοντες έκκρισης ινσουλίνης. Οι εν λόγω δίαυλοι φαίνεται να βρίσκονται επίσης και στους νευρώνες. Οι SU συνταγογραφούνται

εκτενώς για τη θεραπεία του T2DM για περισσότερα από 50 χρόνια. Οι SUs είναι καλά ανεκτές από τον ανθρώπινο οργανισμό και η δημοφιλία τους θα μπορούσε να αποδοθεί στο χαμηλό κόστος τους και στη δυνατότητα χρήσης τους ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με μετφορμίνη (146,163).

Έχει φανεί ότι σε πειραματικά μοντέλα db/db τα οποία εμφανίζουν διαβήτη με αποτέλεσμα τη διαβητική εγκεφαλοπάθεια, η γλιβενκλαμίδα μείωσε τα επίπεδα Αβ στον ιππόκαμπο, ανέστειλε τη νευρωνική απόπτωση και ενίσχυσε τη συναπτική πλαστικότητα (149). Σε τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες καθώς και μελέτες παρατήρησης, διαπίστωσε ότι ο T2DM αύξησε τον κίνδυνο εμφάνισης άνοιας περισσότερο από 2 φορές και ότι η μετφορμίνη και οι SUs οδήγησαν σε μείωση του κινδύνου άνοιας κατά 35% αλλά και ότι ο κακός γλυκαιμικός έλεγχος σχετιζόταν με μειωμένες γνωστικές λειτουργίες, ενώ η επίδραση αυτή θα μπορούσε εν μέρει να είναι αντιστραφεί με τη χρήση SUs (120,158).

IV. Θειαζολιδινεδιόνες.

Οι θειαζολιδινεδιόνες (TZD) αποτελούν μια ομάδα αντιυπεργλυκαιμικών παραγόντων που ενεργοποιούν τον Peroxisome Proliferator- Activated Receptors (PPARγ) παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και δράση που προκαλεί ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη (164). Αυτή η κατηγορία φαρμακευτικών παραγόντων βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία των σκελετικών μυών και του λιπώδους ιστού στην ινσουλίνη. Αναστέλλουν επίσης την ηπατική γλυκονεογένεση, βελτιώνουν τον γλυκαιμικό έλεγχο και μειώνουν τα επίπεδα της κυκλοφορούσας ινσουλίνης (165). Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα απέδειξαν ότι για την εξασθένηση της μνήμης που προκλήθηκε από την έγχυση στρεπτοζοτοκίνης (STZ) εντός των εγκεφαλικών κοιλιών, η πιογλιταζόνη βελτίωσε τη γνωστική εξασθένηση που σχετίζεται με μείωση του οξειδωτικού στρες αλλά κι ότι η ροσιγλιταζόνη, προστατεύει από την επαγόμενη από το Αβ ολιγομερές αντίσταση στην ινσουλίνη σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων του ιππόκαμπου (166,167). Επιπλέον μελέτη σε διαβητικά db/db ποντίκια έδειξε ότι τόσο η ροσιγλιταζόνη όσο και η πιογλιταζόνη μείωσαν το β αμυλοειδές στον ιπποκάμπειο σχηματισμό, τη νευρωνική απόπτωση και αύξησαν την ιπποκάμπεια πλαστικότητα σε αυτά τα μοντέλα (168). Σε επίπεδο κλινικών δοκιμών, οι οποίες εξέτασαν την αποτελεσματικότητα των αγωνιστών PPARγ, της πιογλιταζόνης και της ροσιγλιταζόνης, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτοί οι παράγοντες ελαττώνουν τον εγκεφαλικό μεταβολισμό της γλυκόζης, μειώνουν τη συσσώρευση β-αμυλοειδούς, ρυθμίζουν καθοδικά πολλαπλούς φλεγμονώδεις μεσολαβητές και γενικά έχουν θετική επίδραση στη νευρωνική λειτουργία και στη διαμόρφωση της μνήμης (168–174). Ωστόσο κάποιες κλινικές μελέτες

έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα, καθώς η ροσιγλιταζόνη φάνηκε να μην ενισχύει σημαντικά τις γνωστικές λειτουργίες των ασθενών με AD σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (placebo), ενώ η πιογλιταζόνη (0,8 mg/ημέρα) παρά το γεγονός ότι φαίνεται να συμβάλει στην καθυστέρηση της ανάπτυξης της νόσου, δεν κατάφερε να επιβεβαιώσει κάποιο θετικό αποτέλεσμα (175–178).

V. Αναστολείς της διπεπτυλ- πεπτιδάσης IV.

Οι αναστολείς της διπεπτυλ- πεπτιδάσης IV (DPP-4) δρουν καταστέλλοντας την αποικοδόμηση των ινκρετινών GLP-1 και GIP. Οι ευρέως διαθέσιμοι αναστολείς της DPP 4 - γλιπτίνη, σαξαγλιπτίνη, λιναγλιπτίνη, βιλνταγλιπτίνη και σιταγλιπτίνη - είναι καλά ανεκτοί και μπορούν να χορηγηθούν από το στόμα για τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης αίματος νηστείας και μεταγευματικής περιόδου χωρίς να επηρεάζουν το σωματικό βάρος ή τη γαστρική κένωση (179,180). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλους από του στόματος παράγοντες ή την ινσουλίνη στη διαχείριση του T2DM (181). Αρκετές μελέτες διερεύνησαν την επίδραση των γλιπτινών στη γνωστική λειτουργία και οδήγησαν σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Η σιταγλιπτίνη και η βιλνταγλιπτίνη βελτίωσαν την ικανότητα μάθησης και απέτρεψαν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα στον ιππόκαμπο αρουραίων Wistar των οποίων η διατροφή ήταν υψηλή σε λιπαρά (HFD) με ακόλουθη αντίσταση στην ινσουλίνη (182). Επιπλέον η βιλνταγλιπτίνη φάνηκε να μετριάζει αποτελεσματικά τη γνωστική εξασθένηση και αποκατέστησε τη σηματοδότηση της ινσουλίνης στον εγκέφαλο αρουραίων HFD Wistar (183). Σε πειραματικό μοντέλο διαγονιδιακού ποντικού με AD Cg-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9})85Dbo/J), η σιταγλιπτίνη αύξησε τα επίπεδα της ινκρετίνης GLP-1 στον εγκέφαλο και μείωσε το νιτρικό στρες και τη φλεγμονή του εγκεφάλου. Επιπλέον, απέτρεψε την εξασθένηση της μνήμης που σχετίζεται με σημαντική μείωση των εναποθέσεων β-αμυλοειδούς (184). Στον αντίποδα, η σιταγλιπτίνη αύξησε τον κίνδυνο ανάπτυξης AD αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Tau στον ιππόκαμπο ενός μοντέλου αρουραίου με T2DM, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν κλινικά δεδομένα (185).

VI. Αμυλίνη.

Η αμυλίνη είναι μια μικρή πεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται μαζί με την ινσουλίνη από τα β-κύτταρα του παγκρέατος ως απάντηση στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Η αμυλίνη έχει κοινά χαρακτηριστικά με το Αβ, όπως παρόμοια δομή β-φύλλου, αποτελώντας από μόνη της έναν ακόμη σύνδεσμο μεταξύ του T2DM και των παθογενετικών μηχανισμών

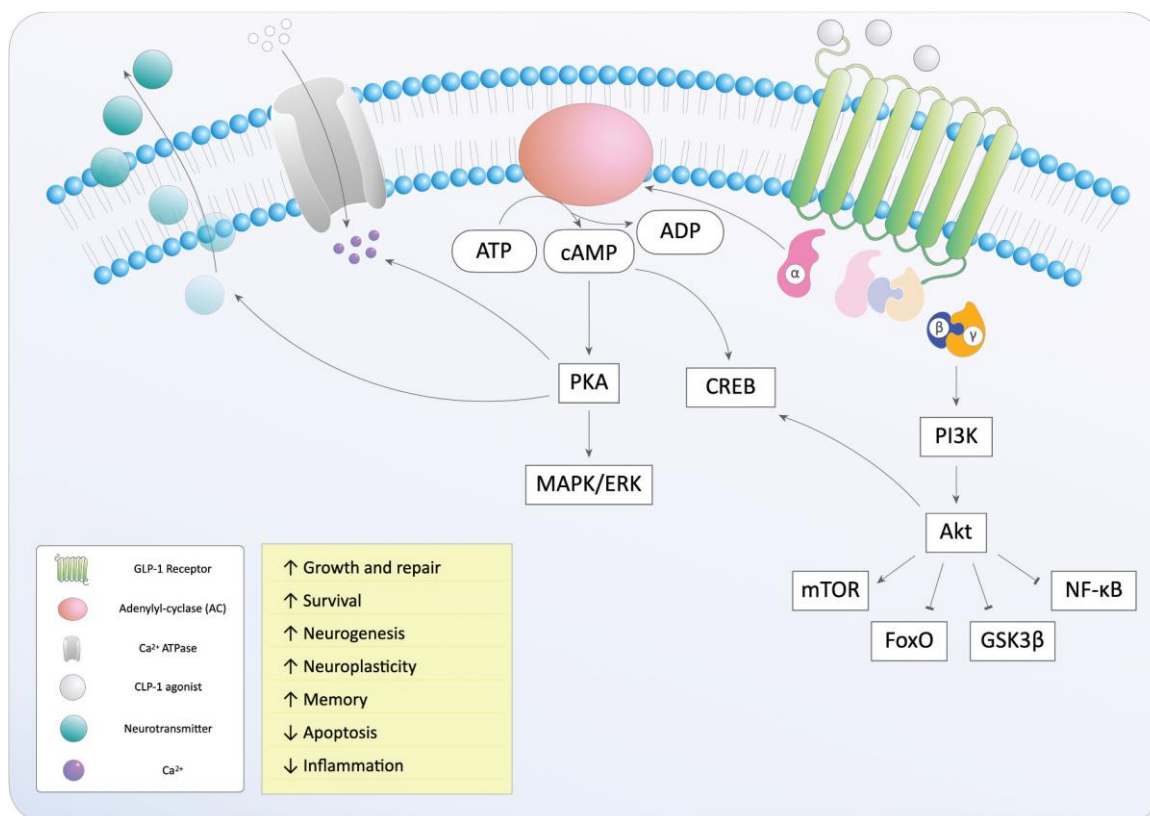
της AD. Έχει αποδειχθεί ότι ολιγομερίζεται και εναποτίθεται στα β-κύτταρα ασκώντας κυτταροτοξική δράση σε ασθενείς με προδιαβητική αντίσταση στην ινσουλίνη οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση αυτής της ορμόνης (186,187). Η αμυλίνη διέρχεται αποτελεσματικά από τον BBB και έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε πολυάριθμες λειτουργίες του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένης της μνήμης και της διάθεσης, και ότι ρυθμίζει τη σηματοδότηση των μονοπατιών ERK και MAPK ενισχύοντας τη συναπτική πλαστικότητα (144,187). Ένα ανάλογο της αμυλίνης, η πραμιλιντίδη, έχει εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2. Σε ασθενείς με AD, τα επίπεδα της αμυλίνης στο πλάσμα μειώνονται σημαντικά, ενώ προκλινικά δεδομένα σε μοντέλα ποντικών με AD έδειξαν ότι η χορήγηση πραμιλιντίδης θα μπορούσε να βελτιώσει τη μνήμη, να μειώσει το οξειδωτικό στρες και να μειώσει τη νευρική φλεγμονή. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμη διαθέσιμα κλινικά δεδομένα (186,188,189).

2.2.2 Νέας γενιάς αντιδιαβητικοί παράγοντες με νευροπροστατευτικές ιδιότητες.

I. Αγωνιστές- Μιμητικά του υποδοχέα του προσομοιάζοντως με τη Γλυκαγόνη Πεπτιδίου 1 (GLP-1RA).

Το GLP-1 ανακαλύφθηκε το 1985 κι αποτελεί μια πρωτογενή ορμόνη 30-31 αμινοξέων, προερχόμενη από τον εντερικό βλεννογόνο, η οποία απελευθερώνεται από το εξειδικευμένα εντεροενδοκρινικά L κύτταρα, που βρίσκονται κατά κύριο λόγο στο λεπτό έντερο και στο παχύ έντερο (κόλον), ως απάντηση στα θρεπτικά συστατικά που λαμβάνονται μέσω της τροφής, όπως τα σάκχαρα και τα λιπαρά οξέα. Η δράση του GLP-1 ως ινσουλινοτροπικού παράγοντα διαμεσολαβείται μέσω της αλληλεπίδρασης με τον μεμβρανικό υποδοχέα του GLP-1 (GLP-1 R), μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 463 αμινοξέων. Η αλληλεπίδραση του GLP-1 με το GLP-1 R προάγει τους ενδοκυττάριους σηματοδοτικούς μηχανισμούς που αυξάνουν την έκφραση, τη βιοσύνθεση και την έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη γλυκόζη (190,191). Η ινσουλινοτροπική δράση του GLP-1 είναι καλά τεκμηριωμένη, ωστόσο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικός παράγοντας αυτός καθαυτός, λόγω του πολύ σύντομου χρόνου ημιζωής του. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων

είκοσι ετών, έχουν αναπτυχθεί για τη θεραπεία του T2DM τα GLP-1 RA με μεγάλο χρόνο ημιζωής, που ονομάζονται επίσης αγωνιστές GLP-1 R ή μιμητικά ινκρετίνης. Υπάρχουν αρκετοί φαρμακευτικοί παράγοντες αυτής της κατηγορίας που έχουν εγκριθεί από τον FDA όπως: η εξενατίδη, η λιραγλουτίδη, η λιξισενατίδη, η αλβιγλουτίδη, η ντουλαγλουτίδη και η σεμαγλουτίδη (192).



Εικόνα 7: Πιθανός ρόλος του GLP-1 R σε κυτταρικό επίπεδο. Η ενεργοποίηση του GLP-1 R οδηγεί στην παραγωγή ενδοκυττάριας cAMP μέσω της αύξησης της ενζυμικής δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης. Η cAMP ενεργοποιεί περαιτέρω τόσο την PKA όσο και την PI3K, οι οποίες φωσφορυλιώνουν καθοδικά μονοπάτια σηματοδότησης, όπως η εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης που διευκολύνει την εισροή Ca²⁺, ενισχύει την πρωτεϊνσύνθεση, αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση, τη φλεγμονή και τη συσσώρευση πρωτεϊνών, οδηγώντας σε βελτιωμένη κυτταρική επιβίωση (191–193).

ATP: adenosine triphosphate, cAMP: cyclic adenosine monophosphate, ADP: adenosine diphosphate, PKA: protein kinase A, MAPK/ERK: mitogen-activated protein kinases/extracellular signal regulated kinases, CREB: cAMP response element-binding protein, PI3K: phosphoinositide 3-kinases, AKT: protein kinase B, mTOR: mechanistic target of rapamycin, FoxO: forkhead box transcription factor class O, GSK3β: glycogen synthase kinase 3β, NF-κβ: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. (Katsenos, 2022)

Το GLP-1 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε νευρωνικό επίπεδο. Στο ΚΝΣ, ένα μεταμεταφραστικό προϊόν της προπρογλυκαγόνης συντίθεται στον πυρήνα της μονήρους οδού. Το GLP-1 R μπορεί να βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε πολλαπλές περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος και ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου (194). Σύμφωνα με μελέτες, φαίνεται ότι το GLP-1 έχει ιδιότητες που μοιάζουν με τους αυξητικούς παράγοντες καθώς και προστατευτική δράση έναντι των νευροτοξικών επιδράσεων (195,196). Το GLP-1 έχει επίσης προκαλέσει μείωση της απόπτωσης, που προκαλείται από το πεπτιδίο β αμυλοειδούς (1-42), στα κύτταρα SY5Y και στους νευρώνες του ιππόκαμπου ενός μοντέλου ποντικού με εξαρτώμενη από την ηλικία γνωστική δυσλειτουργία (B6;129) και βελτίωσε τη χωρική και συνειρμική μάθηση (195,197). Επιπλέον, το GLP-1 εμπλέκεται στον έλεγχο της συναπτικής πλαστικότητας και της νευροπροστασίας και ενδέχεται να διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη μάθηση, τη μνήμη και τη συναπτική λειτουργία (195). Μια μελέτη σε knockout ποντίκια του GLP-1 R αποκάλυψε μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του T2DM και της παθολογίας της AD μέσω του εξασθένηση της συναπτικής πλαστικότητας και του σχηματισμού μνήμης (198). Το GLP-1 έχει αποδειχθεί ότι διασχίζει τον BBB και διεγείρει τους υποδοχείς του σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Η νευροπροστασία, ο σχηματισμός της μνήμης και ο πολλαπλασιασμός των νευρωνικών προγονικών κυττάρων αυξήθηκαν, ενώ η απόπτωση και το οξειδωτικό στρες μειώθηκαν σε ζωικά και κυτταρικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων (199,200). Τα ανάλογα αυτής της κατηγορίας, που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά ως αντιδιαβητικά φάρμακα, δοκιμάζονται επίσης σε διάφορες κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με AD και άλλες νευρολογικές διαταραχές (201,202).

Ένα από τα πρώτα GLP-1RA που δοκιμάστηκε σε προκλινικές μελέτες για να προσδιοριστεί η πιθανή χρησιμότητά του στη AD είναι η εξενατίδη. Το 2010, η εξενατίδη δοκιμάστηκε σε κυτταρικές καλλιέργειες και ζωικά μοντέλα της AD. Η προθεραπεία πρωτογενών νευρωνικών καλλιιεργειών και ανθρώπινων κυττάρων SH-SY5Y με εξενατίδη είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη βιωσιμότητα, μετά από πρόκληση αυξημένων επιπέδων Αβ και οξειδωτικού στρες, με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Από την άλλη πλευρά η μακροχρόνια χρήση, της εξενατίδης σε θηλυκά τριπλά διαγονιδιακά ποντίκια με AD (3xTg-AD) δεν κατάφερε να μεταβάλει το φορτίο Αβ και υπερφωσφορυλιωμένης Ταυ των ζώων, αλλά κατάφερε μόνο να μειώσει τα αυξημένα επίπεδα APP στον εγκέφαλο που προκλήθηκαν από τη χορήγηση STZ στα ίδια ζώα (203). Μια άλλη μελέτη η οποία διερεύνησε την επίδραση της ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης εξενατίδης για διάστημα 4 εβδομάδων στα μονοπάτια σηματοδότησης της ινσουλίνης στον εγκέφαλο, μετά την πρόκληση διαβήτη με STZ σε

αρουραίους Sprague-Dawley. Το GLP-1RA αποκατέστησε τη δραστηριότητα της κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης 3/πρωτεϊνικής κινάσης B (PI3K/AKT) και της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου-3β (GSK-3β) στον εγκέφαλο και απέτρεψε την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau (204). Σε μια πιλοτική διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή ελεγχόμενης με εικονικό φάρμακο (placebo) φάσης II, στην οποία συμμετείχαν 18 άτομα με υψηλή πιθανότητα ανάπτυξης AD, με βάση τους βιοδείκτες εγκεφαλονωτιαίου υγρού, η οποία ωστόσο τερματίστηκε πρόωρα από την ανάδοχο εταιρεία. Τα αποτελέσματα έως τον τερματισμό της κλινικής δοκιμής, έδειξαν ότι η θεραπεία με εξενατίδη δεν οδήγησε σε σημαντικές διαφορές στην κλινική και γνωστική αξιολόγηση, όπως επίσης και στην απεικόνιση του ΚΝΣ και στους βιοδείκτες της AD στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, εκτός από τη μείωση του Αβ42 των νευρωνικών εξωκυτταρικών κυστιδίων (205).

Η λιραγλουτίδη, ένας άλλος GLP-1RA με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής και δυνατότητα διέλευσης μέσω του BBB, επηρεάζει τη νευρωνική δραστηριότητα μέσω του cAMP, ασκεί νευροπροστατευτική δράση και αυξάνει τη νευρογένεση (202,206). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι διαμορφώνει τη συναπτική πλαστικότητα μέσω της ενίσχυσης της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (LTP) σε αρσενικούς αρουραίους Wistar (197). Η χορήγηση λιραγλουτίδης στο Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8), ένα μοντέλο ποντικού με φαινότυπο επιταχυνόμενης γήρανσης, βελτίωσε τη διατήρηση της μνήμης κατά τη διάρκεια του T-maze, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην αναγνώριση νέων αντικειμένων (207). Σε μια άλλη μελέτη, παρουσίασε επίσης νευροπροστατευτικές ιδιότητες σε μεσήλικες και ηλικιωμένους ποντικούς APP/PS1, μετά από 8 μήνες θεραπείας. Παρόλο που η λιραγλουτίδη δεν έδειξε καμία επίδραση στο σωματικό βάρος, τη γλυκόζη πλάσματος και τη γενική συμπεριφορά τόσο για τα ποντίκια WT όσο και για τα ποντίκια APP/PS1 στο ανοιχτό πεδίο, τα ποντίκια APP/PS1 που έλαβαν θεραπεία με λιραγλουτίδη διατήρησαν τη μνήμη αναγνώρισης, βελτίωσαν την απόδοση στο MWM, αύξησαν την LTP καθώς και τα επίπεδα συναπτοφυσίνης και μείωσαν δραματικά τα ιστολογικά χαρακτηριστικά της AD στο φλοιό και στη CA1 περιοχή του ιππόκαμπου (208). Σε θηλυκούς αρουραίους C57BL/6 με γνωστική εξασθένιση που προκλήθηκε από οκαδαϊκό οξύ και σε καλλιέργειες κυττάρων SY-SY5Y μετά από διέγερση της απόπτωσης με τον ίδιο παράγοντα, η προθεραπεία με λιραγλουτίδη ανέστειλε την ενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης της Tau και την αύξηση της BACE1 κι επιπλέον απέτρεψε τη νευρωνική απόπτωση και βελτίωσε τη μάθηση και την εξασθένιση της μνήμης των αρουραίων με AD (206). Σε ένα ζωικό μοντέλο άνοιας που προκλήθηκε από αλουμίνιο, η χορήγηση λιραγλουτίδης (300 μg/kg για 6 εβδομάδες) επέφερε νευροπροστασία και βελτίωσε τις γνωστικές λειτουργίες και τη μνήμη εργασίας και αναφοράς. Επίσης,

απέτρεψε την εξασθένηση της μάθησης, ελαχιστοποίησε την εγκεφαλική βλάβη μέσω της μείωσης των επιπέδων των φλεγμονωδών δεικτών στον ορό, μείωσε το οξειδωτικό στρες και αύξησε τη συγκέντρωση της αδρεναλίνης, της νοραδρεναλίνης και της ντοπαμίνης (209–211). Επιπλέον, σε μια πιλοτική κλινική δοκιμή διάρκειας 6 μηνών, στην οποία συμμετείχαν 18 ασθενείς με AD υποβλήθηκαν σε θεραπεία με λιραγλουτίδη, 20 σε θεραπεία με εικονικό φάρμακο και έξι υγιείς μάρτυρες. Η μελέτη έδειξε ότι η λιραγλουτίδη απέτρεψε την πτώση του εγκεφαλικού μεταβολικού ρυθμού της γλυκόζης στους ασθενείς αυξάνοντας τη μεταφορά γλυκόζης μέσω του BBB (212). Επιπλέον, σε μια πιλοτική κλινική μελέτη διάρκειας 6 μηνών συμμετείχαν 18 ασθενείς με AD σε θεραπεία με λιραγλουτίδη, 20 σε θεραπεία με εικονικό φάρμακο και έξι υγιείς μάρτυρες. Η μελέτη έδειξε ότι η λιραγλουτίδη απέτρεψε την πτώση του εγκεφαλικού μεταβολικού ρυθμού της γλυκόζης στους ασθενείς αυξάνοντας τη μεταφορά γλυκόζης μέσω του BBB (212). Σε μια άλλη 12μηνια, τυχαίοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, δοκιμή φάσης IIβ της λιραγλουτίδης σε συμμετέχοντες με ήπιας μορφής Αλτσχάιμερ, η οποία περιλαμβάνει 103 ασθενείς σε θεραπεία με λιραγλουτίδη και 103 σε εικονικό φάρμακο, βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη (213).

Ένας άλλος GLP-1RA που παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον για τη δυνητική θεραπεία της AD είναι η λιξισενατίδη. Αρχικά δοκιμάστηκε σε ένα μοντέλο ποντικού APP/ PS1 , σε δόσεις 1 και 10 nmol/kg, και συγκρίθηκε με τη λιραγλουτίδη, σε δόσεις 2,5 και 25 nmol/kg. Τα δύο φάρμακα είχαν συγκρίσιμα αποτελέσματα, τόσο στις χαμηλές όσο και στις υψηλές συγκεντρώσεις, μετά από δέκα εβδομάδες καθημερινής ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης. Όλες οι ομάδες θεραπείας επέδειξαν βελτιωμένη απόδοση στη δοκιμασία αναγνώρισης νέων αντικειμένων, βελτίωση της συναπτικής πυκνότητας, αυξημένο LTP, μειωμένη μικρογλοιακή ενεργοποίηση και μειωμένα επίπεδα β- αμυλοειδούς (214). Σε μια άλλη προκλινική μελέτη, η προθεραπεία με λιξισενατίδη βελτίωσε την επαγόμενη από το Αβ25-35 εξασθένηση της χωρικής μνήμης εργασίας σε ενήλικους αρσενικούς αρουραίους Sprague-Dawley και ανέστειλε την κυτταροτοξικότητα του β- αμυλοειδούς στα κύτταρα του υπόκαμπου σε πρωτογενείς νευρωνικές καλλιέργειες. Αυτή η νευροπροστατευτική δράση αποδόθηκε στην καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού (AKT-MEK1/2) και στη μείωση της ενδοκυττάρου ασβεστίου (215).

Η σεμαγλουτίδη έχει παρατεταμένο χρόνο ημιζωής, ο οποίος είναι σχεδόν μία εβδομάδα. Δοκιμάστηκε στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y, η οποία υποβλήθηκε επώαση με 20 μM Αβ25-35 ως μοντέλο της AD, και κατάφερε να αποκαταστήσει τη βιωσιμότητα των κυτταρικών στην καλλιέργεια, σε συγκέντρωση 10 nM, μέσω της αναστολής της απόπτωσης και της ενισχυμένης αυτοφαγίας (216). Μια διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο,

τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη φάσης III για τη σεμαγλουτίδη ξεκίνησε επίσης τον Μάιο του 2021, με την πρόσληψη 1840 συμμετεχόντων με πρώιμη AD- η μελέτη αυτή θα διερευνήσει την επίδραση του παράγοντα αυτού στην πρώιμη AD (NCT04777396).

Ο τελευταίος GLP-1RA του οποίου η αποτελεσματικότητα στη AD βρίσκεται υπό διερεύνηση είναι η ντουλαγλουτίδη. Η επίδρασή της μελετήθηκε σε ένα μοντέλο AD που προκλήθηκε μέσω της χορήγησης STZ σε αρσενικά ποντίκια C57/BL6. Η ντουλαγλουτίδη, η οποία χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε δόση 0,6 mg/kg/εβδομάδα για 4 εβδομάδες, βελτίωσε τις διαταραχές μάθησης και μνήμης και μείωσε το επίπεδο φωσφορυλίωσης Tau και των νευροϊνιδίων στον εγκέφαλο. Επιπλέον, ρύθμιζε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του GLP-1 και του GLP-1R και αντέστρεψε την εξασθένηση του μονοπατιού PI3K/AKT/GSK3b (217).

Οι προκλινικές έρευνες σχετικά με τα GLP-1RA και, ειδικότερα, τη λιραγλουτίδη καταδεικνύουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη βελτίωση της παθογένειας και της εξέλιξης της AD, ιδίως στον ιππόκαμπο. Τα νευροπροστατευτικά αποτελέσματα συνάδουν με δοκιμές συμπεριφοράς σε τρωκτικά, υποδεικνύοντας ευεργετικά αποτελέσματα για τη γνωστική εξασθένηση, ανοίγοντας το δρόμο για περαιτέρω κλινικές δοκιμές οι οποίες κρίνονται αναγκαίο να διεξαχθούν.

II. Αγωνιστές- Μιμητικά του διπλού και τριπλού υποδοχέα του προσομοιάζοντως με τη Γλυκαγόνη Πεπτιδίου 1 του Γαστρικού Ανασταλτικού Πεπτιδίου και του υποδοχέα της Γλυκαγόνης (GLP-1RA/GIP/glucagon receptor agonist).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δέκα ετών, η προσοχή πολλών ερευνητικών ομάδων έχει επικεντρωθεί σε μια νέα κατηγορία δυνητικών θεραπευτικών παραγόντων για τη AD, τους αγωνιστές διπλών υποδοχέων. Οι αγωνιστές των διπλών υποδοχέων σχεδιάστηκαν για τη συνενεργοποίηση των υποδοχέων GLP-1R και του γαστρικού ανασταλτικού πεπτιδίου (GIP). Αυτοί οι υποδοχείς αποδείχθηκε ότι επιφέρουν ένα ισχυρό αποτέλεσμα στον έλεγχο των γλυκαιμικών επιπέδων (218). Η λειτουργία του GLP-1 έγκειται στην αναστολή της έκκρισης της γλυκαγόνης κατά τη διάρκεια υπεργλυκαιμικών συμβάντων, αλλά όχι σε ευγλυκαιμικά και υπογλυκαιμικά επίπεδα γλυκόζης. Κατά συνέπεια, το GLP-1RA μειώνει την υπεργλυκαιμία με ελάχιστο κίνδυνο για την εμφάνιση υπογλυκαιμικών επεισοδίων (219). Σε μη διαβητικές συνθήκες, το GIP διεγείρει την έκκριση γλυκαγόνης κατά την υπογλυκαιμία και

βελτιώνει την έκκριση ινσουλίνης κατά την υπεργλυκαιμία. Η ινσουλινοτροπική δράση της GIP αποδείχθηκε ότι είναι μειωμένη σε ασθενείς με T2DM, αλλά οι εκλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα της GIP δεν είναι επαρκώς αποτελεσματικοί στη θεραπεία του T2DM (220,221). Η ενοποιημένη θεραπευτική δράση των αγωνιστών των υποδοχέων GLP-1 και GIP σε ένα μονομοριακό προσδέτη έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τον γλυκαιμικό έλεγχο σε σύγκριση με τη μεμονωμένη χορήγηση GLP-1RA, μέσω της ενεργοποίησης διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών (222). Μια άλλη νέα θεραπευτική προσέγγιση για τον T2DM, που βασίζεται στον συνδυασμό πεπτιδικών αγωνιστών, αποτελείται από τριπλούς αγωνιστές που έχουν σχεδιαστεί για να διεγείρουν τους υποδοχείς του GLP-1, του GIP και της γλυκαγόνης. Αυτοί οι αγωνιστές έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν αποτελεσματικά το σωματικό βάρος και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σε προκλινικές μελέτες και κλινικές δοκιμές σε βαθμό μεγαλύτερο από τον κάθε παράγοντα μεμονωμένα (223). Σε μοντέλα τρωκτικών, ο τριπλός αγωνιστής μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης αίματος νηστείας, χωρίς να προκαλέσει υπογλυκαιμία, δείχνοντας αποτελεσματικότητα σε μεταβολικές διαταραχές· επομένως, αναμένεται να παρουσιάζει ευεργετική επίδραση στη διαχείριση της AD (224). Ορισμένοι αγωνιστές του διπλού και του τριπλού υποδοχέα έχουν ήδη αναπτυχθεί και ενταχθεί σε κλινικές δοκιμές φάσης I για τη θεραπεία του T2DM, σε περιπτώσεις όπου έχει παρατηρηθεί υπέρτερη δράση σε σχέση με τους εγκεκριμένους εκλεκτικούς αγωνιστές GLP-1R σε προκλινικές μελέτες (225,226). Σε πρόσφατες μελέτες, φάνηκε επίσης ότι βελτιώνουν την παθολογία της AD σε κυτταρικές σειρές και μοντέλα ποντικών της νόσου.

Ένας διπλός αγωνιστής των υποδοχέων GLP-1/GIP, με την ονομασία DA-JC4 (ή DA4-JC), έχει μελετηθεί σε ένα μοντέλο AD που προκαλείται από STZ σε αρσενικούς αρουραίους Sprague-Dawley, παρουσιάζοντας βελτίωση της μάθησης και της μνήμης σε συμπεριφορικές δοκιμασίες. Επιπλέον, το DA4-JC μείωσε τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών Ταυ, ομαλοποίησε την αύξηση της απόκρισης στη χρόνια φλεγμονή, ανέστρεψε την επαγόμενη από STZ αποπτωτική σηματοδότηση και προώθησε την επανευαισθητοποίηση της σηματοδότησης της ινσουλίνης στον εγκέφαλο, ανακουφίζοντας τη γνωστική εξασθένηση (227,228). Τα αποτελέσματά της έχουν επίσης δοκιμαστεί στο μοντέλο ποντικού APP/PS1 της AD και συγκρίθηκαν με τη λιραγλουτίδη. Το DA4-JC μείωσε τον αριθμό των πλακών β-αμυλοειδούς, των αστροκυττάρων και της ενεργοποιημένης μικρογλοίας στον φλοιό, ανέστρεψε την απώλεια μνήμης και ενίσχυσε τη συναπτική πλαστικότητα πιο αποτελεσματικά από τη λιραγλουτίδη. Παρουσίασε επίσης σαφή δόσοεξαρτώμενη επίδραση στην αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα και τη μείωση των πλακών β-αμυλοειδούς (228). Το DA5-CH είναι ένας άλλος νέος αγωνιστής του διπλού υποδοχέα, ο οποίος έχει δοκιμαστεί σε

μοντέλα AD. Η χορήγηση DA5-CH σε 60 ποντίκια ηλικίας εννέα μηνών APP/PS1 προκάλεσε βελτίωση της μνήμης εργασίας, βελτίωσε τα ελλείμματα χωρικής αντίληψης στη δοκιμασία MWM και προστάτευσε την ικανότητα επανεκμάθησης και τη γνωστική ευελιξία σε μια αντίστροφη δοκιμασία MWM. Το DA5-CH αντέστρεψε αποτελεσματικά την εξασθένηση της συναπτικής πλαστικότητας του ιππόκαμπου, μείωσε το φορτίο των πλακών β-αμυλοειδούς και τη φωσφορυλίωση του Tau και ομαλοποίησε τη δραστηριότητα σηματοδότησης PI3K/AKT/GSK3β στον ιππόκαμπο (229). Το 2019, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα SH-SY5Y και ποντίκια APP/PS1 ηλικίας 10 έως 12 μηνών συνέκρινε τον αγωνιστή του διπλού υποδοχέα DA-JC1 έναντι της λιραγλουτίδης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το DA-JC1 προστάτευσε τα κύτταρα SH-SY5Y από το οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από το H₂O₂, και αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων πιο αποτελεσματικά από τη λιραγλουτίδη. Στο *in vivo* πείραμα της μελέτης, και τα δύο φάρμακα βελτίωσαν εξίσου τη νευρογένεση στην υποκοιλιακή ζώνη και μείωσαν τα ολιγομερή β-αμυλοειδούς, αλλά το DA-JC1 είχε συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι της λιραγλουτίδης στη μείωση των νευροφλεγμονωδών δεικτών στον ιππόκαμπο (230). Επιπλέον σε μοντέλο ποντικού APP/PS1, διαπιστώθηκε ότι η θεραπεία με έναν τριπλό αγωνιστή σε δόση 10 nmol/kg για δύο μήνες αντιστρέφει την εξασθένηση της μάθησης και της μνήμης στη δοκιμασία MWM, ενώ βελτιώνει το φορτίο των αμυλοειδικών πλακών στον εγκέφαλο επίσης μειώνει την απόκριση της χρόνιας φλεγμονής στον φλοιό και τον ιππόκαμπο. Επίσης, κατέστειλε το οξειδωτικό στρες στον φλοιό και τον ιππόκαμπο και αύξησε τον αριθμό των ανώριμων νευρώνων στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου. Επιπροσθέτως, ο τριπλός αγωνιστής ανέστρεψε τη μείωση του BDNF στον ιππόκαμπο, αντιστάθμιζε τη μείωση της συναπτοφυσίνης και έδειξε πιθανές αντιαποπτωτικές επιδράσεις μειώνοντας την προαποπτωτική αναλογία BAX/Bcl-2 στα ποντίκια APP/PS1 (231). Μια άλλη μελέτη τριπλού αγωνιστή σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια 3xTg-AD (22 αρσενικά και 8 θηλυκά), μετά από ενδοπεριτοναϊκή χρόνια χορήγηση στην ίδια δόση (10 nmol/kg), μία φορά ημερησίως για 30 ημέρες, μείωσε τη διαταραχή της συμπεριφοράς των ποντικών AD στο ανοιχτό πεδίο, βελτίωσε τη μνήμη εργασίας και διέσωσε τη μακροπρόθεσμη μνήμη τους. Προκάλεσε επίσης βελτίωση της συναπτικής πλαστικότητας στον ιππόκαμπο και ανακούφισε την ιπποκαμπική παθολογία β-αμυλοειδούς και Tau, ρύθμιζε την έκφραση της φωσφορυλιωμένης p-CAMKII, της φωσφορυλιωμένης p-CREB και της φωσφορυλιωμένης p-GSK3b στον ιππόκαμπο, ενώ δεν επηρέασε την το σωματικό βάρος και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των ζώων (232). Η ίδια ερευνητική ομάδα επιβεβαίωσε τα αρχικά της αποτελέσματα σε μια μεταγενέστερη μελέτη σχετικά με τη μνήμη και τη συμπεριφορά των ποντικών 3xTg-AD και επέκτεινε το πείραμά της περιλαμβάνοντας την τεχνική καθήλωσης κηλίδας

(patchclamp) που αποκάλυψε αυξημένη αυθόρμητη διεγερτική συναπτική δραστηριότητα των ποντικών AD μετά από θεραπεία ενός μήνα με τριπλό αγωνιστή. Η θεραπεία συνέβαλε περαιτέρω στην ομαλοποίηση των ανωμαλιών στην υπερδιεγερσιμότητα, μείωσε τους τασεοελεγχόμενους διαύλους ασβεστίου L-τύπου των νευρώνων που βρίσκονται στον ιππόκαμπο και ομαλοποίησε τις διαμεμβρανικές ροές Ca^{2+} . Τέλος, ο τριπλός αγωνιστής φάνηκε να προκαλεί ρύθμιση της έκφρασης της συναπτοφυσίνης και της μετασυναπτικής πρωτεΐνης πυκνότητας 95kDa στον ιππόκαμπο των ποντικών (233).

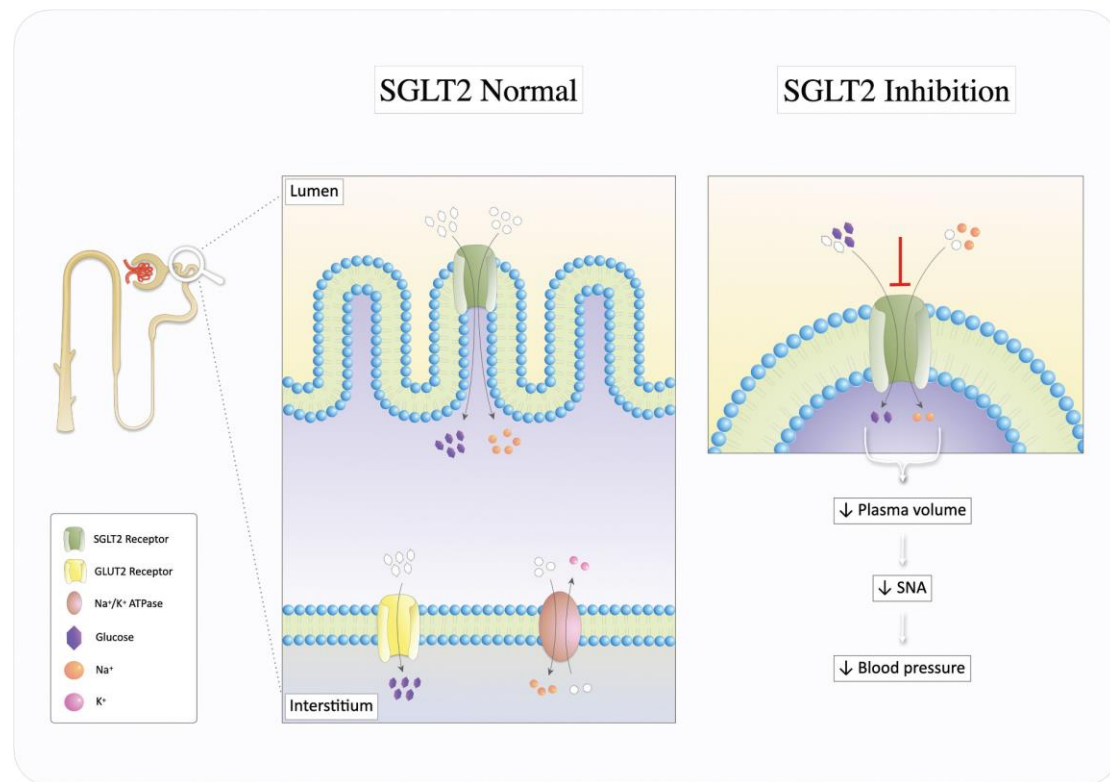
Σοβαρές ενδείξεις σχετικά με τους αγωνιστές διπλών και τριπλών υποδοχέων σε μοντέλα AD υποστηρίζουν τις νευροπροστατευτικές τους δυνατότητες στην AD, καθώς βελτιώνουν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου, μειώνουν τους βιοδείκτες φλεγμονής, το οξειδωτικό στρες, και ως εκ τούτου, κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή περαιτέρω μελετών σε κλινικό επίπεδο.

III. Αναστολείς του συμμεταφορέα νατρίου-γλυκόζης 2.

Η μεταφορά γλυκόζης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης πραγματοποιείται από δύο διαφορετικούς τύπους μεταφορέων, τους μεταφορείς γλυκόζης (GLUTs, κωδικοποιείται από το γονίδιο: SLC2A διαλυτός φορέας 2A) και τους συμμεταφορείς γλυκόζης νατρίου (SGLTs, κωδικοποιείται από το γονίδιο: SLC5A διαλυτός φορέας 5A). Ο δεύτερος τύπος μεταφορέα περιλαμβάνει μεμβρανικές μονομερείς πρωτεΐνες με 14 διαμεμβρανικές περιοχές και μία μόνο θέση N-γλυκοζυλίωσης. Στον άνθρωπο, η οικογένεια SGLT αποτελείται από τουλάχιστον έξι διαφορετικές ισομορφές, με τις SGLT1 και SGLT2 να βρίσκονται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος λόγω της ζωτικής σημασίας λειτουργίας τους (234). Η SGLT2 είναι μια πρωτεΐνη διεκπεραιώνει τη μεταφορά της γλυκόζης ενάντια στην κλίση συγκέντρωσης με ταυτόχρονη μεταφορά ιόντων νατρίου. Εντοπίζεται κυρίως στους νεφρούς, στην ακραία μεμβράνη των κυττάρων των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων, και είναι υπεύθυνη για το 90% περίπου του ρυθμού επαναρρόφησης της γλυκόζης που φιλτράρεται από το σπειραματικό σύστημα των νεφρών (235). Εκτός από την παρουσία τους στους νεφρούς, οι SGLT2 διαπιστώθηκε ότι εκφράζονται σε διάφορα μέρη του σώματος, τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους. Όσον αφορά το νευρικό σύστημα, αποδείχθηκε ότι οι SGLTs εκφράζονται ευρέως στον εγκέφαλο των αρουραίων και έχει περιγραφεί και η περιφερειακή και λειτουργική κατανομή τους στην παρεγκεφαλίδα, τον ιππόκαμπο, τον μετωπιαίο φλοιό, τον ουραίο πυρήνα, το κέλυφος, την αμυγδαλή, τον βρεγματικό φλοιό και τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου (236,237). Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε επίσης την έκφραση του

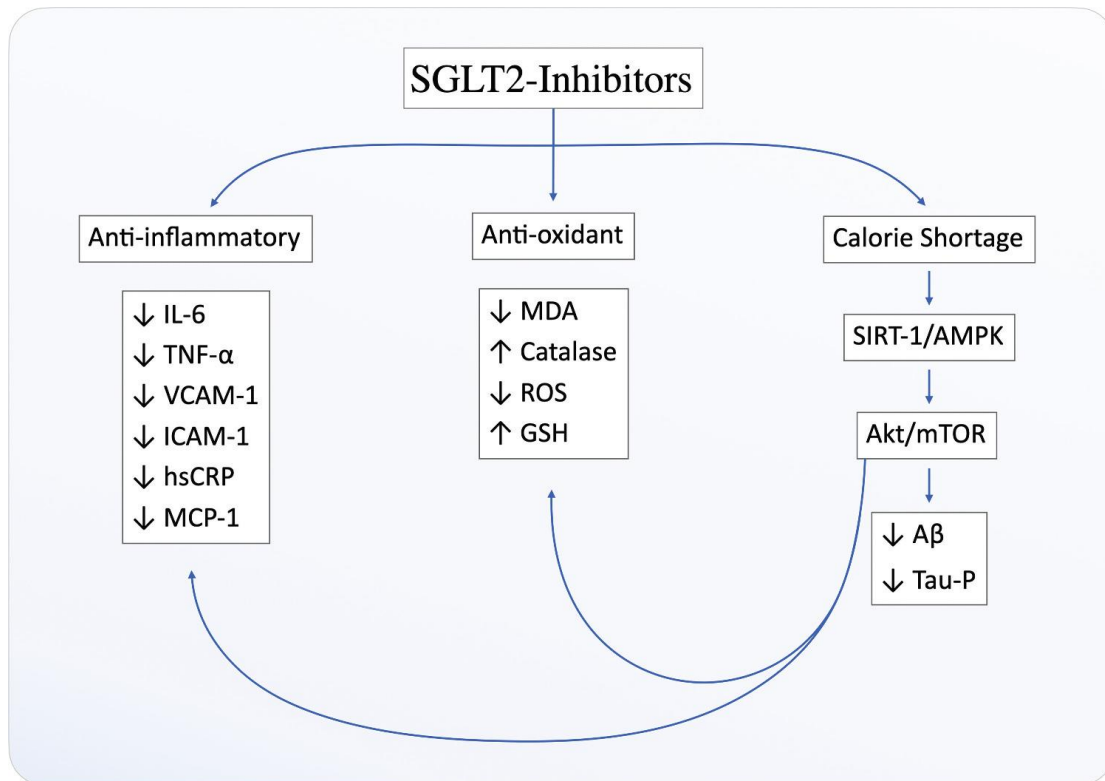
SGLT2 στα επιθηλιακά κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος και στα επενδυματικά κύτταρα στον εγκέφαλο του ανθρώπου και του ποντικού (238). Σε ένα μοντέλο αρουραίου με βλάβη που προκλήθηκε έπειτα από ισχαιμία/επαναιμάτωση, η θεραπεία με εμπαγλιφλοζίνη μείωσε σημαντικά το μέγεθος του εμφράκτου, ενίσχυσε τις νευροσυμπεριφορικές λειτουργίες και μείωσε τις νευρολογικές ελλείψεις, ενώ οι αρουραίοι εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα στις συμπεριφορικές δοκιμασίες (239). Οι SGLT2i αποτελούν μια νέα κατηγορία από του στόματος χορηγούμενων αντιδιαβητικών φαρμάκων, τα οποία δρουν μειώνοντας τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μέσω της παρεμπόδισης της επαναρρόφησης της από τους νεφρούς και της διαχείρισης της ομοιόστασης της γλυκόζης (240). Εν τέλει, η γλυκόζη απομακρύνεται από το σώμα μέσω των ούρων, μια κατάσταση που ονομάζεται γλυκοζουρία. Υπάρχουν διάφορα φάρμακα SGLT2i, που ονομάζονται επίσης γλιφλοζίνες, όπως η *δαπαγλιφλοζίνη*, η *καναγλιφλοζίνη*, η *λουσεογλιφλοζίνη*, η *εμπαγλιφλοζίνη*, η *ιπραγλιφλοζίνη*, η *σοταγλιφλοζίνη*, η *ερτουγλιφλοζίνη* και η *τοφογλιφλοζίνη* (127). Μεταξύ αυτών, οι εγκεκριμένες από τον FDA για τη θεραπεία του T2DM είναι η εμπαγλιφλοζίνη, η καναγλιφλοζίνη, η δαπαγλιφλοζίνη και η ερτουγλιφλοζίνη. Οι SGLT2i διαφέρουν κυρίως ως προς τη συγγένεια πρόσδεσής τους, την εκλεκτικότητά τους για τους μεταφορείς SGLT και την προκύπτουσα μείωση της αιμοσφαιρίνης A1c. Η θεραπεία με SGLT2i προσαρμόζεται ανάλογα με το ιστορικό κάθε ασθενούς καθώς και με προβλήματα υγείας που μπορεί να συνυπάρχουν, όπως αθηρωματική καρδιαγγειακή νόσος, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ή χρόνια νεφρική νόσος, λαμβάνοντας πάντα υπόψη τις βασικές τιμές του εκτιμώμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (241). Λαμβάνοντας υπόψη τα ερευνητικά ευρήματα διαφόρων προκλινικών μελετών που υποδηλώνουν τις πιθανές νευροπροστατευτικές ιδιότητες των SGLT2i, είναι ζωτικής σημασίας να εξεταστούν οι μοριακοί και τους κυτταρικοί μηχανισμοί. Με βάση πειραματικές μελέτες σε διάφορους τύπους κυτταρικών καλλιιεργειών και τρωκτικών, οι SGLT2i αποδείχθηκε ότι μειώνουν το κυτταρικό στρες και τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, βελτιώνουν την έκφραση προφλεγμονωδών μορίων και περιορίζουν την επίδραση της ισχαιμικής βλάβης. Αυτοί οι μοριακοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη δράση του SGLT2i σε άλλα όργανα του σώματος, εκτός από τα νεφρά, όπως η καρδιά. Οι κλινικές δοκιμές EMPAREG και CANVAS εξέτασαν τις καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις της εμπαγλιφλοζίνης και της καναγλιφλοζίνης, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, σε διαβητικούς ασθενείς με υψηλό κίνδυνο για μείζονα ανεπιθύμητα καρδιακά συμβάντα. Η εμπαγλιφλοζίνη παρουσίασε καρδιοπροστατευτικά οφέλη, βελτίωσε τον γλυκαιμικό έλεγχο σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο και μείωσε τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάντα και συνολική θνησιμότητα στους ασθενείς (242). Παρομοίως, περιγράφηκε χαμηλότερος κίνδυνος

καρδιαγγειακών επεισοδίων για τη χρήση της καναγλιφλοζίνης σε διαβητικούς ασθενείς σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (243).



Εικόνα 8: Ο ρόλος των SGLT2 στη λειτουργία των νεφρών και η επίδραση των SGLT2i. (α) Επαναρρόφηση ανιόντων γλυκόζης και νατρίου στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. (β) Συστηματικές επιδράσεις των SGLT2i μέσω της δράσης τους στους νεφρώνες.

SNA: Sympathetic nerve activity, SNS: sympathetic nervous system, CVD: cardiovascular disease. (Katsenos, 2022)



Εικόνα 9: Οι κυτταρικές επιδράσεις των SGLT2i. Προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης της SGLT2i σε κάθε κύτταρο που εκφράζει τον SGLT2 στην κυτταρική μεμβράνη.

IL-6: interleukin 6, TNFα: tumor necrosis factor α, VCAM-1: vascular cell adhesion protein, ICAM-1: intercellular adhesion molecules 1, hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein, MCP-1: monocyte chemotactic protein 1, MDA: malondialdehyde, ROS: reactive oxygen species, GSH: glutathione, SIRT1: histone/protein, AKT: protein kinase B, mTOR: mechanistic target of rapamycin, AMPK: AMP-activated protein kinase deacetylase, Aβ: amyloid β, Tau-p: Phosphorylated Tau protein. (Katsenos 2022)

Η AD σχετίζεται με το χρόνια ενεργοποιημένο mTOR και απορρυθμισμένη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιημένης από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMPK), με επακόλουθη χρόνια αναστολή των αυτοφαγικών διεργασιών. Αυτά τα διαταραγμένα μονοπάτια αποδείχθηκε ότι βελτιώνονται όταν είναι παρόντες οι SGLT2i (244). Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, λόγω της γλυκοζουρίας που προκαλείται από τους SGLT2i, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των AMPK και της σιρτουίνης-1 (sirtuin-1). Τελικά, το μονοπάτι mTOR υπορυθμίστηκε και αποκαταστάθηκε η αυτοφαγία, ένας μηχανισμός επιβίωσης των κυττάρων που οδηγεί στην αποικοδόμηση δυσλειτουργικών οργανιδίων και στην απομάκρυνση ελαττωματικών ή συσσωρευμένων πρωτεϊνών (119,245,246). Δεδομένου ότι ο T2DM και η AD μοιράζονται κοινά παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά, οι SGLTs εκφράζονται ευρέως στον εγκέφαλο και οι SGLT2i ασκούν ποικίλες κυτταροπροστατευτικές επιδράσεις, υπήρξαν αρκετοί λόγοι για να εξεταστεί το θεραπευτικό δυναμικό αυτών των

αναστολέων στη θεραπεία της AD (247). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει μέχρι σήμερα ότι οι SGLT2i έχουν ευεργετικές επιδράσεις στη γνωστική εξασθένηση και παρουσιάζουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες (248).

Παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των μελετών που αφορούν την επίδραση των SGLT2i στο ΚΝΣ είναι περιορισμένος, τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν ένα σημαντικό αντίκτυπο στην αντιμετώπιση της νόσου.

Η εμπαγλιφλοζίνη, προστιθέμενη στο γεύμα των ποντικών 10 mg/kg/ημέρα για 10 ημέρες, εξασφάλισε νευροπροστασία στους εγκεφάλους διαβητικών ποντικών και απέτρεψε τις ανωμαλίες υπερδομικής αναδιαμόρφωσης εντός της νευροαγγειοβριθούς μονάδας της φλοιώδους φαιάς ουσίας και της υποφλοιώδους λευκής ουσίας (249). Οι Hierro-Bujalance et al. χορήγησαν σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο AD και T2DM (ποντίκια APP/PS1x db/db) εμπαγλιφλοζίνη (10 mg/kg/ημέρα) από 4 έως 26 εβδομάδων και παρατήρησαν περιορισμένη λέπτυνση του φλοιού και διατήρηση της νευρωνικής πυκνότητας. Επίσης, οι γεροντικές πλάκες και η φωσφορυλίωση του Ταυ μειώθηκαν και οι συμπεριφορικές δοκιμασίες έδειξαν βελτίωση της γνωστικής εξασθένησης (250). Σε ένα μακροχρόνιο πείραμα, των Lin et al. αναφέρεται ότι η τυπική δίαιτα που περιείχε 0,03% εμπαγλιφλοζίνη σε χρόνια χορήγηση για 10 εβδομάδες απέτρεψε σημαντικά τη γνωστική εξασθένηση σε ένα μοντέλο ποντικού για μη ινσουλινοεξαρτώμενο DM (C57BLKS/J-leprdb/leprdb) που αξιολογήθηκε με συμπεριφορικές δοκιμασίες, ενώ το αποτέλεσμα αυτό σχετίζεται με την μείωση του εγκεφαλικού οξειδωτικού στρες και την αύξηση του BDNF (251). Με ανάλυση Western Blot, οι συγγραφείς εντόπισαν σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του παράγοντα που προκαλείται από την υποξία-1α (HIF-1α) καθώς και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) σε ζώα που έλαβαν θεραπεία με εμπαγλιφλοζίνη. Μάλιστα, τα επίπεδα έκφρασης αυτών των δύο παραγόντων ήταν επίσης υψηλότερα όταν η εμπαγλιφλοζίνη χορηγήθηκε σε δόση 10 mg/kg έναντι της χαμηλότερης δόσης 1 mg/kg. Η υψηλότερη δόση εμπαγλιφλοζίνης βελτίωσε την εκφύλιση των νευρώνων στον ιππόκαμπο και στον εγκεφαλικό φλοιό (251).

Σε μια άλλη μελέτη, στην οποία εξετάστηκαν οι επιδράσεις της καναγλιφλοζίνης σε αρουραίους με δυσλειτουργία της μνήμης που προκλήθηκε από σκοπολαμίνη, πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές αναλύσεις, ανοσοϊστοχημεία καθώς και συμπεριφορική μελέτη στο Y maze και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η από του στόματος χορηγούμενη καναγλιφλοζίνη σε συγκέντρωση 10 mg/5 ml διαλύτη/kg για 13 ημέρες θα μπορούσε να βελτιώσει τη δυσλειτουργία της μνήμης σε αρουραίους μέσω του χολινεργικού και μονοαμινικού συστήματος (252). Οι θεραπείες τεσσάρων εβδομάδων με δαπαγλιφλοζίνη (1 mg/kg/ημέρα), βιλνταγλυπτίνη (3 mg/kg/ημέρα) και ο συνδυασμός τους μελετήθηκαν για τις

επιδράσεις τους σε μοντέλο αρουραίου με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Τα δύο μεμονωμένα φάρμακα ενίσχυσαν εξίσου τη μιτοχονδριακή λειτουργία του εγκεφάλου, βελτίωσαν τη σηματοδότηση της ινσουλίνης, μείωσαν την απόπτωση και απέτρεψαν τη γνωστική έκπτωση, ενώ μόνο η δαπαγλιφλοζίνη βελτίωσε τη συναπτική πλαστικότητα του ιππόκαμπου. Ωστόσο, ο συνδυασμός αυτών των δύο φαρμάκων είχε τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (253). Οι Millar et al. έδειξαν ότι 1 mg/kg δαπαγλιφλοζίνης ως μονοθεραπεία ήταν αποτελεσματική στην αναστροφή της εξασθένησης της μνήμης σε διαβητικά ποντίκια και αύξησε τη συναπτοφυσίνη και τον αριθμό των ανώριμων νευρώνων στην οδοντωτή έλικα. Ωστόσο, όταν συνδυάστηκε με 25 nmol/kg λιραγλουτιδής, η θεραπεία ήταν πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τη μεμονωμένη χορήγηση της δαπαγλιφλοζίνης (254).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, μια εν εξελίξει πιλοτική τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή εξετάζει τις επιδράσεις της δαπαγλιφλοζίνης σε ασθενείς με πιθανή AD. Αυτή η μελέτη, που διεξάγεται από το Κέντρο Νόσου Alzheimer του Πανεπιστημίου του Κάνσας, περιλαμβάνει 48 συμμετέχοντες οι οποίοι έλαβαν τυχαία 10 mg δαπαγλιφλοζίνης μία φορά ημερησίως ($n = 32$) ή εικονικό φάρμακο ($n = 16$) για 12 εβδομάδες (τυχαιοποίηση 2:1). Εξετάστηκαν η ασφάλεια και η ανεκτικότητα της δαπαγλιφλοζίνης και, μεταξύ άλλων, αξιολογήθηκαν οι γνωστικές επιδράσεις κατά την έναρξη και την εβδομάδα 12 με τη χρήση της Κλίμακας Αξιολόγησης της Νόσου του Alzheimer - Γνωστική Υποκλίμακα 14 (ADAS-Cog14) και των επιμέρους δοκιμασιών Λογικής Μνήμης I και II, Δοκιμασίας που κάνει A και B και Δοκιμασίας Χρωμάτων Λέξεων Stroop (ClinicalTrials.gov, NCT03801642). Οι επιδράσεις της εμπαγλιφλοζίνης στα επίπεδα κετονών στον εγκέφαλο θα διερευνηθούν, σε μια μελέτη που αποτελείται από περίπου 20 υγιείς συμμετέχοντες, ηλικίας τουλάχιστον 55 ετών, χωρίς διαβήτη (ClinicalTrials.gov, NCT03852901).

Η βιβλιογραφία υποστηρίζει τις θεραπευτικές δυνατότητες της SGLT2i στον εγκέφαλο της AD, αλλά εξακολουθούν να είναι περιορισμένες. Οι κλινικές δοκιμές που σχεδιάζονται επί του παρόντος αναμένεται να εμπλουτίσουν τις γνώσεις μας σχετικά με την επίδραση αυτών των καινοτόμων κατηγοριών αντιδιαβητικών φαρμάκων στη AD.

3. Νανοτεχνολογία.

Τα όνειρα και η φαντασία των ανθρώπων κατά την πάροδο των ετών, οδήγησαν στη δημιουργία νέων επιστημών και τεχνολογιών. Η νανοτεχνολογία, ένα από τα σημαντικότερα επιτεύγματα του 21ου αιώνα, προέκυψε από τέτοιες ζυμώσεις. Ο όρος "νανοτεχνολογία" αναφέρεται στην κατανόηση και τον έλεγχο της ύλης, διαστάσεων από 0.1 έως 100 nm, όπου

οι μοναδικές τους ιδιότητες παρέχουν νέες και ποικίλες δυνατότητες. Αν και η έκθεση του ανθρώπου σε νανοσωματίδια υπήρχε καθ' όλη τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας, μεγαλύτερη αύξησή της σημειώθηκε κατά τη διάρκεια της βιομηχανικής επανάστασης. Αν και η μελέτη των νανοσωματιδίων δεν είναι νέα, η έννοια του "νανόμετρου" διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τον Richard Zsigmondy, βραβευμένο με Νόμπελ Χημείας το 1925. Αυτός ήταν ο πρώτος που εισήγαγε τον όρο "νανόμετρο" για να χαρακτηρίσει το μέγεθος των σωματιδίων και ήταν επίσης ο πρώτος που μέτρησε το μέγεθος των σωματιδίων αυτών, όπως τα κολλοειδή χρυσού, χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο (255).

Η σύγχρονη νανοτεχνολογία είναι το πνευματικό παιδί του Richard Feynman, βραβευμένου με Νόμπελ Φυσικής το 1965. Κατά τη διάρκεια της συνάντησης της Αμερικανικής Φυσικής Εταιρείας το 1959 στο Caltech, παρουσίασε μια διάλεξη με τίτλο "There's Plenty of Room at the Bottom", στην οποία εισήγαγε την έννοια του χειρισμού της ύλης σε ατομικό επίπεδο. Αυτή η καινοτόμος ιδέα κατέδειξε νέους τρόπους σκέψης και οι υποθέσεις του Feynman έχουν έκτοτε αποδειχθεί σωστές. Για τους λόγους αυτούς θεωρείται ο πατέρας της σύγχρονης νανοτεχνολογίας (255).

Σχεδόν 15 χρόνια μετά τη διάλεξη του Feynman, ο Norio Taniguchi, ένας επιστήμονας από την Ιαπωνία, χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο "νανοτεχνολογία" για να περιγράψει διεργασίες ημιαγωγών που εκτελούνταν σε κλίμακα ενός νανομέτρου. Υποστήριξε ότι η νανοτεχνολογία αφορά την επεξεργασία, το διαχωρισμό, την ενοποίηση και την παραμόρφωση υλικών από ένα άτομο ή ένα μόριο. Η χρυσή εποχή της νανοτεχνολογίας ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του 1980, όταν οι Kroto, Smalley και Curl ανακάλυψαν τα φουλερένια και ο Eric Drexler, του Τεχνολογικού Ινστιτούτου της Μασαχουσέτης (MIT), ενσωμάτωσε ιδέες από το "There is Plenty of Room at the Bottom" του Feynman και τον όρο "νανοτεχνολογία" του Taniguchi στο βιβλίο του το 1986 με τίτλο "Engines of Creation: Η επερχόμενη εποχή της νανοτεχνολογίας". Ο Drexler πρότεινε την ιδέα ενός "συναρμολογητή" σε νανοκλίμακα, ο οποίος θα μπορούσε να κατασκευάσει ένα αντίγραφο του εαυτού του και άλλων αντικειμένων τυχαίας πολυπλοκότητας. Το όραμα του Drexler για τη νανοτεχνολογία συχνά αποκαλείται "μοριακή νανοτεχνολογία". Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας διευρύνθηκε περαιτέρω όταν ο Iijima, ένας άλλος επιστήμονας από την Ιαπωνία, ανέπτυξε τους νανοσωλήνες άνθρακα (256).

Η υποκείμενη επιστήμη αναφέρεται ως νανοεπιστήμη. Οι ιδιότητες της ύλης στη νανοκλίμακα είναι διαφορετικές από εκείνες σε μεγαλύτερη κλίμακα. Όταν οι διαστάσεις ενός υλικού μειώνονται από ένα μεγάλο μέγεθος, οι ιδιότητες παραμένουν αρχικά ίδιες, ενώ στη συνέχεια εμφανίζονται μικρές αλλαγές. Τέλος, όταν το μέγεθος πέφτει κάτω από 100 nm,

μπορεί να εμφανιστούν δραματικές αλλαγές στις ιδιότητες. Οι μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες των νανουλικών μπορούν να αξιοποιηθούν για εμπορικές εφαρμογές και για νέες επιδόσεις που ωφελούν την κοινωνία. Η ανακάλυψη νέων υλικών, διεργασιών και φαινομένων στη νανοκλίμακα και η ανάπτυξη νέων πειραματικών και θεωρητικών τεχνικών για την έρευνα στα τέλη του 20ού αιώνα παρέχουν νέες ευκαιρίες για την ανάπτυξη καινοτόμων νανοσυστημάτων και νανουλικών. Ο τομέας αυτός ανοίγει νέους δρόμους στην επιστήμη και την τεχνολογία (257,258).

Η νανοτεχνολογία αποτελεί μια πολυδιάστατη επιστήμη που καλύπτει τη νανοκατασκευή, τα νανοϋλικά και την εφαρμογή φυσικών, χημικών και βιολογικών συστημάτων σε διαφορετικές κλίμακες, από το επίπεδο του μορίου έως υποмикροσκοπικές διαστάσεις. Περιλαμβάνει διακλαδώσεις σε επιστημονικά πεδία όπως η χημεία, η φυσική, η επιστήμη των υλικών, η μηχανική και η κατασκευή. Ο αντίκτυπός της στην κοινωνία και την οικονομία μας τον 21ο αιώνα μπορεί να συγκριθεί με εκείνον που είχαν η τεχνολογία ημιαγωγών, η πληροφορική ή η κυτταρική και μοριακή βιολογία τον προηγούμενο αιώνα. Η ενσωμάτωση της νανοτεχνολογίας σε ευρύτερα συστήματα έχει προσφέρει καινοτόμες λύσεις σε προβλήματα περιβάλλοντος, ιατρικής και βιομηχανίας, όπως έξυπνα υλικά, ηλεκτρονική, χορήγηση φαρμάκων, ενέργεια και νερό, βιοτεχνολογία, τεχνολογία πληροφοριών και εθνική ασφάλεια. Η νανοτεχνολογία αποτελεί μια σημαντική τάση που φέρνει ανατρεπτική καινοτομία, καθώς έχει γίνει μια τεχνολογία γενικού σκοπού, εφαρμόζοντας σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς (257,258).

Η νανοτεχνολογία αποτελεί μια γέφυρα μεταξύ της κλασικής και της κβαντικής μηχανικής, εντάσσοντας την ενδιάμεση περιοχή γνωστή ως μεσοσκοπικό σύστημα. Αυτή η περιοχή χρησιμοποιείται για τη δημιουργία νανοσυστημάτων σε ποικίλους τομείς, όπως γεωργικά προϊόντα, νανοϊατρική και νανοεργαλεία για ιατρική χρήση. Ασθένειες που παλιά θεωρούνταν ανίατες μπορούν τώρα να περιοριστούν με τη χρήση φαρμάκων και διαγνωστικών εργαλείων που βασίζονται σε νανοσυστήματα. Αυτή η τεχνολογία έχει επίσης έντονη επίδραση στη μαζική βιομηχανική παραγωγή. Αντί να κατασκευάζει υλικά με τη μείωση των ποσοτήτων υλικών, η νανοτεχνολογία χρησιμοποιεί την αρχή της αντίστροφης μηχανικής, παρόμοια με τη λειτουργία της φύσης. Αυτό επιτρέπει την κατασκευή προϊόντων σε νανοκλίμακα, όπως τα άτομα, και στη συνέχεια την ανάπτυξη προϊόντων που λειτουργούν σε μεγαλύτερη κλίμακα (259,260).

3.1.1. Εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στην Ιατρική.

Η γένεση της νανοϊατρικής δεν είναι δυνατόν να παραβλεφθεί όταν μιλάμε για τους μεγάλους τομείς των βιολογικών επιστημών, της βιοτεχνολογίας και της ιατρικής. Η νανοτεχνολογία έχει ήδη αρχίσει να ξεπερνά τη φαντασία στο ευρύτερο όραμα της νανοβιοτεχνολογίας. Η ποιότητα της ανθρώπινης ζωής βελτιώνεται συνεχώς χάρη στις επιτυχημένες εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στην ιατρική, με αποτέλεσμα να έρχεται στην επιφάνεια ένας ολόκληρος νέος τομέας, αυτός της νανοϊατρικής, ο οποίος επέτρεψε στους επιστήμονες να δημιουργήσουν αναβαθμισμένες παραλλαγές της διάγνωσης, της θεραπείας, του ελέγχου, της αλληλουχίας, της πρόληψης ασθενειών και των προληπτικών δράσεων για την υγειονομική περίθαλψη (261). Αυτές οι μέθοδοι μπορούν επίσης να συμπεριλαμβάνουν την παρασκευή φαρμάκων, το σχεδιασμό, τη σύζευξη και τις αποτελεσματικές επιλογές χορήγησης με τις εξελίξεις στη νανο-γενωμική, τη μηχανική ιστών και τη γονιδιακή θεραπεία. Με αυτό τον τρόπο, θα μπορούσε να προβλεφθεί ότι σύντομα, η νανοϊατρική θα αποτελέσει το κατεξοχήν αντικείμενο ερευνητικού ενδιαφέροντος για την επερχόμενη γενιά βιολόγων, προκειμένου να μελετηθούν οι επωφελείς επιπτώσεις και οι κίνδυνοι που μπορεί να συνδέονται με αυτές (262).

Διαφορετικά συστήματα ταξινόμησης έχουν εφαρμοστεί στα νανοϋλικά ανάλογα με το μέγεθος, το σχήμα, τη σύσταση των φάσεων κ.λπ. Όλα τα νανოსωματίδια έχουν συγκεκριμένα φυσικά χαρακτηριστικά (σχήμα, μέγεθος, επιφάνεια, διαπερατότητα, μαγνητισμός) που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητές τους και τα καθιστούν πολύ διαφορετικά από άλλα υλικά μεγαλύτερης κλίμακας (263). Όπως προαναφέρθηκε, το μέγεθος όλων των νανოსωματιδίων, εξ ορισμού, είναι μεταξύ 0,1 και 100 nm. Αυτό το μικρό μέγεθος τους επιτρέπει να περνούν διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών και να βελτιώνουν τη χορήγηση φαρμάκων, βελτιώνουν τη διαλυτότητά τους και αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητά τους και το χρόνο κυκλοφορίας τους μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Επίσης, αυξάνει τη συνολική επιφάνεια του χορηγούμενου υλικού (δηλαδή, αυξάνει την αντιδραστικότητα, τη διαλυτότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα, τις ιδιότητες σύζευξης με ηλεκτροστατικές επιφάνειες ή άλλα μεγαλύτερα μόρια νανοςωματιδίων. Ακόμα, η αυξημένη διαπερατότητα και βιοδιαθεσιμότητα των υλικών σε νανοκλίμακα ενέχει τον κίνδυνο διείσδυσης και συσσώρευσης εντός ορισμένων ιστών και κυττάρων καθώς και την πρόκληση ογκογένεσης. Τα νανοςωματίδια μπορούν να έχουν διάφορα σχήματα (σωλήνες, σφαίρες, ημισφαίρια, κώνοι, σύρματα, δίσκοι, κύλινδροι κ.λπ.) και να είναι στερεά, πορώδη ή κενά. Ως εκ τούτου, τα νανοςωματίδια μπορούν να μεταφέρουν ουσίες εντός του ζωντανού κυττάρου (π.χ. για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, απεικόνιση, αναγέννηση και επιδιόρθωση) (261).

Έχουν περιγραφεί διάφοροι σημαντικοί τύποι νανοσωματιδίων κατάλληλων για ιατρική χρήση με συγκεκριμένες ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων μεταλλικών νανοσωματιδίων, δένδριμερών, λιποσωμάτων, νανοσωμάτων, νανοπόρων, νανοσωλήνων άνθρακα, φουλερενίων, νανοκρυστάλλων/κβαντικών κουκκίδων, νανοκελύφους, νανοσυρμάτων, νανοφυσαλίδων, παραμαγνητικών νανοσωματιδίων και νανοβομβών- οι δομές αυτές μπορούν να συνδυαστούν για να σχηματίσουν νανορομπότ και ακόμη και δομές που μιμούνται τα κύτταρα (261).

3.1.2. Αλληλεπίδραση Νανομορίων με Βιομόρια και Θεραπεία.

Τα νανοσωματίδια αντιστοιχούν και ταιριάζουν με τα φυσικά μόρια και τα λειτουργικά συστήματα μέσα στο ανθρώπινο σώμα και, ως εκ τούτου, μπορούν να αλληλεπιδρούν ενεργά με τα βιολογικά συστήματα. Καθώς η πλειονότητα των ζωικών κυττάρων βρίσκεται στο εύρος των 10-20.000 nm σε μέγεθος, τα νανοσωματίδια και οι συσκευές νανομεγέθους μπορούν να εισέλθουν στο ζωντανό κύτταρο και στις υποκυτταρικές δομές (οργανίδια) και να αλληλεπιδράσουν με ενδοκυτταρικά μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και τα ριβονουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA). Οι συσκευές νανοκλίμακας μπορούν τόσο να ανιχνεύσουν όσο και να θεραπεύσουν ενδεχόμενες κυτταρικές βλάβες διορθώνοντας υποκυτταρικές δυσλειτουργίες (π.χ. μέσω αλληλεπίδρασης με ενδοκυτταρικά βιοπολυμερή, όπως πρωτεΐνες και ριβονουκλεϊκά οξέα, με υποδοχείς και ένζυμα) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενεργό παρακολούθηση κυτταρικών διεργασιών, την υποκυτταρική και ιστική αποκατάσταση και αναγέννηση. Δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι σε αυτά τα μικροσκοπικά μεγέθη, τα χαρακτηριστικά της ύλης αλλάζουν σημαντικά με την υπεροχή των κβαντικών φαινομένων και τις σημαντικές αλλαγές στη χημική αντιδραστικότητα που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση νέων και απρόβλεπτων φαινομένων και ιδιοτήτων (261). Έχουν χρησιμοποιηθεί ως "φορείς" βιολογικά δραστικών μορίων (αντισώματα, εμβόλια, αντικαρκινικοί παράγοντες κ.λπ.), στα οποία ο πυρήνας του νέου νανο-βιοϋλικού σχηματίζεται από τα νανοσωματίδια και καλύπτεται από αδρανές υλικό (π.χ. διοξείδιο του πυριτίου) και στη συνέχεια από ένα μόριο-συνδέτη και, τέλος, συνδέονται οι βιολογικά δραστικές δομές. Τα νανοϋλικά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να καλύψουν και να δεσμεύσουν βιομόρια, και μετά τη μεταφορά στα ζωντανά κύτταρα, τα σημασμένα νανοσωματίδια μπορούν να ανιχνεύσουν και να επιδράσουν στα κύτταρα στόχους. Με άλλα λόγια, τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και την εξάλειψη των κατεστραμμένων κυττάρων (264).

Η νανοτεχνολογία εφαρμόζεται σε πολυάριθμους θεραπευτικούς τομείς, συμπεριλαμβανομένων των αντιμολυσματικών φαρμάκων, των αντικαρκινικών φαρμάκων, της επούλωσης πληγών και των καλλυντικών, των τεχνητών ιστών, των εμβολίων, της οδοντιατρικής, της νευροπροστασίας και της νευροεκφύλισης, των τεχνητών κυττάρων και οργάνων και της νανορομποτικής (261).

Τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, προσφέροντας μεγαλύτερη εξειδίκευση, υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα σε χαμηλότερη δοσολογία και χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης συστηματικών και τοπικών παρενεργειών. Για τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι νανοσωματιδίων, όπως λιποσώματα, μικκύλια, δενδριμερή/νανοπολυμερή, νανοπορώδη, νανοκελύφη κ.λπ. Παρόλα αυτά, η τοξικότητα και η ασφάλειά τους για τον ανθρώπινο οργανισμό και το περιβάλλον παραμένουν ασαφείς και απαιτείται περαιτέρω έρευνα (261).

Στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές, τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων στα κατεστραμμένα κύτταρα ή σε περιοχές που διαφορετικά παραμένουν εντός του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Έχουν διερευνηθεί διάφοροι τύποι νανοσωματιδίων, όπως λιποσώματα, δενδριμερή, νανογέλες, γαλακτώματα, πολυμερή και στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια, καθώς και νανοεναιωρήματα. Στη νόσο του Πάρκινσον, τα νανοσωματίδια διερευνώνται ως φορείς φαρμάκων σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου με στόχο τη βελτίωση της κατάστασης και της ποιότητας ζωής του ασθενούς, δίχως όμως να μπορούν να βελτιώσουν την πρόγνωση. Οι ίδιες στρατηγικές διερευνώνται και στην AD, όπου οι ερευνητικές προσπάθειες στοχεύουν στην απομάκρυνση των εναποθέσεων αμυλοειδούς (261).

3.1.3. Ιεραρχικά Πορώδη Υλικά (HPCs).

Τα οργανικά πορώδη υλικά υπερτερούν σε ειδική επιφάνεια και σταθερή χημική δομή και βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στους τομείς της προσρόφησης, του διαχωρισμού φάσεων, της κατάλυσης και της αποθήκευσης ενέργειας (265). Για τα οργανικά πορώδη υλικά, η έρευνα για τις πορώδεις δομές κινείται σταδιακά προς δύο κατευθύνσεις (266). Η μία είναι η διεξαγωγή σε βάθος έρευνας στην υπάρχουσα πορώδη δομή για την περαιτέρω βελτίωση της απόδοσής της (267). Για παράδειγμα, η κατανομή του μεγέθους των πόρων προσαρμόστηκε για ένα μικροπορώδες υλικό που προσροφά διοξείδιο του άνθρακα, καθώς ο αριθμός και το μέγεθος της μικροπορώδους δομής καθορίζουν την ποσότητα προσρόφησης διοξειδίου του άνθρακα και μια προσαρμοσμένη πορώδης δομή μπορεί να εμφανίσει τη μέγιστη ικανότητα προσρόφησης για αέριο ή μικρά μόρια υπό τις ίδιες συνθήκες (268,269). Η άλλη είναι ο

συνδυασμός διαφόρων πορώδων δομών μέσω χημικών αντιδράσεων και η πλήρης αξιοποίηση των διαφορετικών πορώδων δομών. Η αυξανόμενη ζήτηση για οργανικά πορώδη υλικά σε αναδυσόμενους τομείς τείνει να απαιτεί υλικά με διάφορες δομές πόρων.

Τα ιεραρχικά πορώδη υλικά άνθρακα (HPCs) με μικροπόρους, μεσοπόρους και μακροπόρους χρησιμοποιούνται ευρέως σε αναδυσόμενους τομείς λόγω των ποικίλων δομών πόρων τους με υψηλή ειδική επιφάνεια και εξαιρετική χημική σταθερότητα (270,271). Ωστόσο, η παραδοσιακή μέθοδος σύνθεσης των HPCs εξακολουθεί να είναι περίπλοκη, οδηγώντας σε μια αβέβαιη πορώδη δομή και κάνοντας ακόμη και τους πόρους να καταστραφούν εύκολα. Είναι επιτακτική ανάγκη να βρεθεί μια κατάλληλη μέθοδος σύνθεσης. Οι μέθοδοι παρασκευής ιεραρχικών πορώδων υλικών άνθρακα μπορούν να χωριστούν σε δύο μεθόδους ανάλογα με τις διαφορετικές μεθόδους σύνθεσης, όπου η μία είναι η μέθοδος σκληρού προτύπου και η άλλη η μέθοδος μαλακού προτύπου (272,273). Το σκληρό πρότυπο πρέπει να συνθέτει ένα πρότυπο με προκαθορισμένη δομή, ακολουθούμενο από μια σειρά βημάτων μετα-επεξεργασίας (όπως η ενανθράκωση). Στη συνέχεια, μπορεί να παρασκευαστεί ένα ιεραρχικό πορώδες υλικό άνθρακα μετά την έκλυση του προτύπου. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα της μεθόδου του σκληρού προτύπου είναι τα εξής: (1) Η προεπεξεργασία του προτύπου είναι δύσκολη. Για παράδειγμα, η προεπεξεργασία του προτύπου πυριτίας πρέπει να επιτύχει ένα ορισμένο ποσοστό πρόσμιξης των ενεργών ομάδων για να εξασφαλιστεί η επιτυχία της επακόλουθης αντίδρασης διασύνδεσης. (2) Η επακόλουθη μετεπεξεργασία είναι επίσης περίπλοκη. Η επιλογή μιας πηγής άνθρακα και οι κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης μπορούν να καταστήσουν το HPC μια εξαιρετική δομή πόρων (274).

3.1.4. Πορώδη υλικά ως φορείς φαρμακευτικών παραγόντων.

Τα πορώδη υλικά παρουσιάζουν διευρυμένη επιφάνεια και μεγάλους πόρους που επιτρέπουν την προσρόφηση και την εναπόθεση δραστικών ενώσεων. Αυτά τα βασικά χαρακτηριστικά καθιστούν τα πορώδη υλικά ιδιαίτερα ενδιαφέροντα για τη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών. Η εισαγωγή του φαρμάκου στο εσωτερικό των πορώδων δομών γίνεται για την επίτευξη ελέγχου του ρυθμού απελευθέρωσης του φαρμάκου και την προστασία του από τις δυσμενείς εξωτερικές συνθήκες. Επιπλέον, τα πορώδη υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την τροποποίηση του ρυθμού διάλυσης χαμηλής διαλυτότητας φαρμάκων. Η μεγάλη επιφάνεια αυτών των υλικών μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό διάλυσης των ενώσεων που κατανέμονται στην επιφάνειά τους. Η μεγάλη επιφάνεια συμβάλλει επίσης

στην αμορφοποίηση του φαρμάκου και οι περιορισμένοι χώροι των πόρων μπορούν να αποτρέψουν την κρυστάλλωση του φαρμάκου (275).

Στον τομέα της φαρμακευτικής, τα πορώδη μικροσωματιδιακά υλικά χρησιμοποιούνται συχνά ως μέσο χορήγησης και για την παρασκευή δοσολογικών σχημάτων, όπως συμπιεσμένα ή πυροσυσσωματωμένα προϊόντα. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε ότι σε έναν όγκο πορώδους σωματιδιακού υλικού μπορούν να αναγνωριστούν δύο διαφορετικές καταστάσεις πορώδους: Το πορώδες εντός των μεμονωμένων σωματιδίων αναφέρεται ως ενδοσωματιδιακό πορώδες, ενώ τα κενά που σχηματίζονται μεταξύ των σωματιδίων ονομάζονται ενδοσωματιδιακοί πόροι. Για τις περισσότερες εφαρμογές φαρμακευτικής χορήγησης, είναι προτιμότερο να εισάγεται η δραστική ουσία στους ενδοσωματιδιακούς χώρους (276,277).

3.1.5. Η χρήση των HPCs στην αντιμετώπιση της AD.

Η νανοτεχνολογία έχει αναδειχθεί εδώ και καιρό ως πρωτοπόρος στην έρευνα για τη χορήγηση φαρμάκων, προσφέροντας πολλά υποσχόμενες πλατφόρμες για τη διάγνωση και τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών ως επακόλουθο της νανοκλίμακας. Τα τελευταία χρόνια, η συνδυαστική θεραπεία της νανοθεραπείας και των φαρμακευτικών φαρμάκων έχει λάβει τεράστια υποστήριξη από τον ιατρικό τομέα, καθώς είναι καθοριστικής σημασίας για την αύξηση της αποτελεσματικότητας των τρεχουσών θεραπειών εκτός από την παροχή αξιόπιστων εγγυήσεων. Άλλα ευνοϊκά πλεονεκτήματα που αφορούν αυτές τις νανοδιατάξεις χορήγησης φαρμάκων περιλαμβάνουν την ενισχυμένη σταθερότητα του φαρμάκου, τη βιοκατανομή και τη φαρμακοκινητική (PK), την εγγενή ικανότητα να ξεπερνούν την αντίσταση των όγκων στα φάρμακα, να διαλύουν υδρόφιλες και υδρόφοβες μονάδες, εκτός από την πρόσθετη ικανότητα να ανταποκρίνονται σε διαφορετικά συναντώμενα ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα για να αποκτήσουν χρονικό και χωρικό έλεγχο της απελευθέρωσης των θεραπευτικών τους φορτίων (278–280). Λαμβάνοντας υπόψη τις θεραπευτικές δυνατότητες που παρουσιάζουν οι διατάξεις χορήγησης φαρμάκων με βάση τα νανοσυστήματα, πολλαπλές μελέτες έχουν δοκιμάσει και διαφοροποιήσει ένα πλήθος υλικών για χρήση σε εφαρμογές χορήγησης φαρμάκων (281,282). Η συνεχής τροποποίηση συμπεριλαμβάνεται επίσης στη σχεδίαση των φορέων χορήγησης νανοφαρμάκων. Για να αναφέρουμε μερικά, τα λιποσώματα, τα πολυμερή μικκύλια, τα στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια, τα νανοσωματίδια χρυσού, τα νανοσωματίδια αργύρου, τα νανοσωματίδια οξειδίων μετάλλων και οι κβαντικές κουκκίδες αλλά και τα υλικά πορώδους άνθρακα είναι μεταξύ αυτών που αποκτούν μεγάλη απήχηση στις μέρες μας.

Μέχρι σήμερα, η μοναδική προσπάθεια που έχει γίνει για την αντιμετώπιση της νόσου του Alzheimer (AD) χρησιμοποιώντας τα HPCs αναφέρεται σε μια προκλινική μελέτη που αφορά τον εγκλωβισμό της γαλανταμίνης, ενός αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης, σε υλικά πορώδους άνθρακα. Αυτό έχει σκοπό την ενδορινική χορήγηση σε πειραματικά μοντέλα της νόσου καθώς οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν στην από του στόματος χορήγηση του φαρμάκου. Ωστόσο, η από του στόματος χορήγηση της γαλανταμίνης σε ασθενείς με AD συνοδεύεται από σοβαρές γαστρεντερικές παρενέργειες, όπως ναυτία, έμετος και διάρροια, που μπορεί να οδηγήσουν στην αναστολή της θεραπείας (283). Ωστόσο, η από του στόματος χορήγηση της γαλανταμίνης σε ασθενείς με AD συνοδεύεται από σοβαρές γαστρεντερικές παρενέργειες, όπως ναυτία, έμετος και διάρροια, που μπορεί να οδηγήσουν στην αναστολή της θεραπείας [5]. Επιπλέον, η από του στόματος χορήγηση, εκτός από τα μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι δύσκολη για τα άτομα που πάσχουν από AD λόγω της πνευματικής τους ικανότητας, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μη συμμόρφωση με το θεραπευτικό τους σχήμα. Τα καινοτόμα συστήματα χορήγησης είναι ζωτικής σημασίας και πρέπει να αναπτυχθούν (284).

Η ενδορινική χορήγηση γαλανταμίνης για τη διαχείριση της AD θα μπορούσε να είναι μια εναλλακτική στρατηγική σε σχέση με την από του στόματος χορηγούμενη γαλανταμίνη και έχει κερδίσει πρόσφατα την προσοχή. Η ενδορινική χορήγηση ξεπερνά την επιλεκτική διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τον μεταβολισμό πρώτης διέλευσης στο ήπαρ, οδηγώντας σε υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου στον εγκέφαλο (285,286). Η χορήγηση φαρμάκου από τη μύτη στον εγκέφαλο αποτρέπει επίσης τις γαστρεντερικές και άλλες συστηματικές παρενέργειες που προκαλούνται από την άμεση αλληλεπίδραση των μορίων γαλανταμίνης με τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου (287). Ωστόσο, παρά τα ανωτέρω οφέλη της χορήγησης της γαλανταμίνης μέσω της μύτης στον εγκέφαλο, η αδυναμία διατήρησης σταθερών θεραπευτικών επιπέδων της γαλανταμίνης στον εγκέφαλο αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα. Αμέσως μετά την ενδορινική χορήγηση του φαρμάκου, η αρχική υψηλή βραχύβια φαρμακοκινητική κορύφωση ακολουθείται από μια μεγαλύτερη περίοδο κατά την οποία η γαλανταμίνη είναι παρούσα σε φθίνουσες συγκεντρώσεις κάτω από τη θεραπευτικά απαιτούμενη (φαινόμενο "burst and tailing"). Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, η γαλανταμίνη συνήθως ενθυλακώνεται σε νανοσωματίδια, διαφόρων μορφών, τα οποία λειτουργούν ως φορείς φαρμάκου και την προστατεύουν από την αποικοδόμηση, οδηγώντας σε σταδιακή απελευθέρωση του φαρμάκου στον εγκέφαλο και αποτελεσματικότερη αναστολή της AChE (288).

4. Σκοπός της εργασίας.

Η εν λόγω διδακτορική διατριβή εστίασε στη μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης των αντιδιαβητικών παραγόντων νέας γενιάς SGLT2i αλλά και των DPP-4i, και πιο συγκεκριμένα της σιταγλιπτίνης, της εμπαγλιφλοζίνης και της δαπαγλιφλοζίνης, σε κυτταρικό (*in vitro*) αλλά και σε συμπεριφορικό (*in vivo*) επίπεδο. Η μελέτη επικεντρώθηκε κατά κύριο λόγο στις πρωτογενείς καλλιέργειες πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου απομονωμένα τόσο από επίμυες του είδους Wistar ως κύτταρα των ομάδων ελέγχου όσο από επίμυες TgF344-AD οι οποίοι εμφανίζουν τη νόσο προϊούσης της ηλικίας. Η μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης των αντιδιαβητικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε μέσω της εκτίμησης των μεταβολών στους δενδρίτες και τις δενδριτικές άκανθες, οι οποίες χρησιμεύουν ως δείκτες συναπτικής λειτουργίας και ακεραιότητας εντός των νευρωνικών κυκλωμάτων. Επιπλέον όπως προαναφέρθηκε, μελετήθηκε η *in vivo* επίδραση της δαπαγλιφλοζίνης είτε μόνης είτε εγκλωβισμένης σε νανοσωματίδιο πορώδους άνθρακα, μετά τη χορήγησή της σε πειραματικά μοντέλα στα οποία έχει προκληθεί παθολογία Alzheimer με τη χρήση χλωριδίου του αλουμινίου.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Νομικό πλαίσιο.

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη με την έγκριση της Επιτροπής Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (αριθμός έγκρισης: 56654/ 26-11-2021) και της Κτηνιατρικής Διεύθυνσης της Περιφέρειας Ηπείρου (αριθμός έγκρισης: 1657/17-03-2021). Όλες οι πειραματικές διαδικασίες στα ζώα πραγματοποιήθηκαν στη μονάδα εγκατάστασης ζώων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (αριθμός έγκρισης: EL33-BIOexp01) σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές για τα πειράματα σε ζωικά μοντέλα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κανονισμό L276/33/20.10.2010 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου.

5.2 Κυτταρικές σειρές (*In Vitro*).

5.2.1. NIH/3T3.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια κυτταρική σειρά ινοβλαστών που απομονώθηκε από έμβρυο ποντικού NIH/Swiss (κυτταρική σειρά NIH/3T3, ATCC, CRL-1658) ως σειρά ελέγχου της πιθανής τοξικότητας του υπεροξειδίου του υδρογόνου αλλά και των αντιδιαβητικών παραγόντων. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με πυκνότητα 5×10^3 κύτταρα/well σε πολυτρυβλίο 96 θέσεων σε μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, αρ. κατ. D6429) με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη, ενισχυμένο με 10% εμβρυϊκό βοείο ορό (FBS, RMBIO, αρ. κατ. FBS- BHT), 1% L-γλουταμίνη (Biowest, αρ. κατ. X0550-100) και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Biowest, αρ. κατ. L0018), στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο με παροχή 5% CO₂ και σταθερές συνθήκες υγρασίας. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκε πρωταρχικά για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση των φαρμακευτικών παραγόντων πριν από τους πρωτογενείς πυραμιδικούς νευρώνες, σε μια προσπάθεια να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των πειραματικών μοντέλων που θα χρησιμοποιηθούν.

5.2.2. Πρωτογενείς καλλιέργειες πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου.

I. Διασταυρώσεις πειραματικών μοντέλων.

Οι αρουραίοι του στελέχους Wistar άγριου τύπου (WT) διασταυρώθηκαν για έξι ημέρες για την παραγωγή απογόνων μετά από 21 ημέρες στη Μονάδα Ζωικής Εγκατάστασης του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (αριθμός έγκρισης EL33-BIOexp01). Ομοίως, διαγονιδιακοί επίμυες TgF344-AD (Tg) που εκφράζουν την πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (APP) με τη σουηδική μετάλλαξη και την ανθρώπινη πρεσενιλίνη-1 (PSEN1) με τη μετάλλαξη Δexon9, διασταυρώθηκαν στο Εργαστήριο Ανατομίας, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (αριθμός έγκρισης EL54-BIObr25). Οι αρουραίοι φιλοξενούνταν σε πλαστικά κλουβιά υπό τυπικές συνθήκες θερμοκρασίας $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ και 12ωρου κύκλου φωτός-σκότους. Η τροφή και το νερό παρέχονταν χωρίς περιορισμό. Ο αριθμός των απογόνων κάθε αναπαραγωγής ήταν 8 νεογνά ανά θηλυκό, τόσο για τους (WT) όσο και για τους διαγονιδιακούς αρουραίους (Tg) (289). Στην προσπάθειά μας να μειώσουμε τον αριθμό των πειραματόζων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, οι μελέτες επιβίωσης και απόπτωσης πραγματοποιήθηκαν μόνο σε κύτταρα που προέρχονταν από αρουραίους WT, ενώ τα κύτταρα από αρουραίους Tg χρησιμοποιήθηκαν μόνο για μορφολογική αξιολόγηση.

II. Προετοιμασία.

Πριν από τη διαδικασία των εκτομών, εφαρμόστηκε ένα προσεκτικά σχεδιασμένο πρωτόκολλο προετοιμασίας. Συγκεκριμένα, λίγες ημέρες πριν την πειραματική διαδικασία και για την πρόληψη ενδεχόμενης επιμόλυνσης στα πολυτρυβλία 24 θέσεων, όπου θα τοποθετούνταν καλυπτρίδες 10mm (Thermo Scientific) για την ανάπτυξη των πυραμιδικών νευρώνων, ακολουθήθηκε ένα επιπλέον πρωτόκολλο που περιελάμβανε στάδια αποστείρωσης και πρόληψης δημιουργίας αποτυπωμάτων. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε γυάλινο σκεύος τύπου Pyrex, γνωστού για την αντοχή του στις υψηλές θερμοκρασίες, χωρίς να υπάρχει επικάλυψη μεταξύ τους. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε έναν απαγωγό με εξωτερική παροχή αέρα. Οι καλυπτρίδες υποβλήθηκαν σε εμβάπτιση σε διάλυμα νιτρικού οξέος για 16-18 ώρες. Την επόμενη ημέρα, ακολούθησαν 5 πλύσεις με δισαπαρασταγμένο νερό διάρκειας δύο ωρών. Ακολούθως, τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξηράς θέρμανσης στους 250°C

για 18 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν προσεκτικά στα φρεάτια του πολυτριβλίου.

Ακολούθησε η επώαση των τρυβλίων με πολυορνιθίνη (poly-L-ornithine) (Sigma-Aldrich P4957). Η πολυορνιθίνη αποτελεί μια συνθετική αμινοξική αλυσίδα με θετικό φορτίο η οποία περιλαμβάνει μία ομάδα υδροβρωμιδίου ανά μονάδα ορνιθίνης και χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της προσκόλλησης και της συγκράτησης των κυττάρων, τόσο σε πλαστικά όσο και σε γυάλινα υποστρώματα, προσφέροντας ευνοϊκές συνθήκες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων με νευρικά κύτταρα. Η επιλογή των τρυβλίων διέφερε ανάλογα με το ερευνητικό ερώτημα που εξετάζονταν. Για την αξιολόγηση της τοξικότητας στις πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων υπό την επίδραση του αντιδιαβητικού παράγοντα, χρησιμοποιήθηκε πολυτριβλίο 96 θέσεων. Αντίθετα, για τη μορφολογική και μορφομετρική ανάλυση των νευρώνων, επιλέχθηκαν πολυτριβλία 24 θέσεων, στα οποία τοποθετήθηκαν καλυπτρίδες διαμέτρου 10mm. Πραγματοποιήθηκε προεπώαση των τρυβλίων και των καλυπτρίδων αντίστοιχα, με χρήση διαλύματος πολυορνιθίνης για 16 ώρες. Την επόμενη ημέρα, τα τρυβλία ξεπλύθηκαν τέσσερις φορές με διάλυμα αλάτων (PBS), καθώς αφ' ενός το υπόστρωμα είχε ήδη δημιουργηθεί και αφ' ετέρου η περίσσεια poly-L-ornithine μπορεί να αποβεί τοξική για τα νευρικά κύτταρα.

III. Καλλιέργεια πρωτογενών πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου.

Οι πρωτογενείς καλλιέργειες των πυραμιδικών νευρώνων πραγματοποιήθηκαν μετά την απομόνωση του ιπποκάμπου από αρουραίους αγρίου τύπου (WT) και γιαγονιδιακούς (Tg) κατά τις πρώιμες μεταγεννητικές ημέρες (P0-P1). Ως μέσο εκτομών χρησιμοποιήθηκε παγωμένο HBSS (Biosera, LM-S2034) εμπλουτισμένο με 1X πυροσταφυλικό νάτριο (Thermo Scientific, 11360070), 0,1% γλυκόζη 20% βάρος κατ όγκο και 10mM HEPES. Το DMEM υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (Sigma-Aldrich, D6429) συμπληρωμένο με 10% FBS (RMBIO, FBS-BHT), 1% Pen-strep (Biowest, L0018) και 1% L-γλουταμίνη (Biowest, X0550) αποτέλεσε το μέσο ανάπτυξης κατά τις 4 πρώτες ώρες της καλλιέργειας.

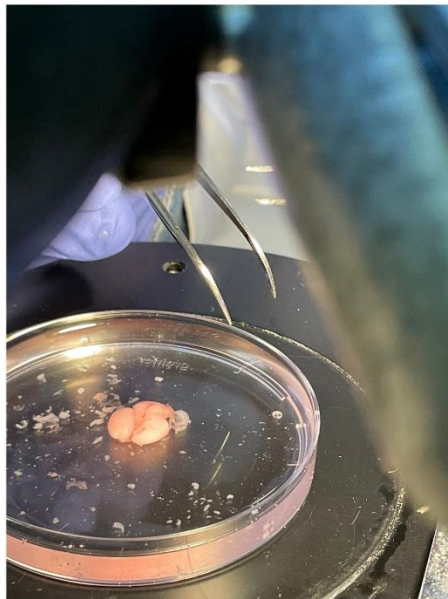
Η διαδικασία των εκτομών πραγματοποιήθηκε σε χειρουργείο ζώων το οποίο αποστειρώθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία. Κατά το αρχικό στάδιο της διαδικασίας, οι νεογέννητοι αρουραίοι αποκεφαλίστηκαν με νυστέρι, το κρανίο ανοίχτηκε και στη συνέχεια ο εγκέφαλος αφαιρέθηκε προσεκτικά με λαβίδα και μεταφέρθηκε αμέσως σε τρυβλίο Petri με παγωμένο HBSS στο οποίο πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ιπποκάμπου, υπό οπτικό

στερεοσκόπιο. Στο επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας, οι απομονωμένοι ιππόκαμποι μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής, τεμαχίστηκαν προσεκτικά με ένα ζευγάρι αποστειρωμένων νυστεριών και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Falcon των 15 ml. Μετά από 2 λεπτά καθίζησης το υπερκείμενο αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 3ml κρύου HBSS (4°C). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 2000rpm για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, προστέθηκαν 6μl/ιστό θρυψίνης και ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά στους 37°C, υπό από ανάδευση κάθε 5 λεπτά. Ακολούθως ο ιστός ξεπλύθηκε δύο φορές με 5 ml κρύο HBSS και προστέθηκε DMEM για την απενεργοποίηση της θρυψίνης. Στη συνέχεια μετά την απόρριψη του DMEM, προστέθηκε φρέσκο ζεστό καλλιεργητικό υλικό με όγκο 0,5 ml ανά ιστό για τη διαδικασία μηχανικού διαχωρισμού. Ακολούθησε ήπια ανάδευση με γυάλινη πιπέτα Pasteur για τριάντα φορές και ο ιστός αφέθηκε προς καθίζηση στον πυθμένα για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο falcon των 15ml. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε 4 φορές ώστε να έχουμε το βέλτιστο αποτέλεσμα. Έντεκα μικρολίτρα (11μl) του κυτταρικού εναιωρήματος καταμετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και τα κύτταρα του ιππόκαμπου επιστρώθηκαν με πυκνότητα 10^5 κύτταρα/πηγάδι σε πολυτρυβλίο 24 θέσεων και 45×10^3 κύτταρα/φρεάτιο σε πολυτρυβλίο 96 θέσεων. Μετά από τέσσερις ώρες, το μέσο ανάπτυξης αντικαταστάθηκε από το καλλιεργητικό υλικό, το οποίο αποτελείτο από Neurobasal-A (Thermo Scientific, αρ. καταλόγου 10888022) συμπληρωμένο με B-27 (Thermo Scientific, αρ. καταλόγου A3582801), 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Thermo Scientific) με σταθερές συνθήκες υγρασίας, 5% CO₂ και θερμοκρασία 37°C. Οι νευρώνες αναπτύχθηκαν για 11 ημέρες in vitro (DIV11) πριν από την επώαση με τους αντιδιαβητικούς παράγοντες. Τέλος αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι εντός της καλλιέργειας των πυραμιδικών νευρώνων εντοπίστηκε η παρουσία γλοιακών κυττάρων, τα οποία συμβάλλουν στην διατήρηση της ομοιόστασης της καλλιέργειας τα οποία όμως δεν λήφθηκαν υπόψη σε καμία από τις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας μελέτης, καθώς η έρευνα επικεντρώθηκε αποκλειστικά στη μελέτη των νευρικών κυττάρων.

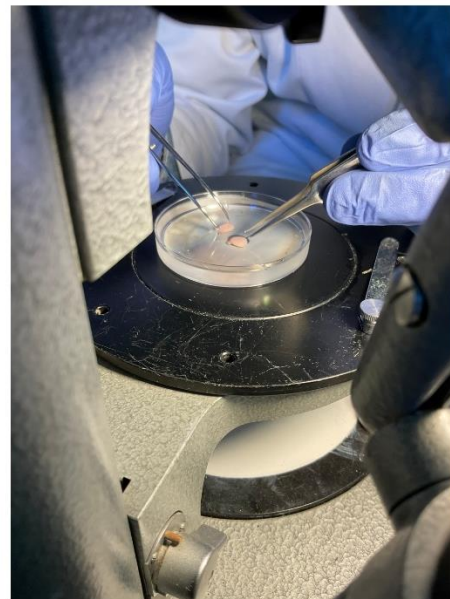
Αποκεφαλισμός



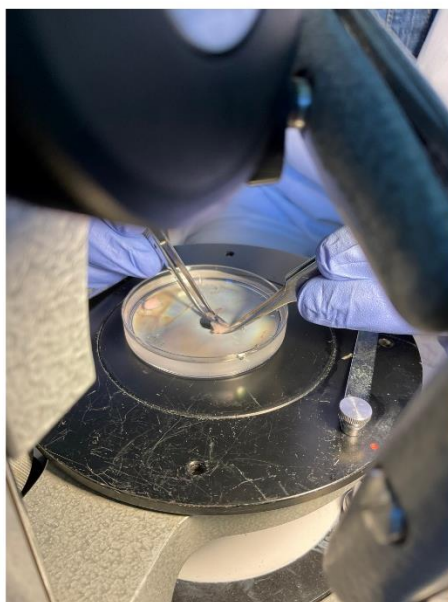
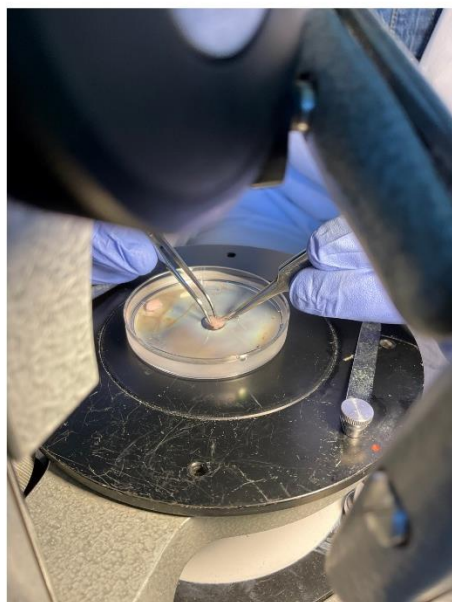
**Τοποθέτηση σε
παγωμένο διάλυμα
αλάτων (HBSS)**



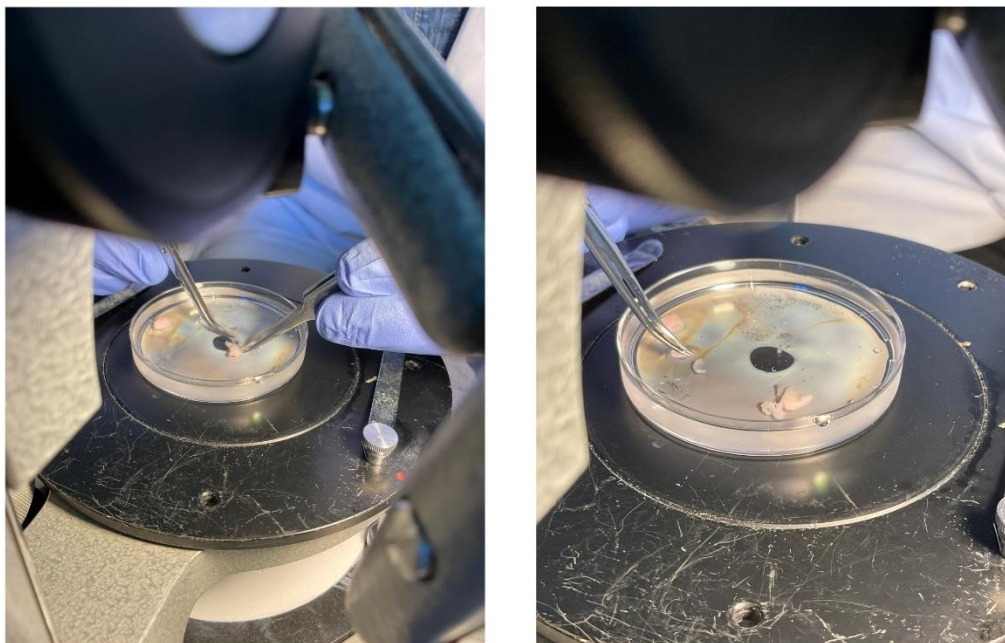
**Διαχωρισμός των
εγκεφαλικών
ημισφαιρίων**



Απομόνωση της ιπποκάμπειας δομής



Ιπποκάμπειος σχηματισμός



Εικόνα 10: Διαδικασία απομόνωσης του ιπποκάμπειου σχηματισμού από αρουραίους του είδους *Wistar* κατά την πρώτη μεταγεννητική ημέρα (P1).

IV. Γονότυπος.

Ο γονοτυπικός προσδιορισμός των διαγονιδιακών νεογνών πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας και Μοριακής Νευροβιολογίας (Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα). Εν συντομία, οι ιστοί επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιείχε NaOH (25 mM) και EDTA (0,2 mM), αναδεύθηκαν με Vortex και επώαστηκαν για 1 ώρα στους 98 °C. Μετά την επώαση, το εναιώρημα εξουδετερώθηκε με Tris-Cl pH: 8,0 (20 mM) και διατηρήθηκε στην κατάψυξη (-20 °C). Δύο μικρολίτρα του εναιωρήματος ιστού χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο στις αντιδράσεις PCR για τον προσδιορισμό του γονοτύπου, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της πολυμεράσης M203 Taq DNA (Minotech), όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο των Jankowsky *et. al* (290).

V. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας.

Στα κύτταρα ινοβλαστών NIH/3T3 καθώς και στους πρωτογενείς νευρώνες του ιππόκαμπου (DIV11) χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) για 24 ώρες (από 1 έως 1000 μ M) και εμπαγλιφλοζίνη (από 1 έως 800 μ M), σιταγλιπτίνη (10 έως 800 μ M) και δαπαγλιφλοζίνη (10 έως 400 μ M) (Morepen) για 96 ώρες. Τα αρχικά διαλύματα της εμπαγλιφλοζίνης, σιταγλιπτίνης και της δαπαγλιφλοζίνης προετοιμάστηκαν σε καθαρό DMSO ($\geq 99,9\%$) και αραιώθηκαν στο καλλιεργητικό υλικό, ώστε το τελικό ποσοστό του DMSO εντός της καλλιέργειας να είναι $<1\%$. Τα κύτταρα νευρώνων τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 96 θέσεων και την 11η ημέρα προστέθηκε εμπαγλιφλοζίνη, σιταγλιπτίνη αλλά και δαπαγλιφλοζίνη στο μέσο καλλιέργειας σε τελική συγκέντρωση 10 μ M για 96 ώρες. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 24 ωρών επώασης, προστέθηκε υπεροξείδιο του υδρογόνου στο καλλιεργητικό μέσο σε τελική συγκέντρωση 100 μ M. Ακολούθησαν 2 πλύσεις των φρεατίων με PBS και επώαστηκαν με 50 μ L διαλύματος Crystal Violet (0,5%) (Sigma-Aldrich, αρ. κατ. C3886-25g) για 20 λεπτά. Η χρωστική αυτή έχει την ικανότητα να προσροφάται από τις μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων. Το πολυτρυβλίο πλύθηκε τέσσερις φορές και στέγνωσε στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για τουλάχιστον 24 ώρες. Η μορφολογική αξιολόγηση της ανάπτυξης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon ECLIPSE E200. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μ L μεθανόλης για 20 λεπτά. Η απορρόφηση προσδιορίστηκε στα 570 nm χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (Infinite 200 Pro, Tecan, Ελβετία). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

VI. Προσδιορισμός της απόπτωσης.

Οι πρωτογενείς νευρώνες του ιππόκαμπου καλλιεργήθηκαν σε πολυτρυβλίο 24 θέσεων με πυκνότητα 10^5 κύτταρα/φρεάτιο για 11 ημέρες (DIV 11), ακολουθούμενη από την επώαση με εμπαγλιφλοζίνη και δαπαγλιφλοζίνη, συγκέντρωσης 10 μ M και υπεροξείδιο του υδρογόνου (100 μ M) για 96 ώρες και 24 ώρες αντίστοιχα, ακολουθούμενη από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. Αρχικά, έγινε αναρρόφηση του μέσου καλλιέργειας και ακολούθησε διπλή έκπλυση με PBS και αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη (Biowest, αρ. κατ. L0940) για 5 λεπτά. Το ένζυμο αδρανοποιήθηκε με καλλιεργητικό DMEM. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf των 1,5 ml, φυγοκεντρήθηκαν στις 3000rpm για 5 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 100 μ l Annexin V Binding Buffer (Biolegend, αρ. κατ. 422201) και πρόσθεση 4,5 μ g/ml FITC Annexin (Biolegend, αρ. κατ. 640906) και 5 μ g/ml διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (Biolegend, αρ. κατ. 421301). Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά στο φωτοστεγές περιβάλλον. Αμέσως

μετά την επώαση, προστέθηκαν 400μl ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης Annexin V και ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Partec ML, Partec GmbH). Η επιλογή του προς ανάλυση πληθυσμού των νευρικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε με βάση το μέγεθός τους, καθώς τα νευρικά κύτταρα συνήθως παρουσιάζουν μεγαλύτερο μέγεθος συγκριτικά με τα νευρογλοιακά.

VII. Ανοσοκυτταροχημεία.

Οι πρωτογενείς νευρώνες καλλιεργήθηκαν με πυκνότητα 10^5 σε τρυβλίο 24 θέσεων στις οποίες είχαν τοποθετηθεί γυάλινες καλυπτρίδες στρογγυλής μορφής 10 mm (Fisher Scientific, αρ. καταλόγου NC1272767), όπως περιγράφηκε παραπάνω. Κατά την DIV11 πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας με πλασμίδιο (pEGFP) (συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA 1,176μg/μl). Αρχικά, 50μl Opti-MEM (Thermo Scientific, αρ. κατ. 31985062) με 1μg πλασμιδιακού DNA, καθώς και 50μl Opti-MEM μαζί με 1μl Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific, αρ. κατ. 11668027), αναμείχθηκαν σε δύο διαφορετικά φιαλίδια αντίστοιχα, ενώ ακολούθησε 5λεπτη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ανάμιξη των φιαλιδίων ακολούθησε επώαση με αυτό το μείγμα διαμόλυνσης για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν τω μεταξύ, 250μl του μέσου καλλιέργειας αφαιρέθηκαν από κάθε φρεάτιο και διατηρήθηκαν σε ένα Eppendorf, ακολουθούμενα από την προσθήκη του ίδιου όγκου φρέσκου καλλιεργητικού μέσου. Μέσα σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 250μl Neurobasal χωρίς B27 μαζί με το μείγμα διαμόλυνσης, ακολουθούμενα από 25λεπτη επώαση στους 37°C. Στο τελευταίο βήμα, το μείγμα διαμόλυνσης αφαιρέθηκε και το μέσο που προηγουμένως διατηρήθηκε στο φιαλίδιο προστέθηκε στο κάθε πηγάδι και ακολούθησε επώαση 4 ημερών. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% PFA (παραφορμαλδεΰδη) (Sigma- Aldrich, cat. no. 16005) με 6% σουκρόζη (SERVA, cat. no. 35580) σε δισαπσταγμένο νερό και υποβλήθηκαν σε αύξηση της διαπερατότητάς τους με 0,5% Triton X-100 (Fisher Bioreagents, cat. no. BP151) σε PBS (Sigma- Aldrich, cat. no. P4417) (PBST). Στη συνέχεια, στα κύτταρα του ιππόκαμπου αποκλείστηκαν οι μη ειδικοί επίτοποι, με ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού που περιείχε 98,5% ορό αιγός (Biosera, αρ. κατ. GO-605/500), 1% αλβουμίνη βόειου ορού (Sigma- Aldrich, αρ. κατ. A2453- 10g) και 0,5% PBST για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα GFP (Novus Biologicals, αρ. κατ. NB600-308SS) αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού 1:1000 και πρωτογενές αντίσωμα NeuN (Millipore, αρ. κατ. MAB377) σε αραιώση 1:500 στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, για 18 ώρες στους 4°C. Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBST και PBS και

ακολούθησε επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα GFP σημασμένο με φθορίζουσα ουσία (Biotium, αρ. κατ. 20019-1) για 18 ώρες στους 4°C με αραιώση 1:2000 και δευτερογενές αντίσωμα NeuN με εκπομπή στο κόκκινο (Biotium, αρ. κατ. 20247-1, CF 555). Οι εικόνες των ανοσοχρωματισμένων κυττάρων λήφθηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon ECLIPSE Ti2).

VIII. Μορφομετρική ανάλυση.

Για τη μέτρηση του δενδριτικού πεδίου χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ImageJ (National Institutes of Health) Fiji distribution (2.9.0) με την προσθήκη της επέκτασης Simple Neurite Tracer (SNT). Η μορφολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε από πειραματιστή ο οποίος αγνοούσε τις ομάδες πειραματόζωνων. Αρχικά, οι εικόνες μετατράπηκαν σε κλίμακα του γκρι 8 bit και οι ρυθμίσεις φωτεινότητα/αντίθεση προσαρμόστηκαν για την καλύτερη απεικόνιση των δενδριτών καθώς και των ακανθών (291). Οι δενδρίτες χαρακτηρίστηκαν και κωδικοποιήθηκαν χρωματικά ως πρωτοταγείς, δευτεροταγείς, τριτοταγείς κ.λπ. (292). Οι απολήξεις που προέρχονταν από το σώμα ή τα υψηλότερης τάξης δενδριτικά τμήματα μικρότερα από 8μm απορρίφθηκαν, καθώς δεν μπορούσαν να διακριθούν από τα φιλοπόδια και τις άκανθες. Η επέκταση SNT χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανάλυση Sholl (αριθμός διατομών των διακλαδώσεων με ομόκεντρους κύκλους αυξανόμενης ακτίνας 20μm από το σώμα), που εκφράζει την πυκνότητα, το μήκος και τη διακλάδωση του δενδριτικού δικτύου. Όλες οι προεξοχές που ξεκινούν από τους δενδρίτες, με μήκος έως 8 μm και ανεξάρτητα από τη μορφολογία τους, θεωρήθηκαν ως " άκανθες " και συμπεριλήφθηκαν στη μορφομετρική ανάλυση (293,294). Τρία με πέντε δενδριτικά τμήματα ανά νευρώνα επιλέχθηκαν τυχαία για την ανάλυση των δενδριτικών ακανθών. Οι τιμές της πυκνότητας των ακανθών εκφράστηκαν ως ο αριθμός των ακανθών ανά 10 μm του δενδρίτη. Το εγγύς τμήμα του δενδριτικού δέντρου, έως και 50 μm μακριά από το σώμα, αποκλείστηκε από την ανάλυση. Ο αριθμός των νευρικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών ήταν 7-8 κύτταρα σε κάθε πειραματική συνθήκη.

IX. Στατιστική ανάλυση.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού SPSS17.0. Χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία One-way ANOVA για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των νευρώνων που προέρχονταν από ζώα WT και Tg, τα οποία εκτέθηκαν σε διαφορετικές θεραπείες. Το Tukey's test χρησιμοποιήθηκε για post hoc συγκρίσεις και οι τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Τα δεδομένα

παρουσιάζονται στο λογισμικό Prism (GraphPadTM) ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM).

5.2.3. Συμπεριφορικές δοκιμασίες (*In Vivo*).

I. Morris Water Maze (MWM).

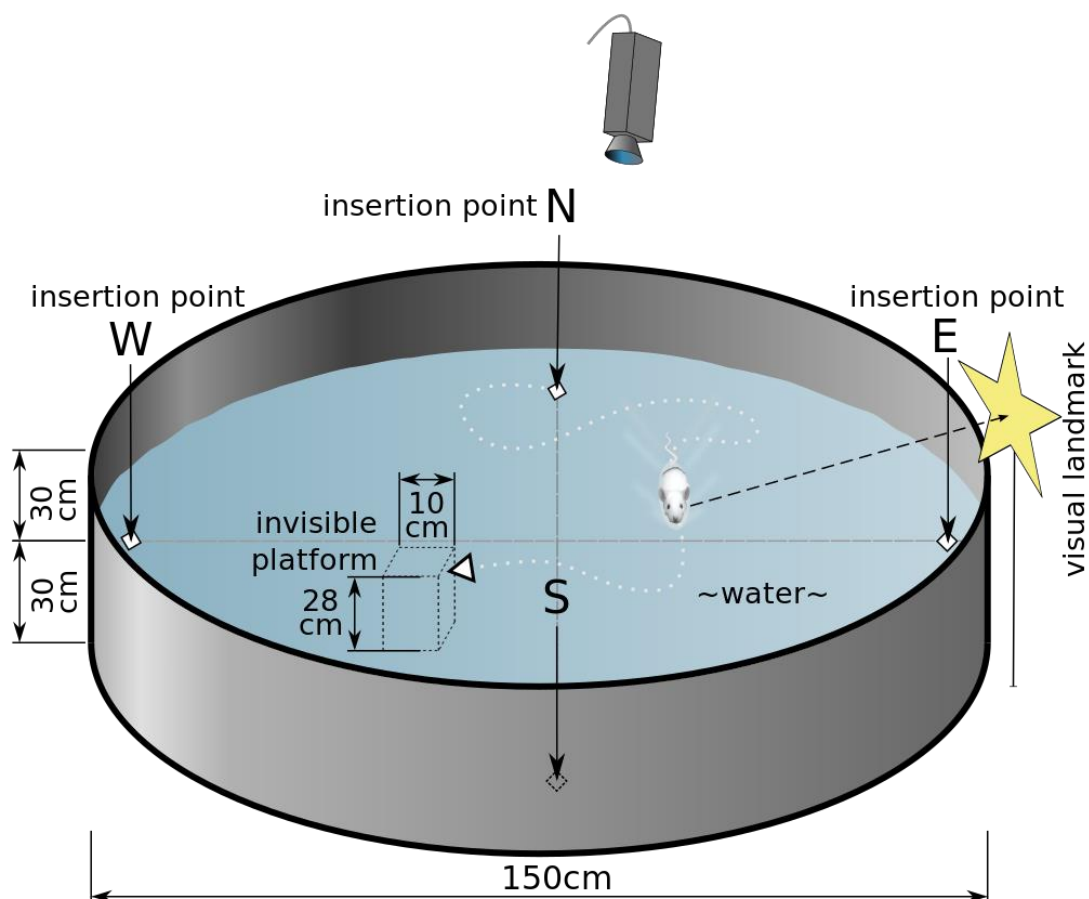
Το Morris Water Maze test, είναι μια δοκιμασία χωρικής εκμάθησης για τα τρωκτικά βασισμένη στις ενδείξεις για την πλοήγηση, από τις θέσεις εκκίνησης γύρω από την περίμετρο μιας ανοικτής πισίνας για τον εντοπισμό μιας βυθισμένης πλατφόρμας διαφυγής. Η χωρική ικανότητα μάθησης αξιολογείται σε επαναλαμβανόμενες δοκιμές και η μνήμη αναφοράς καθορίζεται από την προτίμηση για την περιοχή της πλατφόρμας όταν αυτή απουσιάζει. Οι δοκιμές αντιστροφής και μετατόπισης της πλατφόρμας ενισχύουν την ανίχνευση των χωρικών διαταραχών. Η εξαρτώμενη από τη δοκιμή, λανθάνουσα και η μέσω της διάκρισης εκμάθηση, μπορούν να αξιολογηθούν με τροποποιήσεις του βασικού πρωτοκόλλου. Η αναζήτηση στην περιοχή της πλατφόρμας καθορίζει το βαθμό εξάρτησης από τις χωρικές σε σχέση με τις μη χωρικές στρατηγικές. Οι δοκιμασίες με υπόδειξη καθορίζουν κατά πόσον υπάρχουν παράγοντες που δεν σχετίζονται με τη χωρική εκμάθηση. Το MWM έχει αποδειχθεί ότι είναι μια ισχυρή και αξιόπιστη δοκιμασία που συσχετίζεται στενά με τη συναπτική πλαστικότητα του ιππόκαμπου (295).

Το MWM δεν είναι λαβύρινθος με τη συνηθισμένη έννοια του όρου, αλλά μια ανοιχτή κυκλική πισίνα που είναι γεμάτη περίπου μέχρι τη μέση με νερό. Το εσωτερικό του είναι κατασκευασμένο έτσι ώστε να μην υπάρχουν ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά. Είναι "λαβύρινθος" υπό την έννοια ότι το ζώο πρέπει να ψάξει για να εντοπίσει έναν σχετικά μικρό στόχο (μια κρυμμένη πλατφόρμα) που είναι βυθισμένος κάτω από την επιφάνεια του νερού και τοποθετημένος σε μια σταθερή θέση. Η πλατφόρμα καμουφλάρεται είτε με την τοποθέτηση αδιαφανών υλικών στο νερό (συνήθως, χρώματα ή σφαιρίδια πολυπροπυλενίου), είτε με τη δημιουργία μιας σχεδόν αόρατης χρωματικής αντιστοιχίας πλατφόρμας-φόντου, είτε με τη χρήση διαφανών πλατφορμών σε χρωματιστό φόντο, καθιστώντας την έτσι δυσδιάκριτη λόγω της χαμηλής οπτικής αναλογίας διαστάσεων προς το νερό, όπως το βλέπει το ζώο όταν κολυμπάει.

Είναι σύνηθες να ορίζονται δύο κύριοι άξονες του λαβύρινθου, κάθε γραμμή που διχοτομεί τον λαβύρινθο κάθετα μεταξύ τους, ώστε να δημιουργείται ένα νοητό "+". Το άκρο κάθε γραμμής οριοθετεί τέσσερα βασικά σημεία: Βορράς (B), Νότος (N), Ανατολή (A) και Δύση

(Δ). Αυτές δεν είναι πραγματικές κατευθύνσεις μαγνητικής πυξίδας, αλλά αναφέρονται ως Ν στο σημείο όπου βρίσκεται ο πειραματιστής, το Β στο αντίθετο σημείο, το Α στα δεξιά του πειραματιστή και το Δ στα αριστερά του πειραματιστή. Ο διαχωρισμός του λαβύρινθου με αυτόν τον τρόπο δημιουργεί τέσσερα ίσα τεταρτημόρια. Η πλατφόρμα τοποθετείται στη μέση ενός από τα τεταρτημόρια. Μπορεί κανείς είτε να κρατήσει την πλατφόρμα σε ένα τεταρτημόριο για όλες τις δοκιμές είτε να δοκιμάσει το ένα τέταρτο των ζώων με την πλατφόρμα σε κάθε ένα από τα τεταρτημόρια. Η τελευταία προσέγγιση εξισορροπεί τις πιθανές επιδράσεις των τεταρτημορίων. Η πλατφόρμα βρίσκεται συνήθως στη μέση της διαδρομής μεταξύ του κέντρου και του τοιχώματος, ανεξάρτητα από το τεταρτημόριο που έχει επιλεγεί (296).

Τα χαρακτηριστικά της πισίνας όπου έγινε η *in vivo* μελέτη περιελάμβαναν συνολικό ύψος 60cm διάμετρο 120cm και η πλατφόρμα η οποία τοποθετήθηκε εντός είχε ύψος και διάμετρο 10cm. Η πισίνα γέμιζε με νερό θερμοκρασίας 23-30°C έως το ύψος των 20cm. Στο νερό της πισίνας προστέθηκε παράγοντας θολερότητας έτσι ώστε να κάνει πιο δύσκολο τον οπτικό εντοπισμό της πλατφόρμας. Σε κάθε ένα εκ των τεσσάρων βασικών σημείων τοποθετήθηκε ένα μοτίβο διαφορετικού σχήματος και χρώματος προκειμένου να συνεπικουρεί στον προσανατολισμό των πειραματοζώων.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του MWM.

Το MWM αποτελεί μια ισχυρή τεχνική για την αξιολόγηση της χωρικής απεικόνισης. Η κατάλληλη τροποποίηση του βασικού πρωτοκόλλου το καθιστά ένα ευέλικτο εργαλείο που μπορεί να εφαρμοστεί για τη διερεύνηση της χωρικής μάθησης σε μεγαλύτερο βάθος ή για την αξιολόγηση άλλων μορφών μάθησης και μνήμης.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε εν προκειμένω χωρίστηκε σε δύο φάσεις :

α) Χωρική λήψη δεδομένων (1- 4^η ημέρα).

1. Τοποθετήσαμε το ζώο στην επιθυμητή θέση εκκίνησης στο λαβύρινθο, στραμμένο προς τον τοίχο της πισίνας. Το ζώο αφήνεται στο νερό στο επίπεδο του νερού, ενώ παράλληλα ξεκίνησε καταγραφή των κινήσεων με κάμερα και του χρόνου με χρονόμετρο .
2. Όταν το ζώο εντοπίσει την πλατφόρμα εντός 120 sec τότε αυτό μένει πάνω στην πλατφόρμα για διάστημα 15 sec. Σε περίπτωση στην οποία το ζώο αδυνατεί να βρει την πλατφόρμα τότε αυτό οδηγείται και τοποθετείται εκεί για χρονικό διάστημα 20 sec. Ο στόχος

με την παραμονή του ζώου στην πλατφόρμα είναι να του επιτραπεί να προσανατολιστεί στη θέση του στο χώρο και να θυμηθεί τη θέση του στόχου σε σχέση με τις γύρω ενδείξεις.

3. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές κάθε ημέρα και κάθε φορά το ζώο αφήνεται σε διαφορετικό τεταρτημόριο.

β) Δοκιμασία ελέγχου της μνήμης αναφοράς (5^η ημέρα).

1. Η πλατφόρμα απομακρύνεται.

2. Χρησιμοποιήσαμε ως θέση εισόδου το τεταρτημίο απέναντι από αυτό στο οποίο βρισκόταν η πλατφόρμα για να διασφαλίσουμε ότι η χωρική προτίμησή του αντανάκλα τη μνήμη της θέσης του στόχου και όχι μια συγκεκριμένη διαδρομή κολύμβησης.

3. Κατά το τελευταίο βήμα καταγράφουμε το χρόνο που παραμένει το ζώο το τεταρτημόριο στο οποίο το έχουμε αφήσει καθώς επίσης και στο τεταρτημόριο στόχο. Τέλος καταγράφουμε τον αριθμό των διελεύσεων από το κάθε τεταρτημόριο.

II. Y maze.

Ο λαβύρινθος Y μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της βραχυπρόθεσμης μνήμης σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών. Η αυθόρμητη εναλλαγή, ένα δείγμα της χωρικής μνήμης εργασίας, μπορεί να αξιολογηθεί επιτρέποντας στα ποντίκια να εξερευνήσουν και τα τρία σκέλη του λαβύρινθου και οφείλεται στην έμφυτη περιέργεια των τρωκτικών να εξερευνήσουν περιοχές που δεν είχαν επισκεφθεί προηγουμένως. Ένα ποντίκι με άθικτη μνήμη εργασίας, και συνεπώς άθικτες λειτουργίες του προμετωπιαίου φλοιού, θα θυμάται τους βραχίονες που επισκέφθηκε προηγουμένως και θα παρουσιάζει την τάση να εισέρχεται σε έναν βραχίονα που επισκέφθηκε λιγότερο πρόσφατα. Η χωρική μνήμη αναφοράς, η οποία υπόκειται στη λειτουργία του ιππόκαμπου, μπορεί επίσης να εξεταστεί με την τοποθέτηση των ποντικών στον λαβύρινθο με το ένα χέρι κλειστό κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης. Μετά από ένα μεσοδιάστημα 1 ώρας, το πειραματόζωο θα πρέπει να θυμάται ποιο βραχίονα δεν έχει εξερευνήσει προηγουμένως και να επισκέπτεται συχνότερα αυτόν τον βραχίονα (297).

Η διαδικασία περιλαμβάνει την τοποθέτηση του ζώου στον έναν από τους τρεις βραχίονες (εκκίνησης/start arm). Από τους εναπομείναντες δύο ο ένας παραμένει ανοιχτός (other arm) ενώ ο δεύτερος κλείνει με τη βοήθεια ξύλινου διαφράγματος (novel arm). Όλα τα πειραματόζωα είχαν τον ίδιο βραχίονα εκκίνησης, ενώ ο novel βραχίονας εναλλασσόταν ανάμεσα στα πειραματόζωα της εκάστοτε ομάδας. Το πειραματόζωο παραμένει εντός του

λαβυρίνθου προκειμένου να τον εξερευνήσει για 15 min. Στη συνέχεια το ζώο αποσύρεται και επανατοποθετείται στο κλουβί του για διάστημα 1 ώρας. Με το πέρας της μίας ώρας το ζώο μπαίνει ξανά εντός του λαβυρίνθου, έχοντας πρόσβαση σε όλους τους βραχίονες αυτή τη φορά. Εντός του λαβυρίνθου παραμένει για 5 min όπου καταγράφεται ο χρόνος που περνά στο νέο βραχίονα.

Τα χαρακτηριστικά του λαβυρίνθου ήταν τα εξής: 50cm το μήκος του κάθε βραχίονα, 20cm πλάτος και 30cm ύψος. Στους δύο βραχίονες υπήρχαν τοποθετημένες πόρτες οι οποίες αποσύρνονταν και τοποθετούνταν ανάλογα με την ομάδα των πειραματόζων η οποία ελέγχονταν. Επιπλέον κρίθηκε αναγκαίο, να περάσουμε την ξύλινη κατασκευή του λαβυρίνθου με βερνίκι, ώστε να αποφεύγονται οι οσμές, κι έτσι τα πειραματόζωα να μην κατευθύνονται στον κάθε βραχίονα ακολουθώντας τη μυρωδιά.



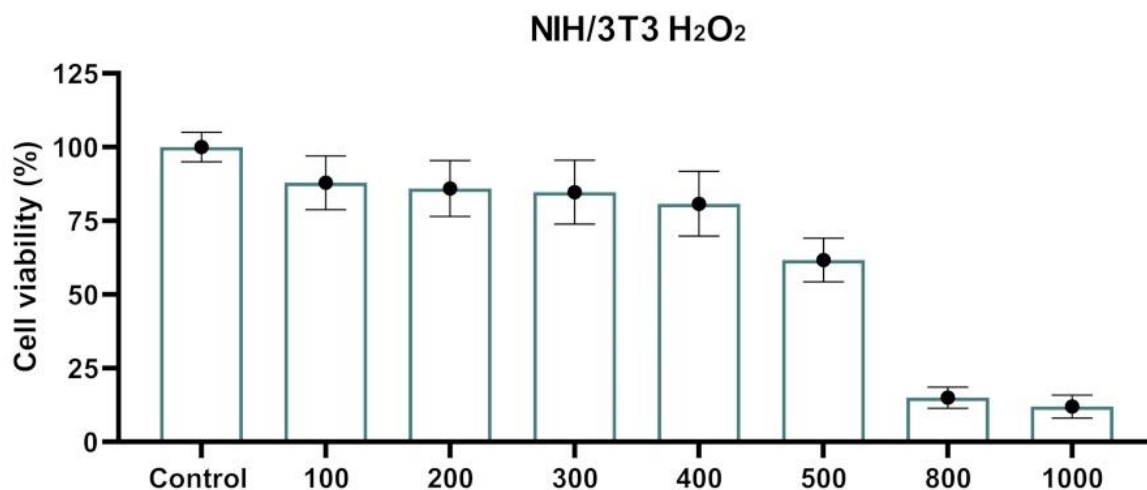
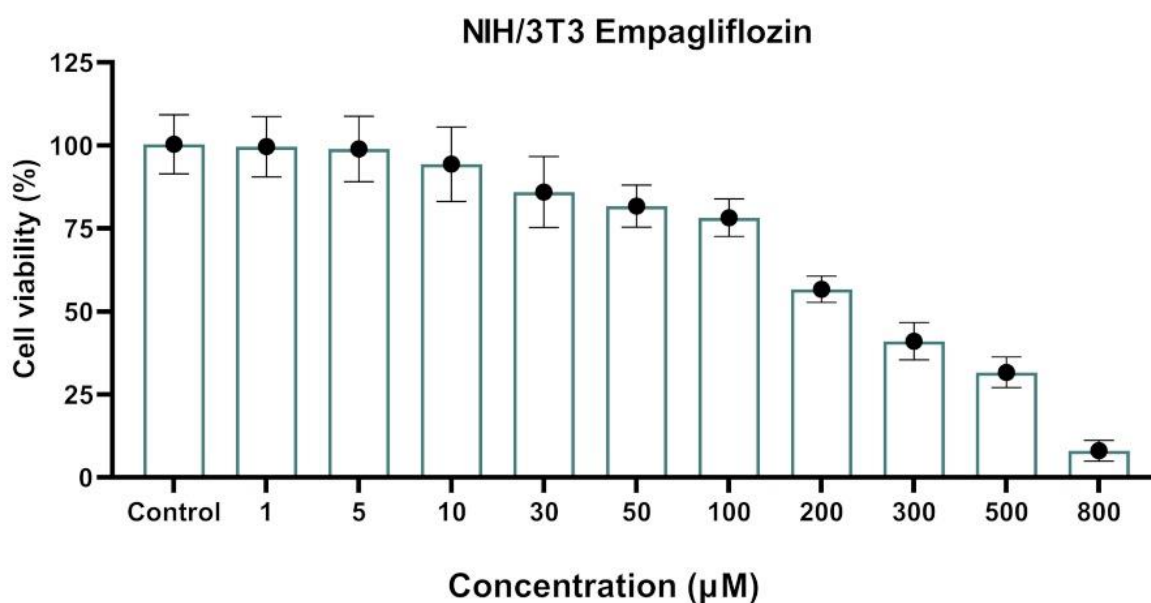
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση του Y- maze test.

6. Αποτελέσματα.

6.1. Εμπαγλιφλοζίνη.

α) Η εμπαγλιφλοζίνη δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα των πρωτογενών νευρώνων του ιππόκαμπου και τείνει να μετριάξει την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

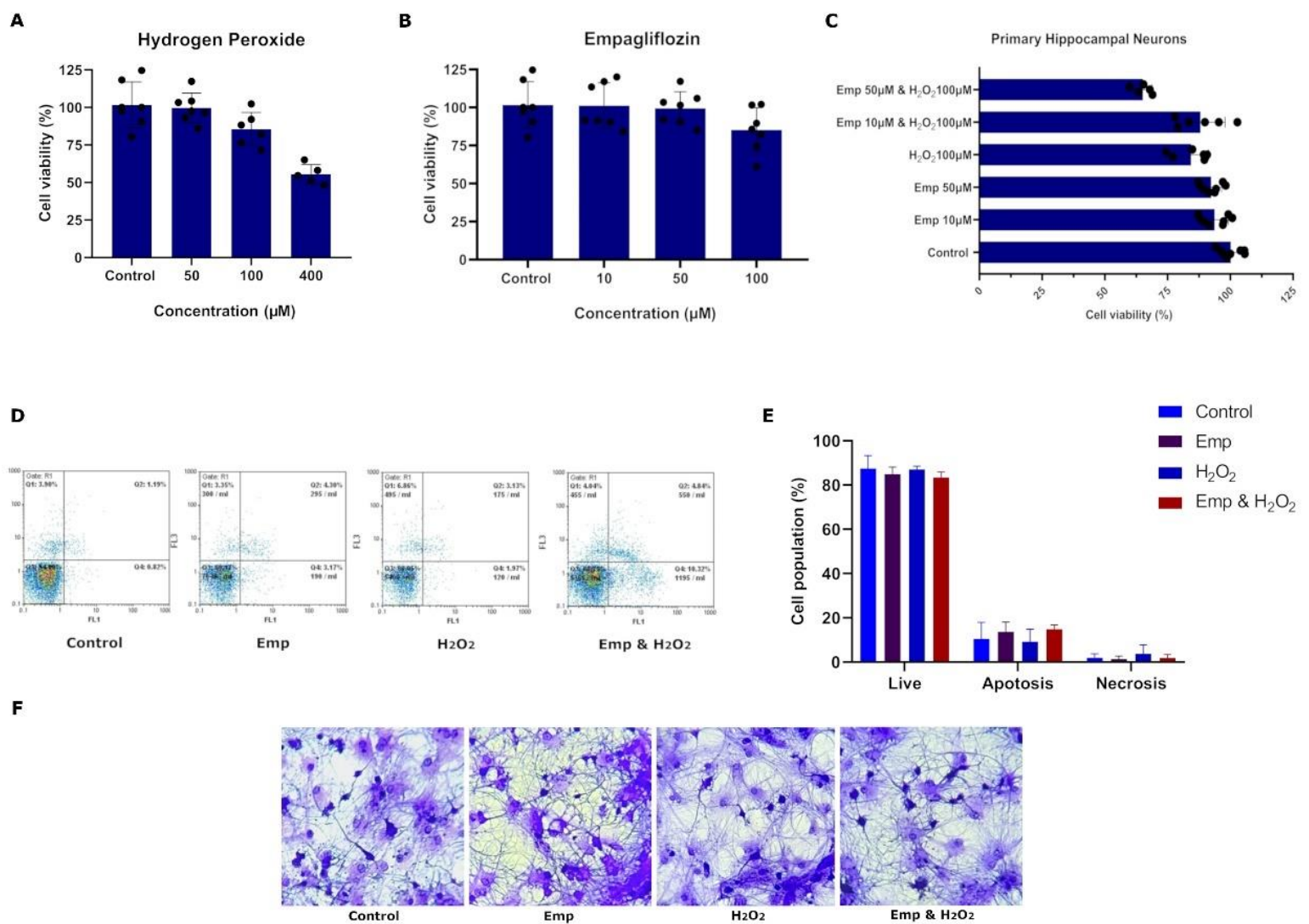
Για να εξετάσουμε την επίδραση της εμπαγλιφλοζίνης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου στους πρωτογενείς νευρώνες του ιππόκαμπου, πραγματοποιήσαμε αρχικά αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε κύτταρα NIH/3T3 (**Εικόνα 13**). Παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα στα κύτταρα αυτά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου για 24 ώρες, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13 Α**. Συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου άνω των 500 μM οδήγησαν σε κυτταρική βιωσιμότητα μικρότερη από 80%. Επιπλέον, τα κύτταρα NIH/3T3 εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις εμπαγλιφλοζίνης για 96 ώρες (**Εικόνα 13 Β**). Σύμφωνα με τη δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων Crystal Violet, η επώαση με 10 μM , 30 μM και 50 μM εμπαγλιφλοζίνης δεν επηρέασε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων, καθώς το 94,33%, 85,96% και 81,7% των NIH/3T3 αντίστοιχα, επέζησαν μετά την 96ωρη θεραπεία. Η συγκέντρωση των 100 μM είχε ως αποτέλεσμα τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε ποσοστό περίπου 78% και θεωρήθηκε ως ήπια τοξική για τα κύτταρα NIH/3T3. Συγκεντρώσεις άνω των 100 μM θεωρήθηκαν τοξικές, καθώς είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε ποσοστό μικρότερο του 80%.

A**B**

Εικόνα 13: Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων NIH/3T3 με *Crystal Violet* στην κυτταρική σειρά NIH/3T3. Τα κύτταρα NIH/3T3 (ATCC, CRL-1658) καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 5×10^3 κύτταρα/φρεάτιο σε τρυβλία 96 θέσεων. Μετά από 24ωρη επώαση (πυκνότητα 10×10^3 κύτταρα/φρεάτιο) τα κύτταρα εκτέθηκαν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και εμπαγλιφλοζίνη. **(Α)** Βιωσιμότητα των κυττάρων NIH/3T3 μετά από έκθεση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου για 24 ώρες (συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 100μM έως 1000μM). **(Β)** Βιωσιμότητα των κυττάρων NIH/3T3 μετά από έκθεση σε εμπαγλιφλοζίνη για 96h (συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1μM έως 800μM). Τα δεδομένα παρουσιάζονται μέσω του λογισμικού Prism (GraphPadTM) ως μέσος όρος $\pm$ το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM).

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιωσιμότητας των κυττάρων NIH/3T3, αξιολογήσαμε περαιτέρω την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε πρωτογενείς νευρώνες του ιππόκαμπου, χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις 50 μM, 100 μM

και 400 μM υπεροξειδίου του υδρογόνου για 24 ώρες (**Εικόνα 14 A**). Η συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 100 μM είχε ως αποτέλεσμα το ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων να είναι 85,5%, ενώ στη συγκέντρωση των 400 μM ήταν τοξικό για τους νευρώνες. Ο πρωταρχικός μας στόχος ήταν να προκαλέσουμε συνθήκες χρόνιου οξειδωτικού στρες στους νευρώνες, παρόμοιες με εκείνες κατά την ανάπτυξη της AD, αλλά και να δημιουργήσουμε ένα *in vitro* μοντέλο οξειδωτικού στρες, έτσι, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα δεδομένα, η συγκέντρωση των 100 μM υιοθετήθηκε για τα ακόλουθα πειράματα (**Εικόνα 14 A**). Όσον αφορά την εμπαγλιφλοζίνη, η έκθεση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (που κυμαίνονταν από 10 έως 100 μM) για 96 ώρες δεν είχε σημαντική επίδραση στην επιβίωση των πρωτογενών νευρώνων του ιππόκαμπου (**Εικόνα 14 B**). Στην πραγματικότητα, σε συγκέντρωση 100 μM , το ποσοστό επιβίωσης των νευρώνων ήταν 85,3%. Ανεξάρτητα από τη μη τοξική δράση της εμπαγλιφλοζίνης μέχρι τα 100 μM , η συνδυαστική έκθεση με 100 μM υπεροξείδιο του υδρογόνου και 50 μM εμπαγλιφλοζίνης οδήγησε σε μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα και αυξημένη κυτταροτοξικότητα, περίπου 65%. Έτσι, υιοθετήσαμε τη χαμηλότερη μη τοξική συγκέντρωση εμπαγλιφλοζίνης (10 μM) για την προεπώαση και μια μη τοξική συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου (100 μM) (**Εικόνα 14 C**). Οι πρωτογενείς νευρώνες (DIV11) υποβλήθηκαν αρχικά σε επώαση με 10 μM εμπαγλιφλοζίνης για τρεις ημέρες. Στη συνέχεια, στο ίδιο μέσο προστέθηκε υπεροξείδιο του υδρογόνου σε τελική συγκέντρωση 100 μM για άλλες 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας των κυττάρων αποκάλυψαν ότι η προεπώαση με εμπαγλιφλοζίνη έτεινε να αμβλύνει την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, αποτέλεσμα που δεν οδήγησε σε στατιστική σημαντικότητα (**Εικόνα 14 C**). Για την ανάλυση των μορφολογικών ευρημάτων εφαρμόστηκε μικροσκοπική αξιολόγηση με χρώση Crystal Violet, η οποία ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας των κυττάρων (**Εικόνα 14 E**). Περαιτέρω πειράματα διεξήχθησαν με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής για την αξιολόγηση της επίδρασης της έκθεσης σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και της εμπαγλιφλοζίνης στην απόπτωση και τη νέκρωση των πρωτογενών νευρώνων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το ποσοστό των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυτταρικών πληθυσμών παρέμεινε σταθερό σε όλες τις πειραματικές συνθήκες (**Εικόνα 14 D**), ενώ το υψηλότερο ποσοστό των νευρώνων, πάνω από 80%, ήταν ζωντανοί. Το ποσοστό του αποπτωτικού κυτταρικού πληθυσμού ήταν ελαφρώς αυξημένο σε σύγκριση με το νεκρωτικό, ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό δεν είχε στατιστική σημαντικότητα. Μικρές και μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p>0,05$) επικύρωσαν τα αποτελέσματα των πειραμάτων βιωσιμότητας.

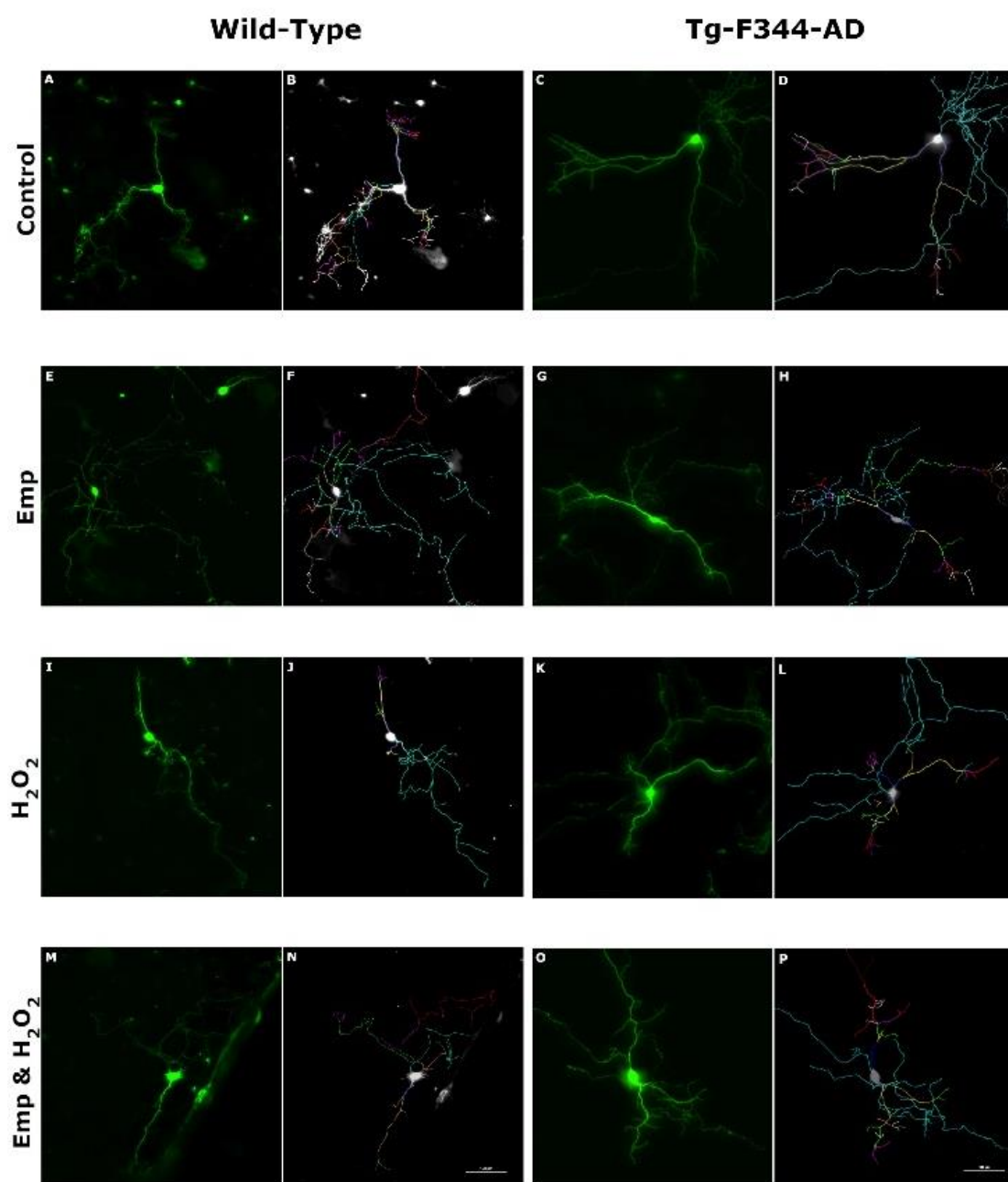


Εικόνα 14: Προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας με *Crystal Violet* σε πρωτογενείς νευρώνες του ιππόκαμπου WT (DIV15). Τα νευρικά κύτταρα επιστρώθηκαν σε πυκνότητα 45×10^3 κύτταρα/φρεάτιο σε τρυβλίο 96 θέσεων και 10^5 ανά φρεάτιο σε τρυβλίο 24 θέσεων για τα πειράματα της κυτταρικής βιωσιμότητας και κυτταρομετρίας ροής, αντίστοιχα. **(Α)** Βιωσιμότητα κυττάρων μετά από έκθεση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου για 24 ώρες (συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 50 έως 400μM). **(Β)** Βιωσιμότητα κυττάρων μετά από έκθεση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις εμπαγλιφλοζίνης για 96h (συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 10 έως 100μM). **(C)** Βιωσιμότητα κυττάρων μετά από 96h προεπάση με εμπαγλιφλοζίνη (10 μM και 50 μM) και 24h έκθεση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (100μM). **(D)** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με διπλή χρώση Annexin V/PI για την απόπτωση των κυττάρων. Q1: νεκρωτικά κύτταρα, Q2: όψιμα αποπτωτικά κύτταρα, Q3: ζωντανά κύτταρα, Q4: Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, υπό όλες τις πειραματικές συνθήκες. Οι πρώιμοι και οι όψιμοι αποπτωτικοί πληθυσμοί θεωρήθηκαν ως ενιαίος πληθυσμός. **(Ε)** Αξιολόγηση του πληθυσμού ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (%) σε καλλιεργηθέντες νευρώνες του ιππόκαμπου (DIV15) μετά προεπάση με εμπαγλιφλοζίνη (10μM) για 96h και υπεροξείδιο του υδρογόνου (100μM) για 24h.

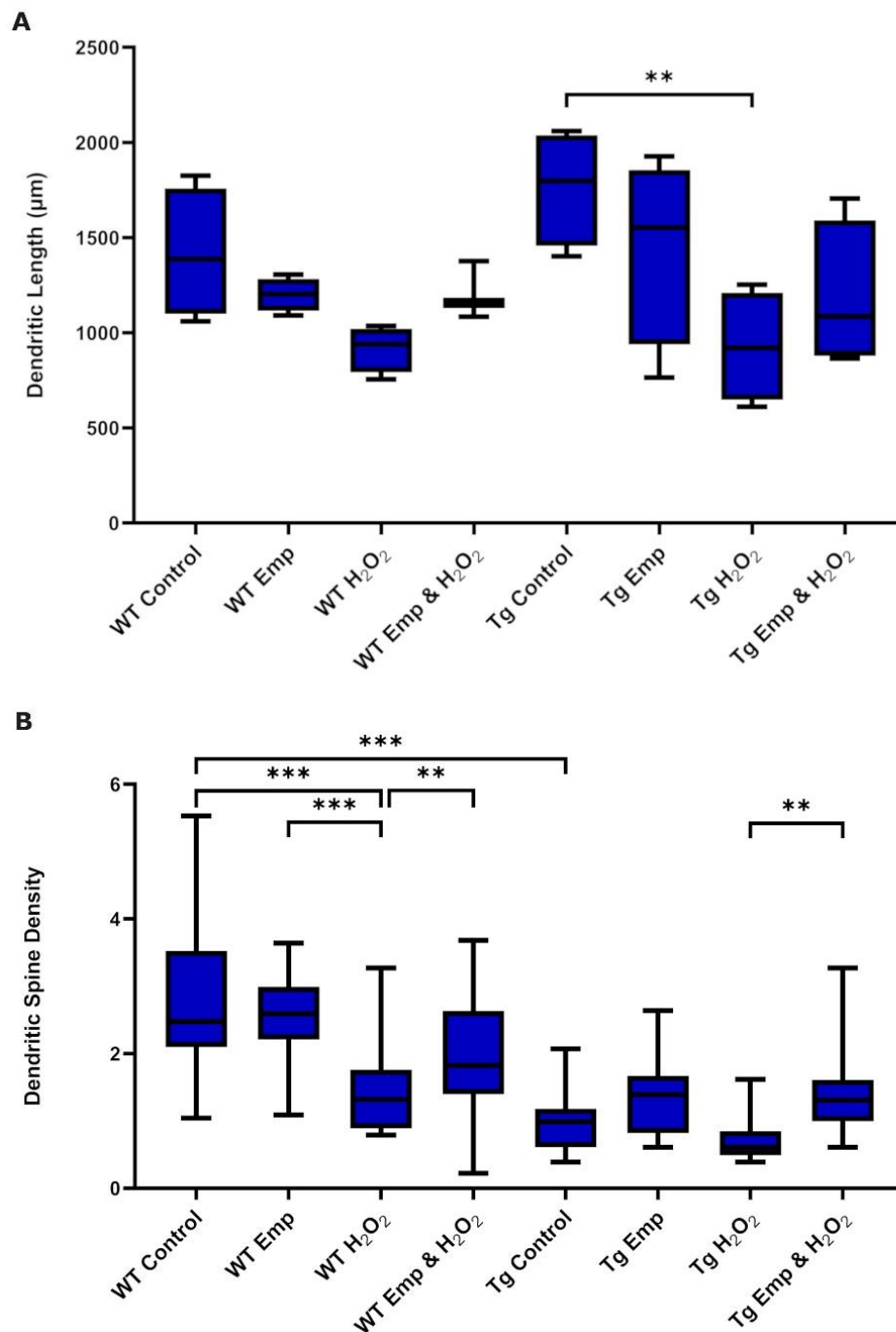
(Ε) Φωτογραφίες πρωτογενών νευρώνων του ιππόκαμπου (DIV15) μετά από χρώση με *Crystal Violet*. Στα σχήματα A-D και E τα δεδομένα παρουσιάζονται μέσω του λογισμικού *Prism (GraphPadTM)* ως μέσος όρος $\pm$ το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM).

b) Η προεπώαση με εμπαγλιφλοζίνη αποτρέπει εν μέρει την απώλεια των δενδριτών των νευρώνων του ιππόκαμπου που εκτέθηκαν σε υπεροξειδίο του υδρογόνου.

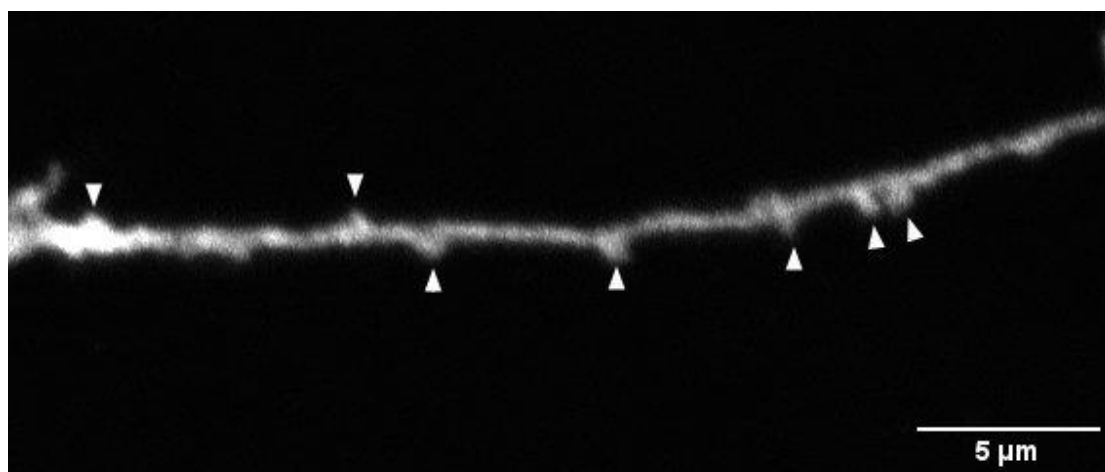
Εξετάσαμε περαιτέρω με ανοσοκυτταροχημεία GFP τις μορφολογικές αλλοιώσεις σε κάθε πειραματική συνθήκη τόσο για τους νευρώνες WT όσο και για τους νευρώνες Tg που καλλιεργήθηκαν, εστιάζοντας στην πολυπλοκότητα των δενδριτών, συμπεριλαμβανομένου του μήκους των δενδριτών, της πυκνότητας των δενδριτικών ακανθών και των διακλαδώσεων **(Εικόνα 15)**. Όσον αφορά τους νευρώνες των WT, η έκθεση στο υπεροξειδίο του υδρογόνου και την εμπαγλιφλοζίνη οδήγησε σε ελαφρά μείωση του δενδριτικού μήκους **(Εικόνα 16)**. Η προεπώαση με εμπαγλιφλοζίνη βελτίωσε εν μέρει τη μείωση του μήκους των δενδριτών που προκλήθηκε από την έκθεση σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Ωστόσο, αυτές οι ήπιες διαφορές δεν έφτασαν σε στατιστική σημαντικότητα. Διαπιστώθηκε ότι οι πρωτογενείς νευρώνες που προέρχονταν από αρουραίους Tg ήταν πιο ευαίσθητοι στην επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου, τα κύτταρα του ιππόκαμπου που προέρχονταν από τρωκτικά Tg παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση του μήκους των δενδριτών ($p < 0,05$) όταν εκτέθηκαν σε υπεροξειδίο του υδρογόνου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου των Tg. Επίσης, παρατηρήθηκε μια μικρή βελτίωση του δενδριτικού μήκους με την προεπώαση με εμπαγλιφλοζίνη, χωρίς στατιστική σημαντικότητα.



Εικόνα 15: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας από WT και Tg πειραματικά μοντέλα με τη χρήση ανοσοκυτταροχημείας GFP σε πρωτογενείς πυραμδικούς νευρώνες του ιππόκαμπου (DIV15) σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Η μορφολογική ανάλυση των δενδριτών (καταγραφή των πρωτοταγών, δευτεροταγών, τριτοταγών κ.λπ.) πραγματοποιήθηκε με το Fiji ImageJ.



Εικόνα 16: Box plot του **(Α)** μήκους των δενδριτών και **(Β)** της πυκνότητας των ακανθών των νευρώνων WT και Tg σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Στο διάγραμμα πλαισίου (Α) το δενδριτικό μήκος των νευρώνων Tg που εκτέθηκαν στο υπεροξείδιο του υδρογόνου μειώθηκε σε σύγκριση με τους νευρώνες της ομάδας ελέγχου των Tg ($p=0,016$). Στο box plot **(Β)** η ομάδα ελέγχου των WT έναντι των WT κυττάρων τα οποία εκτέθηκαν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ($p<0,001$), WT υπεροξείδιο του υδρογόνου σε σύγκριση με τα κύτταρα από τα WT τα οποία εκτέθηκαν στο συνδυασμό εμπαγλιφλοζίνης και υπεροξειδίου του υδρογόνου ($p=0,024$), WT control σε σύγκριση με τα Tg control ($p<0,001$), Tg υπεροξείδιο του υδρογόνου συγκριτικά με Tg σε συνδυασμό εμπαγλιφλοζίνης και υπεροξειδίου του υδρογόνου ($p=0,012$).



Εικόνα 17: Δενδριτικές άκανθες σε τμήμα δένδριτη των πρωτογενών πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου.

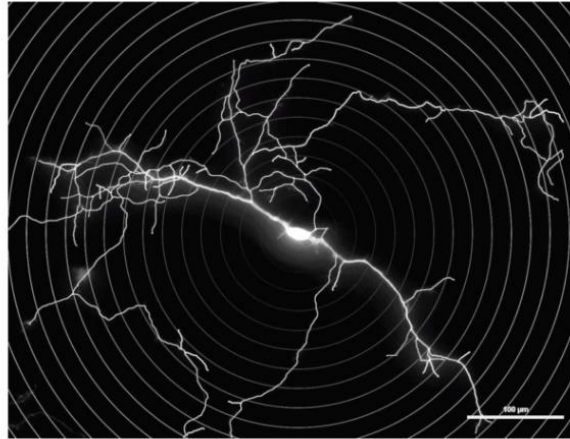
ς) Η προεπώαση με εμπαγλιφλοζίνη διατηρεί τις δενδριτικές άκανθες των νευρώνων του ιπποκάμπου που εκτίθενται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Η πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών στους νευρώνες που προέρχονται από αρουραίους WT και οι οποίοι εκτέθηκαν στο υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με τους νευρώνες της ομάδας ελέγχου των WT ($p < 0,001$) (**Εικόνα 16 Β**), ενώ η πυκνότητα των ακανθών παρέμεινε αμετάβλητη μετά την έκθεση στην εμπαγλιφλοζίνη. Η προεπώαση με εμπαγλιφλοζίνη διατήρησε την πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών σε νευρώνες WT που εκτέθηκαν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ($p < 0,05$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$) στην πυκνότητα των ακανθών μεταξύ των νευρώνων της ομάδας ελέγχου των WT και Tg, με τους νευρώνες Tg να παρουσιάζουν μειωμένη πυκνότητα ακανθών ($p < 0,001$). Στους διαγονιδιακούς νευρώνες, η έκθεση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου οδήγησε σε ελαφρά μείωση της πυκνότητας των ακανθών, ένα αποτέλεσμα που δεν σημείωσε στατιστική σημαντικότητα, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που αφορούν το δενδριτικό μήκος, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Ωστόσο, όπως και στους νευρώνες των WT, σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και στους νευρώνες Tg που εκτέθηκαν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου σε σύγκριση με τους νευρώνες που εκτέθηκαν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ενώ παράλληλα υποβλήθηκαν σε προεπώαση με εμπαγλιφλοζίνη ($p < 0,05$). Συγκρίνοντας νευρώνες που προέρχονταν από αρουραίους WT και Tg, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών ήταν η μοναδική σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου ($p < 0,001$).

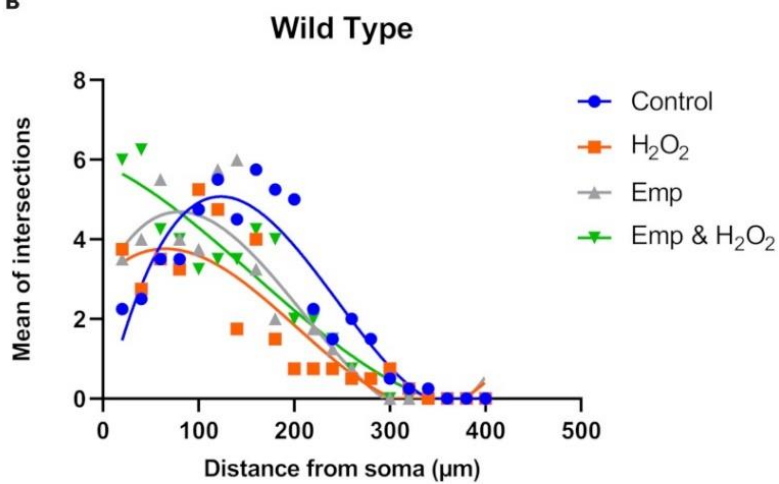
d) Η εμπαγλιφλοζίνη βελτιώνει τις αλλοιώσεις του δενδριτικού πεδίου που προκαλούνται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Η πολυπλοκότητα των δενδριτών αναλύθηκε μέσω της μεθόδου ανάλυσης Sholl. Τόσο οι WT όσο και οι Tg νευρώνες παρουσίασαν μειωμένη δενδριτική διακλάδωση υπό την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (**Εικόνα 18**). Οι δενδρίτες στις πιο απομακρυσμένες περιοχές των πρωτογενών νευρώνων φάνηκε να επηρεάζονται περισσότερο υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Ο μέσος όρος των διακλαδώσεων μειώθηκε αναλογικά με την απόσταση από το σώμα μετά από 100μm τόσο στους WT όσο και στους Tg νευρώνες. Η ανάλυση Sholl αποκάλυψε ότι η έκθεση σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, και στις δύο κατηγορίες, είχε τον ίδιο αντίκτυπο στις δενδριτικές διακλαδώσεις. Η προεπώαση με εμπαγλιφλοζίνη έτεινε να αντιστρέψει το δενδριτικό «κλάδεμα» («pruning»), με αποτέλεσμα υψηλότερο μέσο αριθμό διακλαδώσεων σε ενδιάμεσες και απομακρυσμένες αποστάσεις από το σώμα του κυττάρου, κάτι που γίνεται πιο εμφανές στους νευρώνες Tg.

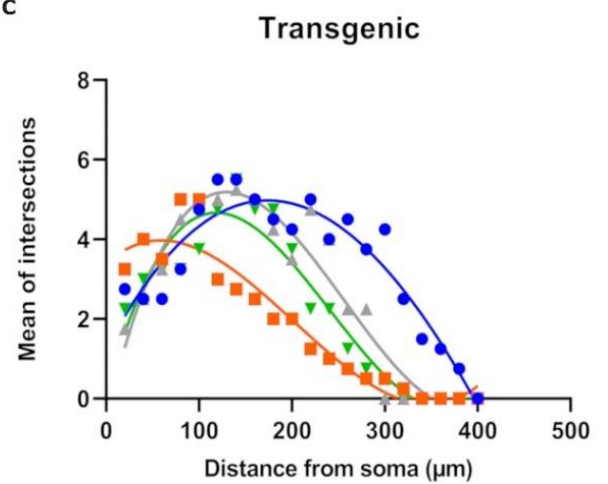
A



B



C



Εικόνα 18: Δενδριτικές τομές των πυραμιδικών νευρώνων του ιππόκαμπου μέσω της ανάλυσης Sholl.

(A) Απεικόνιση της ανάλυσης Sholl ενός πυραμιδικού νευρώνα της ομάδας ελέγχου των WT (DIV15).

Πολωνυμική ανάλυση του μέσου αριθμού διασταυρώσεων για (B) νευρώνες καλλιέργειας WT και

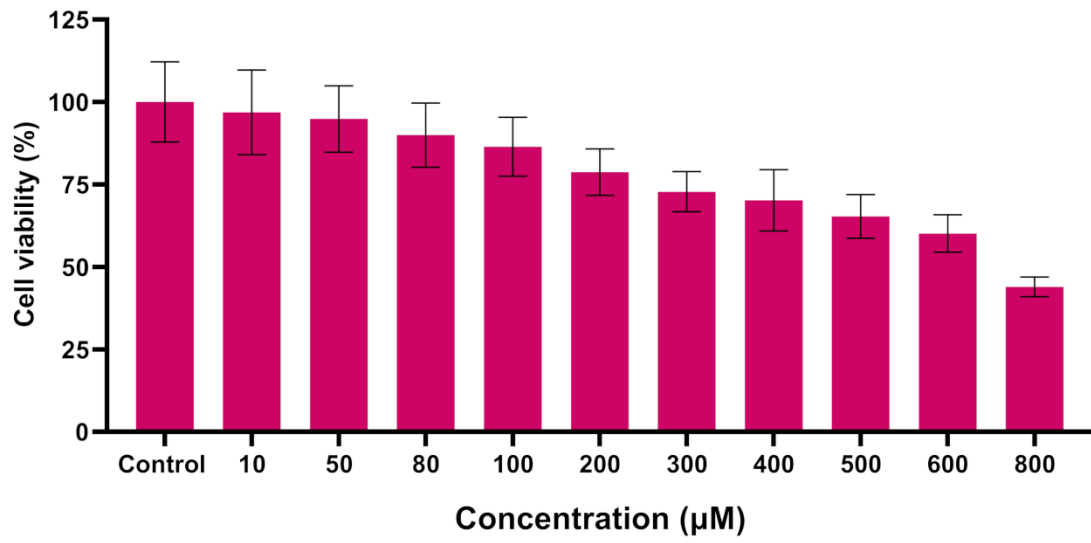
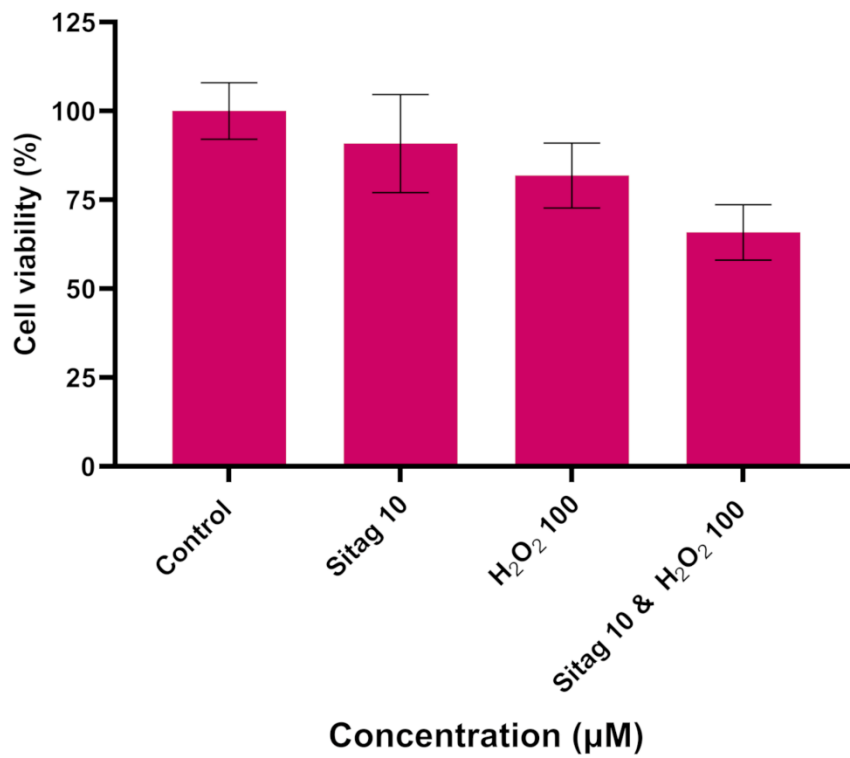
(C) Tg, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες.

6.2. Σιταγλιπτίνη.

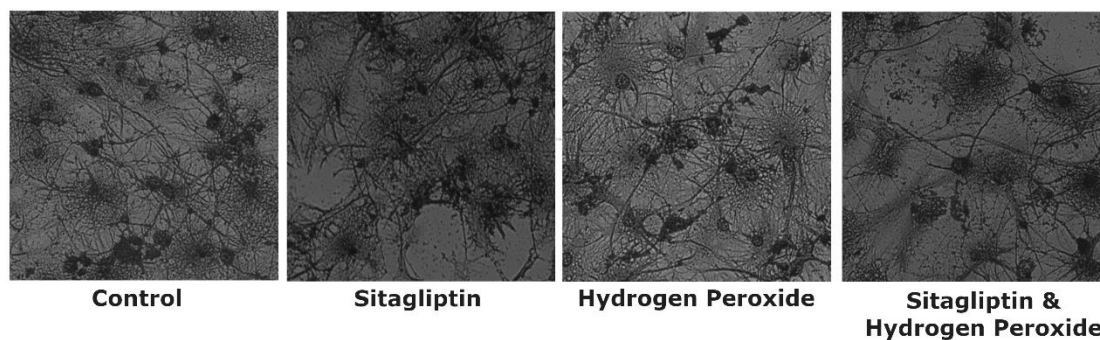
α) Η σιταγλιπτίνη φαίνεται να παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα σε συνδυασμό με το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Όπως και στην προηγούμενη σειρά πειραμάτων τα οποία αφορούσαν την εμπαγλιφλοζίνη, έτσι και για τη σιταγλιπτίνη, ακολουθήσαμε την ίδια φιλοσοφία στον πειραματικό σχεδιασμό. Αρχικά αξιολογήσαμε την επίδραση της σιταγλιπτίνης στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς NIH/3T3. Παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα στην κυτταρική αυτή σειρά με τη χρήση αυξανόμενων συγκεντρώσεων σιταγλιπτίνης μετά από 96 ώρες. Σύμφωνα με τη δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας η επίδραση αυτού του αντιδιαβητικού παράγοντα δεν θεωρήθηκε τοξική καθώς μέχρι τη συγκέντρωση των 100μM η επιβίωση των κυττάρων ήταν πάνω από 80%. Η συγκέντρωση των 200μM θεωρήθηκε ήπια τοξική καθώς η βιωσιμότητα μειώθηκε σε ποσοστό 78,7% για την κυτταρική σειρά των ινοβλαστών. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις (200 έως 800μM) θεωρήθηκαν ιδιαίτερας τοξικές καθώς η βιωσιμότητα μειώθηκε σε ποσοστό κάτω από 75% **(Εικόνα 19 Α)**.

Συνεκτιμώντας τα παραπάνω αποτελέσματα της δοκιμασίας βιωσιμότητας στα κύτταρα NIH/3T3 προχωρήσαμε στην αξιολόγηση της επίδρασης της σιταγλιπτίνης στις πρωτογενείς καλλιέργειες πυραμιδικών νευρώνων του υποκάμπου υπό την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου και πιο συγκεκριμένα, στις *in vitro* συνθήκες οξειδωτικού στρες τις οποίες δημιουργήσαμε. Με βάση τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος τοξικότητας στην κυτταρική σειρά NIH/3T3 η συγκέντρωση της σιταγλιπτίνης η οποία υιοθετήσαμε ώστε να ελέγξουμε τις νευροπροστατευτικές της ιδιότητες απέναντι στις συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες, ήταν αυτή των 10μM και η οποία φαίνεται να μην επιδρά τοξικά στα κύτταρα ινοβλαστών και το ποσοστό επιβίωσης ήταν 97%. Ανεξάρτητα από την μη τοξική επίδραση της σιταγλιπτίνης στους νευρώνες, όπου το ποσοστό επιβίωσης ήταν 91%, η συνδυαστική έκθεση με 100μM υπεροξειδίου του υδρογόνου, οδήγησε σε ιδιαίτερα αυξημένη κυτταροτοξικότητα σε ποσοστό 65%, γεγονός που μας οδήγησε στο να μη συνεχιστούν τα πειράματα με τον αντιδιαβητικό αυτόν παράγοντα, καθώς δε φαίνεται να μπορούμε συμπεράνουμε κάποια πιθανή νευροπροστατευτική δράση **(Εικόνα 19 Β)**. Επομένως τα πειράματα για το συγκεκριμένο αντιδιαβητικό δεν προχώρησαν περαιτέρω.

A**NIH/3T3 Sitagliptin****B****Primary Hippocampal Neurons**

C



Εικόνα 19: Δοκιμή κυτταρικής βιωσιμότητας με *Crystal Violet* **(A)** στην κυτταρική σειρά NIH/3T3 μετά την έκθεση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σιταγλιπτίνης για 96 ώρες. **(B)** Βιωσιμότητα κυττάρων μετά από 96h προθεραπεία με σιταγλιπτίνη (10μM) και 24h έκθεση σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (100μM) **(C)** Φωτογραφίες πρωτογενών νευρώνων του υποκάμπου (DIV15) μετά από χρώση με *Crystal Violet*.

6.3. Δαπαγλιφλοζίνη.

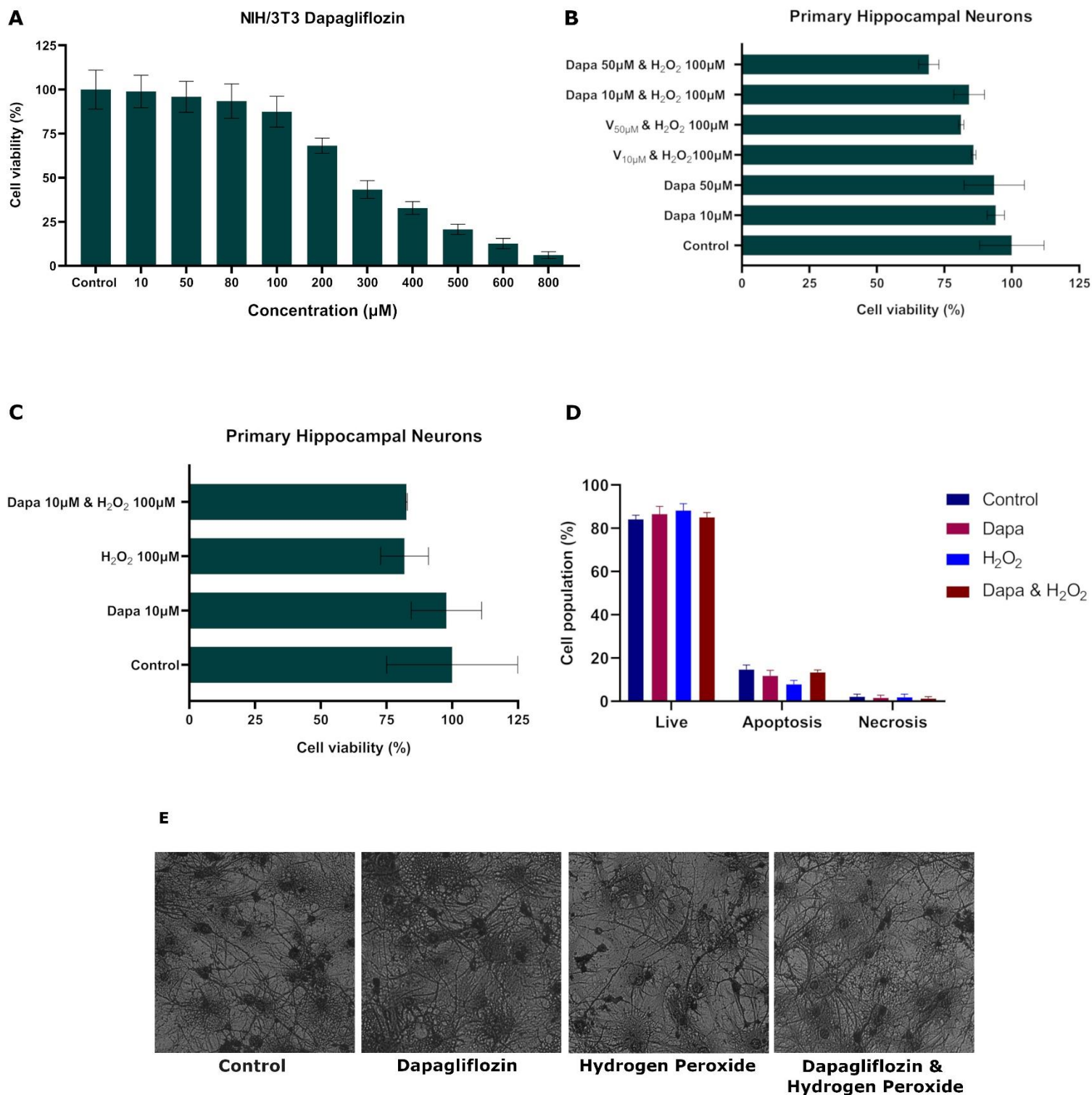
α) Η δαπαγλιφλοζίνη φαίνεται να αντιστρέφει μερικώς την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Θέλοντας να εξετάσουμε την επίδραση ενός ακόμη αναστολέα του συμμεταφορέα νατρίου- γλυκόζης, και πιο συγκεκριμένα της δαπαγλιφλοζίνης, ακολουθήσαμε την προαναφερθείσα πειραματική πορεία. Το πρωταρχικό βήμα περιελάμβανε την εξέταση των συγκεντρώσεων στις οποίες η δαπαγλιφλοζίνη μπορεί να έχει τοξική επίδραση στα κύτταρα NIH/3T3. Όπως και για την εμπαγλιφλοζίνη η οποία ανήκει στην ίδια κατηγορία αντιδιαβητικών παραγόντων, έτσι και η δαπαγλιφλοζίνη παρουσιάζει δοσοεξαρτόμενο μοτίβο τοξικότητας. Σύμφωνα με το πείραμα βιωσιμότητας οι συγκεντρώσεις 10μM, 50μM, 80μM και 100μM δεν επηρέασαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών καθώς τα ποσοστά τους ήταν 98,9%, 95,8%, 93,4%, αντίστοιχα μετά από επώαση 96 ωρών. Από τη συγκέντρωση των 200μM έως και αυτή των 800μM η δαπαγλιφλοζίνη παρουσίασε σημαντική τοξικότητα καθώς το ποσοστό της επιβίωσης μειώθηκε δραματικά σε ποσοστό μικρότερο του 70% **(Εικόνα 20 A)**.

Χρησιμοποιώντας λοιπόν τα ευρήματα της προηγούμενης πειραματικής δοκιμασίας βιωσιμότητας της δαπαγλιφλοζίνης, προχωρήσαμε στην προεπώαση των πρωτογενών πυραμιδικών νευρώνων με τον αντιδιαβητικό παράγοντα στις συγκεντρώσεις 10μM και

50μM δηλαδή στις δύο χαμηλότερες συγκεντρώσεις, παρά το γεγονός ότι μέχρι τη συγκέντρωση των 100μM δεν υπήρξε τοξική επίδραση στα κύτταρα ινοβλαστών. Η επίδραση και των δύο προαναφερθέντων συγκεντρώσεων για 96 ώρες δεν επηρέασε την βιωσιμότητα των πρωτογενών νευρικών κυττάρων του υποκάμου τα οποία εμφάνισαν ποσοστά επιβίωσης 94% και 93,5% αντίστοιχα. Ανεξάρτητα από την μη τοξική επίδραση την οποία παρουσίασε η δαπαγλιφλοζίνη όταν πραγματοποιήθηκε επώαση με τη συγκέντρωση των 50μM, η συνδυαστική επώαση με το υπεροξειδίο του υδρογόνου οδήγησε σε ραγδαία μείωση της κυτταρικής επιβίωσης σε ποσοστό 69,2%, ενώ η επώαση με 10μM δαπαγλιφλοζίνης σε κύτταρα τα οποία είχαν υποβληθεί σε επώαση με 100μM υπεροξειδίου του υδρογόνου, δεν παρουσίασε τοξική επίδραση. Έτσι υιοθετήσαμε τη χαμηλότερη και μη τοξική συγκέντρωση δαπαγλιφλοζίνης για την προεπώαση των νευρώνων τα οποία βρίσκονται υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες **(Εικόνα 20 Β)**. Οι πρωτογενείς νευρώνες (DIV11) υποβλήθηκαν αρχικά σε επώαση με 10 μM δαπαγλιφλοζίνης για τρεις ημέρες. Στη συνέχεια, στο ίδιο καλλιεργητικό υλικό προστέθηκε υπεροξειδίο του υδρογόνου σε τελική συγκέντρωση 100 μM για άλλες 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας των κυττάρων αποκάλυψαν ότι η προεπώαση με δαπαγλιφλοζίνη έτεινε να αντιστρέφει ήπια την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, αποτέλεσμα που δεν οδήγησε σε στατιστική σημαντικότητα **(Εικόνα 20 C)**. Για την ανάλυση των μορφολογικών ευρημάτων, χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπική αξιολόγηση με τη χρήση Crystal Violet, η οποία συνάδει με τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας των κυττάρων **(Εικόνα 20 E)**.

Επιπλέον με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής έγινε διαχωρισμός του κυτταρικού πληθυσμού ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση της έκθεσης σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και της δαπαγλιφλοζίνης στην απόπτωση και τη νέκρωση των πρωτογενών νευρώνων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το ποσοστό των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυτταρικών πληθυσμών παρέμεινε σταθερό σε όλες τις πειραματικές συνθήκες **(Εικόνα 20 D)**, ενώ το υψηλότερο ποσοστό των νευρώνων, πάνω από 80%, ήταν ζωντανοί. Το ποσοστό του αποπτωτικού κυτταρικού πληθυσμού ήταν αυξημένο συγκριτικά με το νεκρωτικό, ωστόσο το αποτέλεσμα έδειξε ότι η δαπαγλιφλοζίνη δεν οδηγεί τα νευρικά κύτταρα ούτε σε απόπτωση ούτε σε νέκρωση. Οι μικρές και μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p>0,05$) επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των πειραμάτων βιωσιμότητας.

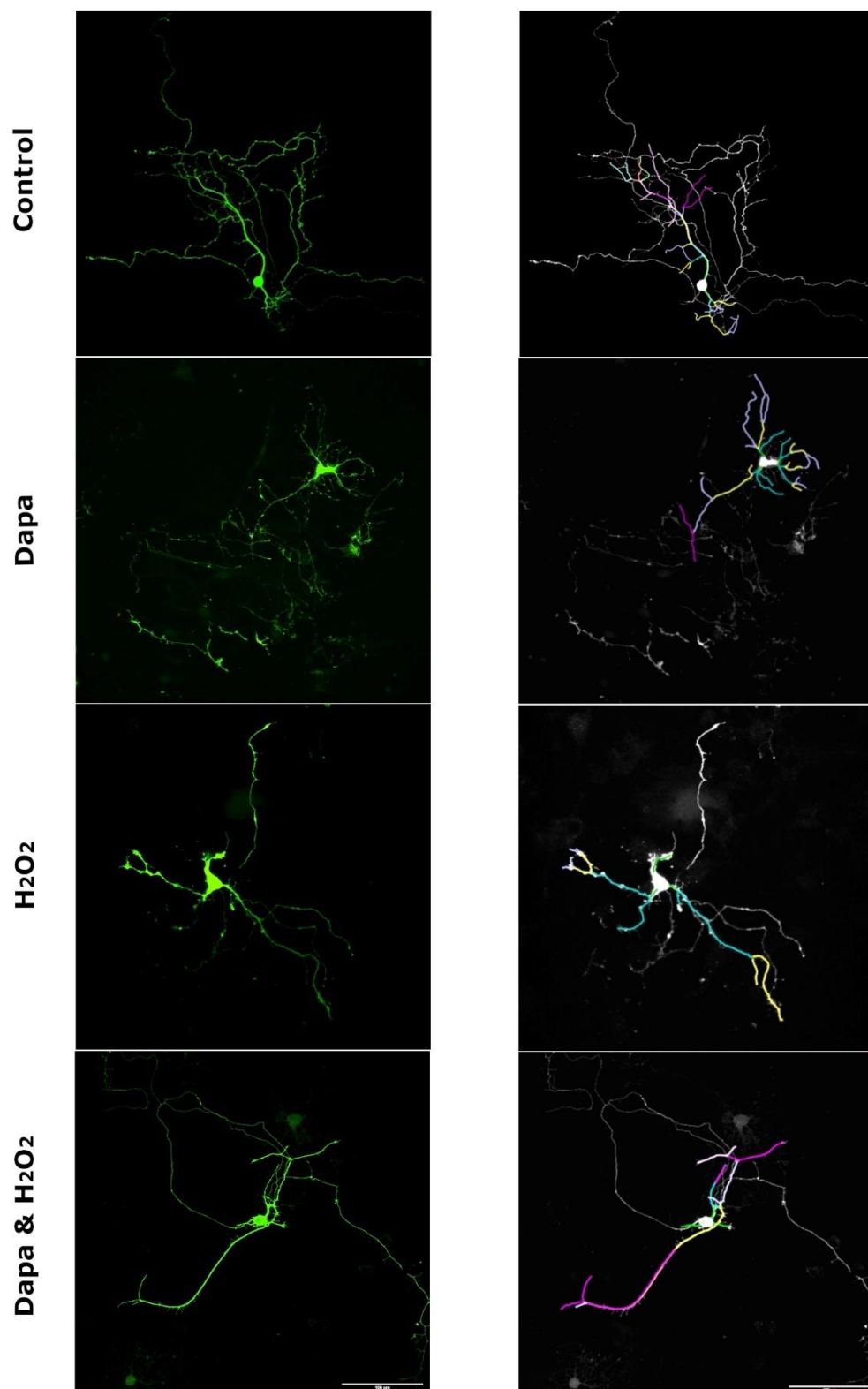


Εικόνα 20: Δοκιμή κυτταρικής βιωσιμότητας με *Crystal Violet* σε πρωτογενείς νευρώνες του υπόκαμπου WT (DIV15). **(Α)** Βιωσιμότητα κυττάρων NIH/3T3 μετά από έκθεση σε δαπαγλιφλοζίνη για 96 ώρες. **(Β)** Βιωσιμότητα κυττάρων μετά από 96h προεπώαση με δαπαγλιφλοζίνη (10 μM και 50 μM) και 24h έκθεση σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (100μM). **(C)** Βιωσιμότητα κυττάρων μετά από 96h προεπώαση με 10μM δαπαγλιφλοζίνη και 24h έκθεση σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (100μM) **(D)** Αξιολόγηση του πληθυσμού ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (%) σε

καλλιεργηθέντες νευρώνες του υπόκαμπου (DIV15) μετά από θεραπεία με δαπαγλιφλοζίνη (10μM) για 96h και υπεροξείδιο του υδρογόνου (100μM) για 24h. **(Ε)** Φωτογραφίες πρωτογενών νευρώνων του υπόκαμπου (DIV15) μετά από χρώση με Crystal Violet.

b) Η προεπώαση με δαπαγλιφλοζίνη φαίνεται να προστατεύει τους νευρώνες από την απώλεια των δενδριτών μετά από έκθεση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου.

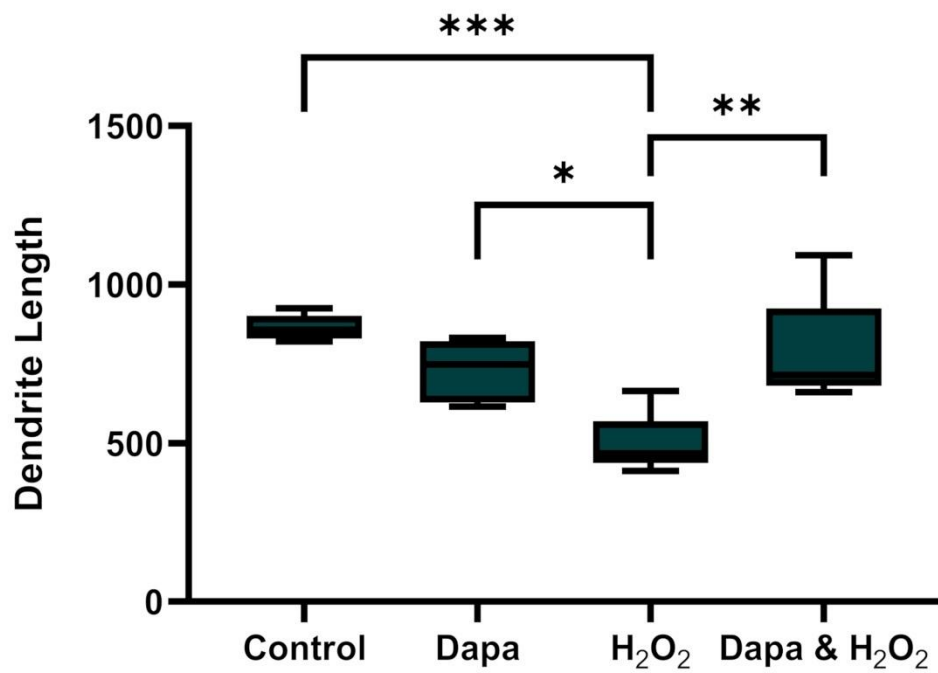
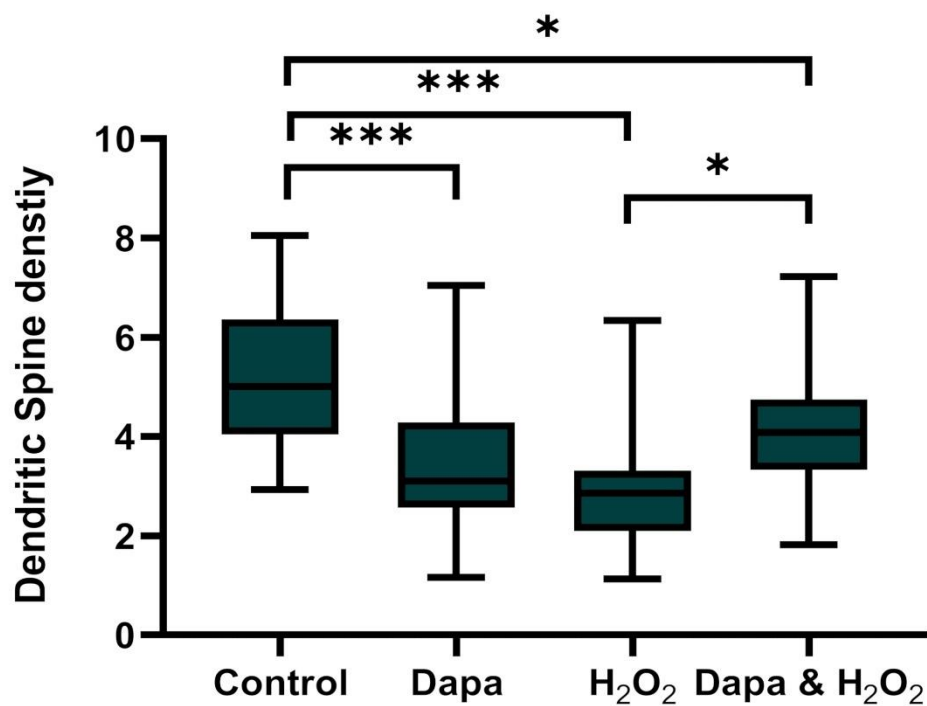
Στη συνέχεια εξετάσαμε περαιτέρω τις μορφολογικές αλλαγές για όλες της πειραματικές συνθήκες με τη χρήση ανοσοκυτταροχημείας GFP, ώστε να εντοπίσουμε τον πληθυσμό των νευρικών κυττάρων στα οποία θα γίνει χαρτογράφηση για το μήκος των δενδριτών και την πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών. Η έκθεση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του μήκους των δενδριτών, ενώ η δαπαγλιφλοζίνη οδήγησε σε μη στατιστικώς σημαντική μείωση του. Η προεπώαση με δαπαγλιφλοζίνη, φαίνεται να ανέστρεψε σημαντικά τη μείωση του δενδριτικού πεδίου η οποία είχε προκληθεί από την έκθεση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου **(Εικόνα 21- 22 Α)**.



Εικόνα 21: Πρωτογενείς πυραμιδικοί νευρώνες του ιππόκαμπου (DIV15) σε όλες τις πειραματικές συνθήκες τη χρήση GFP ανοσοκυτταροχημείας. Η μορφολογική ανάλυση των δενδριτών (καταγραφή των πρωτογενών, δευτερογενών, τριτογενών κ.λπ.) πραγματοποιήθηκε με το Fiji ImageJ.

c) Η προεπώαση με δαπαγλιφλοζίνη αντιστρέφει εν μέρει την απώλεια των δενδριτικών ακανθών η οποία προκλήθηκε λόγω της έκθεσης σε υπεροξείδιο του Υδρογόνου.

Η πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση σε όλες τις πειραματικές συνθήκες συγκριτικά με τους νευρώνες της ομάδας ελέγχου. Παρά το γεγονός ότι υπήρχε σημαντική μείωση τους σε όλες τις πειραματικές συνθήκες, η προεπώαση με τη δαπαγλιφλοζίνη φαίνεται να επιδρά θετικά στα κύτταρα τα οποία είχαν εκτεθεί σε H_2O_2 παρουσιάζοντας στατιστικώς σημαντική αναστροφή στη μείωση της πυκνότητας των δενδριτικών ακανθών **(Εικόνα 22 Β)**.

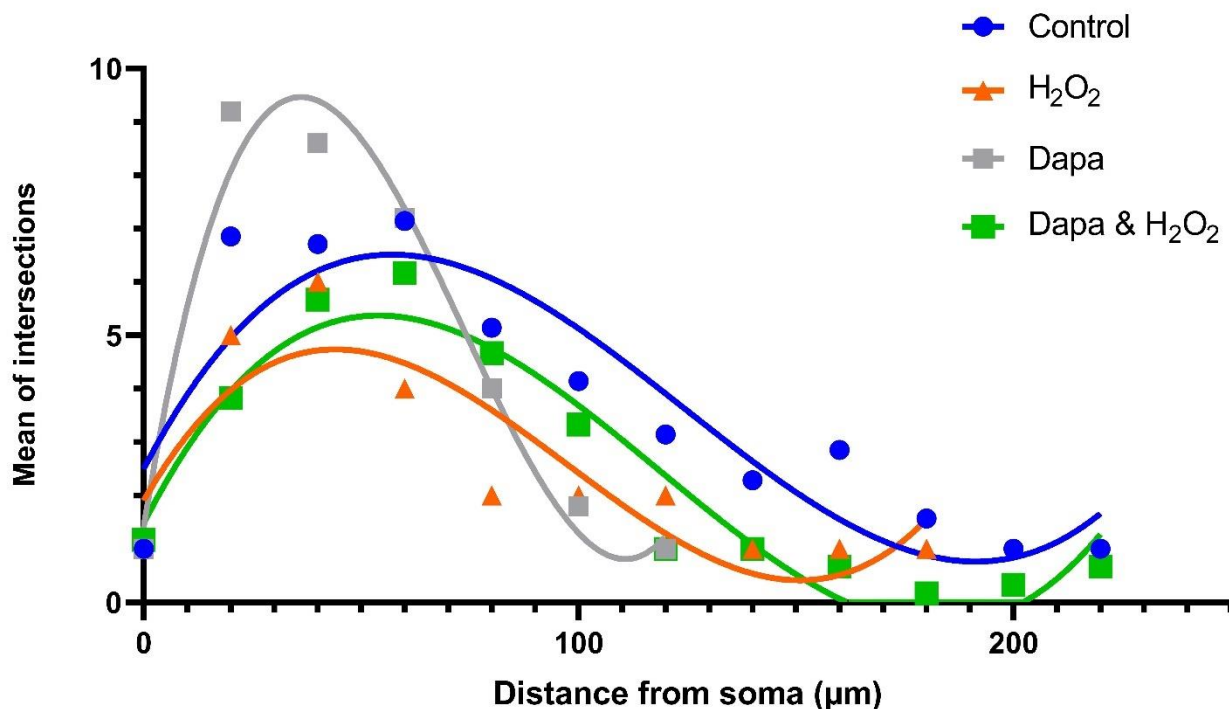
A**B**

Εικόνα 22: Box plot του **(Α)** μήκους των δενδριτών και **(Β)** της πυκνότητας των ακανθών των νευρώνων σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Στο διάγραμμα του σχήματος **(Α)** το δενδριτικό μήκος των νευρώνων που εκτέθηκαν στο υπεροξειδίου του υδρογόνου μειώθηκε σημαντικά ($p < 0,001$) σε σύγκριση με τους νευρώνες της ομάδας ελέγχου, ενώ στο συνδυαστικό φάνηκε να υπάρχει μία ήπια αναστροφή της επίδρασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στο box plot **(Β)** η ομάδα ελέγχου

παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές έναντι των κυττάρων τα οποία εκτέθηκαν στον αντιδιαβητικό παράγοντα ($p<0,001$), στο υπεροξειδίο του υδρογόνου ($p<0,001$), καθώς και στο συνδυασμό δαπαγλιφλοζίνης και υπεροξειδίου του υδρογόνου ($p=0,006$). Παρατηρήθηκε μια μη στατιστικά σημαντική αναστροφή στην πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών κατά την έκθεση στο υπεροξειδίο του υδρογόνου με δαπαγλιφλοζίνη στα κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν με υπεροξειδίου του υδρογόνου

d) Η δαπαγλιφλοζίνη περιορίζει τις προκαλούμενες από το υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλοιώσεις του δενδριτικού πεδίου.

Με τη χρήση της μεθόδου Sholl, προχωρήσαμε στην ανάλυση της πολυπλοκότητας του δενδριτικού πεδίου κάτω από όλες τις πειραματικές συνθήκες. Οι νευρώνες υπό την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, παρουσίασαν μειωμένο αριθμό διακλαδώσεων στις μέσες και απομακρυσμένες αποστάσεις. Πιο συγκεκριμένα ο μέσος όρος των διακλαδώσεων μειώθηκε αναλογικά με την απόσταση από το σώμα μετά τα 70μm. Η προεπώαση με δαπαγλιφλοζίνη παρουσιάζει μια τάση αντιστροφής του «κλαδέματος» το οποίο συμβαίνει υπό τις συνθήκες υψηλού οξειδωτικού στρες, παρουσιάζοντας υψηλότερο αριθμό διακλαδώσεων στις αντίστοιχες αποστάσεις όπου το υπεροξειδίο του υδρογόνου μείωσε την πολυπλοκότητα του δενδριτικού πεδίου. Η επώαση των νευρικών κυττάρων μόνο με την δαπαγλιφλοζίνη παρουσίασε πολυπλοκότητα δενδριτικού πεδίου αντίστοιχη με εκείνη της ομάδας ελέγχου (**Εικόνα 23**).



Εικόνα 23: Πολυωνυμική ανάλυση του μέσου αριθμού διατομών των πυραμιδικών νευρώνων κάτω από όλες τις πειραματικές συνθήκες.

6.4. HPC- Δαπαγλιφλοζίνη.

α) Η εγκλωβισμένη σε νανοσωματίδια άνθρακα δαπαγλιφλοζίνη φαίνεται να μην αντιστρέφει την τοξική επίδραση του υπεροξειδίου.

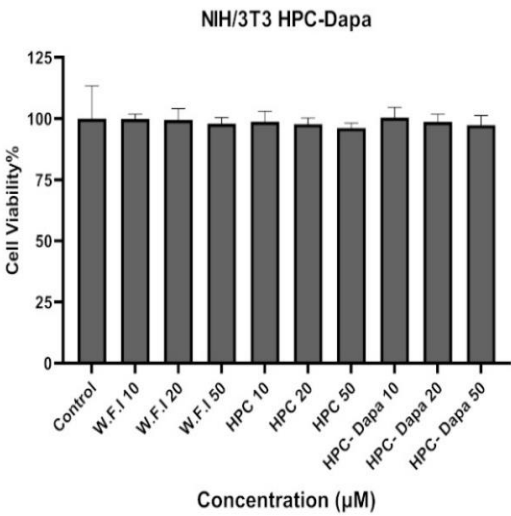
Ακολουθώντας την ίδια πειραματική πορεία στην οποία έχουμε καταλήξει ώστε να εξετάσουμε την επίδραση των αντιδιαβητικών παραγόντων υπό την επίδραση του χρόνιου οξειδωτικού στρες, προχωρήσαμε στη μελέτη της επίδρασης τριών συγκεντρώσεων εγκλωβισμένης σε νανοσωματίδια άνθρακα δαπαγλιφλοζίνης σε κύτταρα ινοβλαστών NIH/3T3 καθώς και σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων του ιπποκάμπου. Αρχικά οι συγκεντρώσεις της εγκλωβισμένης δαπαγλιφλοζίνης υπολογίστηκαν με φασματοσκοπία UV και το αποτέλεσμα έδειξε ότι σε 0,5mg υλικού HPC-Dapa, τα 0,3mg αποτελούνται από τον αντιδιαβητικό παράγοντα. Οι συγκεντρώσεις αντιστοιχούσαν στα 10, 20 και 50μM μη εγκλωβισμένης δαπαγλιφλοζίνης. Η δοκιμασία της κυτταρικής βιωσιμότητας στα κύτταρα ινοβλαστών, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των τριών προαναφερθέντων συγκεντρώσεων. Η πειραματική διάταξη περιελάμβανε την επώαση των κυττάρων με τις τρεις αυτές συγκεντρώσεις, αλλά και με τον διαλύτη της ουσίας (Water for Injection) καθώς και με το

νανοσωματίδιο στο οποίο δεν είχε εγκλωβιστεί η δαπαγλιφλοζίνη. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αυτής έδειξαν ότι σε καμία από τις παραπάνω συνθήκες δεν υπήρξε τοξική επίδραση στα κύτταρα. Κατά τη διάρκεια του επόμενου πειραματικού βήματος, προχωρήσαμε στην επώαση των ινοβλαστών με τις τρεις συγκεντρώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά την πρώτη δοκιμασία αλλά σε συνδυασμό και με το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση η οποία αντιστοιχεί στα 10μM δεν παρουσιάζει τοξικότητα είτε μόνη της είτε κατά την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου όπως ούτε και το νανοσωματίδιο στο οποίο δεν έχει εγκλωβιστεί ποσότητα δαπαγλιφλοζίνης, γεγονός το οποίο μας κατευθύνει να επιλέξουμε αυτή τη συγκέντρωση ώστε να μελετήσουμε την πιθανή νευροπροστατευτική της δράση στα κύτταρα του ιπποκάμπου. Οι δύο επόμενες συγκεντρώσεις του νανοσωματιδίου, αυτή των 20μM και αυτή των 50μM, παρά το γεγονός ότι δεν παρουσίασαν καμία τοξικότητα είτε αυτά στα οποία η δαπαγλιφλοζίνη βρισκόταν στην εγκλωβισμένη της μορφή είτε το νανοσωματίδιο όπου δεν είχε προσροφηθεί ποσότητα αντιδιαβητικής ουσίας, ο συνδυασμός τους με το υπεροξειδίο του υδρογόνου, παρουσίασε τοξική επίδραση η οποία εικάζουμε ότι προέρχεται λόγω της πορώδους φύση τους και η οποία μπορεί να αυξήσει τοπικά την συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των προϊόντων διάσπασής του, προκαλώντας δυνητικά βλάβες στα κύτταρα, γεγονός το οποίο μας οδήγησε στο να αποκλείσουμε από τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας αυτές τις συγκεντρώσεις **(Εικόνα 24 A-B)**.

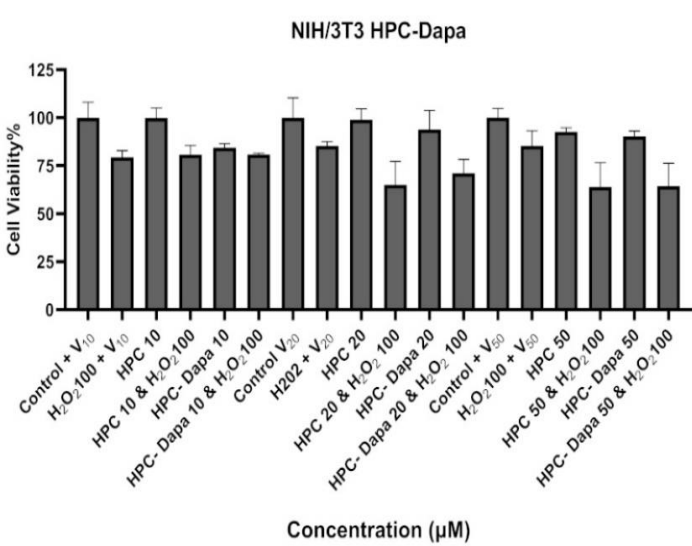
Στο επίπεδο της καλλιέργειας των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου, η έκθεση με τη χαμηλότερη συγκέντρωση του προηγούμενου πειράματος, φαίνεται ότι το νανοσωματίδιο της δαπαγλιφλοζίνης είναι καλά ανεκτό από τα κύτταρα και δεν επάγει τοξικότητα. Αντίστοιχα είναι τα αποτελέσματα της επίδρασης του νανοσωματιδίου σε κύτταρα στα οποία είχαν εκτεθεί με υπεροξειδίο του Υδρογόνου όσον αφορά την βιωσιμότητα των κυττάρων, αλλά η προεπώαση με το νανοσωματίδιο δεν φάνηκε να αντιστρέφει την τοξική επίδραση του υπεροξειδίου **(Εικόνα 24 C)**. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης μετά από χρώση με Crystal Violet **(Εικόνα 24 E)**. Επιπλέον διεξήχθησαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής για τον διαχωρισμό των ζωντανών από τα νεκρά (αποπτωτικά και νεκρωτικά) νευρικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υψηλότερο ποσοστό των νευρικών κυττάρων παρέμειναν ζωντανά σε ποσοστό άνω του 80%, ενώ ο αποπτωτικός και νεκρωτικός πληθυσμός παρέμεινε σταθερός κάτω από όλες τις πειραματικές συνθήκες, με ελαφρώς αυξημένο τον πληθυσμό των αποπτωτικών κυττάρων, επιβεβαιώνοντας όλα τα παραπάνω **(Εικόνα 24 D)**.

Η συγκέντρωση των 10μM χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια στην *in vivo* πειραματική διαδικασία και τα συμπεριφορικά πειράματα.

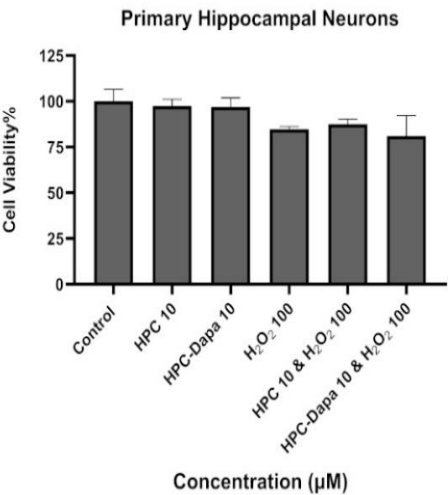
A



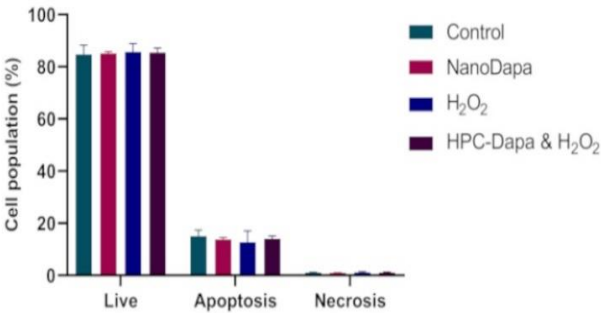
B



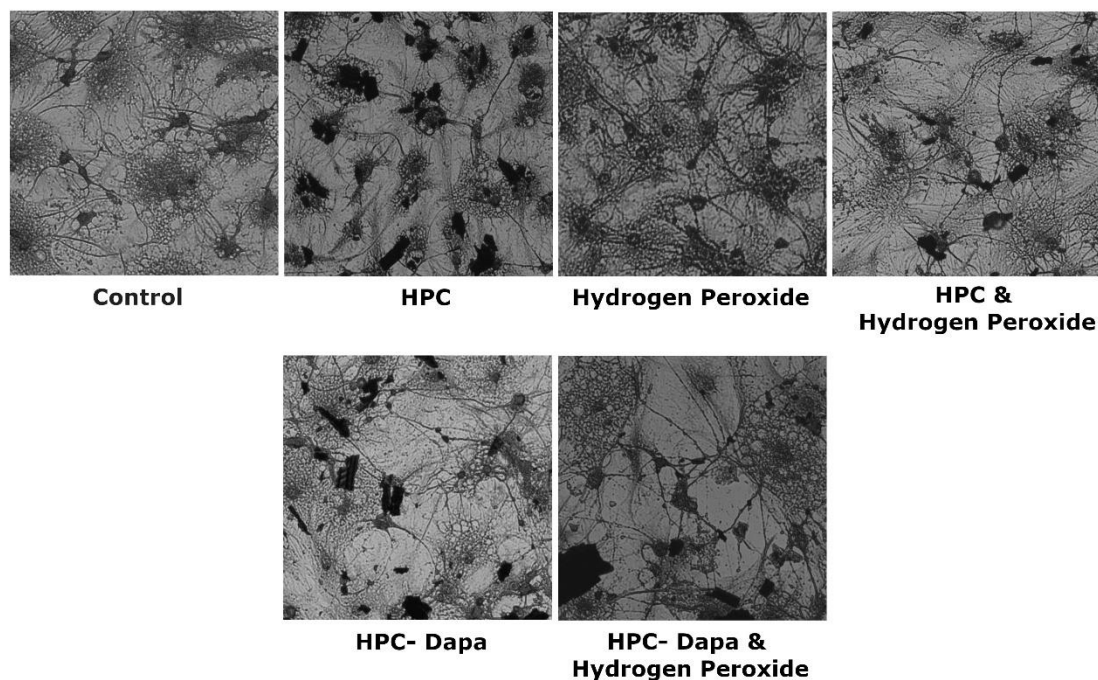
C



D



E



Εικόνα 24: Δοκιμή κυτταρικής βιωσιμότητας με *Crystal Violet* σε κύτταρα NIH/3T3 και πρωτογενείς νευρώνες του ιππόκαμπου WT (DIV15). **(Α)** Βιωσιμότητα κυττάρων NIH/3T3 μετά από έκθεση σε νανομόριο HPC-Dapa καθώς και στον διαλύτη του νανομορίου για 96 ώρες. **(Β)** Βιωσιμότητα κυττάρων μετά από 96h προεπάση με νανομόριο HPC-Dapa (10 μ M, 20 μ M και 50 μ M) και 24h έκθεση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (100 μ M). **(C)** Βιωσιμότητα των πρωτογενών νευρικών κυττάρων μετά από 96h προεπάση με 10 μ M δαπαγλιφλοζίνη και 24h έκθεση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (100 μ M) **(D)** Αξιολόγηση του πληθυσμού ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (%) σε καλλιεργηθέντες νευρώνες του ιππόκαμπου (DIV15) μετά από προεπάση με νανομόριο HPC-Dapa (10 μ M) για 96h και υπεροξείδιο του υδρογόνου (100 μ M) για 24h. **(Ε)** Φωτογραφίες πρωτογενών νευρώνων του ιππόκαμπου (DIV15) μετά από χρώση με *Crystal Violet*.

6.5. Ομάδες πειραματοζώων.

Η *in vivo* μελέτη, πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους του στελέχους Wistar στους οποίους προσπαθήσαμε να προκαλέσουμε συνθήκες παθολογίας Alzheimer με τη χρήση χλωριδίου του Αλουμινίου ($AlCl_3$), καθώς και σε διαγονιδιακούς TgF344-AD και οι οποίοι εμφανίζουν τη νόσο, προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση της δαπαγλιφλοζίνης και της εγκλωβισμένης σε νανοσωματίδιο άνθρακα δαπαγλιφλοζίνης. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 27 ζώα τα οποία χωρίστηκαν σε 4 ομάδες [6 ζώα (3 αρσενικά, 3 θηλυκά)/ ομάδα] όσον αφορά τα πειραματόζωα του στελέχους Wistar και 3 κατηγορίες (1 ζώο/ κατηγορία) όσον αφορά τα διαγονιδιακά:

1. Ομάδα Α- Control (ομάδα ελέγχου) → στην ομάδα αυτή χορηγήθηκε μόνο ορός.
2. Ομάδα Β- AlCl_3 → στην ομάδα αυτή χορηγήθηκε AlCl_3 προκειμένου να δημιουργηθούν συνθήκες παθολογίας Alzheimer.
3. Ομάδα Γ- Dapagliflozin+ AlCl_3 → στην ομάδα αυτή συγχορηγήθηκε δαπαγλιφλοζίνη και AlCl_3 .
4. Ομάδα Δ- HPC- Dapa+ AlCl_3 → στην ομάδα αυτή συγχορηγήθηκε δαπαγλιφλοζίνη εγκλωβισμένη σε νανομόριο και AlCl_3 .

Ενώ οι ομάδες για τα διαγονιδιακά TgF344-AD:

1. Κατηγορία Α- Control (κατηγορία ελέγχου) → Το ζώο αυτό δεν έφερε τη μετάλλαξη και χορηγήθηκε μόνο ορός.
2. Κατηγορία Β- AD → Το ζώο αυτό έφερε τη μετάλλαξη της νόσου και χορηγήθηκε μόνο ορός.
3. Κατηγορία Γ- AD → Το ζώο αυτό έφερε τη μετάλλαξη της νόσου και χορηγήθηκε δαπαγλιφλοζίνη εγκλωβισμένη σε νανομόριο.

Η χορήγηση των προαναφερθέντων ουσιών έγινε από του στόματος, με τη χρήση καθετήρα, στα πειραματόζωα για 45 συνεχόμενες ημέρες προκειμένου να διαπιστώσουμε την επίδραση του αντιδιαβητικού δαπαγλιφλοζίνη, στα γνωστικά ελλείμματα, τα οποία θα πρέπει να δημιουργεί η χορήγηση του AlCl_3 λόγω επαγωγής της παθολογίας της νόσου. Η δοσολογία για το AlCl_3 ήταν 100mg/kg σωματικού βάρους, ενώ για την δαπαγλιφλοζίνη και την HPC- δαπαγλιφλοζίνη, 1mg/kg σωματικού βάρους. Ο διαλύτης για όλες της ουσίες ήταν Water for Injection, το οποίο χορηγήθηκε και στην ομάδα ελέγχου. Η αυξημένη τοξικότητα η οποία προκλήθηκε από τη χρήση του AlCl_3 οδήγησε στην απώλεια ορισμένων από τα πειραματόζωα. Ως εκ τούτου, ο τελικός αριθμός των επίμυων οι οποίοι συμμετείχαν στη διενέργεια των συμπεριφορικών δοκιμασιών, ανήλθε στα 3 πειραματόζωα ανά κατηγορία.

Από την χορήγηση του AlCl_3 εξαιρέθηκαν οι διαγονιδιακοί αρουραίοι, καθώς τα πειραματόζωα του στελέχους αυτού, εμφανίζουν την παθολογία της νόσου με το πέρας της ηλικίας, επομένως δεν κρίθηκε απαραίτητη η χορήγηση AlCl_3 .

Από την 40^η ημέρα και έπειτα, παράλληλα με την χορήγηση των ουσιών ξεκίνησε και η πρώτη συμπεριφορική δοκιμασία, αυτή του Morris Water Maze test, για 5 ημέρες ενώ με την ολοκλήρωση της χορήγησης ακολούθησε η άλλη συμπεριφορική δοκιμασία, η οποία περιελάμβανε το Y- maze.

6.5.1. Morris Water Maze Test.

Η πειραματική δοκιμασία του Morris Water Maze test χωρίζεται σε δύο σκέλη, το αρχικό, αφορά της ημέρες 1-4 οι οποίες αποτελούν το στάδιο της εξοικείωσης του πειραματοζώου με το περιβάλλον της πισίνας καθώς και με την μέτρηση του χρόνου για ανεύρεση της πλατφόρμας. Είναι αναμενόμενο κατά το πρώτο διήμερο δοκιμασιών στα πειραματόζωα, να παρατηρείται δυσκολία εντόπισης της πλατφόρμας καθώς τις μέρες αυτές αφήνονται να κολυμπήσουν από όλες τις πιθανές θέσεις στο κάθε τεταρτημόριο. Κατά την πέμπτη ημέρα η πλατφόρμα αφαιρείται από την πισίνα και το πειραματόζωο τοποθετείται στο τεταρτημόριο το οποίο βρίσκεται ακριβώς απέναντι από αυτό που περιείχε την πλατφόρμα. Για την τελευταία ημέρα της πειραματικής διαδικασίας, μετράται ο χρόνος κατά τον οποίο το κάθε πειραματόζωο έμεινε στο τεταρτημόριο όπου βρισκόταν η πλατφόρμα, τον αριθμό των διελεύσεων στο τεταρτημόριο της πλατφόρμας, και το χρόνο καθυστέρησης της εισόδου στο τεταρτημόριο στόχο.

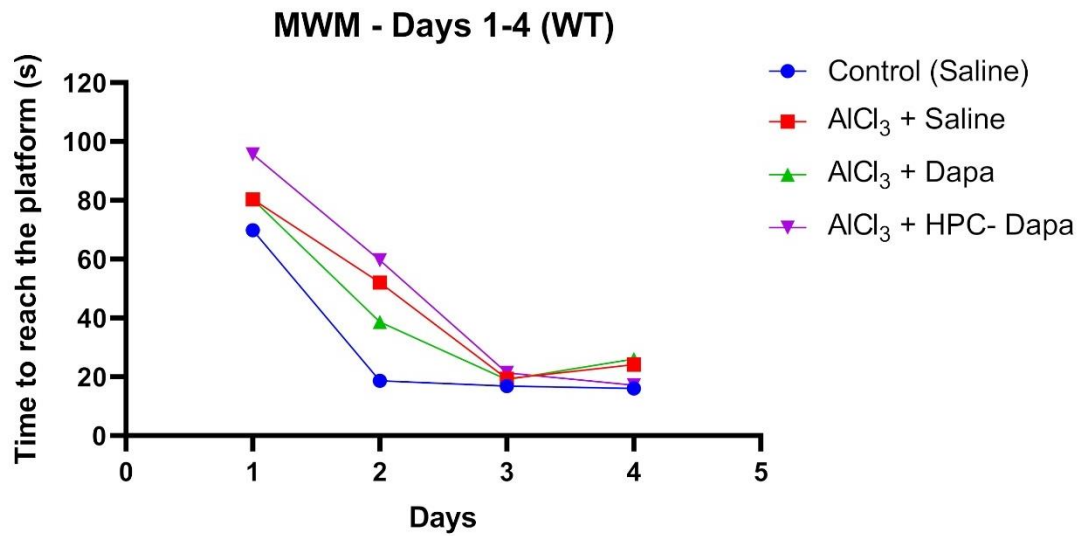
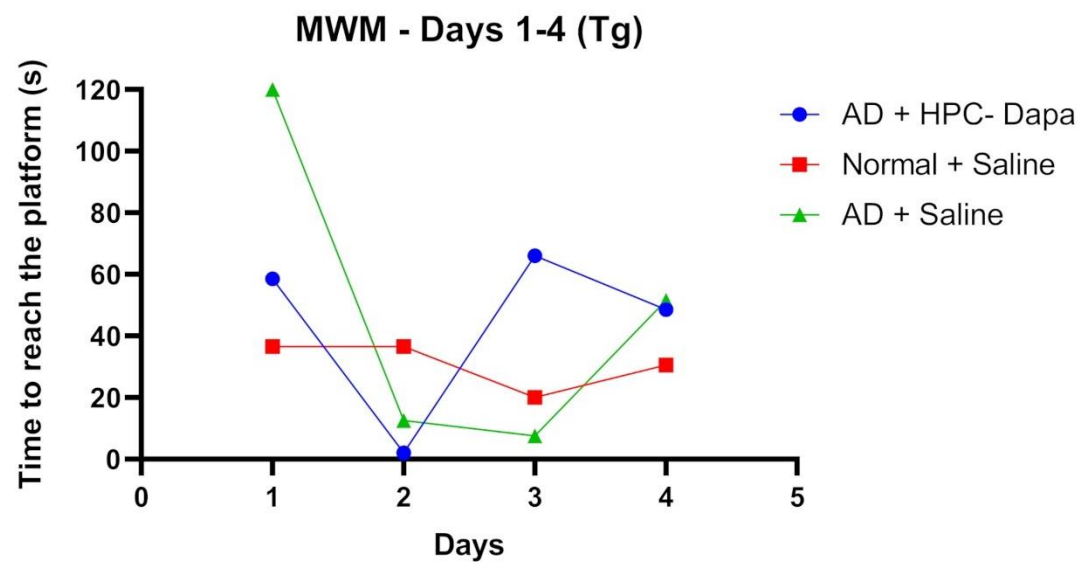
Τα αποτελέσματα δείχνουν, για τα αγρίου τύπου πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου για το στάδιο της εξοικείωσης, ότι κάνουν λιγότερο χρόνο ώστε να προσεγγίσουν την πλατφόρμα, ενώ τα πειραματόζωα στα οποία έχει χορηγηθεί $AlCl_3$ παρουσιάζουν μεγαλύτερο χρόνο προσέγγισης. Οι αρουραίοι στους οποίους συγχωρηγήθηκε η δαπαγλιφλοζίνη φαίνεται να μην παρουσιάζουν βελτίωση στο χρόνο προσέγγισης, ενώ αυτοί της ομάδας HPC- Dara παρουσιάζουν χρόνο παρόμοιο με αυτόν της ομάδας ελέγχου. Όσον αφορά τα διαγονιδιακά πειραματόζωα, φαίνεται ότι παρά το γεγονός ότι το πειραματόζωο το οποίο δεν έφερε τη μετάλλαξη η οποία προκαλεί τον φαινότυπο της νόσου, προσέγγισε σε λιγότερο χρόνο την πλατφόρμα, τα υπόλοιπα τα οποία φέρουν την μετάλλαξη έφτασαν στην πλατφόρμα σε περισσότερο χρόνο, ακόμη και το πειραματόζωο στο οποίο είχε χορηγηθεί HPC- Dara (**Εικόνα 25**).

Όσον αφορά τις παραμέτρους οι οποίες προαναφέρθηκαν και μετρήθηκαν κατά την πέμπτη ημέρα μετά το στάδιο της εξοικείωσης για τα πειραματόζωα αγρίου τύπου, στα οποία προκλήθηκε παθολογία της νόσου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για το χρόνο τον οποίο τα πειραματόζωα έμειναν στο τεταρτημόριο της πλατφόρμας, καλύτερη απόδοση είχε η ομάδα στην οποία είχε χορηγηθεί δαπαγλιφλοζίνη, καθώς και εκείνα στα οποία είχε προκληθεί η νόσος, ενώ στην ομάδα ελέγχου μαζί με εκείνη του νανοσωματιδίου, είναι τους μικρότερους χρόνους για την παράμετρο αυτή. Για τα διαγονιδιακά πειραματόζωα τα αποτελέσματα ήταν επίσης αντιφατικά, καθώς, συγκριτικά με το control, καλύτερη απόδοση ∇ -παρουσιάζει ο αρουραίος στον οποίο είναι παρούσα η νόσος κι έχει ακολουθηθεί θεραπεία με HPC- Dara,

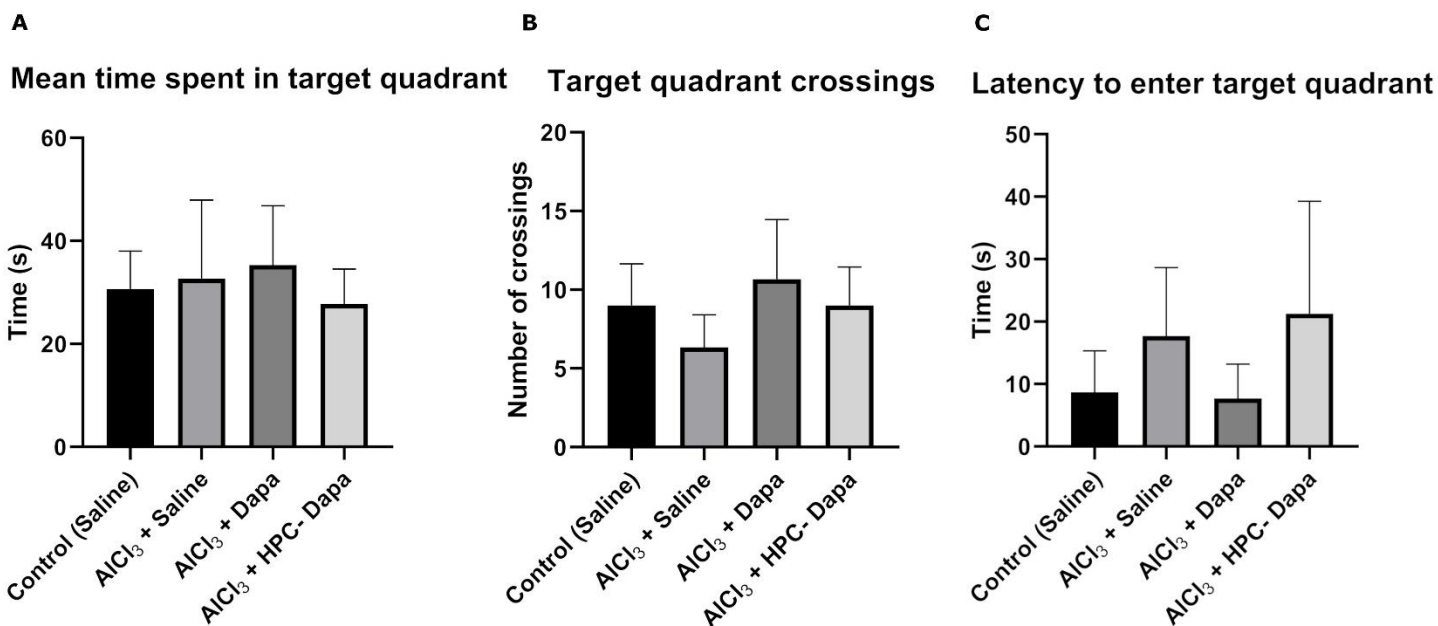
ενώ το πειραματόζωο το οποίο φέρει τη νόσο, όπως είναι αναμενόμενο, παρουσίασε τον χαμηλότερο χρόνο **(Εικόνα 26- 27 A)**.

Η επόμενη παράμετρος η οποία εξετάστηκε, ήταν εκείνη του αριθμού των διελεύσεων από το τεταρτημόριο στο οποίο τοποθετήθηκε η πλατφόρμα κατά το στάδιο της εξοικείωσης. Σε αυτό όπως είναι φυσιολογικό, η ομάδα ελέγχου επιστρέφει περισσότερες φορές στο τεταρτημόριο της πλατφόρμας, ένα αποτέλεσμα το οποίο είναι αντίστοιχο με την ομάδα που έλαβε θεραπεία με τον αντιδιαβητικό παράγοντα είτε στην ελεύθερη είτε στην εγκλωβισμένη μορφή. Το πειραματόζωο με γνωστικά ελλείμματα, επέστρεψε όπως είναι φυσιολογικό της λιγότερες φορές στο τεταρτημόριο στόχο. Αναφορικά με τα διαγονιδιακά πειραματόζωα, ενώ εκείνο το οποίο χρησιμοποιήσαμε ως control, επέστρεψε περισσότερες φορές στο τεταρτημόριο στόχο, εκείνο το οποίο είχε λάβει θεραπεία δεν κατάφερε να προσεγγίσει τον στόχο, εν αντιθέσει με τον φορέα της νόσου, το οποίο προσέγγισε σε αριθμό διελεύσεων εκείνον του control **(Εικόνα 26- 27 B)**.

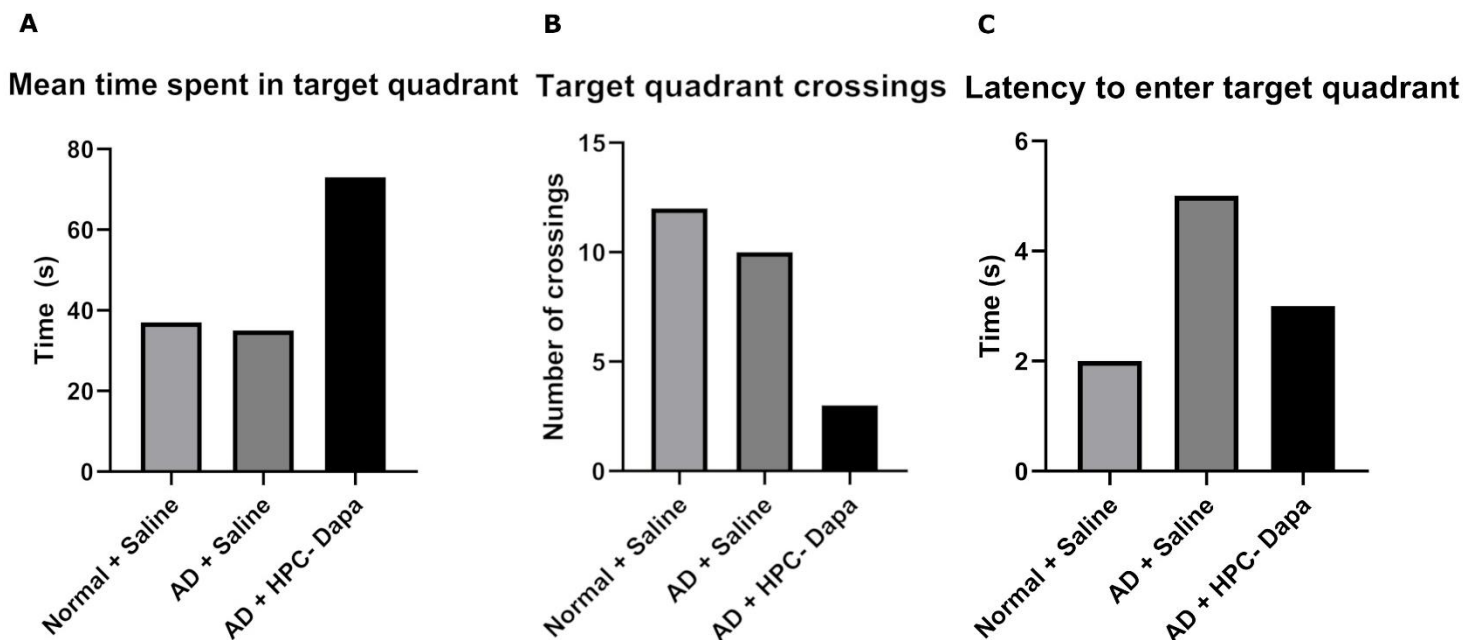
Τελευταία παράμετρος για το MWM ήταν εκείνη του χρόνου καθυστέρησης εισόδου στο τεταρτημόριο στόχο. Και στην περίπτωση των WT αλλά και των Tg πειραματοζώων, η παράμετρος αυτή ήταν χαμηλότερη στις ομάδες ελέγχου, υψηλότερη στις ομάδες οι οποίες παρουσίαζαν τη νόσο και φάνηκε να αντιστρέφεται με τη χρήση του αντιδιαβητικού παράγοντα. Μοναδική εξαίρεση η ομάδα των WT η οποία είχε λάβει θεραπεία με την εγκλωβισμένη μορφή του φαρμάκου **(Εικόνα 26- 27 C)**.

A**B**

Εικόνα 25: Ο χρόνος που απαιτείται ώστε τα πειραματόζωα να προσεγγίσουν την πλατφόρμα κατά το στάδιο της εξοικείωσης των τεσσάρων πρώτων ημερών **(Α)** για τα πειραματόζωα αγρίου τύπου. **(Β)** Για τα διαγονιδιακά πειραματόζωα.



Εικόνα 26: Οι παράμετροι του MWM test οι οποίοι προσμετρώνται για τα πειραματόζωα WT. **(Α)** ο μέσος χρόνος κατά τον οποίο το εκάστοτε πειραματόζωο παρέμεινε στο τεταρτημόριο όπου βρισκόταν η πλατφόρμα, **(Β)** ο αριθμός των διελεύσεων στο τεταρτημόριο της πλατφόρμας, **(C)** ο χρόνος καθυστέρησης της εισόδου στο τεταρτημόριο στόχο.



Εικόνα 27: Οι παράμετροι του MWM test οι οποίοι προσμετρώνται για τα πειραματόζωα Tg. **(Α)** ο μέσος χρόνος κατά τον οποίο το εκάστοτε πειραματόζωο παρέμεινε στο τεταρτημόριο όπου βρισκόταν η

πλατφόρμα, **(B)** ο αριθμός των διελεύσεων στο τεταρτημόριο της πλατφόρμας, **(C)** ο χρόνος καθυστέρησης της εισόδου στο τεταρτημόριο στόχο.

6.5.2. Y- Maze test.

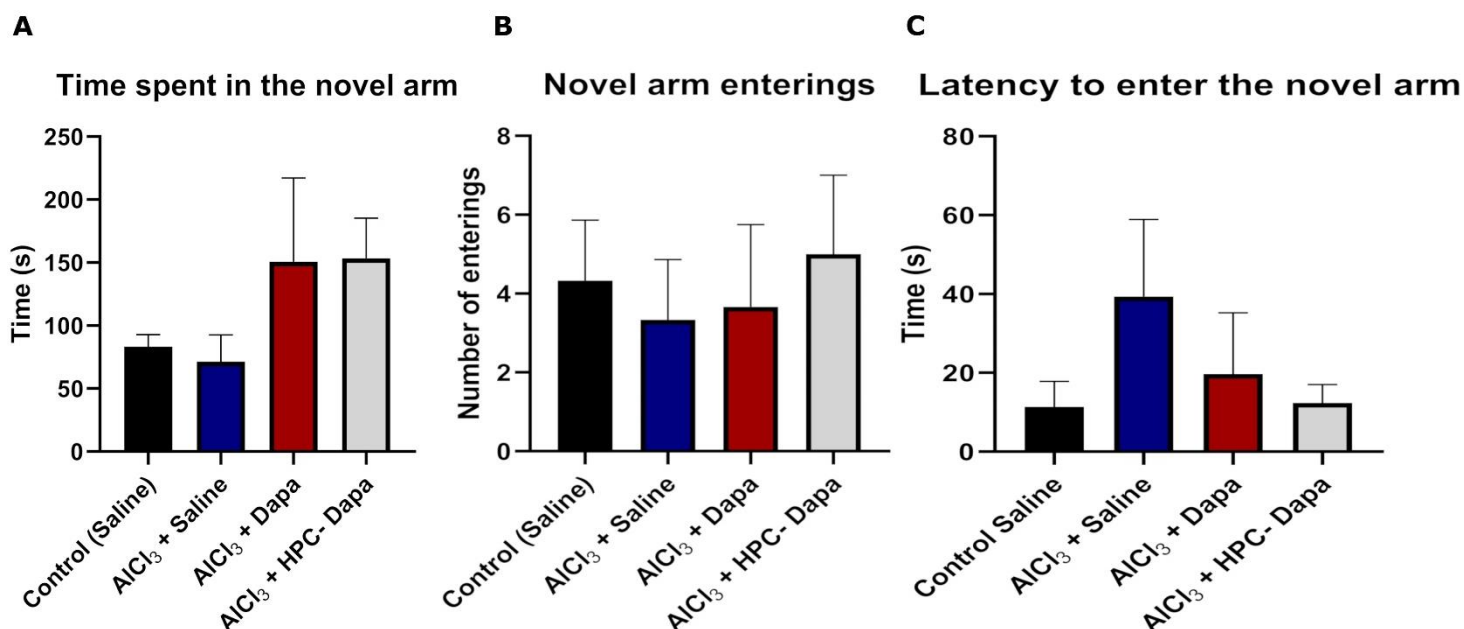
Η δεύτερη *in vivo* πειραματική διαδικασία ήταν αυτή του Y- Maze, η οποία σε αντίθεση με την προηγούμενη, χωρίζεται σε 3 μέρη. Αρχικά η κάθε πειραματική ομάδα τοποθετείται στον λαβύρινθο, στον οποίο ο ένας από τους τρεις βραχίονες παραμένει κλειστός, για 15min, διαδικασία η οποία αποτελεί το στάδιο της εξοικείωσης. Ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες ο βραχίονας ο οποίος παραμένει κλειστός, εναλλάσσεται. Στη συνέχεια τα πειραματόζωα μεταφέρθηκαν στον κλωβό για διάστημα μιας ώρας και με το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, επανατοποθετούνται εντός του λαβυρίνθου με όλες τις πόρτες ανοιχτές για 5min για την μέτρηση των επιθυμητών παραμέτρων. Οι παράμετροι οι οποίες προσμετρήθηκαν ήταν ο χρόνος παραμονής στον νέο βραχίονα ο οποίος κατά το στάδιο της εξοικείωσης παρέμεινε κλειστός, των αριθμό των διελεύσεων από το νέο βραχίονα, την καθυστέρηση εισόδου στο νέο βραχίονα και τέλος το ποσοστό των πειραματοζώων τα οποία επέλεξαν να εισέλθουν στο νέο βραχίονα.

Αναφορικά με τα πειραματόζωα WT, στα οποία προκαλέσαμε την παθολογία της νόσου, παρατηρήσαμε ότι για την πρώτη παράμετρο, αυτή του χρόνου που έμειναν στον ίδιο βραχίονα, ότι στην ομάδα ελέγχου, τα πειραματόζωα ενώ έπρεπε να παραμείνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα εντός του νέου βραχίονα, αυτό δεν παρατηρήθηκε, ενώ όπως είναι λογικό στα πειραματόζωα με την παθολογία της νόσου, ο χρόνος παραμονής ήταν μικρότερος. **(Εικόνα 28 A)**. Στις ομάδες οι οποίες έλαβαν θεραπεία με τον αντιδιαβητικό παράγοντα, είτε εγκλωβισμένο είτε όχι, παρουσίασαν αύξηση στους χρόνους εντός του νέου βραχίονα στο ίδιο επίπεδο.

Η επόμενη παράμετρος η οποία αφορούσε των αριθμό των διελεύσεων από το νέο βραχίονα, παρατηρήθηκε ότι και η ομάδα ελέγχου αλλά και οι ομάδες οι οποίες έλαβαν θεραπεία, επέστρεψαν περισσότερες φορές στο νέο βραχίονα, αντίθετα με την ομάδα της νόσου **(Εικόνα 28 B)**. Επίσης η καθυστέρηση στο χρόνο εισόδου στο νέο βραχίονα ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα στην οποία είχε προκληθεί η νόσος, συγκριτικά και με την ομάδα ελέγχου αλλά και με τις ομάδες οι οποίες έλαβαν θεραπεία **(Εικόνα 28 C)**. Τέλος το ποσοστό των πειραματοζώων τα οποία επέλεξαν να εισέλθουν στο νέο βραχίονα πριν από τον άλλο, παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό της ομάδας ελέγχου, όπως και αυτό της ομάδας οι οποία έλαβε θεραπεία με μη εγκλωβισμένη δαπαγλιφλοζίνη, παρουσίασε ποσοστό 66%, η ομάδα που έλαβε θεραπεία με

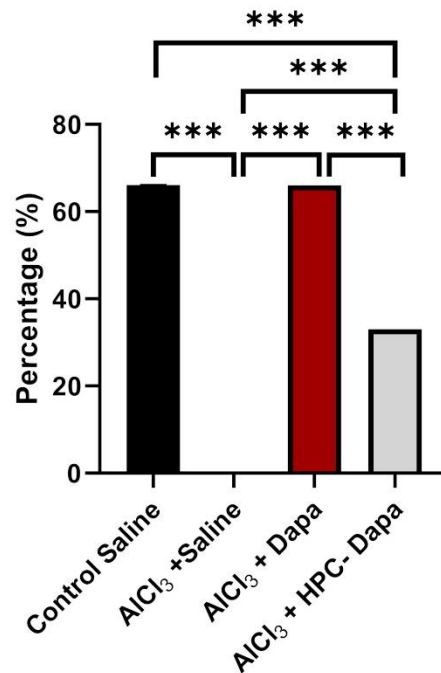
νανομόριο δαπαγλιφλοζίνης, 33% ,ενώ η ομάδα της νόσου ποσοστό το οποίο προσεγγίζει το 0% (**Εικόνα 28 D**).

Τα αποτελέσματα για τα διαγονιδιακά πειραματόζωα, παρουσίασαν παρόμοια εικόνα με εκείνα των WT. Για την πρώτη παράμετρο, παρατηρήθηκε ότι τον περισσότερο χρόνο στο νέο βραχίονα τον πέρασε το πειραματόζωο το οποίο είχε αναπτύξει τη νόσο, ενώ το πειραματόζωο ελέγχου καθώς κι εκείνο που έλαβε θεραπεία, παρουσίασαν μικρότερους χρόνους (**Εικόνα 29 A**). Στον αριθμό των διελεύσεων εντός του νέου βραχίονα, όπως ήταν λογικό το control παρουσίασε υψηλότερο αριθμό διελεύσεων σε αντίθεση με εκείνο το οποίο είχε αναπτύξει τη νόσο, αλλά και με εκείνο το οποίο έλαβε θεραπεία με το νανομόριο του αντιδιαβητικού παράγοντα (**Εικόνα 29 B**). Η παράμετρος που αφορούσε την καθυστέρηση εισόδου στο νέο βραχίονα, έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, καθώς τον μικρότερο χρόνο παρουσίασε το πειραματόζωο ελέγχου, τον μεγαλύτερο χρόνο εκείνο το οποίο έπασχε από τη νόσο, και σαφώς βελτιωμένη ήταν η εικόνα του πειραματοζώου το οποίο είχε λάβει θεραπεία με την εγκλωβισμένη δαπαγλιφλοζίνη (**Εικόνα 29 C**). Αναφορικά με τα πειραματόζωα, τα οποία είχαν ως πρώτη επιλογή το νέο βραχίονα, στην περίπτωση του control αλλά και εκείνου το οποίο έλαβε θεραπεία, ο νέος βραχίονας αποτέλεσε την πρώτη τους επιλογή εν αντιθέσει με το πειραματόζωο φορέα της νόσου το οποίο επέλεξε τον βραχίονα τον οποίο ήδη είχε εισέλθει κατά το πρώτο στάδιο της δοκιμασίας.



D

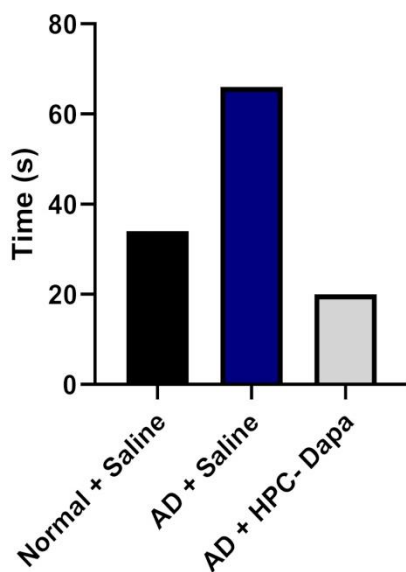
Percentage of animals per group that their first enter was in the novel arm (%)



Εικόνα 28: Οι παράμετροι του Y- maze test οι οποίες αφορούν τα WT πειραματόζωα. **(A)** ο χρόνος ο οποίος πέρασαν τα πειραματόζωα στο νέο βραχίονα, **(B)** ο αριθμός των διελεύσεων από το νέο βραχίονα, **(C)** η καθυστέρηση εισόδου στο νέο βραχίονα και **(D)** το ποσοστό των πειραματόζωων τα οποία επέλεξαν να εισέλθουν στο νέο βραχίονα.

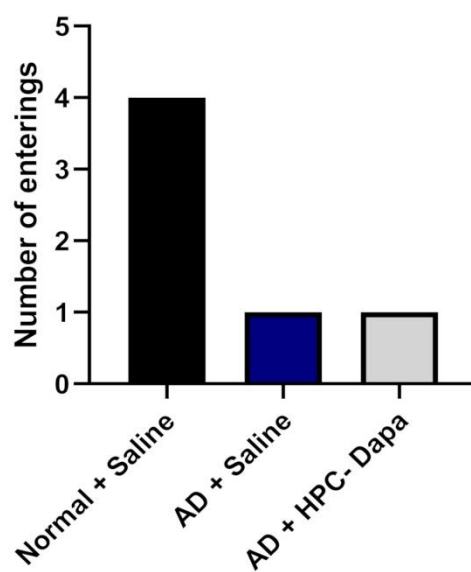
A

Time spent in the novel arm



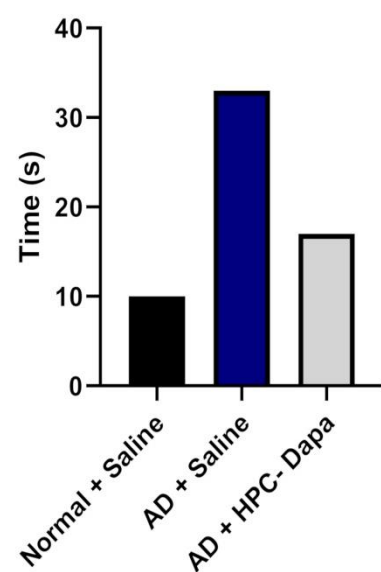
B

Novel arm enterings



C

Latency to enter the novel arm



Εικόνα 29: Οι παράμετροι του Y- maze test οι οποίες αφορούν τα Tg πειραματόζωα. **(Α)** ο χρόνος ο οποίος πέρασαν τα πειραματόζωα στο νέο βραχίονα, **(Β)** ο αριθμός των διελεύσεων από το νέο βραχίονα, **(C)** η καθυστέρηση εισόδου στο νέο βραχίονα.

7. Συζήτηση.

Τις τελευταίες δεκαετίες, πειραματικά δεδομένα τεκμηριώνουν την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ AD και T2DM (146,298). Αυτή η σχέση αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προοπτική για τη διερεύνηση του κατά πόσον οι αντιδιαβητικοί παράγοντες, όπως οι SGLT2i, θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως υποσχόμενες θεραπευτικές επιλογές για την AD (139). Αρκετές προκλινικές και κλινικές μελέτες έχουν καταδείξει αυτό το ενδεχόμενο λόγω της παρουσίας των πρωτεϊνών SGLT2 σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της παρεγκεφαλίδας και του ιππόκαμπου, υποστηρίζοντας περαιτέρω αυτή την άποψη (236,237).

Το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στη ατροφία των δενδριτών, καθώς και την απώλεια δενδριτικών ακανθών στη AD, επηρεάζοντας την ανάπτυξη και τη διατήρηση των δενδριτών και οδηγώντας τελικά σε συναπτική δυσλειτουργία και διαταραχή της νευρωνικής επικοινωνίας (48,299–301). Κατά τα πρώιμα στάδια εξέλιξης της AD, το οξειδωτικό στρες αποτελεί πρωταρχικό τμήμα των προαναφερόμενων νευροπαθολογικών αλλοιώσεων. Γενικά, σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από αυξημένο οξειδωτικό στρες, παρατηρείται μείωση του δενδριτικού πεδίου, ιδιαίτερα στους πιο απομακρυσμένους δενδρίτες, χωρίς σημαντικές επιπτώσεις στο κυτταρικό σώμα (302). Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με τη συσσώρευση του Αβ στα μιτοχόνδρια αλλά και με τη συσσώρευση της Ταυ πρωτεΐνης, οδηγώντας σε μη φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία κατά τα πρώιμα στάδια της παθολογίας της AD (303). Το μιτοχονδριακό δυναμικό, είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική λειτουργία των νευρώνων και την υποστήριξη της νευρωνικής ανάπτυξης και της συναπτικής λειτουργίας (304). Έτσι, η εξασθένηση των μιτοχονδρίων συνοδεύεται από ανεπαρκείς αντιοξειδωτικές ιδιότητες, νευροεκφυλισμό λόγω του οξειδωτικού στρες αλλά και βλάβες στη λειτουργία των νευρώνων (305).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόκληση τοξικότητας και νευρωνικής βλάβης σε κυτταρικές καλλιέργειες για τη διερεύνηση των πιθανών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων και των νευροπροστατευτικών επιδράσεων διάφορων φαρμακολογικών παραγόντων (306–309). Εμείς χρησιμοποιήσαμε υπεροξείδιο του

υδρογόνου για 24 ώρες σε πρωτογενείς καλλιέργειες πυραμιδικών κυττάρων του υποκάμπου, και κατ' αυτό τον τρόπο δημιουργήσαμε ένα έγκυρο *in vitro* μοντέλο του νευροεκφυλισμού που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. Καθολικά για τα πειράματα υιοθετήθηκε μια μη τοξική συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου, η οποία δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των νευρώνων, αποτέλεσμα που επιβεβαιώθηκε και από τη μικροσκοπική παρατήρηση καθώς και τα πειράματα κυτταρικής βιωσιμότητας. Ωστόσο, τόσο οι WT όσο και οι Tg νευρώνες που εκτέθηκαν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσίασαν μείωση του δενδριτικού μήκους και της πυκνότητας των ακανθών. Στατιστική σημαντικότητα παρατηρήθηκε μόνο στην πυκνότητα των ακανθών WT και στο δενδριτικό μήκος Tg, σε σύγκριση με τους νευρώνες της ομάδας ελέγχου. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής και της κυτταρικής βιωσιμότητας, η έκθεση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν προκάλεσε αποπτωτικό ή νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο στους νευρώνες, γεγονός που υποδηλώνει ότι, παρόλο που χρησιμοποιήθηκε μια μη τοξική συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου και η πλειονότητα των καλλιεργούμενων νευρώνων επέζησε, παρατηρήθηκαν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές στους δενδρίτες και τις άκανθες (310,311). Η απώλεια δενδριτικών ακανθών αποτελεί ένα ισχυρό δείκτη γνωστικής εξασθένησης, καθώς οι συνάψεις λαμβάνουν χώρα σε δενδριτικές άκανθες. Από την άλλη πλευρά, η μορφολογία των δενδριτών, όπως το μήκος, είναι καθοριστικής σημασίας για τον σχηματισμό συνάψεων μεταξύ των νευρώνων και τη διατήρησή τους. Ως εκ τούτου, το *in vitro* μοντέλο μας χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της εμπαγλιφλοζίνης, της δαπαγλιφλοζίνης, της σιταγλιπτίνης καθώς και της εγλωβισμένης σε νανομόριο πορώδους άνθρακα δαπαγλιφλοζίνης ως αντιοξειδωτικών και δυνητικώς νευροπροστατευτικών παραγόντων, αξιολογώντας κατά πόσον οι αντιδιαβητικοί αυτοί παράγοντες, μπορούν να περιορίσουν τις μορφολογικές αλλαγές στους νευρώνες που προκαλούνται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που ασχολείται με την επίδραση των SGLT2i αλλά και των DPP-4i σε νευρώνες *in vitro*. Σύμφωνα με τα ευρήματα της κυτταρικής βιωσιμότητας αλλά και της κυτταρομετρίας ροής σε συνδυασμό με τη μικροσκοπική ανάλυση, δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις τοξικότητας ακόμη και με συγκεντρώσεις εμπαγλιφλοζίνης έως και 100 μ M. Σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία σχετικά με τις *in vitro* επιδράσεις της εμπαγλιφλοζίνης σε κύτταρα όπως τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της κοιλιακής αορτής και τα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου του νεφρού, προτιμήσαμε τη προεπώαση 96 ωρών για να προσδιορίσουμε μια μακροπρόθεσμη επίδραση της εμπαγλιφλοζίνης σε πρωτογενείς νευρώνες (312,313). Οι νευρώνες που

προήλθαν τόσο από αρουραίους WT όσο και από αρουραίους Tg και εκτέθηκαν στην εμπαγλιφλοζίνη δεν εμφάνισαν σημαντικές μορφολογικές μεταβολές όσον αφορά το δενδριτικό τους πεδίο, την πυκνότητα των ακανθών και τη διακλάδωση των δενδριτών. Αυτό σημαίνει ότι η εμπαγλιφλοζίνη δεν επηρεάζει αρνητικά ούτε τη βιωσιμότητα ούτε τη μορφολογία των νευρώνων του ιππόκαμπου. Η προεπώαση με εμπαγλιφλοζίνη είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των δενδριτικών αλλοιώσεων που προκλήθηκαν από υπεροξειδίο του υδρογόνου, τόσο στους νευρώνες WT όσο και στους νευρώνες Tg, ιδίως όταν πρόκειται για απώλεια δενδριτικών ακανθών. Τα ευρήματά μας ταυτίζονται με σημαντικό αριθμό στοιχείων που υποστηρίζουν το αντιοξειδωτικό και νευροπροστατευτικό δυναμικό της εμπαγλιφλοζίνης έναντι του οξειδωτικού στρες (249–251,253). Όσον αφορά την AD, οι Hierro Bujalance et al., έδειξαν προηγουμένως ότι η θεραπεία με εμπαγλιφλοζίνη σε ποντίκια APP/PS1x_{db/db} οδήγησε σε βελτίωση της γνωστικής εξασθένησης, μείωση της νευρωνικής απώλειας, των επιπέδων φωσφορυλίωσης Tau και των γεροντικών πλακών (250). Στη μελέτη των Infante-Garcia et al, η αξιολόγηση των δενδριτικών ακανθών και η ανάλυση Sholl σε ποντίκια APP/PS1 και db/db έδειξαν μειωμένη πυκνότητα και αριθμό διατομών, με πιο λεπτομερή αποτελέσματα στα ποντίκια APP/PS1x_{db/db} (314). Η θεραπεία με εμπαγλιφλοζίνη σε διαβητικά ποντίκια μετρίασε τη γνωστική εξασθένηση βελτιώνοντας το οξειδωτικό στρες και αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης του εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα (BDNF) (251). Το μονοπάτι του BDNF θεωρείται ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση του σχηματισμού και της ωρίμανσης των δενδριτικών ακανθών, καθώς και για τη διατήρηση και την πλαστικότητα των ώριμων ακανθών (315). Επιπλέον, ασκεί νευροπροστατευτική δράση στους νευρώνες υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες και η μειωμένη έκφρασή του σχετίζεται με παθήσεις του εγκεφάλου, όπως η AD.

Όταν συγκρίναμε τους νευρώνες της πρωτογενούς καλλιέργειας που προέρχονται από νεογέννητους αρουραίους WT και Tg, παρατηρήσαμε μόνο ήπιες διαφορές, οι οποίες είναι αναμενόμενες, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι αρουραίοι TgF344-AD αναπτύσσουν παθολογία AD που σχετίζεται με την ηλικία (50,52,289). Οι δύο ομάδες εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών αλλά όχι στο μήκος των δενδριτών, υποδεικνύοντας την επίδραση της μετάλλαξης στη μορφολογία των νευρώνων και τη συναπτική λειτουργία ακόμη και κατά την πρώιμη μεταγεννητική περίοδο. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφορά στην απόκριση στο υπεροξειδίο του υδρογόνου, με τους νευρώνες Tg να επιδεικνύουν μεγαλύτερη ευπάθεια και να εμφανίζουν πιο έντονες δενδριτικές και συναπτικές αλλοιώσεις.

Ένας άλλος SGLT2i, η δαπαγλιφλοζίνη, βιβλιογραφικά φαίνεται να οδηγεί σε βελτίωση της συναπτικής πλαστικότητας του ιππόκαμπου σε παχύσαρκους αρουραίους οι οποίοι έλαβαν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (253). Ομοίως, σε διαβητικά ποντίκια, η μονοθεραπεία με δαπαγλιφλοζίνη ανέστρεψε τη διαταραχή της μνήμης και βελτίωσε τη γνωστική λειτουργία (254). Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, της οποίας το δεύτερο σκέλος επικεντρώθηκε στην εξέταση του αντιδιαβητικού αυτού παράγοντα σε πυραμιδικούς νευρώνες, απομονωμένους από αρουραίους WT, στα ευρήματα τα οποία αφορούσαν στη βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων καθώς και στον διαχωρισμό του αποπτωτικού και νεκρωτικού πληθυσμού, όπως και με την εμπαγλιφλοζίνη, δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις τοξικότητας μετά από επώαση 96 ωρών με τη χαμηλότερη δυνατή συγκέντρωση δαπαγλιφλοζίνης (10μM) αλλά και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στο επίπεδο όμως των μορφολογικών αλλαγών και πιο συγκεκριμένα στην παράμετρο του μήκους των δενδριτών, τα αποτελέσματά μας, ήρθαν σε συμφωνία με αυτά της εμπαγλιφλοζίνης, καθώς το υπεροξείδιο του υδρογόνου, μείωσε στατιστικώς σημαντικά το μήκος των δενδριτών, ενώ η προεπώαση με δαπαγλιφλοζίνη αντέστρεψε σημαντικά την επίδραση του οξειδωτικού στρες. Επίσης ο μέσος αριθμός των διατομών κατά την ανάλυση Sholl, μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε γίνει επώαση μόνο με υπεροξείδιο του υδρογόνου και αυτών στα οποία είχε προστεθεί ο αντιδιαβητικός παράγοντας, κατέδειξε μεγαλύτερη πολυπλοκότητα δενδριτικού πεδίου στα νευρικά κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με δαπαγλιφλοζίνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου σε μέση απόσταση αλλά και μακρυνή απόσταση από το κυτταρικό σώμα. Όσον αφορά την πυκνότητα των δενδριτικών ακανθών, μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, σε όλες τις πειραματικές παραμέτρους, με μια ήπια αντιστροφή στα εκτεθειμένα στο οξειδωτικό στρες κύτταρα στα οποία προστέθηκε η δαπαγλιφλοζίνη.

Επιπλέον πειράματα έλαβαν χώρα με την εγλωβισμένη σε νανοϋλικό πορώδους άνθρακα δαπαγλιφλοζίνη με στόχο να εξεταστούν οι νευροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Όπως και κατά τη διάρκεια των προηγούμενων πειραματικών διαδικασιών, έτσι και στην προκειμένη περίπτωση, προκρίθηκε για τη συνέχεια των πειραμάτων η συγκέντρωση του νανοϋλικού, η οποία αντιστοιχεί στα 10μM δαπαγλιφλοζίνης και η οποία φάνηκε να μην επηρεάζει το επίπεδο της κυτταρικής βιωσιμότητας, κατά την επώαση των κυττάρων είτε με το νανομόριο είτε κατά το συνδυασμό με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Όπως και η ελεύθερη μορφή της δαπαγλιφλοζίνης, έτσι και το νανομόριο, στην επιλεγμένη συγκέντρωση, φαίνεται να μην επηρεάζει αρνητικά ούτε τη βιωσιμότητα των κυττάρων αλλά ούτε και να επάγει την απόπτωση και τη νέκρωση σε πρωτογενείς νευρώνες

υποκάμπου. Κατά συνέπεια, ακόμη και στην εγκλωβισμένη της μορφή, η δαπαγλιφλοζίνη δεν παρουσιάζει τοξική επίδραση στα κύτταρα του υποκάμπου, ούτε επάγει αποπτωτικό και νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο στη συγκέντρωση των 10μM.

Θεωρούμε ότι, η δαπαγλιφλοζίνη επηρεάζει σημαντικά το μονοπάτι του BDNF και της συναπτικής λειτουργίας, καθώς όπως φαίνεται κι από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρουσιάζει κι αυτή νευροπροστατευτική δράση μέσω της μείωσης του οξειδωτικού στρες όπως γίνεται φανερό από επιπλέον ερευνητικά δεδομένα. Οι SGLT2i μειώνουν τη γνωστική εξασθένηση μέσω της αποκατάστασης των επιπέδων των νευροτροφινών, της διαμόρφωσης της νευροφλεγμονώδους σηματοδότησης και της γονιδιακής έκφρασης των *SNCA*, *BDNF* και *APP* στον εγκέφαλο των διαβητικών ποντικών. Η στόχευση των προαναφερθέντων γονιδίων θεωρείται σήμερα ως μία από τις πλέον υποσχόμενες και ανεπτυγμένες θεραπευτικές στρατηγικές για ασθένειες που σχετίζονται με γνωστική δυσλειτουργία (316).

Παρά τις γνωστές νευροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες ορισμένων αντιδιαβητικών φαρμάκων της κατηγορίας DPP-4i, παρατηρήθηκε σημαντική τοξικότητα και μείωση της επιβίωσης των νευρικών κυττάρων σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με αυτούς τους παράγοντες. Ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, οι παρατηρούμενες επιπτώσεις οδήγησαν στην απόφαση να αποκλειστεί η περαιτέρω μελέτη του εν λόγω παράγοντα στα πλαίσια των επόμενων πειραμάτων. Το εύρημα αυτό ταυτίζεται με βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν ότι ο συγκεκριμένος αντιδιαβητικός παράγοντας, παρά τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις του ιδιότητες, αυξάνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Ταυ πρωτεΐνης, ενός από τα χαρακτηριστικά της AD (185).

Κατά το δεύτερο σκέλος της παρούσας διατριβής, το οποίο περιελάμβανε τις *in vivo* πειραματικές διαδικασίες, οι αντιδιαβητικοί παράγοντες οι οποίοι προκρίθηκαν προς χρήση, είναι η δαπαγλιφλοζίνη και η εγκλωβισμένη σε νανοϋλικό πορώδους άνθρακα δαπαγλιφλοζίνη (HPC- Dapa). Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα που αφορούσε στις *in vivo* πειραματικές διαδικασίες, υπήρχαν οι ομάδες WT αρουραίων στους οποίους προκλήθηκε παθολογία AD με τη χρήση $AlCl_3$ ως μοντέλο της νόσου, καθώς και οι διαγονιδιακοί αρουραίοι, και οι οποίοι είχαν αναπτύξει την παθολογία της νόσου. Η κατανάλωση Al μπορεί να προκαλέσει εναποθέσεις β- αμυλοειδούς στα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς και να αυξήσει την ποσότητα της πρόδρομης πρωτεΐνης αμυλοειδούς (APP), καθιστώντας την πιθανό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της AD.

Στις ομάδες των WT για την αξιολόγηση των νευροπροστατευτικών τους ιδιοτήτων, παράλληλα με το $AlCl_3$ χορηγήθηκε δαπαγλιφλοζίνη καθώς και HPC- Dapa, ενώ στα διαγονιδιακά μόνο HPC- Dapa. Αναφορικά με την πρώτη πειραματική διαδικασία, αυτή του

MWM test, και συγκεκριμένα κατά τις πρώτες τέσσερις ημέρες, δηλαδή το στάδιο της εξοικείωσης, φαίνεται η ομάδα των WT κάτω από όλες τις συνθήκες, μειώνει τον χρόνο τον οποίο χρειάζεται ώστε να προσεγγίσει την πλατφόρμα. Εν αντιθέσει με τα Tg πειραματόζωα, στα οποία το Control το οποίο δεν έφερε τη μετάλλαξη η οποία είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη της νόσου και εκείνο το οποίο έλαβε θεραπεία με HPC- Dapa και έφερε τη μετάλλαξη, φαίνεται να μειώνουν τους χρόνους προσέγγισης της πλατφόρμας ενώ εκείνο το οποίο φέρει τη νόσο και δεν έλαβε θεραπεία φαίνεται να αυξάνει τον χρόνο. Τα αποτελέσματα αυτά δεν αξιολογούνται καθώς κατά το στάδιο αυτό τα πειραματόζωα αφήνονται να κολυμπήσουν προς την πλατφόρμα από όλες τις πιθανές θέσεις εισόδου. Επομένως στο στάδιο αυτό αναμένεται να δυσκολευτούν στην προσέγγιση της πλατφόρμας καθώς υπάρχουν πολλές διαφορετικές συνιστώσες της δοκιμασίας που δεν αφορούν τη χωρική μνήμη όπως το σχετιζόμενο με την δοκιμασία άγχος, η κατανόηση των κανόνων της δοκιμασίας αλλά και η αντίληψη, ότι υπάρχει τρόπος διαφυγής από την διαδικασία. Οι τέσσερις πρώτες ημέρες, «διδάσκουν» στα ζώα αυτές τις ιδιότητες της δοκιμασίας. Μαθαίνουν ότι θα τοποθετηθούν σε μια δεξαμενή με χλιαρό νερό και θα κολυμπήσουν για δύο λεπτά, αλλά μετά θα απομακρυνθούν. Μαθαίνουν να βρίσκουν την πλατφόρμα και ότι η παραμονή σε αυτήν θα οδηγήσει στην «διαφυγή» τους από τον λαβύρινθο. Επιπλέον διδάσκονται ότι η διαδικασία αυτή έχει τέλος. Μετά το τέλος του σταδίου εξοικείωσης, και συγκεκριμένα κατά την πέμπτη ημέρα και αφού η πλατφόρμα αφαιρέθηκε, ξεκινά η διαδικασία αξιολόγησης των παραμέτρων. Όσον αφορά τα WT πειραματόζωα, η πρώτη παράμετρος η οποία αφορούσε το μέσο χρόνο τον οποίο το εκάστοτε πειραματόζωο παρέμεινε στο τεταρτημόριο στο οποίο ήταν τοποθετημένη η πλατφόρμα, φαίνεται ότι τον καλύτερο χρόνο έκανε η ομάδα στην οποία είχε προκληθεί η νόσος και έλαβε θεραπεία με δαπαγλιφλοζίνη, ενώ έναν από τους υψηλότερους χρόνους παρουσιάζει η ομάδα στην οποία έχει χορηγηθεί $AlCl_3$. Παρόλα αυτά το αναμενόμενο θα ήταν στη συγκεκριμένη παράμετρο η ομάδα ελέγχου να παρουσιάζει υψηλότερους χρόνους.

Η επόμενη παράμετρος ήταν εκείνη του αριθμού των διελεύσεων από το τεταρτημόριο στόχο, όπου όπως είναι φυσιολογικό, όλες οι ομάδες με εξαίρεση εκείνη οποία είχε αναπτύξει γνωστικά ελλείμματα, διέρχονται περισσότερες φορές από το συγκεκριμένο σημείο. Η τελευταία παράμετρος, αυτή της καθυστέρησης της εισόδου στο τεταρτημόριο της πλατφόρμας, παρουσίασε κι αυτή φυσιολογική εικόνα καθώς η ομάδα ελέγχου επέδειξε χαμηλότερο χρόνο καθυστέρησης μαζί με την ομάδα της νόσου που είχε λάβει θεραπεία με δαπαγλιφλοζίνη. Για να μπορέσουμε όμως να έχουμε μια σφαιρική εικόνα της δράσης των

αντιδιαβητικών παραγόντων αλλά και της νευροτοξικότητας της οποίας προκάλεσε το AlCl_3 ακολούθησε και δεύτερη συμπεριφορική δοκιμασία, αυτή του Y- maze test.

Η πρώτη παράμετρος που αξιολογήθηκε για την ομάδα των WT πειραματόζων ήταν ο χρόνος τον οποίο περνάνε εντός του νέου βραχίονα. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ούτε εδώς αναμενόμενα, καθώς παρά το γεγονός ότι η ομάδα στην οποία είχε προκληθεί νευροτοξικότητα, πέρασε λιγότερο χρόνο στο νέο βραχίονα, και οι ομάδες θεραπείας, υψηλούς χρόνους οι οποίοι είναι το ζητούμενο στην παρούσα συμπεριφορική δοκιμή, η ομάδα ελέγχου εμφάνισε χαμηλούς χρόνους ακριβώς όπως το μοντέλο νευροτοξικότητας. Στην επόμενη όμως παράμετρο φαίνεται τα αποτελέσματα να κανονικοποιούνται, καθώς η ομάδα ελέγχου αλλά κι εκείνες που έλαβαν θεραπεία, εισέρχονται περισσότερες φορές στο νέο βραχίονα εν αντιθέσει με το μοντέλο της νόσου το οποίο ήταν εμφανώς χαμηλότερο. Αναμενόμενα ήταν και τα αποτελέσματα της παραμέτρου της καθυστέρησης της εισόδου στο νέο βραχίονα, όπου οι ομάδες ελέγχου και θεραπείας, είχαν εμφανώς μικρότερους χρόνους συγκριτικά με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε AlCl_3 . Τέλος η ποσοστιαία αναγωγή των ομάδων των πειραματόζων τα οποία έχουν ως πρώτη επιλογή την είσοδο στο νέο βραχίονα, παρουσίασε ποσοστά άνω του 65% για την ομάδα ελέγχου αλλά και της ομάδας η οποία έλαβε θεραπεία με τον αντιδιαβητικό παράγοντα. Η ομάδα του HPC- Dapa, κατέδειξε κι εκείνη ποσοστό άνω του 30%, ενώ η ομάδα της νόσου προσέγγισε σε ποσοστό το 0%.

Αντιφατικά υπήρξαν και τα αποτελέσματα για τις παραμέτρους οι οποίες ελέγχθηκαν για τα πειραματόζωα τα οποία ήταν φορείς της νόσου κι όπως προαναφέρθηκε, φέρουν τη μετάλλαξη η οποία προιούσης της ηλικίας προκαλεί γνωστικά ελλείμματα. Αναφορικά με τις παραμέτρους τις οποίες ελέγξαμε, αυτές παραμένουν ακριβώς ίδιες με εκείνες τις οποίες αξιολογήσαμε και στα WT πειραματικά μοντέλα, παρατηρήθηκε ότι στο MWM test, το control αλλά και εκείνο το πειραματόζωο το οποίο είχε αναπτύξει τη νόσο εμφάνισαν περίπου τους ίδιους χρόνους στο τεταρτημόριο στόχο, ενώ το αναμενόμενο θα ήταν το control να παραμείνει περισσότερο. Το πειραματόζωο το οποίο έλαβε θεραπεία με την εγκλωβισμένη μορφή του αντιδιαβητικού παράγοντα, παρουσίασε αισθητά μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στο τεταρτημόριο της πλατφόρμας. Ο αριθμός διελεύσεων από το τεταρτημόριο στόχο φαίνεται να είναι πολύ μεγαλύτερος στο control πειραματόζωο, χαμηλότερος σε εκείνο το οποίο έφερε τη νόσο και αισθητά χαμηλός σε εκείνο το οποίο έλαβε θεραπεία, το οποίο δε συνάδει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Η παράμετρος της καθυστέρησης εισόδου στο τεταρτημόριο της πισίνας, στο οποίο υπήρχε η πλατφόρμα, φαίνεται να ακολουθεί τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς το control καθυστερεί λιγότερο στην προσέγγιση του στόχο, ο φορέας της νόσου, καθυστερεί αισθητά να πλησιάσει στο στόχο, ενώ το

πειραματόζωο το οποίο έλαβε θεραπεία, παρά το γεγονός ότι έφερε τη νόσο, προσέγγισε το τεταρτημόριο της πλατφόρμας σε χρόνο σχεδόν όσο εκείνον του control. Για να μπορέσουμε όμως να οδηγηθούμε σε ασφαλές συμπέρασμα, ακολούθησε ξανά το Y- maze test. Αντίστοιχα ήταν κι εδώ τα αποτελέσματα, καθώς φαίνεται ότι ο χρόνος που περνούν στο νέο βραχίονα φαίνεται να είναι μεγαλύτερος για το πειραματόζωο φορέα της νόσου και χαμηλότερος για τις άλλες δύο κατηγορίες πειραματοζώων. Τα αποτελέσματα για τον αριθμό των εισόδων στο νέο βραχίονα είναι υψηλότερος όπως είναι λογικό στο control αλλά στα ίδια επίπεδα για τις δύο άλλες κατηγορίες. Ενώ για την τελευταία παράμετρο, τα αποτελέσματα φαίνεται να συνάδουν με το αναμενόμενο, καθώς το control καθυστερεί λιγότερο στην είσοδο στο νέο βραχίονα, αμέσως μετά ακολουθεί εκείνο το οποίο έχει λάβει θεραπεία, ενώ τη μεγαλύτερη καθυστέρηση παρουσίασε το πειραματόζωο το οποίο νοσεί. Μετά την ποσοστιαία κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, το control αλλά και το πειραματόζωο το οποίο έλαβε θεραπεία, φαίνεται να προτιμούν καθ' ολοκληρίαν ως πρώτη επιλογή εισόδου το νέο βραχίονα σε αντίθεση με τον αρουραίο ο οποίος παρουσίαζε γνωστικά ελλείμματα εξ' αιτίας της νόσου. Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι και η δαπαγλιφλοζίνη αλλά και το νανομόριό της δείχνει να παρουσιάζει μια ήπια αναστροφή της γνωστικής εξασθένησης.

Η αντιφατικότητα και η ανομοιογένεια των αποτελεσμάτων ενδεχομένως να οφείλεται σε παράγοντες οι οποίοι δεν είναι άμεσα συνδεδεμένοι με νόσο, αλλά με την θεραπεία την οποία έλαβαν οι ομάδες των πειραματοζώων καθώς και με τον χειρισμό μέσω του οποίου πραγματοποιήθηκαν οι παραπάνω διαδικασίες. Θεωρούμε λοιπόν ότι η ανομοιογένεια αυτή μπορεί να προκληθεί λόγω της ηλικίας των πειραματοζώων, καθώς στην πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών τα πειραματικά μοντέλα ήταν ηλικίας μεταξύ 3- 4 μηνών, ενώ τα πειραματόζωα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, προσέγγιζαν ηλικιακά τους 16- 18 μήνες γεγονός το οποίο θεωρούμε ότι έπαιξε σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα που αναλύσαμε παραπάνω (298). Επιπλέον η χορήγηση του $AlCl_3$, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, έπρεπε να έχει διάρκεια 60 ημερών ώστε να αναπτυχθούν τα γνωστικά ελλείμματα και η παθολογία της AD (317). Η χορήγηση $AlCl_3$ στην προκειμένη περίπτωση, διήρκησε 45 ημέρες, καθώς αρκετά από τα πειραματικά μας μοντέλα παρουσίασαν δύσπνοια και ρινικές πυώδεις εκκρίσεις, επομένως το $AlCl_3$ δεν πρόλαβε να δημιουργήσει τα γνωστικά ελλείμματα για τα οποία εξ' αρχής χρησιμοποιήθηκε.

Επιπλέον η από του στόματος χορήγηση μέσω καθετήρα η οποία χρησιμοποιείται συνήθως στην προκλινική αξιολόγηση φαρμάκων, μπορεί δυνητικά να προκαλέσει συμπεριφορικές επιδράσεις ανεξάρτητες από τις υπό εξέταση ενώσεις. Η επαναλαμβανόμενη από του στόματος χορήγηση ενδεχομένως να επάγει συμπεριφορά η

οποία ομοιάζει με άγχος και η οποία προκαλεί αλλοιώσεις στις συμπεριφορικές δοκιμασίες (318).

Όσον αφορά την χορήγηση των φαρμακευτικών παραγόντων, εκεί παρατηρήθηκε παρόμοια δραστικότητα μεταξύ της ελεύθερης αλλά και της εγλωβισμένης δαπαγλιφλοζίνης. Η αποτελεσματικότητά τους ίσως παραμένει μειωμένη, καθώς παρά το γεγονός ότι ο συμμεταφορέας βρίσκεται σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου και διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, η διαθεσιμότητα στον εγκέφαλο να παραμένει μειωμένη καθώς η από του στόματος χορήγηση οδηγεί σε χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της ουσίας στον οργανισμό λόγω της χαμηλής της διαλυτότητας και σταθερότητας (319,320). Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και με την εγλωβισμένη μορφή της δαπαγλιφλοζίνης, καθώς το νανομόριο παρουσιάζει ευαισθησία στις αλλαγές του pH κι έτσι έχει την ιδιότητα να απελευθερώνει την ουσία κατά την επαφή του με το γαστρικό υγρό, επομένως η βιοδιαθεσιμότητα της ουσίας στον εγκέφαλο είναι και στην περίπτωση αυτή χαμηλή. Τα τελευταία χρόνια η προσπάθεια για τον υπερκερασμό αντίστοιχων προβλημάτων είναι ο διαφορετικός τρόπος χορήγησης του εκάστοτε φαρμακευτικού παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα ο φαρμακευτικός παράγοντας εγκλωβίζεται σε νανομόρια και στη συνέχεια χορηγείται ενδορρινικά στα πειραματικά μοντέλα, αποκαλύπτοντας αυξημένη διαπερατότητα διαμέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, χαμηλό ηπατικό μεταβολισμό, αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα στον εγκέφαλο (284,321).

Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα υποστηριζόμενα από μοριακές τεχνικές ώστε να διευκρινιστεί πλήρως η ακριβής επίδραση της εμπαγλιφλοζίνης αλλά και της δαπαγλιφλοζίνης αλλά και των πολλά υποσχόμενων νανοσωματιδίων στα κύτταρα του εγκεφάλου.

8. Συμπεράσματα.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή, είχε ως στόχο να διερευνήσει κατά πόσον η εμπαγλιφλοζίνη ή δαπαγλιφλοζίνη καθώς και η εγλωβισμένη σε νανομόριο πορώδους άνθρακα δαπαγλιφλοζίνη, δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιδιαβητικά φάρμακα, θα μπορούσαν να αποτελέσουν αξιόπιστους υποψηφίους για τη διαχείριση νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως η AD. Για να μιμηθούμε τα πρώιμα στάδια της παθολογίας της AD *in vitro*, δημιουργήσαμε ένα μοντέλο εκθέτοντας νευρώνες σε υπεροξείδιο του υδρογόνου για να προκαλέσουμε μορφολογικές αλλοιώσεις. Αξιολογήσαμε περαιτέρω την επίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων στους δενδρίτες. Η προεπώαση με τα αντιδιαβητικά φάρμακα διέσωσε την απώλεια δενδριτικών ακανθών και μετρίασε τη μείωση του δενδριτικού μήκους τόσο σε WT όσο και σε Tg νευρώνες που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η βελτίωση των επαγόμενων νευροπαθολογικών αλλαγών με τη χρήση των αντιδιαβητικών φαρμάκων αναδεικνύει την πιθανή επίδρασή τους στη συναπτική λειτουργία, μια κρίσιμη πτυχή που εξαρτάται από τους δενδρίτες, οι οποίοι διαταράσσονται στις νευροεκφυλιστικές νόσους. Επιπλέον φαίνεται να βελτίωσε τη πλειοψηφία των παραμέτρων που προσμετρήθηκαν στις συμπεριφορικές δοκιμασίες, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι οι παράγοντες αυτοί βελτιώνουν τη συναπτική λειτουργία και μπορούν να αποτελέσουν το εφαλτήριο για τη στροφή της επιστημονικής κοινότητας σε νέους τρόπους αντιμετώπισης των νευροεκφυλιστικών νόσων. Απαιτείται όμως περαιτέρω διερεύνηση για τη διαλεύκανση των επιδράσεων των παραγόντων αυτών στην παθολογία της AD, προωθώντας έτσι την κατανόησή μας και προσδιορίζοντας πιθανές θεραπευτικές στρατηγικές.

9. Περίληψη.

Η AD είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος αγνώστου αιτιολογίας, η οποία εκτιμάται ότι προκαλεί άνοια σε περισσότερα από 25 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Το αυξημένο προσδόκιμο ζωής και οι αλλαγές στον τρόπο ζωής αναμένεται να αυξήσουν τον αριθμό των ασθενών που θα προσβληθούν από τη AD κατά τις επόμενες δεκαετίες. Η νόσος έχει καταστροφικές συνέπειες για τους ασθενείς, τις οικογένειές τους και τους φροντιστές τους, προκαλώντας επίσης μεγάλη επιβάρυνση για την κοινωνία (322).

Η AD χαρακτηρίζεται από άνοια που συνήθως αρχίζει με ανεπαίσθητη και ελάχιστα αναγνωρίσιμη ανεπάρκεια της μνήμης (συχνά ονομάζεται ήπια γνωστική εξασθένηση) και σιγά-σιγά γίνεται πιο σοβαρή και, τελικά, οδηγεί σε πλήρη ανικανότητα. Άλλα ευρήματα της νόσου περιλαμβάνουν σύγχυση, κακή κρίση, γλωσσικές διαταραχές, οπτικά συμπτώματα, διέγερση, και ψευδαισθήσεις. Η τυπική διάρκεια της νόσου είναι οκτώ έως δέκα έτη (323).

Η διάγνωση της νόσου βασίζεται επί του παρόντος στα κλινικά συμπτώματα της αργά εξελισσόμενης άνοιας, στα νευροαπεικονιστικά ευρήματα της ατροφίας του εγκεφαλικού φλοιού, αποκλείοντας άλλες πιθανές αιτίες άνοιας. Μελέτες όπως η απεικόνιση με PET και οι συγκεντρώσεις αμυλοειδούς και tau στο εγκεφαλονοτιαίο υγρό ή στο πλάσμα δεν χρησιμοποιούνται ακόμη συστηματικά στην καθ' ημέρα κλινική πρακτική, αλλά μπορούν να αυξήσουν τη διαγνωστική ακρίβεια σε πρώιμα στάδια της νόσου και επί του παρόντος, χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές.

Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία η οποία μπορεί να σταματήσει ή να καθυστερήσει τον εκφυλισμό που προκαλεί η AD. Επομένως, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών παραγόντων για τη θεραπεία της νόσου και προς αυτή την κατεύθυνση καταβάλλεται παγκοσμίως μεγάλη ερευνητική προσπάθεια. Πρόσφατες εργασίες, τόσο κλινικές όσο και πειραματικές, δείχνουν ότι οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές εμφανίζουν συνυπάρχουσα μεταβολική δυσλειτουργία, η οποία μπορεί να επιδεινώσει τα νευρολογικά συμπτώματα. Επιδημιολογικές μελέτες αλλά και αποτελέσματα που έχουν προκύψει από ζωικά μοντέλα υποδηλώνουν σύνδεση μεταξύ της αντίστασης στην ινσουλίνη με την αποκλίνουσα εγκεφαλική ομοιόσταση της ινσουλίνης και την εμφάνιση της παθολογίας της AD, όπως οι πλάκες Αβ και οι νευροϊνδιακοί κόμβοι Tau. Είναι εύλογο λοιπόν, ότι τα μεταβολικά μονοπάτια μπορεί να αποτελέσουν υποσχόμενους θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών νόσων (324,325).

Μια πληθώρα φαρμακευτικών παραγόντων έχουν ήδη δοκιμαστεί ή προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές, στοχεύουν σε μεταβολικούς παράγοντες όπως η ινσουλίνη, ένα πεπτίδιο

που εκκρίνεται από τα β κύτταρα του παγκρέατος και παίζει σημαίνοντα ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης στους περιφερικούς ιστούς. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η ινσουλίνη επηρεάζει ποικίλες εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως η ενίσχυση της βιωσιμότητας των νευρικών συνάψεων, επηρεάζοντας τη βιοδιαθεσιμότητα της γλυκόζης (326,327).

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε διάφορες χρόνιες παθολογικές καταστάσεις, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο και βλάβες. Η νόσος του Alzheimer (AD) και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (T2DM) χαρακτηρίζονται και οι δύο από αυξημένο οξειδωτικό στρες, φλεγμονή, αντίσταση στην ινσουλίνη και δυσλειτουργία της αυτοφαγίας. Δεδομένων των κοινών παθοφυσιολογικών χαρακτηριστικών τους, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη διερεύνηση αντιδιαβητικών φαρμάκων ως πιθανών παραγόντων για την πρόληψη και/ή τη θεραπεία της AD. Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο να διαφωτίσει τους κυτταρικούς μηχανισμούς δράσης των αντιδιαβητικών παραγόντων στο νευρικό σύστημα και να ενισχύσει τις ιδιότητές τους για χρήση κατά της AD.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αντιδιαβητικοί παράγοντες νέας γενιάς (SGLT2i) έχουν ευεργετική δράση απέναντι στις μορφολογικές αλλοιώσεις οι οποίες προκαλούνται υπό την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

9. Abstract.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease of unknown etiology, estimated to cause dementia in more than 25 million people worldwide. Increased life expectancy and lifestyle changes are expected to increase the number of patients affected by AD during the following decades. The disease has a devastating impact on the patients and their families and caregivers, producing also a large burden for the society.

AD is characterized by dementia that typically begins with subtle and poorly recognized failure of memory (often called mild cognitive impairment) and slowly becomes more severe and, eventually, incapacitating. Other disease findings include confusion, poor judgment, language disturbance, visual complaints, agitation, withdrawal, and hallucinations. The typical duration of the disease is eight to ten years.

The diagnosis of AD is currently based on clinical signs of slowly progressive dementia, with neuroimaging findings of gross cerebral cortical atrophy, excluding other possible causes of dementia. Studies such as PET imaging and CSF or plasma concentrations of amyloid and tau are not yet routinely implicated in the everyday clinical practice, but they can increase the diagnostic accuracy in early stages of the disease and they are used in clinical trials.

However, until today, there is no treatment that can stop or delay the degeneration caused by AD. Therefore, there is an urgent need to develop new pharmaceutical agents for the treatment of the disease and in this direction a great research effort is being made worldwide. Recent work, both clinical and experimental, indicates that neurodegenerative disorders display a coexisting metabolic dysfunction which may exacerbate neurological symptoms. Epidemiological studies and results obtained from animal models suggest a link between insulin resistance with aberrant cerebral insulin homeostasis and the appearance of AD pathology, such as A β plaques and Tau neurofibrillary tangles. It stands to reason therefore that metabolic pathways may themselves contain promising therapeutic targets for neurodegenerative diseases.

A variety of drugs that have been already tested or advanced in clinical trials, target metabolic factors such as insulin, a peptide that is secreted by pancreatic β cells and plays the most important role in regulating glucose metabolism in peripheral tissues. Recent research shows that insulin affects a variety of brain activities, such as enhancing the viability of neural synapses affecting glucose bioavailability. The proposed project aims to shed light on the cellular mechanisms of action of antidiabetic factors on the nervous system and enhance their properties for use against Alzheimer's disease (AD).

Oxidative stress has been implicated in several chronic pathological conditions, leading to cell death and injury. Alzheimer's disease (AD) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are both characterized by increased oxidative stress, inflammation, insulin resistance, and autophagy dysfunction. Given their common pathophysiological features, there is growing interest in exploring antidiabetic drugs as potential candidates for AD prevention and/or therapy. The results revealed that new generation antidiabetic agents (SGLT2i) exert a beneficial influence on the morphological alterations induced by hydrogen peroxide.

10. Βιβλιογραφία

1. Hippus H, Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* [Internet]. 2003 Mar 31;5(1):101–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.31887/DCNS.2003.5.1/hhippius>
2. Dahm R. Alzheimer's discovery. *Curr Biol* [Internet]. 2006 Nov;16(21):R906–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982206022895>
3. Yang HD, Kim DH, Lee SB, Young LD. History of Alzheimer's Disease. *Dement Neurocognitive Disord* [Internet]. 2016;15(4):115. Available from: <https://dnd.or.kr/DOIx.php?id=10.12779/dnd.2016.15.4.115>
4. Wu Y-T, Fratiglioni L, Matthews FE, Lobo A, Breteler MMB, Skoog I, et al. Dementia in western Europe: epidemiological evidence and implications for policy making. *Lancet Neurol* [Internet]. 2016 Jan;15(1):116–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442215000927>
5. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* [Internet]. 2018 Jan 19;25(1):59–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ene.13439>
6. LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* [Internet]. 2005 Apr;11(4):170–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491405000511>
7. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* [Internet]. 2020 Dec 8;25(24):5789. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/24/5789>
8. Gilbert PE, Brushfield AM. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: A process oriented behavioral assessment. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2009 Aug;33(5):774–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584609001158>
9. Anand K, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol* [Internet]. 2012;15(4):239. Available from: <https://journals.lww.com/10.4103/0972-2327.104323>
10. Small SA, Schobel SA, Buxton RB, Witter MP, Barnes CA. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2011 Oct 7;12(10):585–601. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn3085>

11. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2021 May 13;7(1):33. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41572-021-00269-y>
12. Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* [Internet]. 2010;3(1):1. Available from: <http://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/alzrt59>
13. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol* [Internet]. 2011 Mar;10(3):241–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442210703252>
14. Escott-Price V, Sims R, Bannister C, Harold D, Vronskaya M, Majounie E, et al. Common polygenic variation enhances risk prediction for Alzheimer's disease. *Brain* [Internet]. 2015 Dec;138(12):3673–84. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awv268>
15. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The Association Between Quantitative Measures of Dementia and of Senile Change in the Cerebral Grey Matter of Elderly Subjects. *Br J Psychiatry* [Internet]. 1968 Jul 29;114(512):797–811. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S000712500009958X/type/journal_article
16. Näslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, et al. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1994 Aug 30;91(18):8378–82. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.91.18.8378>
17. Lee VM-Y, Balin BJ, Otvos L, Trojanowski JQ. A68: a Major Subunit of Paired Helical Filaments and Derivatized Forms of Normal Tau. *Science* (80-) [Internet]. 1991 Feb 8;251(4994):675–8. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1899488>
18. Haass C, Hung A, Selkoe D. Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* [Internet]. 1991 Dec 1;11(12):3783–93. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.11-12-03783.1991>
19. Jucker M, Beyreuther K, Haass C, Nitsch RM, Christen Y, editors. *Alzheimer: 100 Years and Beyond* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-37652-1>

20. Hardy J, Selkoe DJ. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* (80-) [Internet]. 2002 Jul 19;297(5580):353–6. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1072994>
21. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the Pathologic Process in Alzheimer Disease: Age Categories From 1 to 100 Years. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2011 Nov;70(11):960–9. Available from: <https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1097/NEN.0b013e318232a379>
22. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* [Internet]. 1991 Apr;6(4):487–98. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0896627391900522>
23. Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Arch Med Res* [Internet]. 2001 Sep;32(5):367–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0188440901003162>
24. Boron, W.F. and Boupaep EL. *Medical Physiology*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.
25. Casares D, Escribá P V., Rosselló CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 May 1;20(9):2167. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2167>
26. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Feb;9(2):112–24. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm2330>
27. Molleman A. *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology*. JW; 2002.
28. Luo L. *Principles of Neurobiology* [Internet]. Second edition. | Boca Raton : Garland Science, 2020.: Garland Science; 2020. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781000096804>
29. Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* [Internet]. 1949 Mar;108(1):37–77. Available from: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.1949.sp004310>
30. Tasaki I, Hagiwara S. DEMONSTRATION OF TWO STABLE POTENTIAL STATES IN THE SQUID GIANT AXON UNDER TETRAETHYLAMMONIUM CHLORIDE. *J Gen Physiol* [Internet]. 1957 Jul 20;40(6):859–85. Available from:

- <https://rupress.org/jgp/article/40/6/859/30377/DEMONSTRATION-OF-TWO-STABLE-POTENTIAL-STATES-IN>
31. Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* [Internet]. 1990 May 22;295(4):580–623. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.902950407>
 32. Buzsáki G. Two-stage model of memory trace formation: A role for “noisy” brain states. *Neuroscience* [Internet]. 1989 Jan;31(3):551–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306452289904235>
 33. Maccaferri G, David J, Roberts B, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P. Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* [Internet]. 2000 Apr;524(1):91–116. Available from: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-3-00091.x>
 34. Altman J, Brunner RL, Bayer SA. The hippocampus and behavioral maturation. *Behav Biol* [Internet]. 1973 May;8(5):557–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091677373801440>
 35. Zeng H, Sanes JR. Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2017 Sep 3;18(9):530–46. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn.2017.85>
 36. Moolman DL, Vitolo O V., Vonsattel J-PG, Shelanski ML. Dendrite and dendritic spine alterations in alzheimer models. *J Neurocytol* [Internet]. 2004 May;33(3):377–87. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/B:NEUR.0000044197.83514.64>
 37. Šišková Z, Justus D, Kaneko H, Friedrichs D, Henneberg N, Beutel T, et al. Dendritic Structural Degeneration Is Functionally Linked to Cellular Hyperexcitability in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Neuron* [Internet]. 2014 Dec;84(5):1023–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627314009222>
 38. Alvarez VA, Sabatini BL. Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 2007 Jul 1;30(1):79–97. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094222>
 39. Pchitskaya E, Bezprozvanny I. Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Front Synaptic Neurosci* [Internet]. 2020 Sep 30;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsyn.2020.00031/full>
 40. Bączyńska E, Pels KK, Basu S, Włodarczyk J, Ruszczycki B. Quantification of Dendritic Spines Remodeling under Physiological Stimuli and in Pathological Conditions. *Int J*

- Mol Sci [Internet]. 2021 Apr 14;22(8):4053. Available from:
<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/4053>
41. Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2015 Jul 11;130(1):1–19. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-015-1449-5>
 42. Popov VI, Davies HA, Rogachevsky VV, Patrushev IV, Errington ML, Gabbott PLA, et al. Remodelling of synaptic morphology but unchanged synaptic density during late phase long-term potentiation(ltp): A serial section electron micrograph study in the dentate gyrus in the anaesthetised rat. *Neuroscience* [Internet]. 2004 Jan;128(2):251–62. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645220400497X>
 43. Duan H. Age-related Dendritic and Spine Changes in Corticocortically Projecting Neurons in Macaque Monkeys. *Cereb Cortex* [Internet]. 2003 Sep 1;13(9):950–61. Available from: <https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/13.9.950>
 44. Markus EJ, Petit TL. Neocortical synaptogenesis, aging, and behavior: Lifespan development in the motor-sensory system of the rat. *Exp Neurol* [Internet]. 1987 May;96(2):262–78. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001488687900458>
 45. Herms J, Dorostkar MM. Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2016 May 23;11(1):221–50. Available from:
<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-012615-044216>
 46. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* [Internet]. 2007 May;68(18):1501–8. Available from:
<https://www.neurology.org/doi/10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f>
 47. Merino-Serrais P, Benavides-Piccione R, Blazquez-Llorca L, Kastanauskaite A, Rábano A, Avila J, et al. The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain* [Internet]. 2013 Jun;136(6):1913–28. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awt088>
 48. Mijalkov M, Volpe G, Feraud-Espinosa I, DeFelipe J, Pereira JB, Merino-Serrais P. Dendritic spines are lost in clusters in Alzheimer's disease. *Sci Rep* [Internet]. 2021

- Jun 11;11(1):12350. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-91726-x>
49. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J Neurosci* [Internet]. 2007 Mar 14;27(11):2866–75. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007>
 50. Rocher AB, Kinson MS, Luebke JI. Significant structural but not physiological changes in cortical neurons of 12-month-old Tg2576 mice. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2008 Nov;32(2):309–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096999610800168X>
 51. Auffret A, Gautheron V, Repici M, Kraftsik R, Mount HTJ, Mariani J, et al. Age-Dependent Impairment of Spine Morphology and Synaptic Plasticity in Hippocampal CA1 Neurons of a Presenilin 1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* [Internet]. 2009 Aug 12;29(32):10144–52. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.1856-09.2009>
 52. Sun G, He Y, Ma XK, Li S, Chen D, Gao M, et al. Hippocampal synaptic and neural network deficits in young mice carrying the human APOE 4 gene. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 2017 Sep 7;23(9):748–58. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cns.12720>
 53. Müller-Thomsen L, Borgmann D, Morcinek K, Schröder S, Dengler B, Moser N, et al. Consequences of hyperphosphorylated tau on the morphology and excitability of hippocampal neurons in aged tau transgenic mice. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2020 Sep;93:109–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458020300774>
 54. Rolland M, Powell R, Jacquier-Sarlin M, Boisseau S, Reynaud-Dulaurier R, Martinez-Hernandez J, et al. Effect of A β Oligomers on Neuronal APP Triggers a Vicious Cycle Leading to the Propagation of Synaptic Plasticity Alterations to Healthy Neurons. *J Neurosci* [Internet]. 2020 Jul 1;40(27):5161–76. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2501-19.2020>
 55. Mateos-Aparicio P, Rodríguez-Moreno A. The Impact of Studying Brain Plasticity. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2019 Feb 27;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2019.00066/full>
 56. Fuchs E, Flügge G. Adult Neuroplasticity: More Than 40 Years of Research. *Neural*

- Plast [Internet]. 2014;2014:1–10. Available from:
<http://www.hindawi.com/journals/np/2014/541870/>
57. Androuin A, Potier B, Nägerl UV, Cattaert D, Danglot L, Thierry M, et al. Evidence for altered dendritic spine compartmentalization in Alzheimer's disease and functional effects in a mouse model. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2018 Jun 25;135(6):839–54. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-018-1847-6>
 58. Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, et al. AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron* [Internet]. 2006 Dec;52(5):831–43. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627306008725>
 59. Benedikz E, Kloskowska E, Winblad B. The rat as an animal model of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2009 Jun;13(6):1034–42. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2009.00781.x>
 60. Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, et al. A Transgenic Alzheimer Rat with Plaques, Tau Pathology, Behavioral Impairment, Oligomeric A β , and Frank Neuronal Loss. *J Neurosci* [Internet]. 2013 Apr 10;33(15):6245–56. Available from:
<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3672-12.2013>
 61. Smith LA, McMahon LL. Deficits in synaptic function occur at medial perforant path-dentate granule cell synapses prior to Schaffer collateral-CA1 pyramidal cell synapses in the novel TgF344-Alzheimer's Disease Rat Model. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2018 Feb;110:166–79. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996117302759>
 62. Joo IL, Lai AY, Bazzigaluppi P, Koletar MM, Dorr A, Brown ME, et al. Early neurovascular dysfunction in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Apr 12;7(1):46427. Available from:
<https://www.nature.com/articles/srep46427>
 63. WU C, YANG L, LI Y, DONG Y, YANG B, TUCKER LD, et al. Effects of Exercise Training on Anxious–Depressive-like Behavior in Alzheimer Rat. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2020 Jul;52(7):1456–69. Available from:
<https://journals.lww.com/10.1249/MSS.0000000000002294>
 64. Shunan D, Yu M, Guan H, Zhou Y. Neuroprotective effect of Betalain against A β 1–42-induced Alzheimer's disease in Sprague Dawley Rats via putative modulation of oxidative stress and nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway. *Biomed*

- Pharmacother [Internet]. 2021 May;137:111369. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332221001542>
65. Barnett JH, Lewis L, Blackwell AD, Taylor M. Early intervention in Alzheimer's disease: a health economic study of the effects of diagnostic timing. BMC Neurol [Internet]. 2014 Dec 7;14(1):101. Available from:
<https://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2377-14-101>
 66. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's Dement [Internet]. 2011 May 22;7(3):263–9. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
 67. Nestor PJ, Scheltens P, Hodges JR. Advances in the early detection of Alzheimer's disease. Nat Med [Internet]. 2004 Jul 1;10(S7):S34–41. Available from:
<https://www.nature.com/articles/nrn1433>
 68. Scheltens P, Fox N, Barkhof F, De Carli C. Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion. Lancet Neurol [Internet]. 2002 May;1(1):13–21. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442202000029>
 69. Schilling LP, Zimmer ER, Shin M, Leuzy A, Pascoal TA, Benedet AL, et al. Imaging Alzheimer's disease pathophysiology with PET. Dement Neuropsychol [Internet]. 2016 Jun;10(2):79–90. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-57642016000200079&lng=en&tlng=en
 70. Se Thoe E, Fauzi A, Tang YQ, Chamyuang S, Chia AYY. A review on advances of treatment modalities for Alzheimer's disease. Life Sci [Internet]. 2021 Jul;276:119129. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320521001144>
 71. DAVIES P. SELECTIVE LOSS OF CENTRAL CHOLINERGIC NEURONS IN ALZHEIMER'S DISEASE. Lancet [Internet]. 1976 Dec;308(8000):1403. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067367691936X>
 72. PAKASKI M, KALMAN J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. Neurochem Int [Internet]. 2008 Nov;53(5):103–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018608000831>
 73. Mash DC, Flynn DD, Potter LT. Loss of M2 Muscarine Receptors in the Cerebral Cortex

- in Alzheimer's Disease and Experimental Cholinergic Denervation. *Science* (80-) [Internet]. 1985 May 31;228(4703):1115–7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.3992249>
74. Teaktong T, Graham AJ, Court JA, Perry RH, Jaros E, Johnson M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor immunohistochemistry in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies: differential neuronal and astroglial pathology. *J Neurol Sci* [Internet]. 2004 Oct;225(1–2):39–49. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X04002084>
 75. Andrieu S, Coley N, Lovestone S, Aisen PS, Vellas B. Prevention of sporadic Alzheimer's disease: lessons learned from clinical trials and future directions. *Lancet Neurol* [Internet]. 2015 Sep;14(9):926–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442215001532>
 76. Danyasz W, Parsons CG, Möbius H-Jö, Stöffler A, Quack Gü. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for alzheimer's disease — a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res* [Internet]. 2000 Jun;2(2–3):85–97. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF03033787>
 77. Bond M, Rogers G, Peters J, Anderson R, Hoyle M, Miners A, et al. The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model. *Health Technol Assess* [Internet]. 2012;16(21):1–470. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541366>
 78. Hyde C, Peters J, Bond M, Rogers G, Hoyle M, Anderson R, et al. Evolution of the evidence on the effectiveness and cost-effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: systematic review and economic model†. *Age Ageing* [Internet]. 2013 Jan;42(1):14–20. Available from: <https://academic.oup.com/ageing/article-lookup/doi/10.1093/ageing/afs165>
 79. Bores GM, Huger FP, Petko W, Mutlib AE, Camacho F, Rush DK, et al. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1996 May;277(2):728–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627552>
 80. Moretti M, Zoli M, George AA, Lukas RJ, Pistillo F, Maskos U, et al. The Novel $\alpha 7 \beta 2$ - Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtype Is Expressed in Mouse and Human Basal Forebrain: Biochemical and Pharmacological Characterization. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2014 Sep;86(3):306–17. Available from:

- <http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/mol.114.093377>
81. Wilcock GK, Lilienfeld S, Gaens E. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. *BMJ* [Internet]. 2000 Dec 9;321(7274):1445–1445. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.321.7274.1445>
 82. Rockwood K. Effects of a flexible galantamine dose in Alzheimer's disease: a randomised, controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2001 Nov 1;71(5):589–95. Available from: <https://jnnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnnp.71.5.589>
 83. Weinstock M. Selectivity of Cholinesterase Inhibition. *CNS Drugs* [Internet]. 1999;12(4):307–23. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00023210-199912040-00005>
 84. Amici S, Lanari A, Romani R, Antognelli C, Gallai V, Parnetti L. Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase activity after long-term treatment with donepezil and rivastigmina. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2001 Nov;122(16):2057–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637401003141>
 85. Potkin SG, Anand R, Fleming K, Alva G, Keator D, Carreon D, et al. Brain metabolic and clinical effects of rivastigmine in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2001 Sep 25;4(03). Available from: <https://academic.oup.com/ijnp/article-lookup/doi/10.1017/S1461145701002528>
 86. Birks JS, Grimley Evans J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. In: Birks JS, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. Available from: <https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD001191.pub3>
 87. Bryson HM, Benfield P. Donepezil. *Drugs Aging* [Internet]. 1997 Mar;10(3):234–9. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00002512-199710030-00007>
 88. Homma A, Takeda M, Imai Y, Udaka F, Hasegawa K, Kameyama M, et al. Clinical Efficacy and Safety of Donepezil on Cognitive and Global Function in Patients with Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* [Internet]. 2000;11(6):299–313. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/17259>
 89. Tariot PN, Cummings JL, Katz IR, Mintzer J, Perdomo CA, Schwam EM, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of the Efficacy and Safety of Donepezil in Patients with Alzheimer's Disease in the Nursing Home Setting. *J Am Geriatr Soc* [Internet]. 2001 Dec 25;49(12):1590–9. Available from:

- <https://agsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1532-5415.2001.49266.x>
90. Holmes C, Wilkinson D, Dean C, Vethanayagam S, Olivieri S, Langley A, et al. The efficacy of donepezil in the treatment of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease. *Neurology* [Internet]. 2004 Jul 27;63(2):214–9. Available from: <https://www.neurology.org/doi/10.1212/01.WNL.0000129990.32253.7B>
 91. Parsons CG, Stöffler A, Danysz W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* [Internet]. 2007 Nov;53(6):699–723. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390807002298>
 92. Chen HV, Lipton SA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* [Internet]. 2006 Jun 19;97(6):1611–26. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2006.03991.x>
 93. Lipton SA. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2006 Feb 20;5(2):160–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd1958>
 94. Alley GM, Bailey JA, Chen D, Ray B, Puli LK, Tanila H, et al. Memantine lowers amyloid- β peptide levels in neuronal cultures and in APP/PS1 transgenic mice. *J Neurosci Res* [Internet]. 2010 Jan 29;88(1):143–54. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.22172>
 95. Matsunaga S, Kishi T, Iwata N. Memantine Monotherapy for Alzheimer’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Quinn TJ, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Apr 10;10(4):e0123289. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0123289>
 96. Grossberg GT, Manes F, Allegri RF, Gutiérrez-Robledo LM, Gloger S, Xie L, et al. The Safety, Tolerability, and Efficacy of Once-Daily Memantine (28 mg): A Multinational, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Patients with Moderate-to-Severe Alzheimer’s Disease Taking Cholinesterase Inhibitors. *CNS Drugs* [Internet]. 2013 Jun 4;27(6):469–78. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40263-013-0077-7>
 97. Rodda J, Carter J. Cholinesterase inhibitors and memantine for symptomatic treatment of dementia. *BMJ* [Internet]. 2012 May 1;344(may01 1):e2986–e2986. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.e2986>
 98. Howard R, McShane R, Lindesay J, Ritchie C, Baldwin A, Barber R, et al. Nursing home

- placement in the Donepezil and Memantine in Moderate to Severe Alzheimer's Disease (DOMINO-AD) trial: secondary and post-hoc analyses. *Lancet Neurol* [Internet]. 2015 Dec;14(12):1171–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442215002586>
99. Piette F, Belmin J, Vincent H, Schmidt N, Pariel S, Verny M, et al. Masitinib as an adjunct therapy for mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Alzheimers Res Ther* [Internet]. 2011;3(2):16. Available from: <http://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/alzrt75>
 100. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2015 Jul 23;1(1):15019. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrdp201519>
 101. Taylor R. Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2012 Apr 1;61(4):778–9. Available from: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/61/4/778/15927/Insulin-Resistance-and-Type-2-Diabetes>
 102. Chaudhury A, Duvoor C, Reddy Dendi VS, Kraleti S, Chada A, Ravilla R, et al. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2017 Jan 24;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00006/full>
 103. Tan SY, Mei Wong JL, Sim YJ, Wong SS, Mohamed Elhassan SA, Tan SH, et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2019 Jan;13(1):364–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871402118304181>
 104. Caberlotto L, Nguyen T-P, Lauria M, Priami C, Rimondini R, Maioli S, et al. Cross-disease analysis of Alzheimer's disease and type-2 Diabetes highlights the role of autophagy in the pathophysiology of two highly comorbid diseases. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Mar 8;9(1):3965. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-39828-5>
 105. Meng L, Li X-Y, Shen L, Ji H-F. Type 2 Diabetes Mellitus Drugs for Alzheimer's Disease: Current Evidence and Therapeutic Opportunities. *Trends Mol Med* [Internet]. 2020 Jun;26(6):597–614. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491420300575>
 106. Rorbach-Dolata A, Piwowar A. Neurometabolic Evidence Supporting the Hypothesis

- of Increased Incidence of Type 3 Diabetes Mellitus in the 21st Century. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019 Jul 21;2019:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/1435276/>
107. Sasaki N, Fukatsu R, Tsuzuki K, Hayashi Y, Yoshida T, Fujii N, et al. Advanced Glycation End Products in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Am J Pathol* [Internet]. 1998 Oct;153(4):1149–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010656593>
 108. Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, et al. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1994 May 24;91(11):4766–70. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.91.11.4766>
 109. Khalid M, Petroianu G, Adem A. Advanced Glycation End Products and Diabetes Mellitus: Mechanisms and Perspectives. *Biomolecules* [Internet]. 2022 Apr 4;12(4):542. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/4/542>
 110. Flier JS, Underhill LH, Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced Glycosylation End Products in Tissue and the Biochemical Basis of Diabetic Complications. *N Engl J Med* [Internet]. 1988 May 19;318(20):1315–21. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198805193182007>
 111. Rhee SY, Kim YS. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications. *Diabetes Metab J* [Internet]. 2018;42(3):188. Available from: <http://e-dmj.org/journal/view.php?doi=10.4093/dmj.2017.0105>
 112. Takeuchi M, Yamagishi S. Possible Involvement of Advanced Glycation End-Products (AGEs) in the Pathogenesis of Alzheimers Disease. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2008 Apr 1;14(10):973–8. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=14&issue=10&spage=973>
 113. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Feb 14;11(2):98–107. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri2925>
 114. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis G-A, Vogiatzi G, Papaioannou S, et al. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol Rev* [Internet]. 2019 Apr 30;14(1):50–9. Available from: <https://www.eocrjournal.com/articles/role-inflammation-diabetes-current-concepts-and-future-perspectives>

115. Boccardi V, Murasecco I, Mecocci P. Diabetes drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2019 Sep;54:100936. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156816371930100X>
116. Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2005 Feb;37(2):289–305. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272504002699>
117. Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* [Internet]. 2010 Aug 15;117(8):919–47. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00702-010-0438-z>
118. Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2017 May;1863(5):1078–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443916302150>
119. Esterline R, Oscarsson J, Burns J. A role for sodium glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2is) in the treatment of Alzheimer's disease? In 2020. p. 113–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074774220300490>
120. Tumminia A, Vinciguerra F, Parisi M, Frittitta L. Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Role of Insulin Signalling and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Oct 24;19(11):3306. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/11/3306>
121. Morello AN da C, Lima TM, Brandão L. Language and communication non-pharmacological interventions in patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Communication intervention in Alzheimer. Dement Neuropsychol* [Internet]. 2017 Sep;11(3):227–41. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-57642017000300227&lng=en&tlng=en
122. Chatterjee S, Mudher A. Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes: A Critical Assessment of the Shared Pathological Traits. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 Jun 8;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00383/full>
123. Akter K, Lanza EA, Martin SA, Myronyuk N, Rua M, Raffa RB. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 2011 Mar;71(3):365–76. Available from: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2125.2010.03830.x>

124. Butterfield DA, Di Domenico F, Barone E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: A key role for oxidative stress in brain. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2014 Sep;1842(9):1693–706. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443914001756>
125. Koenig AM, Mechanic-Hamilton D, Xie SX, Combs MF, Cappola AR, Xie L, et al. Effects of the Insulin Sensitizer Metformin in Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* [Internet]. 2017 Apr;31(2):107–13. Available from: <https://journals.lww.com/00002093-201704000-00004>
126. Luchsinger JA, Perez T, Chang H, Mehta P, Steffener J, Pradabhan G, et al. Metformin in Amnestic Mild Cognitive Impairment: Results of a Pilot Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2016 Mar 15;51(2):501–14. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-150493>
127. Manoj A, Das S, Kunnath Ramachandran A, Alex AT, Joseph A. SGLT2 inhibitors, an accomplished development in field of medicinal chemistry: an extensive review. *Future Med Chem* [Internet]. 2020 Nov;12(21):1961–90. Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc-2020-0154>
128. Zhong KL, Chen F, Hong H, Ke X, Lv YG, Tang SS, et al. New views and possibilities of antidiabetic drugs in treating and/or preventing mild cognitive impairment and Alzheimer's Disease. *Metab Brain Dis* [Internet]. 2018 Aug 6;33(4):1009–18. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11011-018-0227-1>
129. Bendlin BB. Antidiabetic therapies and Alzheimer disease. *Dialogues Clin Neurosci* [Internet]. 2019 Mar;21(1):83–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31607783>
130. Kahn CR, Freychet P, Roth J, Neville DM. Quantitative aspects of the insulin-receptor interaction in liver plasma membranes. *J Biol Chem* [Internet]. 1974 Apr 10;249(7):2249–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4362069>
131. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* [Internet]. 1996 Jan;12(1):106–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng0196-106>
132. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor

- (Igf1r). Cell [Internet]. 1993 Oct 8;75(1):59–72. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402901>
133. Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, et al. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. J Biol Chem [Internet]. 1988 Aug 15;263(23):11486–92. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2969892>
 134. Sędzikowska A, Szablewski L. Insulin and Insulin Resistance in Alzheimer’s Disease. Int J Mol Sci [Internet]. 2021 Sep 15;22(18):9987. Available from:
<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/18/9987>
 135. Bedse G, Di Domenico F, Serviddio G, Cassano T. Aberrant insulin signaling in Alzheimer’s disease: current knowledge. Front Neurosci [Internet]. 2015 Jun 16;9. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnins.2015.00204/abstract>
 136. Kopf D, Frölich L. Risk of Incident Alzheimer’s Disease in Diabetic Patients: A Systematic Review of Prospective Trials. Bierhaus A, editor. J Alzheimer’s Dis [Internet]. 2009 Apr 17;16(4):677–85. Available from:
<https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2009-1011>
 137. Eaton WW, Armenian H, Gallo J, Pratt L, Ford DE. Depression and Risk for Onset of Type II Diabetes: A prospective population-based study. Diabetes Care [Internet]. 1996 Oct 1;19(10):1097–102. Available from:
<https://diabetesjournals.org/care/article/19/10/1097/18170/Depression-and-Risk-for-Onset-of-Type-II-Diabetes>
 138. Talbot K, Wang H-Y, Kazi H, Han L-Y, Bakshi KP, Stucky A, et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer’s disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. J Clin Invest [Internet]. 2012 Apr 2;122(4):1316–38. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/59903>
 139. Steen E, Terry BM, J. Rivera E, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer’s disease – is this type 3 diabetes? J Alzheimer’s Dis [Internet]. 2005 Mar 3;7(1):63–80. Available from:
<https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2005-7107>
 140. Vandal M, White PJ, Tremblay C, St-Amour I, Chevrier G, Emond V, et al. Insulin

- Reverses the High-Fat Diet–Induced Increase in Brain A β and Improves Memory in an Animal Model of Alzheimer Disease. *Diabetes* [Internet]. 2014 Dec 1;63(12):4291–301. Available from:
<https://diabetesjournals.org/diabetes/article/63/12/4291/40421/Insulin-Reverses-the-High-Fat-Diet-Induced>
141. Shingo AS, Kanabayashi T, Kito S, Murase T. Intracerebroventricular administration of an insulin analogue recovers STZ-induced cognitive decline in rats. *Behav Brain Res* [Internet]. 2013 Mar;241:105–11. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432812007796>
 142. Ghasemi R, Zarifkar A, Rastegar K, Maghsoudi N, Moosavi M. Insulin protects against A β -induced spatial memory impairment, hippocampal apoptosis and MAPKs signaling disruption. *Neuropharmacology* [Internet]. 2014 Oct;85:113–20. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390814000434>
 143. Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, et al. Enhancement of Memory in Alzheimer Disease With Insulin and Somatostatin, but Not Glucose. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 1999 Dec 1;56(12):1135. Available from:
<http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.56.12.1135>
 144. Verdile G, Fuller SJ, Martins RN. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2015 Dec;84:22–38. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996115001552>
 145. Schiöth HB, Craft S, Brooks SJ, Frey WH, Benedict C. Brain Insulin Signaling and Alzheimer’s Disease: Current Evidence and Future Directions. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2012 Aug 29;46(1):4–10. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s12035-011-8229-6>
 146. Katsenos AP, Davri AS, Simos Y V., Nikas IP, Bekiari C, Paschou SA, et al. New treatment approaches for Alzheimer’s disease: preclinical studies and clinical trials centered on antidiabetic drugs. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2022 Jan 2;31(1):105–23. Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543784.2022.2022122>
 147. Craft S. Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Arch Neurol* [Internet]. 2012 Jan 1;69(1):29. Available from:
<http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneurol.2011.233>
 148. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules* [Internet]. 2020 Apr 23;25(8):1987. Available from:

- <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/8/1987>
149. Chen F, Dong RR, Zhong KL, Ghosh A, Tang SS, Long Y, et al. Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid- β across the blood–brain barrier and memory impairment in db / db mice. *Neuropharmacology* [Internet]. 2016 Feb;101:123–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390815300307>
 150. Chiang M-C, Cheng Y-C, Chen S-J, Yen C-H, Huang R-N. Metformin activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *Exp Cell Res* [Internet]. 2016 Oct;347(2):322–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482716302427>
 151. Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N, et al. Metformin Inhibits Proinflammatory Responses and Nuclear Factor- κ B in Human Vascular Wall Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2006 Mar;26(3):611–7. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000201938.78044.75>
 152. Asadbegi M, Yaghmaei P, Salehi I, Ebrahim-Habibi A, Komaki A. Neuroprotective effects of metformin against A β -mediated inhibition of long-term potentiation in rats fed a high-fat diet. *Brain Res Bull* [Internet]. 2016 Mar;121:178–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923016300181>
 153. Hettich MM, Matthes F, Ryan DP, Griesche N, Schröder S, Dorn S, et al. The Anti-Diabetic Drug Metformin Reduces BACE1 Protein Level by Interfering with the MID1 Complex. Paudel HK, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jul 15;9(7):e102420. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0102420>
 154. Chen J-L, Luo C, Pu D, Zhang G-Q, Zhao Y-X, Sun Y, et al. Metformin attenuates diabetes-induced tau hyperphosphorylation in vitro and in vivo by enhancing autophagic clearance. *Exp Neurol* [Internet]. 2019 Jan;311:44–56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488618304643>
 155. Xu X, Sun Y, Cen X, Shan B, Zhao Q, Xie T, et al. Metformin activates chaperone-mediated autophagy and improves disease pathologies in an Alzheimer disease mouse model. *Protein Cell* [Internet]. 2021 Oct 21;12(10):769–87. Available from: <https://academic.oup.com/proteincell/article/12/10/769/6746907>
 156. Wu JH, Haan MN, Liang J, Ghosh D, Gonzalez HM, Herman WH. Impact of Antidiabetic Medications on Physical and Cognitive Functioning of Older Mexican Americans with Diabetes Mellitus. *Ann Epidemiol* [Internet]. 2003 May;13(5):369–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1047279702004647>

157. Ryan CM, Freed MI, Rood JA, Cobitz AR, Waterhouse BR, Strachan MWJ. Improving Metabolic Control Leads to Better Working Memory in Adults With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2006 Feb 1;29(2):345–51. Available from: <https://diabetesjournals.org/care/article/29/2/345/26200/Improving-Metabolic-Control-Leads-to-Better>
158. Hsu C-C, Wahlqvist ML, Lee M-S, Tsai H-N. Incidence of Dementia is Increased in Type 2 Diabetes and Reduced by the Use of Sulfonylureas and Metformin. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2011 May 10;24(3):485–93. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2011-101524>
159. Imfeld P, Bodmer M, Jick SS, Meier CR. Metformin, Other Antidiabetic Drugs, and Risk of Alzheimer's Disease: A Population-Based Case–Control Study. *J Am Geriatr Soc* [Internet]. 2012 May 28;60(5):916–21. Available from: <https://agsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1532-5415.2012.03916.x>
160. Moore EM, Mander AG, Ames D, Kotowicz MA, Carne RP, Brodaty H, et al. Increased Risk of Cognitive Impairment in Patients With Diabetes Is Associated With Metformin. *Diabetes Care* [Internet]. 2013 Oct 1;36(10):2981–7. Available from: <https://diabetesjournals.org/care/article/36/10/2981/30476/Increased-Risk-of-Cognitive-Impairment-in-Patients>
161. Kuan Y-C, Huang K-W, Lin C-L, Hu C-J, Kao C-H. Effects of metformin exposure on neurodegenerative diseases in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2017 Oct;79:77–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584617302877>
162. Buccellato FR, D'Anca M, Fenoglio C, Scarpini E, Galimberti D. Role of Oxidative Damage in Alzheimer's Disease and Neurodegeneration: From Pathogenic Mechanisms to Biomarker Discovery. *Antioxidants* [Internet]. 2021 Aug 26;10(9):1353. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/9/1353>
163. Dahlén AD, Dashi G, Maslov I, Attwood MM, Jonsson J, Trukhan V, et al. Trends in Antidiabetic Drug Discovery: FDA Approved Drugs, New Drugs in Clinical Trials and Global Sales. *Front Pharmacol* [Internet]. 2022 Jan 19;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.807548/full>
164. Heneka MT, Landreth GE, Feinstein DL. Role for peroxisome proliferator-activated receptor- γ in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* [Internet]. 2001 Feb 1;49(2):276–276. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1531->

- 8249(20010201)49:2%3C276::AID-ANA53%3E3.0.CO;2-5
165. Zhong Y, Miao Y, Jia WP, Yan H, Wang BY, Jin J. Hyperinsulinemia, insulin resistance and cognitive decline in older cohort. *Biomed Environ Sci* [Internet]. 2012 Feb;25(1):8–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424621>
 166. Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, Ramarao P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Life Sci* [Internet]. 2006 Nov;79(23):2209–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002432050600573X>
 167. De Felice FG, Vieira MNN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A β oligomers. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009 Feb 10;106(6):1971–6. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0809158106>
 168. Wang H, Chen F, Zhong KL, Tang SS, Hu M, Long Y, et al. PPAR γ agonists regulate bidirectional transport of amyloid- β across the blood–brain barrier and hippocampus plasticity in db / db mice. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2016 Jan 19;173(2):372–85. Available from: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13378>
 169. Watson GS. Preserved Cognition in Patients With Early Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment During Treatment With Rosiglitazone: A Preliminary Study. *Am J Geriatr Psychiatry* [Internet]. 2005 Nov 1;13(11):950–8. Available from: <http://ajgponline.org/cgi/doi/10.1176/appi.ajgp.13.11.950>
 170. Risner ME, Saunders AM, Altman JFB, Ormandy GC, Craft S, Foley IM, et al. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2006 Jul 1;6(4):246–54. Available from: <https://www.nature.com/articles/6500369>
 171. Hanyu H, Sato T, Kiuchi A, Sakurai H, Iwamoto T. PIOGLITAZONE IMPROVED COGNITION IN A PILOT STUDY ON PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE AND MILD COGNITIVE IMPAIRMENT WITH DIABETES MELLITUS. *J Am Geriatr Soc* [Internet]. 2009 Jan 31;57(1):177–9. Available from: <https://agsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1532-5415.2009.02067.x>
 172. Hanyu H, Sato T, Sakurai H, Iwamoto T. THE ROLE OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN COGNITIVE IMPROVEMENT AFTER PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATOR RECEPTOR GAMMA AGONIST PIOGLITAZONE TREATMENT IN ALZHEIMER'S DISEASE. *J Am Geriatr Soc* [Internet]. 2010 May 7;58(5):1000–1.

- Available from: <https://agsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1532-5415.2010.02841.x>
173. Geldmacher DS, Fritsch T, McClendon MJ, Landreth G. A Randomized Pilot Clinical Trial of the Safety of Pioglitazone in Treatment of Patients With Alzheimer Disease. *Arch Neurol* [Internet]. 2011 Jan 1;68(1). Available from: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.2010.229>
 174. Sato T, Hanyu H, Hirao K, Kanetaka H, Sakurai H, Iwamoto T. Efficacy of PPAR- γ agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2011 Sep;32(9):1626–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019745800900339X>
 175. Gold M, Alderton C, Zvartau-Hind M, Egginton S, Saunders AM, Irizarry M, et al. Rosiglitazone Monotherapy in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease: Results from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study. *Dement Geriatr Cogn Disord* [Internet]. 2010;30(2):131–46. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/318845>
 176. Harrington C, Sawchak S, Chiang C, Davies J, Donovan C, M. Saunders A, et al. Rosiglitazone Does Not Improve Cognition or Global Function when Used as Adjunctive Therapy to AChE Inhibitors in Mild-to-Moderate Alzheimers Disease: Two Phase 3 Studies. *Curr Alzheimer Res* [Internet]. 2011 Aug 1;8(5):592–606. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2050&volume=8&issue=5&spage=592>
 177. Cheng H, Shang Y, Jiang L, Shi T, Wang L. The peroxisome proliferators activated receptor-gamma agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease and mild-to-moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Int J Neurosci* [Internet]. 2016 Apr 2;126(4):299–307. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00207454.2015.1015722>
 178. Burns DK, Alexander RC, Welsh-Bohmer KA, Culp M, Chiang C, O'Neil J, et al. Safety and efficacy of pioglitazone for the delay of cognitive impairment in people at risk of Alzheimer's disease (TOMMORROW): a prognostic biomarker study and a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* [Internet]. 2021 Jul;20(7):537–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442221000430>
 179. Gavin JR, Stolar MW, Freeman JS, Spellman CW. Improving outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus: practical solutions for clinical challenges. *J Am Osteopath*

- Assoc [Internet]. 2010 May;110(5 Suppl 6):S2-14; quiz S15-6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554501>
180. Cignarelli A, Giorgino F, Vettor R. Pharmacologic agents for type 2 diabetes therapy and regulation of adipogenesis. Arch Physiol Biochem [Internet]. 2013 Oct 31;119(4):139–50. Available from:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13813455.2013.796996>
 181. Morsink LM, Smits MM, Diamant M. Advances in Pharmacologic Therapies for Type 2 Diabetes. Curr Atheroscler Rep [Internet]. 2013 Feb 9;15(2):302. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s11883-012-0302-8>
 182. Pintana H, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats. J Endocrinol [Internet]. 2013 Jul;218(1):1–11. Available from:
<https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/218/1/1.xml>
 183. Pipatpiboon N, Pintana H, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. <scp>DPP</scp> 4-inhibitor improves neuronal insulin receptor function, brain mitochondrial function and cognitive function in rats with insulin resistance induced by high-fat diet consumption. Eur J Neurosci [Internet]. 2013 Mar 12;37(5):839–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejn.12088>
 184. D’Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Abbatecola AM, Ferraraccio F, Rossi F, et al. Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase-4 in Alzheimer’s prone mice. Exp Gerontol [Internet]. 2010 Mar;45(3):202–7. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531556509002976>
 185. Kim D-H, Huh J-W, Jang M, Suh J-H, Kim T-W, Park J-S, et al. Sitagliptin increases tau phosphorylation in the hippocampus of rats with type 2 diabetes and in primary neuron cultures. Neurobiol Dis [Internet]. 2012 Apr;46(1):52–8. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996111004293>
 186. Qiu WQ, Zhu H. Amylin and its analogs: a friend or foe for the treatment of Alzheimer’s disease? Front Aging Neurosci [Internet]. 2014 Jul 29;6. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2014.00186/abstract>
 187. Grizzanti J, Corrigan R, Casadesus G. Neuroprotective Effects of Amylin Analogues on Alzheimer’s Disease Pathogenesis and Cognition. J Alzheimer’s Dis [Internet]. 2018 Oct 16;66(1):11–23. Available from:
<https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-180433>

188. Adler BL, Yarchoan M, Hwang HM, Louneva N, Blair JA, Palm R, et al. Neuroprotective effects of the amylin analogue pramlintide on Alzheimer's disease pathogenesis and cognition. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2014 Apr;35(4):793–801. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458013005290>
189. Zhu H, Wang X, Wallack M, Li H, Carreras I, Dedeoglu A, et al. Intraperitoneal injection of the pancreatic peptide amylin potently reduces behavioral impairment and brain amyloid pathology in murine models of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2015 Feb 11;20(2):252–62. Available from: <https://www.nature.com/articles/mp201417>
190. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1987 May;84(10):3434–8. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.84.10.3434>
191. Holz GG. Epac : A New cAMP-Binding Protein in Support of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor-Mediated Signal Transduction in the Pancreatic β -Cell. *Diabetes* [Internet]. 2004 Jan 1;53(1):5–13. Available from: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/53/1/5/11676/Epac-A-New-cAMP-Binding-Protein-in-Support-of>
192. Ali ES, Hua J, Wilson CH, Tallis GA, Zhou FH, Rychkov GY, et al. The glucagon-like peptide-1 analogue exendin-4 reverses impaired intracellular Ca²⁺ signalling in steatotic hepatocytes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2016 Sep;1863(9):2135–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488916301409>
193. Athauda D, Foltynie T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. *Drug Discov Today* [Internet]. 2016 May;21(5):802–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644616300010>
194. Kinzig KP, D'Alessio DA, Herman JP, Sakai RR, Vahl TP, Figueiredo HF, et al. CNS Glucagon-Like Peptide-1 Receptors Mediate Endocrine and Anxiety Responses to Interoceptive and Psychogenic Stressors. *J Neurosci* [Internet]. 2003 Jul 16;23(15):6163–70. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.23-15-06163.2003>
195. Grieco M, Giorgi A, Gentile MC, D'Erme M, Morano S, Maras B, et al. Glucagon-Like Peptide-1: A Focus on Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* [Internet]. 2019

- Oct 18;13. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.01112/full>
196. Bak AM, Egefjord L, Gejl M, Steffensen C, Stecher CW, Smidt K, et al. Targeting amyloid-beta by glucagon-like peptide -1 (GLP-1) in Alzheimer's disease and diabetes. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2011 Oct 12;15(10):1153–62. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2011.600691>
 197. McClean PL, Gault VA, Harriott P, Hölscher C. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: A link between diabetes and Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2010 Mar;630(1–3):158–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299909011443>
 198. Abbas T, Faivre E, Hölscher C. Impairment of synaptic plasticity and memory formation in GLP-1 receptor KO mice: Interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* [Internet]. 2009 Dec;205(1):265–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432809003970>
 199. Parthasarathy V, Hölscher C. Chronic Treatment with the GLP1 Analogue Liraglutide Increases Cell Proliferation and Differentiation into Neurons in an AD Mouse Model. Vitorica J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Mar 11;8(3):e58784. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058784>
 200. Gault VA, Hölscher C. GLP-1 receptor agonists show neuroprotective effects in animal models of diabetes. *Peptides* [Internet]. 2018 Feb;100:101–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978117303637>
 201. Diabetes drug on trial for Alzheimer's. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2021 Feb 9;39(2):127–127. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41587-021-00833-7>
 202. Hölscher C. Protective properties of GLP-1 and associated peptide hormones in neurodegenerative disorders. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2022 Feb;179(4):695–714. Available from: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.15508>
 203. Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, Holloway HW, et al. GLP-1 Receptor Stimulation Reduces Amyloid- β Peptide Accumulation and Cytotoxicity in Cellular and Animal Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2010 Mar 11;19(4):1205–19. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2010-1314>
 204. Xu W, Yang Y, Yuan G, Zhu W, Ma D, Hu S. Exendin-4, a Glucagon-Like Peptide-1

- Receptor Agonist, Reduces Alzheimer Disease-Associated Tau Hyperphosphorylation in the Hippocampus of Rats with Type 2 Diabetes. *J Investig Med* [Internet]. 2015 Feb 5;63(2):267–72. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1097/JIM.0000000000000129>
205. Mullins RJ, Mustapic M, Chia CW, Carlson O, Gulyani S, Tran J, et al. A Pilot Study of Exenatide Actions in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* [Internet]. 2019 Oct 11;16(8):741–52. Available from: <http://www.eurekaselect.com/174861/article>
 206. Yu C jiang, Song L ling, Zhai Z nan, Tao Y, Zhang Y, Cai L yu, et al. The role of GLP-1/GIP receptor agonists in Alzheimer's disease. *Adv Clin Exp Med* [Internet]. 2020 Jul 2;29(6):661–8. Available from:
<http://www.advances.umed.wroc.pl/pdf/2020/29/6/661.pdf>
 207. Hansen HH, Fabricius K, Barkholt P, Niehoff ML, Morley JE, Jelsing J, et al. The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Improves Memory Function and Increases Hippocampal CA1 Neuronal Numbers in a Senescence-Accelerated Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2015 Jun 26;46(4):877–88. Available from:
<https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-143090>
 208. McClean PL, Jalewa J, Hölscher C. Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice. *Behav Brain Res* [Internet]. 2015 Oct;293:96–106. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432815300966>
 209. Abd el-Rady NM, Ahmed A, Abdel-Rady MM, Ismail OI. Glucagon-like peptide-1 analog improves neuronal and behavioral impairment and promotes neuroprotection in a rat model of aluminum-induced dementia. *Physiol Rep* [Internet]. 2021 Jan 23;8(24). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.14814/phy2.14651>
 210. McClean PL, Parthsarathy V, Faivre E, Hölscher C. The Diabetes Drug Liraglutide Prevents Degenerative Processes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* [Internet]. 2011 Apr 27;31(17):6587–94. Available from:
<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0529-11.2011>
 211. McClean PL, Hölscher C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* [Internet]. 2014 Jan;76:57–67. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390813003626>
 212. Gejl M, Brock B, Egefjord L, Vang K, Rungby J, Gjedde A. Blood-Brain Glucose Transfer

- in Alzheimer's disease: Effect of GLP-1 Analog Treatment. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 13;7(1):17490. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17718-y>
213. Femminella GD, Frangou E, Love SB, Busza G, Holmes C, Ritchie C, et al. Evaluating the effects of the novel GLP-1 analogue liraglutide in Alzheimer's disease: study protocol for a randomised controlled trial (ELAD study). *Trials* [Internet]. 2019 Dec 3;20(1):191. Available from: <https://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13063-019-3259-x>
 214. McClean PL, Hölscher C. Lixisenatide, a drug developed to treat type 2 diabetes, shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* [Internet]. 2014 Nov;86:241–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390814002779>
 215. Cai H-Y, Wang Z-J, Hölscher C, Yuan L, Zhang J, Sun P, et al. Lixisenatide attenuates the detrimental effects of amyloid β protein on spatial working memory and hippocampal neurons in rats. *Behav Brain Res* [Internet]. 2017 Feb;318:28–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432816308920>
 216. Chang Y, Zhang D, Hu W, Liu D, Li L. Semaglutide-mediated protection against A β correlated with enhancement of autophagy and inhibition of apoptosis. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2020 Nov;81:234–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967586820315332>
 217. Zhou M, Chen S, Peng P, Gu Z, Yu J, Zhao G, et al. Dulaglutide ameliorates STZ induced AD-like impairment of learning and memory ability by modulating hyperphosphorylation of tau and NFs through GSK3 β . *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2019 Mar;511(1):154–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X19301342>
 218. Mathiesen DS, Bagger JI, Bergmann NC, Lund A, Christensen MB, Vilsbøll T, et al. The Effects of Dual GLP-1/GIP Receptor Agonism on Glucagon Secretion—A Review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Aug 22;20(17):4092. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/17/4092>
 219. Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, Holst JJ, Nauck MS, Ritzel R, et al. Effects of Glucagon-Like Peptide 1 on Counterregulatory Hormone Responses, Cognitive Functions, and Insulin Secretion during Hyperinsulinemic, Stepped Hypoglycemic Clamp Experiments in Healthy Volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2002 Mar;87(3):1239–46. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article->

- lookup/doi/10.1210/jcem.87.3.8355
220. Christensen M, Vedtofte L, Holst JJ, Vilsbøll T, Knop FK. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide. *Diabetes* [Internet]. 2011 Dec 1;60(12):3103–9. Available from: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/60/12/3103/14188/Glucose-Dependent-Insulinotropic-PolypeptideA>
 221. T. V, T. K, S. M, J. H. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* [Internet]. 2002 Aug 1;45(8):1111–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-002-0878-6>
 222. Yuliantie E, Darbalaei S, Dai A, Zhao P, Yang D, Sexton PM, et al. Pharmacological characterization of mono-, dual- and tri-peptidic agonists at GIP and GLP-1 receptors. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2020 Jul;177:114001. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000629522030229X>
 223. Finan B, Yang B, Ottaway N, Smiley DL, Ma T, Clemmensen C, et al. A rationally designed monomeric peptide triagonist corrects obesity and diabetes in rodents. *Nat Med* [Internet]. 2015 Jan 8;21(1):27–36. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.3761>
 224. Brandt SJ, Götz A, Tschöp MH, Müller TD. Gut hormone polyagonists for the treatment of type 2 diabetes. *Peptides* [Internet]. 2018 Feb;100:190–201. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978117303960>
 225. Baggio LL, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor co-agonists for treating metabolic disease. *Mol Metab* [Internet]. 2021 Apr;46:101090. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877820301642>
 226. Hasib A. Multiagonist Unimolecular Peptides for Obesity and Type 2 Diabetes: Current Advances and Future Directions. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* [Internet]. 2020 Jan 14;13:117955142090584. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1179551420905844>
 227. Shi L, Zhang Z, Li L, Hölscher C. A novel dual GLP-1/GIP receptor agonist alleviates cognitive decline by re-sensitizing insulin signaling in the Alzheimer icv. STZ rat model. *Behav Brain Res* [Internet]. 2017 Jun;327:65–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432817302243>
 228. Maskery M, Goulding EM, Gengler S, Melchiorson JU, Rosenkilde MM, Hölscher C. The Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist DA4-JC Shows Superior Protective Properties Compared to the GLP-1 Analogue Liraglutide in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimer's Dis Other Dementiasr* [Internet]. 2020 Jan

- 1;35:153331752095304. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1533317520953041>
229. Cao Y, Hölscher C, Hu M-M, Wang T, Zhao F, Bai Y, et al. DA5-CH, a novel GLP-1/GIP dual agonist, effectively ameliorates the cognitive impairments and pathology in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2018 May;827:215–26. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001429991830178X>
 230. Salles GN, Calió ML, Hölscher C, Pacheco-Soares C, Porcionatto M, Lobo AO. Neuroprotective and restorative properties of the GLP-1/GIP dual agonist DA-JC1 compared with a GLP-1 single agonist in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* [Internet]. 2020 Jan;162:107813. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390819303806>
 231. Tai J, Liu W, Li Y, Li L, Hölscher C. Neuroprotective effects of a triple GLP-1/GIP/glucagon receptor agonist in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* [Internet]. 2018 Jan;1678:64–74. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899317304596>
 232. Reich N, Hölscher C. The neuroprotective effects of glucagon-like peptide 1 in Alzheimer's and Parkinson's disease: An in-depth review. *Front Neurosci* [Internet]. 2022 Sep 1;16. Available from:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2022.970925/full>
 233. Li T, Jiao J-J, Su Q, Hölscher C, Zhang J, Yan X-D, et al. A GLP-1/GIP/Gcg receptor triagonist improves memory behavior, as well as synaptic transmission, neuronal excitability and Ca²⁺ homeostasis in 3xTg-AD mice. *Neuropharmacology* [Internet]. 2020 Jun;170:108042. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390820301088>
 234. Sano R, Shinozaki Y, Ohta T. Sodium–glucose cotransporters: Functional properties and pharmaceutical potential. *J Diabetes Investig* [Internet]. 2020 Jul 16;11(4):770–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdi.13255>
 235. Poulsen SB, Fenton RA, Rieg T. Sodium-glucose cotransport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* [Internet]. 2015 Sep;24(5):463–9. Available from:
<http://journals.lww.com/00041552-201509000-00011>
 236. Yu AS, Hirayama BA, Timbol G, Liu J, Basarah E, Kepe V, et al. Functional expression of SGLTs in rat brain. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2010 Dec;299(6):C1277–84. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00296.2010>

237. Yu AS, Hirayama BA, Timbol G, Liu J, Diez-Sampedro A, Kepe V, et al. Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2013 Feb 1;304(3):C240–7. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00317.2012>
238. Chiba Y, Sugiyama Y, Nishi N, Nonaka W, Murakami R, Ueno M. Sodium/glucose cotransporter 2 is expressed in choroid plexus epithelial cells and ependymal cells in human and mouse brains. *Neuropathology* [Internet]. 2020 Oct 2;40(5):482–91. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/neup.12665>
239. Abdel-latif RG, Rifaai RA, Amin EF. Empagliflozin alleviates neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury through HIF-1 α /VEGF signaling pathway. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2020 May 20;43(5):514–25. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12272-020-01237-y>
240. Kalra S. Sodium Glucose Co-Transporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Review of Their Basic and Clinical Pharmacology. *Diabetes Ther* [Internet]. 2014 Dec 26;5(2):355–66. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13300-014-0089-4>
241. Simes BC, MacGregor GG. Sodium-Glucose Cotransporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Clinician's Guide. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* [Internet]. 2019 Oct;Volume 12:2125–36. Available from: <https://www.dovepress.com/sodium-glucose-cotransporter-2-sgl2-inhibitors-a-clinicians-guide-peer-reviewed-article-DMSO>
242. Rastogi A, Bhansali A. SGLT2 Inhibitors Through the Windows of EMPA-REG and CANVAS Trials: A Review. *Diabetes Ther* [Internet]. 2017 Dec 26;8(6):1245–51. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13300-017-0320-1>
243. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Nov 23;377(21):2097–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1712572>
244. Stanciu GD, Rusu RN, Bild V, Filipiuc LE, Tamba B-I, Ababei DC. Systemic Actions of SGLT2 Inhibition on Chronic mTOR Activation as a Shared Pathogenic Mechanism between Alzheimer's Disease and Diabetes. *Biomedicines* [Internet]. 2021 May 19;9(5):576. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/5/576>
245. Wang C, Yu J-T, Miao D, Wu Z-C, Tan M-S, Tan L. Targeting the mTOR Signaling Network for Alzheimer's Disease Therapy. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2014 Feb 14;49(1):120–35. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/s12035-013-8505-](http://link.springer.com/10.1007/s12035-013-8505-8)

246. Packer M. Molecular, Cellular, and Clinical Evidence That Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Act as Neurohormonal Antagonists When Used for the Treatment of Chronic Heart Failure. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2020 Aug 18;9(16). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.120.016270>
247. Tsai K-F, Chen Y-L, Chiou TT-Y, Chu T-H, Li L-C, Ng H-Y, et al. Emergence of SGLT2 Inhibitors as Powerful Antioxidants in Human Diseases. *Antioxidants* [Internet]. 2021 Jul 22;10(8):1166. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/8/1166>
248. Wiciński M, Wódkiewicz E, Górski K, Walczak M, Malinowski B. Perspective of SGLT2 Inhibition in Treatment of Conditions Connected to Neuronal Loss: Focus on Alzheimer's Disease and Ischemia-Related Brain Injury. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2020 Nov 11;13(11):379. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/13/11/379>
249. Hayden M, Grant D, Aroor A, DeMarco V. Empagliflozin Ameliorates Type 2 Diabetes-Induced Ultrastructural Remodeling of the Neurovascular Unit and Neuroglia in the Female db/db Mouse. *Brain Sci* [Internet]. 2019 Mar 7;9(3):57. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3425/9/3/57>
250. Hierro-Bujalance C, Infante-Garcia C, del Marco A, Herrera M, Carranza-Naval MJ, Suarez J, et al. Empagliflozin reduces vascular damage and cognitive impairment in a mixed murine model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Alzheimers Res Ther* [Internet]. 2020 Dec 7;12(1):40. Available from: <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-020-00607-4>
251. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2014 Dec 26;13(1):148. Available from: <https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-014-0148-1>
252. Arafa NMS, Ali EHA, Hassan MK. Canagliflozin prevents scopolamine-induced memory impairment in rats: Comparison with galantamine hydrobromide action. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2017 Nov;277:195–203. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279717306312>
253. Sa-nguanmoo P, Tanajak P, Kerdphoo S, Jaiwongkam T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, et al. SGLT2-inhibitor and DPP-4 inhibitor improve brain function via attenuating mitochondrial dysfunction, insulin resistance, inflammation, and apoptosis in HFD-induced obese rats. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2017

- Oct;333:43–50. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X1730340X>
254. Millar P, Pathak N, Parthsarathy V, Bjourson AJ, O’Kane M, Pathak V, et al. Metabolic and neuroprotective effects of dapagliflozin and liraglutide in diabetic mice. *J Endocrinol* [Internet]. 2017 Sep;234(3):255–67. Available from:
<https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/234/3/JOE-17-0263.xml>
 255. Hulla J, Sahu S, Hayes A. Nanotechnology. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2015 Dec 26;34(12):1318–21. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327115603588>
 256. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* [Internet]. 1991 Nov;354(6348):56–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/354056a0>
 257. Bhushan B. Governance, policy, and legislation of nanotechnology: a perspective. *Microsyst Technol* [Internet]. 2015 May 4;21(5):1137–55. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s00542-015-2511-x>
 258. Bhushan B, editor. *Encyclopedia of Nanotechnology* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-9751-4>
 259. McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2005 May 27;78(3):585–94. Available from:
<https://academic.oup.com/jleukbio/article/78/3/585/6922426>
 260. Malik S, Muhammad K, Waheed Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules* [Internet]. 2023 Jan 9;28(2):661. Available from:
<https://www.mdpi.com/1420-3049/28/2/661>
 261. Nikolova M, Slavchov R, Nikolova G. Nanotechnology in Medicine. In: *Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 533–46. Available from:
http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-68864-0_45
 262. Visakh PM, editor. *Nanomaterials and Nanotechnology in Medicine* [Internet]. Wiley; 2022. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119558026>
 263. Ventola CL. The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. *P T* [Internet]. 2012 Sep;37(9):512–25. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066345>
 264. Guo T, Lin M, Huang J, Zhou C, Tian W, Yu H, et al. The Recent Advances of Magnetic

- Nanoparticles in Medicine. *J Nanomater* [Internet]. 2018;2018:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2018/7805147/>
265. Cai L-F, Zhan J-M, Liang J, Yang L, Yin J. Structural control of a novel hierarchical porous carbon material and its adsorption properties. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Feb 24;12(1):3118. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-06781-9>
 266. Dorin RM, Sai H, Wiesner U. Hierarchically Porous Materials from Block Copolymers. *Chem Mater* [Internet]. 2014 Jan 14;26(1):339–47. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cm4024056>
 267. Zhao L, Nasution MKM, Hekmatifar M, Sabetvand R, Kamenskov P, Toghraie D, et al. The improvement of mechanical properties of conventional concretes using carbon nanoparticles using molecular dynamics simulation. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Oct 12;11(1):20265. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-99616-y>
 268. Ji X, Ge L, Liu C, Tang Z, Xiao Y, Chen W, et al. Capturing functional two-dimensional nanosheets from sandwich-structure vermiculite for cancer theranostics. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Feb 18;12(1):1124. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21436-5>
 269. Zhou H, Wang Z, Zhao W, Tong X, Jin X, Zhang X, et al. Robust and sensitive pressure/strain sensors from solution processable composite hydrogels enhanced by hollow-structured conducting polymers. *Chem Eng J* [Internet]. 2021 Jan;403:126307. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894720324359>
 270. Ouyang J, Ji X, Zhang X, Feng C, Tang Z, Kong N, et al. In situ sprayed NIR-responsive, analgesic black phosphorus-based gel for diabetic ulcer treatment. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2020 Nov 17;117(46):28667–77. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2016268117>
 271. Wu J, Xu F, Li S, Ma P, Zhang X, Liu Q, et al. Porous Polymers as Multifunctional Material Platforms toward Task-Specific Applications. *Adv Mater* [Internet]. 2019 Jan 22;31(4). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.201802922>
 272. Ostafiychuk BK, Budzulyak IM, Rachiy BI, Lisovsky RP, Mandzyuk VI, Kolkovsky PI, et al. Electrochemical Properties of the Nanoporous Carbon/Aprotic Electrolyte System. *J Nano- Electron Phys* [Internet]. 2017;9(5):05001-1-05001–5. Available from: http://jnep.sumdu.edu.ua/en/component/content/full_article/2338

273. Myronyuk IF, Mandzyuk VI, Sachko VM, Gun'ko VM. Structural Features of Carbons Produced Using Glucose, Lactose, and Saccharose. *Nanoscale Res Lett* [Internet]. 2016 Dec 17;11(1):508. Available from: <https://link.springer.com/10.1186/s11671-016-1723-z>
274. Wei D, Yu Y, Zhang X, Wang Y, Chen H, Zhao Y, et al. Breaking the Intracellular Redox Balance with Diselenium Nanoparticles for Maximizing Chemotherapy Efficacy on Patient-Derived Xenograft Models. *ACS Nano* [Internet]. 2020 Dec 22;14(12):16984–96. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c06190>
275. Farzan M, Roth R, Schoelkopf J, Huwyler J, Puchkov M. The processes behind drug loading and release in porous drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2023 Aug;189:133–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641123001418>
276. Ridgway CJ, Gane PAC, Schoelkopf J. Achieving Rapid Absorption and Extensive Liquid Uptake Capacity in Porous Structures by Decoupling Capillarity and Permeability: Nanoporous Modified Calcium Carbonate. *Transp Porous Media* [Internet]. 2006 May;63(2):239–59. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11242-005-5391-1>
277. Ridgway CJ, Gane PA., Schoelkopf J. Modified calcium carbonate coatings with rapid absorption and extensive liquid uptake capacity. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2004 Apr;236(1–3):91–102. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775704000822>
278. Allen TM, Cullis PR. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* (80-) [Internet]. 2004 Mar 19;303(5665):1818–22. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1095833>
279. Jabr-Milane LS, van Vlerken LE, Yadav S, Amiji MM. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2008 Nov;34(7):592–602. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737208001813>
280. Cheng R, Meng F, Deng C, Klok H-A, Zhong Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials* [Internet]. 2013 May;34(14):3647–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213001397>
281. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres M del P, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J*

- Nanobiotechnology [Internet]. 2018 Dec 19;16(1):71. Available from:
<https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-018-0392-8>
282. Biswas A, Shukla A, Maiti P. Biomaterials for Interfacing Cell Imaging and Drug Delivery: An Overview. *Langmuir* [Internet]. 2019 Sep 24;35(38):12285–305. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.9b00419>
 283. Lilienfeld S. Galantamine — a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer’s Disease. *CNS Drug Rev* [Internet]. 2002 Jun 7;8(2):159–76. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1527-3458.2002.tb00221.x>
 284. Nanaki SG, Spyrou K, Bekiari C, Veneti P, Baroud TN, Karouta N, et al. Hierarchical Porous Carbon—PLLA and PLGA Hybrid Nanoparticles for Intranasal Delivery of Galantamine for Alzheimer’s Disease Therapy. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 Mar 4;12(3):227. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/3/227>
 285. Hanafy AS, Farid RM, Helmy MW, ElGamal SS. Pharmacological, toxicological and neuronal localization assessment of galantamine/chitosan complex nanoparticles in rats: future potential contribution in Alzheimer’s disease management. *Drug Deliv* [Internet]. 2016 Oct 12;23(8):3111–22. Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2016.1153748>
 286. Bonaccorso A, Musumeci T, Serapide MF, Pellitteri R, Uchegbu IF, Puglisi G. Nose to brain delivery in rats: Effect of surface charge of rhodamine B labeled nanocarriers on brain subregion localization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2017 Jun;154:297–306. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776517301534>
 287. Turiiski VI, Krustev AD, Sirakov VN, Getova DP. In vivo and in vitro study of the influence of the anticholinesterase drug galantamine on motor and evacuative functions of rat gastrointestinal tract. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2004 Sep;498(1–3):233–9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299904007861>
 288. Martín-Rapun R, De Matteis L, Ambrosone A, Garcia-Embid S, Gutierrez L, de la Fuente JM. Targeted Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2017 May 23;23(13):1927–52. Available from:
<http://www.eurekaselect.com/node/148709/article>
 289. Fowler CF, Goerzen D, Devenyi GA, Madularu D, Chakravarty MM, Near J. Neurochemical and cognitive changes precede structural abnormalities in the

- TgF344-AD rat model. *Brain Commun* [Internet]. 2022 Mar 1;4(2). Available from: <https://academic.oup.com/braincomms/article/doi/10.1093/braincomms/fcac072/6554209>
290. Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* [Internet]. 2001 Jun;17(6):157–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389034401000673>
 291. Pemberton K, Mersman B, Xu F. Using ImageJ to Assess Neurite Outgrowth in Mammalian Cell Cultures: Research Data Quantification Exercises in Undergraduate Neuroscience Lab. *J Undergrad Neurosci Educ* [Internet]. 2018;16(2):A186–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30057501>
 292. Holmes JR, Berkowitz A. Dendritic orientation and branching distinguish a class of multifunctional turtle spinal interneurons. *Front Neural Circuits* [Internet]. 2014 Nov 13;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2014.00136/abstract>
 293. Orłowski D, Bjarkam CR. A simple reproducible and time saving method of semi-automatic dendrite spine density estimation compared to manual spine counting. *J Neurosci Methods* [Internet]. 2012 Jul;208(2):128–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027012001628>
 294. Horner CH, Arbuthnott E. Methods of estimation of spine density--are spines evenly distributed throughout the dendritic field? *J Anat* [Internet]. 1991 Aug;177:179–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1769892>
 295. Vorhees C V, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* [Internet]. 2006 Aug 27;1(2):848–58. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.116>
 296. Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. Impaired Spatial Learning in α -Calcium-Calmodulin Kinase II Mutant Mice. *Science* (80-) [Internet]. 1992 Jul 10;257(5067):206–11. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1321493>
 297. Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2019;1916:105–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30535688>
 298. Ibrahim WW, Kamel AS, Wahid A, Abdelkader NF. Dapagliflozin as an autophagic enhancer via LKB1/AMPK/SIRT1 pathway in ovariectomized/d-galactose Alzheimer's

- rat model. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2022 Dec 1;30(6):2505–20. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10787-022-00973-5>
299. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, et al. Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2001 Aug 1;60(8):759–67. Available from: <https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1093/jnen/60.8.759>
 300. Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2019 Mar 8;20(3):148–60. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41583-019-0132-6>
 301. Cochran JN, Hall AM, Roberson ED. The dendritic hypothesis for Alzheimer’s disease pathophysiology. *Brain Res Bull* [Internet]. 2014 Apr;103:18–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923013001937>
 302. Mehder RH, Bennett BM, Andrew RD. Age-Related Neuronal Deterioration Specifically Within the Dorsal CA1 Region of the Hippocampus in a Mouse Model of Late Onset Alzheimer’s Disease. Ferreira S, editor. *J Alzheimer’s Dis* [Internet]. 2021 Feb 16;79(4):1547–61. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-201024>
 303. Liu Z, Li T, Li P, Wei N, Zhao Z, Liang H, et al. The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer’s Disease. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2015;2015:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/352723/>
 304. Flannery PJ, Trushina E. Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer’s disease. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2019 Jul;98:109–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044743119300946>
 305. Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease, Parkinson’s Disease, and Huntington’s Disease: A Mini Review. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016;2016:1–15. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/8590578/>
 306. Jantas D, Chwastek J, Malarz J, Stojakowska A, Lasoń W. Neuroprotective Effects of Methyl Caffeate against Hydrogen Peroxide-Induced Cell Damage: Involvement of Caspase 3 and Cathepsin D Inhibition. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Nov 9;10(11):1530. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/11/1530>

307. Turkez H, Togar B, Di Stefano A, Taspınar N, Sozio P. Protective effects of cyclosativene on H₂O₂-induced injury in cultured rat primary cerebral cortex cells. *Cytotechnology* [Internet]. 2015 Mar 4;67(2):299–309. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10616-013-9685-9>
308. Pratiwi R, Nantasenamat C, Ruankham W, Suwanjang W, Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, et al. Mechanisms and Neuroprotective Activities of Stigmasterol Against Oxidative Stress-Induced Neuronal Cell Death via Sirtuin Family. *Front Nutr* [Internet]. 2021 May 12;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.648995/full>
309. Ribeiro IML, Pereira WL, Nogueira LB, Oliveira LAM, Teixeira RR, Nogueira K de OPC. Neuroprotective Effect of Isobenzofuranones on Hydrogen Peroxide-Mediated Redox Imbalance in Primary Cultures of Hippocampal Neurons. *Brazilian Arch Biol Technol* [Internet]. 2020;63. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132020000100413&tlng=en
310. Hasan SM, Joe M, Alshuaib WB. Oxidative Stress Alters Physiological and Morphological Neuronal Properties. *Neurochem Res* [Internet]. 2007 Jul 28;32(7):1169–78. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11064-007-9287-z>
311. Kirch C, Gollo LL. Single-neuron dynamical effects of dendritic pruning implicated in aging and neurodegeneration: towards a measure of neuronal reserve. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Jan 14;11(1):1309. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-78815-z>
312. Cooper S, Teoh H, Campeau MA, Verma S, Leask RL. Empagliflozin restores the integrity of the endothelial glycocalyx in vitro. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2019 Sep 24;459(1–2):121–30. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-019-03555-2>
313. Yang C-C, Chen Y-T, Wallace CG, Chen K-H, Cheng B-C, Sung P-H, et al. Early administration of empagliflozin preserved heart function in cardiorenal syndrome in rat. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 Jan;109:658–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S07533332218344184>
314. Infante-Garcia C, Ramos-Rodriguez JJ, Galindo-Gonzalez L, Garcia-Alloza M. Long-term central pathology and cognitive impairment are exacerbated in a mixed model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Psychoneuroendocrinology* [Internet].

- 2016 Mar;65:15–25. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306453015300238>
315. Zagrebelsky M, Tacke C, Korte M. BDNF signaling during the lifetime of dendritic spines. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2020 Oct 14;382(1):185–99. Available from:
<https://link.springer.com/10.1007/s00441-020-03226-5>
 316. Piątkowska-Chmiel I, Herbet M, Gawrońska-Grzywacz M, Pawłowski K, Ostrowska-Leśko M, Dudka J. Molecular and neural roles of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in alleviating neurocognitive impairment in diabetic mice. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2023 Apr 4;240(4):983–1000. Available from:
<https://link.springer.com/10.1007/s00213-023-06341-7>
 317. Justin-Thenmozhi A, Dhivya Bharathi M, Kiruthika R, Manivasagam T, Borah A, Essa MM. Attenuation of Aluminum Chloride-Induced Neuroinflammation and Caspase Activation Through the AKT/GSK-3 β Pathway by Hesperidin in Wistar Rats. *Neurotox Res* [Internet]. 2018 Oct 23;34(3):463–76. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s12640-018-9904-4>
 318. Kocovski P, Dang PT, D’Souza CS, Stamper CE, Hale MW, Orian JM. Differential anxiety-like responses in NOD/ShiLtJ and C57BL/6J mice following experimental autoimmune encephalomyelitis induction and oral gavage. *Lab Anim* [Internet]. 2018 Oct 14;52(5):470–8. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0023677218756156>
 319. Unnisa A, Chettupalli AK, Al Hagbani T, Khalid M, Jandrajupalli SB, Chandolu S, et al. Development of Dapagliflozin Solid Lipid Nanoparticles as a Novel Carrier for Oral Delivery: Statistical Design, Optimization, In-Vitro and In-Vivo Characterization, and Evaluation. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2022 May 2;15(5):568. Available from:
<https://www.mdpi.com/1424-8247/15/5/568>
 320. Dong M, Wen S, Zhou L. The Relationship Between the Blood-Brain-Barrier and the Central Effects of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists and Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* [Internet]. 2022 Aug;Volume 15:2583–97. Available from: <https://www.dovepress.com/the-relationship-between-the-blood-brain-barrier-and-the-central-effec-peer-reviewed-fulltext-article-DMSO>
 321. Alavian F, Shams N. Oral and Intra-nasal Administration of Nanoparticles in the Cerebral Ischemia Treatment in Animal Experiments: Considering its Advantages and Disadvantages. *Curr Clin Pharmacol* [Internet]. 2020 May 5;15(1):20–9. Available

- from: <http://www.eurekaselect.com/173233/article>
322. Lopez OL, Kuller LH. Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias. In 2019. p. 139–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128047668000091>
323. Ciaccio M, Lo Sasso B, Scazzone C, Gambino CM, Ciaccio AM, Bivona G, et al. COVID-19 and Alzheimer's Disease. *Brain Sci* [Internet]. 2021 Feb 27;11(3):305. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3425/11/3/305>
324. Tramutola A, Arena A, Cini C, Butterfield DA, Barone E. Modulation of GLP-1 signaling as a novel therapeutic approach in the treatment of Alzheimer's disease pathology. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2017 Jan 2;17(1):59–75. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737175.2017.1246183>
325. Sutphen CL, Jasielec MS, Shah AR, Macy EM, Xiong C, Vlassenko AG, et al. Longitudinal Cerebrospinal Fluid Biomarker Changes in Preclinical Alzheimer Disease During Middle Age. *JAMA Neurol* [Internet]. 2015 Sep 1;72(9):1029. Available from: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaneurol.2015.1285>
326. Mattsson N, Smith R, Strandberg O, Palmqvist S, Schöll M, Insel PS, et al. Comparing 18 F-AV-1451 with CSF t-tau and p-tau for diagnosis of Alzheimer disease. *Neurology* [Internet]. 2018 Jan 30;90(5). Available from: <https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.0000000000004887>
327. Cai H, Cong W, Ji S, Rothman S, Maudsley S, Martin B. Metabolic Dysfunction in Alzheimers Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Curr Alzheimer Res* [Internet]. 2012 Jan 1;9(1):5–17. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2050&volume=9&issue=1&spage=5>