



Master Thesis:

In Vivo Study of Synthetic Neurotrophin Analogs in the 5xFAD Animal Model of Alzheimer's Disease

[Regenerative Pharmacology Lab](#)

Supervisor: Ioannis Charalampopoulos

Student: Marouso Velissariou

A.M.: 1040179

Three-member committee:

Prof. Ioannis Charalampopoulos, Medical School
Prof. Kyriaki Sidiropoulou, Department of Biology
Prof. Emmanouil Froudarakis, Medical School

In Vivo Study of Synthetic Neurotrophin Analogs in the 5xFAD Animal Model of Alzheimer's Disease

Abstract:

Neurotrophins are a family of growth factors including NGF, BDNF, NT3, NT4, and promote the survival, development, and even apoptosis of neurons. These growth factors exert their functions through specific transmembrane receptors to which they bind. The two main categories of neurotrophin receptors are p75NTR and TRK receptors, which are further subdivided into TRKA, TRKB, and TRKC. Each TRK receptor has specific binding sites for different neurotrophin families; namely, NGF binds to TRKA, BDNF and NT4 to TRKB, and NTR3 to TRKC. Following the binding of neurotrophins to TRK receptors, these receptors dimerize, subsequently activating signaling pathways that lead to neuronal survival or differentiation. In the neurodegenerative disease Alzheimer's disease, neuronal apoptosis and loss of synaptic connections are observed in the cortex. Previous studies have shown that neurotrophin production is reduced in a degenerated brain, leaving neurons unprotected from apoptosis. This makes neurotrophins and cellular apoptosis an important therapeutic target for such diseases. However, neurotrophins are unable to cross the blood-brain barrier and have poor pharmacokinetics. For these reasons, this study will investigate a novel synthetic agonist, specific and selective for the TRKB neurotrophin receptor, ENT-A061. This agonist has been shown to have neuroprotective and neuroregenerative properties in primary neuronal cell cultures. The structure of ENT-A061 is based on that of BNN27, a synthetic microneurotrophin, which is a neurosteroid derivative, can cross the blood-brain barrier, and is specific for the receptor to which it binds. In this study, the properties of the agonist ENT-A061 will be examined through its effects on male hemizygous 5xFAD genotype mice and wild-type male mice. 5xFAD mice express human genes (e.g., APP) with a set of five mutations that have been associated with Alzheimer's disease and exhibit its phenotypes, such as neuronal loss and amyloid plaque accumulation. Mice from both the 5xFAD and wild-type genotype categories will be administered the agonist ENT-A061 as well as placebo, thereby creating four different groups. All animals will undergo behavioral memory tests. Following these experiments, the brains of the animals will be isolated for histological and biochemical analyses.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Δ.Π.Μ.Σ.: ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ ΚΑΙ ΝΟΥΣ

Διπλωματική εργασία:

Ιn vivo μελέτη συνθετικών αναλόγων νευροτροφινών στο ζωϊκό μοντέλο 5xFAD της Νόσου Αλτσχάιμερ

[Εργαστήριο Αναγεννητικής Φαρμακολογίας](#)

Υπεύθυνος καθηγητής: Ιωάννης Χαραλαμπίδης

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Μαρουσώ Βελισσαρίου

A.M.: 1040179

Τριμελής επιτροπή:

Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιωάννης Χαραλαμπίδης, Σχολή Ιατρικής

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Κυριακή Σιδηροπούλου, Τμήμα Βιολογίας

Επίκουρος Καθηγητής Νευροφυσιολογίας, Μανώλης Φρουδαράκης, Σχολή Ιατρικής

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Σκοπός της εργασίας.....	22
2. Μέθοδοι και Υλικά.....	23
3. Αποτελέσματα.....	32
4. Συζήτηση.....	44
5. Συμπεράσματα.....	48
6. Βιβλιογραφία.....	50

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω την βαθιά μου ευγνωμοσύνη στον επιβλέποντα καθηγητή κύριο Ιωάννη Χαραλαμπόπουλο καθώς μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του. Επιπλέον για μένα καίριας βοήθειας ήταν οι συμβουλές και η καθοδήγησή του κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Αναγεννητικής Φαρμακολογίας αλλά και στη συγγραφή της εργασίας αυτής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Γεωργία Γρηγορίου ως διευθύντρια του διεπιστημονικού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών Εγκέφαλος και Νους. Για μένα πολύ σημαντική υπήρξε η καθοδήγηση και οι συμβουλές που έλαβα από τον σύμβουλο καθηγητή μου κ. Ιωάννη Δαλέζιο. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, στα μόνιμα μέλη αλλά και σε όσα άτομα πέρασαν από αυτό, καθώς όλοι συνέβαλλαν στην δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος. Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Θανάση Ρογδάκη, για τη αρμονική συνεργασία που είχαμε αλλά και για το γεγονός πως με καθοδηγούσε και συμβούλευε σε όλη τη διάρκεια της παραμονής μου σε αυτό το εργαστήριο. Τέλος ακόμη, είναι πολύ σημαντικό για μένα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τις συμβουλές και τη βοήθεια που μου παρείχε απλόχερα η μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κανελίνα Καραλή.

Περίληψη

Οι νευροτροφίνες είναι μία οικογένεια αυξητικών παραγόντων στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι NGF, BDNF, NT3, NT4 και προωθούν την επιβίωση, την ανάπτυξη αλλά και την απόπτωση των νευρώνων. Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες διεκπεραιώνουν τις λειτουργίες τους, μέσω ειδικών διαμεμβρανικών υποδοχέων στους οποίους προσδένονται. Οι δύο κύριες κατηγορίες υποδοχέων νευροτροφινών είναι ο p75^{NTR} και οι TRK υποδοχείς, οι οποίοι διακρίνονται σε TRKA, TRKB, TRKC. Κάθε TRK υποδοχέας έχει ειδικές θέσεις πρόσδεσης για τα διαφορετικά μέλη νευροτροφινών, δηλαδή, ο NGF προσδένεται στον TRKA, οι BDNF και NT4 στον TRKB και ο NT3 στον TRKC. Μετά την πρόσδεση των νευροτροφινών στους TRK υποδοχείς, οι υποδοχείς διμερίζονται ενεργοποιώντας στη συνέχεια σηματοδοτικά μονοπάτια, κι οδηγώντας τελικά στην επιβίωση ή τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Κατά τη νευροεκφυλιστική νόσο Αλτσχάιμερ (Alzheimer's Disease), στον εγκέφαλο παρατηρούνται απόπτωση νευρικών κυττάρων κι απώλεια συναπτικών συνδέσεων στο φλοιό. Από προηγούμενες μελέτες έχει παρατηρηθεί πως σε έναν εκφυλισμένο εγκέφαλο η παραγωγή νευροτροφινών είναι μειωμένη, αφήνοντας τα νευρικά κύτταρα απροστάτευτα από αποπτωτικές διαδικασίες. Η διατήρηση επομένως των επιπέδων των νευροτροφινών και η νευροπροστατευτική τους δράση έναντι της κυτταρικής απόπτωσης, τις καθιστούν σημαντικό θεραπευτικό στόχο για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Παρ' όλα αυτά, οι νευροτροφίνες δεν είναι ικανές να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και έχουν ασταθή φαρμακοκινητική, αδυνατώντας έτσι να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά σχήματα. Για αυτούς τους λόγους στη συγκεκριμένη μελέτη θα ελεγχθεί ένας νέος συνθετικός αγωνιστής, ειδικός και εκλεκτικός για τον TRKB υποδοχέα νευροτροφινών, ο ENT-A061. Ο αγωνιστής αυτός έχει αποδειχθεί πως έχει νευροπροστατευτικές και νευροαναγεννητικές ιδιότητες σε καλλιέργειες πρωτογενών νευρικών κυττάρων. Η δομή του ENT-A061 είναι βασισμένη σε αυτήν του BNN27, μίας συνθετικής μικρονευροτροφίνης, που είναι παράγωγο του νευροστεροειδούς Διϋδροεπιανδροστερόνη, διαπερνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και είναι ειδική για τους νευροτροφικούς υποδοχείς που προσδένεται. Στη συγκεκριμένη μελέτη θα εξεταστούν οι ιδιότητες του αγωνιστή ENT-A061, μέσω των επιδράσεών του σε

αρσενικούς ετεροζυγώτες μύες γονότυπου 5xFAD και σε αρσενικούς μύες αγρίου τύπου. Οι μύες 5xFAD εκφράζουν γονίδια του ανθρώπου (π.χ. APP) με ένα σύνολο από πέντε μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο Αλτσχάιμερ και εμφανίζουν φαινότυπούς της, όπως απώλεια νευρώνων και συσσώρευση πλακών αμυλοειδούς. Μύες και από τις δύο διαφορετικές κατηγορίες γονότυπου, 5xFAD και αγρίου τύπου, θα υποβληθούν στη χορήγηση του αγωνιστή ENT-A061 αλλά και placebo, δημιουργώντας έτσι τέσσερις διαφορετικές ομάδες. Όλα τα ζώα θα υποβληθούν σε συμπεριφορικά πειράματα μνήμης. Με το πέρας αυτών των πειραμάτων, θα απομονωθούν οι εγκέφαλοι των ζώων για ιστολογικές και βιοχημικές αναλύσεις.

1. Εισαγωγή

Ο εγκέφαλος είναι από τα πιο πολύπλοκα και σημαντικότερα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού. Σε αυτόν οφείλεται η δημιουργία της κάθε σκέψης, δράσης, μνήμης και πολλών άλλων σημαντικών λειτουργιών του ατόμου. Αποτελείται από δισεκατομμύρια νευρικά κύτταρα τα οποία συνδέονται μέσω συνάψεων και η συνδεσιμότητά τους είναι σύνθετη, ακριβής αλλά και ρυθμιζόμενη ανάλογα των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Η νευροεπιστήμη αποτελεί μία διεπιστημονική προσέγγιση στη μελέτη του εγκεφάλου, συνδυάζοντας τομείς όπως της βιολογίας, της ψυχολογίας και του προγραμματισμού. Μεγάλο μέρος της έρευνας στην νευροεπιστήμη έχει αφιερωθεί στην μελέτη των νευροεκφυλιστικών νόσων όπως είναι η νόσος Αλτσχάιμερ (AD), η νόσος Πάρκινσον (PD) και άλλες νόσοι που σχετίζονται με την ηλικία και αφορούν πολλά εκατομμύρια ανθρώπων παγκοσμίως (Yeung et al., 2018).

1.1 Οι Νευροτροφίνες

Οι νευροτροφίνες αποτελούν μία οικογένεια πρωτεϊνών με μεγάλο μοριακό βάρος που έχουν χαρακτηριστεί ως επαγωγείς νευρωνικής επιβίωσης και ανάπτυξης καθώς και ως ρυθμιστές πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τα δενδριτικά δίκτυα και τη συναπτική πλαστικότητα. Έχει ανακαλυφθεί η ικανότητα των νευροτροφινών να αποτρέπουν ή να αναστρέφουν τη νευρωνική εκφύλιση, να προωθούν την αναγέννηση και να ενδυναμώνουν την συναπτική πλαστικότητα σε διάφορα *in vitro* και *in vivo* μοντέλα (Longo & Massa, 2013). Οι ανακαλύψεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα πως η συγκεκριμένη ομάδα πρωτεϊνών είναι σημαντικός θεραπευτικός στόχος. Οι νευροτροφικοί παράγοντες εκκρίνονται από τα νευρικά και γλοιακά κύτταρα και δρουν προωθώντας την νευρική επιβίωση.

Η απαρχή της έρευνας των αυξητικών παραγόντων νευροτροφινών έγινε με την ανακάλυψη του nerve growth factor (NGF) από τους βραβευθέντες με το Βραβείο Νόμπελ το 1956, Rita Levi-Montalcini και Stanley Cohen. Μαζί με τον NGF στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί ακόμη οι εξής τρεις νευροτροφίνες: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), and neurotrophin-4/5 (NT-4/5). Αυτοί οι πολυπεπτιδικοί παράγοντες ονομάστηκαν νευροτροφίνες και ανήκουν στην ίδια πρωτεϊνική οικογένεια καθώς εξελικτικά προέρχονται

από δύο διπλασιασμούς κοινών προγονικών γονιδίων, και μοιράζονται μέρος της δομής και αλληλουχίας τους (Hallböök, 1999).

Ο NGF είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και τη διατήρηση των νευρώνων καθώς έχει προ-αποπτωτικές και νευροτροφικές ιδιότητες. Αρχικά παράγεται η πρόδρομη μορφή του, proNGF, η οποία στη συνέχεια μπορεί να διασπαστεί ενζυμικά ενδοκυττάρια στην ώριμη και ενεργή μορφή του NGF, να διασπαστεί εξωκυττάρια ή να παραμείνει στη πρόδρομη μορφή της. Υπάρχουν δύο υποδοχείς στους οποίους προσδένεται ο NGF, ο p75 υποδοχέας νευροτροφινών (p75^{NTR}), ο οποίος είναι μία χαμηλής χημικής συγγένειας διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και μη ειδικός υποδοχέας όλων των νευροτροφινών, και ο υψηλής χημικής συγγένειας tropomyosin receptor kinase A (TrkA) (Hempstead et al., 1991). Η πρόσδεση του NGF στον p75^{NTR} του κυττάρου στόχου, μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση του κυττάρου, σε περίπτωση μειωμένης ή μη έκφρασης του υποδοχέα TrkA. Αντίθετα, η πρόσδεση του NGF στον TrkA, οδηγεί σε σηματοδοτικό καταράκτη χαρακτηριστικό των υποδοχέων κινάσες τυροσίνης (Sofroniew et al., 2001), επάγοντας προ-επιβιωτικά μονοπάτια. Ο NGF και οι υποδοχείς του παράγονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, της ενήλικης ζωής και κατά τη γήρανση, και εκφράζονται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, στο ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και σε άλλους ιστούς. Ο NGF κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της αντίληψης του πόνου, μεσολαβώντας τη δράση του μέσω του TrkA που εκφράζεται στους αισθητικούς νευρώνες του πόνου, καθώς σε περιπτώσεις τραύματος, οδηγεί σε ισχυρότερο σήμα πόνου από τον τραυματισμένο ιστό και σε ισχυρότερη σηματοδότηση από το περιφερικό στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Barker et al., 2020). Ο NGF έχει δοκιμασθεί κλινικά για τη θεραπεία διάφορων παθήσεων όπως έλκη και νευροπάθειες, παθήσεις του κεντρικού αλλά και του περιφερικού νευρικού συστήματος. Όσον αφορά το κεντρικό νευρικό σύστημα και τις νευροεκφυλιστικές νόσους, έρευνες αποδεικνύουν πως η χορήγηση του NGF, οδήγησε σε επιβίωση των χολινεργικών νευρώνων, οι οποίοι είναι γνωστό ότι εκφυλίζονται σε ασθένειες που σχετίζονται με το πέρας της ηλικίας όπως είναι η νόσος Αλτσχάιμερ (Aloe et al., 2015). Διαφορετικοί τρόποι χορήγησης του NGF αλλά και οι ευεργετικές δράσεις του, καθιστούν τη συγκεκριμένη νευροτροφίνη αντικείμενο έρευνας.

Μερικές δεκαετίες αργότερα από την απομόνωση του NGF, απομονώθηκε ο BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) το 1982, ως το δεύτερο μέλος της οικογένειας των νευροτροφινών, καθώς απομονώθηκε από εγκέφαλο γουρουνιού και φάνηκε να προωθεί την

επιβίωση αισθητικών νευρώνων (Bardé et al., 1982). Ο BDNF μοιράζεται την αμινοξική αλληλουχία του σε βαθμό 50% με τις υπόλοιπες νευροτροφίνες (Rodríguez-Tebar et al., 1991). Επιπλέον, ο συγκεκριμένος αυξητικός παράγοντας προσδένεται και εκτελεί τις λειτουργίες του μέσω του υψηλής συγγένειας υποδοχέα νευροτροφινών TrkB (Fryer et al., 1997). Το mRNA του BDNF και η πρωτεΐνη BDNF εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στον ιππόκαμπο στην κοκκώδη περιοχή της οδοντωτής έλικας. Επιπροσθέτως, το σύμπλοκο BDNF και TrkB βρίσκεται διάχυτο σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα (Conner et al., 1997), και απαντάται κυρίως σε γλουταμεργικές διεγερτικές συνάψεις, ενδυναμώνοντάς τις (επαγωγή του Long Term Potentiation, LTP), και μπορεί να αποδυναμώνει ανασταλτικές GABAεργικές συνάψεις. Έτσι ο BDNF καθίσταται πολύ σημαντικός για τη συναπτική πλαστικότητα. Μέσω της εμπλοκής του στη συναπτική πλαστικότητα έχει συσχετιστεί και με γνωστικές διαδικασίες όπως είναι η μνήμη και η μάθηση (Cunha, 2010). Επιπλέον, ο BDNF έχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της νευρογένεσης, καθώς έχει βρεθεί πως η χορήγησή του μπορεί να οδηγήσει στην διαφοροποίηση ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων και στην δημιουργία νέων νευρώνων (Sairanen et al., 2015). Αντίθετα, μειωμένα ποσοστά πρωτεΐνης BDNF έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ και η νόσος Πάρκινσον, στον ιππόκαμπο και τη Υπομέλαινα Ουσία αντίστοιχα (Binder & Scharfman, 2004).

Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν δύο ακόμη μέλη της οικογένειας των νευροτροφινών, οι NT-3 και NT-4/5. Η NT-3 όπως και ο BDNF ενεργοποιεί τον υποδοχέα TrkB αλλά και τον TrkC. Ο συγκεκριμένος αυξητικός παράγοντας συμμετέχει ενεργά στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος καθώς εκφράζεται από την αρχή της νευρογένεσης και καθ' όλη την υπόλοιπη ζωή του οργανισμού. Οι μύες που δεν εκφράζουν NT-3 παρουσιάζουν έλλειψη συμπαθητικών, ιδιοδεκτικών και μηχανοϋποδεκτικών αισθητικών νευρώνων καθώς επίσης σημαντικά προβλήματα στην κίνηση και μειωμένο αριθμό γλοιακών κυττάρων (Hernández-Echeagaray, 2020). Η νευροτροφίνη NT-4/5, σηματοδοτεί αποκλειστικά μέσω του TrkB, και προωθεί την επιβίωση των κινητικών και αισθητικών νευρώνων (Gu et al., 2015).

1.2 Οι υποδοχείς Νευροτροφινών

Υποδοχείς Κινάσης Τυροσίνης

Οι τέσσερις νευροτροφίνες NGF, BDNF, NT-3 and NT-4/5 προσδέονται και ενεργοποιούν έναν ή περισσότερους υποδοχείς της Trk οικογένειας ή τον p75 υποδοχέα νευροτροφινών. Μέσω αυτών των υποδοχέων, ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη και την λειτουργία του νευρικού συστήματος. Οι Trk πρωτεΐνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες single-pass τύπου 1. Πιο συγκεκριμένα έχουν ένα εξωκυτταρικό τμήμα στο οποίο δεσμεύεται ο προσδέτης, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα με καταλυτική ικανότητα τυροσίνης κινάσης (Ivanisevic & Saragoni, 2013). Ο TrkA αλληλεπιδρά με τον NGF, ο TrkB με τους BDNF και NT-4 και ο TrkC με τον NT-3 (Εικόνα 1). Με τη δέσμευση κάποιου νευροτροφικού παράγοντα στον υποδοχέα, ο υποδοχέας αυτός διμερίζεται και αυτοφωσφορυλιώνονται κατάλοιπα τυροσίνης στο ενδοκυτταρικό τμήμα του. Με αυτήν την φωσφορυλίωση προωθείται η σηματοδότηση, καθώς δημιουργούνται σημεία πρόσδεσης πρωτεϊνών που θα φέρουν σε επαφή τον εκάστοτε υποδοχέα με ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Στα μονοπάτια αυτά συμπεριλαμβάνονται το μονοπάτι της PLCγ (φωσφολιπάση γ), της Ras/MAPK (πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο παράγοντα) και της PI3K/Akt (3-κινάση φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης). Τα μονοπάτια αυτά οδηγούν τελικά στην αύξηση των ιόντων ασβεστίου του κυτταροπλασματικού δικτύου, στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων και στην ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση πρωτεϊνών, προωθώντας έτσι την επιβίωση των νευρώνων αλλά και τη νευρωνική διαφοροποίηση (Pataroutian & Reichardt, 2001; Friedman, 2012). Συγκεκριμένα στην περίπτωση της PLCγ, όταν φωσφορυλιωθούν κατάλοιπα των υποδοχέων τυροσίνης κινάσης, η PLCγ προσδέεται σε αυτά και ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση των υποδοχέων. Η ενεργοποιημένη μορφή της φωσφολιπάσης γ στη συνέχεια, υδρολύει την φωσφοτιδυλινοσιτόλη 4,5-διφωσφορική (PIP₃) σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃) και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η IP₃ προωθεί την έκλυση ιόντων ασβεστίου από ενδοκυτταρικές αποθήκες, γεγονός που επηρεάζει τη συναπτική πλαστικότητα. Τέλος, η DAG ενεργοποιεί ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης C που ρυθμίζεται από τη DAG, οδηγώντας έτσι σε μεταγραφικές αλλαγές (Huang & Reichardt, 2003; Uren & Turnley, 2014). Το άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιούν οι TRK υποδοχείς είναι αυτό της MAP κινάσης. Όταν ο υποδοχέας διμερίζεται, η μικρή G πρωτεΐνη ras ενεργοποιεί το MAPK σηματοδοτικό καταρράκτη, ο οποίος οδηγεί με τη σειρά του στην ενεργοποίηση του ERK. Ο ERK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο CREB, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την νευρωνική διαφοροποίηση (Friedman, 2012).

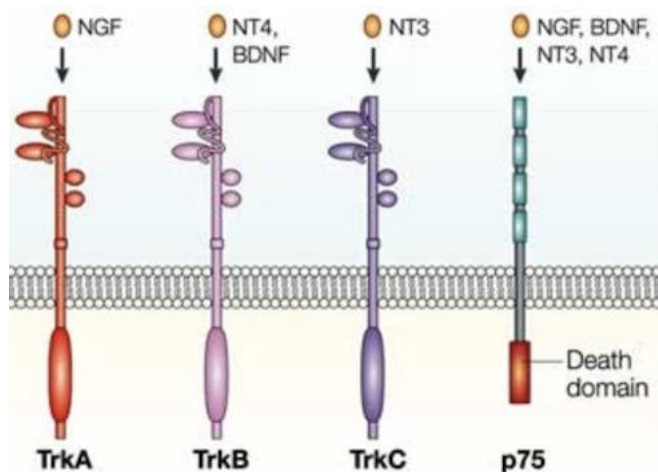
Όσον αφορά τις PI3K/Akt, ο καταρράκτης ξεκινάει όταν η PI3K προσδεθεί στην ενεργοποιημένη κινάση τυροσίνης του υποδοχέα ή στην πρωτεΐνη Ras. Έτσι, η PI3K ενεργοποιείται και καταλύει τη δημιουργία του PIP3. Αυτός ο δεύτερος αγγελιοφόρος ενεργοποιεί την κινάση σερίνης-θρεονίνης Akt, η οποία όταν ενεργοποιηθεί, μπορεί να φωσφορυλιώσει διάφορες πρωτεΐνες (Hemmings & Restuccia, 2015). Η ενεργοποίηση της Akt προκαλεί έναν καταρράκτη γεγονότων που οδηγεί στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών οι οποίες σχετίζονται με την επιβίωση και την απόπτωση, προωθώντας έτσι τη νευρωνική επιβίωση (Friedman, 2012).

Ο TrkA εντοπίζεται κυρίως στους χολινεργικούς νευρώνες του προμετωπιαίου φλοιού, καθώς και ο NGF εντοπίζεται στον ιππόκαμπο και το φλοιό που δέχονται σήμα από αυτήν την περιοχή. Αντίστοιχα ο BDNF επηρεάζει πολλούς νευρωνικούς πληθυσμούς σε όλον τον εγκέφαλο, και σε συνέπεια με αυτό το εύρημα ο TrkB βρίσκεται σε όλη την περιοχή του ιππόκαμπου και του φλοιού (Friedman, 2012). Ο TrkC απαντάται κυρίως στο ραβδωτό σώμα (Keefe & Horner, 2016).

Υποδοχέας p75^{NTR}

Ο υποδοχέας p75^{NTR} ήταν ο πρώτος υποδοχέας που ανακαλύφθηκε από την οικογένεια υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων. Είναι ένας γλυκοζυλιωμένος διαμεμβρανικός υποδοχέας και μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor receptor, TNFR, family). Ο p75^{NTR} είναι περισσότερο γνωστός για το ότι προωθεί την κυτταρική απόπτωση στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα καθώς και για την έκφρασή του μετά από τραυματισμό ή σε νευροπαθολογικές περιπτώσεις. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ένας χαμηλής συγγένειας υποδοχέας για όλες τις νευροτροφίνες (Εικόνα 1). Ο p75^{NTR} δεν έχει κάποια εγγενή ενζυματική ιδιότητα όπως οι υποδοχείς Trk, έτσι η σηματοδότηση μέσω αυτού χρειάζεται τη στρατολόγηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών πρόσδεσης (Kenchappa et al., 2013). Ο p75^{NTR} μπορεί να αλλάζει την ειδικότητα του προσδέτη στους Trk υποδοχείς. Οι νευροτροφίνες BDNF, NT3 και NT4/5 προσδέονται στον TrkB με την απουσία του p75^{NTR}, ενώ με τη συνέκφραση p75^{NTR} με TrkB μόνο ο BDNF οδηγεί σε λειτουργική απόκριση. Επιπλέον, όταν συνεκφράζονται, οι TrkA και p75^{NTR} αποτελούν ένα σύμπλοκο υψηλής συγγένειας, το οποίο αυξάνει την ειδικότητα με την οποία ο NGF προσδέεται στον TrkA και ενδυναμώνει τη σηματοδότηση μέσω της τυροσίνης κινάσης και των σηματοδοτικών γεγονότων που συνεπάγονται. Αναλύσεις της δομικής λειτουργίας των

Trk υποδοχέων προτείνουν πως όταν συνεκφράζονται με τον p75^{NTR}, η δομή τους αλλάζει ώστε να παρέχει επιπλέον σημεία πρόσδεσης με νευροτροφίνες (Zaccaro et al., 2001). Έχει παρατηρηθεί η αύξηση του υποδοχέα p75^{NTR}, μετά από βλάβες στο νευρικό σύστημα, όπως για παράδειγμα βλάβες στη σπονδυλική στήλη ή σε επιληπτικές κρίσεις και οδηγεί σε απόπτωση. Επιπρόσθετα, η αυξημένη έκφρασή του παρατηρείται σε νευροπαθολογίες όπως στην ισχαιμία, στο εγκεφαλικό, στην νόσο Αλτσχάιμερ, οδηγώντας έτσι τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος υποδοχέας παίζει ρόλο στις νευροπαθολογικές ασθένειες (Kokaia et al., 1998; Kenchappa et al., 2013). Όπως και άλλα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων, ο p75^{NTR} ενεργοποιεί την c-Jun N-terminal κινάση (JNK), η οποία είναι απαραίτητη για την επαγωγή της απόπτωσης (Casaccia-Bonnet et al., 1996; Kenchappa et al., 2013). Η κινάση JNK ενεργοποιείται από μιτογόνους παράγοντες και από το στρες (MAPK, SAPK) και έχει βρεθεί πως το σηματοδοτικό μονοπάτι αυτής της οικογένειας κινασών ενεργοποιείται επίσης όταν σε νευρώνες που εκφράζουν τους p75 υποδοχείς νευροτροφινών, χορηγηθεί το πεπτίδιο Αβ, γεγονός που επιβεβαιώνει την σύνδεση μεταξύ των JNK και της απόπτωσης (Yaar et al., 2002). Επιπλέον έρευνες αποδεικνύουν πως οι JNK, ενισχύουν την παραγωγή του Αβ και επιπλέον βοηθούν στην ωρίμανση και ανάπτυξη των νευροϊνιδιακών σωματιδίων (Yarza et al., 2016). Υπάρχουν τρία διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν τις JNK, τα JNK1, JNK2, and JNK3 (Davis, 2000). Η JNK ενεργοποιείται από τις JNK κινάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται από τις JNKKKs. Συγκεκριμένα η JNK ενεργοποιείται από τις MAPK2K (τις MKK4 και MKK7), οι οποίες είναι φωσφορυλιωμένες στα κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης. Οι MAPK2K ρυθμίζονται από τις MAP3K και MAP4K πρωτεΐνες. Ύστερα από την ενεργοποίησή της, η JNK φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες στόχους κατώτερα στο μονοπάτι, όπως διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του c-Jun (Hammouda et al., 2020). Επιπλέον, η JNK μέσω της φωσφορυλίωσης επιδρά στη δραστηριότητα μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση (Weston & Davis, 2007).



Εικόνα 1. Οι νευροτροφίνες και η επιλεκτική τους πρόσδεση στους υποδοχείς τυροσίνης κινάσης ή στον υποδοχέα νευροτροφινών p75 (Chao, 2003).

1.3 Η νόσος Αλτσχάιμερ

Νευροεκφύλιση

Νευροεκφύλιση είναι η διαδικασία που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη νευρωνική βλάβη και κυτταρικό θάνατο, και απαντάται κατά την πάροδο της ηλικίας του ατόμου και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα, προκαλώντας κατάρρευση στην συνδεσιμότητα και στην επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων και άρα αποδεκατίζονται οι συνάψεις και οι νευράξονες και έτσι οι νευρώνες οδηγούνται στο θάνατο (Wareham et al., 2022). Οι κύριοι μηχανισμοί που οδηγούν στη νευροεκφύλιση θεωρούνται πολυπαραγοντικοί και σχετίζονται με γενετικούς, περιβαλλοντικούς και ενδογενείς μηχανισμούς. Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι κατηγοριοποιούνται με βάση γνωστούς γενετικούς μηχανισμούς ή/και σημαντικά ποσά εναπόθεσης πρωτεϊνών. Οι νόσοι που χαρακτηρίζονται από βασικές αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών, χαρακτηρίζονται ως νόσοι με λάθος αναδίπλωση πρωτεϊνών (protein misfolding diseases) ή πρωτεϊνοπάθειες (Jellinger, 2010). Στις πρωτεϊνοπάθειες συγκαταλέγονται η νόσος Αλτσχάιμερ, η νόσος Πάρκινσον, η ατροφία πολλαπλών συστημάτων και άλλες.

Η νόσος Αλτσχάιμερ

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μία προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος που αποτελεί την πιο συχνή αιτία άνοιας στους ηλικιωμένους και προκαλεί στην σταδιακή απώλεια γνωστικών λειτουργιών και τελικά οδηγεί στον θάνατο. Το 1907, ο Alois Alzheimer, νευροψυχίατρος από

τη Γερμανία, περιέγραψε την περίπτωση μίας γυναίκας 51 ετών η οποία παρουσίασε σχετικά γρήγορη επιδείνωση μνήμης, μαζί με άλλες ψυχιατρικές διαταράξεις, η οποία κατέληξε έπειτα από τέσσερα χρόνια. Αυτό που έκανε την συγκεκριμένη περίπτωση ιδιαίτερη είναι η σχετικά νεαρή ηλικία της ασθενούς μαζί με το καινούργιο εύρημα, τα νευροϊνιδιακά δεμάτια (neurofibrillary tangle-NFT). Η νόσος Αλτσχάιμερ αποτελεί τη συχνότερη μορφή άνοιας στον γηραιό πληθυσμό καθώς συνοδεύει περίπου το 70% των ανοϊκών ατόμων άνω των 60 ετών. Πέρα από την ηλικία άλλοι παράγοντες κινδύνου αποτελούν το οικογενειακό ιστορικό άνοιας, το τραύμα στην κεφαλή, οι γενετικοί παράγοντες, οι αγγειακές νόσοι και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (Castellani et al., 2010). Υπάρχουν τρεις τύποι της νόσου Αλτσχάιμερ, ο πρώτος αφορά την πρόωρη έναρξη της (Early-onset Alzheimer's), συγκεκριμένα πριν τα 65 έτη της ζωής των ατόμων, αφορά συνήθως μικρό ποσοστό των ασθενών, και είναι πιο συχνό σε άτομα με σύνδρομο Down, καθώς ένα γονίδιο (APP) σημαντικό για την εμφάνιση πλακών αμυλοειδούς βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21. Στον δεύτερο τύπο παρατηρείται πιο αργή εμφάνιση των συμπτωμάτων (Late-onset Alzheimer's), αργότερα από τα 65 έτη ζωής, ενώ ο τρίτος τύπος της νόσου, είναι γενετικά κληρονομήσιμος (Familial Alzheimer's disease (FAD)), καθώς έχουν βρεθεί και τα αντίστοιχα γονίδια (Small, 1998; Cruchaga et al., 2017). Τα συμπεριφορικά χαρακτηριστικά της νόσου συμπεριλαμβάνουν τα αρχικά συμπτώματα, όπως μείωση της μνημονικής ικανότητας μαζί με αποπροσανατολισμό σε χώρο και χρόνο και δυσκολία συγκέντρωσης. Όταν πρωτοεμφανίζεται η νόσος σε έναν ασθενή, μπορεί να χαρακτηριστεί ως Ήπια Γνωστική Έκπτωση (Mild Cognitive Impairment), κατά την οποία οι ασθενείς εμφανίζουν γνωστικές δυσλειτουργίες αλλά δεν μπορούν να διαγνωσθούν ακόμη με άνοια (Castellani et al., 2010).

Παθολογία της νόσου Αλτσχάιμερ

Η παθολογία της νόσου Αλτσχάιμερ μπορεί να διακριθεί σε δύο σημαντικές κατηγορίες: στις βλάβες που σχετίζονται σε συσσωρεύσεις μορίων και στις βλάβες που προκαλούνται από απώλειες (νευρώνων ή συνάψεων).

Οι βλάβες που προκαλούνται από συσσώρευση μορίων οφείλονται κυρίως στην εναπόθεση Αβ πεπτιδίων και στην ενδοκυτταρική συσσώρευση της Tau πρωτεΐνης, και τα δύο αυτά μόρια αποτελούν φυσιολογικά συστατικά του κυττάρου, πράγμα που αλλάζει στην περίπτωση της νόσου Αλτσχάιμερ (Duyckaerts et al., 2009). Αυτές οι συσσωρεύσεις μορίων μπορούν να οδηγήσουν τον οργανισμό σε αντιδραστικές διαδικασίες, όπως είναι η φλεγμονή.

Τα πεπτίδια Αβ προέρχονται από την πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (APP), η οποία είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I που διασπάται από τις β-, γ-σεκρετάσες, ενώ η φυσιολογική διάσπασή της γίνεται από τις α-, γ-σεκρετάσες (Younkin, 1998; Kuznetsov & Kuznetsov, 2018). Η φυσιολογική λύση της APP έχει δύο σημαντικά αποτελέσματα, αρχικά το καρβοξυτελικό άκρο που κόβεται μπορεί να εκλυθεί από το κύτταρο, και επιπλέον αυτή η διαδικασία καταστρέφει την αλληλουχία που θα μπορούσε να δώσει το Αβ πεπτίδιο, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα σχηματισμού πλακών αμυλοειδούς (Small, 1998). Το τμήμα της APP από το οποίο θα προκύψει το πεπτίδιο Αβ βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά του κυττάρου (Takahashi et al., 2017). Η πρωτεολυτική επεξεργασία του πρόδρομου μορίου APP, βρέθηκε ότι μπορεί να εμπεριέχει ετερογένεια, παράγοντας διαφορετικά μήκη πεπτιδίων Αβ. Οι κύριες μορφές αποτελούνται από 40 και 42 κατάλοιπα (Αβ40 και Αβ42 αντίστοιχα) (Findeis, 2007). Το πεπτίδιο με το μικρότερο μήκος (Αβ40) είναι αυτό που βρίσκεται κατά κύριο λόγο σε έναν εγκέφαλο με φυσιολογική λειτουργία (Younkin, 1998). Η μεγάλη εναπόθεση Αβ πεπτιδίων υποστηρίζεται πως οφείλεται σε ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της απόρριψής τους αλλά και στην αναλογία των Αβ40/Αβ42 πεπτιδίων. Οι πλάκες αμυλοειδούς προέρχονται από τη συσσώρευση των πεπτιδίων Αβ42 (Kuznetsov & Kuznetsov, 2018) και διαφορετικά ονομάζονται και γεροντικές πλάκες. Μεγάλα ποσά Αβ πεπτιδίων βρίσκονται κυρίως στις περιοχές του ιπποκάμπου, του νεοφλοιού και στην εγκεφαλική αγγείωση. Μαζί με την παραγωγή του Αβ πεπτιδίου, έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις στα γονίδια APP, PSEN1, και PSEN2 τα οποία έχουν βρεθεί σε άτομα με οικογενή νόσο Αλτσχάιμερ με πρόωρη έναρξη συμπτωμάτων. Περίπου 200 κυρίαρχες μεταλλάξεις στο γονίδιο της PSEN1 και 14 παραλλαγές του γονιδίου της PSEN2, ευθύνονται για την εμφάνιση της οικογενούς νόσου Αλτσχάιμερ με πρόωρη έναρξη (EOFAD) (Bagyinszky et al., 2014). Οι πρωτεΐνες PSEN1 και PSEN2 είναι στενά συνδεδεμένες με την παθογένεια της συγκεκριμένης νόσου, καθώς σοβαρές μεταλλάξεις στα γονίδιά τους, σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιας νευροεκφύλισης (Plascencia-Villa & Perry, 2020). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες μαζί με άλλες όπως η νικαστρίνη (nicastrin), σχηματίζουν το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης, το οποίο καταλύει τη διάσπαση διάφορων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Όπως έχω ήδη αναφέρει η γ-σεκρετάση εμπλέκεται στη φυσιολογική διάσπαση της πρωτεΐνης APP. Οι PSEN1 και PSEN2 εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi, και έχουν κύριο ρόλο στην επεξεργασία της APP και στο μονοπάτι που οδηγεί στην απελευθέρωση των Αβ πεπτιδίων (Hooli & Tanzi, 2016).

Τα μονομερή Αβ πεπτίδια συσσωρεύονται σε διάφορες μορφές, όπως είναι τα ολιγομερή, τα πρωτοϊνίδια και τα ινίδια αμυλοειδούς. Τα ινίδια αμυλοειδούς είναι μεγαλύτερα από τα ολιγομερή και μπορούν να ενωθούν σχηματίζοντας τις πλάκες αμυλοειδούς, ενώ τα ολιγομερή μπορούν να είναι διάχυτα σε όλον τον εγκέφαλο. Το 1992 οι Hardy and Higgins, διατύπωσαν την υπόθεση του καταρράκτη αμυλοειδούς, ότι η εναπόθεση της πρωτεΐνης Αβ, το κύριο συστατικό των πλακών, είναι η κύρια αιτία της παθολογίας της νόσου Αλτσχάιμερ και πως τα νευροϊνιδιακά δεμάτια, η απώλεια κυττάρων, η καταστροφή αγγείων και η άνοια είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης της πρωτεΐνης αυτής. Μετέπειτα έρευνες έδειξαν ότι δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ των πλακών αμυλοειδούς και της απώλειας συνάψεων και νευρώνων που παρατηρείται σε έναν εγκέφαλο με Αλτσχάιμερ. Επιπλέον δεδομένα δείχνουν πως τα γνωστικά ελλείματα υπήρχαν πριν την εναπόθεση πλακών αμυλοειδούς ή ινιδίων αμυλοειδούς (Hsia et al., 1999). Την υπόθεση αυτή, αντικατέστησε μία νέα, η υπόθεση των Αβ ολιγομερών, σύμφωνα με την οποία τα διαλυτά ολιγομερή, σε αντίθεση με τα μη διαλυτά ινίδια και τις πλάκες αμυλοειδούς, είναι ικανά να προκαλέσουν την απώλεια συνάψεων και τη βλάβη στη μνήμη που απαντώνται στο Αλτσχάιμερ. Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στο ότι συνθετικά Αβ ολιγομερή μπόρεσαν να δράσουν ως νευροτοξίνες και να αναστείλουν την μακρόχρονη ενδυνάμωση (Long Term Potentiation) (Lambert et al., 1998). Τα πεπτίδια Αβ δημιουργούν διάφορες μορφές οι οποίες μπορούν να είναι τοξικές. Οι διάφορες μορφές είναι, τα διαλυτά Αβ πεπτίδια, τα Αβ ολιγομερή, και τα Αβ πεπτίδια στις πλάκες. Η συσσώρευση του Αβ αρχικά δημιουργεί τα ολιγομερή και στη συνέχεια τα ινίδια και τις γεροντικές πλάκες, συμβάλλοντας στην νευροεκφύλιση στα διαφορετικά στάδια της ασθένειας. Επιπλέον, η συσσώρευση του Αβ αμυλοειδούς μπορεί να οδηγήσει στην υπερφωσφορυλίωση της Tau πρωτεΐνης, το οποίο στη συνέχεια θα προκαλέσει το σχηματισμό των νευροϊνιδιακών δεματίων και τέλος νευρωνική και συναπτική δυσλειτουργία. Η εναπόθεση ποσοτήτων Αβ μπορεί να παράγει ελεύθερες ρίζες οι οποίες θα αντιδράσουν με πρωτεΐνες ή λιπίδια και θα δώσουν τοξικά οξειδωμένες πρωτεΐνες και υπεροξειδωμένα λιπίδια. Μία σταθερή και διαρκής ποσότητα πεπτιδίων Αβ μπορεί να προκαλέσει μία ανοσολογική απόκριση και να ενεργοποιήσει την μικρογλοία, οδηγώντας έτσι σε απώλεια νευρώνων, εξαιτίας της φαγοκυττάρωσης (Takahashi et al., 2017).

Οι πλάκες αμυλοειδούς και τα νευροϊνιδιακά δεμάτια είναι τα πλέον χαρακτηριστικά ευρήματα της παθολογίας της νόσου Αλτσχάιμερ. Αντίστοιχα με τα πεπτίδια Αβ, η συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Tau οδηγεί στην δημιουργία των νευροϊνιδιακών δεματίων

(NeuroFibrillary Tangles, NFT). Η πρωτεΐνη Tau (tubulin associated unit) ανήκει σε μία οικογένεια με έξι διαλυτές πρωτεϊνικές ισομορφές που προέρχονται από το γονίδιο MAPT (microtubule-associated protein tau) (Goedert et al., 1988) και ανακαλύφθηκε πρώτη φορά το 1975 (Weingarten et al., 1975). Η Tau προωθεί την συγκέντρωση της τουμπουλίνης σε μικροσωληνίσκους, οι οποίοι και αποτελούν ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του κυτταροσκελετού που καθορίζουν τη μορφολογία των νευρώνων και τους υποστηρίζουν δομικά. Το ποσοστό πρόσδεσης της Tau με την τουμπουλίνη εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της Tau. Στην περίπτωση της νόσου Αλτσχάιμερ, η μη φυσιολογική φωσφορυλίωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης μειώνει την ικανότητα πρόσδεσής της, οδηγώντας σε αποδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων και ταυτόχρονα μπορεί να οδηγήσει σε αυτό-πολυμερισμό της ίδιας της πρωτεΐνης Tau με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή της στα μικροϊνιδιακά δεμάτια. Η υπερφωσφορυλιωμένη Tau έχει βρεθεί πως είναι το κύριο συστατικό των PHFs (paired helical filaments) τα οποία συγκεντρώνονται και οδηγούν στη δημιουργία των NFTs. Η σοβαρότητα της συγκεκριμένης ασθένειας αυξάνεται ανάλογα με τα επίπεδα συγκέντρωσης των NFTs, τα οποία εντοπίζονται κυρίως στον ιππόκαμπο, στον ενδορινικό φλοιό και στην αμυγδαλή (Maccioni et al., 2001).

Επιπλέον, πέρα από την υπόθεση αμυλοειδούς έχει διατυπωθεί ακόμη η χολινεργική υπόθεση, η οποία είναι η παλαιότερη υπόθεση που έχει διατυπωθεί για τη νόσο Αλτσχάιμερ. Έρευνες υποδεικνύουν πως χολινεργικά δεμάτια του βασικού και του ραχιαίου πρόσθιου εγκεφάλου, έχουν πολύ σημαντικούς λειτουργικά ρόλους στην προσοχή, την μνήμη εργασίας και σε άλλες μνημονικές διαδικασίες (Perry et al., 1999). Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η δυσλειτουργία των νευρώνων που παράγουν τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη στον εγκεφαλο συμβάλλουν ουσιαστικά στην γνωστική διαταραχή που παρατηρείται σε άτομα μεγάλης ηλικίας και με τη νόσο Αλτσχάιμερ. Μελέτες σε μεταθανάτιο ανθρώπινο ιστό υποδεικνύουν ελλείματα στη δραστηριότητα του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της ακετυλοχολίνης, την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Ο πυρήνας του βασικού χολινεργικού προσθεγκεφάλου (cholinergic basal forebrain nuclei (ChBF)), παρέχει την κύρια χολινεργική πληροφορία στον ιππόκαμπο και στον φλοιό, και άρα είναι πολύ σημαντικός για τη λειτουργία της μνήμης και της προσοχής (Allen et al., 2011). Έτσι, η χολινεργική υπόθεση για τη νόσο Αλτσχάιμερ, προτείνει πως η απώλεια της χολινεργικής λειτουργίας στον συγκεκριμένο πυρήνα και τον εγκεφαλικό φλοιό, συμβάλλει στην διαταραχή της γνωστικής λειτουργίας που παρατηρείται στους ασθενείς με τη συγκεκριμένη νόσο (Bartus et al., 1982). Κατά συνέπεια,

η υπόθεση αυτή αποτελεί τη βάση για πολλές θεραπευτικές στρατηγικές εναντίον της συγκεκριμένης νόσου (Terry & Buccafusco, 2003).

Μία τρίτη υπόθεση διαμορφώθηκε το 1981 και υποστηρίζει την συμμετοχή του νευροτροφικού παράγοντα στις νευροεκφυλιστικές νόσους. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η νόσος Αλτσχάιμερ, μπορεί να οφείλεται σε έλλειψη νευροτροφικών πρωτεϊνών ή των υποδοχέων τους. Σε συμφωνία με αυτά τα δεδομένα έρχονται οι έρευνες με μειωμένα επίπεδα του BDNF και του NGF αλλά και του υποδοχέα νευροτροφινών TrkA στην περίπτωση της νόσου Αλτσχάιμερ (Allen et al., 2011; Lübke et al., 2021).

Έρευνες έχουν δείξει πως τα γνωστικά ελλείμματα οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στην απώλεια νευρώνων που πιθανά να είναι αποτέλεσμα της συναπτικής απώλειας (Jackson et al., 2019). Σε προχωρημένα επίπεδα της συγκεκριμένης νόσου παρατηρείται σημαντική απώλεια νευρώνων και συνάψεων, ωστόσο, υπάρχουν παρατηρήσεις ότι η απώλεια συνάψεων συμβαίνει και σε πρόδρομα στάδια της νόσου ή στην περίπτωση της MCI και μάλιστα πως προηγείται της ατροφίας και της μετέπειτα νευροεκφύλισης (Scheff et al., 2006). Πιστεύεται λοιπόν, πως τα συμπτώματα στα αρχικά στάδια της νόσου, κατά την MCI, προέρχονται από τη συναπτική δυσλειτουργία η οποία με τη σειρά της έχει προκληθεί από τη συσσώρευση διαλυτών ολιγομερών Αβ, πριν δημιουργηθούν ακόμη οι πλάκες αμυλοειδούς και πριν τη διάχυτη απώλεια συνάψεων και νευρώνων (Hsia et al., 1999, Skaper et al., 2017). Σε συνέπεια με αυτά τα ευρήματα, υπάρχουν έρευνες στις οποίες αποδεικνύεται πως με τη διαγονιδιακή έκφραση του APP υπάρχουν και μειωμένες προσυναπτικές απολήξεις (Jackson et al., 2019).

Η νευροφλεγμονή έχει αποδειχτεί πως έχει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου Αλτσχάιμερ και κλιμακώνεται με την πάροδο της νόσου. Κατά της διαδικασία της φλεγμονής αυτής το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται από διάφορους προκλητικούς παράγοντες. Η φλεγμονώδης αντίδραση στη συγκεκριμένη νόσο καθοδηγείται από ανοσοποιητικά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), κυρίως τα μικρογλοιακά κύτταρα αλλά και από άλλα όπως τα αστροκύτταρα. Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι τα εγγενή ανοσοποιητικά κύτταρα του ΚΝΣ, προστατεύουν τον εγκέφαλο από παθογόνα και υποστηρίζουν την ομοιόσταση του ΚΝΣ και την πλαστικότητά του (Heppner et al., 2015). Επιπλέον τα μικρογλοιακά κύτταρα έχουν ρόλους που σχετίζονται με την ανάπτυξη, την ωρίμανση και τη γήρανση του ΚΝΣ καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ατόμου (Leng & Edison, 2020). Κατά την παρουσία εσωτερικού ή εξωτερικού παθολογικού κινδύνου, οι

επιφανειακοί μικρογλοιακοί υποδοχείς, αναγνωρίζουν παθογόνα όπως μη φυσιολογικές πρωτεΐνες και προκαλούν μία μικρογλοιακή αντίδραση. Έτσι, εσωτερικεύουν τα παθογόνα και τα διασπούν μέσω διάφορων ενδοκυτταρικών μονοπατιών. Ενώ η διαδικασία αυτή σταματά όταν έχει εξαλειφθεί το ερέθισμα που προκαλεί την ανοσοποιητική αντίδραση, στους ηλικιωμένους εγκέφαλους τα μικρογλοιακά κύτταρα εμφανίζουν λειτουργικές βλάβες καθώς τείνουν να είναι διαρκώς ενεργοποιημένα. Αυτή η κατάσταση μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεια των νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι η νόσος Αλτσχάιμερ. Τα μικρογλοιακά κύτταρα σε εγκέφαλους μεγάλης ηλικίας έχουν μειωμένες διακλαδώσεις στην περιοχή που επιτηρούν, το οποίο μπορεί επιπλέον να συμβάλλει στην βλάβη της διατήρησης της ομοιόστασης (Leng & Edison, 2020). Τα Αβ πεπτίδια προσελκύουν τα μικρογλοιακά κύτταρα, τα οποία τα αντιμετωπίζουν μέσω φαγοκυττάρωσης. Έτσι, στην περίπτωση της νόσου Αλτσχάιμερ η συσσώρευση του Αβ διατηρεί ενεργοποιημένα τα μικρογλοιακά κύτταρα, οδηγώντας εντέλει στη βλάβη τους, αλλά και των αστροκυττάρων και άλλων κυττάρων του ΚΝΣ, οδηγώντας έτσι στην νευροεκφύλιση και την απώλεια νευρώνων (Leng & Edison, 2020; Zhang et al., 2021).

Ενήλικη Νευρογένεση και νόσος Αλτσχάιμερ

Η περιοχή του ιππόκαμπου είναι κρίσιμη για τις γνωστικές λειτουργίες της μνήμης και της μάθησης και είναι ιδιαίτερα ευάλωτη στην περίπτωση της νόσου Αλτσχάιμερ. Πολλές έρευνες δείχνουν πως ένα πρώιμο στάδιο της νόσου αυτής περιλαμβάνει τη ελλειψόμενη λειτουργία της δημιουργίας νέων νευρώνων -ενήλικη νευρογένεση- στην περιοχή της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου. Συνεπώς μη λειτουργική νευρογένεση μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες της λειτουργίας της μνήμης (Mu & Gage, 2011). Η ενήλικη νευρογένεση στα θηλαστικά, λαμβάνει χώρα σε δύο περιοχές του ιππόκαμπου, στην υποκοιλιακή (subventricular) ζώνη και την υποκοκκώδη (subgranular) ζώνη της οδοντωτής έλικας (Rodríguez & Verkhatsky, 2011). Η πλειοψηφία των ερευνών σε διαγονιδιακά ζώα, που φέρουν γονίδια της νόσου Αλτσχάιμερ, επιδεικνύει μειωμένη νευρογένεση σε μία από τις δύο ή και στις δύο παραπάνω περιοχές. Τα αποτελέσματα δείχνουν την μειωμένη λειτουργία των γνωστικών δραστηριοτήτων μετά από μειωμένη νευρογένεση στον ιππόκαμπο. Επιπρόσθετα, οι έρευνες υποστηρίζουν πως τα επίπεδα της νευρογένεσης είναι αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία, και πως σχετίζονται με την συσσώρευση πλακών αμυλοειδούς (Li Puma et al., 2021). Υπάρχουν και αντιφατικές έρευνες οι οποίες υποστηρίζουν την αύξηση της νευρογένεσης σε διαγονιδιακά ζώα με τη νόσο Αλτσχάιμερ (Rodríguez & Verkhatsky, 2011). Συνεπώς, η ρύθμιση της νευρογένεσης είναι

ένας σημαντικός στόχος για την ανάπτυξη νέων θεραπειών κατά των νευροεκφυλιστικών νόσων.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το διαγονιδιακό ζωϊκό μοντέλο 5xFAD, το οποίο φέρει πέντε μεταλλάξεις της οικογενούς μορφής της νόσου Αλτσχάιμερ (FAD). Αυτά τα διαγονιδιακά ζώα, αναπτύσσουν αμυλοειδικές πλάκες στον εγκέφαλο και γλοίωση στους δύο πρώτους μήνες της ζωής τους. Επιπρόσθετα, στα ζώα αυτά παρατηρούνται πολύ υψηλά επίπεδα του Αβ42 πεπτιδίου, μειωμένα επίπεδα συναπτικών δεικτών, νευρωνική απώλεια και διαταραχές στη λειτουργία της μνήμης κατά το συμπεριφορικό πείραμα Υ-λαβύρινθος (Oakley et al., 2006).

1.4 Συνθετικές Νευροτροφίνες

Όπως είναι γνωστό οι νευροτροφίνες έχουν σημαντικό ρόλο στο ΚΝΣ, καθώς το υποστηρίζουν και το συντηρούν μέσω μηχανισμών νευροπροστασίας και πλαστικότητας, οι οποίοι ελέγχονται από τη σηματοδότηση υποδοχέων νευροτροφινών. Από προηγούμενες μελέτες έχει παρατηρηθεί πως σε έναν εκφυλισμένο εγκέφαλο η παραγωγή νευροτροφινών είναι μειωμένη, συνεπώς αφήνοντας τα νευρικά κύτταρα απροστάτευτα από την απόπτωση. Η πρόδρομη μορφή του NGF, ο pro-NGF, είναι η κύρια μορφή στην οποία παρατηρείται ο NGF στον εγκέφαλο κι ο οποίος προάγει την απόπτωση. Στην περίπτωση της νόσου Αλτσχάιμερ, παρατηρούνται αλλαγές στα επίπεδα του pro-NGF, που μπορούν να οδηγήσουν σε ανικανότητα μεταφοράς του NGF (Schindowski et al., 2008). Τα επίπεδα του NGF συγκεκριμένα στον πυρήνα ChBF, ο οποίος σχετίζεται με τη χολινεργική πληροφορία, είναι μειωμένα ενώ το ίδιο δεν συμβαίνει σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου όπως ο φλοιός ή ο ιππόκαμπος. Η έλλειψη NGF στους χολινεργικούς νευρώνες μπορεί να προκαλέσει συρρίκνωση του κυττάρου και μειωμένη παραγωγή ενζύμων όπως η ChAT και η AChE (Svendsen et al., 1991). Αυτή η χολινεργική εκφύλιση, είναι το έναυσμα για διάφορες θεραπείες για τη νόσο αυτή, όπως είναι γονιδιακές θεραπείες με τη χορήγηση του NGF. Επιπλέον, έχει καταγραφεί η απώλεια των υποδοχέων TrkA του NGF στον βασικό τηλεγκεφαλο και στον φλοιό, σε εγκεφάλους που πάσχουν από τη νόσο αυτή (Schindowski et al., 2008). Εξαιτίας λοιπόν της σχέσης του NGF με το χολινεργικό σύστημα αλλά και το γεγονός ότι είναι αυξητικός παράγοντας, αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο. Ταυτόχρονα όμως, είναι ιδιαίτερα απαιτητικό να βρεθεί ένας ασφαλής και επιτυχημένος τρόπος να

χορηγηθεί στον εγκέφαλο. Έτσι, έχουν γίνει δοκιμές μέσω *ex-vivo* και *in-vivo* γονιδιακής θεραπείας σε ανθρώπους με NGF από τους Tuszynski et al., 2015, οι οποίες ξεκίνησαν το 2001. Σε αντίστοιχη έρευνά τους το 2015, φαίνεται πως ο NGF προκαλεί αυξητικές (“trophic”) αποκρίσεις σε AD εγκεφάλους. Οι αποκρίσεις αυτές περιλαμβάνουν νευρωνική υπερτροφία, αξονικές διακλαδώσεις (sprouting) και ενεργοποίηση της κυτταρικής σηματοδότησης, αποδεικνύοντας έτσι πως η χορήγηση αυξητικών παραγόντων μπορεί να διεγείρει λειτουργικές καταστάσεις των νευρώνων ακόμη και στις περιπτώσεις χρόνιων νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Επίσης στοιχεία για τον BDNF δείχνουν, πως το mRNA και η πρωτεΐνη του εμφανίζονται σε μειωμένα επίπεδα σε περιοχές του εγκεφάλου όπως ο ιππόκαμπος και ο ενδορινικός φλοιός, στη περίπτωση της νόσου Αλτσχάιμερ (Allen et al., 2011). Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο BDNF, ενεργοποιεί τον TrkB υποδοχέα νευροτροφινών, με αποτέλεσμα την αποφυγή του κυτταρικού θανάτου και την προστασία των νευρώνων από απειλές. Συνεπώς, στην περίπτωση της νόσου Αλτσχάιμερ τα μειωμένα επίπεδα BDNF, οδηγούν σε κάποια από τα νευροπαθολογικά συμπτώματα της νόσου αυτής. Επιπλέον, στον ιππόκαμπο και τον πρόσθιο φλοιό στην περίπτωση της νόσου, ο υποδοχέας TrkB είναι σε μειωμένα επίπεδα (Allen et al., 1999). Βασιζόμενοι στα ανωτέρω ευρήματα, οι νευροτροφίνες και η μείωση της κυτταρικής απόπτωσης αποτελούν σημαντικό θεραπευτικό στόχο για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Παρ’ όλα αυτά, οι νευροτροφίνες δεν είναι ικανές να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, εμφανίζουν περιορισμένη διάχυση στο ΚΝΣ και έχουν ασταθή κινητική (Gravanis et al., 2017; Longo & Massa, 2013). Ένας από τους τρόπους να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια είναι να στοχευθούν μεμονωμένα οι υποδοχείς των νευροτροφινών, με συνθετικούς μικρομοριακούς προσδέτες. Οι προσδέτες αυτοί θα πρέπει να διαθέτουν επιθυμητές χημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες, όπως η σταθερότητα, το μικρό μέγεθος και η ικανότητα να διαπερνούν φραγμούς των ιστών. Ανάλογα με τους συνθετικούς προσδέτες και την περιοχή του υποδοχέα που θα προστεθούν, μπορούν να δράσουν ως ρυθμιστές βιολογικών αποκρίσεων, ανταγωνιστές ή αγωνιστές (Skaper, 2008).

1.5 Σκοπός της εργασίας

Στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία μελετήθηκε η χορήγηση ενός συνθετικού αγωνιστή νευροτροφινών σε ζώα αγρίου τύπου και διαγονιδιακά ζώα 5xFAD (B6SJL) μέσω συμπεριφορικών και ιστολογικών πειραμάτων. Τα διαγονιδιακά αυτά ζώα εκφράζουν γονίδια του ανθρώπου (π.χ. APP) με ένα σύνολο από πέντε μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο Αλτσχάιμερ και εμφανίζουν φαινότυπους της. Ο συνθετικός αγωνιστής ENT-A061 είναι ειδικός και εκλεκτικός για τον υποδοχέα TRKB, καθώς επίσης έχει αποδειχθεί πως έχει νευροπροστατευτικές και νευροαναγεννητικές ιδιότητες σε καλλιέργειες πρωτογενών νευρικών κυττάρων. Η δομή του ENT-A061 είναι βασισμένη σε αυτήν του BNN27, μίας συνθετικής μικρονευροτροφίνης, που είναι παράγωγο νευροστεροειδούς, διαπερνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και είναι ειδική για τον υποδοχέα στον οποίο προσδένεται (Pediaditakis et al., 2021; Bonetto et al., 2017). Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να εξετασθεί η επίδραση του ειδικού για τον TRKB αγωνιστή, σε γνωστικές λειτουργίες όπως η μνήμη και η μάθηση, αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο, στην συσσώρευση πλακών αμυλοειδούς, στη νευρογένεση, στην νευροφλεγμονή και στην απώλεια συνάψεων. Ο απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας αλλά και των μετέπειτα μελετών που θα ακολουθήσουν είναι να εξετασθεί η ικανότητα του συγκεκριμένου συνθετικού αγωνιστή, αλλά και άλλων αντίστοιχων, να δρουν ως φαρμακευτικές ουσίες ώστε να βοηθήσουν στην εξέλιξη της έρευνας για τη νόσο Αλτσχάιμερ.

2. Μέθοδοι και Υλικά

Πειραματόζωα

Όλοι οι μύες αναπαράγονται και εκτρέφονται στο ζωοτροφείο του Ιδρύματος Έρευνας και Τεχνολογίας στο Ηράκλειο Κρήτης, υπό συγκεκριμένες συνθήκες υγιεινής, σε πλαστικά κλουβιά των οποίων το μέγεθος ποικίλλει ανάλογα με τον αριθμό μυών που περιέχει. Στα ζώα παρέχεται μονίμως ξηρά τροφή, νερό και ελεγχόμενη θερμοκρασία. Όλα τα πειράματα έγιναν βάσει της Ευρωπαϊκής και Ελληνικής νομοθεσίας που περιγράφονται στην οδηγία 2010 / 63EE του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010.

Ξεκινώντας την πειραματική διαδικασία λήφθηκαν αρσενικά 49 ζώα. Από αυτά τα ζώα τα 23 ήταν αγρίου τύπου (Wild Type/WT) και τα υπόλοιπα 26 5xFAD διαγονιδιακά ζώα.

5xFAD διαγονιδιακά ζώα

Τα 5xFAD ζώα υπερεκφράζουν το μεταλλαγμένο ανθρώπινο γονίδιο του βήτα αμυλοειδούς για την πρόδρομη πρωτεΐνη 695 (APP) μαζί με τη Swedish (K670N, M671L), τη Florida (I716V), και τη London (V717I) μεταλλάξεις της οικογενούς νόσου Αλτσχάιμερ (Familial Alzheimer's Disease (FAD)). Ακόμη εκφράζουν δύο FAD μεταλλάξεις M146L and L286V, για την ανθρώπινη πρεσενιλίνη 1 (PS1). Και τα δύο αυτά διαγονίδια έχουν ρυθμιστεί με τον εκκινητή Thy1 για προωθήσει την υπερέκφραση στον εγκέφαλο. Οι 5xFAD μύες εμφανίζουν πολύ σημαντικά χαρακτηριστικά της παθολογίας αμυλοειδούς και θεωρούνται ένα πολύ χρήσιμο μοντέλο για τη νευροεκφύλιση που προκαλείται από το Αβ-42 και το σχηματισμό πλακών αμυλοειδούς (Oakley et al., 2006). Τα ζώα που χρησιμοποιούνται είναι ετερόζυγα ως προς το γονίδιο με τη μετάλλαξη για την πρωτεΐνη APP. Τα ζώα ταυτοποιούνται αν είναι αγρίου τύπου ή φέρουν τη μετάλλαξη APP μέσω της διαδικασίας της γονοτύπησης, έπειτα από απομόνωση DNA (The Jackson Laboratory). Σε ηλικία 4 μηνών τα διαγονιδιακά αυτά ζώα ήδη έχουν αναπτύξει την κλινική εικόνα της ασθένειας του Αλτσχάιμερ (Oblak et al., 2021). Συγκεκριμένα οι πλάκες αμυλοειδούς αρχίζουν να διαμορφώνονται ήδη από τους δύο μήνες ζωής των 5xFAD ζώων (Oakley et al., 2006).

Συνθετικός αγωνιστής ENT-A061

Στις μισές πειραματικές ομάδες θα χορηγηθεί ένας νέος συνθετικός αγωνιστής, ειδικός και επιλεκτικός για τον TRKB υποδοχέα νευροτροφινών, ο ENT-A061. Ο αγωνιστής αυτός έχει αποδειχθεί πως έχει νευροπροστατευτικές και νευροαναγεννητικές ιδιότητες σε καλλιέργειες πρωτογενών νευρικών κυττάρων. Η δομή του ENT-A061 είναι βασισμένη σε αυτήν του BNN27, μίας συνθετικής μικρονευροτροφίνης, που είναι παράγωγο νευροστεροειδούς, διαπερνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και είναι ειδική για τον υποδοχέα στον οποίο προσδένεται.

Πειραματικές ομάδες ζώων

Στην συγκεκριμένη μελέτη υπήρχαν δύο ομάδες ελέγχου: οι ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε placebo, δηλαδή ανενεργή ουσία. Το placebo ήταν φυσιολογικός ορός (saline). Η εργασία αυτή αποτελεί μία τυφλή μελέτη, καθώς η ταυτότητα του κάθε ζώου αποκαλύφθηκε στους ερευνητές μόνο πριν τη στατιστική ανάλυση.

1^η ομάδα: WT με Placebo (εικονική πελέτα)-11 αρσενικά ζώα

2^η ομάδα: WT με ENT-A061 πελέτα-12 αρσενικά ζώα

3^η ομάδα: APP με Placebo-13 αρσενικά ζώα

4^η ομάδα: APP με ENT-A061 πελέτα-13 αρσενικά ζώα

Χορήγηση του αγωνιστή ENT-A061

Η χορήγηση του συνθετικού αγωνιστή έγινε στην ηλικία των τεσσάρων μηνών των μυών, σε δύο από τις ομάδες, μέσω υποδόριας πελέτας. Η πελέτα η οποία περιείχε τον αγωνιστή απελευθερωνόταν σε σταθερές δόσεις καθημερινά (10mg/kg/day) για δύο μήνες. Με το πέρας αυτών των δύο μηνών, όλα τα ζώα υποβλήθηκαν σε συμπεριφορικά πειράματα ύστερα από τη διαδικασία εξοικείωσής τους με τον πειραματιστή.

Συμπεριφορικά πειράματα

Προετοιμασία και καταγραφή συμπεριφορικών πειραμάτων:

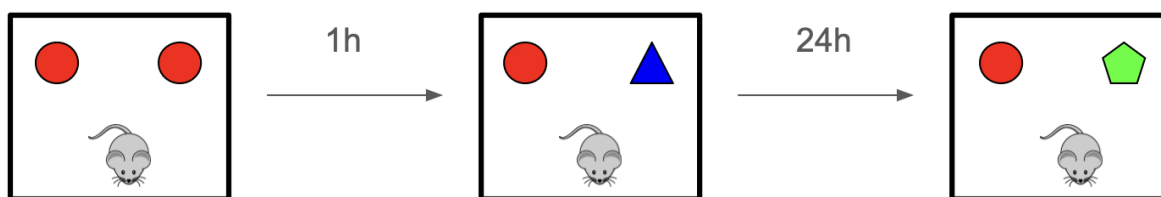
Πριν την έναρξη όλων των συμπεριφορικών πειραμάτων, οι μύες εξοικειώνονται με τον πειραματιστή σε διάστημα 7 με 10 ημερών. Συγκεκριμένα τα ζώα αφήνονται ελεύθερα από τον καρπό έως τον βραχίονα του πειραματιστή για 3-10 λεπτά κάθε μέρα. Οι μύες μεταφέρονται στον πειραματικό χώρο μία ώρα πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.

Σκοπός αυτών των δύο διαδικασιών είναι η εξοικείωση του ζώου τόσο με τον πειραματιστή όσο και με τον χώρο διεξαγωγής του πειράματος, έτσι ώστε στη διαδικασία του πειράματος να μην υπάρχει εκ των προτέρων στρες, που προήλθε από κάτι άγνωστο. Όλες οι φάσεις καταγράφονται με κάμερες και αποθηκεύονται προς ανάλυση, η οποία γίνεται με την βοήθεια του προγράμματος J Watcher και στην συνέχεια καταγραφή των αποτελεσμάτων στο Excel.

Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου

Οι δοκιμασίες αναγνώρισης αντικειμένου λαμβάνουν χώρα στην αρένα ανοιχτού πεδίου, υπό χαμηλό φωτισμό σε ειδικό δωμάτιο συμπεριφοράς. Πριν από τους τρεις τύπους αναγνώρισης αντικειμένου τα ζώα υπό δοκιμασία τοποθετήθηκαν για τρεις εν συνεχεία μέρες επί 10 λεπτά στην αρένα ανοιχτού πεδίου, για εξοικείωση με τον χώρο.

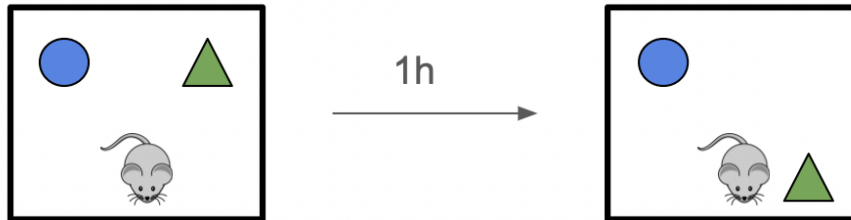
Αναγνώριση νέου αντικειμένου (Novel Object Recognition, NOR)



Εικόνα 2. Αναγνώριση νέου αντικειμένου.

Το συγκεκριμένο πείραμα αποτελείται σε τρεις φάσεις. Στην πρώτη φάση (acquisition) ο μυς τοποθετείται στην αρένα ανοιχτού πεδίου, όπου έχουν ήδη τοποθετηθεί δύο ίδια μεταξύ τους αντικείμενα απέναντι το ένα στο άλλο. Τα εν λόγω αντικείμενα είναι καινούργια ως προς το ζώο. Στη δεύτερη φάση (retention) το ζώο επανατοποθετείται στην αρένα ανοιχτού πεδίου με δύο αντικείμενα αντίκρου του, το ένα είναι το αντικείμενο της πρώτης φάσης και το άλλο καινούργιο και μη γνώσιμο αντικείμενο ως προς τους υποκείμενους μύες. Η κάθε φάση διαρκεί για 5 λεπτά, ανάμεσα στις δύο φάσεις μεσολαβεί ένα διάστημα 60 λεπτών (short-term NOR), όπου τα ζώα επανατοποθετούνται σε ένα κλουβί μεταφοράς διαφορετικό από αυτό στο οποίο διαμένουν. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μετά από 24 ώρες (long-term NOR) όπου στο ζώο παρουσιάζονται πάλι δύο αντικείμενα, το ένα το ίδιο που υπήρχε και στις δύο φάσεις της προηγούμενης ημέρας και ένα καινούργιο, μη γνώσιμο αντικείμενο. Συνολικά και οι τρεις φάσεις εμπεριέχουν ένα κοινό αντικείμενο που από τη δεύτερη φάση και μετά θεωρείται το γνώσιμο προς το ζώο αντικείμενο.

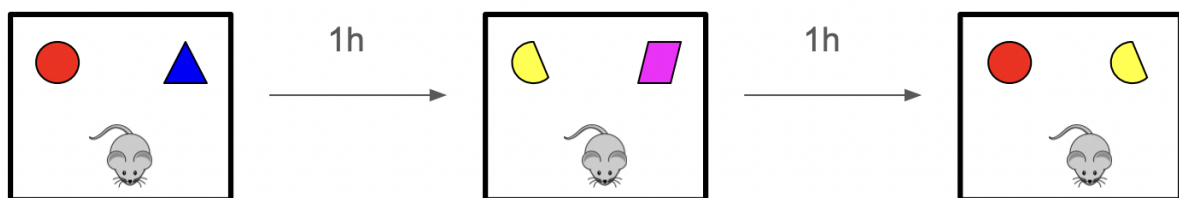
Αναγνώριση αντικειμένου ως προς θέση (To Place Object Recognition, TPOR)



Εικόνα 3. Αναγνώριση αντικειμένου ως προς τη θέση.

Μετά από μία μέρα κενή, οι μύες επανατοποθετούνται στην αρένα ανοιχτού πεδίου, χωρίς αντικείμενο, το κάθε ένα για 15 λεπτά. Ακολουθεί η ημέρα της πειραματικής διαδικασίας, όπου στην αρένα ανοιχτού πεδίου τοποθετούνται δύο άγνωστα στο ζώο αντικείμενα αντίκρου του και το ένα δίπλα στο άλλο. Στη συνέχεια το ζώο τοποθετείται στη συσκευή και αφήνεται ελεύθερο να εξερευνήσει. Στην επόμενη φάση, στην αρένα ανοιχτού πεδίου, παραμένουν τα αντικείμενα της πρώτης φάσης, με τη διαφορά ότι το ένα από τα δύο παραμένει στην ίδια θέση (stationary) και το άλλο έχει μετακινηθεί αντιδιαμετρικά από την αρχική του θέση (displaced). Το ζώο τοποθετείται πάλι στην αρένα ανοιχτού πεδίου και αφήνεται ελεύθερο να εξερευνήσει. Η κάθε φάση διαρκεί για 5 λεπτά, ανάμεσα στις δύο φάσεις μεσολαβεί ένα διάστημα 60 λεπτών, όπου τα ζώα επανατοποθετούνται σε ένα κλουβί μεταφοράς διαφορετικό από αυτό στο οποίο διαμένουν.

Αναγνώριση αντικειμένου σε χρονική σειρά (Temporal Object Recognition, TOR)

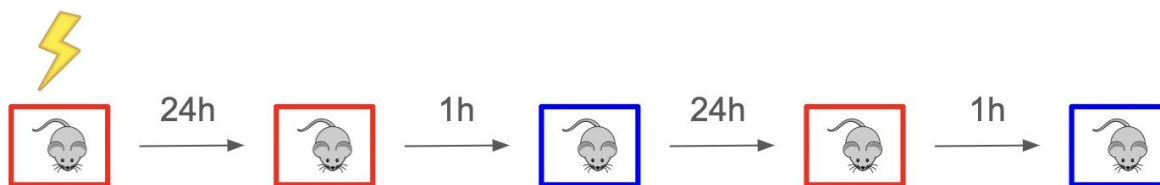


Εικόνα 4. Αναγνώριση αντικειμένου σε χρονική σειρά.

Μετά από μία μέρα κενή, οι μύες επανατοποθετούνται στην αρένα ανοιχτού πεδίου, χωρίς αντικείμενο, το κάθε ένα για 15 λεπτά. Ακολουθεί η ημέρα της πειραματικής διαδικασίας,

όπου στην αρένα ανοιχτού πεδίου τοποθετούνται δύο άγνωστα στο ζώο αντικείμενα αντίκρου του και το ένα δίπλα στο άλλο. Στη συνέχεια το ζώο τοποθετείται στη συσκευή και αφήνεται ελεύθερο να εξερευνήσει. Αυτό αποτελεί την πρώτη δοκιμή. Στη συνέχεια τοποθετούνται στην ίδια με την προηγούμενη θέση δύο νέα και μη γνώριμα αντικείμενα, το ζώο τοποθετείται ξανά στην αρένα ανοιχτού πεδίου. Αυτή η διαδικασία αποτελεί την δεύτερη δοκιμή. Ακολουθεί η φάση τεστ, όπου στις ίδιες θέσεις με όλες τις δοκιμασίες τοποθετείται ένα αντικείμενο ίδιο με την πρώτη δοκιμασία, το οποίο αποτελεί το λιγότερο οικείο και άρα το νέο αντικείμενο και ένα αντικείμενο ίδιο με την δεύτερη το οποίο αποτελεί το περισσότερο οικείο αντικείμενο, άρα το παλιό αντικείμενο. Η κάθε φάση διαρκεί για 5 λεπτά, ανάμεσα στις δύο φάσεις μεσολαβεί ένα διάστημα 60 λεπτών, όπου τα ζώα επανατοποθετούνται σε ένα κλουβί μεταφοράς διαφορετικό από αυτό στο οποίο διαμένουν.

Συντελεστική εκμάθηση φόβου

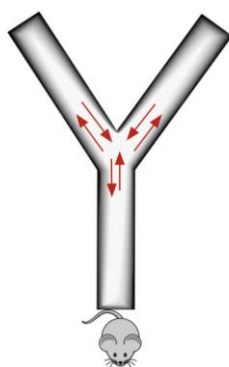


Εικόνα 5. Συντελεστική εκμάθηση φόβου. Τα κόκκινο και μπλε χρώματα συμβολίζουν τα δύο διαφορετικά περιβάλλοντα μέσα στη συσκευή.

Ο θάλαμος εκμάθησης φόβου είναι μεταλλικός και το κάτω μέρος του αποτελείται από μεταλλικές ράγες τις οποίες μπορεί να διαπεράσει το ρεύμα. Κατά τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία οι μύες δεν χρειάζεται να εξοικειωθούν με την πειραματική συσκευή. Το πείραμα συντελεστικής εκμάθησης φόβου αποτελείται από τρεις διαφορετικές φάσεις και έχει διάρκεια τριών ημερών. Την πρώτη μέρα λαμβάνει χώρα η συσχετιστική εκμάθηση φόβου μέσω ήπιου ηλεκτρισμού στον θάλαμο εκμάθησης φόβου στον οποίο κάτω από τις ράγες είναι τοποθετημένο λευκό χαρτί. Ο μυς τοποθετείται στο θάλαμο εκμάθησης φόβου για 12 λεπτά, όπου κατά το έβδομο λεπτό της πειραματικής διαδικασίας εκτίθεται σε ήπιο ηλεκτρισμό στα πόδια. Το ανεξάρτητο προκλητικό ερέθισμα του ήπιου ηλεκτρισμού έχει ένταση ρεύματος 0,75 mA και διάρκεια 1000msec. Την επόμενη ημέρα ο μυς επανατοποθετείται στο θάλαμο εκμάθησης φόβου για τρία λεπτά, χωρίς να υποβληθεί σε ηλεκτρισμό δύο φορές. Την πρώτη φορά το περιβάλλον είναι το ίδιο με της προηγούμενης μέρας καθώς δεν έχει αλλάξει το χρώμα στο χαρτί κάτω από τις ράγες, ενώ τη δεύτερη φορά το χρώμα στο χαρτί κάτω από τις ράγες

που περπατάει ο μυς είναι διαφορετικό, εισάγοντας έτσι ένα νέο πλαίσιο. Οι εκθέσεις στα δύο διαφορετικά περιβάλλοντα απείχαν μεταξύ τους χρονικά 60 λεπτά. Την τρίτη και τελευταία ημέρα η διαδικασία είναι η ίδια με της δεύτερης μέρας. Όλες οι φάσεις καταγράφονταν με κάμερες και αποθηκεύονταν προς ανάλυση, η οποία γινόταν με την βοήθεια του προγράμματος J Watcher και στην συνέχεια καταγραφή των αποτελεσμάτων στο Excel, όπου υπολογιζόταν το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το ζώο ήταν ακινητοποιημένο.

Υ *Λαβύρινθος δοκιμασία αυθόρμητης εναλλαγής*



Εικόνα 6. Η συσκευή του Y λαβύρινθου για τη δοκιμασία της αυθόρμητης εναλλαγής. Τα βέλη υποδεικνύουν τις πιθανές κινήσεις των μυών μέσα τη συσκευή.

Η συγκεκριμένη συμπεριφορική δοκιμασία αξιολογεί την προθυμία των μυών να εξερευνήσουν νέα περιβάλλοντα, καθώς η τυπική συμπεριφορά τους είναι να εξερευνήσουν έναν νέο βραχίονα.

Η πειραματική διαδικασία λαμβάνει χώρα σε έναν λαβύρινθο με το σχήμα Y, που αποτελείται από μεταλλικούς βραχίονες που απέχουν 120 μοίρες μεταξύ τους. Ο μυς αρχικά τοποθετείται στο κέντρο της συσκευής και αφήνεται ελεύθερος να εξερευνήσει τους βραχίονες.

Απομόνωση εγκεφάλων και δημιουργία τομών

Με το πέρας των συμπεριφορικών πειραμάτων τα ζώα θυσιάστηκαν με αναισθητοποίηση με ισοφλουράνιο και ενδοκαρδιακή έγχυση φυσιολογικού ορού (0.9% NaCl) και στη συνέχεια οι εγκεφαλοι αφαιρέθηκαν και χωρίστηκαν στα δύο ημισφαίρια. Τα ημισφαίρια που προοριζόταν για ανοσοσφθορισμό αποθηκεύτηκαν σε PFA και διατηρήθηκαν στους 4 °C. Στη συνέχεια, το

ημισφαίριο αυτό κοβόταν οβελιαία (sagittally) με την μικροτόμο παλλόμενης λεπίδας (Vibratome) σε τομές πάχους 40μm. Οι τομές αφορούσαν τις περιοχές του ιππόκαμπου και του φλοιού και αποθηκεύτηκαν σε πηγάδια με κρυοπροστατευτικό υγρό 30% στους -20 °C. Το κρυοπροστατευτικό υγρό αποτελείται από 30% γλυκερόλη/30% ethylene glycol σε phosphate buffer (PB). Έπειτα ακολουθούσε η διαδικασία του ανοσοφθορισμού.

Ανοσοφθορισμός

Το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού διαρκεί συνολικά τρεις ημέρες και καθ' όλη τη διάρκεια των πλύσεων ή των επώσεων των τομών στα διαλύματα, τα πηγάδια με τις τομές βρισκόντουσαν τοποθετημένα σε αναδευτήρα. Οι τομές αρχικά μεταφέρθηκαν σε καινούργια πηγάδια όπου ξεπλύθηκαν από το κρυοπροστατευτικό, με PBS 1x, τρεις φορές για 15 λεπτά, στη συνέχεια με PBStx 0.1% (Triton X-100, 0.1% in PBS) για 15 λεπτά και τέλος με PBStx 0.3% (Triton X-100, 0.3% in PBS) για μισή ώρα. Στη συνέχεια για κάποιες από τις χρώσεις χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανάκτησης αντιγονικών επίτοπων πρωτεϊνών που κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης με παραφορμαλδεΐδη έγιναν μη αντιδραστικοί και μη ανιχνεύσιμοι (Krenacs et al., 2009). Η διαδικασία αυτή έγινε με κιτρικό οξύ (10mM sodium citrate σε PBS, pH=6.0) στους 85 °C για 10 λεπτά. Έπειτα από επαναφορά των τομών σε θερμοκρασία δωματίου, έγινε ξανά πλύση των τομών με PBStx 0.1% για 15 λεπτά. Στη συνέχεια ετοιμάστηκε το Blocking buffer το οποίο αποτελείται από 0.1% BSA (Bovine Serum Albumin), 10% normal serum (φυσικός ορός) σε PBStx 0.1%. Το Blocking buffer χρησιμοποιείται για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης, κάνοντας έτσι την πρόσδεση του αντισώματος πιο ειδική. Οι τομές παρέμειναν στο Blocking buffer για διάρκεια τριών ωρών. Στη συνέχεια οι τομές επεξεργάστηκαν ολονύχτια με τα πρωτογενή αντισώματα στους 4 °C. Τη δεύτερη μέρα ακολουθούν τρεις πλύσεις των τομών από τα πρωτογενή αντισώματα με PBStx 0.1% για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και στη συνέχεια ολονύχτια επεξεργασία τους με τα δευτερογενή αντισώματα στους 4 °C. Από αυτό το σημείο και έπειτα οι τομές προστατεύονται από το φως. Την τρίτη και τελευταία μέρα της πειραματικής διαδικασίας ανοσοφθορισμού, σε θερμοκρασία δωματίου, οι τομές ξεπλένονται αρχικά με PBStx 0.1% και στη συνέχεια με PBS 1x. Κάθε πλύση διαρκεί 15 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε χρώση με Hoescht (1:10000 σε PBS) για 15 λεπτά. Το Hoescht είναι χρωστική που βάφει το DNA των κυττάρων, και έτσι γίνεται ευδιάκριτη η τοποθεσία του πυρήνα. Στη συνέχεια ακολουθεί μία πλύση με PBS 1x και μία με PB 1x , η κάθε μία για 15 λεπτά. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την τοποθέτηση των τομών πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες

με καλυπτρίδες και Vectashield mounting medium το οποίο καθυστερεί τον αποχρωματισμό του φθορισμού των τομών. Τέλος, αποθηκεύονται στους 4 °C.

Για τη συγκεκριμένη εργασία έγιναν οι εξής τέσσερις χρώσεις:

1. Πρωτογενές αντίσωμα APP Antibody (6E10) mouse, αραιώση 1:500 (σε PBStx 0.1%) με δευτερογενές Alexa Fluor 488 anti-mouse σε αραιώση 1:1000. Το αντίσωμα για APP αναγνωρίζει τα Αβ πεπτίδια καθώς και την APP σε διαφορετικά μεγέθη (Rajendran et al., 2006).
2. Πρωτογενές αντίσωμα Anti-doublecortin (DCX) rabbit, αραιώση 1:200 με δευτερογενές Alexa Fluor 546 anti-rabbit σε αραιώση 1:1000. Η DCX είναι μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους και περιλαμβάνεται στις διαδικασίες μετανάστευσης και διαφοροποίησης των νευρώνων (Schaar et al., 2004). Η πρωτεΐνη αυτή χρησιμοποιείται ως δείκτης την ενήλικης νευρογένεσης (Couillard-Despres et al., 2005).
3. Πρωτογενή αντισώματα PSD95 Antibody mouse και Synapsin I Antibody rabbit σε αραιώση 1:500 και 1:200 αντίστοιχα, με δευτερογενή αντισώματα Alexa Fluor anti-mouse 488 goat και Alexa Fluor anti-rabbit 546 donkey αντίστοιχα, με αραιώση 1:1000. Εντοπίζοντας την Postsynaptic density protein-95, εντοπίζονται οι μετασυναπτικές απολήξεις. Ενώ εντοπίζοντας την φωσφοπρωτεΐνη Synapsin I, εντοπίζονται οι προσυναπτικές απολήξεις. Έτσι, ο συνδυασμός αυτών των δύο βοηθάει στην εξαγωγή συμπεράσματος για τον αριθμό των συνάψεων που υπάρχουν στην εκάστοτε τομή.

Οι λήψεις των εικόνων έγιναν στην περιοχή του ιππόκαμπου και πραγματοποιήθηκε από το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP8 στους φακούς x40 και τον ελαιοκαταδιτικό x60.

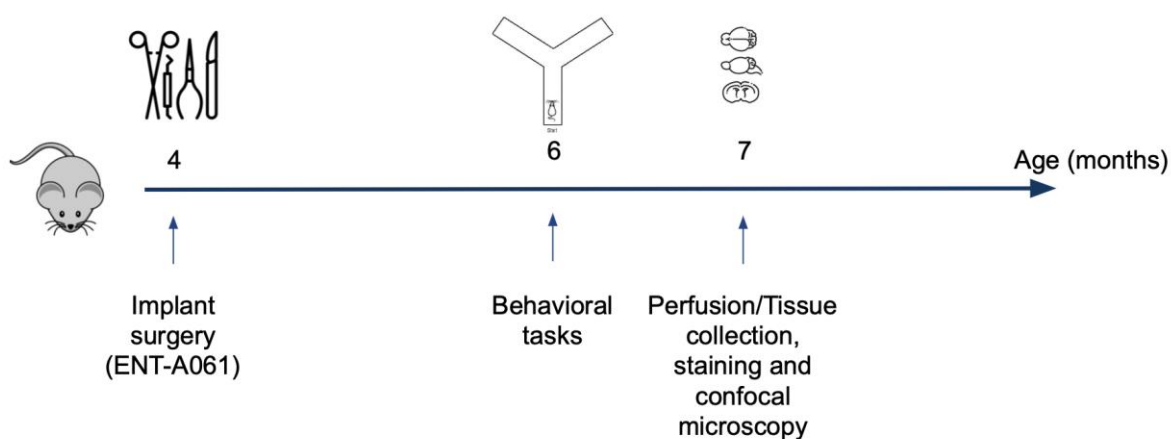
Ανάλυση

Τα συμπεριφορικά πειράματα καταγράφηκαν από τις κάμερες. Τα βίντεο αναλύθηκαν στο πρόγραμμα J Wtacher και στην συνέχεια τα αποτελέσματα περάστηκαν προς στατιστική ανάλυση στο Excel και το GraphPad-Prism. Οι φωτογραφίες από τα πειράματα ανοσοφθορισμού αναλύθηκαν στο πρόγραμμα Fiji και στη συνέχεια και αυτά τα αποτελέσματα περάστηκαν προς στατιστική ανάλυση στο Excel και το GraphPad-Prism. Για όλα τα στατιστικά τεστ η σημαντικότητα καθορίστηκε με το $p < 0.05$. Ο στατιστικός έλεγχος που πραγματοποιήθηκε σε όλες τις κατηγορίες πειραμάτων είναι one-way ANOVA, κατά τον

οποίον εξετάζεται μέσω σύγκρισης εάν οι μέσοι δύο ομάδων με μία κοινή παράμετρο είναι σημαντικά διαφορετικοί. Χρησιμοποιήθηκε post-hoc μέθοδος για να συγκριθούν όλες οι ομάδες μεταξύ τους. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι οι μέσοι όροι \pm το τυπικό σφάλμα του μέσου (s. e. m.).

3. Αποτελέσματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη η πειραματική διαδικασία ξεκινάει όταν τα ζώα έχουν ηλικία τεσσάρων μηνών. Στους τέσσερις μήνες τα ζώα τα οποία θα ανήκουν στις κατηγορίες WT ENT-A061 και APP ENT-A061, υποβάλλονται σε ένα χειρουργείο όπου τους εμφυτεύεται υποδόρια ο συνθετικός αγωνιστής νευροτροφινών ENT-A061 σε μορφή πελέτας. Μετά από δύο μήνες κατά τους οποίους απελευθερώνεται σταθερό ποσό του ENT-A061 από την πελέτα, ξεκινούν τα συμπεριφορικά πειράματα αξιολόγησης μνήμης και μάθησης με σκοπό να διαπιστωθεί μέσω των επιδόσεων των ζώων εάν υπάρχουν διαφορές στα ζώα που τους χορηγήθηκε ο αγωνιστής νευροτροφινών και στα ζώα που ανήκαν στις Placebo ομάδες, αλλά και στα ζώα που ανήκαν σε διαφορετικές ομάδες γονοτύπων. Μας ενδιαφέρει η επίδοση των ζώων σε αυτές τις γνωστικές διαδικασίες καθώς η νόσος Αλτσχάιμερ χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργίες στη μνήμη και τη μάθηση. Τέλος, το δεύτερο κομμάτι της εργασίας αυτής αφορά τον έλεγχο της επίδρασης του συνθετικού αγωνιστή των νευροτροφινών μαζί με το γονότυπο σε κυτταρικό επίπεδο, καθώς υπάρχουν διάφορα χαρακτηριστικά ευρήματα στη νόσο του Αλτσχάιμερ, όπως είναι η εναπόθεση πλακών αμυλοειδούς. Για το σκοπό αυτό απομονώνονται, κόβονται και βάφονται με τα κατάλληλα αντισώματα οι τομές από τους εγκεφάλους των ζώων. Τα πειράματα αυτά έχουν σκοπό να μελετηθούν οι πιθανές επιδράσεις του Αλτσχάιμερ αλλά και του συνθετικού αγωνιστή ENT-A061 σε ιστολογικό επίπεδο στην περιοχή του ιππόκαμπου, μία περιοχή όπου σχετίζεται με τη μνήμη και να συγκριθούν μεταξύ τους όλες οι τέσσερις κατηγορίες των ζώων.



Εικόνα 7. Πειραματικός σχεδιασμός. Στην εικόνα αυτή απεικονίζονται όλα τα πειράματα και οι διαδικασίες που διενεργήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη με χρονική σειρά με βάση την ηλικία των ζώων. Όλα τα ζώα και οι ιστοί που απομονώθηκαν υποβλήθηκαν σε πειράματα κάτω από

τις ίδιες συνθήκες ανεξαρτήτων της ομάδας στην οποία ανήκαν. Ο πειραματιστής κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν γνώριζε σε ποια ομάδα ζώων ανήκαν τα αποτελέσματα που ανέλυε (*blind analysis*).

Συμπεριφορικά πειράματα

Δοκιμασίες αναγνώρισης αντικειμένου

Στις δοκιμασίες αναγνώρισης αντικειμένου γίνεται αξιολόγηση της μνήμης που βασίζεται στην εγγενή τάση των ζώων να εξερευνούν το καινούργιο ως προς αυτά αντικείμενο. Αυτό εφαρμόζεται στην αναγνώριση νέου αντικειμένου, αλλά και στην αναγνώριση του μετατοπισμένου αντικειμένου και στην αναγνώριση του λιγότερο γνώριμου αντικειμένου. Οι συγκεκριμένες δοκιμασίες αναγνώρισης αντικειμένου που αξιολογούν τις εναλλαγές μνήμης χρησιμοποιούνται συχνά σε έρευνες φαρμακολογίας και ψυχιατρικών διαταραχών (Goulart et al., 2010).

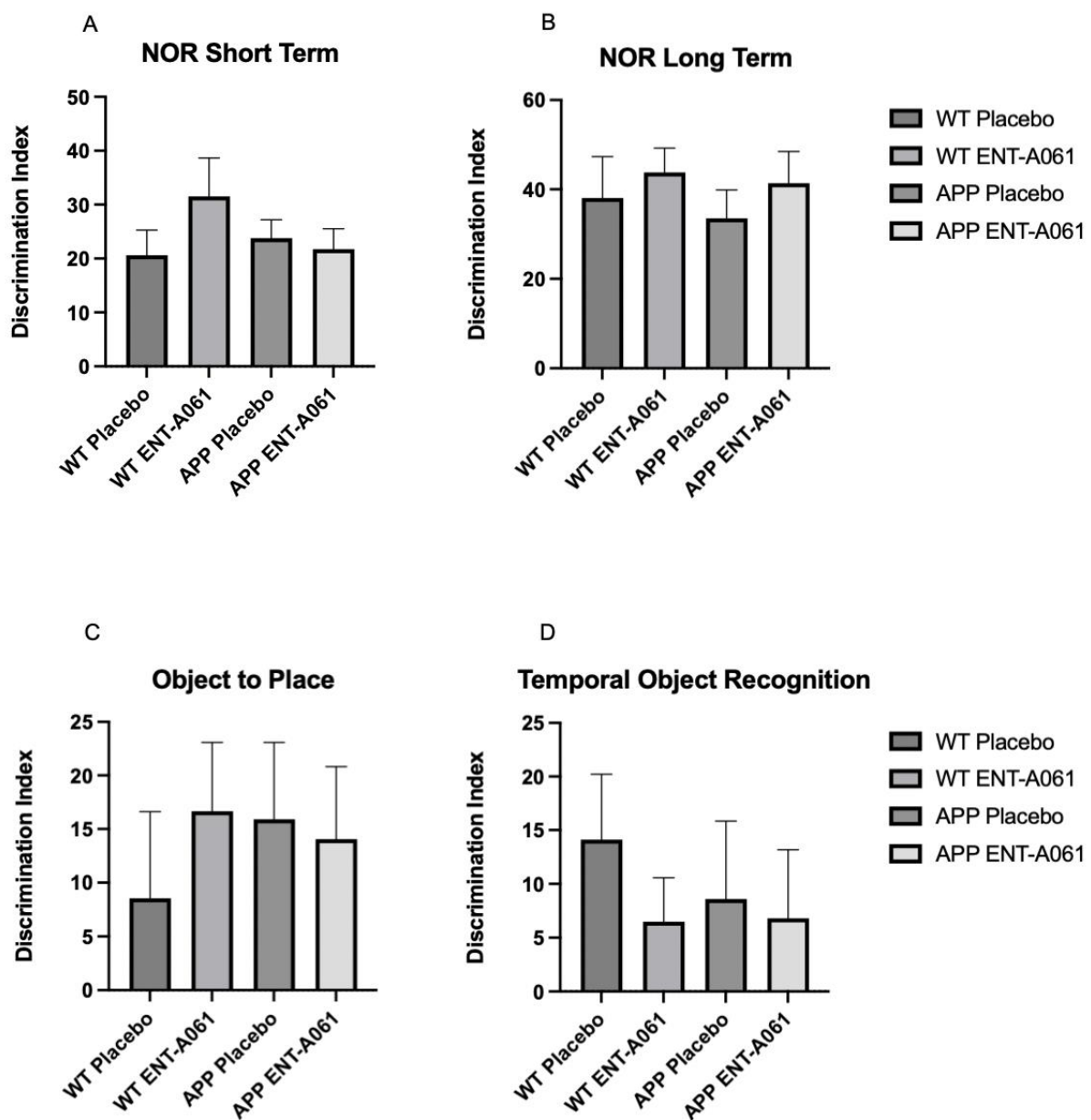
Στη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου τα ζώα έρχονται αντιμέτωπα με ένα αντικείμενο το οποίο το εξερεύνησαν στην δοκιμή και ένα εντελώς καινούργιο αντικείμενο και τις δύο ημέρες της πειραματικής διαδικασίας. Για αυτήν τη δοκιμασία υπολογίστηκε ο δείκτης διάκρισης ξεχωριστά και για τις δύο ημέρες (*short-term*, *long-term*). Υπολογίζεται από την εξής σχέση: $(\text{Καινούργιο} - \text{γνώριμο αντικείμενο}) / (\text{Καινούργιο} + \text{γνώριμο αντικείμενο})$. Αντίστοιχα για την δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου ως προς τη θέση ο δείκτης διάκρισης υπολογίζεται ως: $(\text{μετατοπισμένο} - \text{στάσιμο αντικείμενο}) / (\text{μετατοπισμένο} + \text{στάσιμο αντικείμενο})$. Τέλος στην δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου με χρονική σειρά ο δείκτης διάκρισης υπολογίζεται ως εξής: $(\text{λιγότερο γνώριμο} - \text{γνώριμο αντικείμενο}) / (\text{λιγότερο γνώριμο} + \text{γνώριμο αντικείμενο})$. Οι υπολογισμοί αυτών των δεικτών αφορούν τους μέσους όρους των επιδόσεων των τεσσάρων κατηγοριών των ζώων. Τα πειράματα αυτά έγιναν με σκοπό να αξιολογηθεί η ικανότητα των μυών να διακρίνουν μεταξύ των αντικειμένων. Τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά μεταξύ όλων των ομάδων (WT Placebo – WT ENT-A061 – APP Placebo – APP ENT-A061).

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα για το πείραμα NOR Short Term οι μέσοι όροι των ομάδων \pm sem έχουν ως εξής: WT Placebo: 20.6 ± 4.6 , WT ENT-A061: 30.6 ± 5.9 , APP Placebo: 23.7 ± 3.4 , APP ENT-A061: 19.6 ± 4 .

Για το πείραμα NOR Long Term: WT Placebo: 24.1 ± 6.2 , WT ENT-A061: 35.3 ± 7 , APP Placebo: 33.5 ± 6.3 , APP ENT-A061: 33 ± 8 .

Για το πείραμα TPOR: WT Placebo: 8.5 ± 8 , WT ENT-A061: 16.6 ± 6 , APP Placebo: 16 ± 7 , APP ENT-A061: 14 ± 6.7 .

Για το πείραμα TOR: WT Placebo: 14.1 ± 6.1 , WT ENT-A061: 6.4 ± 4 , APP Placebo: 8.5 ± 7.2 , APP ENT-A061: 6.8 ± 6.3 .



Εικόνα 8. Διάκριση στα πειράματα αναγνώρισης αντικειμένου. Στα διαγράμματα A-D παρουσιάζεται ο δείκτης διάκρισης χρόνου εξερεύνησης των αντικειμένων, καινούργιου οικείου ή μετατοπισμένου στάσιμου αντίστοιχα, μεταξύ όλων των πειραματικών ομάδων. Σε όλες τις πειραματικές δοκιμασίες οι ομάδες είναι οι εξής *WT Placebo* (n=11), *WT ENT-A061* (n=12), *APP Placebo* (n=13), *APP ENT-A061* (n=13). Μεταξύ όλων των ομάδων $p > 0.05$.

Δοκιμασία συντελεστικής εκμάθησης φόβου

Η συντελεστική εκμάθηση φόβου είναι μία διαδικασία μάθησης (Lee, 2013), στη συγκεκριμένα δοκιμασία τα ζώα υπόκεινται σε ένα ήπιο ηλεκτρικό ερεθισμό σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον. Στη συνέχεια καταγράφεται και μελετάται ο χρόνος όπου τα ζώα ήταν ακίνητα στο αρχικό αλλά και σε ένα διαφορετικό περιβάλλον στο οποίο δεν δέχθηκαν ηλεκτρικό ερεθισμό. Αυτό που μετρείται είναι τα δευτερόλεπτα ακινητοποίησης του εκάστοτε υποκειμένου (freezing). Αυτό που θέλουμε να δούμε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι η διάρκεια που τα ζώα θυμούνται τον ερεθισμό και η ικανότητά τους να διακρίνουν μεταξύ των δύο διαφορετικών πλαισίων, του ενός που δέχθηκαν τον ερεθισμό και του άλλου που δεν δέχθηκαν. Υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας *WT ENT-A061* και *APP Placebo*, αλλά και μεταξύ *APP Placebo* και *APP ENT-A061*.

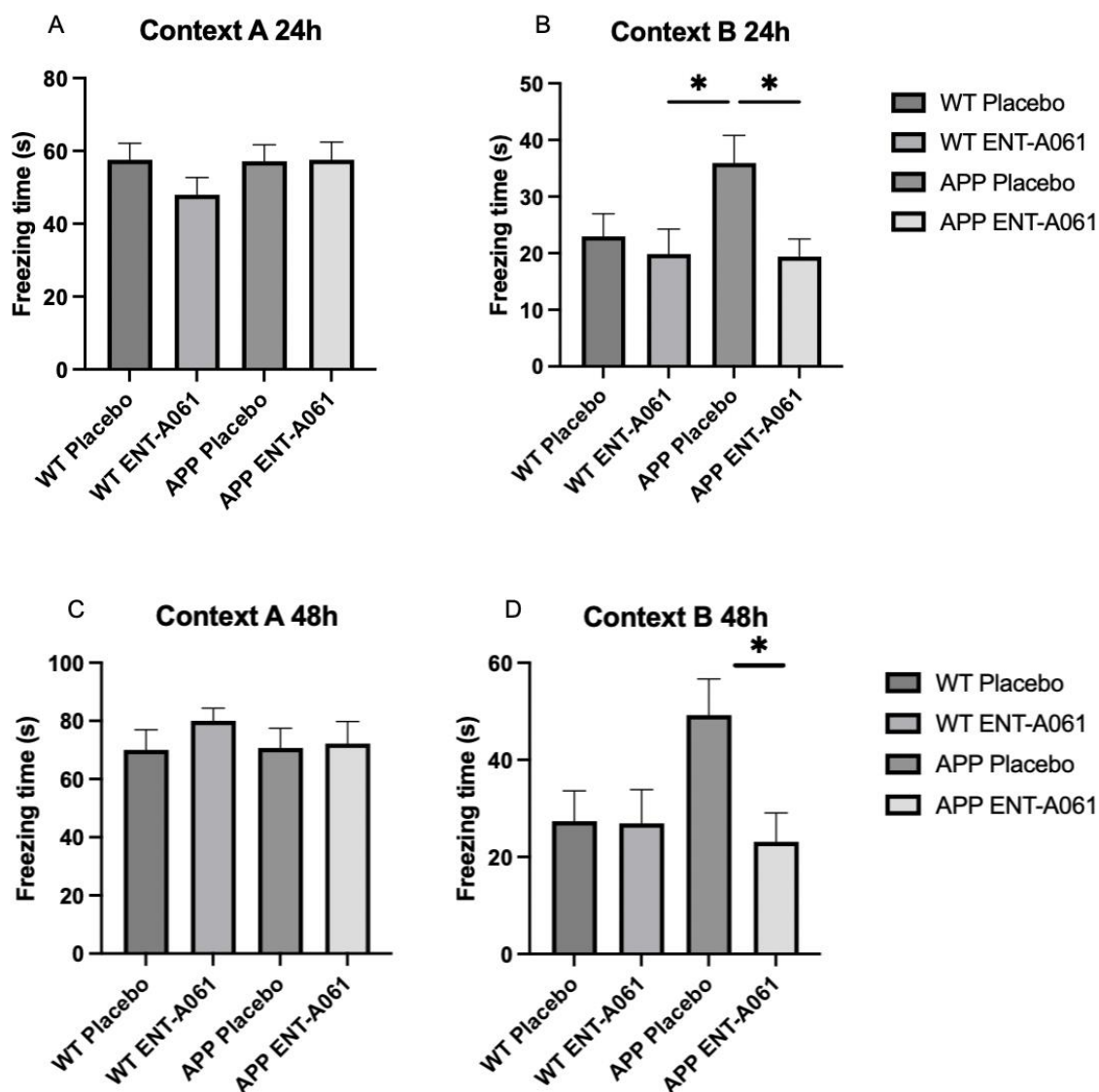
Συγκεκριμένα, για το πλαίσιο A στις 24 ώρες οι μέσοι όροι των ομάδων \pm sem έχουν ως εξής: *WT Placebo*: 57.5 \pm 4.5, *WT ENT-A061*: 47.9 \pm 4.7, *APP Placebo*: 57.1 \pm 4.5, *APP ENT-A061*: 57.5 \pm 4.9.

Για το πλαίσιο A στις 48 ώρες: *WT Placebo*: 70 \pm 6.8, *WT ENT-A061*: 80 \pm 4.3, *APP Placebo*: 70.6 \pm 6.7, *APP ENT-A061*: 72.2 \pm 7.6.

Για το πλαίσιο B στις 24 ώρες: *WT Placebo*: 23 \pm 3.9, *WT ENT-A061*: 19.8 \pm 4.4, *APP Placebo*: 34.7 \pm 6, *APP ENT-A061*: 20.9 \pm 3.2.

Για το πλαίσιο B στις 48 ώρες: *WT Placebo*: 30.6 \pm 6.5, *WT ENT-A061*: 32.1 \pm 8, *APP Placebo*: 38.2 \pm 8, *APP ENT-A061*: 27 \pm 6.7.

Contextual Fear Freezing Time



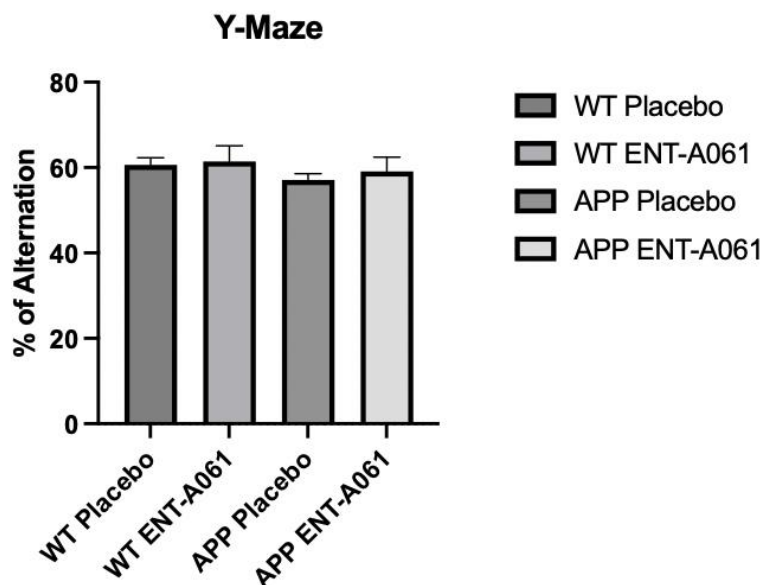
Εικόνα 9. Ακίνητοποίηση στην δοκιμασία συντελεστικής εκμάθησης φόβου. Στα διαγράμματα A-D παρουσιάζεται ο μέσος όρος των χρόνων όπου τα υποκείμενα των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων έμειναν ακίνητα. Τα διαγράμματα A, B αφορούν την δεύτερη ημέρα της πειραματικής διαδικασίας που τα ζώα δεν δέχτηκαν το ερέθισμα και συγκεκριμένα το A αφορά το περιβάλλον στο οποίο τα ζώα είχαν δεχθεί το ερέθισμα την προηγούμενη μέρα (A), ενώ το B αποτελεί ένα καινούργιο περιβάλλον (B). Στα C, D μετριέται ο χρόνος ακίνητοποίησης των ζώων

την τρίτη μέρα της πειραματικής διαδικασίας σε αντίστοιχα περιβάλλοντα A και B. Σε όλες τις πειραματικές δοκιμασίες οι ομάδες είναι οι εξής WT Placebo (n=11), WT ENT-A061 (n=12), APP Placebo (n=13), APP ENT-A061 (n=13). (B: p=0.0442, p=0.0392; D: p=0.0385).

Δοκιμασία Y λαβυρίνθου

Η δοκιμασία Y λαβυρίνθου χρησιμοποιείται για τη μελέτη της μνήμης εργασίας και τη λειτουργία του ιππόκαμπου μία περιοχή κρίσιμη για τη χωρική μνήμη. Τα ζώα έρχονται αντιμέτωπα με την εξερεύνηση των δύο καινούργιων αρμών του λαβυρίνθου. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία υπολογίστηκε το ποσοστό εναλλαγής. Το ποσοστό αυτό χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της χωρικής μνήμης ως ένδειξη του πόσο συχνά το υποκείμενο εναλλάσσει μεταξύ διαφορετικών αρμών των Y λαβυρίνθου. Για να υπολογισθεί αυτό το ποσοστό, αρχικά καταγράφεται ο συνολικός αριθμός επιλογών αρμού που έχει κάνει το υποκείμενο. Στη συνέχεια υπολογίζεται ο αριθμός των φορών που το ζώο έχει μπει σε έναν αρμό με τη σειρά χωρίς να υπολογίζεται η προηγούμενη επιλογή, δημιουργώντας τριπλέτες (π.χ. ΑΓΒ, ΑΒΑ, ΓΑΒ). Τέλος δημιουργείται το εξής κλάσμα:
$$\frac{\text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΩΝ ΤΡΙΠΛΕΤΩΝ}}{\text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΩΝ ΕΠΙΛΟΓΩΝ ΑΡΜΟΥ}} \times 100$$
, μέσω του οποίου υπολογίζεται το ποσοστό επί τοις εκατό της εναλλαγής. Ο σκοπός του πειράματος είναι να αξιολογηθεί η τάση των ζώων για εξερεύνηση νέων περιβαλλόντων. Από τα αποτελέσματα καμμία ομάδα ζώων δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά με κάποια άλλη.

Συγκεκριμένα για την πειραματική διαδικασία του Y λαβύρινθου οι μέσοι όροι των ομάδων±sem έχουν ως εξής: WT Placebo: 56.9±3.9, WT ENT-A061: 61.4±3.6, APP Placebo: 57±1.4, APP ENT-A061: 56.8±3.8.



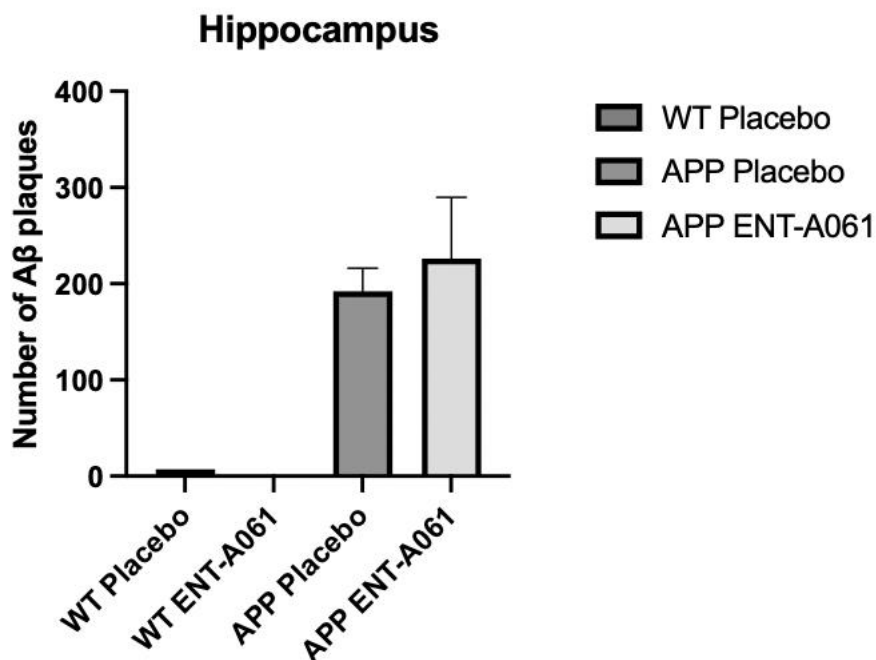
Εικόνα 10. Ποσοστό εναλλαγής επιλογής βραχίονα για τον Y λαβύρινθο. Για τη δοκιμασία Y λαβύρινθου υπολογίσθηκε το ποσοστό της εναλλαγής μεταξύ των τριών αρμών, στις τέσσερις ομάδες ζώων. Οι ομάδες είναι οι εξής WT Placebo (n=11), WT ENT-A061 (n=12), APP Placebo (n=13), APP ENT-A061 (n=13). Μεταξύ όλων των ομάδων $p > 0.05$.

Ιστολογικά πειράματα ανοσοφθορισμού

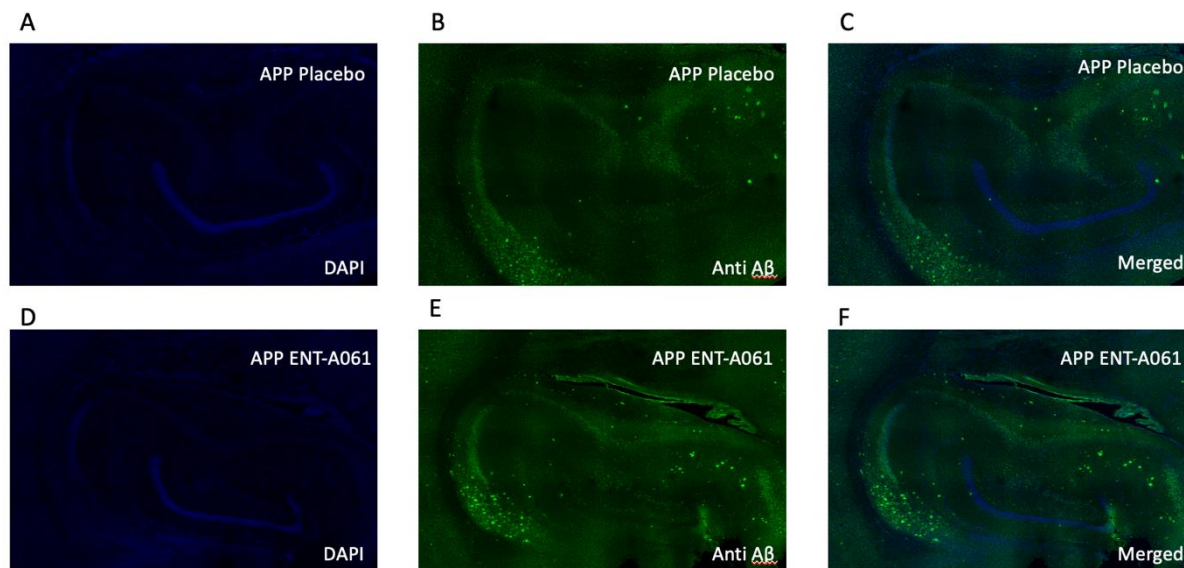
Χρώση με πρωτογενές αντίσωμα APP

Η χρώση αυτή γίνεται για τον εντοπισμό πλακών αμυλοειδούς και την σύγκριση του ποσού πλακών αμυλοειδούς πεπτιδίου ανάμεσα σε όλες τις 4 ομάδες. Συγκεκριμένα ανά φωτογραφία καταμετρώνται οι πλάκες αμυλοειδούς. Η καταμέτρηση αυτή γίνεται σε ολόκληρη την περιοχή του ιππόκαμπου και δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων.

Συγκεκριμένα σε αυτή τη χρώση οι μέσοι όροι των ομάδων \pm sem έχουν ως εξής: WT Placebo: 7, WT ENT-A061: 0, APP Placebo: 192.2 ± 23.8 , APP ENT-A061: 226.2 ± 63.4 .



Εικόνα 11. Αριθμός πλακών αμυλοειδούς ανά κατηγορία. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα φαίνεται ο μέσος όρος των πλακών αμυλοειδούς των μυών της κάθε ομάδας σε όλο τον ιππόκαμπο. Οι παραπάνω ομάδες είναι WT Placebo ($n=1$), WT ENT-A061 ($n=0$), APP Placebo ($n=5$), APP ENT-A061 ($n=5$). Μεταξύ όλων των ομάδων $p>0.05$.



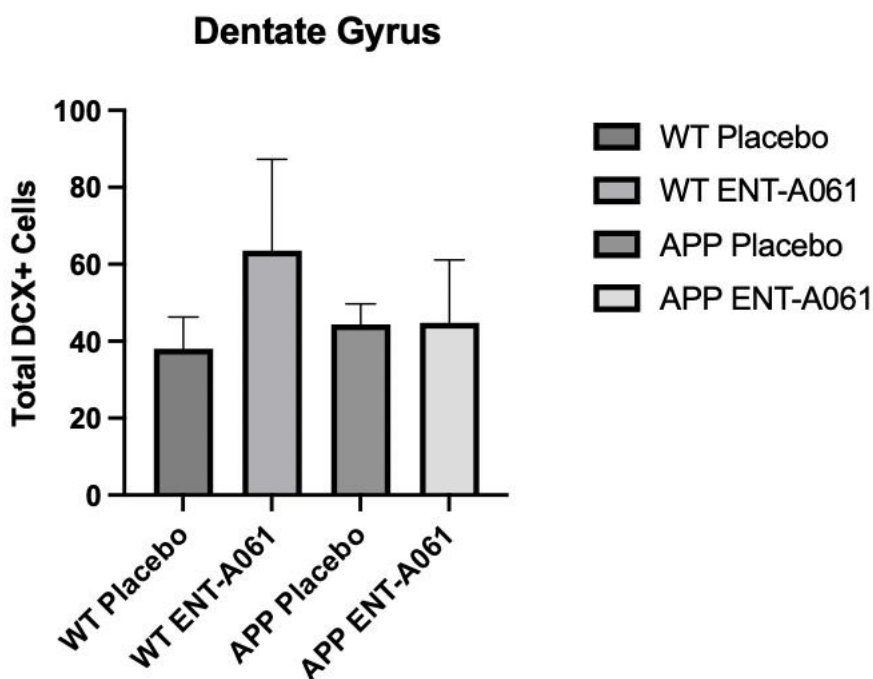
Εικόνα . Φωτογραφίες από ιππόκαμπο με χρώσεις με DAPI και 6E10. Στις εικόνες A και B βλέπουμε τις χρώσεις σε ιππόκαμπο APP Placebo ζώου με DAPI και 6E10 αντίστοιχα, ενώ στη C βλέπουμε την ένωση των δύο χρώσεων στην ίδια περιοχή της ίδιας τομής. Αντίστοιχα στις

εικόνες D, E και F για ιππόκαμπο ζώου APP ENT-A061. Μπορούν να παρατηρηθούν οι πυρήνες των κυττάρων και οι πλάκες αμυλοειδούς.

Χρώση με πρωτογενές αντίσωμα DCX

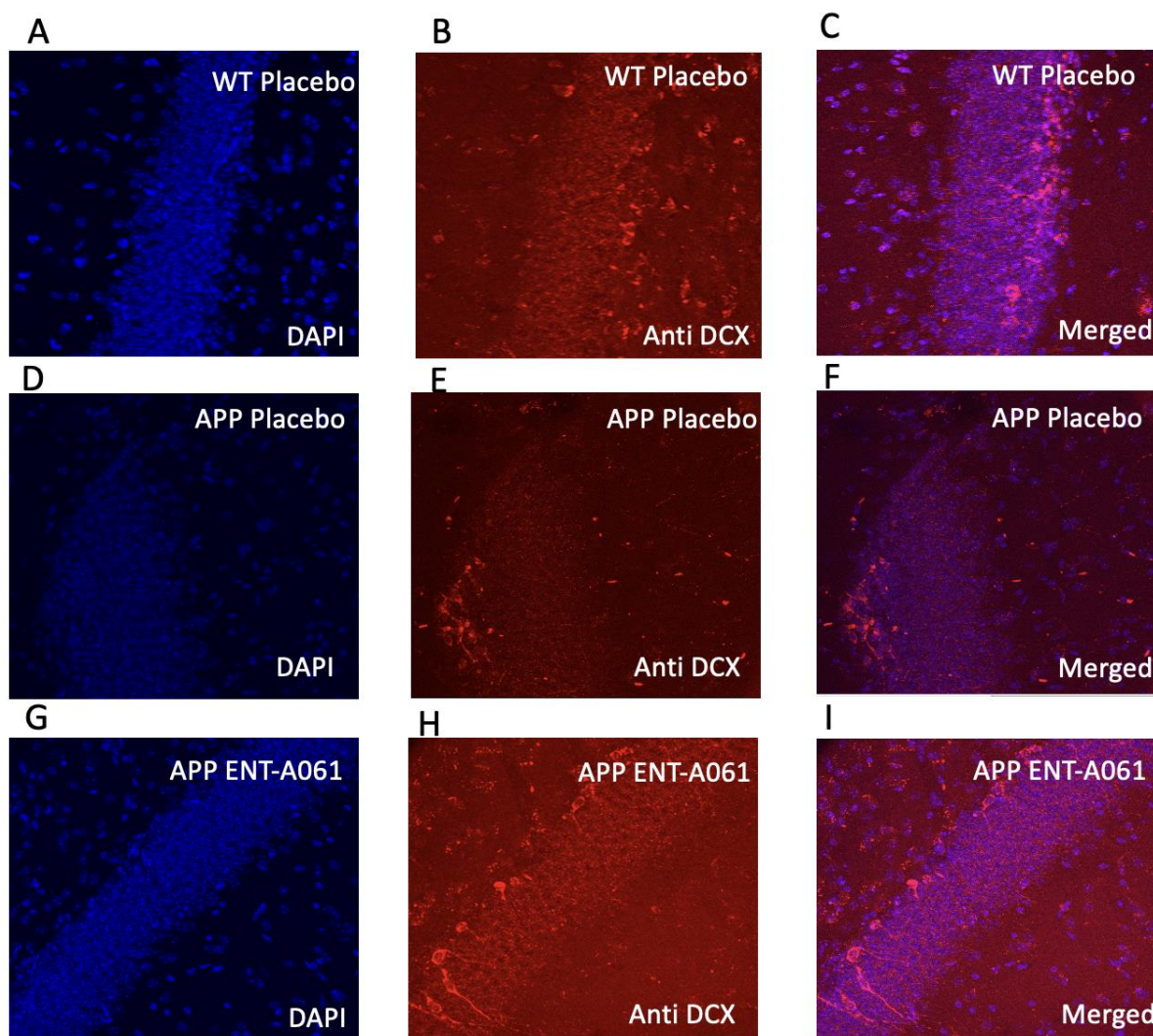
Η συγκεκριμένη χρώση έγινε για τον εντοπισμό πιθανής ενήλικης νευρογένεσης. Μετρήθηκαν στην περιοχή του DG (Dental Gyrus) κύτταρα τα οποία ήταν θετικά στην συγκεκριμένη ουσία (DCX+). Επιπλέον, στην συγκεκριμένη χρώση δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Συγκεκριμένα για τη συγκεκριμένη χρώση τα αποτελέσματα ήταν: WT Placebo: 30.7 ± 9.3 , WT ENT-A061: 63.5 ± 23.7 , APP Placebo: 44.3 ± 5.3 , APP ENT-A061: 44.75 ± 16.3 .



Εικόνα 12. Αριθμός DCX+ κυττάρων. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα φαίνεται ο μέσος όρος των κυττάρων με χρώση DCX στους εγκεφάλους στην περιοχή DG του ιππόκαμπου των μυνών

της κάθε ομάδας. Οι παραπάνω ομάδες είναι WT Placebo (n=4), WT ENT-A061 (n=4), APP Placebo (n=6), APP ENT-A061 (n=4). Μεταξύ όλων των ομάδων $p > 0.05$.



Εικόνα 13. Φωτογραφίες από την περιοχή DG του ιππόκαμπου με χρώσεις DAPI και DCX. Στις εικόνες A, B, D, E, G, H αποτελούν χρώσεις με DAPI και αντισώματα για DCX, ζώων WT Placebo, APP Placebo, APP ENT-A061 αντίστοιχα. Στις εικόνες C, F και I φαίνεται η ένωση των χρώσεων αυτών για τους αντίστοιχους εγκεφάλους. Μπορούν να παρατηρηθούν οι πυρήνες των κυττάρων αλλά και τα DCX+ κύτταρα.

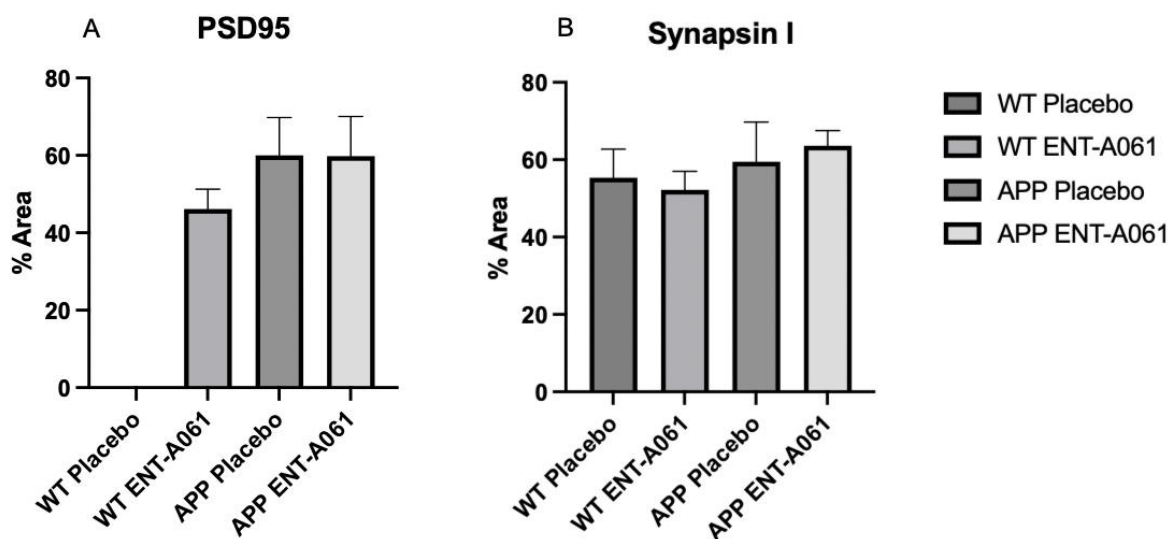
Χρώση με πρωτογενή αντισώματα PSD95 και Synapsin I

Ο σκοπός της συγκεκριμένης χρώσης είναι να μελετηθεί εάν υπήρξε διαφορά στην ποσότητα των συνάψεων μεταξύ του πριν και του μετά της χορήγησης είτε του ENT-A061 είτε placebo. Έγινε μέτρηση του φθορισμού ανά περιοχή με χρήση του προγράμματος Fiji (Image J). Η

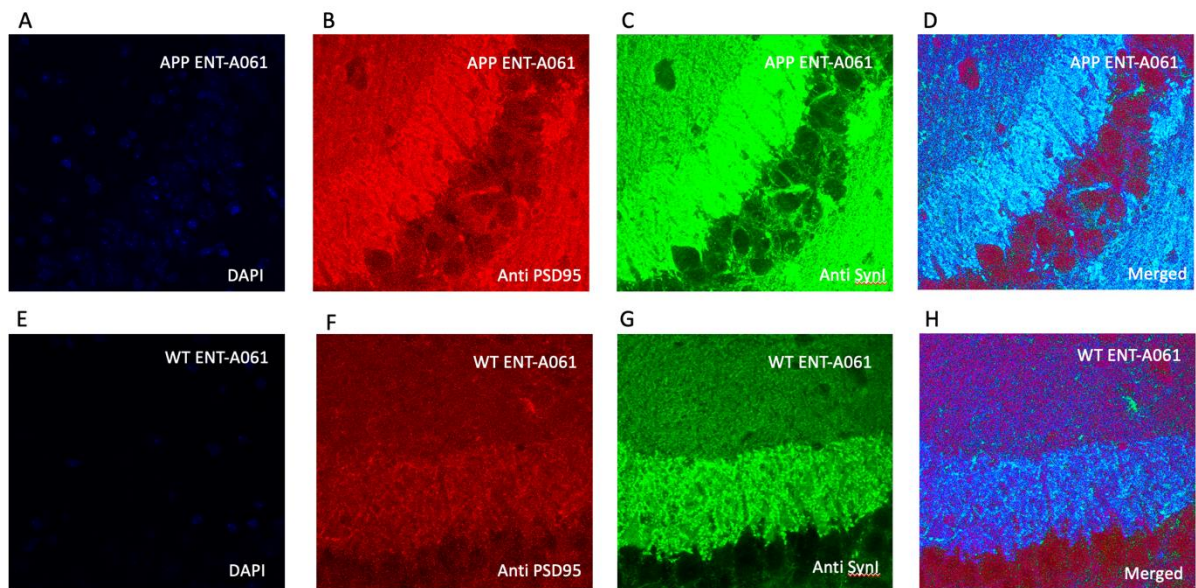
περιοχή η οποία ερευνάται για την συγκεκριμένη χρώση είναι η CA3 του ιππόκαμπου. Στις συγκεκριμένες χρώσεις δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των διαφορετικών ομάδων.

Συγκεκριμένα στη χρώση PSD95 τα αποτελέσματα ήταν WT Placebo: 0, WT ENT-A061: 46.1±5.1, APP Placebo: 60±9, APP ENT-A061: 59.8±10.2.

Ενώ για τη χρώση SynI τα αποτελέσματα ήταν WT Placebo: 55.3±7.3, WT ENT-A061: 52.2±4.8, APP Placebo: 59.5±10.2, APP ENT-A061: 63.6±3.9.



Εικόνα 14. Ποσοστό φθορισμού ανά περιοχή. Στα διαγράμματα A και B φαίνονται οι μέσοι όροι των ποσοστών φθορισμού ανά περιοχή CA3 για τις δύο διαφορετικές χρώσεις για τις τέσσερις πειραματικές ομάδες. Οι παραπάνω ομάδες για τη χρώση με PSD95 είναι WT Placebo ($n=0$), WT ENT-A061 ($n=5$), APP Placebo ($n=3$), APP ENT-A061 ($n=3$), ενώ για τη χρώση SynI είναι WT Placebo ($n=4$), WT ENT-A061 ($n=3$), APP Placebo ($n=3$), APP ENT-A061 ($n=5$). Μεταξύ όλων των ομάδων $p>0.05$.



Εικόνα 15. Φωτογραφίες από την περιοχή CA3 του ιππόκαμπου με χρώσεις DAPI, Anti PSD95 και Anti Synapsin I. Συγκεκριμένα, στις εικόνες A, B, C και E, F, G φαίνεται η χρώση DAPI, Anti PSD95 και Anti Synapsin I σε εγκεφάλους ζώων APP ENT-A061 και WT ENT-A061 αντίστοιχα. Στις εικόνες D και H φαίνεται στην ίδια περιοχή των ίδιων εγκεφάλων η ένωση αυτών των χρώσεων. Μπορούν να παρατηρηθούν οι πυρήνες των κυττάρων και οι περιοχές των συνάψεων.

4. Συζήτηση

Συμπεριφορικά πειράματα

Δοκιμασίες αναγνώρισης αντικειμένων

Σε έρευνες στις οποίες μελετάται η μνήμη των ζώων χρησιμοποιούνται συχνά οι συγκεκριμένοι έλεγχοι αναγνώρισης αντικειμένων, οι οποίοι βασίζονται στην εγγενή τάση των τρωκτικών να αναζητούν και να εξερευνούν το καινούργιο αντικείμενο (Ennaceur & Delacour, 1988). Τα συγκεκριμένα πειράματα είναι σχετικά εύκολα να εφαρμοστούν καθώς δεν απαιτούν από τα ζώα να μπουν σε διαδικασίες έλλειψης φαγητού ή νερού. Η μνήμη αναγνώρισης είναι μία πολύ βασική ικανότητα μνήμης που περιλαμβάνει την ικανότητα για αναγνώριση αλλά και την κρίση των προηγούμενων συνθηκών ή αντικειμένων (Brown & Aggleton, 2001). Στις διαδικασίες αναγνώρισης αντικειμένου έχει φανεί πως ουσιαστικό ρόλο παίζουν δύο περιοχές του εγκεφάλου, ο περιρινικός φλοιός και ο ιππόκαμπος. Συγκεκριμένα η δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου σχετίζεται με τις περιοχές του ιππόκαμπου, περιοχές του περιρινικού και ενδορινικού φλοιού (Buckmaster et al., 2004; Hammond et al., 2004). Ο ενδορινικός φλοιός κατέχει σημαντικό ρόλο στα inputs και τα outputs του ιππόκαμπου. Ακόμη, ένας δείκτης του Αλτσχάιμερ έχει προταθεί πως είναι και η μειωμένη ικανότητα της μνήμης οπτικής αναγνώρισης (αναγνώριση χαρακτηριστικών των αντικειμένων). Η μνήμη αυτή σχετίζεται με αλληλεπιδράσεις του νεοφλοιού με τον ενδορινικό και τον περιρινικό φλοιό,, ενώ ο ιππόκαμπος έχει κυρίως ρόλο σε χωρική και χρονική αναγνώριση αντικειμένου (Grayson et al., 2015). Ο ιππόκαμπος μαζί με τον ενδορινικό, τον περιρινικό και τις άλλες γειτονικές περιοχές (parahippocampal) δημιουργούν το σύστημα του medial temporal lobe (MTL), το οποίο είναι ένα σύστημα μνήμης.

Όσον αφορά τη δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου ως προς τη θέση, η τάση των τρωκτικών είναι να αφιερώσουν περισσότερο χρόνο προς εξερεύνηση του αντικειμένου που μετακινήθηκε σε νέα θέση (Ennaceur, Neave, & Aggleton, 1997). Η δοκιμασία αυτή βασίζεται σε λειτουργία του ιππόκαμπου, καθώς έχει σχέση με τη χωρική μνήμη (Rolls et al., 2018).

Στα πειράματα αναγνώρισης αντικειμένου με βάση τη θέση του και αντικειμένου με χρονική σειρά, πειράματα με ζώα με βλάβες σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου έχουν δείξει πως σημαντικό ρόλο παίζει και ο προμετωπιαίος φλοιός (PFC). Έχειδειχθεί ότι μη πρωτεύοντα ζώα μπορούν να διακρίνουν οικείο από μη οικείο αντικείμενο αλλά δεν μπορούν να διακρίνουν τα αντικείμενα με βάση τη σειρά που τους παρουσιάστηκαν, εάν πάσχουν από βλάβη στον

PFC (Mitchell, 1998). Επειδή συμπτώματα αντίστοιχα με τις βλάβες που αναφέρθηκαν, όπως αμνησία και αδυναμία αναγνώρισης οικείων αντικειμένων είναι συμπτώματα της νόσου του Αλτσχάιμερ που μελετάται στη συγκεκριμένη εργασία, τα πειράματα αναγνώρισης αντικειμένου είναι πολύ βασικά για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Συντελεστική εκμάθηση φόβου

Η εκμάθηση μέσω του φόβου και συγκεκριμένα του ηλεκτρικού σοκ στα πόδια είναι από τους πιο εύκολους τρόπους μάθησης μέσω συσχέτισης με το περιβάλλον. Η μάθηση και η συσχέτιση του χώρου αυτού με το ερέθισμα εκφράζονται ως πάγωμα του υποκειμένου (freezing), το πάγωμα αυτό αποτελεί ειδική συμπεριφορά για το συγκεκριμένο είδος ζώου, και αποτελούν αυτό που ονομάζεται *συντελεστική εκμάθηση φόβου* (Matus-Amat et al., 2004). Επιπλέον κατά την πειραματική διαδικασία στα πρωτόκολλα υπάρχει επανέκθεση στο ίδιο περιβάλλον που το ζώο έλαβε τον ηλεκτρισμό στο πόδι. Κατά την πειραματική διαδικασία αυτή, τα υποκείμενα μαθαίνουν να συσχετίζουν το ηλεκτρικό σοκ με το περιβάλλον (Α, εικόνα 5) στο οποίο το δέχτηκαν. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται ευαισθητοποίηση. Τις επόμενες μέρες όπου το ζώο εκτίθεται στο ίδιο περιβάλλον χωρίς το ερέθισμα σταδιακά απευαισθητοποιείται.

Πολλές μελέτες υποδεικνύουν πως βλάβη στον ιππόκαμπο επηρεάζει αρνητικά την συντελεστική εκμάθηση φόβου (Blanchard & Fial, 1968; Phillips & LeDoux, 1992). Οι ερευνητές Xu και Südhof, το 2013, επίσης υποστήριξαν πως οι περιοχές έσω προμετωπιαίος φλοιός και ιππόκαμπος εμπλέκονται στη διαδικασία της μνήμης στην συντελεστική εκμάθηση φόβου. Θεωρείται πως ο ιππόκαμπος έχει σημαντικό ρόλο αλλά ελεγχόμενο χρονικά στην αποθήκευση μνημών οι οποίες θα ενσωματωθούν αργότερα σε άλλες εγκεφαλικές δομές. Οι βλάβες στην περιοχή του ιππόκαμπου οδηγούν σε οπισθοδρομική αμνησία και για το λόγο αυτό μελετάται η συγκεκριμένη περιοχή στις έρευνες σχετικά με τη νόσο του Αλτσχάιμερ και στην συγκεκριμένη εργασία (Kim & Fanselow, 1992).

Τέλος, τα κοκκώδη οδοντωτά κύτταρα που γεννιούνται στον ενήλικο οργανισμό (DGCs) παράγονται διαρκώς από νευρικά βλαστικά κύτταρα στην οδοντωτή έλικα (DG) του ιππόκαμπου στους ανθρώπους και τα τρωκτικά καθ' όλα τη διάρκεια της ζωής τους. Τα DGCs ενσωματώνονται λειτουργικά στο κύκλωμα του ιππόκαμπου και παρουσιάζουν υψηλή συναπτική και δομική πλαστικότητα (Besnard & Sahay, 2021). Έρευνες δείχνουν πως ενδυναμώνοντας την ενήλικη νευρογένεση στις περιοχές DG-CA3-CA1, οδηγεί σε

βελτιωμένες επιδόσεις στην συντελεστική εκμάθηση φόβου αλλά επίσης ενισχύει την ικανότητα διάκρισης του ηλεκτρικού σοκ από το αντίστοιχο πλαίσιο (Miller & Sahay, 2019). Οι ερευνητές Sahay et al. το 2011 διενέργησαν συμπεριφορικά πειράματα συντελεστικής εκμάθησης φόβου. Τα ζώα τα οποία συμμετείχαν σε αυτό το πείραμα ήταν μύες με αυξημένη ενήλικη νευρογένεση. Τα ζώα αυτά ήταν πιο ικανά από τα ζώα της ομάδας ελέγχου στο να ξεχωρίζουν επικαλυπτόμενα πλαίσια, γεγονός το οποίο είναι ένδειξη για αυξημένη ικανότητα διαχωρισμού μοτίβων (pattern separation). Επιπλέον, οι ίδιοι αποδεικνύουν μέσω ακτινοβολίας στον ιππόκαμπο, πως οι μύες οι οποίοι δεν είχαν νευρώνες που γεννήθηκαν στην ενήλικη περιοχή DG, είχαν μειωμένη ικανότητα να ξεχωρίσουν μεταξύ δύο παρόμοιων περιβαλλόντων. Για τους λόγους αυτούς στη συγκεκριμένη μελέτη διεξάγεται και χρώση με DCX για την έρευνα των επιπέδων της ενήλικης νευρογένεσης, ανά τις διαφορετικές κατηγορίες ζώων και σχετικά με τη χορήγηση του συνθετικού ENT-A061.

Υ Λαβύρινθος δοκιμασία αυθόρμητης εναλλαγής

Η συγκεκριμένη δοκιμασία μελετάει την προθυμοποίηση των ζώων να εξερευνήσουν νέα περιβάλλοντα. Η δοκιμασία αυτή επιπλέον αποτελεί μία δοκιμασία της χωρικής μνήμης εργασίας (Prieur & Jadavji, 2019; Sarnyai et al., 2019). Έτσι, η αυθόρμητη εναλλαγή είναι ο τρόπος με τον οποίο μετρείται η χωρική μνήμη εργασίας. Ένα υποκείμενο με πλήρως λειτουργική μνήμη εργασίας θα θυμάται ποιοι ήταν οι αρμοί στους οποίους μπήκε πρόσφατα και έτσι θα φανεί η τάση του να επισκέπτεται τους λιγότερο πρόσφατους αρμούς της συσκευής Υ λαβυρίνθου. Επιπλέον είναι γνωστό πως στα ζώα που πάσχουν από τη νόσο του Αλτσχάιμερ εμφανίζονται δυσλειτουργίες όσον αφορά τη χωρική μνήμη, πράγμα που καθιστά τη πραγματοποίηση της συγκεκριμένης δοκιμασίας στη μελέτη αυτή, καίρια (Hoveida et al., 2011).

Πειράματα ανοσοφθορισμού

Στην εργασία αυτή έγινε μελέτη για την ποσότητα εναπόθεσης πλακών αμυλοειδούς. Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή οι συσώρευση πλακών αμυλοειδούς είναι υπεύθυνη για πολλά από τα βασικά συμπτώματα της νόσου Αλτσχάιμερ. Μέσω της τεχνικής του ανοσοφθορισμού έγινε η χρώση των τομών για ανίχνευση των πλακών αμυλοειδούς και το αποτέλεσμα δείχνει πως δεν υπάρχει παρ' όλα αυτά σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων στις οποίες ανήκαν τα ζώα σ αυτήν την εργασία, δεν καταγράφηκαν

όμως διαφορές ούτε μεταξύ των ομάδων Wild Type Placebo με 5xFAD Placebo. Επιπρόσθετα καθώς πολλές μελέτες δείχνουν μειωμένη ενήλικη νευρογένεση στα άτομα με τη νόσο του Αλτσχάιμερ, ήταν σημαντικό να γίνει χρώση με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού για την doublecortin, για την ανίχνευση κυττάρων θετικών σε DCX. Συγκεκριμένα η ποσοτικοποίηση των κυττάρων που εκφράζουν DCX είναι ένας αξιόπιστος δείκτης για τις ρυθμίσεις που γίνονται κατά την ενήλικη νευρογένεση (Couillard-Despres et al., 2005). Στη συνέχεια μετρήθηκε ο αριθμός συνάψεων σε όλες τις κατηγορίες των ζώων, με σκοπό να διευκρινιστεί εάν υπήρξε κάποια διαφορά μεταξύ τις κατηγορίες ζώων στα οποία χορηγήθηκε ο αγωνιστής ENT-A061. Η απώλεια των συνάψεων στη νόσο του Αλτσχάιμερ είναι ένα από τα αποτελέσματα που έχει η συσσώρευση πλακών αμυλοειδούς και συσχετίζεται και με την γνωστική έκπτωση (Colom-Cadena et al., 2020), πράγμα που σημαίνει ότι τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να συσχετιστούν και με τα συμπεριφορικά πειράματα που διενεργήθηκαν.

5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη η πλειοψηφία των συμπεριφορικών αλλά και όλα τα ιστολογικά πειράματα δεν επέφεραν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα. Μία ερμηνεία για αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσε να είναι πως ίσως δεν έγινε επιτυχημένο χειρουργείο ή/και πως οι πελέτες με τον συνθετικό αγωνιστή δεν διαλύθηκαν όπως ανέμεναν οι ερευνητές. Οι εξηγήσεις αυτές θα έδιναν απάντηση στη σύγκριση μεταξύ Placebo και ENT-A061 ομάδων που χαρακτηρίζονταν από τον ίδιο γονότυπο. Δεν είναι όμως ικανές αυτές οι ερμηνείες να απαντήσουν και στο εξής ερώτημα: γιατί δεν υπάρχει διαφορά στις επιδόσεις και στους ιστούς μεταξύ των δύο διαφορετικών γονοτύπων. Απάντηση σε αυτό το ερώτημα που αφορά κυρίως τις επιδόσεις στα συμπεριφορικά πειράματα, θα μπορούσαν να δώσουν οι συνθήκες που κυριαρχούσαν στο ζωοτροφείο και στο χώρο διεξαγωγής των συμπεριφορικών πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα οι θερμοκρασίες που είχαν αυτοί οι χώροι ήταν είτε 15 είτε 30 βαθμοί Κελσίου. Το πρόβλημα αυτό οφειλόταν σε βλάβη στο σύστημα κλιματισμού. Έχει αποδειχθεί πως η θερμοκρασία και οι μεταβολές τις μπορούν να αποτελέσουν περιβαλλοντικό στρεσογόνο παράγοντα, γνωστό και ως θερμικό στρες (thermal stress) (Gaskill & Garner, 2017). Ένα τέτοιο γεγονός μπορεί να ταράξει την ομοιόσταση των υποκειμένων, καθώς η θερμοκρασία στις συνήθεις συνθήκες εργαστηρίου είναι 20-24 βαθμοί Κελσίου (Gordon et al., 1993). Σε εργαστηριακές συνθήκες, τα ζώα έχουν λίγο ή καθόλου έλεγχο στη θερμοκρασία, και έτσι η απώλεια αυτού του ελέγχου αλλά και η απότομη μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί να τους προκαλέσει πίεση (Moberg, 2000). Έτσι, πιθανόν στην συγκεκριμένη εργασία οι απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας αλλά και η μεγάλη απόκλιση αυτών των τιμών από τις προτεινόμενες, να επηρέασε σημαντικά την επίδοση των υποκειμένων.

Συγκεκριμένα όμως στα αποτελέσματα των ιστολογικών πειραμάτων δεν υπάρχει επίσης κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Αυτό μπορεί επιπλέον να εξηγηθεί από τον μικρό αριθμό ζώων στα οποία έγιναν πειράματα και στις τέσσερις κατηγορίες. Τα μεγέθη των δειγμάτων είναι πολύ μικρά και τα στατιστικά αποτελέσματα μπορεί να μην είναι αρκετά ακριβή ή αξιόπιστα για να συναχθούν νοήματα.

Στη δεύτερη και στην τρίτη μέρα του πειράματος της συντελεστικής εκμάθησης φόβου και στο δεύτερο πλαίσιο, βλέπουμε πως υπάρχει μία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), καθώς τα ζώα με γονότυπο APP που δέχθηκαν Placebo, έχουν σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο ακινητοποιημένα απ' ό,τι τα ζώα με τον ίδιο γονότυπο που δέχθηκαν ENT-A061 και από τα

ζώα με γονότυπο αγρίου τύπου στα οποία χορηγήθηκε ENT-A061. Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να δείχνουν πως η χορήγηση του ENT-A061, πράγματι επηρεάζει την συσχέτιση του πλαισίου με το ηλεκτρικό ερέθισμα, αλλά και την ταχύτητα με την οποία το ζώα θα απευαισθητοποιηθούν.

Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν μπορεί να εξαχθεί ένα καθολικό συμπέρασμα για τη συνεισφορά του αγωνιστή ENT-A06, αλλά μπορεί να γραφτεί πως υπάρχει μία τάση λόγω κάποιων αποτελεσμάτων των συμπεριφορικών πειραμάτων να ενισχύει ο αγωνιστής αυτός την απόδοση των υποκειμένων αλλά και να βοηθάει στον διαχωρισμό μεταξύ διαφορετικών πλαισίων. Σύμφωνα με αυτά που έχω αναφέρει στην προηγούμενη ενότητα των αποτελεσμάτων, τα αποτελέσματα από τα συγκεκριμένα πειράματα θα μπορούσαν να είναι ένδειξη ενισχυμένης νευρογένεσης. Αυτό σημαίνει πως ο αγωνιστής ENT-A061 έχει ερευνητική προοπτική να ενισχύει την νευρογένεση σε συγκεκριμένες περιοχές του ιππόκαμπου, γεγονός που τον καθιστά στόχο για περαιτέρω έρευνα. Κάποιοι περιορισμοί που υπήρχαν στη μελέτη αυτή, θα μπορούσαν να προσπεραστούν επαναλαμβάνοντας την ίδια πειραματική διαδικασία συμπεριλαμβανομένων των συμπεριφορικών και των ιστολογικών πειραμάτων. Σε αυτήν την περίπτωση χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός ζώων για να μπορέσουν να επαληθευθούν στατιστικά τα αποτελέσματα. Επιπλέον ίσως χρειαστεί να αναθεωρηθεί η ποσότητα δραστικής ουσίας που χρησιμοποιείται στις πελέτες, αλλά θεωρώ αυτό μπορεί να γίνει σε δευτερεύοντα χρόνο. Πιο σημαντικά για την πορεία αυτής της έρευνας είναι η επανάληψη των πειραμάτων σε ρυθμισμένες συνθήκες θερμοκρασίας και με μεγαλύτερο αριθμό υποκειμένων.

6. Βιβλιογραφία

1. Aloe, L., Rocco, M., Balzamino, B., & Micera, A. (2015). Nerve growth factor: A focus on neuroscience and therapy. *Current Neuropharmacology*, *13*(3), 294–303. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150403231920>
2. Bagyinszky, E., Youn, Y. C., An, S. S., & Kim, S. Y. (2014). The genetics of alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 535. <https://doi.org/10.2147/cia.s51571>
3. Barde, Y. A., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO Journal*, *1*(5), 549–553. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x>
4. Barker, P. A., Mantyh, P., Arendt-Nielsen, L., Viktrup, L., & Tive, L. (2020). nerve growth factor signaling and its contribution to pain. *Journal of Pain Research, Volume 13*, 1223–1241. <https://doi.org/10.2147/jpr.s247472>
5. Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, *217*(4558), 408–414. <https://doi.org/10.1126/science.7046051>
6. Besnard, A., & Sahay, A. (2021). Enhancing adult neurogenesis promotes contextual fear memory discrimination and activation of hippocampal-dorsolateral septal circuits. *Behavioural Brain Research*, *399*, 112917. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112917>
7. Binder, D. K., & Scharfman, H. E. (2004). Mini review. *Growth Factors*, *22*(3), 123–131. <https://doi.org/10.1080/08977190410001723308>
8. Brown, M. W., & Aggleton, J. P. (2001). Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(1), 51–61. <https://doi.org/10.1038/35049064>
9. Buckmaster, C. A., Eichenbaum, H., Amaral, D. G., Suzuki, W. A., & Rapp, P. R. (2004). Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in Monkeys. *The Journal of Neuroscience*, *24*(44), 9811–9825. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1532-04.2004>
10. Casaccia-Bonnel, P., Carter, B., Dobrowsky, R. et al. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* *383*, 716–719 (1996). <https://doi.org/10.1038/383716a0>
11. Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Disease-A Month*, *56*(9), 484–546. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>
12. Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(4), 299–309. <https://doi.org/10.1038/nnr1078>
13. Colom-Cadena, M., Spires-Jones, T., Zetterberg, H. et al. The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease. *Alz Res Therapy* *12*, 21 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00588-4>
14. Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., & Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: Evidence for anterograde axonal transport. *The Journal of Neuroscience*, *17*(7), 2295–2313. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-0702295.1997>
15. Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubek, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H.-G., & Aigner, L. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, *21*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x>

16. Cruchaga, C., Del-Aguila, J. L., Saef, B., Black, K., Fernandez, M. V., Budde, J., Ibanez, L., Deming, Y., Kapoor, M., Tosto, G., Mayeux, R. P., Holtzman, D. M., Fagan, A. M., Morris, J. C., Bateman, R. J., Goate, A. M., & Harari, O. (2017). Polygenic risk score of sporadic late-onset alzheimer's disease reveals a shared architecture with the familial and early-onset forms. *Alzheimer's & Dementia*, *14*(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.08.013>
17. Cunha. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.001.2010>
18. Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK Group of MAP kinases. *Cell*, *103*(2), 239–252. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00116-1)
19. Duyckaerts, C., Delatour, B., & Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, *118*(1), 5–36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>
20. Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral Data. *Behavioural Brain Research*, *31*(1), 47–59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-x](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-x)
21. Findeis, M. A. (2007). The role of amyloid β peptide 42 in alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, *116*(2), 266–286. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.06.006>
22. Friedman, W. (2012). Growth factors. *Basic Neurochemistry*, 546–557. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374947-5.00029-8>
23. Fryer, R. H., Kaplan, D. R., & Kromer, L. F. (1997). Truncated trkb receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in Vitro. *Experimental Neurology*, *148*(2), 616–627. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6699>
24. Gaskill, B. N., & Garner, J. P. (2017). Stressed out: Providing laboratory animals with behavioral control to reduce the physiological effects of stress. *Lab Animal*, *46*(4), 142–145. <https://doi.org/10.1038/lablan.1218>
25. Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., & Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of alzheimer disease: Identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(11), 4051–4055. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.11.4051>
26. Gordon, C. J., Becker, P., & Ali, J. S. (1998). Behavioral thermoregulatory responses of single- and Group-housed mice. This paper has been reviewed by the National Health and Environmental Effects Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, and approved for publication. mention of trade names or commercial products does not constitute endorsement or recommendation for use. *Physiology & Behavior*, *65*(2), 255–262. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00148-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00148-6)
27. Gravanis, A., Padiaditakis, I., & Charalampopoulos, I. (2017). Synthetic Microneurotrophins in therapeutics of neurodegeneration. *Oncotarget*, *8*(6), 9005–9006. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14667>
28. Grayson, B., Leger, M., Piercy, C., Adamson, L., Harte, M., & Neill, J. C. (2015). Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. *Behavioural Brain Research*, *285*, 176–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.025>
29. Gu, X., Ding, F., Yang, Y., & Liu, J. (2015). Tissue engineering in peripheral nerve regeneration. *Neural Regeneration*, 73–99. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12801732-6.00005-7>

30. Hallböök, F. (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and trk receptor gene families. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(5), 616–621. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(99\)00011-2](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(99)00011-2)
31. HAMMOND, R. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.005>
32. Hammouda, M., Ford, A., Liu, Y., & Zhang, J. (2020). The JNK signaling pathway in inflammatory skin disorders and cancer. *Cells*, 9(4), 857. <https://doi.org/10.3390/cells9040857>
33. Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2015). The PI3K-PKB/akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026609>
34. Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: The role of inflammation in alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>
35. Hernández-Echeagaray, E. (2020). Neurotrophin-3 modulates synaptic transmission. *Vitamins and Hormones*, 71–89. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2020.04.008>
36. Hooli, B., & Tanzi, R. E. (2016). The genetic basis of alzheimer's disease. *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry*, 547–571. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800105-9.00034-2>
37. Hoveida, R., Alaei, H., Oryan, S., Parivar, K., & Reisi, P. (2011). Treadmill running improves spatial memory in an animal model of alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 216(1), 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.003>
38. Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, *et al*. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3228–33
39. Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G.-Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R. C., Nicoll, R. A., & Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in alzheimer's disease mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 3228–3233. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3228>
40. Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 609–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>
41. Ioannou, M., & Fahnstock, M. (2017). PRNGF, but not NGF, switches from neurotrophic to apoptotic activity in response to reductions in trka receptor levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 599. <https://doi.org/10.3390/ijms18030599>
42. Ivanisevic, L., & Saragovi, H. U. (2013). Neurotrophins. *Handbook of Biologically Active Peptides*, 1639–1646. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385095-9.00224-4>
43. J. Allen, S., J. Watson, J., & Dawbarn, D. (2011). The neurotrophins and their role in alzheimers disease. *Current Neuropharmacology*, 9(4), 559–573. <https://doi.org/10.2174/157015911798376190>
44. Jackson, J., Jambrina, E., Li, J., Marston, H., Menzies, F., Phillips, K., & Gilmour, G. (2019). Targeting the synapse in alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00735>
45. Jellinger, K. A. (2010). Basic mechanisms of neurodegeneration: A critical update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.15824934.2010.01010.x>

46. Keefe, K. A., & Horner, K. A. (2016). Neurotransmitter regulation of striatal gene expression. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 609–637. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802206-1.00030-1>
47. Kenchappa, R. S., & Carter, B. D. (2013). Neurotrophin receptor signaling. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 241–246. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378630-2.00405-9>
48. Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 256(5057), 675–677. <https://doi.org/10.1126/science.1585183>
49. Kokaia, Z., Andsberg, G., Martinez-Serrano, A., & Lindvall, O. (1998). Focal cerebral ischemia in rats induces expression of P75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons. *Neuroscience*, 84(4), 1113–1125. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00579-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00579-4)
50. Krenacs, L., Krenacs, T., Stelkovic, E., & Raffeld, M. (2009). Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Immunocytochemical Methods and Protocols*, 103–119. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_14
51. Kuznetsov, I. A., & Kuznetsov, A. V. (2018). How the formation of amyloid plaques and neurofibrillary tangles may be related: A mathematical modelling study. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 474(2210), 20170777. <https://doi.org/10.1098/rspa.2017.0777>
52. Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., & Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from AB 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6448–6453. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>
53. Leng, F., & Edison, P. (2020). Neuroinflammation and microglial activation in alzheimer disease: Where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17(3), 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
54. Li Puma, D. D., Piacentini, R., & Grassi, C. (2021). Does impairment of adult neurogenesis contribute to pathophysiology of alzheimer's disease? A still open question. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.578211>
55. Longo, F. M., & Massa, S. M. (2013). Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: A strategy for the treatment of neurological disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(7), 507–525. <https://doi.org/10.1038/nrd4024>
56. Longo, F. M., & Massa, S. M. (2013). Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: A strategy for the treatment of neurological disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(7), 507–525. <https://doi.org/10.1038/nrd4024>
57. Lübke J., Idoon F., Mohasel-Roodi M., Alipour F., Hami J., Ehteshampour A., Mostafae H., Sadeghi A. (2021). Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: pathogenesis and therapy. *Acta Neurobiol Exp* 2021, 81: 314–327
58. Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., & Barbeito, L. (2001). The molecular bases of alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research*, 32(5), 367–381. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(01\)00316-2](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(01)00316-2)
59. Miller, S. M., & Sahay, A. (2019). Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. *Nature Neuroscience*, 22(10), 1565–1575. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0484-2>

60. Mitchell, J. (1998). The medial frontal cortex and temporal memory: Tests using spontaneous exploratory behaviour in the rat. *Behavioural Brain Research*, 97(1-2), 107–113. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(98\)00032-1](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(98)00032-1)
61. Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: Implications for animal welfare. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare.*, 1–21. <https://doi.org/10.1079/9780851993591.0001>
62. Mu, Y., & Gage, F. H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-85>
63. Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, 26(40), 10129–10140. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1202-06.2006>
64. Oblak, A. L., Lin, P. B., Kotredes, K. P., Pandey, R. S., Garceau, D., Williams, H. M., Uyar, A., O'Rourke, R., O'Rourke, S., Ingraham, C., Bednarczyk, D., Belanger, M., Cope, Z. A., Little, G. J., Williams, S.-P. G., Ash, C., Bleckert, A., Ragan, T., Logsdon, B. A., ... Lamb, B. T. (2021). Comprehensive evaluation of the 5XFAD mouse model for preclinical testing applications: A model-AD study. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.713726>
65. Patapoutian, A., & Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 272–280. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00208-7)
66. Peditakis, I., Kodella, K.R., Manatakis, D.V. *et al.* Modeling alpha-synuclein pathology in a human brain-chip to assess blood-brain barrier disruption. *Nat Commun* 12, 5907 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26066-5>
67. Perry, R. J. (1999). Attention and executive deficits in alzheimer's disease: A critical review. *Brain*, 122(3), 383–404. <https://doi.org/10.1093/brain/122.3.383>
68. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* Vol. 331, No. 1261, Development and Regeneration of the Nervous System (Mar. 29, 1991), pp. 255-258
69. Plascencia-Villa, G., & Perry, G. (2020). Status and future directions of clinical trials in alzheimer's disease. *International Review of Neurobiology*, 3–50. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2020.03.022>
70. Prieur, E., & Jadavji, N. (2019). Assessing spatial working memory using the spontaneous alternation Y-maze test in aged male mice. *BIO-PROTOCOL*, 9(3). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3162>
71. Rajendran, L., Honscho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., & Simons, K. (2006). Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11172–11177. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603838103>
72. Rodríguez, J. J., & Verkhratsky, A. (2011). Neurogenesis in alzheimer's disease. *Journal of Anatomy*, 219(1), 78–89. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01343.x>
73. Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castrén M, Castrén E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*. 2005 Feb 2;25(5):1089-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3741-04.2005. PMID: 15689544; PMCID: PMC6725966.

74. Schaar, B. T., Kinoshita, K., & McConnell, S. K. (2004). Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron*, *41*(2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/s08966273\(03\)00843-2](https://doi.org/10.1016/s08966273(03)00843-2)
75. Schindowski, K., Belarbi, K., & Buée, L. (2008). Neurotrophic factors in alzheimer's disease: Role of Axonal Transport. *Genes, Brain and Behavior*, *7*, 43–56. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2007.00378.x>
76. Skaper, S. (2008). The biology of Neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of Neurotrophins and their receptors. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *7*(1), 46–62. <https://doi.org/10.2174/187152708783885174>
77. Skaper, S. D., Facci, L., Zusso, M., & Giusti, P. (2017). Synaptic plasticity, dementia and alzheimer disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *16*(3), 220–233. <https://doi.org/10.2174/1871527316666170113120853>
78. Small, D. H. (1998). *Neurochemical Research*, *23*(5), 795–806. <https://doi.org/10.1023/a:1022471729291>
79. Sofroniew, M. V., Howe, C. L., & Mobley, W. C. (2001). Nerve growth factors signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annual Review of Neuroscience*, *24*, 1217–81. Retrieved from <https://www.proquest.com/scholarly-journals/nerve-growth-factors-signaling-neuroprotection/docview/198914155/se-2>
80. Svendsen, C. Live N., Cooper, Jonathan D., & Sofroniew, Michael V. (1991). Trophic factor effects on septal cholinergic Neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *640*(1), 91–94. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb00197.x>
81. Takahashi, R. H., Nagao, T., & Gouras, G. K. (2017). Plaque Formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in alzheimer's disease. *Pathology International*, *67*(4), 185–193. <https://doi.org/10.1111/pin.12520>
82. Terry, A. V., & Buccafusco, J. J. (2003). The cholinergic hypothesis of age and alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *306*(3), 821–827. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041616>
83. Tuszynski, M. H., Yang, J. H., Barba, D., U, H.-S., Bakay, R. A., Pay, M. M., Masliah, E., Conner, J. M., Kobalka, P., Roy, S., & Nagahara, A. H. (2015). Nerve growth factor gene therapy. *JAMA Neurology*, *72*(10), 1139. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.1807>
84. Uren, R. T., & Turnley, A. M. (2014). Regulation of neurotrophin receptor (TRK) signaling: Suppressor of Cytokine Signaling 2 (SOCS2) is a new player. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00039>
85. Wareham, L. K., Liddelow, S. A., Temple, S., Benowitz, L. I., Di Polo, A., Wellington, C., Goldberg, J. L., He, Z., Duan, X., Bu, G., Davis, A. A., Shekhar, K., Torre, A. L., Chan, D. C., Canto-Soler, M. V., Flanagan, J. G., Subramanian, P., Rossi, S., Brunner, T., ... Calkins, D. J. (2022). Solving neurodegeneration: Common mechanisms and strategies for new treatments. *Molecular Neurodegeneration*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00524-0>
86. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci* *72*: 1858–1862
87. Weston, C. R., & Davis, R. J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.001>
88. Yaar, M., Zhai, S., Fine, R. E., Eisenhauer, P. B., Arble, B. L., Stewart, K. B., & Gilchrist, B. A. (2002). Amyloid β binds trimers as well as monomers of the 75-KDA

- neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7720–7725. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110929200>
89. Yarza, R., Vela, S., Solas, M., & Ramirez, M. J. (2016). C-jun N-terminal kinase (JNK) signaling as a therapeutic target for alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00321>
90. Yeung, A. W., Tzvetkov, N. T., & Atanasov, A. G. (2018). When neuroscience meets pharmacology: A neuropharmacology literature analysis. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00852>
91. Younkin, S. G. (1998). The role of a β 2 in alzheimer's disease. *Journal of Physiology-Paris*, 92(3-4), 289–292. [https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(98\)80035-1](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(98)80035-1)
92. Zaccaro, M. C., Ivanisevic, L., Perez, P., Meakin, S. O., & Saragovi, H. U. (2001). P75 co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering trk docking subdomains. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31023–31029. <https://doi.org/10.1074/jbc.m104630200>
93. Zhang, J., Wu, N., Wang, S., Yao, Z., Xiao, F., Lu, J., & Chen, B. (2021). Neuronal loss and microgliosis are restricted to the core of AB deposits in mouse models of alzheimer's disease. *Aging Cell*, 20(6). <https://doi.org/10.1111/accel.13380>
94. Goulart, B. K., de Lima, M. N. M., de Farias, C. B., Reolon, G. K., Almeida, V. R., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schröder, N., & Roesler, R. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, 167(4), 969–973. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.032>
95. Lee, J. L. C. (2013). Mechanisms and functions of hippocampal memory reconsolidation. *Memory Reconsolidation*, 43–68. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386892-3.00003-2>
96. Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., & Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature09817>
97. Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., & Chao, M. V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 350(6320), 678–683. <https://doi.org/10.1038/350678a0>