

Magdalena Kuszczak

Rozprawa doktorska

**Próby modulowania wywołanej przez A β patologii synaps
glutaminianergicznych**

**Promotorzy: prof. dr hab. n. med. Jerzy W. Łazarewicz
dr hab. n. med. Marcin J. Sadowski**

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego

Polska Akademia Nauk

Zakład Neurochemii – Pracownia Farmakoneurochemii

Warszawa 2011

W niniejszej pracy chciałabym złożyć serdeczne podziękowania panu profesorowi Jerzemu Łazarewiczowi za patronat naukowy, cenne wskazówki oraz pomoc w rozwiązywaniu napotkanych problemów w pracy badawczej, jak również za ogromne wsparcie w trudnych chwilach i napełnianie mnie optymizmem.

Panu profesorowi Marcinowi Sadowskiemu dziękuję za nieustanny patronat naukowy, możliwość prowadzenia różnokierunkowych badań, które wniosły istotny wkład w mój rozwój intelektualny, poszerzenie warsztatu metodycznego, a także stały się źródłem ogromnej satysfakcji płynącej z pracy naukowej.

Ponadto chciałabym złożyć serdeczne podziękowania całemu zespołowi Zakładu Neurochemii za owocną współpracę oraz przyjazną atmosferę.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie zostały częściowo umieszczone w publikacji:

Kuszczyk M, Słomka M, Antkiewicz-Michaluk L, Salińska E, Łazarewicz JW. (2010) 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and established uncompetitive NMDA receptor antagonists induce tolerance to excitotoxicity. *Pharmacol Rep* 62(6): 1041-1050.

Praca powstała w wyniku realizacji następujących projektów badawczych:

1. NIH/NIA R01 AG031221 (M.J.Sadowski)
2. NIH/NIA K02 AG034176 (M.J.Sadowski)
3. Hartford/AFAR Collaborative Research Grant (M.J.Sadowski)
4. MNiSW 26/E-40/SN-0023/2007 (J.W. Łazarewicz)
5. MNiSW N N401 066738 (D. Makarewicz)

Wykaz najważniejszych skrótów użytych w rozprawie:

A β	(ang. β -amyloid peptide) – amyloid β
AD	(ang. Alzheimer`s disease) – choroba Alzheimera
Akt	(ang. serine-threonine kinase) – kinaza serynowo-treoninowa
AMPA	(ang. alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) – kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoksazolepropionowy
apo E	(ang. apolipoprotein E) - apolipoproteina E
ATP	(ang. adenosine triphosphate) - adenozynotrifosforan
β APP	(ang. A β precursor protein) – białko prekursorowe A β
CaMKII	(ang. calmodulin-dependent protein kinase II) – wielofunkcyjna zależna od kalmoduliny kinaza II
Cdk5	(ang. cyclin-dependent kinase 5) – cyklinozależna kinaza 5
COMT	(ang. catechol-O-methyltransferase) - katecholo-O-metylotransferaza
EEA1	(ang. early endosome antigen 1 protein) – marker wczesnych endosomów
GFAP	(ang. glial fibrillary acid protein) - kwaśne fibrylarne białko glejowe
GSK3 β	(ang. glycogen synthase kinase 3 beta) - kinaza syntazy glikogenu 3
FBS	(ang. fetal bovine serum) – surowica płodowa cielęca
HFIP	(ang. 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) - 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
Hsp60	(ang. heat shock protein 60) – białko szoku cieplnego 60

i.p.	(łac. Intraperitoneal) – dootrzewnowo
LDL	(ang. low-density lipoprotein) - lipoproteina o niskiej gęstości
LTD	(ang. long-term depression) - długotrwałe osłabienie synaptyczne
LTP	(ang. long-term potentiation - długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
LRP-1	(ang. low-density lipoprotein receptor-related protein 1) – receptor związany z lipoproteiną o niskiej gęstości 1
MAO	(ang. monoamine oxidase) - monoaminooksydaza
MAP2	(ang. microtubule-associated protein 2) – białko związane z mikrotubulami 2
MEM	(ang. 3,5-dimethyl-amantadine hydrochloride) - memantyna
1MeTIQ	(ang. 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) - 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina
MK-801	(ang. dizocilpine; (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate) – dizocilpina; maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzocyklohepteno-5,10-iminy
MPTP	(ang. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) – 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna
NFTs	(ang. neurofibrillary tangles) - sploty neurofibrylarne
NMDA	(ang. N-methyl- D-aspartic acid) – kwas N-metylo-D-asparaginowy

NO	(ang. nitric oxide) – tlenek azotu
OUN	Ośrodkowy Układ Nerwowy
PD	(ang. Parkinson`s disease) - choroba Parkinsona
PHFs	(ang. paired helical filaments) - spiralnie skręcone włókienka
PI3K	(ang. phosphoinositide-3 kinase) – fosfoinozytowa-3 kinaza
PKA	(ang. protein kinase A) – kinaza białkowa A
PKC	(ang. protein kinase C) – kinaza białkowa C
PP1/PP2A/ PP2B/PP2C	(ang. protein phosphatase-1/-2A/-2B/-2C) – fosfataza białkowa 1/2A/2B/2C
PS1	(ang. presenilin 1) – presenilina 1
PS2	(ang. presenilin 2) – presenilina 2
PSD-95	(ang. post-synaptic density protein 95) – białko gęstości postsynaptycznej 95
RAB7	(ang. Ras-related protein Rab-7) – marker późnych endosomów
RAGE	(ang. receptors for advanced glycation end product) – receptor dla zaawansowanych produktów glikacji
ROS	(ang. reactive oxygen species) - reaktywne formy tlenu
SYP	(ang. synaptophysin) - synaptofizyna
TPA	(ang. 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) – 12-O-tetradecanoylforbol-13-etylu

Streszczenie

Choroba Alzheimerera (AD), jedno z najczęstszych schorzeń neurodegeneracyjnych, charakteryzuje się ubytkiem komórek nerwowych i zakończeń synaptycznych w korze mózgu, prowadzącym m. in. do zaburzeń pamięci i innych funkcji poznawczych. W obrazie neuropatologicznym AD dominuje odkładanie się w strukturach istoty szarej mózgu oraz w naczyniach mózgowia i opon mózgowych nierozpuszczalnych, fibrylarnych złogów białka amyloidowego (A β) w postaci płytek starczych, w których skład wchodzi również pula A β nie tworzącego włókien, a także występowanie wewnątrz neuronów splotów neurofibrylarnych, powstałych na skutek nadmiernej fosforylacji białka tau. Etiologia najczęstszej, sporadycznej formy AD wiązana jest z nagromadzeniem się A β w mózgu, zachodzącym w wyniku zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją a procesami transportu tego peptydu z mózgu i jego degradacji. Chociaż główną rolę w patogenezie AD przypisuje się powszechnie A β , jednak mechanizmy jego neurotoksyczności nie są jasne. Obok powszechnie uznanej konwencjonalnej hipotezy zakładającej toksyczne działanie zewnątrzkomórkowych, fibrylarnych form A β , nowe wyniki wskazują na fakt, iż neurotoksyczne działanie A β wynika także z odkładania się oligomerów tego peptydu w wysokich stężeniach na powierzchni i wewnątrz neuronów. W efekcie dochodzi do postępującej degeneracji synaps, która ma miejsce na długo przed pojawieniem się pozakomórkowych złogów amyloidowych. Wiadomo, że apo E tworzy kompleksy z A β przyczyniając się do zwiększonego wychwytu i nagromadzenia się A β w neuronach, a tym samym nasilenia jego toksyczności. Można więc założyć, iż związki zapobiegające interakcji pomiędzy A β i apo E mogłyby hamować neurotoksyczność A β , dając podstawę dla nowej strategii terapeutycznej w AD. Za jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za cytotoksyczne działanie oligomerów A β uznaje się wiązanie peptydów w obrębie synaps glutaminianergicznych i złożone interakcje z receptorami NMDA. Pobudzenie receptorów NMDA prowadzące do znacznego wzrostu napływu wapnia do neuronów, czyli mechanizm zbliżony do toksyczności pobudzeniowej (ekscytotoksyczności), mogący w konsekwencji doprowadzić do śmierci neuronów wydaje się być mniej istotną konsekwencją toksyczności A β . Natomiast są poglądy, że niespecyficzna aktywacja receptorów NMDA wywołana przez A β zaburza funkcję tych receptorów, co może być jedną z przyczyn deficytów poznawczych. Tak uzasadniano

zastosowanie antagonisty receptora NMDA – memantyny w leczeniu objawowym średnio zaawansowanego i zaawansowanego stadium AD. Ta kwestia jest jednak bardziej złożona, ponieważ jak wykazały ostatnie badania, patologiczny wpływ A β na synapsy glutaminianergiczne obejmuje spadek ekspresji białek synaptycznych, w tym podjednostek receptora NMDA, co pogłębia zaburzenia pamięci, a te efekty są hamowane przez antagonistów receptorów NMDA. Z uwagi na postulowany przez licznych autorów kluczowy udział stresu oksydacyjnego w mechanizmie zaburzeń obserwowanych w AD sugeruje się, iż efektywność terapii antagonistami receptorów NMDA może być zwiększona przez jej skojarzenie z działaniami przeciwrodnikowymi. To nasuwa celowość zbadania działania ochronnego przed toksycznością A β związku, który łączyłby cechy antagonisty receptorów NMDA oraz substancji o właściwościach przeciwrodnikowych.

Celem niniejszej rozprawy było określenie możliwości modulowania wywołanej przez A β patologii synaps glutaminianergicznych z wykorzystaniem peptydu A β 12-28P, związku hamującego wiązanie A β i apo E, oraz 1MeTIQ, przypuszczalnego antagonisty receptorów NMDA o sugerowanych właściwościach przeciwrodnikowych.

Dla realizacji tego zagadnienia zostały wyznaczone następujące cele cząstkowe:

- a. Określenie wpływu mysiej apo E na wychwyt oraz nagromadzenie się syntetycznego A β w neuronach i zbadanie, czy antagonistą wiązania A β /apo E, A β 12-28P, może hamować ten proces.
- b. Sprawdzenie wpływu wewnątrzkomórkowego odkładania się A β na zmianę ekspresji białek postsynaptycznych oraz zbadanie działania A β 12-28P na indukowaną A β , postępującą utratę markerów synaps glutaminianergicznych.
- c. Weryfikacja powinowactwa 1MeTIQ do wybranych kluczowych miejsc wiązania dla ligandów w kompleksie receptora NMDA, oraz określenie wpływu 1MeTIQ na aktywność tego receptora.
- d. Potwierdzenie właściwości antagonistycznych 1MeTIQ wobec receptorów NMDA poprzez zbadanie jego zdolności do zapobiegania ekscytotoksyczności *in vitro* i *in vivo*.
- e. Wykazanie w warunkach doświadczenia biologicznego *in vitro* działania przeciwrodnikowego 1MeTIQ.
- f. Zbadanie, czy 1MeTIQ może przeciwdziałać wywołanym przez A β zmianom w poziomie wybranych białek będących markerami synaps glutaminianergicznych w neuronach.

Ponieważ rozprawa dotyczyła komórkowych i molekularnych mechanizmów badanych efektów, oraz ze względów etycznych, przeważająca część eksperymentów była przeprowadzona na modelach komórkowych. Wykorzystałam w nich hodowle pierwotne neuronów piramidowych hipokampa, współ-hodowle neuronalno-astrocytarne oraz hodowle neuronów ziarnistych mózdku. W badaniach pobierania A β stosowałam m. inn. metody immunodetekcji Western blot oraz Dot blot, których dopełnieniem było zobrazowanie komórkowej lokalizacji A β techniką mikroskopii fluorescencyjnej oraz konfokalnej. Ponadto wzór ekspresji powierzchniowych markerów synaps glutaminianergicznych badałam metodami immunocytochemicznymi. Działanie antagonistyczne 1MeTIQ na receptory NMDA oceniałam badając wypieranie znakowanych ligandów tych receptorów z błon, i w oparciu o jego wpływ na pobieranie ⁴⁵Ca i poziom wapnia wewnątrzkomórkowego mierzony metodą fluorescencyjną. Znacznik fluorescencyjny został także wykorzystany dla oceny stresu oksydacyjnego. Ponadto badałam neuroprotektoryjny wpływ 1MeTIQ w modelu ostrej ekscytotoksyczności glutaminianu stosując hodowle neuronów ziarnistych, a także *in vivo* z wykorzystaniem zwierzęcych modeli asfiksji okołoporodowej i globalnej ischemii mózgu.

W początkowej fazie badań oceniałam wpływ apo E na wychwyt i odkładanie się A β w neuronach, następnie zbadałam możliwości zapobiegania tym patologicznym procesom poprzez zastosowanie A β 12-28P, peptydu hamującego tworzenie kompleksów A β /apo E. Uzyskane przeze mnie obserwacje, wskazujące na zdolność neuronów hipokampa do wychwytu zarówno A β 40 jak i A β 42, pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi. Wykazałam, że choć obecność apo E nie jest czynnikiem decydującym o pobieraniu A β przez neurony, wychwyt jest w znacznym stopniu usprawniony w obecności tej cząsteczki. Ponadto, moje wyniki pokazują, iż zwiększone w obecności apo E pobieranie A β przez neurony stwarza warunki sprzyjające wewnątrzkomórkowej agregacji A β w formy oligomeryczne. Nową obserwacją było wykazanie możliwości zapobiegania nagromadzeniu się A β w neuronach oraz jego oligomeryzacji poprzez osłabienie wychwytu A β z przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wyniku selektywnego zahamowania wiązania A β /apo E przez A β 12-28P. Są opinie, że odkładanie się A β w neuronach w postaci form oligomerycznych, będące pierwotną przyczyną toksyczności A β , może zachodzić w wyniku upośledzenia metabolizmu A β w komórkach. Moje wyniki potwierdziły, iż na skutek osłabionej degradacji A β w neuronach ze współ-hodowli neuronalno-

astrocytarnej, dochodzi do zalegania tego peptydu w strukturach ścieżki endosomalno/lizosomalnej, co świadczy o utracie fizjologicznej roli apo E w usuwaniu A β z komórek. Istnieje przekonanie, iż we wczesnym stadium AD jednym z pierwszych skutków patologicznego odkładania się A β neuronach oraz jego wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji jest obniżenie poziomu ekspresji białek synaptycznych oraz degeneracja synaps. W kolejnym etapie pracy zbadalam więc wywołane przez A β zmiany patologiczne w synapsach glutaminianergicznych, oraz wpływ na nie A β 12-28P. Z moich obserwacji wynika, iż odkładanie się A β w neuronach powoduje istotny spadek ekspresji markerów synaptycznych, tj. NR1/NMDA, PSD-95 oraz synaptofizyny. W obecności apo E dochodzi do nasilenia utraty białek synaptycznych, czemu towarzyszy nagromadzenie A β wewnątrz komórek. Po zastosowaniu A β 12-28P zaobserwowałam zmniejszenie wewnątrzkomórkowej puli A β , oraz przywrócenie ekspresji markerów synaptycznych. Można więc wnioskować, iż A β 12-28P efektywnie hamuje indukowaną przez A β patologię synaps glutaminianergicznych. Ponieważ powszechnie uznanym przejawem toksyczności A β jest hiperfosforylacja białka tau, za celowe uznałam sprawdzenie czy patologicznemu nagromadzeniu się A β 40 w neuronach hipokampa towarzyszą zmiany w stopniu ufosforylowania tau. Wyniki tych badań pokazały, że odkładanie się A β w neuronach oraz jego wewnątrzkomórkowa oligomeryzacja nie wpływają na stan ufosforylowania białka tau. Wyjaśnienie tej sprzeczności wymaga dalszych badań.

W następnej części badań testowałam właściwości farmakologiczne i neuroprotektoryjne 1MeTIQ, substancji o wymagających potwierdzenia i scharakteryzowania cechach antagonisty receptora NMDA niezależnie obniżającego produkcję wolnych rodników tlenowych. Wykazałam po raz pierwszy, iż 1MeTIQ hamuje wiązanie znakowanej D-seryny do błon synaptycznych. Ten wynik, łącznie z potwierdzonym hamowaniem przez 1MeTIQ wiązania znakowanego MK-801, wskazuje na blokowanie miejsca glicynowego_b receptora NMDA, co obniża aktywację kanału jonowego tego receptora. Badania z użyciem pierwotnych hodowli neuronów ziarnistych mózdzku potwierdziły, że 1MeTIQ obniża wywołany przez glutaminian (Glu) i NMDA napływ wapnia do neuronów, jak również wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia tych jonów, co jest odbiciem hamowania aktywności receptorów NMDA. Zaobserwowałam także inne właściwości 1MeTIQ typowe dla antagonisty receptora NMDA, polegające na bezpośrednim hamowaniu

neurotoksyczności wywołanej przez Glu, a także po raz pierwszy wykazałam zdolność tej substancji do indukcji tolerancji neuronów na ekscytotoksyczność. Uzyskane wyniki świadczą o niskim powinowactwie 1MeTIQ do receptora NMDA, ponieważ obserwowane *in vitro* efekty porównywalne do działania uznanego antagonisty receptora NMDA, 0,5 μ M MK-801 uzyskałam przy zastosowaniu 0,5 mM 1MeTIQ. Do cech typowych dla antagonisty receptora NMDA, które obserwowałam w przypadku 1MeTIQ, należy neuroprotekcja w wybranych modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu. Opisane poprzednio w warunkach eksperymentu chemicznego działanie przeciwnodkowe 1MeTIQ znalazło potwierdzenie w moich doświadczeniach *in vitro* na hodowlach pierwotnych neuronów hipokampa, przy czym wykazałam że jest to właściwość niezależna od hamownia aktywności receptora NMDA. Scharakteryzowanie 1MeTIQ jako antagonisty receptora NMDA jednocześnie działającego przeciwnodkowo umożliwiło realizację jednego z głównych celów tej rozprawy, to jest zbadanie możliwości ochrony przez 1MeTIQ synaps glutaminianergicznych przed toksycznym działaniem A β . Badanie to wykazało, że 0,5 mM 1MeTIQ, podobnie jak 0,5 μ M MK-801, hamuje w hodowlach pierwotnych neuronów hipokampa myszy wywołane przez A β obniżenie ekspresji powierzchniowych markerów synaps glutaminianergicznych, w tym białka podjednostki NR1 receptora NMDA.

Uzyskane wyniki pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

- ApoE odgrywa kluczową rolę w wychwycie oraz patologicznym nagromadzeniu się A β w komórkach, czego potwierdzeniem jest hamowanie tego procesu przez antagonistę wiązania A β /apo E, A β 12-28P.
- Odkładanie się A β w strukturach ścieżki endosomalno-lizosomalnej powoduje stopniową agregację peptydu w formy oligomeryczne o silnym działaniu cytotoksycznym. Tworzenie oligomerów A β , wyraźnie upośledzających jego wewnątrzkomórkową degradację, prowadzi do rozległej utraty markerów synaps glutaminianergicznych na powierzchni komórek.
- A β 12-28P efektywnie hamuje proces oligomeryzacji A β w neuronach oraz przywraca ekspresję białek synaptycznych, co świadczy o jego działaniu ochronnym w indukowanej przez A β degeneracji synaps glutaminianergicznych.
- 1MeTIQ blokuje miejsce wiążące glicynę w kompleksie receptora NMDA i hamuje indukcję sygnału wapniowego w tym receptorze, ma więc właściwości

antagonisty receptora NMDA. Dalszym potwierdzeniem tych właściwości 1MeTIQ jest jego potencjał neuroprotekcyjny w warunkach ekscytotoksyczności *in vitro* i w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu.

- Niezależnie od hamowania aktywności receptorów NMDA, 1MeTIQ wykazuje w warunkach doświadczenia biologicznego działanie przeciwrodnikowe.
- 1MeTIQ, podobnie jak uznany antagonistą receptorów NMDA - MK-801, znosi cytotoksyczne działanie A β , przejawiające się obniżeniem ekspresji białek synaptycznych, co wskazuje na możliwość zastosowania antagonistów receptora NMDA w hamowaniu obserwowanych w AD, wywołanych przez A β zmian patologicznych w synapsach glutaminianergicznych.

Wyniki tej pracy wykazały więc hamowanie toksycznego działania A β na synapsy glutaminianergiczne przy wykorzystaniu A β 12-28P, peptydu blokującego wiązanie A β z apo E, oraz 1MeTIQ, antagonisty receptorów NMDA.

Spis treści

1. Wstęp	17
1.1. Choroba Alzheimerera (AD)	17
1.2. Hipoteza neurotoksyczności A β	18
1.3. Powstawanie A β oraz jego rola w chorobach neurodegeneracyjnych	21
1.4. Pochodzenie A β w komórce nerwowej	24
1.5. Apo E: od fizjologii do AD	25
1.6. Zaburzenia neuroprzekąźnictwa z udziałem receptorów glutaminianergicznycy w AD	26
1.7. Strategie terapeutyczne w leczeniu AD	30
1.8. 1MeTIQ – potencjalny antagonistą receptorów NMDA o działaniu przeciwoxidnikowym	34
2. Założenia i cel pracy	37
2. Materiał i metody	40
2.1. Badania <i>in vitro</i>	40
2.1.1. Hodowla pierwotna mysich/szczurzych neuronów hipokampa	40
2.1.2. Hodowla astrocytarna	41
2.1.3. Współ-hodowla neuronalno-astrocytarna	42
2.1.4. Ocena przeżywalności neuronów hipokampa w neurotoksyczności wywołanej A β	43
2.1.5. Oznaczanie wychwyty oraz nagromadzenia się peptydów A β w neuronach hipokampa	44
2.1.6. Ocena zdolności neuronów hipokampa do wewnątrzkomórkowej degradacji A β	45
2.1.7. Wpływ nagromadzenia się A β w neuronach hipokampa na proces wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji peptydu	46
2.1.8. Wykrywanie fibryli A β wewnątrz komórek nerwowych	47
2.1.9. Ocena immunocytochemiczna wewnątrzkomórkowej lokalizacji A β	47
2.1.10. Ocena ekspresji powierzchniowych markerów neuronalnych w warunkach inkubacji komórek z A β	48
2.1.11. Hodowla pierwotna neuronów ziarnistych mózdzku szczura	50

2.1.12. Schemat podawania substancji farmakologicznie czynnych w modelu ostrej neurotoksyczności Glu	50
2.1.13. Wpływ 1MeTIQ na wiązanie znakowanych ligandów	51
2.1.14. Pobieranie ⁴⁵ Ca przez komórki ziarniste mózdzku w obecności 1MeTIQ	52
2.1.15. Wpływ 1MeTIQ na poziom wapnia wewnątrzkomórkowego w neuronach ziarnistych mózdzku szczura	52
2.1.16. Ocena wpływu 1MeTIQ na poziom produkcji wolnych rodników tlenowych	53
2.2. Badania <i>in vivo</i>	53
2.2.1. Określenie potencjału neuroprotekcynowego 1MeTIQ w modelu odwracalnej ischemii przodomózgowia dorosłych myszokoczek	53
2.2.2. Ocena neuroprotekcynowego działania 1MeTIQ w modelu asfiksji okołoporodowej osesków szczyrzych	55
3. Wyniki	56
3.1. Wpływ A β 12-28P na toksyczność A β w hodowlach pierwotnych neuronów	56
3.1.1. Ocena neurotoksyczności A β w pierwotnej hodowli neuronów hipokampa myszy	56
3.1.2. Astrocyty jako źródło lipidowanej postaci apo E	58
3.1.3. Wychwyty oraz odkładanie się A β 40 i A β 42 w neuronach we współ-hodowli neuronalno-astrocytarnej: wpływ A β 12-28P	59
3.1.4. Potwierdzenie wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β 40 w hodowli neuronów hipokampa: rola apo E i wpływ A β 12-28P	61
3.1.5. Udział apo E w procesach wewnątrzkomórkowej degradacji i agregacji A β	62
3.1.6. Zapobieganie przez A β 12-28P wewnątrzkomórkowej agregacji peptydów A β	64
3.1.7. Ocena stopnia fibrylizacji wewnątrzneuronalnych agregatów A β	65
3.1.8. Wpływ apo E na rozmieszczenie peptydów A β w obrębie neuronu	66
3.1.9. Wpływ toksyczny A β na synapsy glutaminianergiczne i jego modulacja przez A β 12-28P	67
3.1.10. Wpływ nagromadzenia się A β w neuronach na stopień ufosforylowania białka tau	71

3.2. Charakterystyka 1MeTIQ jako antagonisty receptorów NMDA o właściwościach przeciwrodnikowych i antyekscytotoksycznych oraz ocena wpływu 1MeTIQ na zmiany patologiczne w synapsach glutaminianergicznym wywołane przez A β	72
3.2.1. Interakcje 1MeTIQ z wybranymi miejscami wiązania ligandów receptora NMDA	73
3.2.2. Wpływ 1MeTIQ na aktywność receptora NMDA ocenianą przez indukcję sygnału wapniowego w neuronach	75
3.2.3. Ochronny wpływ 1MeTIQ, w porównaniu do uznanych antagonistów receptora NMDA, w modelu ostrej neurotoksyczności wywołanej przez glutaminian: bezpośrednia neuroprotekcja, pre- i postkondycjonowanie.....	77
3.2.4. Neuroprotekcyjne działanie 1MeTIQ w modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu	81
3.2.5. Ocena potencjału przeciwrodnikowego 1MeTIQ	83
3.2.6. Ochronne działanie antagonistów receptora NMDA w indukowanej przez A β patologii synaps glutaminianergicznym	84
4. Dyskusja.....	87
4.1. Ocena strony metodycznej	87
4.2. Wpływ A β 12-28P na wychwyt oraz wewnątrzkomórkowe odkładanie się peptydów A β zależne od apo E	91
4.3. Wpływ nagromadzenia się A β w neuronach na procesy oligomeryzacji oraz fibrylizacji A β : modulacja przez A β 12-28P	97
4.4. Subkomórkowa lokalizacja A β w obecności inhibitora wychwyty i nagromadzenia się peptydu, A β 12-28P.....	100
4.5. Wpływ hamowania wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β na synapsy glutaminianergiczne	103
4.6. Wpływ odkładania się A β w neuronach na stopień ufosforylowania białka tau.....	107
4.7. 1MeTIQ, antagonist receptor NMDA o właściwościach przeciwrodnikowych, wywiera działanie neuroprotekcyjne w ekscytotoksyczności, niedokrwieniu mózgu i toksyczności A β	109
4.7.1. Hamowanie przez 1MeTIQ aktywności receptora NMDA	109

4.7.2. Potencjał neuroprotekcyny 1MeTIQ w warunkach ekscytotoksyczności <i>in vitro</i> i w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu	113
4.7.3. Przeciwnadmierne działanie 1MeTIQ	118
4.7.4. Wpływ 1MeTIQ na wywołane przez A β obniżenie ekspresji powierzchniowych białek synaptycznych	119
5. Podsumowanie i wnioski	126
6. Piśmiennictwo	130

1. Wstęp

1.1. Choroba Alzheimerera (AD)

Choroba Alzheimerera (AD) została opisana po raz pierwszy w roku 1907 przez wybitnego niemieckiego psychiatrę i neurologa, Aloisa Alzheimer'a, który posługując się techniką impregnacji srebrzej stwierdził u 51-letniej pacjentki obecność płytek starczych oraz splotów neurofibrylarnych w tkance mózgu. Przypadek Augusty D. stał się pierwszym udokumentowanym neuropatologicznie opisem tej choroby (Alzheimer 1907).

Klinicznie, AD objawia się demencją, której nasilenie pogłębia się wraz z postępowaniem choroby. W obrazie neuropatologicznym obserwuje się charakterystyczne dla AD odkładanie się nierozpuszczalnych, fibrylarnych złogów białka amyloidowego (A β) w postaci płytek starczych w strukturach istoty szarej mózgu oraz w naczyniach mózgu, a także obecność splotów neurofibrylarnych wewnątrz neuronów, powstałych na skutek nadmiernej fosforylacji białka tau (Ingelsson i wsp. 2004). AD towarzyszy rozległa degeneracja komórek nerwowych oraz zakończeń synaptycznych w korze mózgu z jednoczesnym wzrostem aktywności tkanki glejowej, postępującą atrofią mózgu oraz pojawieniem się ostrych stanów zapalnych.

AD należy do grupy chorób neurodegeneracyjnych najczęściej występujących wśród wszystkich schorzeń otępiennych. Przeważnie dotyka osoby po 65. roku życia. Szacuje się, iż na AD cierpi na świecie ok. 35 mln osób. Na podstawie obserwacji dziedziczności zachorowań w niektórych rodzinach, przyjęło się wyróżniać dwie postaci tej choroby: późną, sporadyczną oraz wczesną, rodzinną, która stanowi 5-10% przypadków (Selkoe 2004). Za przyczynę występowania sporadycznej postaci AD uznaje się nagromadzenie się A β w mózgu spowodowane zaburzeniem równowagi pomiędzy produkcją A β a jego usuwaniem z mózgu i degradacją (Mawuenyega i wsp. 2010, Castellano i wsp. 2011). Z kolei za występowanie postaci rodzinnej odpowiedzialne są czynniki genetyczne, takie jak mutacje w genach białka prekursorowego amyloidu β (β APP), preseniliny 1 (PS1), preseniliny 2 (PS2). Zaobserwowano, iż mutacjom w cząsteczce PS1 bądź β APP towarzyszy wcześniejsze pojawienie się objawów klinicznych AD oraz ciężkie uszkodzenia mózgu (Martin i wsp. 1995, Gouras i wsp. 2005). Badania histopatologiczne wskazują również na ścisłą korelację pomiędzy dziedziczeniem allelu dla apo E4 a

wzrostem ilości płytek amyloidowych w mózgu oraz odkładaniem się A β w naczyniach (Schmechel i wsp. 1993).

1.2. Hipoteza neurotoksyczności A β

Powszechnie uznaną hipotezą patogenezy AD jest tzw. `hipoteza amyloidowa`, zaproponowana po raz pierwszy przez Hardy i Higgins w 1992 roku, która zakłada, że odkładanie się nieprawidłowych, włóknkowych agregatów A β w postaci płytek starczych w mózgu poprzedza i prowadzi do hiperfosforylacji i agregacji białka tau oraz degeneracji synaps (Hardy and Higgins 1992). Jej rozwinięciem jest `hipoteza degeneracji cytoszkieletu` mówiąca, iż zmiany cytoszkieletu neuronów zachodzące w następstwie wewnątrzneuronalnego odkładania się peptydów A β , prowadzą do indukcji zdarzeń neuropatologicznych jak zaburzenia transportu aksonalnego oraz degeneracja aksonów, zmiany w przekaźnictwie sygnału, a w konsekwencji śmierć komórek nerwowych (D'Andrea i wsp. 2002).

Termin amyloid odnosi się do różnorodnej grupy pozakomórkowych złogów białkowych, które towarzyszą wielu schorzeniom. Należy jednak zaznaczyć, iż gromadzenie się białka amyloidowego ma miejsce także w procesie starzenia fizjologicznego. Odkładanie się amyloidu rozpoczyna się w wieku 40 lat, następnie obserwuje się zależne od wieku zwiększenie produkcji i agregacji tego białka z wyraźnym plateau w wieku ok. 70 lat. Pierwszą formą pojawiającą się w tkance mózgu jest A β 42, po czym następuje nasilona produkcja formy dominującej A β 40, stanowiącej ok. 90% całej puli białek amyloidu (Morishima-Kawashima i wsp. 2002, Querfurth i LaFerla 2010). U osób chorych na AD silnie zaznaczona jest dysproporcja w kierunku produkcji obu form A β w stosunku 1:1 (Plant i wsp. 2003). Na podstawie badań biochemicznych nad składem peptydów w naczyniach oraz płytkach starczych w mózgu osób dotkniętych AD stwierdzono, że w odróżnieniu od płynów ustrojowych, gdzie przeważa forma A β 40, śródkankowe złogi amyloidowe są tworzone w głównej mierze przez nierozpuszczalne, wysoce odporne na działanie proteaz peptydy A β 42 (Yamaguchi 1995).

Patogeneza AD przez długi czas wiązana była z obecnością pozakomórkowych agregatów amyloidowych, z których uwalniane peptydy A β miały prowadzić do uszkodzeń neuronów, przyczyniając się tym samym do postępu

choroby. Jednakże w późniejszych latach pojawiły się doniesienia świadczące o tym, iż płytki starcze, które początkowo były uznawane za główną przyczynę patogenezy AD, mogą być umiejscowione w znacznej odległości od obszarów mózgu objętych degeneracją synaps i neuronów, a utrata funkcji poznawczych bardziej wiąże się ze zwyrodnieniem zakończeń synaptycznych niż z innymi zjawiskami typowymi dla AD jak agregacja A β w formy fibrylarne (Mucke i wsp. 2000). Stąd wysnuto hipotezę, iż kluczową rolę w generacji zjawisk neuropatologicznych, które mają miejsce na wczesnym etapie choroby jeszcze przed pojawieniem się płytek starczyc w mózgu, może pełnić nagromadzenie się A β wewnątrz komórek (Takahashi 2002, Holtzman 2008). W późniejszym czasie założenie to zostało potwierdzone obserwacjami uzyskanymi w badaniach *in vitro* (Martin i wsp. 1995) i *in vivo* (Wirhth i wsp. 2001), jak również u pacjentów cierpiących na sporadyczną postać AD (Gouras i wsp. 2000). Rozpoczęto okres intensywnych badań nad określeniem roli A β odkładającego się w przedziałach wewnątrzkomórkowych w patogenezie AD.

1.3. Powstawanie A β oraz jego rola w chorobach neurodegeneracyjnych

Głównym źródłem A β w komórce jest proteolityczna degradacja białka prekursorowego amyloidu β (A β PP, ang. β amyloid precursor protein), glikoproteiny transbłonowej, kodowanej przez gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 21. Peptydy A β (39-43 aa) powstają w wyniku aktywności proteolitycznej enzymów określanych mianem α , β oraz γ -sekretyz. Możemy mówić o dwóch typach szlaków metabolicznych warunkujących powstawanie produktów rozpadu β APP, to jest o tzw. nieamyloidogennej oraz amyloidogennej obróbce β APP. W szlaku nieamyloidogennym, określanym również sekrecyjnym, ulega przemianom ok. 90-95 % β APP. Białko to degradowane jest przez grupę enzymów wykazujących właściwości metaloproteaz - α -sekretyzy. Końcowym produktem proteolitycznej obróbki β APP z udziałem α - oraz γ -sekretyz jest krótki peptyd p3 (A β 17-40 i A β 17-42) (Evin i wsp. 2002), który wydaje się wykazywać zdolność agregowania w struktury amyloidopodobne. Pomimo, iż pewne dane literaturowe wskazują na udział p3 w tworzeniu złogów amyloidowych (Streltsov i wsp. 2011), istnieją również doniesienia sugerujące neuroprotektoryjne działanie fragmentu p3 w mózgu (Han i wsp. 2011).

W wyniku amyloidogennych przemian β APP, w których uczestniczy druga grupa enzymów zwanych β -sekretyzami, powstaje kilka izoform A β , wśród których wyróżnia się najczęściej występującą formę A β 40 (LaFerla i.wsp. 2007) oraz stanowiący zasadniczo niewielką pulę A β 42 (Gandy i wsp. 1994). Aktywność proteolityczna β -sekretyz została oznaczona w obrębie struktur tworzących ścieżkę endosomalno/lizosomalną tj. późnych endosomów i lizosomów (Koo i Squazzo 1994, Wild-Bode i wsp. 1997), skąd za pośrednictwem systemu pęcherzyków wydzielniczych, peptydy A β mogą być transportowane i uwalniane na zewnątrz neuronów, zasilając tym samym pulę A β w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Cirrito i wsp. 2008).

Zgodnie z najnowszymi danymi literaturowymi, zaburzenie homeostazy A β w mózgu stanowi główny czynnik zapoczątkowujący procesy neurodegeneracyjne zachodzące w AD. Rozpuszczalne formy A β są obecne we wszystkich płynach fizjologicznych obejmujących płyn mózgowo-rdzeniowy, osocze oraz mocz (Ghisso i wsp. 1993, 1997). Zjawisko agregacji A β oraz tworzenia włókien fibrylarnych zachodzi natomiast jedynie w tkance mózgu oraz w ścianach naczyń mózgowych.

Istnieją liczne doniesienia pochodzące z badań *in vitro* i *in vivo* świadczące o tym, iż peptydy A β , których stopniowa agregacja w nierozpuszczalne włókna prowadzi do tworzenia płytek starczych, wykazują silne lokalne działanie neurotoksyczne (Meyer-Luehmann i wsp. 2008) oraz zaburzają metabolizm A β powodując zwiększenie jego czasu półtrwania w mózgu (Cirrito et al., 2003). Formami wykazującymi również wysoką cytotoksyczność są występujące w przestrzeni zewnątrzkomórkowej oligomery A β , a przejawem tej toksyczności jest postępująca utrata funkcji poznawczych odnotowana w AD (Pierrot i wsp. 2004, Isaacs i wsp. 2006). Za odrębne zjawisko towarzyszące temu schorzeniu należy uznać odkładanie się A β wewnątrz neuronów oraz jego oligomeryzacja, którym również przypisuje się działanie neurotoksyczne o niejasnym jak dotąd mechanizmie.

Przyjmuje się, iż za mechanizm neurotoksyczności oligomerów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej odpowiada wiązanie się peptydów w obrębie synaps glutaminianergicznych, które poprzez oddziaływanie z receptorami NMDA aktywują napływ jonów wapnia przez kanały NMDA do neuronów, indukując tym samym sekwencję zdarzeń prowadzących do śmierci komórek (Alberdi i wsp. 2010). Neurotoksyczność patologicznych form A β jest więc ściśle związana z zakłócaniem wewnątrzkomórkowej homeostazy wapniowej i transdukcji sygnału z udziałem tych jonów. Wynika to m.in. z faktu, iż w AD peptydy A β występują w przestrzeni pozakomórkowej w podwyższonym stężeniu, co prowadzi do zaburzenia uwalniania neuroprzekaźników z zakończeń presynaptycznych oraz zakłócenia neurotransmisji w części postsynaptycznej zakończeń nerwowych, a także potęgowania cytotoksycznego działania aminokwasów pobudzających na komórki nerwowe. Skutkiem tego jest generacja patologicznego sygnału wapniowego. Stąd też na wczesnym etapie choroby obserwuje się osłabienie transmisji i plastyczności synaptycznej. Toksyczne działanie peptydów A β prowadzi także do zmian w mechanizmach transdukcji sygnału komórkowego, wynikiem czego jest indukcja wielu zdarzeń patologicznych. Należą do nich zmiany przepuszczalności błony komórkowej, zakłócenie procesu endocytozy, zaburzenie homeostazy jonowej w neuronach, zakłócenie procesów fosforylacji/defosforylacji prowadzące m.in. do hiperfosforylacji białka tau, spowolnienie transportu aksonalnego, dysfunkcja mitochondriów oraz uszkodzenia oksydacyjne (Hansley i wsp. 1994, Alvarez i wsp. 2002).

Istotnym zjawiskiem obserwowanym w AD, poza obecnością śródkankowych i naczyniowych złogów A β oraz uszkodzeniami połączeń synaptycznych, jest występowanie zwyrodnienia neurofibrylarnego. Choroby neurodegeneracyjne, którym towarzyszy tworzenie parzystych, spiralnie skręconych włókienek (PHFs) tworzących sploty neurofibrylarne (NFTs), określane są wspólnym pojęciem tauopatii. Głównym składnikiem tych wewnątrzneuronalnych struktur jest wysoko ufosforylowane białko tau. Tau (ok. 55 kDa) należy do grupy białek towarzyszących mikrotubulom (MAP). Jest asymetrycznym i stabilnym w wysokich temperaturach białkiem wytwarzanym przede wszystkim w mózgu. Produktem ekspresji genu na chromosomie 17q jest 6 izoform tego białka o różnej długości łańcucha, 352-441 aminokwasów (Adamec i wsp. 1997). C-końcowa domena obejmuje wspólną dla wszystkich izoform sekwencję Pro-Gly-Gly, która stanowi miejsce wiązania do tubuliny (Morishima-Kawashima i wsp. 2002) Główna rola fizjologiczna białka tau polega na stabilizacji struktury i orientacji mikrotubul w neuronach, astrocytach oraz oligodendrocytach. Białko tau odpowiada m.in. za prawidłowy transport aksonalny (Alvarez i wsp. 2002). O właściwościach białka tau oraz pełnionych przez niego funkcjach decyduje liczna grupa kinaz białkowych (CaMKII, PKA, PKC, Cdk5, GSK3 β) (Liu i wsp. 2004) i fosfataz białkowych (PP1, PP2A, PP2B, PP2C) (Saito i wsp. 1995, Gong i wsp. 2000), regulujących stopień ufosforylowania tau, prowadząc tym samym do zmian jego konformacji, a w dalszej kolejności zmian właściwości tego białka (Gong i wsp. 1993). Zaobserwowano, iż ta sama grupa kinaz i fosfataz białkowych odpowiada za stan ufosforylowania białka tau w warunkach fizjologicznych i patologicznych, a obserwowana w AD hiperfosforylacja białka tau, w następstwie której dochodzi do destabilizacji cytoszkieletu mikrotubularnego oraz spowolnienia transportu aksonalnego, wiąże się ściśle z zaburzeniem równowagi pomiędzy aktywnością tych dwóch grup enzymów (Merrick i wsp. 1996, Alvarez i wsp. 2002). Istnieje wiele prac opisujących interakcję tau z białkiem amyloidowym, które nasila procesy fosforylacji białka tau i związanej z tym patologii chorób neurodegeneracyjnych (Busciglio i wsp. 1995, Morishima-Kawashima i wsp. 2002). Obecnie uważa się jednak, iż AD jest schorzeniem związanym przede wszystkim z postępującą degeneracją synaps, która ma miejsce już na wczesnym etapie choroby i poprzedza pojawienie się płytek starczych (Ingelsson i wsp. 2004, Stokin i wsp. 2005).

1.4. Pochodzenie A β w komórce nerwowej

Odkąd za jeden z wczesnych czynników odpowiedzialnych za zdarzenia patologiczne towarzyszące AD, jak wczesna dysfunkcja synaptyczna i obniżenie funkcji poznawczych, przyjęto się uważać odkładanie się A β w neuronach, obecnie główny nurt badań poświęcony jest poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za nagromadzenie się A β w komórkach, co mogłoby przyczynić się do opracowania skutecznej terapii AD. Stężenie wewnątrzkomórkowego A β mogłoby wzrastać w wyniku działania dwóch głównych mechanizmów: poprzez nasilenie produkcji A β na skutek proteolitycznej degradacji β APP lub też w wyniku pobierania peptydów A β przez neurony z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Obecne doniesienia świadczą o tym, iż pula wewnątrzkomórkowego A β jest zasilana przede wszystkim na skutek zwiększonego wychwyty peptydów z przestrzeni zewnątrzkomórkowej jak również osłabienia mechanizmów odpowiedzialnych za jego degradację w komórkach, w mniejszym stopniu zaś przyczynia się do tego wzrost produkcji form A β o działaniu cytotoksycznym (LaFerla i wsp. 2007, Bayer i wsp. 2010). Pobieranie A β przez neurony może zachodzić z udziałem różnych grup receptorów takich jak receptory RAGE (ang. Receptors for Advanced Glycation End product), SRs (ang. Scavenger Receptors), LDL (ang. Low-Density Lipoprotein) (Saavedra i wsp. 2007), receptory sprzężone z białkami G (Yazawa i wsp. 2001), receptory NMDA (Bi i wsp. 2002) lub receptory nikotynowe (Nagele i wsp. 2002). Wydaje się, iż oddziaływanie peptydów A β z poszczególnymi klasami receptorów ściśle zależy od typów komórek, stężenia i/lub izoformy A β . Wychwyt A β przez neurony wymaga wcześniejszej interakcji oraz związania się egzogennych peptydów A β z błoną komórkową. Jedną z hipotez zakłada, iż głównym miejscem gromadzenia się A β na powierzchni komórki są tratwy lipidowe oraz kompleksy synaps, w których obrębie obficie występują receptory NMDA (Besshoh i wsp. 2005). Stąd też receptory NMDA są uznawane za jedną z głównych grup receptorów zaangażowanych w aktywny transport A β do neuronów oraz procesy patologiczne wywołane wewnątrzkomórkowym odkładaniem się peptydów A β (Bi i wsp. 2002).

Jak pokazują prace prezentowane przez grupę Takahashi i wsp. (2002) oraz Shie i wsp. (2003), strukturami zaangażowanymi zarówno w metabolizm A β jak i wychwyt oraz transport peptydów A β w komórce są organelle systemu endosomalno/lizosomalnego, a panujące w nich niskie pH sprzyja procesowi

agregacji A β . Stąd, endosomy oraz lizosomy są uważane za główne miejsca patologicznego nagromadzenia się A β w neuronach zapoczątkowującej kaskadę zdarzeń prowadzącą do neurodegeneracji. Na skutek zalegania nierozpuszczalnych agregatów A β w organellach ścieżki endosomalno/lizosomalnej zaobserwowano również pojawienie się zaburzeń strukturalnych oraz funkcjonalnych tych przedziałów wewnątrzkomórkowych, a także zakłócenie recyrkulacji pęcherzyków wydzielniczych (Song i wsp. 2011). W efekcie dochodzi do spowolnienia procesu endocytozy, a także zalegania oraz agregacji A β na powierzchni błony komórkowej. A β może być transportowany do neuronów w postaci kompleksów z innymi cząsteczkami, do których w głównej mierze należą apolipoproteiny

1.5. Apo E: od fizjologii do AD

Apolipoproteina E (apo E), jest to 34-kDa glikozylowana cząsteczka białkowa kodowana na chromosomie 19q13.2. Składa się ona z 299 reszt aminokwasowych, gdzie motyw 192-299 apo E odpowiada za przyłączanie cząsteczek lipidów, zaś sekwencja 136-160 tworzy region wiązania do receptora. Różnica w kompozycji aminokwasów w pozycjach 112 i 158 warunkuje powstawanie 3 izoform ludzkiej apo E: apo E2 (cysteina/cysteina), apo E3 (cysteina/arginina), apoE 4 (arginina/arginina). Odmienne skład aminokwasowy cząsteczki apo E determinuje istotne różnice w budowie oraz funkcji poszczególnych izoform (Sadowski i Wisniewski 2006). Apo E jest produkowana przede wszystkim przez hepatocyty w wątrobie, komórki Schwanna w obwodowym układzie nerwowym, oraz astrocyty w ośrodkowym układzie nerwowym (Pitas 1987), w którym to apo E odpowiedzialna jest za transport cholesterolu niezbędnego w procesach wzrostu neuronów, tworzenia połączeń synaptycznych oraz odbudowy komórek w następstwie uszkodzeń (Boyles i wsp. 1989). Transport lipidów z udziałem apo E zachodzi za pośrednictwem grupy receptorów określanych mianem LDLR (ang. Low-Density Lipoprotein Receptor), zlokalizowanych przede wszystkim na powierzchni neuronów oraz reaktywnych astrocytów (Masliah i wsp. 1997). Z uwagi na to, że w AD ma miejsce rozległa degeneracja synaps, dochodzi do aktywacji procesów mających na celu odtworzenie połączeń synaptycznych, a więc m.in. usprawnienia transportu lipidów do neuronów z udziałem apo E, co sprzyja zwiększonemu wychwyty A β za pośrednictwem apo E/LRP i nasileniu jego neurotoksyczności. U osób cierpiących na sporadyczną

odmianę AD występuje podwyższone stężenie lipidowanej apo E w mózgu, która tworząc kompleksy z A β może przyczyniać się do jego zwiększonego wychwytu przez neurony na drodze endocytozy (Rebeck i wsp. 1993, Tomiyama i wsp. 1999). Ponadto, doniesienia z ostatnich lat wskazują na istotną rolę apo E w procesie agregacji oraz fibrylizacji A β poprzez zdolność apo E do indukcji zmian konformacyjnych cząsteczki A β z formy rozpuszczalnej w strukturę β -kardki (Ma i wsp. 1994, Wisniewski i wsp. 1994). Badania immunohistochemiczne wykazały obecność apo E w plakach amyloidowych utworzonych przez włóknkowy A β zlokalizowanych w obrębie neuronów wykazujących zaawansowaną dystrofię neurytów i nasilone procesy neurodegeneracyjne (Wisniewski i wsp. 1994, Burns i wsp. 2003). Obserwacje te wskazują, iż cząsteczka apo E zaangażowana jest w metabolizm A β , a zależne od niej mechanizmy odkładania się peptydów A β przeważają nad istotną rolą apo E w usuwaniu A β z mózgu za pośrednictwem receptorów LRP oraz LDLR (Kim i wsp. 2009). Miejsce wiązania apo E do sekwencji A β jest motyw 12-28, co sugeruje, iż ten fragment peptydu odpowiada za tworzenie kompleksów A β /apo E. Sekwencja ta składa się z domeny hydrofobowej 14-21, oraz skrętu w obrębie motywu 22-28, która umożliwia oddziaływanie dwóch domen hydrofobowych peptydu (14-21 oraz 29-40-42), w następstwie czego dochodzi do przyłączania A β do agregatów białkowych (Petkova i wsp. 2002). Wraz z wiekiem zaobserwowano również spadek ekspresji LRP-1 przez co usuwanie A β z mózgu z udziałem apo E staje się znacznie mniej efektywne (Kang i wsp. 2000). Stąd też uważa się, iż zależny od LRP transport kompleksów A β /apo E do komórek przy jednoczesnym osłabieniu procesu usuwania peptydów A β z mózgu, stanowi jeden z głównych mechanizmów wychwytu oraz nagromadzania się A β w przedziałach wewnątrzkomórkowych, prowadzących do neurodegeneracji

1.6. Zaburzenia neuroprzebieżnictwa z udziałem receptorów glutaminianergicznym w AD

Pierwotnie AD wiązano głównie z zaburzeniem transmisji cholinergicznym. Jednakże postęp w badaniach nad patogenezą AD i nad rolą neurotransmisji za pośrednictwem pobudzających aminokwasów w mechanizmach pamięci wykazał kluczowy udział także transmisji glutaminianergicznym w indukcji zdarzeń patologicznych typowych dla tej choroby. Głównym neuroprzebieżnikiem

odpowiadającym za transmisję glutaminianergiczną jest kwas glutaminowy (glutaminian). Depolaryzacja zakończeń neuronów glutaminianergicznych powoduje uwolnienie glutaminianu do szczeliny synaptycznej i aktywację dwóch rodzin receptorów: jonotropowych receptorów glutaminianergicznych (w tym receptorów typu NMDA i AMPA) oraz metabotropowych receptorów glutaminianergicznych sprzężonych z białkami G. Uważa się, iż receptory NMDA oraz indukowany przez nie sygnał wapniowy odgrywają kluczową rolę w plastyczności synaptycznej, której przejawami są dwa zjawiska: LTP (ang. long-term potentiation - długotrwałe wzmocnienie synaptyczne) oraz LTD (ang. long-term depression - długotrwałe osłabienie synaptyczne). Przejściowe zwiększenie stężenia jonów wapnia w neuronie postsynaptycznym jest konieczne do wystąpienia zjawiska LTP, podczas gdy umiarkowany lecz długo utrzymujący się wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego prowadzi do osłabienia transmisji synaptycznej czyli LTD. W skutek indukcji LTP dochodzi do przemodelowania już istniejących jak i tworzenia nowych połączeń synaptycznych. Uważa się więc, iż LTP odgrywa istotną rolę w procesach uczenia się i pamięci (Peng i wsp. 2011), a upośledzenie neurotransmisji za pośrednictwem receptorów NMDA prowadzi do zaburzenia uczenia się i pamięci obserwowanego m. in. w cechującej się otępieniem AD (Li i wsp. 2009, Yamin i wsp. 2009).

Receptory NMDA (ang. N-methyl- D-aspartate glutamate receptors) wykazują szerokie rozmieszczenie w OUN, przy czym ich największe zagęszczenie zostało stwierdzone w takich strukturach mózgu jak hipokamp, zwłaszcza w sektorze CA1, kora mózgowa, jądra podstawy mózgu, jądro migdałowe (Petralia i wsp. 1994, Wenzel i wsp. 1995). Przyjmuje się, iż zlokalizowane są one przede wszystkim post-synaptycznie, w centralnej części synapsy (Nowak i Zawilska 2004). Istnieją dwie główne rodziny podjednostek receptora NMDA, do których należą NR1 oraz NR2. Funkcjonalny receptor NMDA występuje w postaci tetrameru składającego się z dwóch podjednostek NR1 i dwóch podjednostek NR2 (Kutsuwada i wsp. 1992), choć wcześniejsze prace sugerowały pentameryczną budowę kompleksu NMDA (Premkumar i Auerbach 1997). Łańcuchy białkowe NR1 i NR2 występują w postaci 4 domen, z których jedna zlokalizowana jest w dwuwarstwie lipidowej błony. Fragment ten tworzy wewnętrzną ścianę kanału jonowego i ma kluczowe znaczenie dla jego funkcji tj. decyduje o przewodności kanału NMDA dla jonów Ca^{2+} , Na^{+} i K^{+} oraz uczestniczy w jego blokowaniu przez jony Mg^{2+} (Prybyłowski i Wenthold 2004).

Aktywacja receptora wymaga przyłączenia dwóch cząsteczek agonisty, którym w OUN jest przede wszystkim kwas L-glutaminowy, oraz koagonisty (glicyna, D-seryna), bez obecności którego receptor nie może ulec aktywacji nawet w warunkach wysokich stężeń agonisty NMDA (Danysz i Parsons 1998). Do całkowitej aktywności receptora NMDA, poza związaniem obu agonistów, niezbędne jest także zniesienie bloku magnezowego, które jest możliwe dopiero po odpowiedniej stymulacji receptora i obniżeniu potencjału błony komórkowej. Wynikiem depolaryzacji błony jest uzyskanie pełnej przepuszczalności kanału i napływ Na^+ i Ca^{2+} do komórki. Wzrost stężenia wapnia w komórce prowadzi do aktywacji wielu procesów biochemicznych zależnych od wapnia, a zarazem inicjuje generację zależnych od wapnia mechanizmów transdukcji sygnału (Lipton 2004, Waxman i Lynch 2005). Uważa się, iż prawidłowe funkcjonowanie receptorów NMDA warunkuje zachodzenie zjawiska LTP, decydującego o sprawności procesów poznawczych. Jednakże w warunkach wysokich stężeń agonisty może dojść do zaburzenia neurotransmisji glutaminianergicznej. Zjawisko to określane mianem ekscytotoksyczności ma miejsce wówczas gdy na skutek długotrwałej ekspozycji komórek nerwowych na glutaminian dochodzi do nadmiernej aktywacji receptorów NMDA, wynikiem czego jest silny wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego. Indukcja patologicznego sygnału wapniowego prowadzi w następstwie do kaskady zdarzeń takich jak dysfunkcja mitochondriów, wzrost produkcji ROS, a w efekcie do śmierci komórki (Lynch i wsp. 2002). Stąd, farmakologiczne hamowanie aktywności receptorów NMDA poprzez stosowanie selektywnych antagonistów wydaje się być kluczowe do tłumienia zaburzeń neurotransmisji glutaminianergicznej obserwowanych w ekscytotoksyczności. Jak dotąd ukazało się wiele doniesień literaturowych poświęconych neuroprotekcijnym właściwościom antagonistów receptora NMDA w zjawiskach ekscytotoksyczności *in vitro* (Tremblay i wsp. 2000, Lipton 2004) i *in vivo* (Kitagawa i wsp. 1990, Salińska i wsp. 2005). Antagoniści kompetytywni, cechujący się powinowactwem do miejsca wiążącego agonistę i blokujący w ten sposób aktywację receptora NMDA nie wzbudzają jednak dużych nadziei jako potencjalne leki skuteczne w zapobieganiu ekscytotoksyczności, ponieważ naturalny agonista, glutaminian, występuje w stanach patologicznych w wysokich stężeniach, co praktycznie wyklucza kompetycję. Skuteczne hamowanie kanału NMDA może odbywać się z udziałem substancji, która nie konkuruje o miejsce wiązania z głównym agonistą lub koagonistą, wówczas określa się go mianem

bezkompetytywnego (ang. uncompetitive). Inaczej jest w przypadku antagonizmu niekompetytywnego (ang. noncompetitive), dotyczącego głównie miejsca wiązania dla glicyny (Danysz i wsp. 2000b). Do związków blokujących kanał receptora należą m.in. PCP, MK-801 oraz memantyna. Cechą wielu antagonistów kanału NMDA jest ścisła zależność stopnia blokady od potencjału błonowego. Stosowanie terapeutycznych związków wykazujących silne powinowactwo do kanału NMDA jak MK-801 jest w znacznej mierze ograniczone, z uwagi na ich efekty niepożądane jak działanie psychozomimetyczne a nawet neurotoksyczność. Blokery charakteryzujące się słabszym powinowactwem oraz wyższą zależnością blokady od potencjału (ang. voltage dependence), do których należy memantyna, cechująca się słabszymi efektami niepożądanymi, znalazły już zastosowanie terapeutyczne, m.in. w leczeniu schorzeń neurodegeneracyjnych jak AD (Parsons i wsp. 1999a).

Choroba Alzheimerera charakteryzuje się złożonymi i różnokierunkowymi interakcjami specyficznych czynników patogennych z neurotransmisją glutaminianergiczną, zwłaszcza zachodzącą za pośrednictwem receptorów NMDA. Wiele badań nad rolą neurotransmisji glutaminianergicznej w AD wskazuje na kluczowy udział zjawiska ekscytotoksyczności w patologii AD (Salińska i wsp. 2005). Ekscytotoksyczność uważana jest za jeden z krytycznych czynników wtórnych uczestniczących w mechanizmach chorób neurodegeneracyjnych, w tym AD. Istotność zjawiska ekscytotoksyczności w patogenezie AD została opisana przez Olney i wsp. (1997). Ci autorzy zaproponowali hipotezę opierającą się na istnieniu dwóch faz ekscytotoksyczności zależnej od $A\beta$. W początkowej fazie, gdy stężenie $A\beta$ w przestrzeni pozakomórkowej jest niewielkie, dochodzi do zwiększenia wrażliwości neuronów na cytotoksyczne działanie glutaminianu, efektem czego jest hiperaktywacja receptorów NMDA. Druga faza ekscytotoksyczności związana jest ze stanem hipoaktywacji receptorów NMDA, który wydaje się nasilać wraz z wiekiem. Obie fazy skutkują zaburzeniem procesów kognitywnych. Odkąd zaobserwowano, że złogi $A\beta$ mogą potęgować utrzymywanie receptorów w stanie hipoaktywacji uważa się, iż to hipoaktywacja receptorów NMDA odpowiada za wystąpienie zmian patologicznych prowadzących do rozległej degeneracji synaps, utraty neuronów i zaburzeń funkcji poznawczych typowych dla AD. Najnowsze doniesienia świadczą o tym, iż zaburzenia neurotransmisji glutaminianergicznej towarzyszące AD nie są jedynie wynikiem zmian aktywności receptorów NMDA, ale wiążą się także ze spadkiem ekspresji podjednostek kompleksu receptorowego, co dodatkowo zmienia

wrażliwość neuronów na stymulację i transmisję sygnału za pośrednictwem receptorów NMDA (Goto i wsp. 2006).

1.7. Strategie terapeutyczne w leczeniu AD

Obecne możliwości terapeutyczne dotyczące AD sprowadzają się do objawowego leczenia tego schorzenia. Dotychczas zaaprobowano dwie metody objawowego leczenia AD. Pierwszą z nich jest stosowanie inhibitorów esterazy acetylocholinowej, co pozwala na utrzymanie niezbędnego stężenia acetylocholin w mózgu. Wykazano, iż leki o aktywności inhibitorów cholinesterazy poprawiają neurotransmisję cholinergiczną, a tym samym łagodzą zaburzenia procesów poznawczych (Birks 2006). Drugą uznaną strategią w terapii objawowej AD jest stosowanie memantyny, antagonisty receptorów NMDA, której deklarowane przez producenta działanie polega także na łagodzeniu kluczowego objawu AD, to jest deficytu funkcji poznawczych (Reisberg i wsp. 2003, Hansen i wsp 2006). Za mechanizm tego efektu powszechnie przyjmuje się przywracanie przez memantynę prawidłowej funkcji niespecyficznie aktywowanych przez A β receptorów NMDA. Jednak wyniki bardziej współczesnych badań przedklinicznych wskazują, że memantynie i innym antagonistom receptorów NMDA można także przypisać znaczący potencjał neuroprotekcyny w toksyczności A β , wychodzący daleko poza standardowe zapobieganie ekscytotoksyczności, co zostanie obszerniej omówione w różnych częściach tej rozprawy.

W trakcie badań są również strategie terapeutyczne skierowane w inne elementy patogenetyczne towarzyszące AD. Wiadomo, iż u podstaw procesów patologicznych związanych z AD leży stres oksydacyjny, co uzasadnia propozycje stosowania leków antyoksydacyjnych. Markery biochemiczne świadczące o wysokiej aktywności komórek mikrogleju oraz reaktywnych astrocytów są podwyższone w AD. W początkowej fazie komórki mikrogleju wykazują właściwości typowych komórek żernych, pochłaniając i degradując A β . Jednakże hiperaktywacja komórek gleju prowadzi do uwalniania uszkodzających neurony chemokin oraz kaskady cytokin, które przyczyniają się do zaostrzenia procesów zapalnych i uszkodzenia bariery krew-mózg towarzyszących AD. Stąd możliwości terapeutyczne można wiązać z regulacją odpowiedzi zapalnej. Obecne badania kliniczne prowadzone są w kierunku testowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, które poprzez redukcję

poziomu A β 42, zahamowanie receptorów dla czynników prozapalnych, stymulację fagocytozy wydają się posiadać zdolność obniżania ryzyka zapadnięcia na AD oraz spowalniać przebieg choroby (Weiner i Frenkel 2006). Należy zaznaczyć, iż liczne próby kliniczne środków przeciwzapalnych nie wykazały aktywności klinicznej i w chwili obecnej badania kliniczne nad tą formą farmakoterapii zostały przerwane.

Nowe perspektywy efektywnej terapii wiążano z zastosowaniem immunoterapii (Holtzman 2008). Stosując mysie modele AD charakteryzujące się nasiloną produkcją A β oraz zaostrzeniem procesu tworzenia złogów amyloidowych w licznych obszarach mózgu dowiedziono, iż immunoterapia prowadzi do istotnej redukcji zmian patologicznych typowych dla tego schorzenia. Wykazano bowiem, iż pasywna immunizacja myszy transgenicznym PDAPP przeciwciałami skierowanymi przeciwko N-końcowemu odcinkowi A β przez okres 6 miesięcy, jak również aktywna immunizacja tych myszy A β 42 prowadzi do blisko 90 % redukcji płytek amyloidowych oraz istotnego obniżenia całkowitego poziomu A β . Efektem wtórnym terapeutycznego działania aktywnej oraz pasywnej immunizacji było zaobserwowane przez badaczy istotne obniżenie degeneracji synaps, zjawiska typowego dla wczesnych etapów AD (Buttini i wsp. 2005). Ponadto badania behawioralne przeprowadzone z użyciem labiryntu wodnego Morrisa na myszach transgenicznym Tg2576 wykazały, iż dootrzewnowe podanie przeciwciał monoklonalnych BAM-10 skierowanych przeciwko N-końcowej domenie A β , poprzez regulację poziomu A β w mózgu, zapobiega deficytom behawioralnym, poprawiając pamięć oraz przywracając funkcje poznawcze (Kotilinek i wsp. 2002). Immunizacja bierna jest w chwili obecnej najbardziej zaawansowana w rozwoju klinicznym forma terapii skierowanej przeciw gromadzeniu się A β w mózgu (Salloway i wsp. 2009).

Badania diagnostyczne wykazały podwyższony poziom apo E w płynie mózgowo-rdzeniowym osób dotkniętych AD, który stopniowo wzrasta wraz z postępowaniem choroby. Stąd, badania nakierowane na zmiany struktury cząsteczki apo E, które by osłabiały jej cytotoksyczne działanie jednocześnie przywracając fizjologiczne funkcje apo E, wydają się być ciekawym i obiecującym kierunkiem w strategii terapeutycznej. Przedmiotem szeroko prowadzonych badań klinicznych są również: modulacja aktywności sekretaz-enzymów odpowiedzialnych za powstawanie amyloidogennych peptydów A β 40-43 (Siemers i wsp. 2006), substancje blokujące agregację i fibrylizację A β (Adessi i wsp. 2003, Wisniewski i Sadowski 2008), związki niszczące strukturę A β istotną dla tworzenia włókien (Soto i wsp.

1998), a także kontrola fosforylacji i agregacji białka tau (Golde 2005, Matsuoka i wsp. 2008).

Z uwagi na wysoki stopień zaawansowania badań nad istotnością wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β w patogenezie AD, jak również kluczowy udział apo E w tym procesie, za kolejny cel dla skutecznej terapii AD przyjęto zbadanie efektywności substancji hamujących tworzenie kompleksów pomiędzy A β i apo E. Ma i wsp. (1996) po raz pierwszy pokazali, iż zastosowanie krótkiego, syntetycznego homologu sekwencji 12-28 cząsteczki A β , stanowiącej miejsce wiązania apo E, w znacznym stopniu osłabia oddziaływanie pomiędzy peptydami A β oraz apo E, co w konsekwencji może ograniczać tworzenie struktur fibrylarnych oraz zmniejszenie neurotoksyczności A β . Wyniki *in vitro* uzyskane przez tę grupę badawczą pokazują, iż interakcja pomiędzy apoE a motywem 12-28 nie stanowi jedynie niespecyficznego oddziaływania pomiędzy resztami hydrofobowymi, ale odgrywa ono istotną rolę w mechanizmach patologicznego działania A β w AD. Z uwagi na fakt, iż sekwencja 12-28 decyduje o interakcji pomiędzy A β a apo E, istnieje obawa, iż peptyd ten może wykazywać działanie toksyczne oraz wspomagać tworzenie struktur fibrylarnych w układach biologicznych. Badania nad peptydem A β 12-28 znalazły swoją kontynuację w obszernym cyklu doświadczeń przeprowadzonych przez grupę Dr Sadowskiego (2004, 2006). Po raz pierwszy zastosowali oni krótki, syntetyczny peptyd A β 12-28P, będący zmodyfikowaną cząsteczką A β 12-28 pozbawioną właściwości neurotoksycznych oraz fibrilogennych, a dodatkowo charakteryzującą się wydłużonym czasem półtrwania *in vivo*. Cykl badań poświęcony określeniu właściwości biologicznych A β 12-28P wykazał jego wysoką skuteczność w przeciwdziałaniu interakcji syntetycznego A β z apo E, a przeprowadzona seria eksperymentów z wykorzystaniem dwóch różnych modeli myszy transgenicznych z objawami typowymi dla AD wykazał, że podanie A β 12-28P znacząco obniża odkładanie się A β w postaci złożeń amyloidowych w parenchymie oraz w naczyniach mózgu, jak również wpływa na redukcję już istniejących plak amyloidowych oraz obniżenie całkowitego poziomu A β w mózgu. Ponadto, badania behawioralne wykazały, iż A β 12-28P zapobiega utracie funkcji poznawczych, co dodatkowo czyni go niezwykle interesującym przedmiotem badań nad terapią w AD. Niezwykle obiecujące wyniki badań *in vivo* skłaniają do lepszego poznania właściwości biologicznych peptydu A β 12-28P poprzez wnikliwą obserwację efektów jego działania na poziomie komórkowym i molekularnym. Innowacyjnym nurtem

badania przedstawionych w tej rozprawie jest określenie wpływu A β 12-28P na zależne od apo E nagromadzenie się A β w neuronach, indukujące serię zdarzeń patologicznych obserwowanych w początkowych stadiach AD.

Na podstawie licznych doniesień zakłada się istotny udział zaburzenia funkcji receptorów dla pobudzających aminokwasów w patogenezie AD. Wydaje się więc, iż wykorzystanie antagonistów receptorów NMDA w początkowej fazie choroby mogłoby skutecznie spowalniać jej przebieg (Scholtzova i wsp. 2008). Napływ wapnia do komórki i zależna od jonów Ca²⁺ aktywacja procesów neurodegeneracyjnych może być hamowana przez blokery kanału NMDA takie jak memantyna. Jest to antagonistą receptorów NMDA zatwierdzony do leczenia średnio-zaawansowanego i zaawansowanego stadium choroby (Hansen i wsp. 2006). Wykazano, iż memantyna korzystnie wpływa na funkcjonowanie, zachowanie i samopoczucie części chorych na AD (Danysz i wsp. 2000a, Ott i wsp. 2007). Należy podkreślić, iż terapia AD oparta na stosowaniu memantyny jest objawowym leczeniem tego schorzenia, usprawniającym działanie receptorów NMDA. Wydaje się, iż u podstaw ochronnego działania memantyny znajdują się specyficzne cechy tego antagonisty jako związku wykazującego wysoką zależność od potencjału błonowego oraz charakteryzującego się niskim powinowactwem do receptora NMDA (Parsons i Gilling 2007). Oznacza to, iż w wyniku fizjologicznej aktywacji receptora NMDA przez specyficznego agonistę ma miejsce sprawne oddysocjowanie memantyny z kanału receptora, tak że staje się on przepuszczalny dla prądu jonowego, dochodzi do depolaryzacji błony komórkowej i transmisji sygnału. Jedną z hipotez dotyczącą mechanizmu korzystnego działania memantyny w AD zaproponowaną przez Parsons i wsp. (2007) jest hipoteza eliminacji szumów (ang. signal-to-noise hypothesis). Jak wiadomo, w warunkach fizjologicznych ma miejsce przejściowa aktywacja receptora NMDA przez milimolarne stężenia glutaminianu uwalnianego z zakończeń synaptycznych (Clements i wsp 1992), co w konsekwencji prowadzi do depolaryzacji błony postsynaptycznej, zwolnienia silnie zależnego od potencjału bloku magnezowego i pobudzenia neuronu. Patologiczna stymulacja receptora NMDA, mająca miejsce w AD, ma polegać na sensytyzacji przez A β receptora NMDA i jego chronicznej aktywacji przez niskie stężenia glutaminianu, bez wywołania potencjału czynnościowego (Benveniste 1984, Andine i wsp. 1991), co w efekcie prowadzi do osłabienia plastyczności synaptycznej (Parsons i wsp. 1999b). Wówczas zastosowanie memantyny miałoby hamować odpowiedź receptora NMDA

na długo utrzymującą się stymulację, z jednej strony eliminując sygnały prowadzące do uszkodzeń neuronu (Parsons i wsp. 1993, 1996), z drugiej zaś strony przywracać właściwą transmisję synaptyczną (Danysz i wsp. 2000a). Stąd też, inne niż memantyna, związki wykazujące działanie hamujące na receptory NMDA mogą być uznane za obiecujące narzędzie terapeutyczne w AD.

Wykazana w praktyce klinicznej skuteczność terapii AD z wykorzystaniem kombinacji inhibitorów esterazy acetylocholinowej oraz memantyny skłoniła wielu autorów (np. Sobow (2010)), do zaproponowania innych wariantów terapii kombinowanej. Jak wiadomo, nieodłącznym elementem towarzyszącym AD jest stres oksydacyjny. Rozważania na temat terapii kombinowanej obejmują możliwość zwiększenia skuteczności terapii AD poprzez jednoczesne zastosowanie antagonisty receptorów NMDA oraz substancji o właściwościach przeciwrodnikowych (Butterfield i Pocernich 2003). Wciąż mało poznanym związkiem przypuszczalnie wykazującym obie te właściwości jest 1MeTIQ.

1.8. 1MeTIQ – potencjalny antagonist receptorów NMDA o działaniu przeciwrodnikowym

1MeTIQ (ang. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) należy do grupy substancji endogennych określanych mianem tetrahydroizochinolin (TIQs), których przedstawiciele mogą wykazywać zarówno działanie neurotoksyczne jak i neuroprotektoryjne. Dowiedziono, iż istnieje ścisła korelacja pomiędzy poziomem TIQs w mózgu a występowaniem schorzeń psychicznych, jak również zmian neurodegeneracyjnych typowych dla choroby Parkinsona (PD) (McNaught i wsp. 1998). Są sugestie, iż długotrwała ekspozycja na nawet niewielkie stężenia pochodnych TIQs o działaniu neurotoksycznym może przyczyniać się do rozległej utraty neuronów w istocie czarnej, do zaburzenia neurotransmisji w układzie dopaminergicznym, a w efekcie do postępu PD (Naoi i wsp. 1996, Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2000). Wciąż nieznanym jest mechanizm neurotoksycznego działania tych substancji, jednakże wydaje się on być zbliżony do podobnego strukturalnie MPTP, który indukuje parkinsonizm. 1MeTIQ stanowi jedną z niewielu pochodnych TIQs obecnych w mózgu, której przypisuje się właściwości neuroprotektoryjne. Jej ochronne działanie na neurony zostało wykazane m.in. w neurotoksyczności indukowanej MPTP (Kohno i wsp 1986, Parrado i wsp. 2000, Antkiewicz-Michaluk i

wsp. 2001). Stwierdzono, że 1MeTIQ redukuje szkodliwe działanie rotenonu, związku będącego inhibitorem kompleksu I łańcucha oddechowego, co prowadzi do uszkodzeń systemu dopaminergicznego oraz wywołującego zmiany biochemiczne i behawioralne typowe dla parkinsonizmu (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2003, 2004). Na podstawie szeregu badań poświęconych określeniu właściwości biologicznych 1MeTIQ o znaczeniu neuroprotektoryjnym (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006) opisano zdolność hamowania przez 1MeTIQ zjawiska ekscytotoksyczności wywołanej glutaminianem, a u podstaw mechanizmu tego działania wydaje się leżeć blokowanie receptorów NMDA. Istnieją więc podstawy do uznania tej tetrahydroizochinoliny za substancję o cechach antagonisty receptora NMDA.

Jak wspomniano powyżej, z uwagi na fakt, iż nieodłącznym elementem AD są rozległe uszkodzenia neuronów w następstwie nasilenia reakcji wolnorodnikowych (Markesbery 1997) wydaje się, iż efektywność terapii tego schorzenia może być w znacznym stopniu zwiększona poprzez jednoczesne zastosowanie antagonistów receptorów NMDA oraz związków o właściwościach przeciwrodnikowych (Butterfield and Pocernich 2003). W pracy Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006 wykazano, że 1MeTIQ to związek o potencjalnych właściwościach przeciwrodnikowych, który blokując utlenianie kwasu salicylowego w reakcji Fentona w układzie abiotycznym hamuje powstawanie rodnika hydroksylowego. Są też dane wskazujące pośrednio na potencjał przeciwrodnikowy 1MeTIQ *in vivo*. Substancja ta osłabia neurotoksyczne działanie rotenonu, którego jednym z mechanizmów jest wzrost produkcji ROS na drodze utleniania dopaminy, hamując indukowany przez rotenon stres oksydacyjny, co dodatkowo przemawia za przeciwrodnikowymi właściwościami tej tetrahydroizochinoliny (Patsenka i Antkiewicz-Michaluk 2004). Ta właściwość 1MeTIQ wymaga jednak dalszych badań.

Sugerowany mechanizm działania 1MeTIQ obejmujący m.in. działanie przeciwrodnikowe i hamowanie receptora NMDA może przemawiać za możliwością wykorzystania 1MeTIQ jako substancji modelowej, użytecznej do sprawdzenia skuteczności terapii kombinowanej z użyciem antagonisty receptora NMDA oraz substancji przeciwrodnikowej w zapobieganiu neurotoksyczności A β . Podjęcie takich badań musi być jednak poprzedzone dokładną charakterystyką właściwości biologicznych 1MeTIQ. Potwierdzenia wymaga zdolność 1MeTIQ do hamowania reakcji wolnorodnikowych z wykorzystaniem materiału biologicznego. Wymaga też udowodnienia, że jest bezpośredni związek między hamowaniem receptora NMDA a

działaniem neuroprotekcijnym 1MeTIQ. Nie został również zbadany potencjał neuroprotekcyny 1MeTIQ *in vivo* w sytuacjach patologicznych związanych z ekscytotoksycznością, jak niedokrwienie i niedotlenienie mózgu lub toksyczność NMDA indukowana przez mikroiniekcje domózgowe. Ponadto, nie prowadzono badań nad możliwością ochronnego działania 1MeTIQ w toksyczności A β i wykorzystania tego związku jako substancji o potencjalnych właściwościach protekcyjnych przed indukcją patologicznych zdarzeń mających miejsce w AD.

2 Założenia i cel pracy

Liczne doniesienia wskazują na istotną rolę apo E w procesie agregacji oraz fibrylizacji A β (Castano i wsp. 1995, Golabek i wsp. 1996, LaDu i wsp. 2000, Ye i wsp. 2005). Badania immunohistochemiczne wykazały obecność apo E w plakach amyloidowych utworzonych przez fibrylarny A β zlokalizowanych w obrębie neuronów o zaawansowanej dystrofii neurytów i nasilonych procesach neurodegeneracyjnych (Bales i wsp. 1997, Holtzman i wsp. 2000), co świadczy o istotnym udziale cząsteczki apo E w metabolizmie A β . Miejscem wiązania apo E do sekwencji A β jest motyw 12-28, co sugeruje, iż ten fragment peptydu odpowiada za tworzenie kompleksów A β /apo E. Stąd, są podstawy do rozpatrywania potencjału terapeutycznego związków zapobiegających interakcji pomiędzy A β a apo E w leczeniu AD. Sadowski i wsp. (2004, 2006) w swoich badaniach po raz pierwszy zastosowali krótki, syntetyczny peptyd odpowiadający sekwencji aminokwasowej A β (12-28) będącej miejscem wiązania apo E. Cykl badań poświęcony określeniu właściwości biologicznych peptydu A β 12-28P wykazał jego wysoką skuteczność w przeciwdziałaniu interakcji syntetycznego A β z apo E, a przeprowadzona seria eksperymentów z wykorzystaniem dwóch różnych modeli myszy transgenicznych z objawami typowymi dla AD wykazał, że podanie A β 12-28P znacząco obniża odkładanie się A β w postaci złogów amyloidowych w parenchymie oraz w naczyniach mózgu, jak również wpływa na obniżenie ilości już istniejących plak amyloidowych oraz całkowitego poziomu A β w mózgu. Ponadto, badania behawioralne wykazały, iż A β 12-28P zapobiega utracie funkcji poznawczych, co dodatkowo czyni go niezwykle interesującym przedmiotem badań dotyczących leczenia AD. Obiecujące wyniki badań *in vivo* skłaniają do lepszego poznania właściwości biologicznych peptydu A β 12-28P poprzez wnikliwą obserwację efektów jego działania na poziomie komórkowym i molekularnym. Niewiele wiadomo na temat wpływu nagromadzenia się peptydów A β w komórkach nerwowych na generację patologicznych sygnałów prowadzących do neurodegeneracji. Nasuwa się również pytanie, czy czynniki hamujące tworzenie kompleksów A β /apo E będą wpływały na wychwyt egzogenego A β przez komórki nerwowe, a tym samym modulowały toksyczność A β wywołaną jego nagromadzeniem się wewnątrz komórek.

Jednym z centralnych zagadnień dotyczących patogenezy AD jest patologiczna rola interakcji A β z receptorami NMDA, odgrywającymi kluczową rolę w

procesach poznawczych oraz w mechanizmach toksyczności pobudzeniowej. Wywoływane przez A β zaburzenia funkcjonowania receptorów NMDA przyczyniają się do obserwowanych w AD zaburzeń poznawczych oraz rozwoju zmian patologicznych w synapsach glutaminianergicznych. Antagonista receptorów NMDA memantyna jest stosowana w terapii AD, co nie wyczerpuje zapotrzebowania na skuteczniejsze leki z tej grupy. Obiecującą substancją jest 1MeTIQ, endogenna tetrahydroizochinolina o złożonym mechanizmie działania neuroprotekcijnego. Są przesłanki do twierdzenia, że jest to antagonistą receptorów NMDA o działaniu przeciwrodnikowym. Mimo zachęcających wyników poprzednich badań wskazujących na działanie 1MeTIQ hamujące ekscytotoksyczność (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006), nie jest jasne jaki jest dokładny receptorowy mechanizm tego hamowania. Poprzednio wykazano, że 1MeTIQ hamuje wiązanie znakowanego MK-801 do błon izolowanych z synaptoneurosomów, co wskazuje na bezpośrednie hamowanie aktywacji kanału NMDA, jednakże nie jest znany dokładny mechanizm tego efektu i miejsce działania 1MeTIQ na kompleks receptora NMDA. Poza lepszym scharakteryzowaniem działania neuroprotekcijnego 1MeTIQ *in vitro*, wymaga też zbadania potencjału neuroprotekcijnego 1MeTIQ *in vivo* w sytuacjach patologicznych związanych z ekscytotoksycznością, jak niedokrwienie i niedotlenienie mózgu. Następnie konieczna jest weryfikacja w warunkach eksperymentu biologicznego hipotezy o działaniu przeciwrodnikowym 1MeTIQ. Wreszcie wstępne przetestowanie ochronnego działania 1MeTIQ na synapsy glutaminianergiczne poddane toksyczności A β mogłoby otworzyć drogę dla wykorzystania tego związku jako substancji modelowej do przyszłych badań nad nowymi strategiami terapeutycznymi w AD.

Stąd też celem niniejszej rozprawy było określenie możliwości modulowania wywołanej przez A β patologii synaps glutaminianergicznych z wykorzystaniem peptydu A β 12-28P, związku zapobiegającego interakcji pomiędzy A β a apo E, oraz 1MeTIQ, przypuszczalnego antagonisty receptorów NMDA o sugerowanych właściwościach przeciwrodnikowych.

Dla realizacji tego zagadnienia zostały wyznaczone następujące cele cząstkowe:

- a. Określenie wpływu mysiej apo E na wychwyt oraz nagromadzenie się syntetycznego A β w neuronach i zbadanie działania A β 12-28P na ten proces.

- b. Dokonanie oceny wpływu wewnątrzkomórkowego odkładania się A β na zmianę ekspresji białek postsynaptycznych oraz zbadanie, czy A β 12-28P może zapobiegać postępującej utracie markerów synaps glutaminianergicznych.
- c. Weryfikacja powinowactwa 1MeTIQ do wybranych kluczowych miejsc wiązania dla ligandów w kompleksie receptora NMDA, oraz zbadanie wpływu 1MeTIQ na aktywność tego receptora.
- d. Potwierdzenie właściwości antagonistycznych 1MeTIQ wobec receptorów NMDA poprzez zbadanie jego zdolności do przeciwdziałania ekscytotoksyczności *in vitro* i *in vivo*.
- e. Wykazanie w warunkach doświadczenia biologicznego *in vitro* działania przeciwrodnikowego 1MeTIQ.
- f. Zbadanie, czy 1MeTIQ może zapobiegać wywołanym przez A β zmianom w poziomie wybranych białek będących markerami synaps glutaminianergicznych w neuronach.

2. Materiał i metody

2.1. Badania *in vitro*

2.1.1. Hodowla pierwotna mysich/szczurzych neuronów hipokampa

Badania wykonano na dojrzałych 15-dniowych (15DIV) mysich hodowlach neuronów hipokampa zakładanych z myszy dzikiego szczepu C57B16J lub na niedojrzałych 8-dniowych (8DIV) hodowlach neuronów hipokampa zakładanych z osesków szczurzych szczepu Wistar uzyskanych w przeciągu 24 godz. od narodzin osesków wg metody opisanej przez Takahashi i wsp. (2004) z niewielkimi modyfikacjami. Skórę zwierząt (10-12 sztuk na doświadczenie) odkażano przy użyciu alkoholu, a następnie dekapitowano i na lodzie preparowano hipokampy umieszczane w zimnym buforze HBSS (Hank's balanced salt solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Wyizolowane hipokampy inkubowano z 0,05% trypsyną (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) w HBSS przez 10 min. w 37⁰ C delikatnie wytrząsając. Po dodaniu roztworu inhibitora trypsyny (0,1 %) oraz DNasy I (0,05 %), zawiesinę komórek poddawano wirowaniu (500 x g, 30 s.). Uzyskany osad komórek zawieszano w ogrzanym środowisku wzrostowym MEM (Minimum Essential Medium; Invitrogen, Carlsbad, CA) uzupełnionym inaktywowaną (60⁰ C, 60 min.) 10 % cielęcą surowicą płodową (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0,5 mM glutaminą (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), oraz streptomycyną (50 µg/ml) i penicyliną (50 U/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Tkanekę rozdrabniano poprzez triturację za pomocą 5 mL pipety (ok. 10 x uważając przy tym, aby nie wprowadzać pęcherzyków powietrza), a następnie ponownie wirowano (500 x g, 5 min.), zawieszano w świeżej pożywce i rozdrabniano przy użyciu 5 mL pipety, aż do uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Zawiesinę komórek przepuszczano następnie przez filtr o wielkości porów 70 µM, barwiono 2 % roztworem błękitu trypanu i liczono używając hematocytometru (Hausser Scientific, Horsham, PA). W zależności od typu eksperymentu, komórki wysiewane były na pokryte poli-L-lizyną powierzchnie w ilości 2 x 10⁴ / dołek płytki 96-dołkowej (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) do testu MTT; 5 x 10⁵ / dołek płytki 12-dołkowej (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) do Western blot; 1 x 10⁵ / szkiełko nakrywkowe (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) do immunocytochemii. Hodowle neuronów umieszczano w inkubatorze na 4 godz., aby umożliwić komórkom przyczepienie się do podłoża. Następnie zmieniano środowisko

wzrostowe na pozbawiony surowicy Neurobasal (Invitrogen, Carlsbad, CA) uzupełniony w 2 % B27, 0,5 mM glutaminę, oraz roztwór streptomycyny (50 µg/ml) i penicyliny (50 U/ml) i powtórnie umieszczano hodowle w inkubatorze. W 3. dniu hodowli podawano do pożywki jednorazowo Ara C (arabinozyd cytozyny) do końcowego stężenia 5 µM, aby zapobiec namnażaniu się komórek glejowych i fibroblastów. Hodowle prowadzono w inkubatorze w standardowych warunkach przy 37⁰ C oraz 5 % zawartości CO₂ w powietrzu o wilgotności 95 %. Dwa razy w tygodniu, 1/3 objętości środowiska hodowlanego była zastępowana świeżą pożywką Neurobasal/B27. Czystość hodowli neuronów, która oznaczana była na podstawie analizy obrazu z mikroskopu fluorescencyjnego jako liczba wybarwionych jodkiem propidyny jąder komórkowych z jednoczesnym barwieniem na marker neuronów MAP2, wynosiła ~ 97 %.

2.1.2. Hodowla astrocytarna

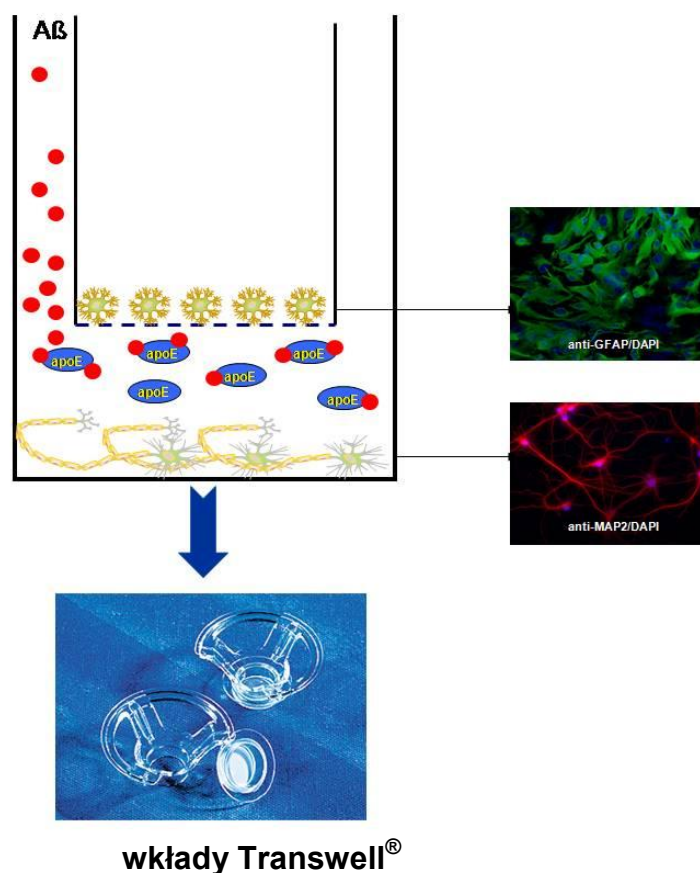
Hodowle astrocytów kory mózgu uzyskiwano z 1-dniowych oseków mysich dzikiego szczepu C57B16J na podstawie protokołu Le Roux i Reh (1996). Używając mikroskopu stereoskopowego (AmScope, Chino, CA), przeprowadzano na lodzie procedurę usuwania z powierzchni mózgu widocznych naczyń krwionośnych oraz błon, a następnie oczyszczone półkule mózgu krojono za pomocą skalpela na niewielkie skrawki i umieszczano w zimnym buforze HBSS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺. Tak rozdrobnioną tkankę poddawano tritracji przy użyciu 5 mL pipety aż do uzyskania homogennej zawiesiny komórek, którą wirowano (500 x g, 5 min.) i zawieszano w świeżym środowisku wzrostowym MEM wzbogaconym o inaktywowaną 20 % cielęcą surowicą płodową FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2 mM glutaminę (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), oraz roztwór streptomycyny (50 µg/ml) i penicyliny (50 U/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Homogenat komórkowy przesączano następnie przez filtr o wielkości porów 45 µM, barwiono 2 % roztworem błękitu trypanu, a dalej liczono używając hematocytometru (Hausser Scientific, Horsham, PA). Komórki o gęstości 1 x 10⁵ wysiewano na buteleczki o powierzchni 25 cm² (Corning, Corning, NY). Hodowle prowadzono w inkubatorze w standardowych warunkach przy 37⁰ C oraz 5 % zawartości CO₂ w powietrzu o wilgotności 95 %. Na drugi dzień po wysianiu komórek, wymieniano 1/3 środowiska wzrostowego MEM + 20 % FBS, a po 48 godz. środowisko hodowlane zastępowano świeżą pożywką i

dotychczas dodawano jednorazowo 5 μ M Ara C. Po 6 dniach prowadzenia hodowli, wymieniano środowisko hodowlane na MEM o zredukowanym stężeniu surowicy (10 % FBS, 2 mM glutamina, streptomycyna (50 μ g/ml) i penicylina (50 U/ml)) i w tych warunkach komórki utrzymywane były do osiągnięcia pełnej konfluencji (12 DIV). Czystość hodowli astrocytarnej wynosiła > 95 %, jak oceniono na podstawie barwienia anty-GFAP.

2.1.3. Współ-hodowla neuronalno-astrocytarna

Hodowle astrocytarne (12 DIV) poddawano działaniu 0,25 % trypsyny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) i umieszczano ponownie w inkubatorze na 5 min. Po tym czasie dodawano świeże środowisko wzrostowe (MEM + 10% FBS, 2 mM glutamina, streptomycyna (50 μ g/ml) i penicylina (50 U/ml)) oraz dodatkowo 10 % FBS, działającą jako stoper trypsyny. Następnie komórki wirowano przy 500 x g przez 5 min, zawieszano w świeżym środowisku wzrostowym, poddawano trituracji i wysiewano w ilości 1×10^4 na wkłady Transwell® o wielkości porów 0,4 μ M (Corning, Corning, NY) (Carlson i wsp. 2009). W następnym dniu, środowisko hodowlane w górnym przedziale zawierającym astrocyty zmieniano na świeże środowisko wzrostowe, a po 48 godz. prowadzenia hodowli pożywkę w obu przedziałach wymieniano na Neurobasal uzupełniony w 2% B27, 0,5 mM glutaminę, oraz roztwór streptomycyny (50 μ g/ml) i penicyliny (50 U/ml) i powtórnie umieszczano hodowle w inkubatorze. W takich warunkach astrocyty hodowano przez kolejne 24 godz., a następnie przenoszono wkłady z astrocytami do dojrzałej hodowli neuronów hipokampa (Manelli i wsp. 2007). Przed wykonaniem doświadczenia, współ-hodowle neuronalno-astrocytarne utrzymywane były przez 24 godz. w inkubatorze w standardowych warunkach przy 37⁰ C oraz 5 % zawartości CO₂ w powietrzu o wilgotności 95 %.

Schemat współ-hodowli neuronalno-astrocytarnej



2.1.4. Ocena przeżywalności neuronów hipokampa w neurotoksyczności wywołanej A β

Przed przystąpieniem do eksperymentu, syntetyczny A β 40 oraz A β 42 (WM Keck Laboratorium Yale Univ, USA), poddawano monomeryzacji poprzez liofilizację peptydu w \pm 99 % HFIP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Hodowle pierwotne neuronów hipokampa myszy (15 DIV) inkubowano w obecności monomerów A β 40 lub A β 42 w stężeniach 5, 10, 25 lub 50 μ M. Peptydy podawane były do środowiska wzrostowego na okres 24 lub 72 godz., po czym dokonywano oceny przeżywalności komórek przy użyciu testu MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA) na podstawie protokołu dostarczonego przez producenta. Po 24 godz. mierzono absorbancję przy długościach fal 570 nm oraz 630 nm przy użyciu spektrofotometru Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT), a otrzymane dane liczbowe wyrażano jako % wartości kontrolnej. Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty, przy liczbie punktów pomiarowych n=18.

2.1.5. Oznaczanie wychwytu oraz nagromadzenia się peptydów A β w neuronach hipokampa

Dojrzałe hodowle neuronów hipokampa lub współ-hodowle neuronalno-astrocytarne były poddawane działaniu monomerów 10 μ M A β 40 lub 10 μ M A β 42 w obecności A β 12-28P (NH₂-VHHQKLPPFAEDVGSNK-COOH) lub A β 12-28P_(s) (NH₂-QGKFSDHVNEPHFAVKL-COOH) przez okres 24 godz. W następnym dniu usuwano wkłady z astrocytami z warstwy neuronów, a pozostałe na płytce czyste hodowle neuronów były 3-krotnie przepłukiwane ogrzanym do 37⁰ C PBS. Następnie komórki poddawano trypsynizacji 0,01 % trypsyną przez 5 min., w celu usunięcia A β związanego z błoną komórkową (Lambert i wsp. 1998), i lizie przez 5 min. w 4⁰ C w buforze zawierającym 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % nonidet-P40, 0,1 % SDS, 0,2 % dietylaminę, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ g/ml Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) i po 5 μ g/ml leupeptyny, antypainy, pepstatyny. Komórki były zdrapywane z powierzchni płytek, umieszczane w probówkach typu Eppendorf i homogenizowane 10-krotnie za pomocą teflonowego tłoka. Cała procedura zbierania materiału wykonywana była na lodzie. Uzyskany homogenat poddawano wirowaniu przy 10 000 x g przez 20 min. w temperaturze 4⁰ C. Zebrany nadsącz stanowił materiał do dalszych badań. Do oznaczenia poziomu NR1/NMDA, PSD-95 oraz synaptofizyny próbek nie wirowano. Zawartość białka w nadsączu z homogenatu neuronów hipokampa oznaczano testem BCA (The bicinchoninic acid assay; Pierce, Rockford, IL), a następnie próbki zawierające taką samą ilość białka tj. odpowiednio 10 μ g białka/studzienkę dla oznaczenia A β 40/42, NR1/NMDA, PSD-95 oraz synaptofizyny, 20 μ g białka/studzienkę dla oznaczenia tau, ogrzewano przez 5 min. w buforze redukującym Laemmli`ego. Rozdziału białek dokonywano na żelu poliakrylamidowym o gęstości 15 % (do oceny A β , tau) lub 10 % (do oceny NR1/NMDA, PSD-95, synaptofizyny oraz apo E) przy stałym napięciu 100 V przez 2 godz. Następnie dokonywano transferu białek na błonę nitrocelulozową (Towbin i wsp. 1979) przy stałym napięciu 100 V przez 2 godz. W celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciała do innych białek, błony nitrocelulozowe inkubowano przez 1 godz. w 5 % roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-T. Następnie błony nitrocelulozowe inkubowano z pierwszym przeciwciałem przez 1 godz. w temp. pokojowej (Tabela 1), dalej płukano trzykrotnie po 10 min. w TBS-T, po czym przeprowadzano inkubację z drugim przeciwciałem sprzężonym z

peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:5000 (SAM-HRP; GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) przez 1 godz. w temp. pokojowej. Następnie błony płukano trzykrotnie po 10 min. w TBS-T. Do detekcji białka wykorzystywano metodę chemiluminescencji z użyciem odczynnika ECL (SuperSignal; Pierce, Rockford, IL). We wszystkich doświadczeniach czas naświetlania filmów użytych do analizy densytometrycznej wynosił 30 s.. Analiza densytometryczna filmów była przeprowadzana z użyciem skanera Epson Perfection 4990 (Epson America, Long Beach, CA) oraz programu Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA). Intensywność immunoreakcji mierzona była za pomocą NIH Image J software v 1.42i (Bethesda, MD) (Pankiewicz i wsp. 2006, Sadowski i wsp. 2009). Ciężar cząsteczkowy białek był oznaczany poprzez stosowanie odpowiednich standardów białkowych tj. białek o określonym ciężarze cząsteczkowym (Bio Rad, Hercules, CA). Kontrolę ilości materiału nakładanego na studzienki żelu stanowiły wyniki Western blot z użyciem przeciwciała przeciw β -aktynie (42 kDa). Przeprowadzono 4 niezależne eksperymenty.

2.1.6. Ocena zdolności neuronów hipokampa do wewnątrzkomórkowej degradacji A β

Do hodowli neuronów hipokampa w 15DIV, prowadzonej w obecności lub pod nieobecność astrocytów, podawano monomeryczny A β 40 o stężeniu 10 μ M na czas 6 godz.. Następnie usuwano środowisko inkubacyjne, 3-krotnie przepłukiwano komórki PBS ogrzany do 37⁰ C, po czym hodowle neuronów bądź współ-hodowle neuronalno-astrocytarne umieszczano w środowisku hodowlanym pozbawionym A β . Komórki pozostawiano w standardowych warunkach na czas 2, 6, 12, 24 lub 48 godz. Przed przystąpieniem do zebrania materiału w wyznaczonym punkcie czasowym, hodowle 2-krotnie płukano PBS, a następnie inkubowano z 0,01 % trypsyną. Procedura zbierania materiału oraz detekcji A β metodą Western blot była wykonywana zgodnie z protokołem umieszczonym w paragrafie 2.1.5. Przeprowadzono 5 niezależnych eksperymentów.

2.1.7. Wpływ nagromadzenia się A β w neuronach hipokampa na proces wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji peptydu

Dojrzałe hodowle neuronów hipokampa oraz współ-hodowle neuronalno-astrocytarne były poddawane działaniu monomerycznego A β 40 lub A β 42, oba w stężeniu 10 μ M, przez okres 24 godz. Następnego dnia usuwano wkłady z astrocytami znad warstwy neuronów, które przepłukiwano 3-krotnie ogrzanym PBS. Po poddaniu neuronów przez 5 min. działaniu 0,01 % trypsyny, komórki umieszczano w buforze lizującym na 5 min., po czym zdrapywano z powierzchni płytek i homogenizowano 10-krotnie za pomocą tłoka teflonowego. Procedura zbierania materiału wykonywana była na lodzie. Uzyskany homogenat poddawano wirowaniu przy 10 000 x g przez 20 min. w temperaturze 4⁰C. Uzyskany nadsącz poddawano analizie na obecność form oligomerycznych metodą Dot blot przy użyciu aparatu Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (Bio Rad, Hercules, CA). Do detekcji oligomerów A β wykorzystano specyficzne przeciwciało A11 (Kayed i wsp. 2003) wiążące się do oligomerów białkowych (Invitrogen, Carlsbad, CA). Analiza densytometryczna filmów była przeprowadzana z użyciem skanera Epson Perfection 4990 (Epson America, Long Beach, CA) oraz programu Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA). Intensywność immunoreakcji mierzono za pomocą NIH Image J software v 1.42i (Bethesda, MD). Do oceny specyficzności reakcji jako kontroli pozytywnej użyto oligomerycznego A β 40. Przeprowadzono 4 niezależne eksperymenty.

Procedurę oligomeryzacji A β przeprowadzono w oparciu o metodę opisaną przez Chromy i wsp. (2003) oraz Chafekar i wsp. (2008). Monomeryczny A β 40 rozpuszczano w DMSO (1 %) i pozostawiano na 10 min. w temperaturze pokojowej. Następnie stopniowo dodawano środowisko DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium; Invitrogen, Carlsbad, CA) nie zawierające phenol red, za każdym razem mieszając próbkę na vortexie. W celu stworzenia warunków sprzyjających oligomeryzacji, do mieszaniny dodawano 2 % SDS. A β (100 μ M) pozostawiano na 24 godz. w 4⁰ C. Następnego dnia próbkę wirowano (14 000 x g, 10 min.) przy użyciu filtrów Microcon[®] YM-10 (Millipore, Billerica, MA), w celu usunięcia niezagregowanych form A β .

Inna zastosowana metoda pomiaru stężenia oligomerów A β w lizatach komórkowych polegała na wykonaniu testu ELISA przy użyciu fabrycznego pakietu (Aggregated A β Human ELISA Kit; Invitrogen Carlsbad, CA). Pomiaru absorbancji

dokonano przy długości fali 450 nm za pomocą spektrofotometru Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT). Przeprowadzono 4 niezależne eksperymenty.

2.1.8. Wykrywanie fibryli A β wewnątrz komórek nerwowych

Do oznaczenia poziomu fibryli A β wewnątrz komórek nerwowych wykorzystano barwienie z użyciem Tioflawiny S. Procedura barwienia Tioflawiną S polegała na pokryciu roztworem barwnika komórek rosnących na szkiełku nakrywkowym na czas 6 min., a następnie preparat umieszczano w alkoholu etylowym o stężeniu 80 % na 3 min., 50 % na 1 min. oraz w wodzie destylowanej na 30 sek. Otrzymane preparaty komórkowe poddawano analizie w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon 80i wyposażonym w kolorową kamerę DS-Fi1 5 z pomocą oprogramowania Nikon NIS Elements image analysis software (Nikon Corp. Tokyo, Japan). Zdjęcia neuronów wykonywano pod powiększeniem 100 x z użyciem imersji, zapisywano w formacie TIF z rozdzielczością 600 dpi.

2.1.9. Ocena immunocytochemiczna wewnątrzkomórkowej lokalizacji A β

W 12 DIV, do hodowli neuronów hipokampa dodawano mieszaninę monomerów A β 40 sprzężonego ze znacznikiem fluorescencyjnym, FITC-A β 40 (WM Keck Laboratorium Yale Univ, USA) oraz nieznakowanego A β 40 w stosunku 1:9 o końcowym stężeniu 10 μ M. Po 72 godz. inkubacji hodowli neuronów bądź współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych z A β , neurony utrwalano 80 % metanolem przez 10 min., następnie komórki płukano trzykrotnie PBS i poddawano działaniu 0,25 % Triton-X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) przez 2 min. Badania immunocytochemiczne przeprowadzano z wykorzystaniem kitu Mouse on Mouse (MOM; Vector Laboratories, Ltd., Burlingame, CA) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Wyznakowane neurony oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon 80i wyposażonym w kolorową kamerę DS-Fi1 5 oraz z pomocą oprogramowania Nikon NIS Elements image analysis software (Nikon Corp. Tokyo, Japan). Zdjęcia neuronów wykonywano pod powiększeniem 100 x z wykorzystaniem imersji, zapisywano w formacie TIF z rozdzielczością 600 dpi. Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty.

2.1.10. Ocena ekspresji powierzchniowych markerów neuronalnych w warunkach inkubacji komórek z A β

Dojrzałe hodowle neuronów hipokampa zostały poddane działaniu monomerów 10 μ M A β 40 w obecności lub pod nieobecność apo E. Po 72 godz. inkubacji, neurony utrwalano 80 % metanolem przez 10 min., następnie płukano trzykrotnie PBS i poddawano działaniu 0,25 % Triton-X przez 2 min. Badania immunocytochemiczne przeprowadzano z użyciem pakietu M.O.M. (Vector Laboratories, Ltd., Burlingame, CA) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Podjednostka NR1 receptora NMDA, PSD-95 oraz synaptofizyna były znakowane za pomocą specyficznych przeciwciał monoklonalnych (Tabela 1). Inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym prowadzono przez 2 godz.. Po trzykrotnym przepłukaniu PBS, dodawano biotynylowane przeciwciało drugorzędowe (Vector Laboratories, Ltd., Burlingame, CA) na 1 godz.. Następnie komórki umieszczano w roztworze awidyna-Cy3 lub awidyna-Cy2 na 30 min, po czym trzykrotnie płukano PBS i nakładano DAPI. Wyznakowane neurony oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon 80i wyposażonym w kolorową kamerę DS-Fi1 5 z użyciem oprogramowania Nikon NIS Elements image analysis software (Nikon Corp. Tokyo, Japan). Zdjęcia neuronów wykonywano pod powiększeniem 100 x z wykorzystaniem imersji, zapisywano w formacie TIF z rozdzielczością 600 dpi. Poziom ekspresji białek postsynaptycznych oznaczano na podstawie losowo wybranych pięciu miejsc pomiarowych zebranych z określonych neurytów na odcinku o długości 20 μ M i analizowano za pomocą NIH Image J software v 1.42i (Bethesda, MD). Obszary testowe pobrano z 20 neuronów przypadających na jeden wiariant eksperymentu, doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki pomiarów gęstości markerów synaptycznych wyrażono jako % wartości kontrolnej.

W doświadczeniach zaprojektowanych w celu uwidocznienia A β wchodzącego w skład powierzchniowej lub wewnątrzkomórkowej puli tego peptydu, neurony poddano działaniu FITC-A β 40 oraz nieznakowanego A β 40 w proporcji 1:9 do uzyskania końcowego stężenia 10 μ M. Obraz neuronów MAP2-pozytywnych (Tabela 1) analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego (Bio-Rad Radiance 2000 confocal system; Hercules, CA) pod obiektywem immersyjnym 60 x.

Tabela 1. Spis użytych przeciwciał

Klon	Antygen	Typ	Rozcieńczenie do badań immunocytochemicznych	Rozcieńczenie do Western blot	Pochodzenie
AC-15	N-koniec β -aktyny	Mysie monoklonalne		1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
3H2	GFAP	Mysie monoklonalne	1:1000		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
4G8	A β Reszta 17-24	Mysie monoklonalne		1:5000	Otrzymane dzięki uprzejmości Richarda J. Kascsaka, NYS Institute for Basic Research, Staten Island, NY
6E10	A β Reszta 1-16	Mysie monoklonalne		1:5000	Otrzymane dzięki uprzejmości Richarda J. Kascsaka, NYS Institute for Basic Research, Staten Island, NY
7E3-1B8	PSD-95	Mysie monoklonalne	1:500	1:2000	Millipore, Billerica, MA
A11	Oligomery A β	Królicze poliklonalne		1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA
C-20	C-koniec podjednostki NMDA ζ 1	Kozie poliklonalne		1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
G-4	EEA1 Reszta 1-300	Mysie monoklonalne	1:100		Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
GA5	GFAP/Alexa [®] 488	Mysie monoklonalne	1:100		Cell Signaling Technology
H-8	SYP Reszta 221-313	Mysie monoklonalne	1:200	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
H-50	Rab 7	Królicze poliklonalne	1:100		Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
H-75	Katepsyna D	Królicze poliklonalne	1:100		Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
HM-2	MAP2	Mysie monoklonalne	1:1000		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
HSP60	HSP60 Reszta 288-366	Mysie monoklonalne	1:100		Stressgen Bioreagents, Ann Arbor, MI
M-20	C-koniec mysiej apoE	Kozie poliklonalne		1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
NR-1, CT	NR1/ NMDA Reszta 834-938	Mysie monoklonalne	1:100		Millipore, Billerica, MA
Tau	Fosfo-Ser199/202 białka Tau	Królicze poliklonalne		1:5000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

2.1.11. Hodowla pierwotna neuronów ziarnistych mózdzku szczura

Komórki uzyskano z 8-dniowych szczurów szczepu Wistar obu płci wg metody opisanej przez Schousboe i wsp. (1985). Skórę zwierząt (16 sztuk na jedno doświadczenie) poddawano sterylizacji alkoholem, a następnie wykonywano dekapitację. Ze zwierząt izolowano mózdzki, które krojono następnie na siekaczu McIlwaina na skrawki o wymiarach 400 x 400 μm . Uzyskany homogenat tkanki poddawano trypsynizacji w buforze HIB o składzie: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 9,1 mM glukoza z dodatkiem 0,025 % trypsyny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) i 0,05 % DNazy (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), które dalej wytrząsano przez 15 min. w łaźni wodnej. Następnie dodawano roztwór zawierający inhibitor trypsyny. Po zwirowaniu zawiesiny komórek, nadsącz usuwano, a osad zawieszano w ciepłym środowisku wzrostowym BME (Basal Medium Eagle) z dodatkiem soli Earla (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) uzupełnionym 10 % cielęcą surowicą płodową (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 25 mM KCl oraz 0,5 % roztworem penicyliny/streptomycyny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Osad komórek rozdrabniano przy pomocy strzykawki z grubą igłą, a następnie wirowano przez 15 min. Uzyskany osad zawieszano w określonej objętości BME i rozdrabniano w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Do liczenia komórek w komorze Bürkera używano 2 % roztworu błękitu trypanu. Gęstość wysiewanych komórek, w zależności od doświadczenia, wynosiła 2 mln / dołek płytki 12-dołkowej (NUNC, USA) oraz 13 mln / 25 cm^2 butelkę (NUNC, USA). Po 72 godz. od założenia hodowli dodawano 5 μM AraC w celu ograniczenia namnażania się fibroblastów oraz komórek glejowych. Hodowla prowadzona była w inkubatorze w warunkach standardowych przy 37⁰ C, 5 % zawartości CO₂ i 95 % wilgotności powietrza. Doświadczenia przeprowadzano w 8 DIV.

2.1.12. Schemat podawania substancji farmakologicznie czynnych w modelu ostrej neurotoksyczności Glu

Do indukcji ekscytotoksyczności, jak opisała uprzednio Ancarcrona i wsp. (1995), wykorzystano 30 min. inkubację komórek z glutaminianem sodu (Glu) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) rozpuszczonym w buforze LOCKE 25 o składzie: 134 mM NaCl, 25 mM KCl, 4 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 2,3 mM CaCl₂, 5 mM D-

glukoza, 50 μM glicyna o pH 7,4. Po usunięciu środowiska wzrostowego komórki umieszczano w buforze LOCKE 25 z dodatkiem:

1. 250 μM Glu oraz 0,5 μM MK-801; 5 μM MEM lub 1MeTIQ w stężeniach 100, 250, 500 μM . Inhibitory były dodawane 5 min. przed podaniem Glu (bezpośrednia neuroprotekcja);
2. 250 μM Glu oraz 0,5 μM MK-801 lub 1MeTIQ w stężeniach 100, 250, 500 μM . Inhibitory były dodawane na okres 30 min., 24 lub 48 godz. przed podaniem Glu (prekondycjonowanie);
3. 100 μM Glu oraz 0,5 μM MK-801; 5 μM MEM lub 1MeTIQ w stężeniach 100, 250, 500 μM . Inhibitory były dodawane na okres 30 min., 30 min., 1 godz. lub 3 godz. po podaniu Glu (postkondycjonowanie).

Po inkubacji neuronów z badanymi substancjami, przywracano środowisko wzrostowe i prowadzono hodowle w warunkach standardowych przez kolejne 24 godz.. Następnie komórki utrwalono 80 % metanolem i barwiono 0,05 % jodkiem propidyny. Oceny przeżywalności neuronów, wyrażonej jako liczba żywych i martwych komórek, dokonywano przy użyciu mikroskopu fluoroscencyjnego Zeiss Axiovert 25. Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty, przy liczbie punktów pomiarowych $n=18$ (\pm SD).

2.1.13. Wpływ 1MeTIQ na wiązanie znakowanych ligandów

Badanie powinowactwa 1MeTIQ do miejsc wiązania agonisty, ko-agonisty oraz antagonisty na kompleksie receptora NMDA, przeprowadzono na frakcji błonowej synaptoneurosomów izolowanej z mózgów dorosłych szczurów szczepu Wistar wg metody opisanej przez Wang i wsp. (1999a). Uzyskaną frakcję błon synaptosomalnych inkubowano w buforze 5 mM Tris-HCl o pH 7,4, w obecności 100 μM NMDA, 1MeTIQ w zakresie stężeń 50-750 μM oraz znakowanych ligandów, zależnie od wariantu eksperymentu: 4 nM [^3H]MK-801, 12 nM [^3H]D-seryny lub 12,5 μM [^3H]Glu. W celu określenia wiązania niespecyficznego, do części próbek dodawano nieznakowany ligand odpowiednio dla poszczególnych wariantów eksperymentu 10 μM MK-801, 10 μM D-serynę lub 1 mM Glu. Inkubację prowadzono w temperaturze 30° C przez 30 min. w łaźni wodnej z mieszaniem. Po zakończeniu inkubacji próbki filtrowano stosując Cell Harvester MPR-24 (Brandel) i filtry Whatman GF/B nasączone medium inkubacyjnym, po czym próbki łączono z mieszaniną

scyntylicyjną Bray'a. Radioaktywność próbek mierzono w liczniku scyntylicyjnym Wallac 1409 korzystając z programu pomiarowego dla trytu. Przeprowadzono 4 niezależne eksperymenty, przy liczbie punktów pomiarowych $n=8$ (\pm SD).

2.1.14. Pobieranie ^{45}Ca przez komórki ziarniste mózdku w obecności 1MeTIQ

Po usunięciu środowiska wzrostowego, komórki preinkubowano w buforze o składzie: 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 3,6 mM NaHCO_3 , 1,3 mM CaCl_2 , 5,6 mM glukoza, 10 mM HEPES o pH 7,35, przez 10 min. w 37°C . Do oceny wpływu 1MeTIQ na aktywność receptora NMDA, do hodowli neuronów podawano 500 μM 1MeTIQ oraz 5 μM glicynę na 5 min., po czym dodawano $^{45}\text{CaCl}_2$ (1 $\mu\text{Ci}/\text{dołek}$) jednocześnie z 250 μM Glu lub 250 μM NMDA. Komórki w obecności badanych substancji inkubowane były przez 10 min.. Po usunięciu środowiska radioaktywnego, neurony ziarniste przepłukiwano zimnym buforem bez glukozy oraz CaCl_2 , zawierającym 2 mM EGTA. Następnie do każdego dołka na płytce dodawano zimny roztwór 0,5 M NaOH i pozostawiano na 30 min. w 4°C . Uzyskany lizat komórkowy łączono z mieszaniną scyntylicyjną Bray'a. Pomiaru radioaktywności dokonywano za pomocą licznika scyntylicyjnego Wallac 1409. Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty, przy liczbie punktów pomiarowych $n=9$ (\pm SD).

2.1.15. Wpływ 1MeTIQ na poziom wapnia wewnątrzkomórkowego w neuronach ziarnistych mózdku szczura

Komórki inkubowano w obecności wrażliwej na wapń sondy fluorescencyjnej Calcium Orange/AM (Invitrogen, Carlsbad, CA) o stężeniu 14 μM w buforze zawierającym 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,3 mM CaCl_2 , 5,6 mM glukozę oraz 8,6 mM HEPES o pH 7,4, przez 30 min. w warunkach standardowych. Nadmiar barwnika był następnie 3-krotnie odpłukiwany powyższym buforem, po czym komórki były umieszczane w buforze i inkubowane w obecności antagonistów receptora NMDA tj. 0,5 μM MK-801 lub 1MeTIQ w trzech stężeniach 100, 250, 500 μM przez 2 min. oraz 5 μM glicyny (Wahl i wsp. 1989, Berman i wsp. 2000, warunki nieznacznie zmodyfikowano). Sygnał wapniowy generowano poprzez podanie 250 μM Glu. Zmiany fluorescencji sondy Calcium Orange, odpowiadające fluktuacjom stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia $[\text{Ca}^{2+}]_i$, rejestrowano przez 40 min. co 2 min. za pomocą czytnika FLUOstar Omega BMG LABTECH GmbH (Germany) przy

długościach fal: dla światła wzbudzającego (ex) 530 nm i dla światła emitowanego (em) 580 nm. Wynik przedstawiono w postaci procentowych zmian intensywności fluorescencji Calcium Orange po podaniu badanych substancji w stosunku do poziomu fluorescencji wyjściowej, mierzonej w tych samych komórkach przed zadziałaniem bodźca. Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty, (\pm SD).

2.1.16. Ocena wpływu 1MeTIQ na poziom produkcji wolnych rodników tlenowych

Neurony hipokampa w 8 DIV inkubowano w obecności 16 μ M DCFH-DA (6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate; Molecular Probes Inc., USA) w buforze Locke 25 przez 30 min. w warunkach standardowych wg metody opisanej przez Wang i wsp. (1999b). Nadmiar barwnika 3-krotnie odpłukiwano stosując bufor Locke 25, po czym komórki pozostawione w buforze poddawano działaniu antagonistów receptora NMDA tj. 1MeTIQ w stężeniach 100 μ M, 250 μ M oraz 500 μ M oraz 0,5 μ M MK-801 przez 2 min. w obecności 5 μ M glicyny. Następnie do hodowli dodawano 10 μ M H₂O₂ i po 5 min. mierzono poziom fluorescencji komórek przez 30 min. co 2 min. przy użyciu czytnika FLUOstar Omega BMG LABTECH GmbH (Germany). Do pomiaru zastosowano filtry: dla światła wzbudzającego (ex) 485 nm i dla światła emitowanego (em) 538 nm. Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty, (\pm SD).

2.2. Badania *in vivo*

2.2.1. Określenie potencjału neuroprotekcijnego 1MeTIQ w modelu odwracalnej ischemii przodomózgowia dorosłych myszokoczków

Badania wykonano na dorosłych myszokoczkach mongolskich potocznie zwanych gerbilami (*Meriones unguiculatus*), samcach o masie 60-80 g. Globalną ischemię mózgu indukowano jak opisano przez Duszczyk i wsp. (2006).

Zwierzęta podzielono na trzy główne grupy doświadczalne:

1. Ischemia nieleczone (testowa): zwierzęta poddane operacji zaciśnięcia tętnic szyjnych wspólnych na czas 3 min., n=10;

2. Ischemia leczona: zwierzęta operowane jak w grupie 1, otrzymywały 1MeTIQ w iniekcji dootrzewnowej 60 min. przed indukcją ischemii, n=10;
3. Grupa kontrolna (ang. *sham*): zwierzęta poddane pozorowanej operacji polegającej na wypreparowaniu tętnic szyjnych wspólnych bez ich zaciśnięcia, n=10.

Przed wykonaniem zabiegu zwierzęta poddano narkozie wziewnej halotanem w stężeniu 4 % w mieszaninie 30 % O₂ i 70 % N₂O. Dwie minuty przed operacją poziom halotanu obniżano do 2 % i utrzymywano na tym poziomie podczas przeprowadzania ischemii. Tętnice szyjne wspólne izolowano poprzez niewielkie nacięcie w linii środkowej szyi. Ischemia mózgu była indukowana poprzez zaciśnięcie obu tętnic szyjnych wspólnych na czas 3 min. za pomocą atraumatycznych klipsów (Fine Science Tools, Germany). Zwierzęta były operowane na podgrzewanym stole o temperaturze 37⁰ C. Po opatrzeniu rany, zwierzęta wracały do klatek.

Czternaście dni po ischemii myszokoczki były znieczulane letalną dawką halotanu i poddawane perfuzji dosercowej 4 % roztworem formaliny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Po wypreparowaniu mózgow, przenoszono je do 4 % roztworu formaliny na okres 1 tygodnia, po czym odwadniano we wzrastających stężeniach etanolu i umieszczano w parafinie. Mózgi krojono na kriostacie (Micron HM550). Skrawki były barwione fioletem krezyłu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Dla każdego zwierzęcia badano przynajmniej 5 fragmentów ze środkowej części obu hipokampów za pomocą mikroskopu świetlnego (Zeiss Axiovert 25) w obiektywie 40 x. Liczbę zachowanych neuronów piramidowych w sektorze CA1 liczono w dziesięciu 0.1 mm odcinkach w każdym fragmencie hipokampa. Średnią liczbę neuronów wyrażono jako procentową wartość średniej liczby neuronów w sektorze CA1 u zwierząt poddanych pozorowanej operacji (320 neuronów na 1 mm). Dalej obliczano średni ubytek neuronów piramidowych hipokampa dla każdej grupy zwierząt (Duszczyk i wsp. 2005, 2006).

2.2.2. Ocena neuroprotektynowego działania 1MeTIQ w modelu asfiksji okołoporodowej u osesków szczurzych

Hipoksję/ischemię indukowano wg zaadaptowanego do młodych zwierząt modelu Levine'a opisanego przez Rice'a i wsp. (1981) w modyfikacji Andine i wsp. (1990). Zwierzęta podzielono na następujące grupy doświadczalne:

1. Hipoksja/ischemia nieleczona: zwierzęta po operacji jednostronnego podwiązania i przecięcia tętnicy szyjnej wspólnej poddano 65 min. niedotlenieniu, n=10;
2. Hipoksja/ischemia leczona: zwierzęta poddane zabiegowi jak w grupie 1, otrzymywały dootrzewnowo mikroiniekcję 1MeTIQ (25 mg/kg lub 50 mg/kg masy ciała), podaną 30 min. 2 godz. i 4 godz. po hipoksji/ischemii, n=10;
3. Grupa kontrolna (ang. *sham*) poddana pozorowanej operacji polegającej na wypreparowaniu tętnicy szyjnej wspólnej bez jej podwiązania i bez hipoksji, n=10.

Przed przystąpieniem do wywołania hipoksji/ischemii, noworodki szczurze poddawano znieczuleniu wziewnemu halotanem w stężeniu 4 % w czasie indukcji narkozy i 1,5-2,0 % w czasie jej podtrzymywania, podawanym w mieszance gazowej O₂ z N₂O w stosunku 1:0,6. Operacja polegała na wypreparowaniu tętnicy szyjnej wspólnej, którą podwiązywano w dwóch miejscach chirurgicznymi nićmi jedwabnymi (7.0), a następnie przecinano między podwiązkami, lub tylko wypreparowano (*sham*). Po nasączeniu rany anestetykiem miejscowym (lignokainą) ranę zaszywano, a zwierzęta odstawiano do klatki z matką na okres jednej godziny. Po tym czasie zwierzęta ponownie oddzielano od matki i poddawano hipoksji przez 65 min. w termostатовanej kamerze (35-36⁰ C) ze stałym przepływem (3 l/min) mieszanki gazowej zawierającej 7,2 % O₂ w N₂, nawilżanej przez przedmuchiwanie przez płuczkę z wodą destylowaną. Następnie zwierzęta umieszczano w klatce z matką.

Dwa tygodnie po hipoksji/ischemii zwierzęta usypiano letalną dawką vetbutalu, dekapitowano, a wypreparowywane mózgi przecinano wzdłuż szczeliny podłużnej mózgu (*fissura longitudinalis*) i każdą z półkul ważono z dokładnością do 0,1 mg. Uszkodzenie mózgowia po przebytej hipoksji/ischemii wyrażano jako procentowy deficyt masy półkuli po stronie operowanej w stosunku do półkuli kontrolnej.

3. Wyniki

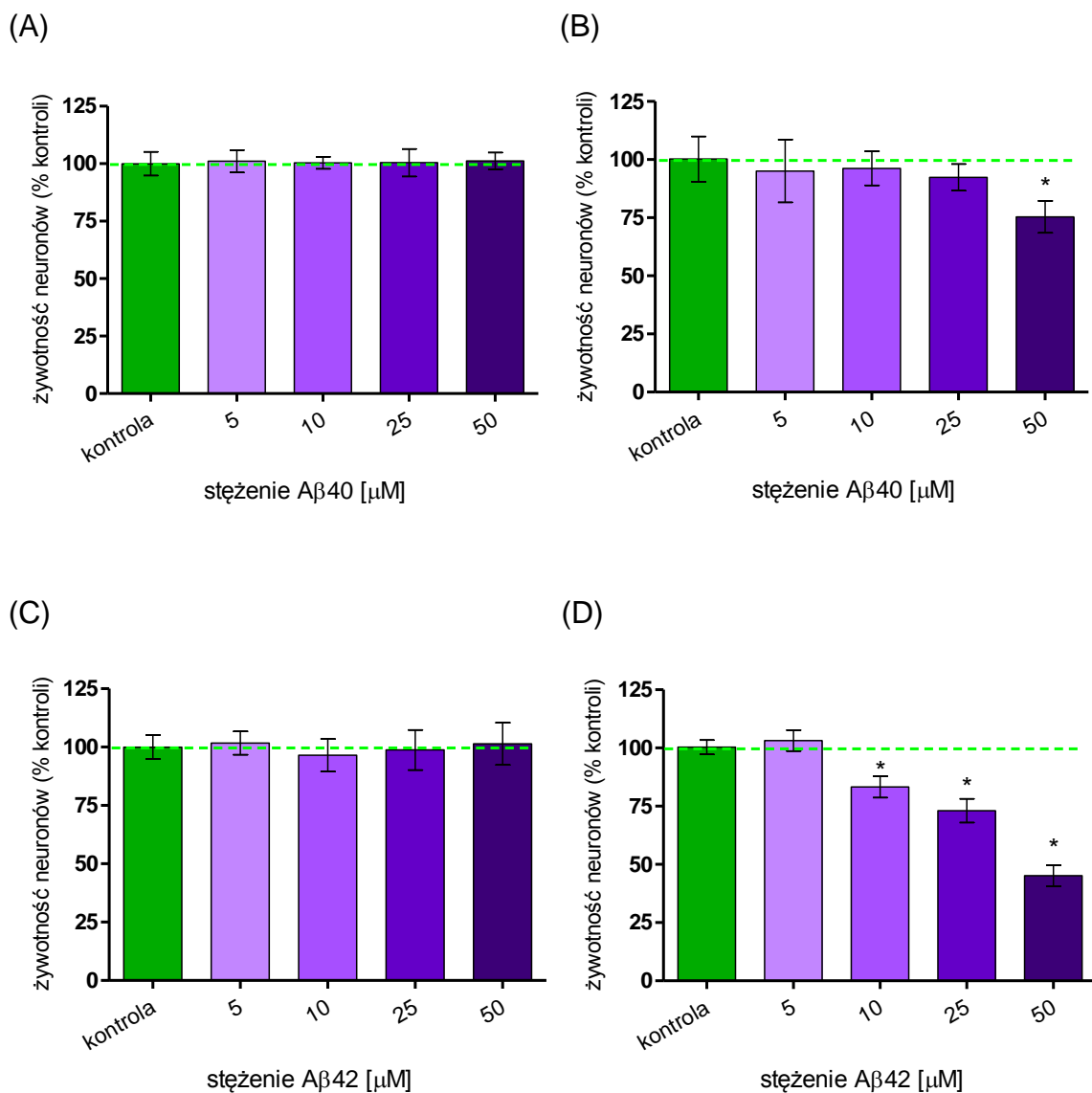
3.1. Wpływ A β 12-28P na toksyczność A β w hodowlach pierwotnych neuronów

Wczesne zaburzenia przekazywania w synapsach glutaminianergicznym oraz obniżenie funkcji poznawczych należą do grupy zjawisk scharakteryzowanych w wielu modelach doświadczalnych AD (Ashe i Zahs 2010), którym towarzyszy odkładanie się A β w komórkach nerwowych. Odkąd jeden z głównych, uznanych przez wielu badaczy, mechanizmów wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β uwzględnia udział receptorów LRP w tym procesie (Oddo i wsp. 2003, Shankar i wsp. 2009), rola apo E w wychwycie oraz odkładaniu się A β w neuronach wydaje się być kluczowa. Stąd też, pomimo istotnych funkcji biologicznych, jakie apo E pełni w OUN, cząsteczka ta zaliczana jest do grupy czynników nasilających procesy neurodegeneracyjne przyspieszające rozwój AD. Na podstawie obserwacji przeprowadzonych przez Ma i wsp. (1996) wiadomo, iż miejscem wiązania apo E do sekwencji A β jest motyw 12-28, co sugeruje, iż ten fragment peptydu odpowiada za tworzenie kompleksów A β /apo E. Na tej podstawie można przypuszczać, iż związki hamujące interakcję pomiędzy A β a apo E mogą zapobiegać zaburzeniom neurotransmisji synaptycznej towarzyszącym wczesnym stadium choroby, a tym samym być rozpatrywane jako potencjalne terapeutyki w leczeniu AD.

3.1.1. Ocena neurotoksyczności A β w pierwotnej hodowli neuronów hipokampa myszy

Na podstawie danych z literatury opisujących ekspresję poszczególnych podjednostek receptora NMDA w hodowli neuronów hipokampa w zależności od stopnia ich zróżnicowania (Luo i wsp. 2002), do swoich badań wybrałam 15-dniowe, dojrzałe hodowle neuronów hipokampa, charakteryzujących się wysoką ekspresją funkcjonalnych receptorów NMDA na powierzchni komórek. Przed przystąpieniem do badań dotyczących roli apo E w zjawiskach toksyczności A β , niezbędne było wyznaczenie odpowiedniego stężenia A β dodanego do środowiska wzrostowego, przy którym po pobraniu peptydu przez neurony, doszłoby do upośledzenia zdolności jego wewnątrzkomórkowej degradacji, a w efekcie odkładania się A β w przedziałach wewnątrzkomórkowych, bez wywołania śmierci komórek. W tym celu, dojrzałe

hodowle neuronów hipokampa poddane były działaniu różnych stężeń monomerycznego A β 40 lub A β 42 przez okres 24 godz. bądź 72 godz.. Jak wykazano, niskocząsteczkowy A β jest sprawnie wychwytywany przez neurony, podczas gdy A β w postaci zagregowanej ma tendencję do zalegania na powierzchni komórkowej, lokalizując się przede wszystkim w okolicy synaps glutaminianergicznych (Gylis i wsp. 2003). Stąd, w moich badaniach wykorzystałam A β , który w pierwszej kolejności został rozpuszczony w HFIP w celu uzyskania frakcji monomerycznej, a następnie poddany liofilizacji. Wyniki przedstawione na Ryc. 1 pokazują, iż trwająca 24 godz. ekspozycja hodowli neuronalnych na działanie A β 40 nie wpływała na żywotność komórek, a znamienny spadek przeżywalności neuronów zaznaczał się dopiero po podaniu do hodowli wysokich stężeń A β 40 (50 μ M) na okres 72 godz.. Efekt neurotoksyczny nie był obserwowany również w przypadku A β 42, gdy neurony hipokampa poddane były przez okres 24 godz. działaniu niskich stężeń tego peptydu. Wydłużenie czasu inkubacji do 72 godz. silnie potęgowało spadek żywotności neuronów w hodowli, przy czym efekt neurotoksyczny A β 42 był szczególnie widoczny w przypadku stężeń przekraczających 10 μ M.

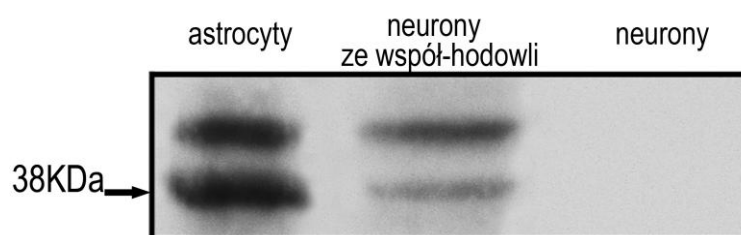


Ryc. 1. Wpływ Aβ na przeżywalność hodowli pierwotnej neuronów hipokampa. Inkubacja neuronów z monomerycznym Aβ40 (A,B) lub Aβ42 (C,D) w zakresie stężeń (5-50 μM) prowadzona była przez 24 godz. (A,C) lub 72 godz. (B,D). Ocena przeżywalności komórek była dokonana przy użyciu testu MTT. Wykresy przedstawiają wartości średnie ± SD; ANOVA z testem post-hoc Dunnett'a. (D) * p<0,001 w stosunku do kontroli.

3.1.2. Astrocyty jako źródło lipidowanej postaci apo E

Badania poświęcone określeniu roli apo E w wewnątrzkomórkowym odkładaniu się Aβ w neuronach wymagały potwierdzenia własności astrocytów jako komórek będących źródłem lipidowanej apo E. W tym celu oznaczyłam immunoreaktywność apo E z użyciem specyficznego przeciwciała w lizatach czystej hodowli komórek nerwowych, neuronów hipokampa hodowanych w obecności

astrocytów oraz hodowli astrocytów. Wyniki (Ryc. 2) pokazują wysoki poziom apo E w lizatach astrocytów potwierdzając zdolność tych komórek do produkcji apo E. Brak detekcji tej glikoproteiny w lizatach komórek nerwowych, przy jednoczesnej znaczącej immunoreaktywności apo E w lizatach neuronów hipokampa pochodzących ze współ-hodowli, świadczy o tym, iż obecność apo E w neuronach jest determinowana przede wszystkim pobieraniem z przestrzeni zewnątrzkomórkowej apo E produkowanej przez astrocyty.

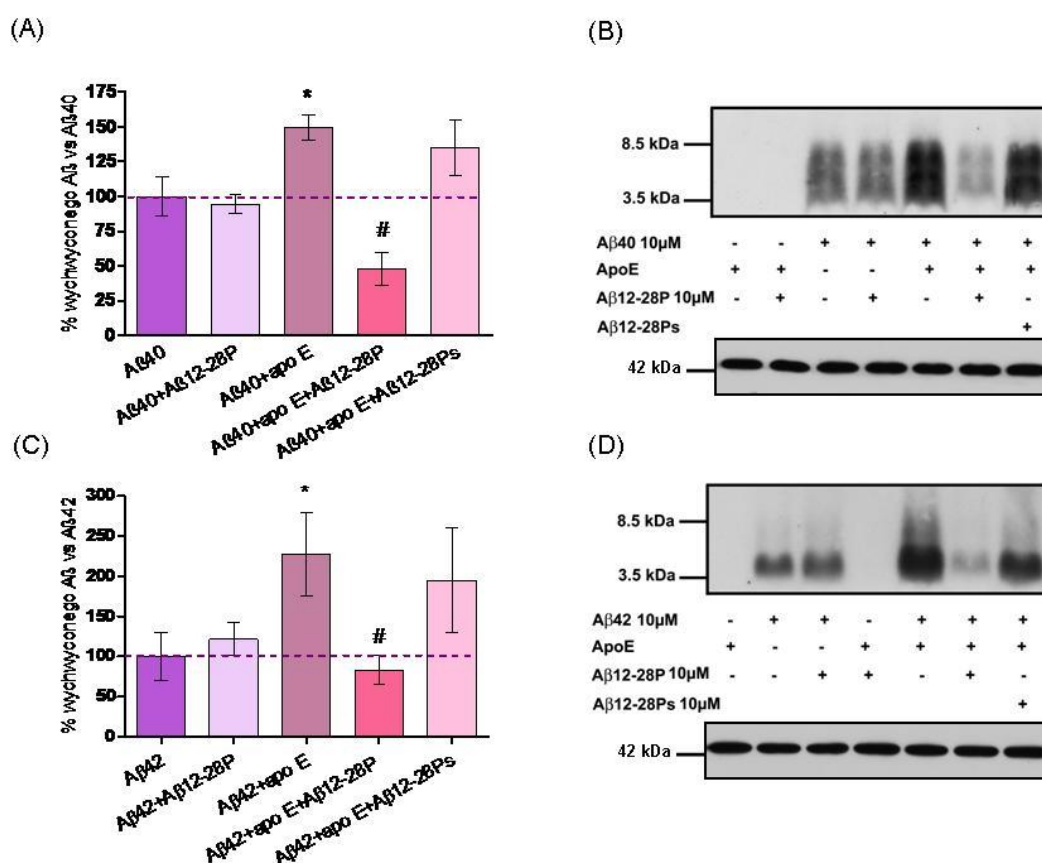


Ryc. 2. Oznaczenie poziomu apo E w różnych typach hodowli. Ocena poziomu ekspresji apo E przeprowadzona została w próbkach uzyskanych z neuronów hipokampa hodowanych w obecności lub pod nieobecność astrocytów oraz w lizacie z hodowli astrocytów (A). Rycina przedstawia przykładowy wynik badania Western blot.

3.1.3. Wychwyty oraz odkładanie się A β 40 i A β 42 w neuronach we współ-hodowli neuronalno-astrocytarnej: wpływ A β 12-28P

Badania z wykorzystaniem współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych, które stanowią model doświadczalny najlepiej odzwierciedlający fizyczną interakcję pomiędzy A β i apo E, miały na celu określenie wpływu apo E na wychwyty oraz wewnątrzkomórkowe nagromadzenie się peptydów A β 40 oraz A β 42, jak również sprawdzenie, czy związki zapobiegające interakcji pomiędzy A β i apo E znoszą cytotoksyczne działanie A β nagromadzonego w przedziałach wewnątrzkomórkowych. Na podstawie przedstawionych powyżej wyników badań dotyczących neurotoksycznego działania A β , do tego cyklu eksperymentów wybrałam 24 godz. inkubację czystych hodowli neuronów oraz współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych w obecności dwóch izoform A β , A β 40 oraz A β 42, w stężeniach 10 μ M. Jak przedstawiono na Ryc. 3, podanie A β do neuronów hipokampa hodowanych w obecności astrocytów, co zapewniało produkcję apo E, prowadziło do wzrostu zawartości A β 40 we frakcji cytozolowej o 50,8 % (A,B) zaś

A β 42 o 127,1 % (C,D). Wzrost wyrażono względem kontroli, jaką był poziom A β oznaczony w materiale pochodzącym z czystych hodowli neuronów. Eksperymenty z zastosowaniem A β 12-28P, antagonisty wiązania A β /apo E pokazały, iż hamowanie interakcji pomiędzy A β i apo E obniża wewnątrzkomórkowy poziom A β 40 o 102,5 %, a A β 42 o 144,5 %. Podanie A β 12-28P wraz z A β do czystej hodowli neuronów nie miało wpływu na wychwyt A β przez komórki, co świadczy o specyficznym działaniu tego peptydu na tworzenie kompleksów A β /apo E.

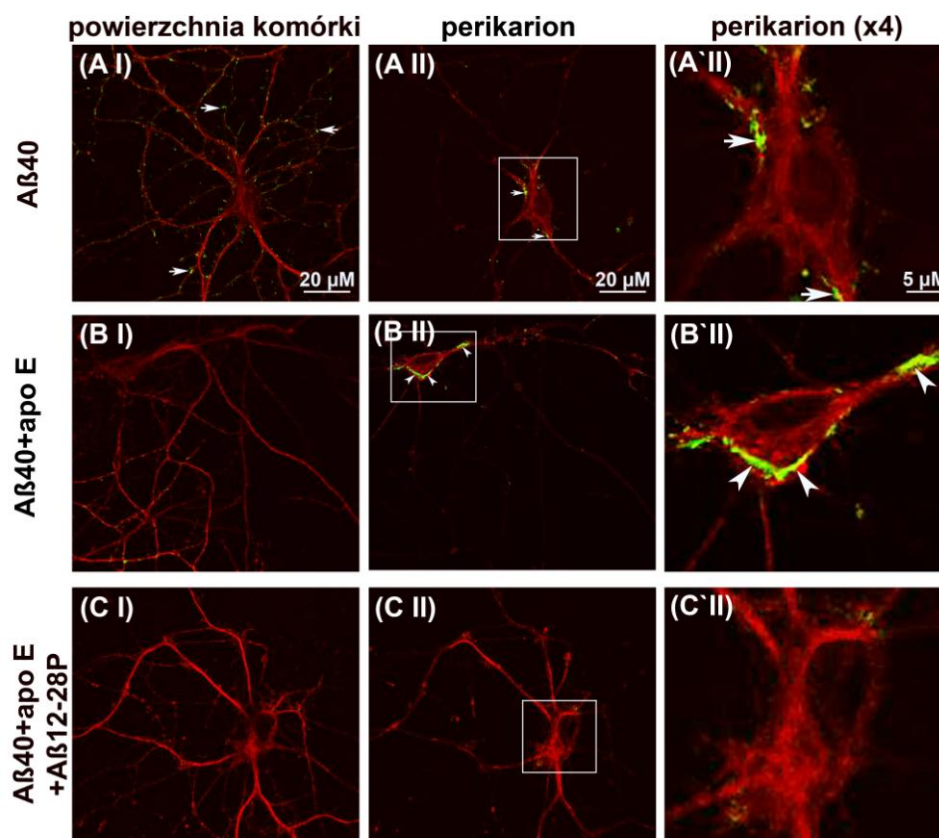


Ryc. 3. Wychwyt oraz wewnątrzkomórkowe odkładanie się peptydów A β i jego hamowanie przez blokowanie interakcji A β /apo E. Hodowle pierwotne neuronów hipokampa oraz współhodowle neuronalno-astrocytarne poddane były ekspozycji na działanie monomerycznych form A β 40 (A,B) lub A β 42 (C,D). Poziom A β w lizatach komórkowych zebranych po 24 godz. od podania A β 40 oraz A β 42 oznaczony był poprzez analizę densytometryczną uzyskanych wyników metodą Western blot (przykładowe bloty – B,D); β -aktyna (42 kDa). Wykresy (A,C) przedstawiają wartości średnie \pm SD; ANOVA z testem post-hoc Dunnett'a. * $p < 0,001$ w stosunku do A β 40/42; # $p < 0,001$ w stosunku do A β 40/42+apo E.

Podanie do współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych A β 12-28_(s), stanowiącego sekwencję A β 12-28P o losowo przestawionym układzie aminokwasów, nie wpływało na poziom A β w neuronach.

3.1.4. Potwierdzenie wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się $A\beta_{40}$ w hodowli neuronów hipokampa: rola apo E i wpływ $A\beta_{12-28P}$

Wiadomo, że internalizacja $A\beta$ jest poprzedzona związaniem się peptydów z powierzchnią błony komórkowej. Interakcja ta warunkuje pojawienie się sygnału do rozpoczęcia procesu endocytozy. Podany $A\beta$ tworzy dwie pule peptydów: powierzchniową oraz wewnątrzkomórkową. Z uwagi na możliwość pojawienia się wątpliwości dotyczących oznaczeń wewnątrzkomórkowego poziomu $A\beta$ uzyskanych metodą Western blot, dla odróżnienia puli $A\beta$ związanej z błoną plazmatyczną od nagromadzonej wewnątrz neuronów, przeprowadziłam dodatkową weryfikację przedstawionych powyżej wyników posługując się technikami fluorescencyjnymi i immunocytochemii oraz mikroskopii konfokalnej. Wykorzystanie $A\beta$ znakowanego fluorescencyjnie FITC pozwoliło na precyzyjne ustalenie lokalizacji $A\beta$ z podziałem na pulę związaną z błoną komórkową (powierzchniową) oraz wewnątrzkomórkową w neuronach MAP2-pozytywnych. Jak przedstawiono na Ryc. 4, jedynie niewielka pula $A\beta$ podanego do czystej hodowli neuronów hipokampa uległa wychwytowi i nagromadzeniu wewnątrz komórek (A III), podczas gdy znaczna ilość peptydu pozostała związana z błoną komórkową, osadzając się na powierzchni neurytów (A I). Natomiast w przypadku neuronów rosnących w obecności astrocytów, a więc z zapewnionym dostępem do apo E, obserwowałam słabą fluorescencję $A\beta$ na powierzchni komórki (B I), zaś silny sygnał FITC- $A\beta$ odnotowałam wewnątrz perikarionu (B III). Inkubacja współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych z $A\beta_{12-28P}$ doprowadziła do znaczącego obniżenia poziomu $A\beta$ wewnątrz komórek nerwowych (C III).

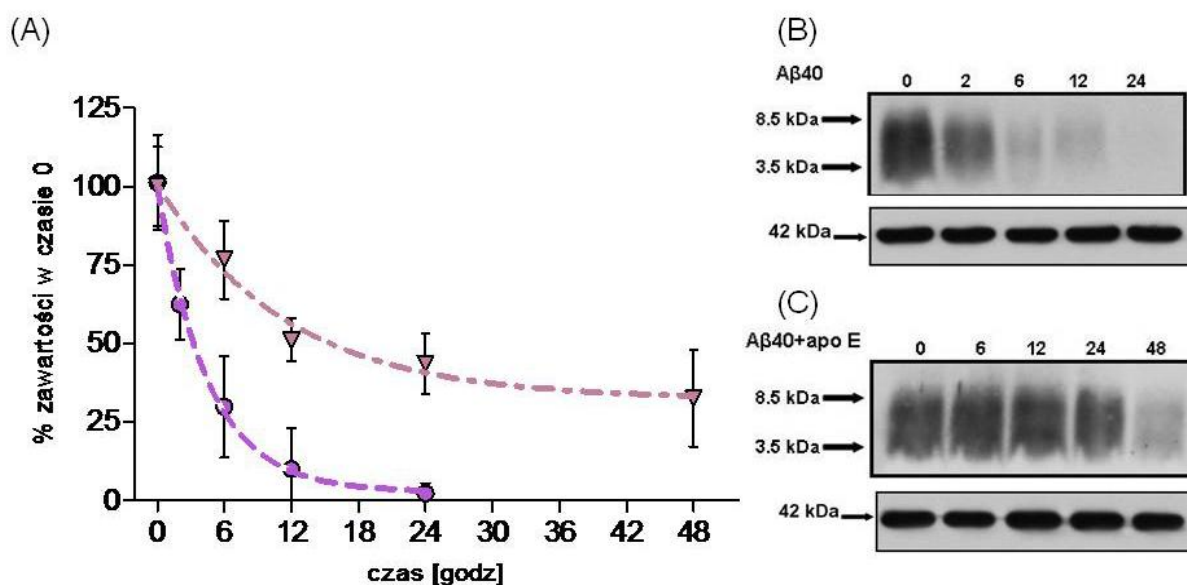


Ryc. 4. Wpływ apo E na wychyt oraz wewnątrzkomórkowe odkładanie się FITC-A β w neuronach hipokampa: hamowanie przez A β 12-28P. A β 40 znakowany domieszką FITC podany był do współ-hodowli neuronalno-astrocytarnej na 72 godz. W 18 DIV, preparaty wybarwione MAP2 (na kolor czerwony) zostały poddane analizie w mikroskopie konfokalnym. Panel przedstawia skan preparatu o grubości 1 μ m. Strzałki wskazują lokalizację A β -FITC (kolor zielony) w obrębie neuronu.

3.1.5. *Udział apo E w procesach wewnątrzkomórkowej degradacji i agregacji A β*

Dotychczasowe wyniki moich badań wskazujące na istotny udział apo E w procesach pobierania oraz wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się peptydów A β stały się punktem wyjścia do rozważenia roli apo E w wewnątrzneuronalnej agregacji A β . Zagadnienie to jest słabo poznane. W pierwszej kolejności przeprowadziłam serię eksperymentów, których założeniem była próba wyjaśnienia dalszych losów A β nagromadzonego w neuronach w obecności apo E. W tym celu hodowle neuronów hipokampa oraz współ-hodowle neuronalno-astrocytarne zostały poddane 6-godzinnej ekspozycji na działanie A β 40, po czym oznaczyłam poziom A β w lizatach komórkowych w różnych punktach czasowych po usunięciu A β ze środowiska hodowlanego. Badanie immunochemiczne frakcji cytozolowej uzyskanej z czystej

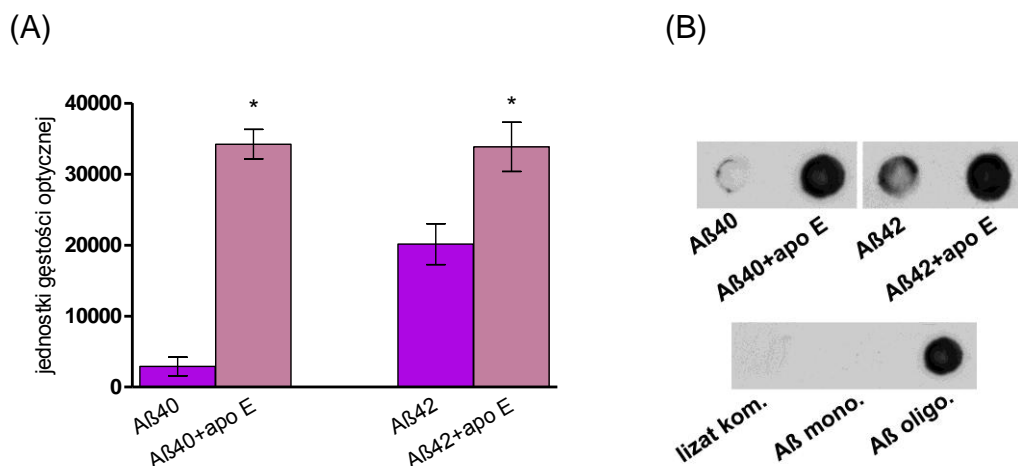
hodowli neuronów pozwoliło zaobserwować szybko postępujący spadek zawartości A β w badanym materiale (Ryc. 5 B), a oznaczony okres półtrwania A β wynosił $t_{1/2}=3,2$ godz. (Ryc. 5 A). Natomiast analiza próbek lizatów komórek nerwowych pochodzących ze współ-hodowli wykazała długo utrzymujący się wysoki poziom A β w neuronach, obecność A β w lizatach komórkowych była wykrywalna nawet po 48 godz. (Ryc. 5 C). To przemawia za zachodzącym w obecności apo E istotnym zaburzeniem funkcji neuronów, jaką jest fizjologiczna degradacja białka amyloidowego.



Ryc. 5. Ocena zdolności neuronów hipokampa do wewnątrzkomórkowej degradacji A β w obecności apo E. Do oznaczenia poziomu A β 40 oraz A β 42 w lizatach komórkowych z hodowli neuronów oraz współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych posłużyły próbki materiału zebranego kolejno w przedziale czasowym 0-48 godz., gdzie za czas 0 przyjęto zmianę środowiska inkubacyjnego na podłoże hodowlane pozbawione A β . Lizaty komórek nerwowych były analizowane metodą Western blot (B,C); β -aktyna (42 kDa). Wykres (A) przedstawia wyniki analizy densytometrycznej; wartości średnie \pm SD.

Przedstawione powyżej wyniki świadczące o obniżeniu w obecności apo E zdolności neuronów do degradacji A β skłoniły mnie do zbadania wpływu apo E na stan agregacji A β nagromadzanego w neuronach hipokampa. Lizaty komórkowe z hodowli neuronów i współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych poddane były badaniu na obecność form oligomerycznych A β . Zaobserwowałam niewielką zawartość oligomerów A β 40 oraz stosunkowo wysoki poziom oligomerów A β 42 w czystych hodowlach neuronów (Ryc. 6 A,B). We frakcji cytozolowej neuronów hipokampa

hodowanych w obecności astrocytów, zawartość form oligomerycznych zarówno dla A β 40 jak i A β 42 była znacząco zwiększona, przy czym nie obserwowałam istotnych różnic w poziomie oligomerów A β pomiędzy obiema formami tego peptydu (Ryc. 6 A,B).

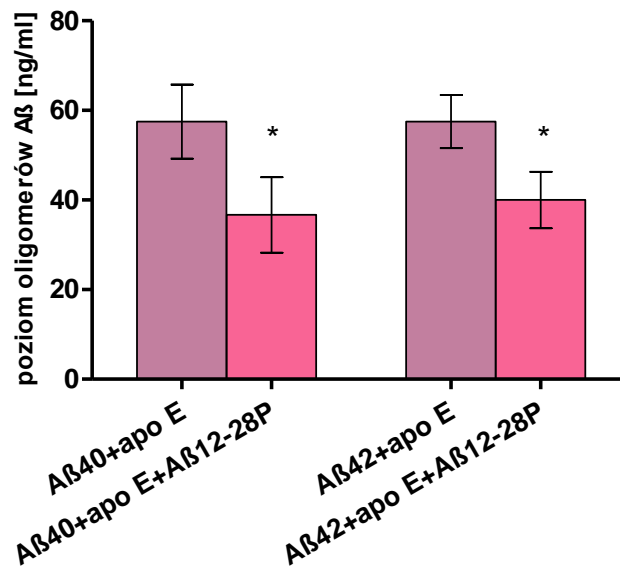


Ryc. 6. Tworzenie form oligomerycznych A β w neuronach w zależności od dostępności apo E i zwiększonego wychwytu peptydu przez komórki nerwowe. Hodowle neuronów oraz współ-hodowle neuronalno-astrocytarne poddane były działaniu monomerycznego A β 40 lub A β 42 przez 24 godz. (A), po czym przeprowadzono analizę frakcji cytozolowej na obecność oligomerów A β wykorzystując metodę Dot blot z użyciem specyficznego przeciwciała A11 (B). Kontrolę ujemną (A β mono.) stanowił syntetyczny zmonomeryzowany A β 42. Kontrolę pozytywną (A β oligo.) stanowił syntetyczny oligomeryczny A β 42. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD; ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. * $p < 0,001$ w stosunku do A β 40/42.

3.1.6. Zapobieganie przez A β 12-28P wewnątrzkomórkowej agregacji peptydów A β

W oparciu o omówione powyżej wyniki wskazujące na istotne obniżenie pobierania oraz odkładania się peptydów A β w neuronach we współ-hodowli neuronalno-astrocytarnej po zastosowaniu A β 12-28P (Ryc. 3), jak również kierując się obserwowanym przeze mnie nasileniem procesu oligomeryzacji A β w obecności apo E (Ryc. 6), zbadałam wpływ A β 12-28P na poziom oligomerów w neuronach hipokampa. Zgodnie z prezentowanymi powyżej wynikami, badania przy wykorzystaniu testu ELISA potwierdziły brak różnic w wewnątrzkomórkowej zawartości form oligomerycznych pomiędzy A β 40 a A β 42, która wyniosła odpowiednio 57,5 ng/ml oraz 57 ng/ml (Ryc. 7). Zaobserwowałam natomiast znaczące obniżenie poziomu oligomerów w neuronach po podaniu do hodowli neuronalno-astrocytarnych A β 12-28P. W tym wypadku zawartość form

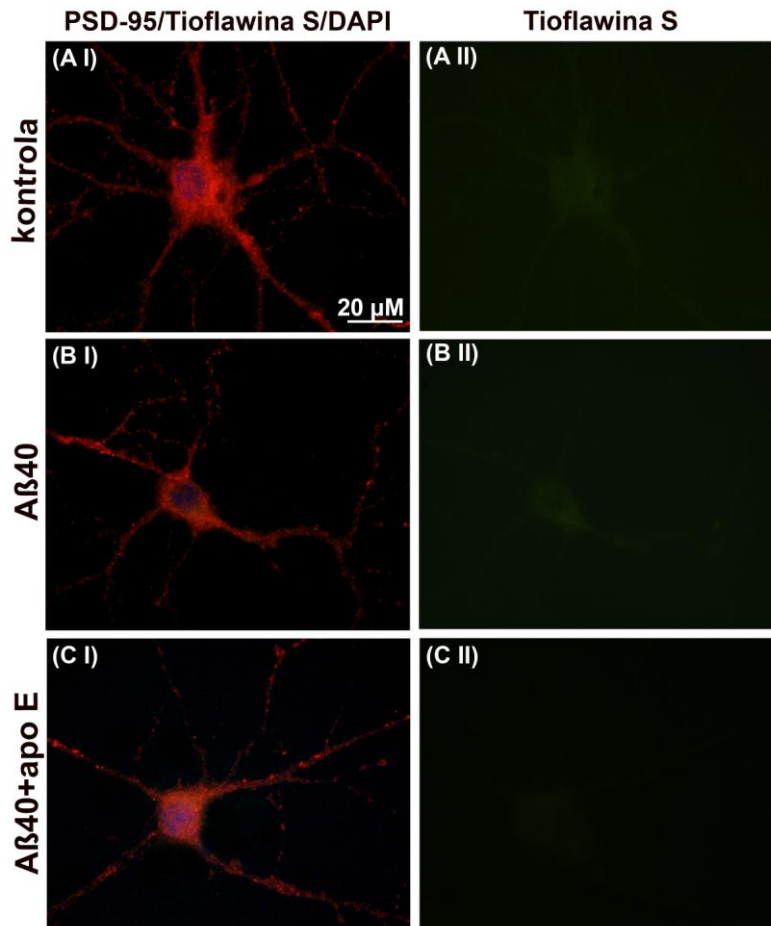
oligomerycznych w neuronach inkubowanych z A β 40 wynosiła 30.0 ng/ml, zaś z A β 42 wyniosła 40 ng/ml.



Ryc. 7. Wpływ A β 12-28P na oligomeryzację A β w neuronach. Współ-hodowle neuronalno-astrocytarne prowadzone były w obecności monomerycznego A β 40 lub A β 42. Do hodowli podawano także A β 12-28P. Po 24 godz. inkubacji neuronów z badanymi substancjami, przeprowadzono analizę materiału stosując test ELISA przeznaczony do oszacowania poziomu oligomerów w lizatach komórkowych. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SEM; ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. * $p < 0,05$ w stosunku do A β 40+apo E lub A β 42+apo E.

3.1.7. Ocena stopnia fibrylizacji wewnątrzneuronalnych agregatów A β

Uzyskane wyniki badań, wskazujące na silny wzrost immunoreakcji z przeciwciałem znakującym formy oligomeryczne A β w lizatach neuronów uzyskanych ze współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych, nasunęły pytanie czy A β nagromadzany w komórkach nerwowych w następstwie jego wychwytu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej może ulegać kolejnemu po oligomeryzacji etapowi agregacji jakim jest tworzenie struktur fibrylarnych, znajdujących m.in. w płytkach starczych. W wyniku analizy immunocytochemicznej uzyskałam negatywną reakcję na obecność form fibrylarnych A β w agregatach wewnątrzkomórkowych (Ryc. 8).

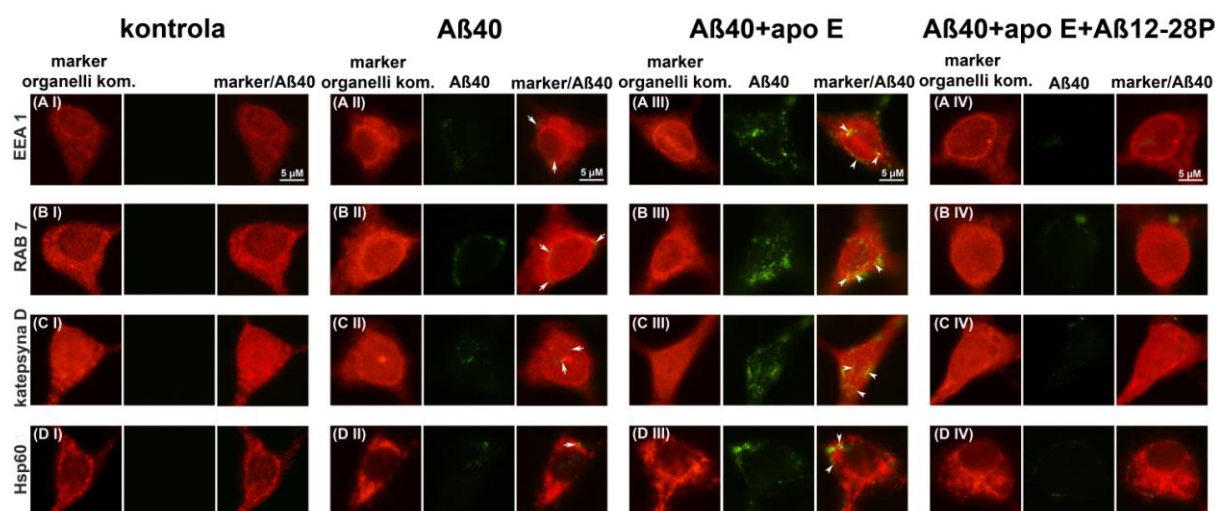


Ryc. 8. Wpływ wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β na fibrylogenezę. Ocena preparatów hodowli neuronalnych oraz współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych na obecność struktur fibrylarnych została wykonana po 72 godz. inkubacji komórek z monomerycznym A β 40 na podstawie barwienia tioflawiną S (kolor zielony). Do analizy wykorzystano neurony PSD-95-pozytywne (kolor czerwony).

3.1.8. Wpływ apo E na rozmieszczenie peptydów A β w obrębie neuronu

Jak pokazują zaprezentowane wyniki badań, w warunkach zapewniających dostępność apo E, podwyższonemu stężeniu A β w przestrzeni zewnątrzkomórkowej towarzyszy sprawny wychwyt oraz wewnątrzkomórkowe nagromadzenie się i agregacja peptydów A β w formy oligomeryczne. Bazując na powszechnie uznanym twierdzeniu, iż pobieranie A β z przestrzeni zewnątrzkomórkowej zachodzi przede wszystkim na drodze endocytozy, a głównymi strukturami odpowiedzialnymi za patologiczne nagromadzenie się A β są endosomy oraz lizosomy, dokładniej zbadałam lokalizację A β w obrębie neuronu oraz wpływ A β 12-28P na zmiany w dystrybucji A β w przedziałach wewnątrzkomórkowych. Zaobserwowałam, iż zwiększonemu wychwyty A β przez neurony hipokampa indukowanemu

tworzeniem kompleksów z apo E towarzyszy wyraźny wzrost zawartości peptydów A β w późnych endosomach (B III) oraz lizosomach (C III), jak również nieznaczne podwyższenie ilości A β we wczesnych endosomach (A III) oraz mitochondriach (D III). Ponadto, wyniki pokazują znaczące obniżenie poziomu A β po zastosowaniu A β 12-28P we wszystkich czterech typach organelli komórkowych (A-D IV), potwierdzając unikalne właściwości A β 12-28P jako blokera wychwytu oraz zalegania peptydów A β wewnątrz neuronów. Pomimo wyraźnych różnic w wewnątrzkomórkowej lokalizacji A β w poszczególnych wariantach eksperymentu, znaczna pula tego peptydu nie wykazywała współ-lokalizacji z żadnym z badanych znaczników organelli komórkowych, co może oznaczać, iż A β oprócz odkładania się w strukturach ścieżki endosomalno/lizosomalnej gromadzi się również w cytoplazmie.



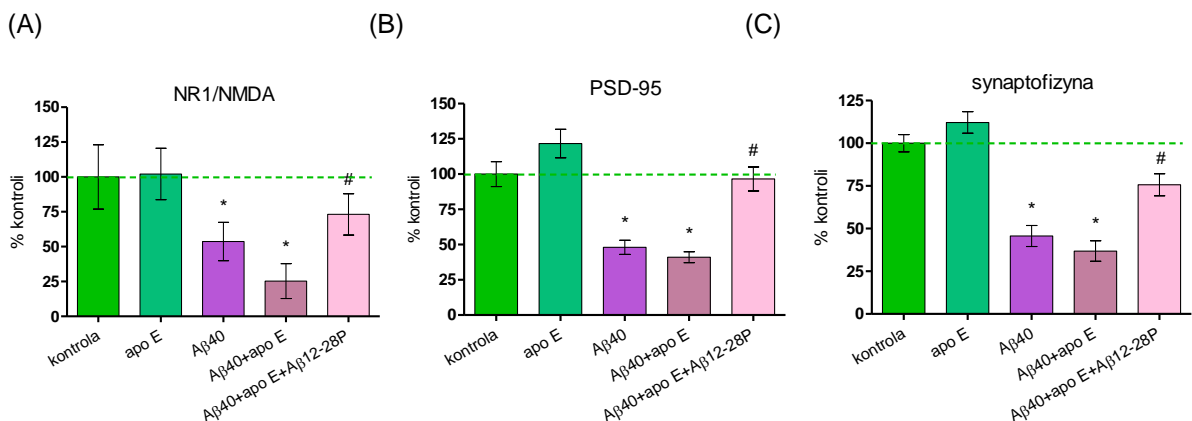
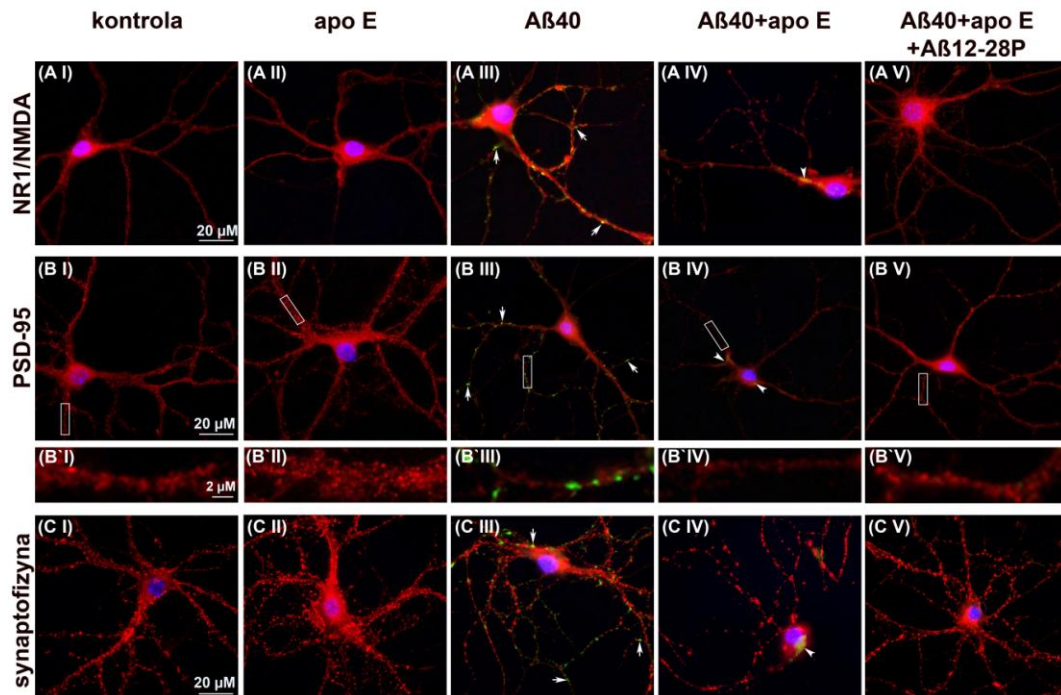
Ryc. 9. Udział szlaku endosomalno/lizosomalnego w transporcie oraz wewnątrzkomórkowej lokalizacji A β . Hodowle neuronów hipokampa oraz współ-hodowle neuronalno-astrocytarne inkubowane były przez 72 godz. w obecności monomerów FITC-A β 40 (kolor zielony). Po inkubacji, preparaty zostały wybarwione z użyciem przeciwciał znakujących wczesne endosomy (EEA1), późne endosomy (RAB7), lizosomy (katepsyna D) oraz mitochondria (Hsp60) (kolor czerwony dla wszystkich markerów). Strzałki wskazują współ-lokalizację FITC-A β z poszczególnymi markerami struktur komórkowych w obrębie periakryonu.

3.1.9. Wpływ toksyczny A β na synapsy glutaminianergiczne i jego modulacja przez A β 12-28P

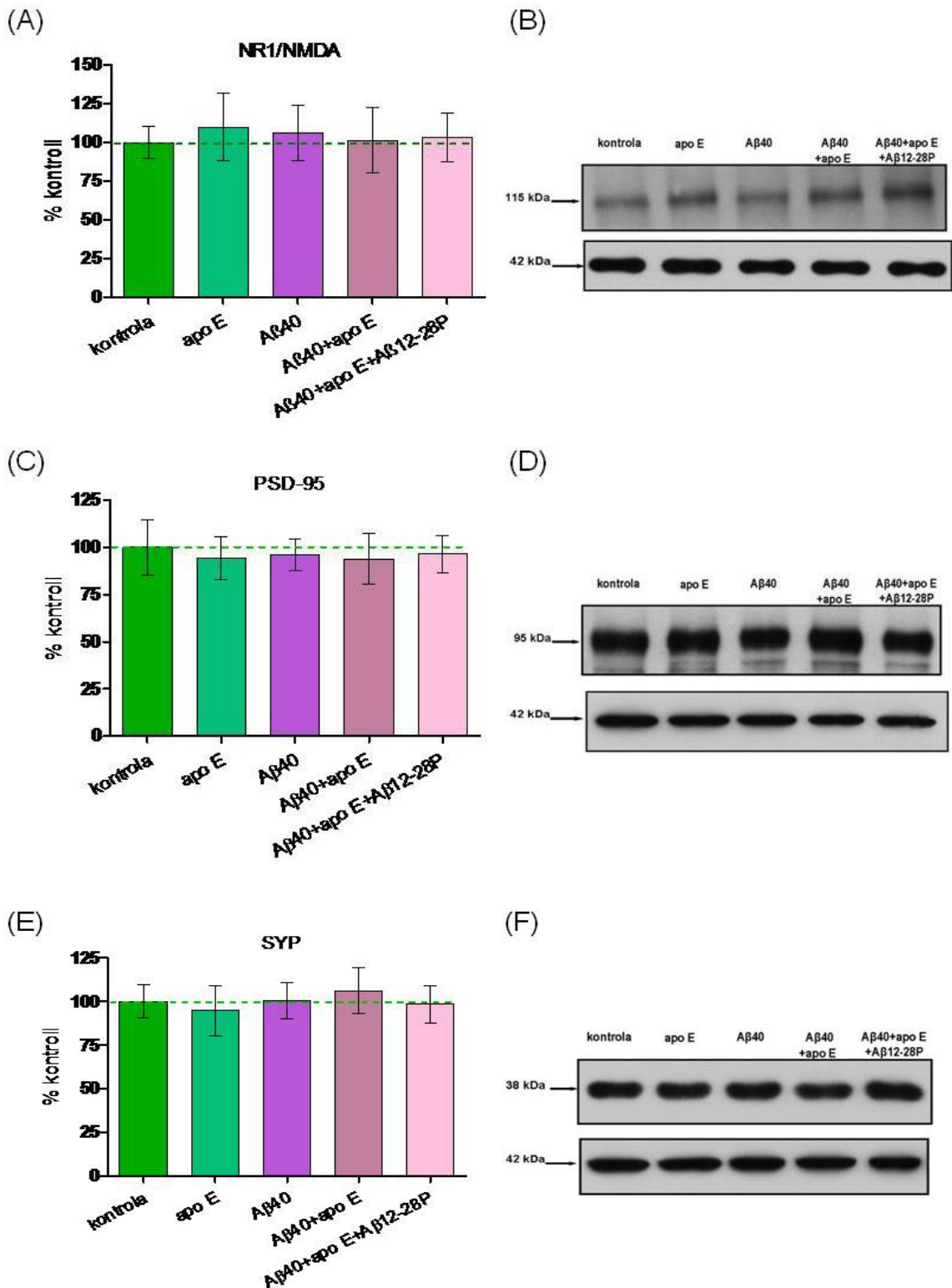
Jednym z głównych zagadnień badanych w tej rozprawie była ocena wpływu wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β na indukcję zmian patologicznych w neuronach towarzyszących AD. Patogeneza AD jest w znacznym stopniu związana z postępującą degeneracją synaps, która zachodzi na wczesnym etapie choroby.

Odnosząc się do tego zagadnienia, zbadalam wpływ wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β pobudzanego w obecności apo E na wzór ekspresji powierzchniowych markerów neuronalnych, takich jak lokalizacja podjednostki NR1 receptora NMDA, PSD-95 - białka strukturalnie i funkcjonalnie związanego z receptorami NMDA oraz synaptofizyny- białka synaps.

Aby ocenić wpływ A β na poziom ekspresji białek synaptycznych, wykorzystałam monomeryczny A β 40, gdyż jak wykazano, rozpuszczalna forma A β 40 w większym stopniu związana jest ze zmianami zachodzącymi w obrębie synaps niż A β 42 (Lue i wsp. 1999). Ponadto do użycia A β 40 skłoniły mnie wyniki poprzednich badań, które pokazały istotny spadek przeżywalności neuronów hipokampa po 72-godzinnej inkubacji komórek z A β 42 (Ryc. 1). Moim założeniem była obserwacja zmian towarzyszących początkowej fazie toksyczności A β , nie zaś końcowym stadiom procesu neurodegeneracyjnego, w których ma miejsce zaawansowana dystrofia neurytów. Ryc. 10 przedstawia zmiany ekspresji trzech markerów synaps glutaminianergicznych tj. NR1/NMDA, PSD-95 oraz synaptofizyny wywołane inkubacją z A β 40, jak również efekt jednoczesnego podania A β 40 oraz A β 12-28P do współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych. Zaobserwowałam obniżenie immunoreaktywności białek postsynaptycznych na powierzchni neurytów po inkubacji czystej hodowli neuronalnej z A β 40, do 53,7 % dla NR1/NMDA (A III, wykres A), 48 % dla PSD-95 (B III, wykres B) oraz 45,6 % dla synaptofizyny (C III, wykres C). Podanie A β 40 do współ-hodowli neuronalno-astrocytarnej prowadziło do dalszego spadku poziomu białek synaptycznych do 24,2 % dla NR1/NMDA (A IV, wykres A), 19,6 % dla PSD-95 (B IV, wykres B) oraz 24,7 % dla synaptofizyny (C IV, wykres C), co związane było ze wzrostem detekcji A β wewnątrz neuronów hipokampa. Blokowanie interakcji pomiędzy A β oraz apo E poprzez zastosowanie A β 12-28P skutecznie zapobiegało degeneracji synaps indukowanej A β , przywracając ekspresję NR1/NMDA do 73 % (A V, wykres A), PSD-95 do 79,3 % (B V, wykres B) zaś synaptofizyny do 67,6 % (C V, wykres C), czemu towarzyszyło znaczące obniżenie puli A β nagromadzonego w komórkach. Analiza preparatów komórek nerwowych uzyskanych ze współ-hodowli nie traktowanych A β , nie wykazała znaczących zmian immunoreaktywności żadnego z badanych markerów synaptycznych.



Ryc. 10. Wpływ A β 12-28P na spadek ekspresji powierzchniowych białek synaptycznych wywołany A β . Wzór powierzchniowych markerów neuronalnych określono na podstawie barwienia z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał znakujących NR1/NMDA (A I-V), PSD-95 (B I-V) oraz synaptofizynę (C I-V) (kolor czerwony dla wszystkich markerów). Analizę preparatów uzyskanych po 72 godz. ekspozycji czystych hodowli neuronów bądź współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych na działanie monomerycznego FITC-A β 40 (kolor zielony) wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Wykresy (A,B,C) przedstawiają wyniki pomiaru immunoreaktywności poszczególnych markerów synaptycznych. Kontrole stanowiły czyste hodowle neuronów hipokampa lub współ-hodowle neuronalno-astrocytarne nie traktowane A β . Strzałki wskazują lokalizację powierzchniowej oraz wewnątrzkomórkowej puli FITC-A β . Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD; ANOVA z testem post-hoc Tukey`a. * $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, # $p < 0,001$ w stosunku do A β 40+apoE.

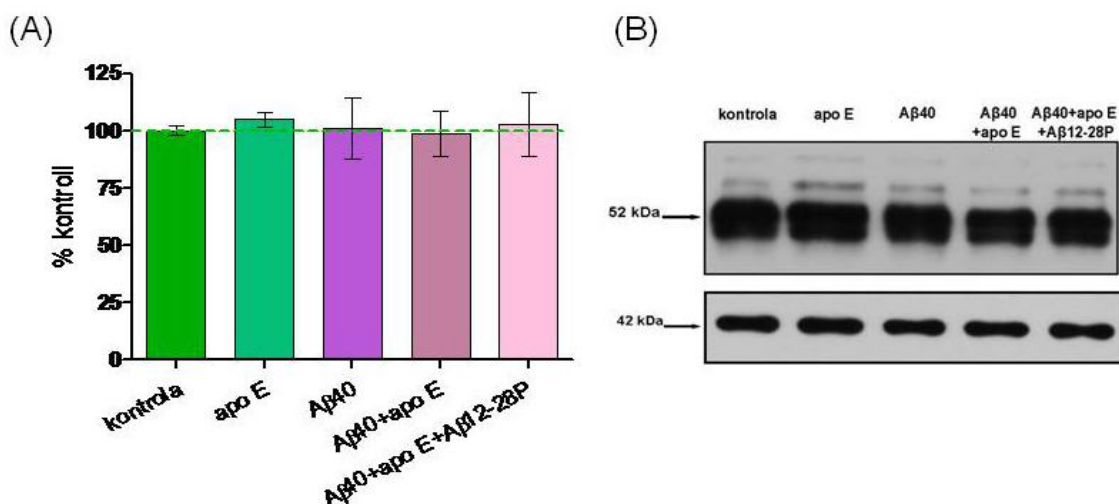


Ryc. 11. Wpływ Aβ40 na całkowity poziom białek synaptycznych w hodowli pierwotnej neuronów hipokampa. Analiza materiału uzyskanego po inkubacji czystych hodowli neuronów hipokampa oraz współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych w obecności monomerów Aβ40 przez 72 godz. została przeprowadzona metodą Western blot (przykładowe bloty B,D,F); β-aktyna (42 kDa). Wykresy (A,C,E) przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej; wartości średnie ± SD. ANOVA z testem post-hoc Tukey`a. Brak różnic statystycznie.

W równoległych doświadczeniach posługując się metodą Western blot, przeprowadziłam analizę poziomu białek synaptycznych w całej komórce tj. zarówno we frakcji błon komórkowych jak i frakcji cytozolowej. Wyniki badań pokazują brak różnic w całkowitym poziomie NR1/NMDA (Ryc. 11 A,B), PSD-95 (Ryc. 11 C,D) oraz synaptofizyny (Ryc. 11 E,F) w hodowli neuronów prowadzonej w obecności lub pod nieobecność astrocytów, jak również bez względu na obecność peptydu A β 12-28P.

3.1.10. Wpływ nagromadzenia się A β w neuronach na stopień ufosforylowania białka tau

Jednym z głównych zjawisk patologicznych towarzyszących AD, będącym przejawem toksyczności A β , jest nadmierna fosforylacja białka tau, która zapoczątkowuje jego nagromadzenie się i polimeryzację w formie PHF w neurytach komórek nerwowych, prowadząc do ich zaawansowanej dystrofii. W moich badaniach sprawdziłam więc wpływ odkładania się A β wewnątrz neuronów hipokampa na stopień ufosforylowania białka tau po 72 godz. inkubacji. W poprzednio prezentowanych badaniach wykazałam, iż po takim czasie dochodzi do rozległej utraty powierzchniowych białek synaptycznych. Jak przedstawiono na Ryc. 12, inkubacja hodowli neuronów oraz współ-hodowli neuronalno-astrocytarnych z A β 40 nie powodowała żadnych istotnych zmian w immunoreaktywności ufosforylowanego białka tau (A,B), co może sugerować, iż postulowany przez badaczy wzrost fosforylacji białka tau indukowany A β może nie zachodzić na wczesnych etapach jego toksyczności, lecz towarzyszyć daleko posuniętym procesom neurodegeneracyjnym. Uzyskane wyniki nie pozwalają na wysnucie jednoznacznych wniosków, a jedynie stanowią podłoże do rozważań na ten temat. Aby potwierdzić zaproponowaną przeze mnie tezę należałoby przeprowadzić szereg badań uwzględniających możliwość wpływu A β 40 na inne miejsca fosforylacji na cząsteczce białka tau, a także określić wpływ A β 42 na stan ufosforylowania tego białka.



Ryc. 12. Efekt odkładania się peptydów Aβ40 na stan fosforylacji białka tau. Do oszacowania stopnia ufosforylowania białka tau wykorzystano frakcję cytozolową uzyskaną z neuronów hipokampa poddanych działaniu monomerycznego Aβ40 przez 72 godz.. Lizaty komórkowe analizowano metodą Western blot z użyciem przeciwciała rozpoznającego ufosforylowane epitopy Ser199/202 białka tau. Wykres (A) przedstawia wyniki analizy densytometrycznej; wartości średnie ± SD. ANOVA z post-hoc testem Tukey'a. Brak różnic znamiennej statystycznie. Panel (B) przedstawia przykładowy wynik Western blot; β-aktyna (42 kDa).

3.2. Charakterystyka 1MeTIQ jako antagonisty receptorów NMDA o właściwościach przeciwrodnikowych i antyekscytotoksycznych oraz ocena wpływu 1MeTIQ na zmiany patologiczne w synapsach glutaminianergicznych wywołane przez Aβ

Inną niż użycie peptydu Aβ12-28P strategią neuroprotekcijną testowaną w tej pracy w warunkach doświadczenia *in vitro*, nakierowaną na ochronę synaps glutaminianergicznych przed zmianami patologicznymi indukowanymi przez Aβ, było zastosowanie antagonisty receptorów NMDA wykazującego jednocześnie właściwości przeciwrodnikowe. Wstępne wyniki badań przeprowadzonych w naszej pracowni sugerowały, że substancją mogącą cechować się obu tymi właściwościami jest 1MeTIQ (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006). Jednak przed podjęciem badań związanych z ochroną synaps przed toksycznością Aβ konieczne było potwierdzenie faktu hamowania przez 1MeTIQ receptorów NMDA, lepsze poznanie mechanizmu tego efektu, wykazanie właściwości przeciwrodnikowych 1MeTIQ w układzie biologicznym oraz scharakteryzowanie właściwości neuroprotekcyjnych 1MeTIQ porównywalnych do uznanych antagonistów receptora NMDA.

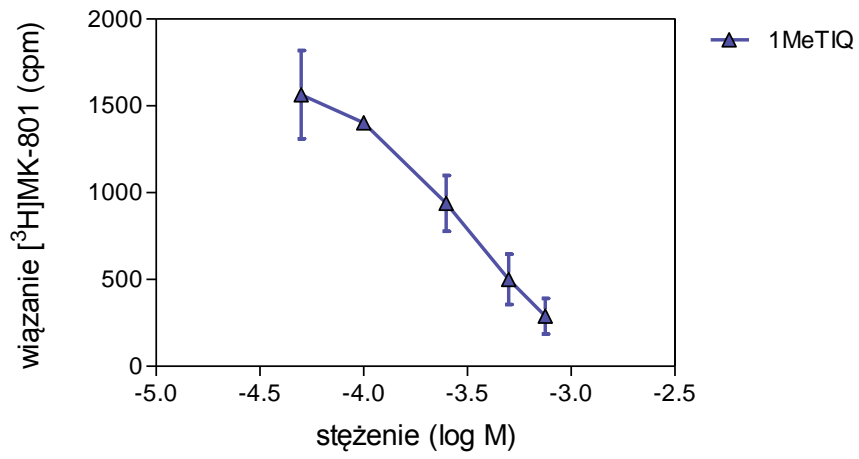
W tym celu badałam powinowactwo 1MeTIQ do wybranych miejsc wiążących ligandy w kompleksie receptora NMDA na izolowanych błonach synaptycznych

mózgu oraz wpływ tej substancji na aktywność receptora NMDA w hodowanych neuronach ocenianą na podstawie generacji sygnału wapniowego. Wykorzystując hodowle neuronów badałam także efekty przeciwdrobnikowe 1MeTIQ. Następnie porównałam potencjał neuroprotekcyny 1MeTIQ i uznanych antagonistów receptora NMDA w modelach ekscytotoksyczności i niedokrwienia mózgu *in vitro* i *in vivo*. Dopiero po uzyskaniu tych danych podjęłam badanie wpływu 1MeTIQ, w porównaniu z klasycznym antagonistą receptora NMDA – MK-801, na wywołaną przez A β patologię synaps glutaminianergicznych.

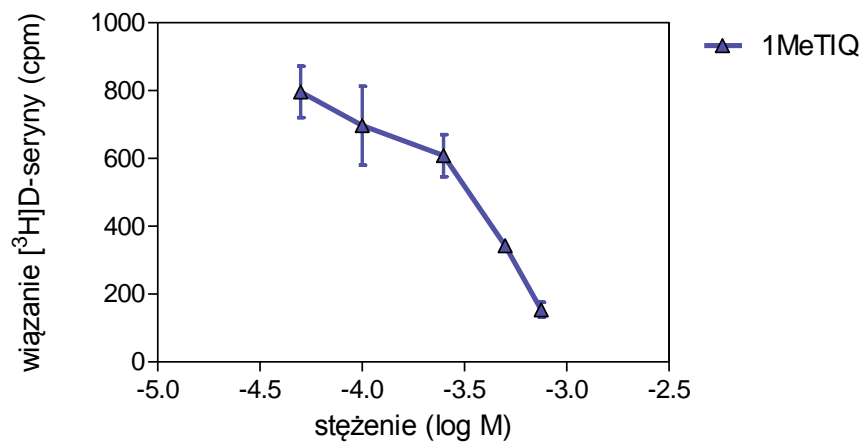
3.2.1. Interakcje 1MeTIQ z wybranymi miejscami wiązania ligandów receptora NMDA

Przedstawione we wstępie informacje dotyczące hamowania przez 1MeTIQ zjawiska ekscytotoksyczności oraz założenie, iż u podstaw tego działania leży antagonizm wobec receptorów NMDA (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006), skłoniły mnie do podjęcia badań powinowactwa 1MeTIQ do receptora NMDA. Taktyka tych badań polegała na próbie zidentyfikowania miejsc na strukturze kompleksu receptora NMDA kluczowych dla jego funkcjonowania, do których 1MeTIQ może wykazywać powinowactwo. Do badania wybrałam miejsca w kanale receptora wiążące z dużym powinowactwem jego bezkonkurencyjnego antagonistę MK-801 oraz miejsca wiążące ko-agonistę – D-serynę i agonistę – glutaminian. W tym celu wykorzystałam frakcję błon synaptycznych izolowanych z kory mózgu szczura inkubowaną z wymienionymi powyżej ligandami znakowanymi trytem, a następnie badałam wypieranie izotopu w zależności od stężenia dodanego 1MeTIQ. Przeprowadzone badania wykazały, iż 1MeTIQ w sposób zależny od stężenia hamuje wiązanie znakowanego [3 H]MK-801. IC $_{50}$ dla 1MeTIQ wyniosło około 300 μ M (Ryc. 13 A). Wyniki badań wskazują również na zdolność tej tetrahydroizochinoliny do hamowania wiązania radioaktywnej [3 H]D-seryny do frakcji synaptosomów, gdzie IC $_{50}$ wyniosło 470 μ M (Ryc. 13 B). Nie obserwowałam natomiast istotnego wpływu 1MeTIQ na wiązanie znakowanego kwasu glutaminowego ([3 H]Glu) (Ryc. 13 C). Te wyniki są zgodne z koncepcją przypisującą 1MeTIQ działanie hamujące na aktywność receptora NMDA i wskazują na antagonizm miejsca glicynowego jako pierwotny mechanizm tego działania.

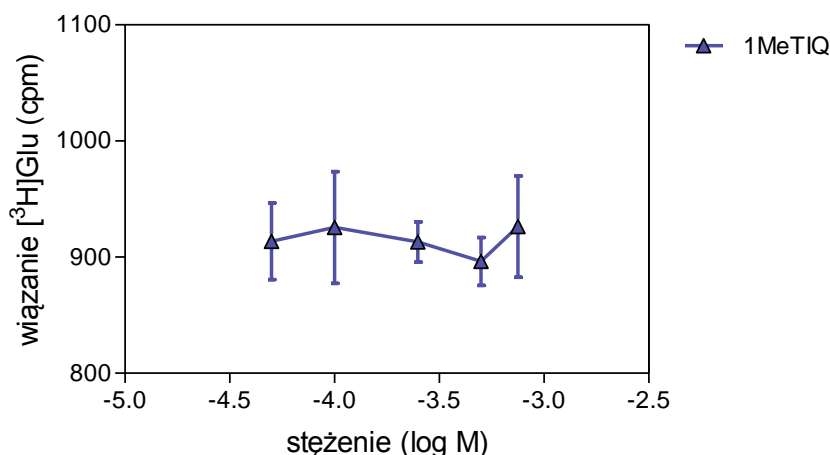
(A)



(B)



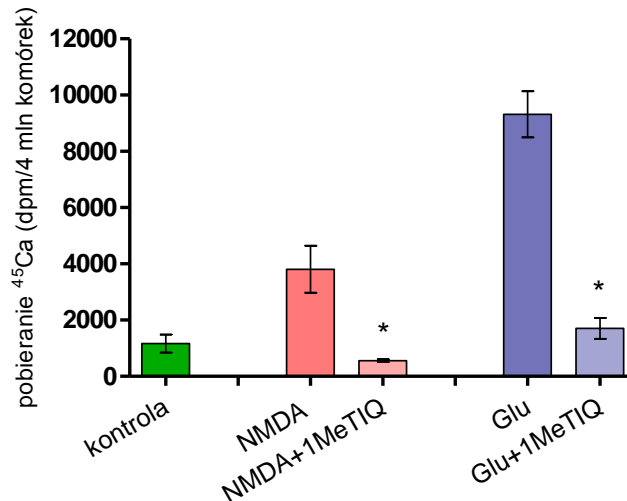
(C)



Ryc. 13. Wpływ 1MeTIQ na wiązanie [³H]MK-801, [³H]D-seryny i [³H]Glu do frakcji izolowanych błon synaptycznych. Błony synaptoneurosomów kory mózgu szczura były inkubowane w obecności 1MeTIQ w zakresie stężeń 50-750 μ M oraz znakowanego radioaktywnie 4 nM MK-801 (A), 12 nM D-seryny (B) lub 12,5 μ M Glu (C) przez 30 min. w temperaturze 30^oC.

3.2.2. Wpływ 1MeTIQ na aktywność receptora NMDA ocenianą przez indukcję sygnału wapniowego w neuronach

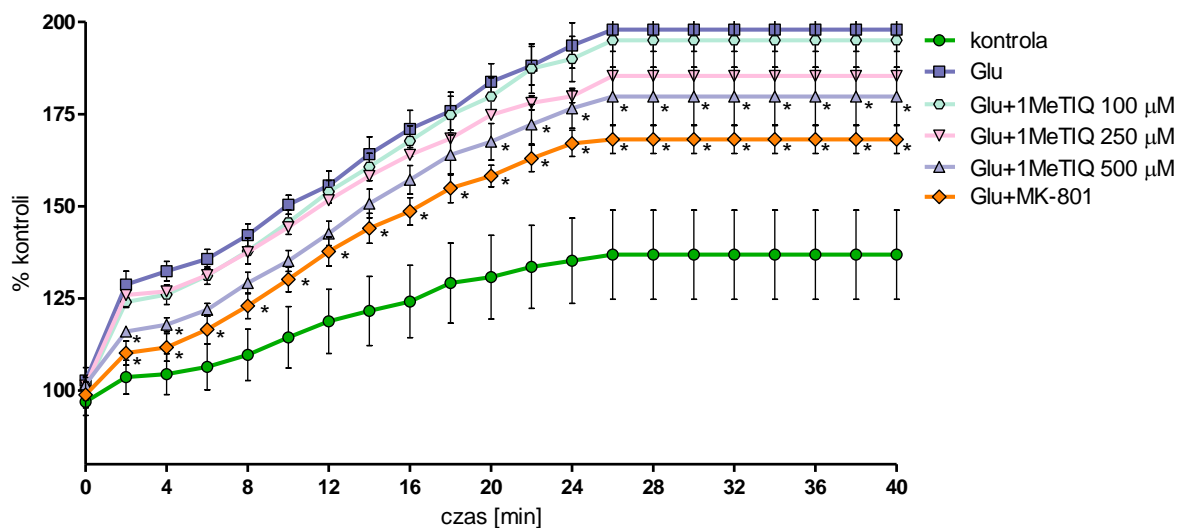
Jak wiadomo, zjawiskiem nieodłącznie towarzyszącym stymulacji receptorów i aktywacji kanału NMDA jest wzrost poziomu wapnia w komórkach nerwowych, wynikający głównie z napływu jonów Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Bouchelouche i wsp. 1989). Opierając się na tym założeniu, kolejny etap badań z wykorzystaniem hodowli neuronów ziarnistych mózdzku był poświęcony określeniu wpływu 1MeTIQ na aktywowane przez NMDA i Glu pobieranie zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Zastosowano przy tym metodę z wykorzystaniem radioaktywnego ⁴⁵Ca do wyznakowania zewnątrzkomórkowej puli wapnia. Otrzymane wyniki pokazują, iż 1MeTIQ w wysokim stężeniu 500 μ M niemal całkowicie znosi napływ jonów wapniowych do neuronów indukowany przez NMDA lub Glu (Ryc. 14). Wyniki te potwierdzają, iż 1MeTIQ wykazuje cechy antagonisty receptora NMDA.



Ryc. 14. Wpływ 1MeTIQ na indukowane przez NMDA lub Glu pobieranie ⁴⁵Ca przez neurony ziarniste mózdzku. Hodowle neuronów poddane zostały trwającej 10 min inkubacji w środowisku jonowym w obecności ⁴⁵CaCl₂ (0.1 μCi), 5 μM glicyny, 250 μM Glu lub 250 μM NMDA wraz z 500 μM 1MeTIQ. Stężenie wapnia w komórkach oznaczano metodą izotopową. Wykres przedstawia wartości średnie ± SD; ANOVA z testem post-hoc Tukey`a. * p<0,001 w stosunku do działania samych agonistów.

Dla pełniejszego udokumentowania modulującego wpływu 1MeTIQ na indukcję sygnału wapniowego w neuronach poprzez hamowanie receptorów NMDA, przeprowadziłam także badanie wzrostu poziomu jonów wapnia w cytozolu po podaniu Glu i wpływu na ten efekt 1MeTIQ, w porównaniu do klasycznego antagonisty receptora NMDA - MK-801. Jak przedstawiono na Ryc. 15, aktywacja receptorów dla pobudzających aminokwasów przez Glu prowadzi do wzrostu fluorescencji wrażliwej na wapń sondy Calcium Orange, co jest odzwierciedleniem wzrostu stężenia jonów wapnia w neuronach. Efekt ten był silnie, ale nie całkowicie, znoszony w obecności 0,5 μM MK-801, co świadczy o dominującym w nim udziale napływu jonów Ca²⁺ przez kanały receptorów NMDA. Podanie 1MeTIQ w sposób zależny od jego stężenia obniżało poziom Ca²⁺ w cytozolu, przy czym efekt znamieny statystycznie był odnotowany jedynie w przypadku 500 μM 1MeTIQ. Hamowanie przez 500 μM 1MeTIQ wzrostu stężenia wapnia w neuronach było słabsze w porównaniu do efektów uzyskanych po podaniu MK-801, co potwierdza zarówno antagonizm 1MeTIQ w stosunku do receptorów NMDA jak i jego słabe powinowactwo do miejsc wiązania w kompleksie receptora. Wyniki te są więc zgodne z danymi przedstawionymi na Ryc. 14 o hamującym wpływie 1MeTIQ na wywołane przez Glu pobieranie wapnia znakowanego ⁴⁵Ca z przestrzeni zewnątrzkomórkowej,

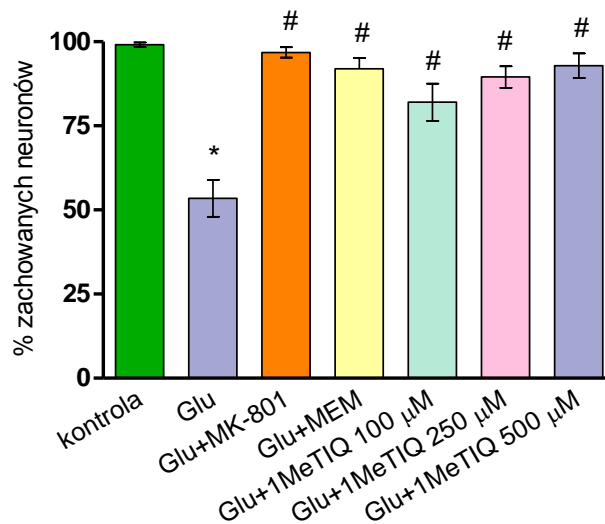
a także z wynikami badania wpływu 1MeTIQ na wiązanie [³H]MK-801 i [³H]D-seryny (Ryc. 13).



Ryc. 15. Wpływ antagonistów receptora NMDA na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołany przez Glu. Poziom wapnia w neuronach ziarnistych mózdzku po podaniu Glu (250 µM) oraz 1MeTIQ w stężeniach 100 µM, 250 µM i 500 µM lub 0,5 µM MK-801 w obecności agonisty oznaczano metodą fluorymetryczną z użyciem wrażliwej na wapń sondy fluorescencyjnej Calcium Orange. Wykres przedstawia wartości średnie ± SD; ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. * p<0,05 w stosunku do działania Glu.

3.2.3. Ochronny wpływ 1MeTIQ, w porównaniu do uznanych antagonistów receptora NMDA, w modelu ostrej neurotoksyczności wywołanej przez glutaminian: bezpośrednia neuroprotekcja, pre- i postkondycjonowanie

Dalszym etapem badań było sprawdzenie, czy w warunkach ekscytotoksyczności 1MeTIQ wykazuje działanie neuroprotekcyjne typowe dla innych uznanych antagonistów receptora NMDA jak MK-801 lub memantyny (MEM). Eksperymenty zostały przeprowadzone na pierwotnych hodowlach neuronów ziarnistych mózdzku poddanych przez 30 min. działaniu na 250 µM Glu. Jak przedstawiono na Ryc. 16, obecność Glu powodowała 47 % obniżenie liczby przeżywających neuronów. Dodanie do środowiska inkubacyjnego 1MeTIQ skutkowało zależnym od stężenia wzrostem przeżywalności neuronów. Porównywalny efekt neuroprotekcyny uzyskałam po podaniu do hodowli neuronów 0,5 µM MK-801, 5 µM MEM oraz 500 µM 1MeTIQ.

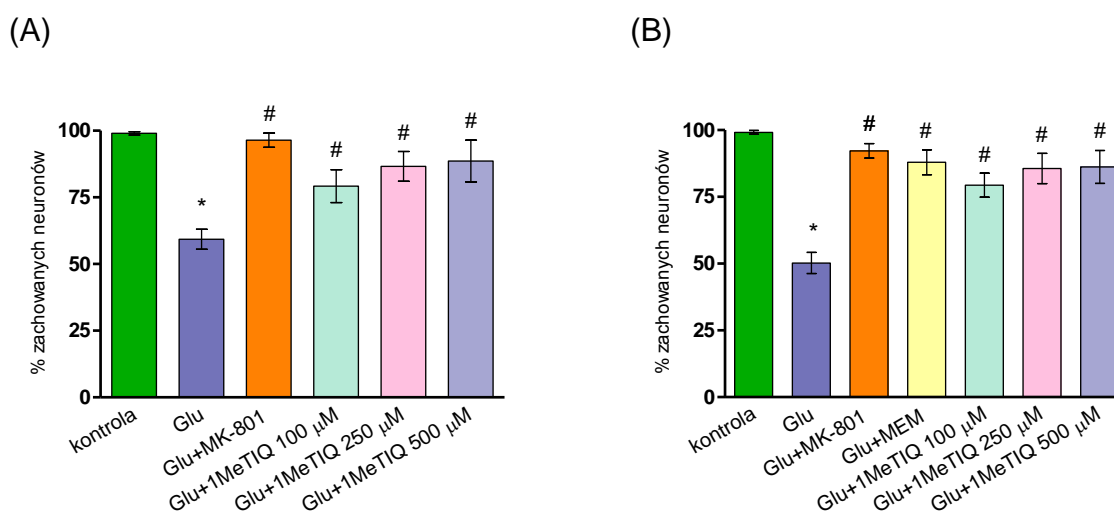


Ryc. 16. Wpływ 1MeTIQ i uznanych antagonistów receptora NMDA na ostrą neurotoksyczność indukowaną przez Glu. Neurony ziarniste mózdku poddane zostały jednoczesnej ekspozycji na działanie Glu (250 µM) oraz MK-801 (0,5 µM), MEM (5 µM) lub 1MeTIQ (100, 250, 500 µM) w obecności glicyny (5 µM). Ocena przeżywalności neuronów dokonywana była po 24 godz. na podstawie barwienia jodkiem propidyny. Wykres przedstawia wartości średnie ± SD; ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. * p<0,001 w stosunku do kontroli; # p<0,001 w stosunku do Glu.

Można więc sądzić, iż obserwowana po zastosowaniu 1MeTIQ neuroprotekcja była w tym wypadku odbiciem typowego dla antagonistów receptorów NMDA efektu hamowania toksyczności Glu związanego z blokowaniem aktywności tych receptorów, przy czym efektywność neuroprotekcji była zależna od powinowactwa badanych substancji do odpowiednich miejsc wiązania w kompleksie receptora NMDA.

W przedstawionych powyżej wynikach pokazałam, iż 1MeTIQ działa neuroprotekcynie gdy podany jest do hodowli neuronów ziarnistych mózdku jednocześnie z Glu, bezpośrednio hamując jego interakcję z receptorem NMDA. Moim kolejnym zadaniem było sprawdzenie czy 1MeTIQ, podobnie jak MK-801 i MEM, indukuje tolerancję na Glu, co można zakwalifikować do mechanizmów pre- lub postkondycjonowania, zjawisk zależnych od modulacji aktywności receptorów NMDA. Efekt indukcji tolerancji neuronów kory mózgu szczura w hodowli pierwotnej przez prekondycjonowanie antagonistami receptorów NMDA jest zjawiskiem mało znanym, był on poprzednio opisany w jednej publikacji autorstwa Tremblay i wsp. (2000). Jak wykazały badania tych autorów, trwająca 30 min. inkubacja komórek nerwowych z antagonistami receptorów NMDA w okresie 24-96 godz. przed ekspozycją hodowli neuronów na działanie związków cytotoksycznych i indukujących

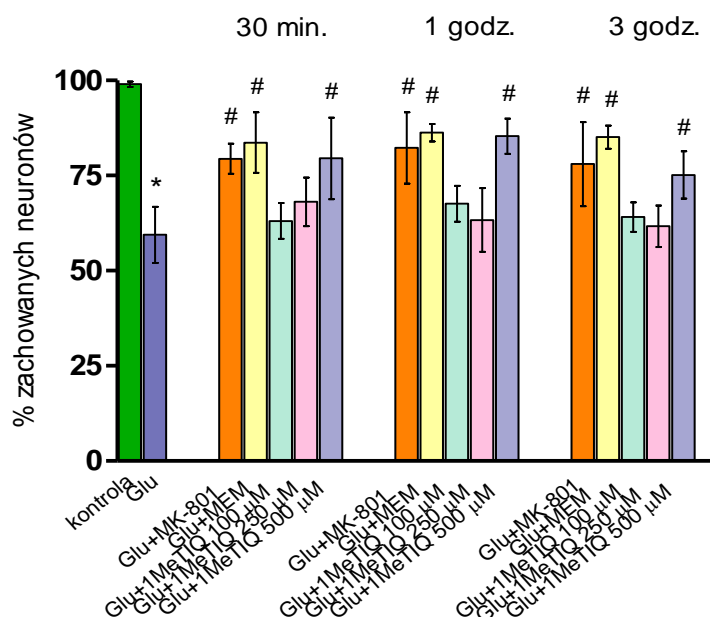
apoptozę, m.in. Glu oraz A β , powodowało tolerancję na te toksyny. Wprowadzając jedynie niewielkie modyfikacje, zastosowałam zbliżony do zaproponowanego przez Tremblay i wsp. protokół doświadczenia do oceny zdolności 1MeTIQ do indukcji tolerancji komórek ziarnistych mózdzku w hodowli pierwotnej na ekscytotoksyczność *in vitro*. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, iż maksymalny poziom neuroprotekcji został osiągnięty po trwającej 30 min. ekspozycji komórek na działanie 0,5 μ M MK-801, 5 μ M MEM, a także 500 μ M 1MeTIQ. Efekt tolerancji na ekscytotoksyczność Glu obserwowałam, gdy antagonistów receptorów NMDA podano 24 godz. (Ryc. 17 A) lub 48 godz. (Ryc. 17 B) przed ekspozycją na Glu i wyrażał się on wzrostem przeżywalności neuronów odpowiednio o 30 % oraz 36 % w przypadku 500 μ M 1MeTIQ, podczas gdy efekt neuroprotekcijny po zastosowaniu niższych stężeń tej tetrahydroizochinoliny był słabiej zaznaczony.



Ryc. 17. Wpływ prekondycjonowania z wykorzystaniem 1MeTIQ, MK-801 i MEM na przeżywalność neuronów w warunkach ekscytotoksyczności wywołanej przez Glu. Neurony ziarniste mózdzku były inkubowane w obecności antagonistów receptora NMDA przez 30 min., po czym przywracano środowisko hodowlane. Po upływie 24 godz. (A) lub 48 godz. (B), do komórek podawany był 250 μ M Glu na okres 30 min. Badanie przeżywalności neuronów przeprowadzono po 24 godz. na podstawie barwienia jodkiem propidyny. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SD; ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. * $p < 0,001$ w stosunku do kontroli; # $p < 0,001$ w stosunku do Glu.

Zachęcona doniesieniami o możliwości indukcji tolerancji neuronów na czynniki uszkadzające przez postkondycjonowanie, a więc ekspozycję na działanie różnych stresorów o intensywności nie powodującej uszkodzenia już po zadziałaniu czynników uszkadzających (Prehn i wsp. 1995), podjęłam próbę zbadania tej możliwości w odniesieniu do 1MeTIQ jak i uznanych antagonistów receptora NMDA.

Jak przedstawia Ryc. 18, zastosowanie 1MeTIQ w stężeniu 500 μM z opóźnieniem 30 min., 1 godz. oraz 3 godz. po ostrej ekspozycji neuronów na działanie Glu, zaowocowało znamienym statystycznie obniżeniem śmiertelności komórek we wszystkich badanych punktach czasowych. Zbliżony efekt neuroprotekcji uzyskałam również po zastosowaniu MK-801 oraz MEM. Nie odnotowałam natomiast efektu neuroprotekcijnego stosując niższe stężenia 1MeTIQ (100 μM oraz 250 μM). Należy przypomnieć, iż stężenie 1MeTIQ dające w tym doświadczeniu efekt neuroprotekcyny sięgało wysokich wartości mikromolarnych (500 μM), zaś inni antagoniści podawani byli w stężeniach farmakologicznych (0,5 μM MK-801, 5 μM MEM), co świadczy o bardzo niskim powinowactwie 1MeTIQ do receptora NMDA. Pomimo słabiej wyrażonych właściwości farmakologicznych 1MeTIQ w tym eksperymencie, wyniki badań jednoznacznie wskazują, iż substancja ta podana w odpowiednio wysokich stężeniach zachowuje się podobnie jak inni antagoniści receptora NMDA, a w szczególności wywołuje długo utrzymującą się tolerancję na ekscytotoksyczność.

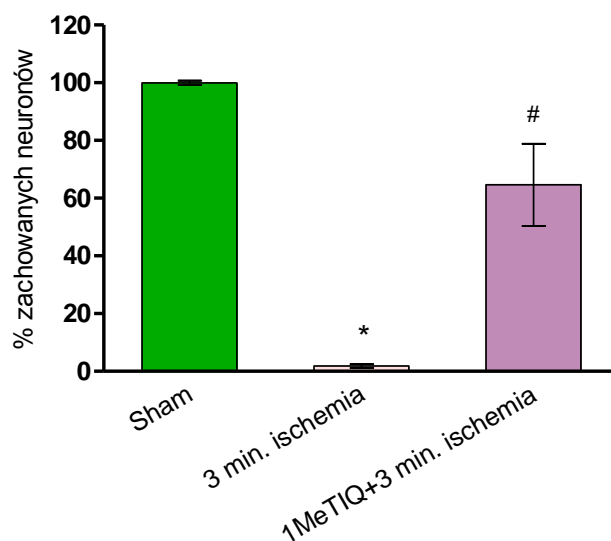


Ryc. 18. Wpływ postkondycjonowania przy wykorzystaniu antagonistów receptora NMDA na indukcję tolerancji neuronów na ostrą ekspozycję na Glu. Hodowle neuronów ziarnistych mózdzku poddane były działaniu 100 μM Glu przez okres 30 min., a następnie w różnych punktach czasowych po usunięciu Glu, komórki inkubowane były przez 30 min. w obecności antagonistów receptorów NMDA. Ocena przeżywalności neuronów odbywała się po 24 godz. od zakończenia eksperymentu w oparciu o barwienie jodkiem propidyny. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD; ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. * $p < 0,001$ w stosunku do kontroli; # $p < 0,001$ w stosunku do Glu.

3.2.4. Neuroprotektcyjne działanie 1MeTIQ w modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu

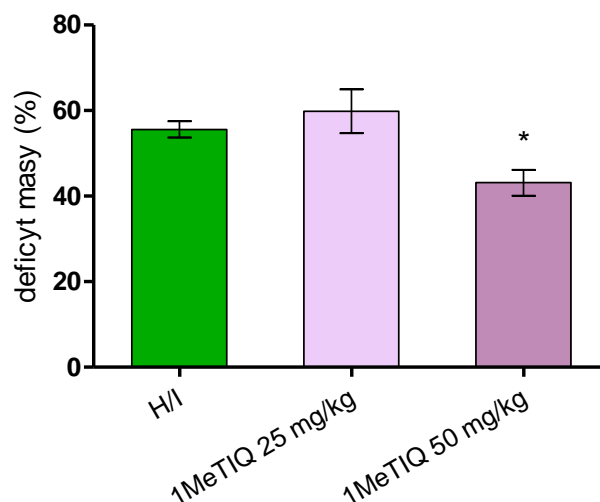
Zgodnie z założeniami testowanej przeze mnie hipotezy roboczej, wyniki badań *in vitro* zarówno z wykorzystaniem frakcji izolowanych błon kory mózgu szczura jak i hodowli pierwotnych neuronów ziarnistych mózdzku wykazały zdolność 1MeTIQ do hamowania aktywności receptora NMDA, a także neuroprotektcyjne właściwości 1MeTIQ w neurotoksyczności indukowanej przez Glu, naturalnego agonistę receptora NMDA. Oczywiście hamowanie receptora NMDA przez 1MeTIQ odgrywa kluczową rolę w ochronnym działaniu tej tetrahydroizochinoliny w ekscytotoksyczności. Wskazuje to na potencjalną możliwość hamowania przez 1MeTIQ także uszkodzeń powstałych *in vivo* na skutek niedokrwienia mózgu. Z licznych doniesień literaturowych wiadomo, iż antagoniści receptora NMDA wykazują działanie neuroprotektcyjne w różnych modelach niedokrwienia mózgu, zwłaszcza w ischemii ogniskowej (prace przeglądowe: Łazarewicz 1996, Salińska i wsp. 2005). Są nieliczne doniesienia wskazujące na zdolność niektórych syntetycznych pochodnych TIQ do częściowego obniżania uszkodzeń poischemicznych w globalnym niedokrwieniu mózgu (Nakanishi i wsp. 1994), jednak neuroprotektcyjne działanie 1MeTIQ w ischemii mózgu nie było dotąd badane. Stąd, dla zebrania dalszych dowodów potwierdzających rolę hamowania receptorów NMDA w neuroprotektyjnym działaniu 1MeTIQ *in vivo* wykorzystaliśmy dwa zwierzęce modele doświadczalnego niedokrwienia mózgu.

Pierwszym z nich jest model odwracalnej ischemii przodomózgowia dorosłych myszokoczków (gerbili mongolskich), powodującej ubytek neuronów piramidowych hipokampa, głównie sektora CA1 (Duszczyk i wsp. 2005). Otrzymane wyniki potwierdziły, iż globalne niedokrwienie przodomózgowia przez czas 3 min. prowadziło do sięgającego 90 % ubytku neuronów piramidowych w sektorze CA1 hipokampa. Podanie 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg masy ciała 30 min. przed ischemią powodowało wzrost przeżywalności neuronów CA1 hipokampa o 62 %, co potwierdza jego ochronne działanie w tym modelu niedokrwienia mózgu (Ryc. 19).



Ryc. 19. Wpływ 1MeTIQ na wywołany przez globalną ischemię ubytek neuronów piramidowych w sektorze CA1 hipokampa u myszokoczka. 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg masy ciała był podawany dootrzewnowo 30 min. przed 3 min. ischemią. Materiał do badań histologicznych pobierany był 14 dni po przeprowadzonym eksperymencie. Uszkodzenia po-ischemiczne oznaczane były poprzez barwienie skrawków mózgu fioletem krezyłu. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SEM; ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. * $p < 0,001$ w stosunku do wyników grupy „Sham”; # $p < 0,001$ w stosunku do wyników grupy „3 min. ischemia”

W badaniach nad neuroprotekcijnymi właściwościami 1MeTIQ posłużyliśmy się także modelem asfiksji okołoporodowej u szczurów. W tym mieszanym modelu z elementami niedokrwienia ogniskowego i globalnego, w którym uszkodzenie półkuli po stronie operowanej wyraża się ubytkiem jej masy, dominuje obraz typu ogniskowego niedokrwienia mózgu. Poddając analizie potencjał neuroprotekcyny 1MeTIQ wyrażający się zmniejszeniem ubytku masy uszkodzonej półkuli mózgu stwierdziliśmy, iż trzykrotne dootrzewnowe podanie tej tetrahydroizochinoliny w dawce 50 mg/kg po hipoksji/ischemii indukowało znamienne neuroprotekcję, podczas gdy dawka 25 mg/kg okazała się nieskuteczna (Ryc. 20). Otrzymane wyniki potwierdzają, iż 1MeTIQ zachowuje się podobnie do innych antagonistów receptorów NMDA, działając neuroprotekcynie w dwu modelach niedokrwienia mózgu u zwierząt doświadczalnych.

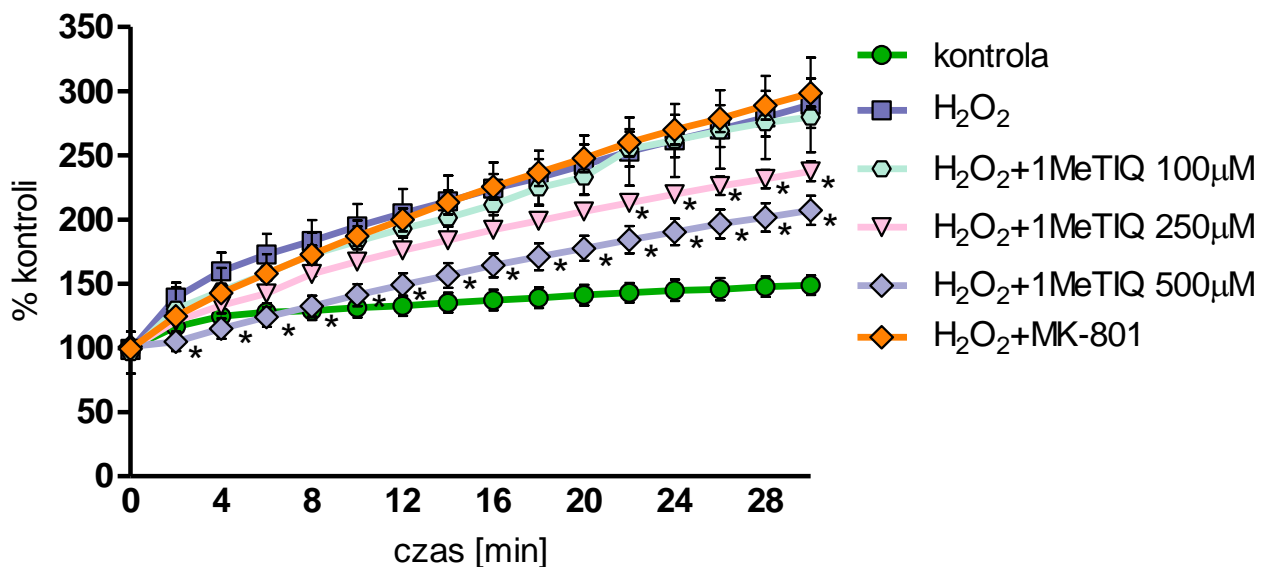


Ryc. 20. Wpływ 1MeTIQ na uszkodzenie mózgu w modelu asfiksji okołoporodowej u osesków szczurzych. 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg) podawany był dootrzewnowo 30 min., 2 godz. oraz 4 godz. po hipoksji/ischemii. Dla oceny uszkodzeń mózgu, 14 dni po epizodzie ischemii był badany metodą wagową ubytek masy półkuli uszkodzonej. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SEM; ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

3.2.5. Ocena potencjału przeciwrodnikowego 1MeTIQ

Przyjmuje się, iż u podstaw procesów patologicznych związanych z postępowaniem AD leży stres oksydacyjny. Stwierdzono, iż wewnątrzkomórkowe nagromadzenie się peptydów A β obserwowane w tym schorzeniu, przyczynia się do nasilenia reakcji wolnorodnikowych oraz wzrostu produkcji ROS, skutkiem czego są zaburzenia neurotransmisji cholinergiczej oraz glutaminianergiczej (Reddy 2006, Guan 2008). Na tej podstawie można przypuszczać, iż efektywność terapii AD, która opiera się m.in. na stosowaniu antagonistów receptora NMDA, może być skutecznie zwiększona poprzez jednoczesne zastosowanie kombinacji antagonistów receptorów NMDA i antyoksydantów lub też podanie jednego związku łączącego cechy antagonisty receptora NMDA oraz substancji wykazującej działanie przeciwrodnikowe (Butterfield and Pocernich 2003). Istnieją dane, że 1MeTIQ obniża produkcję ROS w warunkach abiotycznych (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006). Stąd, przedmiotem moich dalszych badań było sprawdzenie potencjału przeciwrodnikowego 1MeTIQ z wykorzystaniem materiału biologicznego. Aby wykluczyć ewentualny efekt wtórnego wygaszania reakcji wolnorodnikowych przez 1MeTIQ na skutek hamowania receptorów NMDA, do swoich eksperymentów

wybrałam pierwotne hodowle szczurzych neuronów hipokampa we wczesnym stadium rozwoju, charakteryzujące się brakiem ekspresji funkcjonalnych receptorów NMDA. Hodowle neuronów poddane były działaniu 10 μM nadtlenu wodoru (H_2O_2), który jest związkem powszechnie stosowanym do indukcji stresu oksydacyjnego w wielu modelach doświadczalnych. Wyniki zaprezentowane na Ryc. 21 pokazują, iż zgodnie z oczekiwaniami podanie H_2O_2 indukuje produkcję ROS a wysokie stężenia 1MeTIQ (250 μM , 500 μM) powodują znamienne statystycznie obniżenie produkcji wolnych rodników spowodowanej podaniem H_2O_2 , zaś w niższym stężeniu (100 μM) 1MeTIQ okazał się nieskuteczny. Brak wpływu MK-801 na tworzenie ROS w obecności H_2O_2 potwierdza, iż efekt przeciwrodnikowy 1MeTIQ nie jest związany z blokowaniem receptorów NMDA, a wynika ze specyficznych właściwości tej substancji do hamowania reakcji wolnorodnikowych.



Ryc. 21. Wpływ 1MeTIQ na produkcję ROS wywołaną H_2O_2 w hodowli neuronów hipokampa. 8-dniowe hodowle neuronów zostały poddane działaniu H_2O_2 w obecności 1MeTIQ (100 μM , 250 μM , 500 μM) oraz MK-801 (0,5 μM). Poziom wolnych rodników oznaczano na podstawie pomiaru fluorescencji z wykorzystaniem sondy DCF. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD; ANOVA z testem post-hoc Tukey`a. * $p < 0,05$ w stosunku do H_2O_2 .

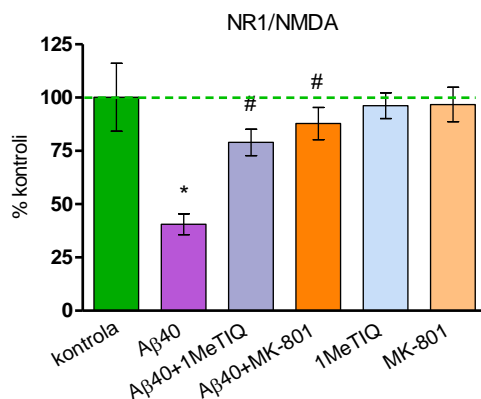
3.2.6. Ochronne działanie antagonistów receptora NMDA w indukowanej przez $\text{A}\beta$ patologii synaps glutaminianergicznych

Najnowsze doniesienia świadczą o tym, iż zaburzenia neurotransmisji glutaminianergicznej towarzyszące AD nie są jedynie wynikiem wpływu tego peptydu

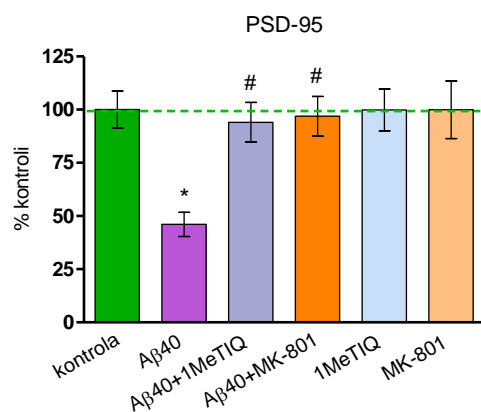
na aktywność receptorów NMDA, ale wiążą się ściśle ze spadkiem ekspresji podjednostek kompleksu receptorowego na powierzchni komórek, jak również że antagoniści receptora NMDA hamują ten efekt (Lacor i wsp. 2007, Dong i wsp. 2008). Po wykazaniu, iż 1MeTIQ jest antagonistą receptora NMDA o właściwościach przeciwrodnikowych, przystąpiłam do przeprowadzenia następujących eksperymentów z udziałem 1MeTIQ, testujących ochronne działanie tej substancji mogącej osłabiać toksyczne działanie A β na synapsy. Z uwagi na zaobserwowane przeze mnie zmiany gęstości receptorów NMDA, białka PSD-95 oraz synaptofizyny na powierzchni neuronów wywołane nagromadzeniem się A β w komórkach nerwowych, kolejny cykl doświadczeń obejmował sprawdzenie wpływu antagonistów receptora NMDA, 500 μ M 1MeTIQ oraz 0,5 μ M MK-801, na zmiany ekspresji tych powierzchniowych makromolekuł wywołane przez A β . W tym celu do dojrzałej hodowli neuronów hipokampa został podany A β 40 jednocześnie z badanymi antagonistami receptorów NMDA na okres 3 dni. Wyniki zaprezentowane na Ryc. 21 pokazują, iż 1MeTIQ zapobiega utracie białek synaptycznych, która ma miejsce po podaniu A β 40 do hodowli pierwotnej neuronów hipokampa, przywracając ekspresję NR1/NMDA o 37,1 % (A), PSD-95 o 48 % (B), oraz synaptofizyny o 48,4 % (C).

Podobny lub nieco silniejszy efekt ochronny na synapsy glutaminianergiczne został uzyskany po podaniu MK-801, przemawiając za zdolnością antagonistów receptora NMDA do modulowania efektu cytotoksycznego wywołanego przez A β . Nie obserwowałam natomiast wpływu samych antagonistów receptora NMDA na wzór powierzchniowych markerów neuronalnych. Należy podkreślić, że w porównaniu do efektu MK-801, nie stwierdziłam wyraźnych objawów większej skuteczności 1MeTIQ podanego w 1000 razy wyższym stężeniu w ochronie synaps przed toksycznym działaniem A β . Nieco słabsze lub podobne do 0,5 μ M MK-801 działanie neuroprotektoryjne 500 μ M 1MeTIQ odnotowałam poprzednio w modelu ekscytotoksyczności indukowanej przez Glu. Te wyniki wskazują więc, że właściwości przeciwrodnikowe 1MeTIQ nie wzmocniły potencjału neuroprotektoryjnego tej substancji w modelu neurotoksyczności A β *in vitro*.

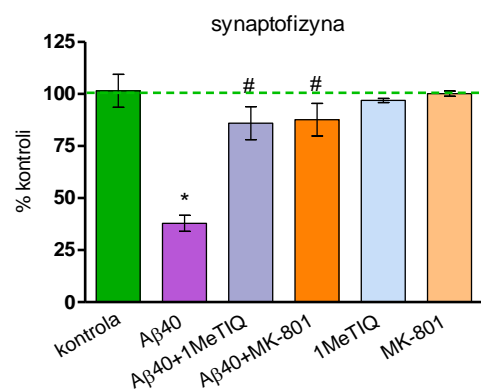
(A)



(B)



(C)



Ryc. 21. Wpływ 1MeTIQ oraz MK-801 na wzór powierzchniowych białek synaptycznych w neuronach poddanych toksyczności Aβ. Gęstość powierzchniowych markerów neuronalnych określano na podstawie barwienia z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał znakujących NR1/NMDA (A), PSD-95 (B) oraz synaptofizynę (C). Analizę preparatów uzyskanych po 72-godzinnej ekspozycji hodowli neuronów hipokampa na działanie monomerycznego Aβ40 oraz blokerów kanału NMDA: 500 μM 1MeTIQ lub 0,5 μM MK-801, wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego na podstawie pomiaru immunoreaktywności poszczególnych markerów synaptycznych. Wykresy przedstawiają wartości średnie ± SD; ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. * p<0,001 w stosunku do kontroli; # p<0,001 w stosunku do Aβ.

4. Dyskusja

4.1. Ocena strony metodycznej

Uważa się, iż hipokamp należy do najbardziej wrażliwych obszarów mózgu na wczesne zjawiska patologiczne towarzyszące AD (Hort i wsp. 2007). Ponadto, badacze zwracają uwagę na różnice we wrażliwości poszczególnych rejonów hipokampa na zmiany neurodegeneracyjne, których skutkiem jest stopniowy zanik funkcji poznawczych. Jak pokazują badania zaprezentowane przez Bahr i wsp. (1998), istnieje zróżnicowanie zdolności komórek nerwowych do pobierania A β w poszczególnych obszarach hipokampa. I tak, neurony w sektorze CA1 charakteryzują się najwyższym stopniem wychwytu egzogenego A β , a następnie jego wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się (Bahr i wsp. 1998). Na podstawie doniesień literaturowych wiadomo, iż dojrzałe hodowle pierwotne neuronów hipokampa wykazują wysoki poziom ekspresji receptorów NMDA, odgrywających decydującą rolę w procesach uczenia się i pamięci (Jarvis i wsp. 1987). Czyni to z hodowli neuronów hipokampa doskonały model do badań nad biologią synaps glutaminianergicznych (Boyer i wsp. 1998), jak również nad wtórnymi efektami patologicznego nagromadzenia się A β w neuronach. Należy pamiętać, że w linii ludzkich komórek neuroblastoma SH-SY5Y wraz ze wzrostem stężenia A β w środowisku wzrostowym nie obserwowano spadku wychwytu A β przez komórki (Ida i wsp. 1996, Chafekar i wsp. 2008). Ponadto zaobserwowałam wysoką zdolność komórek neuroblastoma SK-N-SH do degradacji A β w warunkach wysokich stężeń tego peptydu (Kuszczyk i Sadowski 2009). Natomiast neurony hipokampa wykazują ograniczony metabolizm A β , dzięki czemu utrzymywanie tego typu hodowli pierwotnej w obecności wysokich stężeń A β prowadzi do upośledzenia degradacji peptydu oraz spowolnienia procesu endocytozy na skutek zalegania A β w późnych endosomach i lizosomach. Mając na uwadze, iż transport A β w obecności apo E, odbywający się z udziałem receptorów dla apo E, angażuje struktury ścieżki endosomalno/lizosomalnej, wykorzystanie hodowli pierwotnej neuronów hipokampa o niezwykle dobrze scharakteryzowanym systemie endosomalno/lizosomalnym, dodatkowo przemawia za słusnością wyboru tego typu hodowli. Stąd, hodowle pierwotne neuronów hipokampa stanowią szeroko stosowany na świecie model komórkowy do badań nad mechanizmami toksyczności A β .

W swojej pracy wykorzystałam syntetyczny A β 40/42 występujący w postaci monomerycznej. Jak wiadomo z literatury, monomery A β są łatwiej wychwytywane przez neurony niż zagregowane formy tego peptydu, które pozostają związane z powierzchnią błony komórkowej (Gyls i wsp. 2003). Ponadto, do eksperymentów poświęconych określeniu wpływu wewnątrzkomórkowego odkładania się A β w neuronach na patologię synaps glutaminianergicznych wybrałam A β 40, który w odróżnieniu od silnie hydrofobowych, łatwo agregujących form A β 42, wymaga dłuższego czasu inkubacji w środowisku wzrostowym do uzyskania form oligomerycznych (Stine i wsp. 2003). Stąd, zastosowanie A β 40 pozwoliło na obserwację wtórnych zmian patologicznych, rozwijających się w odpowiedzi na zwiększony wychwyt monomerycznego A β 40 i oligomeryzację tego peptydu wewnątrz neuronów.

Przeważająca większość moich eksperymentów *in vitro* przeprowadzona została w oparciu o model współ-hodowli neuronalno-astrocytarnej, gdzie źródłem natywnej postaci apo E była hodowla pierwotna astrocytów, uzyskana z kory mózgu myszy. Odwołując się do literatury można stwierdzić, iż większość badań *in vitro* poświęconych tej tematyce, opiera się na stosowaniu rekombinowanej, nielipidowanej postaci apoE, która to forma nie występuje w warunkach fizjologicznych. Stąd też wątpliwe wydaje się odniesienie tych wyników do warunków panujących *in vivo*. Należy wspomnieć, iż natywna forma apo E, wchodząca w skład kompleksów z lipidami, w porównaniu do formy nielipidowanej, wykazuje odmienną konformację, stabilność wewnętrzną oraz interakcję z receptorami błonowymi. Ponadto są zasadnicze różnice, zależne od stopnia lipidacji apo E, w wiązaniu się apo E do cząsteczki A β oraz trwałości kompleksów A β /apo E. Decydują one o właściwościach biologicznych apo E, o przewadze usuwania A β z mózgu lub też nasilonym odkładaniu się A β w postaci płytek starczych (Jiang i wsp. 2008). Doniesienia z literatury podają, iż jest ścisła zależność pomiędzy stopniem zaawansowania AD a zawartością rozpuszczalnych form A β 40. Ta zależność w większym stopniu zaznacza się w przypadku A β 40 niż A β 42, co dodatkowo uzasadnia wybór krótszej formy A β (McLean i wsp. 1999). Za tym wyborem przemawiają również wyniki badań podkreślające istotność udziału A β 40 w potęgowaniu zmian neurodegeneracyjnych w zależności od ilości allelu apo e4 u chorych cierpiących na sporadyczną postać AD (Ishii i wsp. 1997) oraz obserwacje

zależności zmian struktury i funkcji synaps komórkowych od stężenia A β 40 (Lue i wsp. 1999).

Do badań porównawczych nad potencjałem neuroprotekcijnym 1MeTIQ oraz uznanych antagonistów receptora NMDA w ekscytotoksyczności indukowanej Glu *in vitro* oraz dla oceny wpływu 1MeTIQ na indukowany przez Glu lub NMDA sygnał wapniowy, zastosowałam pierwotne hodowle neuronów ziarnistych mózdzku szczura (Schousboe i wsp. 1985, 1999, Contestabile 2002). Komórki ziarniste mózdzku stanowią największą, homogeną populację neuronów w mózgu ssaka o dobrze poznanym rozwoju. Poprzednio publikowane dane wykazały, że neurony ziarniste mózdzku w 7 DIV wykazują ekspresję funkcjonalnych receptorów jonotropowych i metabotropowych dla Glu oraz wysoką wrażliwość na toksyczne działanie agonistów tych receptorów glutaminianergicznych (Schousboe i wsp. 1985, Marini i wsp. 1999, Schousboe i wsp. 1999, Contestabile 2002, Arundine i Tymianski 2003). Stąd, ten typ hodowli pierwotnej stanowi doskonały model do badań nad molekularnymi mechanizmami prowadzącymi do przeżycia lub śmierci komórek, ze szczególnym uwzględnieniem procesów neurodegeneracji i neuroprotekcji.

Do badań *in vivo* wybrałam dwa stosowane w pracowni zwierzęce modele niedokrwienia mózgu. Pierwszy z nich, model odwracalanej ischemii przodomózgowia, przeprowadzono na myszokoczkach. Zwierzęta te charakteryzują się unikalną architekturą koła Willisa, polegającą na słabym wykształceniu połączeń pomiędzy rozgałęzieniami tętnic kręgowych i tętnic szyjnych wewnętrznych. W odróżnieniu od innych gatunków zwierząt, gdzie do wywołania ischemii konieczna jest dodatkowa koagulacja tętnic kręgowych, u myszokoczków obustronne zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych indukuje globalne niedokrwienie przodomózgowia (Crockard i wsp. 1980), co czyni ten model łatwym do wykonania pod względem technicznym, dodatkowo cechującym się sięgającą niemal 100 % przeżywalnością zwierząt po wykonanym zabiegu. W swoich badaniach użyłam 3 min. ischemii przodomózgowia, która, jak opisali to Ohtsuki i wsp. (1996) oraz Łazarewicz i wsp. (1997), indukuje śmierć blisko 70 % neuronów piramidowych w sektorze CA1 hipokampa. Taka wysoka śmiertelność komórek nerwowych daje możliwość badania potencjału neuroprotekcijnego antagonistów receptora NMDA, których ekspresja w tej strukturze mózgu jest szczególnie wysoka.

Drugim zwierzęcym modelem niedokrwienia mózgu zastosowanym w moich badaniach był model asfiksji okołoporodowej u osesków szczurzych. W tym modelu,

ekspozycji na warunki hipoksyjne poddawane są siedmiodniowe szczury, po uprzednim podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej. Na podstawie porównania szeregu parametrów opisujących i określających stopień rozwoju mózgu przyjmuje się, że siedmiodniowy szczur odpowiada stopniem rozwoju mózgu siedmiomiesięcznemu płodowi ludzkiemu. Symuluje to warunki, w jakich znajdują się noworodki przedterminowo urodzone, których nie w pełni rozwinięte mózgi są szczególnie narażone na procesy neurodegeneracyjne (Nyakas i wsp. 1996, Hagberg 1997). Wybór tego właśnie modelu spośród kilku stosowanych sposobów indukowania hipoksyjnego uszkodzenia mózgu u niedojrzałych szczurów wynika z faktu, że ma on wiele zalet przy stosunkowo niewielkiej ilości wad. Zabieg podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej przeprowadza się w przeciągu stosunkowo krótkiego czasu. Ponadto zabieg ten jest zaliczany do mało inwazyjnych i daje duże możliwości pozyskiwania materiału do opracowań statystycznych. Model asfiksji okołoporodowej jest dobrze scharakteryzowany pod względem hemodynamiki, metabolizmu energetycznego, przemian białek (Gilland i Hagberg 1996, Hagberg 1997). Za korzystną cechę stosowanego przeze mnie modelu należy uznać również to, że pozwala on badać odroczone skutki asfiksji okołoporodowej (Dell'Anna i wsp. 1991), nie powodując u badanych zwierząt żadnych ubocznych zaburzeń zdrowotnych. Do istotnych zalet tego modelu należy też fakt, iż zapis EEG szczura poddanego eksperymentalnej hipoksji/ischemii jest zgodny ze wzorem otrzymanym w warunkach klinicznych po przebytej asfiksji okołoporodowej (Hellstrom-Westas i wsp. 1995). Wszystkie podane powyżej zalety powodują, że szczurzy model hipoksji/ischemii noworodków jest szeroko stosowany na świecie. Jedną z wad stosowania tego modelu niedokrwienia mózgu, dotyczącą także modelu globalnej ischemii mózgu myszokoczka, jest uzyskanie jedynie wybiórczego uszkodzenia mózgowia, przy braku uszkodzenia innych organów, co nie przekłada się na zjawiska obserwowane w patologii ludzkiej. Z drugiej strony, w modelu asfiksji okołoporodowej noworodków wykorzystanie półkuli mózgu nie objętej uszkodzeniem jako kontroli wewnętrznej daje możliwość standaryzacji wyników.

4.2. Wpływ A β 12-28P na wychwyt oraz wewnątrzkomórkowe odkładanie się peptydów A β zależne od apo E

Główną hipotezą nadającą kierunek badań tej rozprawy było uznanie kluczowej roli apo E w procesie wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β , prowadzącym do rozwoju zjawisk o znaczeniu cytotoksycznym m. in. postępującej degeneracji synaps, a także możliwość modulacji tych procesów przez substancję blokującą wiązanie A β /apo E, A β 12-28P, oraz antagonistę receptora NMDA, 1MeTIQ.

Prowadzone od wielu lat badania nad udziałem apo E w wychwycie, wewnątrzkomórkowym odkładaniu się A β oraz mechanizmach jego toksyczności, stanowią nadal jeden z głównych nurtów badawczych, mogących przyczynić się do lepszego poznania patogenezy AD. Jak wcześniej wspomniano, stopniowa agregacja A β w nierozpuszczalne włókna prowadzi do tworzenia płytek starczych o udowodnionym działaniu zaburzającym metabolizm A β , co prowadzi do zwiększenia jego czasu półtrwania w mózgu (Cirrito et al., 2003). Istnieją więc warunki sprzyjające dalszemu odkładaniu się A β w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i tworzeniu wysoce toksycznych struktur oligomerycznych i fibrylarnych. Wg niektórych doniesień, postępującej utracie neuronów w mózgu towarzyszy niskie stężenie A β w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, niewystarczające do wystąpienia zaawansowanych zmian neurodegeneracyjnych (Harper and Lansbury 1997). Ponadto uważa się, iż cytotoksyczne działanie A β może dodatkowo opierać się na nagromadzeniu się A β wewnątrz neuronów, gdzie peptyd ten może osiągać wysokie stężenie determinujące jego toksyczność. Może to następować na skutek zwiększonej produkcji A β , nasilonego wychwytu peptydu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz/bądź osłabienia mechanizmów jego wewnątrzkomórkowej degradacji. Dane z literatury, potwierdzone wynikami tej rozprawy wskazują, że wczesne etapy AD są przede wszystkim związane z pobieraniem przez neurony monomerycznego A β , jego wewnątrzkomórkowym odkładaniem się i oligomeryzacją. Potwierdzają to liczne wyniki badań wykazujące, iż u myszy potrójnie transgenicznych (3xTg) wewnątrzkomórkowe stężenie A β ściśle koreluje z osłabieniem zjawiska LTP na skutek zachodzącej pod wpływem A β dysfunkcji synaps, co przekłada się na istotne pogorszenie pamięci oraz spadek funkcji poznawczych (Oddo i wsp. 2003, Shankar i wsp. 2009).

Tak więc obecnie badacze skupiają swoją uwagę na toksyczności indukowanej przez rozpuszczalny, niskocząsteczkowy A β (Chromy i wsp. 2003), który zapoczątkowuje zjawiska patologiczne towarzyszące wczesnym etapom demencji (Glabe 2008). Badania pokazały, iż zmiany behawioralne, degeneracja synaps oraz zaburzenia transmisji synaptycznej poprzedzają tworzenie płytek amyloidowych w mysich modelach AD (Chapman i wsp. 1999), wskazując na potrzebę poznania i zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw zjawisk zachodzących w odpowiedzi na działanie A β we wczesnych etapach jego toksyczności.

Produkowany przez neurony A β może być w dalszej kolejności uwalniany do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie zasila on pulę A β stanowiącą główne źródło tego peptydu ulegającego agregacji w formy fibrylarne w tkance mózgu (McLean 1999). Innym przeznaczeniem A β uwolnionego przez komórki nerwowe do przestrzeni pozakomórkowej jest jego wychwyt przez neurony, a dalej odkładanie się A β w przedziałach wewnątrzkomórkowych. Wydaje się więc, iż istnieje ścisła zależność pomiędzy dwoma źródłami A β : zewnątrzkomórkowym oraz wewnątrzkomórkowym, pomiędzy którymi istnieje swobodny przepływ A β (Glabe 2001).

Zdolność różnych typów komórek do pobierania A β jest zagadnieniem szeroko opisywanym w literaturze. W konsekwencji, nie tylko neurony, będące głównym źródłem A β w OUN, ale także fibroblasty (Knauer i wsp. 1992), mikroglej (Paresce i wsp. 1996), komórki neuroblastoma ludzkie (Ida i wsp. 1996) czy też komórki jajnika chomika chińskiego (Yang i wsp. 1999) są przez badaczy nierzadko stosowane jako model do badań *in vitro* nad mechanizmami toksycznego działania peptydów A β . Należy jednak zaznaczyć, iż mimo tak dużej różnorodności stosowanych modeli komórkowych, wiele mechanizmów toksyczności A β jak dotąd nie zostało dobrze scharakteryzowanych. Opisywany różny stopień wychwytu A β w odmiennych typach komórek w dużym stopniu zależy od stanu agregacji peptydu (Shankar i wsp. 2007, Chafekar i wsp. 2008). Wyniki uzyskane przez grupę badawczą Gylys'a pokazują, iż komórki grzbietowego zwoju nerwowego posiadają zdolność pobierania A β w formie oligomerycznej, a także prefibrylarnej (Gylys i wsp. 2003), podczas gdy podanie form zagregowanych do hodowli pierwotnej neuronów hipokampa nie skutkuje wychwytem A β , a jedynie powoduje wiązanie się fibryli do błony plazmatycznej za pośrednictwem m.in. β APP, receptorów RAGE czy receptorów NMDA. W efekcie dochodzi do

miejscowego gromadzenia się agregatów A β w obrębie aksonu i zmian morfologicznych określanych jako obrzęk aksonu. Z kolei neurony hipokampa poddane działaniu rozpuszczalnego A β wykazują wysoki poziom śmierci nekrotycznej wynikającej m.in. z zaburzenia funkcji mitochondriów, a w efekcie wzrostu produkcji ROS i nasilenia stresu oksydacyjnego. Sugeruje się, iż daleko posunięte procesy neurodegeneracyjne mające miejsce po ekspozycji neuronów na działanie rozpuszczalnych form A β są wynikiem odkładania się A β wewnątrz neuronów (Shah i wsp. 2009). Stąd też dobrze scharakteryzowana zdolność egzogenego A β do wywołania neurotoksyczności *in vitro* (Yankner i wsp. 1989) i *in vivo* (Geula i wsp. 1998) może zachodzić w głównej mierze poprzez zasilanie wewnątrzkomórkowej puli A β .

Istnieją doniesienia potwierdzające, iż zarówno A β 40 jak i A β 42 są sprawnie wychwytywane z przestrzeni pozakomórkowej przez wiele typów komórek, jednakże autorzy zwracają uwagę, iż obie formy A β wykazują odmienną tendencję do gromadzenia się w komórkach. Opisano bowiem wysoką odporność A β 42 na degradację, co w efekcie prowadzi do zalegania tej formy A β w endosomach i lizosomach. W przeciwieństwie do formy A β 42, A β 40 po wniknięciu do komórek miałby ulegać natychmiastowej proteolizie (Knauer i wsp. 1992, Burdick i wsp. 1997). W swoich badaniach, w których wykorzystałam obie formy A β , odnotowałam wysoką zdolność zarówno A β 40 jak i A β 42 do nagromadzania się w przedziałach wewnątrzkomórkowych neuronów hipokampa. Niezgodność moich obserwacji z wynikami innych badaczy może być związana z wykorzystaniem przez autorów odmiennych typów komórek, tj. fibroblastów oraz komórek PC12, które mogą charakteryzować się znacznie sprawniejszym metabolizmem A β 40 niż ma to miejsce w przypadku hodowli pierwotnej neuronów. Ponadto, zastosowanie przeze mnie wysokich stężeń A β 40 oraz A β 42 przypuszczalnie upośledziło działanie mechanizmów wewnątrzkomórkowej degradacji, ułatwiając odkładanie się A β w komórkach. Badane przeze mnie zagadnienie wewnątrzkomórkowej degradacji A β zostanie poruszone w dalszej części rozprawy.

Istnieje wiele mechanizmów decydujących o wychwycie A β z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jednakże podstawową rolę w tym procesie wydaje się odgrywać zjawisko endocytozy. Endocytoza jest procesem wieloetapowym. Pierwszym etapem jest wgłębienie się błony komórkowej w miejscu związania się ligandu z receptorem, po czym następuje uformowanie pęcherzyka wokół kompleksu

ligand/receptor, opłaszczanego białkami adaptorowymi - klatryną i dynaminą. Białka te są niezbędne do utworzenia pęcherzyka, jego odcięcia od błony komórkowej i dostarczenia jego zawartości do endosomów lub innych subkomórkowych przedziałów (Kumari i wsp. 2010). Obecność pewnych grup receptorów aktywnie uczestniczących w wychwycie A β sprawia, że niektóre miejsca błony komórkowej stają się bardziej wrażliwe na wiązanie się peptydów A β , a następnie na ich wychwyt z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zastosowana przez Saavedra i wsp. (Saavedra i wsp. 2007) innowacyjna technika hodowli polegająca na oddzieleniu ciała komórki od części aksonalnej pozwoliła zaobserwować, iż pobieranie A β 42 oraz jego nagromadzenie się wewnątrz neuronu zachodzi znacznie wydajniej w dystalnej części aksonu niż ma to miejsce w obszarze perikarionu. Autorzy sugerują więc, iż w obrębie aksonu znajdują się kompleksy receptorów sprawiające, iż wychwyt A β przez neurony w tej części komórki zachodzi niezwykle wydajnie. Inne badania poświęcone określeniu składu pęcherzyków endocytarnych, gdzie stwierdzono wysoką zawartość cholesterolu oraz sfingolipidów sugerują, iż wychwyt A β może zachodzić w głównej mierze w obrębie tratw lipidowych. Jak pokazują badania, w obecności błonowych tratw lipidowych dochodzi do szybkiej oligomeryzacji A β na powierzchni błony, co znacznie osłabia jego wychwyt przez neurony w miarę wydłużania czasu inkubacji z A β (Williamson i wsp. 2008). Stąd wydaje się, iż endocytoza za pośrednictwem tratw lipidowych odgrywa ważną rolę w początkowych etapach internalizacji A β (Chafekar i wsp. 2008).

Pomimo wielu spekulacji dotyczących wnikania A β do komórek, za jeden z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za transport A β do neuronów przyjęto się uważać tworzenie kompleksów peptydu z cząsteczkami białkowymi wśród których należy wyróżnić apolipoproteinę E (apo E). Wyniki badań *in vitro* potwierdzają wysokie powinowactwo wiązania się apo E do A β , w efekcie czego obie cząsteczki tworzą stabilne kompleksy (Wisniewski i wsp. 1993, Sadowski 2006). Przeprowadzone przeze mnie badania nad rolą apo E w transporcie A β do neuronów są zgodne z zaobserwowanym przez wielu badaczy wzrostem wychwytu A β w warunkach dostępności apo E (Beffert i wsp. 1998, Gylys i wsp. 2003). Również badania *in vivo* prowadzone na myszach z nokautem genu dla apo E, gdzie odnotowano drastyczny spadek zawartości A β w komórkach, potwierdziły istotny udział apo E w wychwycie oraz wewnątrzkomórkowym odkładaniu się A β (Zerbinatti i wsp. 2006). Nowym podejściem do tego zagadnienia było porównanie zdolności

neuronów hipokampa do zależnego od apo E wychwytu oraz nagromadzenia się dwóch form A β , tj. A β 40 oraz A β 42. Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, iż obecność apo E w większym stopniu sprzyja wychytowi A β 42 niż A β 40, co może świadczyć o wyższym powinowactwie apo E do A β 42.

Zagadnienie któremu poświęcona jest ta rozprawa, a więc patologiczne odkładanie się A β w komórkach z udziałem apo E i towarzysząca temu zjawisku kaskada cytotoksycznych zdarzeń, dotyczy jednej z ról jaką apo E pełni w mózgu. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż zależny od apo E wychyt A β przez neurony jest również uznawany za jeden z mechanizmów usuwania peptydów A β z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co zapobiega odkładaniu się złogów amyloidowych w tkance i naczyniach mózgu. Tak więc można mówić o dwukierunkowym działaniu apo E w OUN. W odpowiedzi na uszkodzenia mózgu lub schorzenia neurodegeneracyjne dochodzi do wzrostu uwalniania apo E przez astrocyty, co pobudza dostarczenie lipidów do uszkodzonych neuronów w celu regeneracji aksonów oraz utworzenia nowych połączeń synaptycznych (Boyles i wsp. 1989, Rapp i wsp. 2006). Ponadto w AD, spowodowany działaniem peptydów A β wzrost aktywacji astrocytów i zaostrzenie reakcji zapalnej nasila uwalnianie apo E do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Ten proces zwiększa wiązanie i usuwanie A β poprzez wychyt kompleksów A β /apo E przez otaczające neurony, co skutkuje zmniejszeniem stanu aktywacji astrocytów oraz osłabieniem reakcji zapalnej (Hu i wsp. 1998). Z drugiej strony uwolniona przez astrocyty apo E zwiększa obrót metaboliczny β APP w obrębie neuronu nasilając produkcję A β , który uwolniony do przestrzeni zewnątrzkomórkowej może ulegać agregacji w nierozpuszczalne struktury fibrylarne. Proces ten może zachodzić znacznie szybciej w obecności apo E z uwagi na zdolność tej cząsteczki do ułatwiania zmian konformacyjnych A β w strukturę β -kartki, decydującą o cytotoksycznych właściwościach tego peptydu (Ma i wsp. 1994, Wisniewski i wsp. 1994). Jak pokazały badania *in vitro*, apo E posiada również zdolność wiązania się do białka tau, co może wskazywać na bezpośredni udział apo E w tworzeniu splotów neurofibrylarnych w neuronach, zjawisku nieodłącznie towarzyszącym neurotoksyczności A β (Hu i wsp. 1998).

Pomimo licznych doniesień na temat udziału apo E w zwiększonym wychycie A β przez neurony i nasilaniu procesów neurodegeneracyjnych, istnieją prace świadczące o fizjologicznej roli apo E w wewnątrzkomórkowej degradacji A β oraz wspomaganie działania IDE (ang. insulin degrading enzyme), enzymu

rozkładającego A β w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Jiang i wsp. 2008). Z drugiej jednak strony, Fuentealba i wsp. (2010) zademonstrowali, iż w mysiej linii komórkowej neuroblastoma (Neuro-2A) wykazującej zwiększoną ekspresję receptorów LRP, ekspozycja hodowli na działanie A β 42 prowadzi do zależnego od czasu wychwytu A β z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, którego detekcję stwierdzono w strukturach szlaku endocytarnego. Autorzy zwracają uwagę na fakt, iż po 48 godz. od rozpoczęcia inkubacji hodowli z A β , w komórkach Neuro-2A rozpoczyna się proces nagromadzania się peptydów A β na skutek upośledzonej zdolności neuroblastoma do zachodzącej w lizosomach degradacji A β . Jednocześnie autorzy doniesienia spekulują, iż jedynie ciągła ekspozycja neuronów na działanie wysokich stężeń A β i towarzyszący temu wychwyt A β przez komórki, może w znacznym stopniu ograniczać zdolność lizosomów do metabolizmu tak dużej puli pobranego A β , co w konsekwencji będzie prowadziło do zalegania A β w tych strukturach, ich agregacji i neurodegeneracji. Nasuwa się więc pytanie czy obserwowany przeze mnie zależny od apo E wzrost odkładania się A β w komórkach poddanych działaniu wysokich stężeń A β 40 może być związany z upośledzeniem zdolności apo E do wspomaganie wewnątrzkomórkowej degradacji A β . Jak pokazują wyniki moich badań, neurony hipokampa poddane 6 godz. ekspozycji na działanie A β przy dostępności apo E charakteryzują się znacznie niższym wskaźnikiem metabolizmu A β niż ma to miejsce pod nieobecność apo E. Tak więc, obserwowany przeze mnie wzrost nagromadzania się A β w neuronach warunkowany nasilonym wychwytem tego peptydu w obecności apo E wydaje się korelować z utratą przez tą cząsteczkę funkcji wspierania efektywnej degradacji A β . Na podstawie moich obserwacji można wnioskować, iż w warunkach wysokich stężeń A β wpływ apo E na odkładanie się A β w komórkach oraz ewentualne potęgowanie jego cytotoksycznego działania przeważa nad ochronnymi właściwościami apo E jako cząsteczki zaangażowanej w metabolizm A β .

Badania tej pracy potwierdzają istotność udziału mechanizmów angażujących apo E w wewnątrzkomórkowym odkładaniu się A β , a w konsekwencji możliwość zastosowania związków mogących zapobiegać wychwytoowi kompleksów A β /apo E. Pionierami w tej dziedzinie byli Ma i wsp. (1996), którzy na podstawie opisanej poprzednio sekwencji aminokwasowej odpowiadającej za interakcję A β z apo E (Strittmatter i wsp. 1993), zaprojektowali peptyd będący homologiem motywu 12-28. Peptyd ten określony mianem A β 12-28 okazał się być skuteczny w hamowaniu

wiązania się A β do apo E, wynikiem czego był obserwowany przez autorów spadek tworzenia struktur fibrylarnych przez A β oraz wzrost przeżywalności komórek w hodowli pierwotnej neuronów (Ma i wsp. 1996). Istniało jednak podejrzenie, iż z uwagi na decydujący wpływ sekwencji 14-21 w toksyczności A β oraz udział tego fragmentu w odkładaniu się A β w mózgu w formie plak amyloidowych, peptyd A β 12-28 może przyczyniać się do szybszego rozwoju zmian patologicznych towarzyszących AD. Postęp badań nad właściwościami biologicznymi peptydu A β 12-28 doprowadził do opracowania związku wykazującego cechy inhibitora wiązania A β /apo E charakteryzującego się wydłużonym okresem półtrwania *in vivo*, przy jednoczesnym wykluczeniu jego cytotoksycznego działania (Sadowski i wsp. 2004, 2006). Pomimo niezwykle obiecujących wyników badań *in vivo*, które dostarczyły dowodów na zdolność A β 12-28P do zapobiegania odkładaniu się A β w parenchymie oraz w naczyniach mózgu, jak również do redukcji już istniejących plak amyloidowych, niewiele wiadomo na temat potencjalnego działania ochronnego A β 12-28P na poziomie komórkowym. Zagadnienie to stało się głównym przedmiotem moich badań, i właśnie jemu w dużej części poświęcona jest ta rozprawa. Odnosząc się do wyników poprzednich badań na temat roli apo E w zwiększonym wychwycie A β przez neurony, w pierwszej kolejności niezbędne było określenie roli hamowania tworzenia kompleksów A β /apo E przez A β 12-28P na wychwyt oraz wewnątrzkomórkowe odkładanie się A β . Wyniki moich badań wskazują, że A β 12-28P ogranicza wychwyt zarówno A β 40 jak i A β 42 z przestrzeni pozakomórkowej, a mechanizm tego działania polega na hamowaniu interakcji pomiędzy A β a apo E. Ponadto, na skutek obniżenia transportu A β do neuronów w obecności A β 12-28P był obserwowany spadek nagromadzania się A β wewnątrz komórek, co może sugerować ochronne działanie A β 12-28P w mechanizmach toksyczności A β .

4.3. Wpływ nagromadzania się A β w neuronach na procesy oligomeryzacji oraz fibrylizacji A β : modulacja przez A β 12-28P

Na istotność zjawiska wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji w neurotoksyczności A β zwróciła uwagę Walsh i wsp. (2000), którzy opowiedzieli się za tezą, iż wewnątrz komórek proces oligomeryzacji A β zachodzi znacznie wcześniej i w większym stopniu niż ma to miejsce w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Również grupa Takahashi zaobserwowała agregację A β w formy oligomeryczne w obrębie

synaps oraz zakończeń synaptycznych zarówno w mózgach myszy transgenicznych Tg2576 jak i wywodzących się od tych myszy pierwotnych hodowli neuronów (Takahashi i wsp. 2004), któremu to zjawisku towarzyszyła postępująca dysfunkcja oraz degeneracja synaps, tak typowa dla wczesnych etapów AD (Ingelsson i wsp. 2004). Z kolei badania *in vivo* pokazały, iż jedynie wewnątrzkomórkowe oligomery A β indukują ostre zakłócenia plastyczności synaptycznej oraz wpływają na przejściowe pogorszenie się zdolności zapamiętywania u zwierząt (Walsh i wsp. 2002, Cleary i wsp. 2005).

W zaprezentowanych przeze mnie badaniach dowiodłam, iż w warunkach dostępności apo E degradacja A β w neuronach jest ograniczona, wynikiem czego jest nasilone odkładanie się peptydu wewnątrz komórek. Te obserwacje stały się podstawą do zbadania, czy upośledzona degradacja A β w obecności apo E może wynikać jedynie z dysfunkcji apo E w kierunku efektywnego metabolizmu A β , czy też apo E może przyczyniać się do wewnątrzkomórkowej agregacji A β , co w znacznej mierze utrudniałoby usuwanie peptydu z komórek. Jak dotąd nie zostało wyjaśnione zagadnienie losów apo E po wniknięciu kompleksów A β /apo E do neuronów. W warunkach fizjologicznych, rola apo E sprowadza się do transportu lipidów do neuronów za pośrednictwem receptorów LDLR, po czym apo E oddysocjowuje od cząsteczki transportowanej i powraca do obiegu. Istnieje jednak możliwość, iż na skutek nasilonego wychwytu kompleksów A β /apo E przez neurony, jak również wzrostu zawartości A β w komórkach skutkującego zaburzeniami procesów endocytozy/egzocytozy, apo E może pozostawać w komórce w postaci kompleksów z A β , tworząc rdzeń do przyłączania kolejnej puli peptydu. Założenie to wydaje się tym bardziej prawdopodobne, iż znana jest zdolność apo E do ułatwiania zmiany konformacji A β w strukturę β -karty, warunkującej tworzenie agregatów A β o działaniu cytotoksycznym. Ponadto, badania immunohistochemiczne wykazały obecność apo E w płytkach amyloidowych utworzonych przez włóknkowy A β (Wisniewski i wsp. 2003), co mogłoby przemawiać za udziałem apo E w agregacji A β w nierozpuszczalne złogi. Stąd też, za moją hipotezę roboczą przyjąłam twierdzenie, iż w stanach patologicznego nagromadzania się A β w neuronach, którym towarzyszy zaburzenie procesów usuwania A β z komórek, dochodzi do wewnątrzkomórkowej agregacji A β w formy oligomeryczne oraz/bądź fibrylarne. Aby to sprawdzić, oceniłam poziom oligomerów w neuronach hipokampa wystawionych na działanie wysokich stężeń A β w obecności apo E. Jak pokazują wyniki moich badań, w

warunkach stałej dostępności A β 40 lub A β 42 w medium hodowlanym, dochodzi do nagromadzenia się peptydu w czystej hodowli neuronów hipokampa, co koresponduje z tworzeniem form oligomerycznych. Postulowane przez wielu badaczy różnice w tempie agregacji poszczególnych form A β w zależności od stopnia ich hydrofobowości zostały potwierdzone w moich badaniach, gdzie poziom oligomerów A β 42 w czystej hodowli neuronów znacznie przewyższał ilość oligomerów A β 40 oznaczonych w komórkach po tym samym czasie inkubacji. Ponadto zaobserwowałam, iż zapewnienie dostępności apo E, skutkujące wzrostem wychwytu A β przez neurony, prowadzi do nasilenia procesu wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji obu form A β , przy czym stężenie oligomerów A β 40 oraz A β 42 w komórkach było porównywalne. Na tej podstawie można stwierdzić, iż wysokie stężenie A β w neuronach sprzyja jego wewnątrzkomórkowej agregacji w formy oligomeryczne. Co ważniejsze, wykazany w moich wcześniejszych badaniach znacznie wyższy stopień wychwytu A β 42 w porównaniu do A β 40 indukowany apo E, nie przekłada się na proporcjonalny wzrost stężenia oligomerów w komórkach co sugeruje, iż rola apo E w procesie wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji A β może nie ograniczać się jedynie do nasilania transportu peptydu do komórek.

Odkąd zaobserwowano obecność form oligomerycznych A β w tkance mózgu osób z AD (Gong i wsp. 2003) oraz w mózgach myszy transgenicznym z objawami tego schorzenia (Oddo i wsp. 2006), przyjął się pogląd, iż wewnątrzkomórkowe nagromadzenie się A β i jego agregacja w formy oligomeryczne odporne na działanie proteaz może odgrywać istotną rolę w tworzeniu złogów A β *in vivo*, zjawiska nasilającego się w miarę rozwoju AD (Knauer i wsp. 1992). Stąd, niezwykle istotne wydaje się podjęcie próby blokowania procesu oligomeryzacji A β w neuronach. Moje badania pokazują, iż hamowanie tworzenia kompleksów pomiędzy A β a apo E poprzez zastosowanie inhibitora wiązania A β /apo E, A β 12-28P, co przekłada się na osłabienie wychwytu A β przez neurony, prowadzi do znaczącej redukcji stężenia oligomerów A β w komórkach. Wyniki te świadczą, iż głównym źródłem A β wchodzącego w skład wewnątrzkomórkowych agregatów jest A β pobrany przez neurony z przestrzeni pozakomórkowej, a proces wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji A β może być efektywnie hamowany przez substancje zapobiegające transportowi kompleksów A β /apo E do komórek.

U pacjentów cierpiących na AD stwierdzono obecność form fibrylarnych w mózgu występujących w postaci płytek starczych. Przytoczone powyżej sugestie

dotyczące wpływu oligomerów A β obecnych w neuronach na tworzenie form fibrylarnych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Knauer i wsp. 1992), nasuwają pytanie o możliwość przechodzenia A β w kolejne stadia agregacji wewnątrz komórek w miarę wydłużenia czasu inkubacji neuronów z A β . Jednak wyniki moich badań nie dostarczyły dowodów na istnienie struktur fibrylarnych A β w neuronach po 72 godz. inkubacji co dowodzi, iż zwiększony wychwyty A β w obecności apo E sprzyja procesowi oligomeryzacji, lecz nie fibrylizacji A β . Stąd też mechanizmy neurotoksyczności A β rozważane w dalszej części rozprawy mogą być przypisane odkładaniu się A β w postaci form oligomerycznych w przedziałach wewnątrzkomórkowych.

4.4. Subkomórkowa lokalizacja A β w obecności inhibitora wychwyty i nagromadzenia się peptydu, A β 12-28P

Odkąd za jeden z wczesnych markerów rozwoju AD przyjęto się uważać wewnątrzneuronalne odkładanie się peptydów A β , które zapoczątkowuje kaskadę patologicznych zdarzeń prowadzących do neurodegeneracji, badacze skupili swoją uwagę na dokładnym poznaniu mechanizmów uczestniczących w wychwyty A β przez neurony oraz jego transporcie w obrębie komórek. Poprzednie prace wskazują, iż jednymi z podstawowych przedziałów wewnątrzkomórkowych odpowiadających za nagromadzenie się β APP, jak również produktów jego metabolizmu w neuronach są późne endosomy i lizosomy (Wisniewski i wsp. 1991, Golde i wsp. 1992) Jedną z grup badawczych (Takahashi i wsp. 2004), która również za miejsce wewnątrzkomórkowej lokalizacji A β przyjęła uważać struktury ścieżki endosomalno/lizosomalnej sugeruje, iż właśnie te organella przez wzgląd na panujące w nich niskie pH (3,5-6,5) stwarzają odpowiednie warunki do procesu agregacji A β w formy oligomeryczne. Z kolei Gregori i wsp. (1995) dokonali obserwacji, iż nagromadzony w neuronach oligomeryczny A β bezpośrednio wpływa na upośledzenie działania proteasomów, a więc struktur odpowiedzialnych za wewnątrzkomórkową degradację peptydu, sprzyjając jego dalszemu nagromadzeniu się w komórkach. Jednym z efektów patologicznego nagromadzenia się A β wewnątrz pęcherzyków endocytarnych i wielopęcherzykowych ciałek błonowych jest zaburzenie obiegu pęcherzyków transportujących w obrębie komórki, co prowadzi do upośledzenia procesu endocytozy oraz transportu aksonalnego (LaFerla i wsp.

1997). Zaobserwowano bowiem, iż długo utrzymujące się wysokie stężenie A β na zewnątrz komórki prowadzi do spowolnienia wychwytu A β na drodze endocytozy na skutek zalegania peptydu w endosomach i lizosomach, co jest przyczyną powiększenia rozmiaru tych struktur oraz spowolnienia tworzenia nowych pęcherzyków. Zjawisko to ma jednak miejsce jedynie wówczas gdy A β przyjmuje formę monomerów lub niewielkich oligomerów, gdyż większe formy oligomeryczne mają tendencję do zalegania i agregowania na powierzchni komórek, nie są więc pobierane przez neurony (Almeida i wsp. 2006, Chafekar i wsp. 2008). Przedstawione powyżej wyniki badań *in vitro* znalazły potwierdzenie w obrazach mikroskopowych uzyskanych z mózgu pacjentów z AD, gdzie stwierdzono znaczne powiększenie rozmiaru endosomów oraz lizosomów (Cataldo i wsp. 2000). Wyniki te wskazują na potencjalny cel dla efektywnego zapobiegania nagromadzenia się i oligomeryzacji A β w przedziałach wewnątrzkomórkowych.

Jak pokazały moje wcześniejsze badania, podwyższonemu stężeniu A β w przestrzeni pozakomórkowej towarzyszy sprawny wychwyt A β przez neurony, przy jednoczesnym osłabieniu procesów jego wewnątrzkomórkowej degradacji na skutek postępującej oligomeryzacji peptydu w komórkach. W dalszych badaniach sprawdziłam, czy zależny od apo E wzrost wychwytu monomerycznego A β 40 oraz odkładania się tego peptydu w formy oligomeryczne znajdzie odbicie we wzroście zawartości A β w wybranych strukturach komórkowych. Wykorzystanie specyficznych markerów znakujących struktury ścieżki endosomalno/lizosomalnej oraz mitochondria pozwoliło mi zaobserwować współ-lokalizację A β z badanymi organellami komórkowymi. Wzrost wychwytu A β spowodowany obecnością apo E przekładał się wyraźnie na wzrost immunoreaktywności A β w obrębie późnych endosomów (RAB7-pozytywne) oraz lizosomów (katepsyna D-pozytywne), jak również odnotowałam słabiej zaznaczony wzrost zawartości A β we wczesnych endosomach (EEA1-pozytywne) oraz mitochondriach (Hsp60-pozytywne). Potwierdza to wskazywaną przez wielu badaczy istotność udziału struktur szlaku endosomalno/lizosomalnego w wewnątrzkomórkowym nagromadzeniu się oraz oligomeryzacji A β . Wiedząc już, iż istnieje ścisły związek pomiędzy nasileniem wychwytu A β z udziałem apo E a odkładaniem się peptydu w wybranych organellach komórkowych, dokonałam oceny wpływu A β 12-28P na gromadzenie się A β w komponentach ścieżki endosomalno/lizosomalnej oraz w mitochondriach. Zaobserwowałam, iż blokowanie wiązania pomiędzy A β oraz apo E i wynikający z tego osłabiony wychwyt

kompleksów A β /apo E przez neurony prowadzi do istotnego spadku zawartości A β we wszystkich badanych strukturach komórkowych. Na tej podstawie można sądzić, iż zależne od apo E przenikanie A β do neuronów zachodzi przede wszystkim na drodze endocytozy, efektem czego jest nagromadzenie się A β w komponentach ścieżki endosomalno/lizosomalnej, a zjawisko to jest skutecznie hamowane przez inhibitora wiązania A β /apo E.

Drugim mechanizmem uznawanym przez wielu badaczy za główny proces pobierania A β przez komórki, jest przyłączenie się A β do miejsc na błonie bogatych w sfingolipidy oraz cholesterol, a dalej wychwyt A β w obrębie tratw lipidowych. W odróżnieniu od potwierzonego przeze mnie mechanizmu wychwytu A β na drodze endocytozy angażującej cząsteczki białkowe, endocytoza A β zależna od obecności lipidów błonowych wyklucza udział koszyczków klatrynowych, co przekłada się na brak współ-lokalizacji A β z markerem wczesnych endosomów- EEA1 (Saavedra i wsp. 2007). Wydaje się więc, iż przenikanie A β do komórek może angażować jednocześnie wiele różnych mechanizmów, co niezwykle komplikuje możliwość zastosowania inhibitorów wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β działających selektywnie na poszczególne ścieżki wychwytu.

Należy zaznaczyć, iż obok struktur tworzących szlak endosomalno/lizosomalny, obecność agregatów A β stwierdzono w mitochondriach komórek mózgu myszy transgenicznym Tg2576 (Manczak i wsp. 2006) oraz w izolowanych mitochondriach otrzymanych z mózgu pacjentów z AD (Hirai i wsp. 2001). Zjawisko to obserwowałam także w moich badaniach. Pochodzenie A β w mitochondriach jak dotąd nie zostało wyjaśnione. Sugeruje się, iż peptyd ten może ulegać translokacji z cytozolu do mitochondriów, jednakże dokładny mechanizm odpowiedzialny za nagromadzenie się A β w cytozolu również jest nieznan. Wiadomo, iż w AD ma miejsce zahamowanie aktywności kluczowych enzymów mitochondrialnych, efektem czego jest wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych będących induktorami stresu oksydacyjnego, co w efekcie prowadzi do uwolnienia z uszkodzonych strukturalnie mitochondriów cytochromu c, a w dalszej kolejności do apoptotycznej śmierci komórek (Reddy i Beal 2008.) Stąd też mogę przypuszczać, iż obserwowany przeze mnie efekt zmniejszonego odkładania się A β w mitochondriach w obecności A β 12-28P może w konsekwencji hamować zależne od ROS procesy patologiczne prowadzące do neurodegeneracji.

Obok detekcji A β w badanych przeze mnie strukturach komórkowych, moje wyniki wskazują na istnienie znacznej puli A β , nie wykazującej współ-lokalizacji z żadnym z użytych znaczników struktur ścieżki endosomalno/lizosomalnej. Sugeruje to, że pobierany z przestrzeni zewnątrzkomórkowej A β , poza gromadzeniem się w badanych organellach komórkowych, odkłada się także w cytozolu, co może dodatkowo przyczyniać się do jego cytotoksyczności. Takahashi i wsp. (2004), badając przy pomocy mikroskopu elektronowego wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie endogennego A β w pierwotnej hodowli neuronów z myszy transgenicznym Tg2576, wykazali obecność A β zarówno w komponentach ścieżki endosomalno/lizosomalnej, ze szczególnym uwzględnieniem ciałek wielopęcherzykowych, jak i w cytozolu. A β wykrywalny w cytozolu, gromadził się w dużej ilości wzdłuż wiązki mikrotubul w wypustkach neuronalnych, co sugeruje, iż może on zaburzać transport aksonalny. Podobne wyniki uzyskali Shah i wsp. (2009), którzy obserwowali skupianie się wzdłuż mikrotubul agregatów A β podanych do hodowli mysich komórek neuroblastoma N2a, które w następstwie prowadziły do osłabienia transportu aksonalnego. Zjawisko to było tłumaczone tworzeniem przez A β fizycznej blokady dla przemieszczania się białek motorycznych. Tak więc doniesienia literaturowe, podobnie jak wyniki przedstawione w tej rozprawie, wskazują na różnorodne rozmieszczenie A β w obrębie komórki, którego lokalizacja w neuronach, w przypadku zarówno egzogenego A β jak i endogenego peptydu powstającego na drodze wewnątrzneuronalnej proteolizy β APP, jest bardzo zbliżona.

4.5. Wpływ hamowania wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β na synapsy glutaminianergiczne

Zaprezentowane przeze mnie wyniki badań wskazujące na możliwość zapobiegania odkładania się A β oraz jego oligomeryzacji w strukturach ścieżki endosomalno/lizosomalnej poprzez zastosowanie A β 12-28P, skłoniły mnie do sprawdzenia czy hamowanie procesu wewnątrzkomórkowego nagromadzenia się A β może wpływać na zjawiska towarzyszące wczesnej toksyczności A β . Odkąd zaobserwowano, iż podanie rozpuszczalnego A β do hodowli organotypowej hipokampa ściśle koreluje z odkładaniem się tego peptydu w neuronach w obrębie rejonu CA1, co z kolei wiąże się ze spadkiem ekspresji markera synaps - synaptofizyny (Bahr i wsp. 1998), wielu badaczy za wczesny przejaw

neurotoksyczności A β uważa zmiany struktury i funkcji synaps glutaminianergicznych. Jednym z pierwszych widocznych sygnałów patologicznego odkładania się A β w komórkach jest istotne obniżenie poziomu białka gęstości postsynaptycznej, PSD-95, jakie odnotowano we frakcji izolowanych błon synaptosomalnych (Almeida i wsp. 2005). PSD-95 jest białkiem zaangażowanym w regulację plastyczności synaptycznej poprzez udział w dostarczaniu receptorów NMDA na powierzchnię komórek nerwowych podczas kształtowania się synaps na powierzchni kolców dendrytycznych, jak również zakotwiczenie kompleksów receptorowych w błonie plazmatycznej (Ehrlich i Malinow 2004). Kolce dendrytyczne są strukturami plastycznymi odpowiedzialnymi za przechowywanie informacji synaptycznej oraz za procesy pamięci, gdzie zlokalizowane są głównie synapsy glutaminianergiczne (Hering i Sheng 2001). Stąd też zmiany zachodzące w obrębie kolców dendrytycznych indukowane peptydami A β stanowią główny czynnik odpowiedzialny za zaburzenia neurotransmisji synaptycznej. Wykazano, iż oligomery A β wiążąc się z białkiem cytoszkieletu kolców dendrytycznych, drebryną, mają tendencję do tworzenia skupisk w ich obrębie i tam wykazują swoje działanie toksyczne. Polega ono m.in. na zakłóceniu ekspresji białka Arc, niezbędnego w procesach pamięci, które może wpływać na zaburzenie ekspresji oraz transportu cząsteczek receptorowych (Takahashi i wsp. 2003, Lacor i wsp. 2004). Wiązanie się oligomerów A β w obrębie synaps glutaminianergicznych zostało potwierdzone poprzez wykazanie współ-lokalizacji oligomerycznego A β oraz PSD-95 i NR1/NMDA, co może wskazywać na istnienie fizycznej interakcji pomiędzy receptorem NMDA a A β . Dodatkowo zaobserwowano, iż inkubacja dojrzałych neuronów hipokampa z frakcją oligomeryczną A β 40 lub A β 42 już po okresie 1 godz. prowadzi do znacznego spadku poziomu podjednostki NR1 oraz NR2B na powierzchni dendrytów, bez wpływu na całkowity poziom receptorów NMDA w komórkach (Lacor i wsp. 2007). Zjawisku temu towarzyszy istotny spadek immunoreakcji drebryno-pozytywnych wypustek, jak również rozwój znaczących zmian morfologicznych kolców dendrytycznych polegających na ich wydłużaniu się oraz zmniejszeniu ich gęstości na powierzchni dendrytów. Co istotne, efekt ten nie był obserwowany w przypadku monomerycznych form A β 40 (Lacor i wsp. 2004). Na tej podstawie można sądzić, iż monomeryczną postać A β cechuje odmienny mechanizm obniżania puli receptorów NMDA na powierzchni dendrytów niż ma to miejsce w przypadku form zagregowanych. Wiadomo, iż oligomery A β skupiają się w obrębie synaps

glutaminianergicznym i za pośrednictwem receptorów NMDA prowadzą do aktywacji kaskady zdarzeń w komórce, jak wspomniana przeze mnie zmiana ekspresji białka Arc, prowadzących do zakłócenia transportu wewnątrzkomórkowego. Z kolei w przypadku monomerycznego A β można przypuszczać, iż zaburzenie struktury synaps wymaga wcześniejszej internalizacji peptydu, a następnie jego nagromadzenia się w organellach ścieżki endosomalno/lizosomalnej, co wpływa bezpośrednio na upośledzenie transportu cząsteczek zaangażowanych w proces endocytozy/egzocytozy, w tym również podjednostek receptora NMDA oraz białek postsynaptycznych, na powierzchni neuronów. Jak podaje Shah i wsp. (2009), odkładanie się A β w neuronach może zaburzać transport aksonalny na dwa sposoby. Gromadzenie się A β wzdłuż wiązki mikrotubul, stanowi fizyczną blokadę dla przemieszczania się białek motorycznych. Alternatywny mechanizm obejmuje zasilanie puli agregującego w neuronach A β , który w takiej postaci indukuje kaskadę zdarzeń prowadzącą do załamania się stabilności cytoszkieletu i osłabienia transportu aksonalnego (Shah i wsp. 2009).

W moich badaniach odniosłam się do przedstawionych powyżej wyników innych grup badawczych na temat mechanizmu działania egzogennych oligomerów A β na poziom NR1/NMDA, jak również do doniesień na temat udziału A β nagromadzonego w neuronach w postępującej utracie białek synaptycznych. Do oceny wpływu nagromadzenia się A β w przedziałach wewnątrzkomórkowych na wzór powierzchniowych markerów neuronalnych użyłam monomerycznego A β 40 sprzężonego ze znacznikiem fluorescencyjnym FITC. Wykorzystałam też informacje dostarczone przez Vazhappily i wsp. dotyczące czasu trwania pełnego obrotu podjednostki NR1 w komórce, który wynosi 16 godz. (Vazhappily i Sucher 2002). Pozwoliło mi to na analizę daleko posuniętych procesów degeneracji synaps związanych z obniżeniem puli receptorów NMDA na powierzchni komórek po 72 godz. inkubacji neuronów hipokampa z A β . Zaobserwowany przeze mnie znaczący spadek immunoreaktywności NR1/NMDA korespondował z istotnym obniżeniem detekcji dwóch pozostałych znaczników synaptycznych tj. PSD-95 oraz synaptofizyny. Istnieją przesłanki, iż spadek immunoreaktywności powierzchniowych markerów neuronalnych może się wiązać z zaburzeniem transportu wewnątrzkomórkowego i upośledzeniem obiegu ciałek wielopęcherzykowych. Jak wskazuje praca Pigino i wsp. (2009), zaburzenie transportu aksonalnego przez nagromadzone w neuronach peptydy A β ma miejsce jedynie wówczas, gdy A β

przyjmuje formę oligomerów, nie występuje natomiast w przypadku monomerów bądź fibryli A β . Guillaud i wsp (2003), utratę podjednostek NR1/NMDA w błonie plazmatycznej tłumaczy zakłóceniem transportu wzdłuż wiązki mikrotubul wypustek dendrytycznych, za które wydaje się odpowiadać białko należące do rodziny białek motorycznych, KIF17. Stwierdzono bowiem, iż KIF17 wiąże się specyficznym z kompleksem białek gęstości postsynaptycznej, w tym również PSD-95, z którym to związana jest także podjednostka NR2B receptora NMDA. Stosując model hodowli pierwotnej neuronów hipokampa wykazano, iż KIF17 odpowiada za transport podjednostki NR2B do synaps glutaminianergicznych na powierzchni komórek nerwowych. Z kolei wprowadzenie mutacji w domenę transportującej KIF17, przejawiającej się utratą funkcjonalności tego białka, prowadzi do spadku w obrębie synaps ilości receptorów NMDA mających w swoim składzie podjednostkowym NR2B, któremu to zjawisku towarzyszy nieznaczne gromadzenie się tej podjednostki w ciele komórki. Odnosząc się do przywołanych przeze mnie doniesień literaturowych, jak również powołując się na wyniki moich poprzednich badań, w których wykluczyłam istnienie form fibrylarnych A β , natomiast dowiodłam obecności oligomerów A β w neuronach, mogę wysnuć wniosek, iż zaobserwowany przeze mnie spadek poziomu powierzchniowych białek synaptycznych przy jednoczesnym wzroście zawartości A β w komórkach, jest ściśle związany z zależnym od oligomerów A β załamaniem się systemu transportującego zarówno w dendrytach jak i wzdłuż aksonu. Za tą tezę przemawiają dodatkowo wyniki moich badań pokazujące dalszy spadek immunoreaktywności białek synaptycznych na powierzchni komórek, gdy A β podawany był w obecności apo E. Obniżenie gęstości markerów neuronalnych w warunkach dostępności apo E koresponduje więc ze wzrostem poziomu oligomerów A β w neuronach. Ta obserwacja skłoniła mnie do kontynuowania toku badań testujących możliwość zapobiegania utracie białek synaptycznych poprzez zastosowanie A β 12-28P. Moje wyniki wskazują, iż ograniczenie transportu A β do komórek nerwowych oraz spowolnienie procesu wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji A β poprzez użycie specyficznego antagonisty wiązania A β /apoE, przywraca ekspresję wszystkich badanych markerów synaps. Za podstawowy mechanizm działania monomerycznej formy A β na degenerację synaps można więc uznać stopniowe nagromadzenie się A β w komórkach, które sprzyja jego wewnątrzkomórkowej agregacji w formy oligomeryczne powodujące zaburzenia

transportu komórkowego, które uniemożliwiają dostarczanie białek synaptycznych do błony plazmatycznej.

Istnieje hipoteza zaproponowana przez Synder i wsp. (2005), iż odnotowany przez badaczy brak zmian w całkowitym poziomie NR1 i NR2B w komórce w obecności A β wynika z redystrybucji NR1/NMDA z okolic synaps do miejsc pozasynaptycznych. Zjawisko to nie było jednak związane ze spadkiem ekspresji NR1 na powierzchni komórki. W tej pracy zaobserwowałam drastyczny spadek poziomu immunodetekcji NR1/NMDA, PSD-95 oraz synaptofizyny na powierzchni neuronów przy braku wpływu A β na całkowity poziom tych markerów synaptycznych w lizatach komórkowych. Podobne zjawisko zostało już wcześniej opisane przez Lacor i wsp. (2007), którzy po podaniu oligomerycznego A β do hodowli neuronów hipokampa nie odnotowali zmian w całkowitym poziomie podjednostki NR1/NMDA przy jednoczesnym spadku detekcji tej podjednostki na powierzchni komórek. Jak wiadomo, większość białek synaptycznych powstaje w ER, a następnie jest transportowana na powierzchnię komórki. Tak więc w przeciągu całego okresu życia komórki, białka te występują zarówno w ciele komórki, dendrytach jak i w obrębie synaps (Lacor i wsp. 2007). Stąd, oznaczony przeze mnie stały poziom białek synaptycznych we wszystkich wariantach eksperymentu może dodatkowo przemawiać za załamaniem się transportu wewnątrzkomórkowego, wynikiem czego jest zahamowanie dostarczania białek synaptycznych na powierzchnię komórek i ich gromadzenie się wewnątrz neuronów.

4.6. Wpływ odkładania się A β w neuronach na stopień ufosforylowania białka tau

Istnieje przekonanie, iż jednym z bardziej powszechnych przejawów neurotoksyczności A β jest nieprawidłowa fosforylacja białka tau a następnie jego stopniowa agregacja w parzyste, spiralnie skręcone włókna w ramach cytoszkieletu komórek nerwowych, tzw. filamenty helikalne (ang. paired helical filaments, PHFs) (Busciglio i wsp. 1995). Podobnie jak oligomery A β , pośrednie formy agregacji białka tau są silnie cytotoksyczne, powodując zaburzenie transportu aksonalnego (Khlistunova i wsp. 2006), a tym samym przyczyniając się do szybszej śmierci komórek. Ponadto wykazano, iż zwiększony poziom zarówno ufosforylowanej formy tau jak i całkowitego poziomu tego białka w płynie mózgowo-rdzeniowym prowadzi do istotnego osłabienia funkcji poznawczych (Santacruz i wsp. 2005). Stąd też

oznaczenie ilości ufosforylowanych form białka tau oraz jego całkowitego poziomu w płynie mózgowo-rdzeniowym stanowi jeden z podstawowych markerów wskazujących na stopień zaawansowania AD (Mattsson i wsp. 2009).

Dowiedziano, iż odkładanie się A β w neuronach poprzedza tworzenie splotów neurofibrylarnych i sprzyja agregacji białka tau (Lewis i wsp. 2001). Z drugiej strony stwierdzono, iż wywołana przez peptydy A β degeneracja komórek nerwowych w pierwotnej hodowli neuronów korowych (Rapoport i wsp. 2002) oraz neuronów mózgu myszy transgenicznym z objawami AD (Roberson i wsp. 2007) wymaga obecności endogennych agregatów białka tau. Proponowany model działania egzogenego A β zakłada inaktywację ścieżki PI3K, wynikiem czego jest defosforylacja kinazy białkowej GSK3 β , a tym samym wzrost jej aktywności, prowadzący do nasilenia zmian patologicznych obserwowanych w AD. Nie jest znany mechanizm receptorowy za pośrednictwem którego zachodzi ten proces (Alvarez i wsp. 2002). Badania *post mortem* tkanek mózgu pacjentów z AD wykazały, iż rozmieszczenie kinazy GSK3 β w komórce pokrywa się z miejscami występowania nadmiernie ufosforylowanego białka tau podczas wszystkich etapów rozwoju AD, co świadczy o istotnej roli tego enzymu w patogenezie tego schorzenia (Habas i wsp. 2006). Poza GSK3 β , do grupy białek odpowiedzialnych za stopień ufosforylowania białka tau należą także kinazy, których aktywność jest ściśle związana z homeostazą jonów wapnia jak zależna od kalmoduliny kinaza CaMKII. Wykazano, iż do aktywacji tego enzymu dochodzi na skutek wzrostu stężenia wapnia wewnątrz komórek na skutek napływu jonów wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Tak więc można spodziewać się wzrostu aktywności kinazy CaMKII w odpowiedzi na pobudzenie receptorów NMDA, a w efekcie wzrostu fosforylacji białka tau zarówno poprzez nasilenie aktywności kinaz białkowych jak i w wyniku towarzyszącego mu spadku aktywności fosfataz białkowych (Liu i wsp. 2002). Wpływ receptorów NMDA na stan fosforylacji białka tau został potwierdzony badaniami z zastosowaniem antagonisty NMDA, memantyny (MEM). Li i wsp. (2004) w swoich badaniach wykazali, że MEM zapobiega nadmiernej fosforylacji białka tau indukowanej wzrostem aktywności kinaz białkowych i spadkiem aktywności fosfatazy 2A (PP2A), co dowodzi kluczowej roli receptorów NMDA w tym procesie. Wydaje się więc, iż A β moduluje stan ufosforylowania białka tau poprzez wiązanie się z białkami receptora NMDA i regulację zależnej od aktywności receptorów NMDA kaskady kinaz/fosfataz białkowych (Li i wsp. 2004).

Powołując się na dane literaturowe wskazujące na istotny udział receptorów NMDA w zmianach stanu ufosforylowania białka tau wywołanych A β , a także odwołując się do wyników moich poprzednich badań o silnej toksyczności wewnątrzkomórkowych oligomerów A β wobec synaps glutaminianergicznych, przeprowadziłam serię eksperymentów z zachowaniem protokołu doświadczeń stosowanego przy badaniu wpływu hamowania wewnątrzkomórkowego nagromadzania się A β na synapsy glutaminianergiczne, w celu sprawdzenia czy zaawansowanej degeneracji synaps będą towarzyszyły zmiany stopnia ufosforylowania białka tau. Jak pokazały wyniki badań, zarówno w warunkach zależnego jak i niezależnego od apo E nagromadzania się oraz oligomeryzacji A β nie obserwowałam zmian w stanie ufosforylowania białka tau. Odnotowany przeze mnie brak wpływu A β na stan ufosforylowania tau może świadczyć o tym, iż postulowany przez wielu badaczy wzrost fosforylacji tau w odpowiedzi na egzogenny A β może nie zachodzić na wczesnych etapach toksyczności A β , nawet wówczas gdy przyjmuje on formę wysoce toksycznych agregatów wewnątrzkomórkowych. Być może hiperfosforylacja tau towarzyszy dopiero daleko posuniętym procesom neurodegeneracyjnym.

4.7. 1MeTIQ, antagonist receptor NMDA o właściwościach przeciwnodrodnikowych, wywiera działanie neuroprotekcjne w ekscytotoksyczności, niedokrwieniu mózgu i toksyczności A β

W następnej części będą omówione wyniki, w których wykazałam, że 1MeTIQ hamuje aktywność receptora NMDA i że mechanizmem tego efektu jest antagonizm 1MeTIQ wobec miejsca glicynowego receptora NMDA. Dalsze wyniki mojej pracy wskazały, że 1MeTIQ, podobnie jak uznani antagoniści receptorów NMDA, działa neuroprotekcjnie w warunkach ekscytotoksyczności oraz w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu. Ponadto w eksperymentach biologicznych ujawniłam działanie przeciwnodrodnikowe 1MeTIQ. To doprowadziło do realizacji głównego celu tej części badań, to jest weryfikację hipotezy, że 1MeTIQ może działać ochronnie na synapsy glutaminianergiczne poddane toksycznemu działaniu A β .

4.7.1. Hamowanie przez 1MeTIQ aktywności receptora NMDA

Wyniki poprzednich badań naszej pracowni wykazały, że 1MeTIQ w sposób zależny od stężenia obniża wiązanie [3 H]MK-801 do błon synaptycznych, co było

interpretowane jako wynik wypierania znakowanego ligandu z jego miejsca wiązania i odbicie specyficznego powinowactwa 1MeTIQ do kanału receptora NMDA (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006). Takie rozumienie typu powinowactwa 1MeTIQ do receptora NMDA i mechanizmu jego działania polegającego na hamowaniu jego kanału jonowego było także wynikiem przeniesienia na badany przez nas związek informacji z literatury o blokowaniu kanału NMDA przez inne syntetyczne pochodne TIQ (Gray i wsp. 1989, Ludwig i wsp. 2006). Wyniki moich obecnych badań potwierdziły fakt hamowania przez 1MeTIQ w wysokich stężeniach mikromolarnych specyficznego wiązania [³H]MK-801 do błon kory mózgu. Należy jednak pamiętać, że aktywacja kanału jonowego receptora NMDA jest m.in. uzależniona od jednoczesnego pobudzenia miejsc wiążących agonistę (glutaminian) i ko-agonistę (glicynę lub D-serynę). W związku z tym, zależne od stężenia hamowanie wiązania znakowanego MK-801 mogą także wywołać substancje wypierające agonistę i ko-agonistę. Wiadomo z literatury, iż pochodne amidowe tetrahydrochinolin wykazują powinowactwo do miejsca wiązania glicyny, ko-agonisty w kompleksie receptora NMDA (Carling i wsp. 1992, Leeson i wsp. 1992). Choć nie znalazłam w literaturze informacji o powinowactwie TIQ lub związków pochodnych do różnego typu miejsc wiążących glutaminian, uznałam za celowe zbadanie czy za hamowanie przez 1MeTIQ aktywności receptora NMDA może odpowiadać wiązanie się tego związku, a tym samym blokowanie miejsc wiązania zarówno dla glicyny jak i/lub glutaminianu w kompleksie receptora NMDA. Oceny interakcji 1MeTIQ z tymi miejscami decydującymi o aktywności receptora NMDA dokonałam poprzez wykorzystanie znakowanego agonisty [³H]Glu i ko-agonisty [³H]D-seryny. Uzyskane wyniki wykazały brak wpływu 1MeTIQ na wiązanie agonisty receptora NMDA, glutaminianu (Glu). Natomiast uzyskałam dowód na powinowactwo 1MeTIQ do miejsca wiązania dla glicyny. Co więcej, IC₅₀ dla hamowania przez 1MeTIQ wiązania do błon [³H]MK-801 i [³H]D-seryny okazały się być bardzo zbliżone, na poziomie odpowiednio 300 μM i 470 μM. To przemawia za wskazaniem na blokowanie przez 1MeTIQ miejsca wiązania glicyny jako na pierwotne miejsce hamowania aktywności receptora NMDA, natomiast hamowanie wiązania MK-801 jest efektem wtórnym, wynikiem dezaktywacji kanału jonowego receptora NMDA. Wiadomo bowiem, iż wiązanie [³H]MK-801 w kanale receptora NMDA zależy od spełnienia warunków do aktywacji receptora i otwarcia kanału, a pochodne kwasu kynureninowego silnie blokujące miejsce wiążące dla glicyny (receptor glicynowy_b) hamują aktywację kanału

jonowego tego receptora i wiązanie znakowanego MK-801 (Foster i wsp. 1992). Chociaż szczegółowe określenie charakterystyki wiązania się 1MeTIQ do miejsca glicynowego receptora NMDA wymaga dalszych badań wykraczających poza ramy tej rozprawy, uzyskana w tej pracy oryginalna obserwacja stanowi postęp w rozumieniu mechanizmu działania 1MeTIQ na receptor NMDA. Wyjaśnia ona także przyczyny występujących w literaturze pozornie sprzecznych ze sobą informacji dotyczących interakcji 1MeTIQ z receptorem NMDA, z jednej strony udokumentowanego hamowania aktywności tego receptora i efektów tego zjawiska identycznych z działaniem MK-801 (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006, Kuszczak i wsp. 2010), a z drugiej strony zapobiegania przez 1MeTIQ niepożądanym efektem behawioralnym podania MK-801 (Pietraszek i wsp. 2009). 1MeTIQ jako antagonistą miejsca glicynowego receptora NMDA obniżając aktywność tego receptora zmniejsza prawdopodobieństwo związania się MK-801 z kanałem jonowym i jego długotrwałej inaktywacji, dającej działania niepożądane.

Przedstawione powyżej wyniki uzyskane z eksperymentów posługujących się techniką badania znakowanych ligandów, które ujawniły że receptor glicynowy_b jest prawdopodobnie pierwotnym miejscem działania 1MeTIQ na kompleks receptora NMDA, nie uwzględniały jednak aspektów czynnościowych. Dla bezpośredniego określenia funkcjonalnych skutków tych interakcji i dla zebrania dalszych dowodów potwierdzających rolę hamowania receptorów NMDA w neuroprotektoryjnym działaniu 1MeTIQ, kluczowe było zbadanie wpływu 1MeTIQ na indukcję sygnału wapniowego w neuronach poddanych działaniu agonistów receptora NMDA. W warunkach fizjologicznych zasadnicza rola jonów wapnia polega na aktywacji zależnych od wapnia szlaków transdukcji sygnału, czyniąc wapń kluczowym przekaźnikiem wewnątrzkomórkowym w neurotransmisji glutaminianergicznej (Gleichmann i Mattson 2011). Z kolei w neuronach poddanych ostrej neurotoksyczności Glu, patologicznie wysoki napływ jonów wapnia do komórek, któremu towarzyszy silny wzrost jego stężenia wewnątrzkomórkowego, nieodłącznie wiąże się z aktywacją kaskady zdarzeń skutkujących uszkodzeniem oraz śmiercią neuronów (Arundine i Tymianski 2003, Zündorf i Reiser 2010). Pomiary napływu do neuronów wapnia znakowanego izotopem ⁴⁵Ca, w połączeniu z badaniem wzrostu stężenia jonów wapnia wewnątrz komórek w odpowiedzi na podanie agonistów receptora NMDA, kolektywnie charakteryzują zarówno generację sygnału wapniowego jak i potencjalnie neurotoksyczne obciążenie komórek wapniem.

W tej pracy, zastosowałam pierwotne hodowle neuronów ziarnistych mózdku szczura dla oceny wpływu 1MeTIQ na indukowane przez Glu lub NMDA pobieranie wapnia zewnątrzkomórkowego i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Użyłam także tego samego modelu komórkowego w omawianym dalej badaniu neuroprotekcynnego potencjału 1MeTIQ *in vitro*. Jest to powszechnie stosowany model neuronów glutaminianergicznych (Schousboe i wsp. 1985, 1999, Contestabile 2002). Poprzednio publikowane dane wykazały, że te komórki w 7 dniu hodowli *in vitro* wykazują dojrzały fenotyp glutaminianergiczny, a ekspresjonowane przez nie receptory NMDA są w pełni funkcjonalne, co stanowi warunek dla wykazania indukowanych przez Glu intensywnych przepływów jonowych i efektu ekscytotoksyczności (Marini i wsp. 1999, Arundine i Tymianski 2003). Uzyskane przeze mnie wyniki jednoznacznie wykazały, że 1MeTIQ istotnie hamuje aktywność receptorów NMDA. Wykazałam bowiem kompletną inhibicję przez 500 μ M 1MeTIQ pobierania 45 Ca w obecności NMDA i niemal pełną inhibicję tego efektu wywołanego przez Glu. Ta obserwacja jest zgodna z poprzednimi danymi z naszej pracowni (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006). Odnotowałam także znaczące obniżenie przez 500 μ M 1MeTIQ, a także przez 0,5 μ M MK-801, wywołanego przez Glu wzrostu stężenia jonów wapnia w komórkach, mierzonego przez pomiar fluorescencji wskaźnika Calcium Orange. To hamowanie nie było kompletne, co można przypisać udziałowi dodatkowych mechanizmów, niezależnych od aktywacji receptorów NMDA, w indukowanym Glu wzroście stężenia wapnia w neuronach. Wiadomo bowiem, że pula wewnątrzkomórkowego wapnia może być zasilana nie tylko w wyniku napływu jonów wapnia do neuronów z przestrzeni zewnątrzkomórkowej poprzez aktywne kanały receptorów NMDA i wtórnie aktywowane napięciowo zależne kanały wapniowe, ale również poprzez zachodzącą za pośrednictwem receptorów metabotropowych mobilizację wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych w retikulum endoplazmatycznym. Wpływ na homeostazę wapniową mają również jony wapnia napływające do komórki w odpowiedzi na aktywację receptorów AMPA i na skutek działania systemów wymiany jonowej tj. pompy wapniowo-sodowej (Łazarewicz i Salińska 2005).

4.7.2. Potencjał neuroprotekcynny 1MeTIQ w warunkach ekscytotoksyczności *in vitro* i w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu

Po wykazaniu w eksperymentach prowadzonych na poziomie frakcji wzbogaconej w błony synaptyczne i na hodowlach komórkowych, że 1MeTIQ hamuje aktywność receptorów NMDA, strategia dalszych badań tej części rozprawy obejmowała wykazanie, że ta substancja wykazuje właściwości neuroprotekcynne w komórkowych oraz zwierzęcych modelach doświadczalnych obejmujących ekscytotoksyczność i niedokrwienie mózgu. Takie właściwości mają bowiem uznani antagoniści receptorów NMDA.

Przedstawione w tej rozprawie badanie wpływu 1MeTIQ na przeżycie hodowli pierwotnych neuronów ziarnistych mózdku poddanych działaniu Glu w ostrym eksperymencie, wykazało zależne od stężenia neuroprotekcynne działanie badanej substancji. Jest to zgodne z omówionymi powyżej danymi wykazującymi działanie 1MeTIQ jako antagonisty receptora NMDA i substancji blokującej indukowany przez ekscytotoksyny nadmierny napływ wapnia do neuronów. Na podstawie rezultatów badań otrzymanych przez niezależne grupy badawcze (Kim i wsp. 1996, Lipton i wsp. 1997) można postulować, że zjawisko ekscytotoksyczności jest przede wszystkim wynikiem nadmiernego pobudzenia receptorów NMDA i nasilonego napływu wapnia do komórek. Wykazano, iż aktywacji receptorów NMDA przez ich selektywnych agonistów w wysokich stężeniach towarzyszy znaczny wzrost poziomu wapnia w komórkach i generacja patologicznego sygnału wapniowego prowadzącego do degeneracji neuronów (Choi 1994, Kim i wsp. 1996, Berridge i wsp. 1998, Leist i wsp. 1998). Natomiast fluktuacje stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego w wyniku aktywacji innych grup receptorów niż NMDA, nie są związane z wystąpieniem zjawiska ekscytotoksyczności. Oznacza to, iż patologiczny sygnał wapniowy powstaje przede wszystkim w odpowiedzi na aktywację receptorów NMDA i jest cechą charakterystyczną tych receptorów (Lynch i Guttman 2002). Mechanizm, za pośrednictwem którego dochodzi do neurodegeneracji na skutek napływu jonów wapnia do neuronów jest złożony i obejmuje szereg procesów, za które odpowiedzialne są m.in. szlaki sygnałowe z udziałem NO i kaskady kinaz/fosfataz białkowych o aktywności ściśle zależnej od Ca^{2+} . Badania poświęcone roli wapnia w neurodegeneracji z udziałem receptorów dla aminokwasów pobudzających dowodzą ponadto, iż o degeneracji komórek decyduje nie tyle wzrost

stężenia wapnia w cytozolu, co całkowity poziom nagromadzonych jonów wapnia w komórce (Hartley i wsp. 1993, Eimerl i Schramm 1994).

Poza 1MeTIQ, w tych badaniach zastosowałam jako substancje referencyjne uznanych bezkompetycyjnych antagonistów receptora NMDA, MK-801 i MEM. MK-801 wiąże się z miejscem w kanale NMDA z dużym powinowactwem, podczas gdy powinowactwo MEM jest określane jako umiarkowane (Lipton 2005). Z kolei, jak wynika z podanych powyżej danych, powinowactwo 1MeTIQ do miejsca glicynowego receptora NMDA jest niskie, IC_{50} dla wypierania przez tę substancję D-seryny jest bliskie 500 μ M. Zabserwowałam neuroprotektoryjne działanie wszystkich trzech badanych antagonistów receptora NMDA, przy czym dla uzyskania zbliżonego efektu neuroprotektoryjnego konieczne było zastosowanie MEM w stężeniu 10 razy wyższym niż MK-801, oraz 1MeTIQ w stężeniu 1000 razy wyższym. Jest więc wyraźny związek między neuroprotekcją i powinowactwem badanych antagonistów do receptora NMDA, i w tę zależność wpisuje się także 1MeTIQ. Uzyskane dane potwierdzają, że 1MeTIQ wykazuje cechy antagonisty receptora NMDA, ponieważ podobnie jak substancje referencyjne wykazuje bezpośrednie działanie neuroprotektoryjne w ekscytotoksyczności wywołanej przez Glu.

Potwierdzenie neuroprotektoryjnych właściwości 1MeTIQ w warunkach ekscytotoksyczności przejawiające się m.in. wyraźnym osłabieniem sygnału wapniowego, wskazują na kluczową rolę hamowania aktywności receptorów NMDA w mechanizmach ochronnego działania tej tetrahydroizochinoliny. Ten wynik stał się podstawą do szerszego spojrzenia na podobieństwo działania 1MeTIQ i uznanych antagonistów receptora NMDA, z uwzględnieniem mało poznanego zjawiska indukcji przez antagonistów receptora NMDA tolerancji na toksyczne działanie aminokwasów pobudzających.

Prekondycjonowanie (hartowanie) to sposób indukcji tolerancji na czynniki uszkadzające, takie jak ischemia mózgu czy ekscytotoksyczność, które zostało wykazane w eksperymentach prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* (Kitagawa i wsp. 1990, Obrenovitch 2008, Dirnagl i wsp. 2009). Zjawisko to polega na poddaniu mózgu lub neuronów warunkom umiarkowanego stresu, nie prowadzącego do zauważalnych uszkodzeń, natomiast powodującego syntezę nowych białek i pojawienie się fenotypu warunkującego zwiększoną odporność. Do grupy stresorów indukujących tolerancję należą zarówno łagodna ischemia, hipoksja, hipertermia jak i różnorodne substancje farmakologiczne, w tym agoniści receptorów

NMDA stosowani krótko i w niskich stężeniach (Obrenovitch 2008). Dla przykładu, wykazano że krótkotrwała ekspozycja hodowli neuronów hipokampa na działanie NMDA lub Glu, prowadziła do zmiany wrażliwości neuronów na działanie tych samych ekscytotoksyn po osiągnięciu przez te neurony dojrzałości rozumianej ekspresją funkcjonalnych receptorów NMDA. Uzyskana w ten sposób neuroprotekcja była tłumaczona istnieniem zjawiska tolerancji wywołanego wysokimi stężeniami związków pobudzających receptory glutaminianergiczne (Friedman i Segal 2010). Istnieje szereg innych doniesień dokumentujących możliwość indukcji tolerancji mózgu na ischemię i ekscytotoksyczność poprzez podanie subletalnych dawek agonistów receptora NMDA (Miao i wsp. 2005, Yin i wsp. 2005, Marini i wsp. 2006). Są też dane pochodzące z eksperymentów *in vivo* podważające kluczową rolę pobudzenia receptorów NMDA i metabotropowych receptorów glutaminianergicznych grupy I w czasie ischemii prekondycjonującej w indukcji tolerancji na ischemię (Duszczuk i wsp. 2005, 2006, Makarewicz i wsp. 2006).

Nowe i pozornie sprzeczne z podanymi powyżej danymi wyniki uzyskali Tremblay i wsp (2000), którzy wykazali, iż krótkotrwała ekspozycja hodowli pierwotnych neuronów kory mózgu szczura na działanie antagonistów receptora NMDA indukuje w tych neuronach długotrwałą tolerancję na różne czynniki uszkodzające, w tym na ekscytotoksyczność indukowaną Glu i neurotoksyczne działanie A β . Efekt ten wydaje się być zależny od syntezy nowych białek, spełniając tym samym kryteria prekondycjonowania. W zgodzie z wynikami badań *in vitro* pozostają liczne badania *in vivo* pokazujące, iż zahamowanie aktywności receptorów NMDA przez podanie selektywnych antagonistów tych receptorów indukuje w neuronach odpowiedź na stres (Olney i wsp. 1991). Choć praca Tremblay i wsp. (2000) nie znalazła kontynuatorów, postanowiłam wykorzystać zaobserwowaną przez tych autorów nową właściwość antagonistów receptorów NMDA dla dalszego charakteryzowania 1MeTIQ. Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, iż podobnie jak MK-801 i MEM, krótkotrwała preinkubacja neuronów ziarnistych mózdzku w obecności 1MeTIQ wywołuje znamienne tolerancję na ekscytotoksyczność, obserwowaną nawet 48 godz. po preinkubacji. Dyskutowane powyżej zależności od stężenia bezpośrednich efektów neuroprotektoryjnych 1MeTIQ i substancji referencyjnych, odnoszą się także do eksperymentów dotyczących prekondycjonowania. Są to wyniki, w których po raz pierwszy wykazałam indukcję tolerancji na ekscytotoksyczność przez antagonistów receptora NMDA, ze

szczególnym uwzględnieniem 1MeTIQ, w hodowlach pierwotnych komórek ziarnistych mózdku.

Nowe doniesienia wskazują, że tolerancja na ischemiczne uszkodzenie mózgu, jak również na uszkodzenia neuronów w warunkach *in vitro* indukowane działaniem silnych stresorów, może się rozwinąć także po zakończeniu działania czynnika uszkadzającego w procesie zwanym postkondycjonowaniem (Burda i wsp. 2006, Pignataro i wsp. 2008, Xing i wsp. 2008). Ponieważ uważa się, że mechanizmy pre- i postkondycjonowania są zbieżne, postanowiłam rozciągnąć także na postkondycjonowanie badanie właściwości 1MeTIQ w porównaniu z innymi antagonistami receptorów NMDA. Zaobserwowałam, że ekspozycja neuronów na krótkotrwałe działanie 1MeTIQ, podobnie jak MK-801 oraz MEM, w okresie nawet do 3 godz. po zadziałaniu ekscytotoksyny, w znaczący sposób zwiększa przeżywalność neuronów. Należy podkreślić, iż są to pierwsze obserwacje wskazujące na możliwość postkondycjonowania przy użyciu antagonistów receptorów NMDA. Co prawda poprzednio wykazano, iż inaktywacja receptorów NMDA za pomocą MK-801 podanego do 2 godz. po zadziałaniu ekscytotoksyn prowadzi do znaczącej neuroprotekcji neuronów hipokampa, jednak w tych eksperymentach substancja neuroprotekcjna była obecna w środowisku hodowlanym aż do zakończenia doświadczenia, a uzyskany efekt wiązano z hamowaniem przedłużonej nadmiernej aktywności receptorów NMDA (Prehn i wsp. 1995). W moich doświadczeniach postkondycjonowanie obejmowało zaledwie 30 min. inkubację z antagonistami receptorów NMDA, co wskazuje na odrębny mechanizm uzyskanej neuroprotekcji. Mechanizmy tolerancji indukowanej przez pre- i postkondycjonowanie wydają się być złożone, niejasne i wciąż pozostają przedmiotem badań (Heurteaux i wsp. 1995, Jiang i wsp. 2003, Meller i wsp. 2008, Liu i wsp. 2009, Navon i wsp. 2011, Yuan i wsp. 2011, Zhang i wsp. 2011).

To zagadnienie, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów komórkowych i molekularnych tolerancji indukowanej przez antagonistów receptorów NMDA, w tym 1MeTIQ, wykracza poza ramy mojej rozprawy doktorskiej. Natomiast uzyskane przeze mnie wyniki przemawiające za zdolnością 1MeTIQ, podobnie jak i uznanych antagonistów receptorów NMDA, do wywołania tolerancji na toksyczność indukowaną przez Glu, zarówno poprzez pre- jak i postkondycjonowanie, po raz kolejny dowodzą, że antagonizm wobec receptorów NMDA jest właściwością 1MeTIQ warunkującą neuroprotekcjne działanie tej tetrahydroizochinoliny.

Już w pierwszej połowie lat 80' ubiegłego wieku utrwaliła się hipoteza wskazująca na ekscytotoksyczność jako na kluczowy mechanizm odpowiedzialny za uszkodzenie mózgu w wyniku niedokrwienia (Benveniste i wsp. 1984, Simon i wsp. 1984, Hagberg i wsp. 1985, Rothman i Olney 1986). Zgodnie z tą hipotezą, wiadomo z bardzo licznych publikacji, iż antagoniści receptora NMDA podane zarówno przed jak i przez okres kilku godz. po indukcji niedokrwienia, wykazują działanie neuroprotekcyjne w różnych modelach ischemicznych (Foster i wsp. 1988, Prehn i wsp. 1995, Lipton 2004, Nakamura i Lipton 2008). Niezależnie od sugerowanego mechanizmu tego działania, tj. bezpośredniej ochrony neuronów w półcieniu ischemicznym wokół ogniska niedokrwienego, lub też indukowania umiarkowanej hipotermii mogącej odgrywać istotną rolę w neuroprotekcji neuronów piramidowych sektora CA1 hipokampa w globalnej ischemii mózgu, są to efekty przypisywane hamowaniu przez tych antagonistów aktywności receptorów NMDA (Olney i wsp. 1991). Dlatego, kontynuując testowanie hipotezy, że 1MeTIQ ma właściwości antagonisty receptora NMDA, i wykazuje je w warunkach doświadczenia *in vivo*, w tej pracy zbadalam neuroprotekcyjne działanie 1MeTIQ w dwu modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu stosowanych szeroko w naszej pracowni. Krótkotrwałe obustronne niedokrwienie przodomózgowia u myszokoczka mongolskiego (gerbila) odpowiada globalnej ischemii mózgu (Duszczyk i wsp. 2006), natomiast hipoksja/ischemia mózgu 7-dniowych szczurów jest uznanym modelem asfiksji okołoporodowej (Makarewicz i wsp. 2006). Wiadomo z literatury, że MK-801 i MEM, substancje stosowane w moich badaniach jako referencyjne dla 1MeTIQ, a także testowani antagoniści miejsca glicynowego receptora NMDA, działają neuroprotekcyjnie w tych modelach niedokrwienia mózgu (Łazarewicz i wsp. 1994, Salińska i wsp. 2005, Łazarewicz i wsp. 1997, Gilland i Hagberg 1997). Co prawda wykazano zdolność niektórych syntetycznych pochodnych TIQ mających właściwości bezkompetycyjnych antagonistów receptora NMDA blokujących kanał do częściowego zapobiegania uszkodzeniom poischemicznych w globalnym niedokrwieniu mózgu (Nakanishi i wsp. 1994), jednak neuroprotekcyjne działanie w ischemii mózgu substancji endogennej, jaką jest 1MeTIQ, nie było dotąd opisane. Uzyskane w tej pracy wyniki badania metodą histologiczną ubytku neuronów piramidowych sektora CA1 hipokampa gerbila ujawniły ochronny wpływ 1MeTIQ podanego na 30 min. przed ischemią. Nasze nieprzedstawione w rozprawie dane wykazały umiarkowane obniżenie temperatury mózgu gerbila rozwijające się po

ischemii w grupie zwierząt które otrzymały 1MeTIQ. Jest to typowy efekt podania antagonistów receptorów NMDA, obserwowany po ischemii (Buchan i wsp. 1990, Corbett i wsp. 1990). Potwierdzeniem neuroprotektoryjnych właściwości 1MeTIQ w niedokrwieniu mózgu są też wyniki uzyskane w modelu asfiksji okołoporodowej u szczurów. Na podstawie obserwacji polegającej na ocenie uszkodzenia wyrażonego ubytkiem masy półkuli po stronie operowanej można stwierdzić, iż 1MeTIQ wykazuje wyraźne działanie ochronne, przeciwdziałając skutkom niedokrwienia i niedotlenienia tej półkuli. Tak więc, badania na modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu, w których wykazano poprzednio neuroprotektoryjne działanie antagonistów receptorów NMDA udowodniły, że 1MeTIQ chroni mózg przed uszkodzeniem spowodowanym przez niedokrwienie.

Reasumując ten fragment rozprawy można stwierdzić, że badania *in vitro* na hodowlach pierwotnych neuronów oraz wyniki eksperymentów *in vivo* na modelach niedokrwienia mózgu dostarczyły dowodów na neuroprotektoryjne działanie 1MeTIQ, a cechy charakterystyczne tych efektów wskazują, że hamowanie aktywności receptora NMDA odgrywa w nich kluczową rolę. Tym samym uzyskane dane wykazały, że właściwości farmakologiczne 1MeTIQ uzasadniają zakwalifikowanie tej substancji do grupy antagonistów receptora NMDA.

4.7.3. Przeciwnadnikowe działanie 1MeTIQ

Jednym ze szczegółowych celów badań objętych tą rozprawą było sprawdzenie hipotezy zakładającej, że do właściwości farmakologicznych 1MeTIQ, obok hamowania aktywności receptorów NMDA, można zaliczyć działanie przeciwnadnikowe. Wiadomo z poprzednich badań, że w układzie abiotycznym 1MeTIQ hamuje reakcję Fentona, oraz że ta substancja całkowicie znosi nasiloną produkcję wolnych rodników indukowaną w obecności dopaminy (Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006). To drugie zjawisko można tłumaczyć faktem, że 1MeTIQ jest inhibitorem MAO (Patsenka i Antkiewicz-Michaluk 2004), co może przesunąć metabolizm dopaminy w kierunku O-metylacji zależnej od COMT. Natomiast bezpośrednie działanie przeciwnadnikowe 1MeTIQ wymagało potwierdzenia w biologicznym układzie doświadczalnym. Komplikacją w tych badaniach była konieczność wykluczenia udziału w mechanizmie badanych efektów hamowania

przez 1MeTIQ aktywności receptorów NMDA. Wiadomo bowiem, że stres oksydacyjny i produkcja wolnych rodników są nieodłącznymi elementami ekscytotoksyczności indukowanej za pośrednictwem receptorów NMDA i jonów wapnia. Masowe pobieranie wapnia przez mitochondria skutkuje drastycznym spadkiem produkcji ATP i upośledzeniem działania łańcucha oddechowego, efektem czego jest wzrost tworzenia ROS, w tym wysoce toksycznego rodnika hydroksylowego (OH^\cdot) (Greene i Greenemyre 1996). Ta sekwencja zdarzeń zachodząca w odpowiedzi na zaburzenie równowagi wapniowej w komórce dowodzi, iż aktywacja receptorów NMDA bezpośrednio przyczynia się do zwiększenia produkcji ROS i nasilenia reakcji wolnorodnikowych poprzez zaburzenie funkcji i struktury mitochondriów (Lynch i Guttman 2002). Moje badania pokazały, iż w niedojrzałych hodowlach neuronów hipokampa, które jak potwierdziłam doświadczalnie, cechują się brakiem ekspresji funkcjonalnych receptorów NMDA, 1MeTIQ w wysokich stężeniach mikromolarnych istotnie obniża poziom produkcji rodników tlenowych pochodzących z katabolizmu H_2O_2 . Dalszych badań, wychodzących poza ramy obecnej rozprawy, wymaga określenie mechanizmu przeciwrodnikowego działania 1MeTIQ, a w szczególności określenie jego związku z budową chemiczną tej substancji. Jednak dane uzyskane w tej rozprawie pozwalają na zakwalifikowanie 1MeTIQ do nowego typu antagonistów receptora NMDA cechujących się jednocześnie znaczącym działaniem przeciwrodnikowym.

4.7.4. Wpływ 1MeTIQ na wywołane przez A β obniżenie ekspresji powierzchniowych białek synaptycznych

Ponieważ wyniki przedstawione w tej rozprawie wykazały, iż 1MeTIQ spełnia kryteria umożliwiające zakwalifikowanie go do antagonistów receptora NMDA i wykazuje też działanie przeciwrodnikowe, przeszłam do badań nad możliwością modulacji przez 1MeTIQ patologii synaps glutaminianergicznych wywołanej przez A β . Punktem wyjścia do tych badań były obserwacje, pokazujące że receptory NMDA odgrywają szczególną i bardzo złożoną rolę w tym procesie, a ich antagoniści wykazują działanie ochronne. Celem badań było sprawdzenie czy także 1MeTIQ cechuje się porównywalnym potencjałem neuroprotektynym. Z moich obserwacji wynika, iż w obecności zarówno 1MeTIQ, jak i referencyjnego antagonisty receptora NMDA - MK-801, ulega zahamowaniu spadek ekspresji NR1/NMDA, a także innych

powierzchniowych białek synaptycznych, PSD-95 i synaptofizyny, wywołany przez A β w warunkach sprzyjających pobieraniu, oligomeryzacji i zaleganiu tego peptydu w neuronach. Nie zaobserwowałam jednak uchwytne go przełożenia przeciwnodrodkowego działania 1MeTIQ na zwiększenie potencjału neuroprotekcijnego tej substancji.

Ochronne działanie antagonistów receptorów NMDA na synapsy glutaminianergiczne było już poprzednio opisywane. Między innymi, w eksperymentach *in vivo* wykazano, że przewlekłe podawanie memantyny w mysim modelu AD zwiększa gęstość synaps w hipokampie (Dong i wsp. 2008). W innej pracy przeprowadzono badania na dojrzałych hodowlach hipokampa poddanych działaniu oligomerów A β , w których obserwowano ochronny wpływ memantyny na poziom immunoreaktywności drebryny, białka markerowego dla kolców dendrytycznych, co świadczy o zapobieganiu przez memantynę uszkodzeniu synaps (Lacor i wsp. 2007). Mniej jasna jest wymowa wyników opisanych przez Roselli i wsp. (2005), którzy prowadzili badania na 7 dniowych hodowlach korowych, w których jak wynika m. in. z moich obserwacji, ekspresja funkcjonalnych receptorów NMDA jest wątpliwa. Ci badacze wykazali jednak, że podanie rozpuszczalnego A β prowadzi do spadku poziomu białka PSD-95, a podanie MK-801 lub ifenprodilu, antagonisty miejsca wiążącego poliaminy w strukturze receptora NMDA, hamowało toksyczne działanie A β . Opisano jednak także ochronne działanie kompetycyjnego antagonisty receptora NMDA, CPP na wywołany przez oligomeryczny A β spadek gęstości kolców dendrytycznych w organotypowej hodowli hipokampa (Shankar i wsp. 2007). Uzyskane przeze mnie wyniki dobrze wpisują się w te różnorodne doniesienia. Wnoszą one nową informację, ważną dla interpretacji i zrozumienia mechanizmu ochronnego efektu antagonistów receptora NMDA w toksyczności A β . Pokazują bowiem po raz pierwszy że antagonistą receptora glicynowego_b jakim jest 1MeTIQ, także wykazuje tę właściwość, co dowodzi, że różnorodni antagoniści receptora NMDA, bez względu na miejsce wiązania z receptorem i mechanizm działania hamującego na jego aktywność, wywierają podobny ochronny efekt. Ta kwestia będzie dyskutowana poniżej w kontekście postulowanego mechanizmu omawianego efektu protekcijnego.

Nie ulega wątpliwości, iż rozważania dotyczące potencjalnych mechanizmów toksycznego działania A β na synapsy i ochronnego działania antagonistów receptorów NMDA powinny uwzględniać interakcje pomiędzy A β i tymi receptorami.

Omawiając wyniki moich badań dotyczących wpływu A β na synapsy glutaminianergiczne przedstawiłam dane świadczące o upośledzeniu wzoru ekspresji powierzchniowych białek synaptycznych zależnym od nagromadzenia się A β w neuronach, przy czym poziom immunoreaktywności białka receptora NMDA był jednym z markerów zmian w synapsach. Jednak udział tych receptorów w wywołanej przez A β patologii synaps wydaje się być znacznie bardziej złożony i specyficzny.

Jeden z aktywniejszych obecnie nurtów badań wskazuje na możliwość wzajemnych oddziaływań cząsteczek A β z receptorem NMDA i bezpośredniego udziału receptorów NMDA w mechanizmach toksyczności A β . Grupa badawcza Lacor i wsp. (2007) odnotowała, iż miejsce wiązania oligomerów A β do błony komórkowej pokrywa się ściśle z rejonami występowania podjednostki NR1/NMDA oraz PSD-95, co może wskazywać na istnienie fizycznej interakcji pomiędzy receptorem NMDA a peptydami A β (Lacor i wsp. 2007). W zgodzie z tym założeniem pozostają wyniki badań Alberdi i wsp. (2010), którzy dowiedli, iż oligomeryczny A β wiąże się w okolicach synaps glutaminianergicznych, prowadząc do aktywacji receptorów NMDA oraz zależnego od tego procesu napływu jonów wapnia do neuronów, indukującego kaskadę patologicznych zdarzeń (Alberdi i wsp. 2010). Jednym z lepiej poznanych efektów toksycznego działania A β jest defosforylacja podjednostki NR2B/NMDA na Tyr¹⁴⁷², odpowiadającej za wiązanie się receptora do białek kotwiczących m. in. PSD-95, co w konsekwencji prowadzi do endocytozy kompleksu receptorowego z powierzchni komórki (Venkitaramani i wsp. 2007). Nie podważając tych obserwacji, trudno zaakceptować ich interpretację, wiążącą ochronę przez antagonistów receptora NMDA synaps glutaminianergicznych poddanych działaniu A β z możliwym zablokowaniem przez tych antagonistów konkretnego miejsca wiązania się A β z kompleksem receptora NMDA. Jak omawiano powyżej, wykazano ochronne działanie na synapsy różnorodnych typów antagonistów receptora NMDA, o różnych punktach uchwytu w podjednostkach receptora, w tym blokerów kanału MK-801 i memantyny (Lacor i wsp. 2007, Dong i wsp. 2008, wyniki tej rozprawy), antagonisty kompetycyjnego CPP (Shankar i wsp. 2007), antagonisty miejsca dla poliamin ifenprodilu (Roselli i wsp. 2005), a także antagonisty miejsca glicynowego, 1MeTIQ (wyniki tej rozprawy). Wydaje się więc, że kluczową rolę w mechanizmie ochronnego działania antagonistów receptora NMDA odgrywa nie tyle fizyczne blokowanie interakcji A β z receptorem NMDA, ile raczej fakt zahamowania mechanizmów transdukcji sygnału w tym receptorze.

Niezwykle istotnym, a wciąż niejasnym zagadnieniem, dotyczącym oddziaływania A β na synapsy, jest natura i miejsce działania cząstek A β indukujących patologiczne zmiany w synapsach glutaminianergicznych. Na podstawie obserwacji przeprowadzonych przez Shankar i wsp. (2007) wiadomo, iż poddanie organotypowych hodowli hipokampa działaniu naturalnych oligomerów A β powoduje znaczący spadek gęstości kolców dendrytycznych, będących miejscem występowania synaps glutaminianergicznych. Jak już wspomniano powyżej, efekt ten był hamowany przez blokowanie receptora NMDA. Należy zaznaczyć, iż ekspozycja tych samych hodowli organotypowych na działanie monomerycznego A β nie wpływała na gęstość kolców dendrytycznych neuronów piramidowych hipokampa, co potwierdza, iż degeneracja synaps jest zależna od stanu agregacji A β jak również, iż mechanizmy odpowiedzialne za cytotoksyczne działanie peptydów mogą się zasadniczo różnić (Shankar i wsp. 2007). Są też inne doniesienia świadczące o tym, iż ekspozycja hodowli pierwotnych neuronów na oligomeryczny A β sprzyja endocytozie receptorów NMDA a także zaburzeniu mechanizmów odpowiedzialnych za transport podjednostek receptora NMDA na powierzchnię komórki (Guillaud i wsp. 2003, Tang 2009). Inne obserwacje wskazują jednak na potencjalną rolę monomerycznego A β w indukcji endocytozy receptora NMDA w synapsach i na interesujące przełożenie tych interakcji na zjawiska neurotoksyczności i neuroprotekcji. Wykazano, że poddanie hodowli neuronów hipokampa 3 godz. ekspozycji na działanie A β 42 niepoddanego fibrylizacji, co można uznać za formę prekondycjonowania, skutkowało wzrostem przeżywalności tych komórek, jeśli były one następnie inkubowane w obecności Glu (Goto i wsp. 2006). Zaobserwowano również w tych komórkach brak wzrostu stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego po podaniu Glu. Tolerancja na neurotoksyczne działanie Glu indukowana przez A β była tłumaczona endocytozą receptorów NMDA z powierzchni komórek.

Badanie, których znane z literatury wyniki zostały omówione powyżej, nie zawsze lub nie w pełni uwzględniały realne warunki spotykane *in vivo* w mózgu, ze szczególnym uwzględnieniem patologii AD. Dane z literatury wskazują na istotność korelacji wewnątrzkomórkowego odkładania się A β na dysfunkcję synaps oraz osłabienie zjawiska LTP, co przekłada się na istotne pogorszenie pamięci oraz spadek funkcji poznawczych (Oddo i wsp. 2003, Shankar i wsp. 2009). Należy podkreślić, iż A β wpływa hamująco na plastyczność synaptyczną i zjawiska długotrwałych zmian aktywności synaptycznej jedynie w przypadku, gdy te zdarzenia

zachodzą w synapsach glutaminianergicznymi i są zależne od aktywności receptorów NMDA. Wykazano bowiem, iż w DG oraz CA1 hipokampa zjawisko długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD), zachodzące bez udziału receptorów NMDA, nie jest zaburzone przez peptydy A β (Wang i wsp. 2002). Wydaje się więc, że zaleganie A β w neuronach jest zjawiskiem prowadzącym do zmian w składzie białek synaptycznych, w tym receptora NMDA, oraz do spadku ich ekspresji na powierzchni komórek, co w efekcie doprowadza do zaburzenia przekaźnictwa synaptycznego, zachodzącego za pośrednictwem receptorów NMDA. Te białka błonowe cechują się wysoką ekspresją w obrębie synaps (Bi i wsp. 2002). Należy podkreślić, że badania przedstawione w tej rozprawie uwzględniają podane wyżej realia, ponieważ hodowle pierwotne neuronów korowych były prowadzone w warunkach umożliwiających dostęp do apo E, a w konsekwencji pobieranie, oligomeryzację i zaleganie A β w neuronach. Ostatecznie, takiej interpretacji mechanizmu toksycznego działania A β należy podporządkować proponowane mechanizmy ochronnego działania antagonistów receptora NMDA.

Można roboczo ograniczyć rozważania do zmian ekspresji receptora NMDA w synapsach glutaminianergicznymi poddanych działaniu A β i antagonistów receptorów NMDA. Dynamika zmian struktury receptorów NMDA oraz ich lokalizacji w obrębie błony postsynaptycznej, indukowanych różnymi czynnikami, została opisana przez Fong i wsp. (2002). Badacze ci wykazali, iż w hodowli szczurzych neuronów hipokampa, aktywacja kinazy białkowej C (PKC) przez selektywnego agonistę tej kinazy, TPA, prowadzi do gwałtownej translokacji receptorów NMDA zlokalizowanych w synapsach do okolic pozasynaptycznych, zmniejszając wrażliwość neuronów na działanie czynników ekscytotoksycznych. W następstwie hamowania zjawiska ekscytotoksyczności dochodziło do zmniejszenia utraty podjednostki NR1 receptora NMDA oraz białka synaps - synapsyny. Wyniki otrzymane przez Fong i wsp. (2002) wskazują więc, iż mechanizm neuroprotekcyny, a w szczególności zapobiegania degeneracji synaps, może opierać się na relokacji receptorów NMDA do pozasynaptycznych obszarów błony. Można się pokusić o wniosek, iż obserwowane przez mnie zjawisko oddziaływania A β na powierzchniowe białka synaptyczne, w tym na receptor NMDA, może być tłumaczone translokacją receptorów NMDA w obrębie synapsy, co może stanowić mechanizm obronny komórek przed toksycznością A β (Rao i Craig 1997). Z kolei jeden z prawdopodobnych mechanizmów ochronnego działania antagonistów receptora NMDA wobec synaps

glutaminianergicznych poddanych toksycznemu działaniu A β może polegać na znanym zjawisku (Follesa i Ticku 1996) kompensacyjnego wzrostu ekspresji podjednostek receptora NMDA na skutek długo utrzymującej się ekspozycji komórek na działanie antagonistów NMDA. Z uwagi na to, iż w swoich doświadczeniach zapewniłam długotrwałe działanie antagonistów receptorów NMDA na hodowle pierwotne neuronów podczas ich inkubacji z A β , obserwowany przeze mnie efekt ochronny 1MeTIQ oraz MK-801 może wynikać z nasilenia ekspresji podjednostki NR1/NMDA, co mogłoby powodować przywrócenie normalnej gęstości receptorów NMDA w obrębie synaps w neuronach ekspozowanych na działanie A β .

Specyficzną cechą, wyróżniającą 1MeTIQ na tle innych antagonistów receptorów NMDA, jest zdolność tej substancji do hamowania tworzenia wolnych rodników tlenowych. Zgodnie z postulowanym przez Butterfield i Pocernich (2003) założeniem, efektywność terapii AD może być w znacznym stopniu zwiększona poprzez jednoczesne zastosowanie antagonisty receptorów NMDA oraz związku o właściwościach przeciwrodnikowych. Nakazuje to zwrócenie szczególnej uwagi na ewentualny udział aktywności przeciwrodnikowej 1MeTIQ w mechanizmie ochronnego działania tej substancji na synapsy glutaminianergiczne poddane działaniu toksycznemu A β . Jeśli uwzględnimy dyskutowane powyżej różnice w powinowactwie stosowanych w tej pracy antagonistów receptora NMDA do odpowiednich miejsc wiążących, wyniki moich badań nie ujawniły szczególnych korzyści zastosowania 1MeTIQ, w porównaniu do MK-801, dla ochrony synaps glutaminianergicznych przed toksycznością A β . Należy jednak zachować ostrożność przy wyciąganiu daleko idących wniosków z wyników tego doświadczenia. Co prawda w doświadczeniach prowadzonych na hodowlach neuronów obserwowałam bardzo zbliżone relacje pomiędzy efektywnością 500 μ M 1MeTIQ i 0,5 μ M MK-801 w hamowaniu ekscytotoksyczności wywołanej przez Glu i indukowanego przez A β ubytku ekspresji powierzchniowych białek synaptycznych, co może nasuwać przypuszczenie, że w obu przypadkach neuroprotekcja jest wyłącznie zależna od siły hamownia receptorów NMDA. Z drugiej strony wiadomo, że stres oksydacyjny jest stałym elementem mechanizmu ekscytotoksyczności (Lynch i Guttman 2002), trudno więc ocenić w jakim stopniu działanie przeciwrodnikowe 1MeTIQ przyczynia się do ochrony neuronów przed neurotoksycznym działaniem Glu, a więc czy takie porównanie jest uprawnione. Ponadto, nie znalazłam w dostępnej literaturze danych na temat udziału stresu oksydacyjnego w mechanizmie wywołanej przez A β

endocytozy powierzchniowych białek synaptycznych. Wymaga więc zastanowienia, czy zastosowane w tej pracy badanie poziomu immunoreaktywności białek NR1/NMDA, PSD-95 oraz synaptofizyny jest dobrym markerem dla oceny neuroprotekcynowego działania jakiegokolwiek substancji przeciwrodnikowej. Wydaje się, że zbadanie tej kwestii wymaga zastosowania modeli doświadczalnych innych, niż były użyte w tej rozprawie.

Reasumując wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań, mających na celu ocenę ochronnego przed toksycznością A β działania 1MeTIQ na synapsy glutaminianergiczne, uwzględniających jednoczesne działanie antagonistyczne tej substancji na miejsce glicynowe, receptora NMDA oraz hamowanie tworzenia wolnych rodników tlenowych należy stwierdzić, że wykazały one, iż 1MeTIQ, podobnie jak inni uznani antagoniści receptorów NMDA o różnych mechanizmach hamowania aktywności tego receptora, ma działanie ochronne. Dalszych badań wymaga jednak ocena udziału w tym zjawisku aktywności przeciwrodnikowej 1MeTIQ.

5. Podsumowanie i wnioski

W tej rozprawie scharakteryzowałam pobieranie, nagromadzenie oraz oligomeryzację A β w neuronach i zbadalam wpływ tych zjawisk na poziom ekspresji białek synaptycznych w neuronach glutaminianergicznym, a także testowałam możliwość zapobiegania zmianom patologicznym w synapsach przy wykorzystaniu dwu różnych strategii farmakologicznych. Pierwsza z nich polegała na hamowaniu wiązania się apo E z A β , druga na obniżeniu aktywności receptorów NMDA.

Badania pierwszej części rozprawy skupiły się na określeniu wpływu apo E na wychwyty oraz odkładanie się A β w neuronach oraz zbadaniu możliwości zapobiegania tym procesom przez zastosowanie A β 12-28P, syntetycznego peptydu hamującego tworzenie kompleksów A β /apo E. Uzyskane przeze mnie wyniki pokazujące zdolność neuronów hipokampa do pobierania zarówno A β 40 jak i A β 42 są zgodne z danymi literaturowymi. Ponadto wykazałam, iż apo E ma zdolność wiązania się do sekwencji A β , co znacznie usprawnia jego wychwyty z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, oraz że w warunkach dostępności apo E dochodzi do nasilonego odkładania się peptydu w przedziałach wewnątrzkomórkowych. Dalsze badania pokazały, iż zależnemu od apo E nagromadzeniu się A β w komórkach towarzyszy agregacja peptydu w formy oligomeryczne, a proces ten jest efektywnie hamowany przez A β 12-28P. Należy zaznaczyć, iż w przeciwieństwie do dobrze scharakteryzowanego zagadnienia wpływu apo E na zwiększoną fibrylizację A β w warunkach *in vitro* i *in vivo*, moje badania wskazujące na udział apo E w procesie oligomeryzacji A β dotyczyły kwestii słabo poznanych. Na podstawie uzyskanych obserwacji powstało przypuszczenie, iż oligomeryzacja A β w neuronach może utrudniać usuwanie peptydu z komórek, a tym samym być przyczyną odnotowanego przeze mnie zalegania A β w strukturach ścieżki endosomalno/lizosomalnej. To założenie potwierdziły wyniki badań wskazujące na upośledzenie degradacji A β w neuronach hodowanych w obecności astrocytów, a więc przy dostępności apo E. Świadczy to o przewadze właściwości apo E promujących usprawnianie wychwyty oraz odkładania się A β w neuronach w postaci oligomerów, maskujących jej fizjologiczną funkcję wspomaganie metabolizmu A β . Uważa się, iż jednym z pierwszych widocznych skutków patologicznego odkładania się A β w neuronach oraz jego wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji jest istotne obniżenie poziomu ekspresji białek synaptycznych oraz rozległa degeneracja synaps, zachodzące na wczesnych

etapach AD. Dlatego kolejny etap moich badań obejmował określenie wpływu A β 12-28P na wywołane przez A β zmiany patologiczne w synapsach glutaminianergicznych. Z moich obserwacji wynika, iż odkładanie się A β w neuronach powoduje istotny spadek ekspresji markerów synaptycznych takich jak NR1/NMDA, PSD-95 oraz synaptofizyna, a efekt ten jest nasilony w obecności apo E. Zastosowanie A β 12-28P skutecznie hamuje ten proces, świadcząc o ochronnym wpływie tego peptydu na synapsy glutaminianergiczne. Innym powszechnie uznanym przejawem toksyczności A β jest hiperfosforylacja białka tau. Stąd za celowe uznałam sprawdzenie, czy patologicznemu nagromadzeniu się A β 40 w neuronach hipokampa będą towarzyszyły zmiany stopnia ufosforylowania białka tau. Wyniki moich wstępnych badań, nie wykazały wpływu odkładania się A β 40 w neuronach oraz jego wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji na stan ufosforylowania tau. Te wyniki nie pozwalają na wysunięcie daleko idących wniosków. Wymaga sprawdzenia jaki wpływ na stan ufosforylowania białka tau będzie miało zastosowanie A β 42, z którym w większym stopniu związane jest tworzenie splotów neurofibrylarnych, a także uwzględnienie innych epitopów ufosforylowanej postaci białka tau po inkubacji neuronów z obiema formami A β .

W drugiej części tej rozprawy testowałam właściwości farmakologiczne i neuroprotektoryjne 1MeTIQ, w tym ochronne działanie tej substancji na synapsy glutaminianergiczne poddane działaniu A β . 1MeTIQ jest związkiem o wymagających potwierdzenia i scharakteryzowania cechach antagonisty receptora NMDA o właściwościach przeciwrodnikowych. Wykazałam po raz pierwszy, że 1MeTIQ hamuje wiązanie znakowanej D-seryny do błon synaptycznych. Ten wynik, łącznie z potwierdzonym przeze mnie obniżaniem przez 1MeTIQ wiązania znakowanego MK-801, wskazuje na blokowanie miejsca glicynowego_b receptora NMDA, co drastycznie obniża aktywację kanału jonowego tego receptora. Dalsze badania z użyciem pierwotnych hodowli neuronów glutaminianergicznych potwierdziły, że 1MeTIQ hamuje także wywołany przez Glu i NMDA napływ wapnia do neuronów i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia tych jonów, co jest odbiciem hamowania aktywności receptorów NMDA. Zaobserwowałam także inne właściwości 1MeTIQ typowe dla antagonisty receptora NMDA, a więc bezpośrednie hamowanie neurotoksyczności wywołanej przez Glu, a także po raz pierwszy wykazałam zdolność tej substancji do indukcji tolerancji neuronów na ekscytotoksyczność. Jest to jednak działanie świadczące o niskim powinowactwie do receptora NMDA, ponieważ efekty

porównywalne do działania uznanego antagonisty receptora NMDA - MK-801 w stężeniu 0,5 μ M obserwowałam przy zastosowaniu 0,5 mM 1MeTIQ. Do cech typowych dla antagonisty receptora NMDA, które jak ustaliłam posiada 1MeTIQ, należy neuroprotekcja w wybranych modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu. Opisane poprzednio w warunkach eksperymentu chemicznego działanie przeciwoxidacyjne 1MeTIQ znalazło potwierdzenie w moich doświadczeniach *in vitro* na hodowlach pierwotnych neuronów mózgu, przy czym wykazałam, że jest to właściwość niezależna od hamowania aktywności receptora NMDA. Scharakteryzowanie 1MeTIQ jako antagonisty receptora NMDA o niezależnym działaniu przeciwoxidacyjnym uzasadniło podjęcie badania nad ochroną przez 1MeTIQ synaps glutaminianergicznych przed działaniem toksycznym A β . Badanie to wykazało, że 0,5 mM 1MeTIQ, podobnie jak 0,5 μ M MK-801, hamuje w hodowlach pierwotnych neuronów hipokampa wywołane przez A β obniżenie ekspresji powierzchniowych markerów synaps glutaminianergicznych, w tym białka podjednostki NR1 receptora NMDA. Tym samym potwierdziłam skuteczność ochrony przez 1MeTIQ synaps neuronów glutaminianergicznych przed toksycznym działaniem A β .

Wyniki uzyskane w toku badań pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

- ApoE odgrywa kluczową rolę w wychwycie oraz patologicznym nagromadzeniu się A β w komórkach, czego potwierdzeniem jest hamowanie tego procesu przez antagonistę wiązania A β /apo E, A β 12-28P.
- Odkładanie się A β w strukturach ścieżki endosomalno/lizosomalnej powoduje stopniową agregację peptydu w formy oligomeryczne o silnym działaniu cytotoxycznym. Tworzenie oligomerów A β , wyraźnie upośledzających jego wewnątrzkomórkową degradację, prowadzi do rozległej utraty markerów synaps glutaminianergicznych na powierzchni komórek.
- A β 12-28P efektywnie hamuje proces oligomeryzacji w neuronach oraz przywraca ekspresję białek synaptycznych, co świadczy o jego działaniu ochronnym w indukowanej przez A β degeneracji synaps glutaminianergicznych.
- 1MeTIQ blokuje miejsce wiążące glicynę w kompleksie receptora NMDA i hamuje indukcję sygnału wapniowego w tym receptorze, ma więc właściwości

antagonisty receptora NMDA. Dalszym potwierdzeniem tych właściwości 1MeTIQ jest jego potencjał neuroprotekcyny w warunkach ekscytotoksyczności *in vitro* oraz w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu.

- Niezależnie od hamowania aktywności receptorów NMDA, 1MeTIQ wykazuje w warunkach doświadczenia biologicznego działanie przeciwrodnikowe.
- 1MeTIQ, podobnie jak uznany antagonist receptorów NMDA - MK-801, znosi cytotoksyczne działanie A β , przejawiające się obniżeniem ekspresji białek synaptycznych, co wskazuje na możliwość zastosowania antagonistów receptora NMDA w hamowaniu obserwowanych w AD, wywołanych przez A β zmian patologicznych w synapsach glutaminianergicznych.

Wyniki tej pracy wykazały więc hamowanie toksycznego działania A β na synapsy glutaminianergiczne przy wykorzystaniu A β 12-28P, peptydu blokującego wiązanie A β z apo E, oraz 1MeTIQ, antagonisty receptorów NMDA.

Piśmiennictwo

Adamec E, Mercken M, Beermann ML, Didier M, Nixon RA. (1997) Acute rise in the concentration of free cytoplasmic calcium leads to dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau. *Brain Res* 757(1): 93-101.

Adessi C, Frossard MJ, Boissard C, Fraga S, Bieler S, Ruckle T, Vilbois F, Robinson SM, Mutter M, Banks WA, Soto C (2003) Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278(16): 13905-13911.

Alberdi E, Sánchez-Gómez MV, Cavaliere F, Pérez-Samartín A, Zugaza JL, Trullas R, Domercq M, Matute C (2010) Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* 47(3): 264-272.

Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis* 20(2): 187-198.

Almeida CG, Takahashi RH, Gouras GK (2006) Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci* 26(16): 4277-4288.

Alvarez G, Munoz –Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J (2002) Regulation of tau phosphorylation and protection against β -amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disord* 4(3): 153-165.

Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Z psychiatr U Psych-Gerichtl Med.* 64: 146-148.

Andine P, Orwar O, Jacobson I, Sandberg M, Hagberg H (1991) Changes in extracellular amino acids and spontaneous neuronal activity during ischaemia and extended reflow in the CA1 of the rat hippocampus. *J Neurochem* 57(1): 222–229.

Andine P, Thordstein M, Kjellmer I, Nordborg C, Thiringer K, Wennberg E, Hagberg H (1990) Evaluation of brain damage in a rat model of neonatal hypoxic-ischemia. *J Neurosci Methods* 35(3): 253-260.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicoretta P (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15(4): 961-973.

Antkiewicz-Michaluk L, Karolewicz B, Romańska I, Michaluk J, Bojarski AJ, Vetulani J (2003) 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline protects against rotenone-induced mortality and biochemical changes in rat brain. *Eur J Pharmacol* 466(3): 263-269.

Antkiewicz-Michaluk L, Łazarewicz JW, Patsenka A, Kajta M, Zieminska E, Salinska E, Wasik A et al. (2006) The mechanism of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines neuroprotection: the importance of free radicals scavenging properties and inhibition of glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurochem* 97(3): 846-856.

Antkiewicz-Michaluk L, Michaluk J, Mokrosz M, Romanska I, Lorenc-Koci E, Ohta S, Vetulani J (2001) Different action on dopamine catabolic pathways of two endogenous 1,2,3,4-

tetrahydroisoquinolines with similar antidopaminergic properties. *J Neurochem* 78(1): 100-108.

Antkiewicz-Michaluk L, Romańska I, Papla I, Michaluk J, Bakalarz M, Vetulani J, Krygowska-Wajs A, Szczudlik A (2000) Neurochemical changes induced by acute and chronic administration of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol in dopaminergic structures of rat brain. *Neuroscience* 96(1): 59-64.

Antkiewicz-Michaluk L, Wardas J, Michaluk J, Romaska I, Bojarski A, Vetulani J (2004) Protective effect of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline against dopaminergic neurodegeneration in the extrapyramidal structures produced by intracerebral injection of rotenone. *Int J Neuropsychopharmacol* 7(2): 155-163.

Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34(4-5): 325-337.

Ashe KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 66(5): 631-645.

Bahr BA, Hoffman KB, Yang AJ, Hess US, Glabe CG, Lynch G (1998) Amyloid beta protein is internalized selectively by hippocampal field CA1 and causes neurons to accumulate amyloidogenic carboxyterminal fragments of the amyloid precursor protein. *J Comp Neurol* 397(1): 139-147.

Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet* 17(3): 263-264.

Bayer TA, Wirths O (2010) Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2:8.

Benveniste H, Drejer J, Schusboe A, Diemer NH (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43(5): 1369-1374.

Beffert U, Aumont N, Dea D, Lussier-Cacan S, Davignon J, Poirier J (1998) Beta-amyloid peptides increase the binding and internalization of apolipoprotein E to hippocampal neurons. *J Neurochem* 70(4): 1458-1466.

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium- a life and death signal. *Nature* 395(6703): 645-648.

Berman FW, Murray TF (2000) Brevetoxin-induced autocrine excitotoxicity is associated with manifold routes of Ca²⁺ influx. *J Neurochem* 74(4): 1443-1451.

Besshoh S, Bawa D, Teves L, Wallace MC, Gurd JW (2005) Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem* 93(1): 186-194.

Bi X, Gall CM, Zhou J, Lynch G (2002) Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. *Neuroscience* 112(4): 827-840.

- Birks J (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1:CD005593.
- Bouchelouche P, Belhage B, Frandsen A, Drejer J, Schousboe A (1989) Glutamate receptor activation in cultured cerebellar granule cells increases cytosolic free Ca^{+2} by mobilization of cellular Ca^{+2} and activation of Ca^{+2} influx. *Exp Brain Res* 76(2): 281-291.
- Boyer C, Schikorski T, Stevens CF (1998) Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J Neurosci* 18(14): 5294-5300.
- Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH, Hui DY, Mahley RW, Gebicke-Haerter PJ, Ignatias MJ, Shooter EM (1989) A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *Clin Invest* 83(3): 1015-1031.
- Buchan A, Pulsinelli WA (1990) Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci* 10(1): 311-316.
- Burda J, Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M, Matiasova M, Domorakova I, Mechirova E, Ferikova M, Salinas M, Burda R (2006) Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 26(7-8): 1141-1151.
- Burdick D, Kosmoski J, Knauer MF, Glabe CG (1997) Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A beta 1-42, in differentiated PC12 cells. *Brain Res* 746(1-2): 275-284.
- Burns MP, Noble WJ, Olm V, Gaynor K, Casey E, LaFrancois J, Wang L, Duff K (2003) Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar A beta in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res* 110(1): 119-125.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) β -amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14(4): 879-888.
- Butterfield DA, Pocernich CB (2003) The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 17(9): 641-652.
- Buttini M, Masliah E, Barbour R, Grajeda H, Motter R, Johnson-Wood K, Khan K, Seubert P, Freedman S, Schenk D, Games D (2005) Beta-amyloid immunotherapy prevents synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 25(40): 9096-90101.
- Carling RW, Leeson PD, Moseley AM, Baker R, Foster AC, Grimwood S, Kemp JA, Marshall GR (1992) 2-Carboxytetrahydroquinolines. Conformational and stereochemical requirements for antagonism of the glycine site on the NMDA receptor. *J Med Chem* 35(11): 1942-1953.
- Carlson NG, Rojas MA, Black JD, Redd JW, Hille J, Hill KE, Rose JW (2009) Microglial inhibition of neuroprotection by antagonists of the EP1 prostaglandin E2 receptor. *J Neuroinflammation* 6:5.
- Castano EM, Prelli F, Wisniewski T, Golabek A, Kumar RA, Soto C, Frangione B (1995) Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem J* 306 (Pt 2): 599-604.

Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, Fagan AM, Morris JC, Mawuenyega KG, Cruchaga C, Goate AM, Bales KR, Paul SM, Bateman RJ, Holtzman DM (2011) Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- β Peptide Clearance. *Sci Transl Med* 3(89): 89ra57.

Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid β deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol* 157(1): 277-286.

Chafekar SM, Baas F, Scheper W (2008) Oligomer-specific A β toxicity in cell models is mediated by selective uptake. *Biochim Biophys Acta* 1782(9): 523-531.

Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2(3): 271-276.

Choi DW. (1994) Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann NY Acad Sci* 747: 162-171.

Chromy BA, Nowak RJ, Lambert MP, Viola KL, Chang L, Velasco PT, Jones BW, Fernandez SJ, Lacor PN, Horowitz P, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2003) Self-assembly of A β (1-42) into globular neurotoxins. *Biochemistry* 42(44): 12749-12760.

Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM (2008) Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid- β in vivo. *Neuron* 58(1): 42-51.

Cirrito JR, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Parsadanian M, Cramer JW, Audia JE, Nissen JS, Bales KR, Paul SM, DeMattos RB, Holtzman DM (2003) In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid- β metabolism and half-life. *J Neurosci* 23(26): 8844-8853.

Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005) Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8(1): 79-84.

Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258(5087): 1498-1501.

Contestabile A (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum* 1(1): 41-55.

Corbett D, Evans S, Thomas C, Wang D, Jonas RA (1990) MK-801 reduced cerebral ischemic injury by inducing hypothermia. *Brain Res* 514(2): 300-304.

Crockard A, Iannotti F, Hunstock AT, Smith RD, Harris RJ, Symon L (1980) Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke* 11(5): 494-498.

D'Andrea MR, Nagele RG, Wang HY, Peterson PA, Lee DH Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology* 2001 38(2): 120-34.

Danysz W, Parsons CG (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 50(4): 597-664.

Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler A, Quack G. (2000a) Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res* 2(2-3): 85-97.

Danysz W, Sopala M, Frankiewicz T (2000b) Jonotropowe receptory glutaminianergiczne. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Pobudzające aminokwasy. Pod redakcją Andrzeja Pilca i Piotra Popika, Kraków, str. 25-51.

Dell'Anna ME, Calzolari S, Molinari M, Iuvone L, Calimici R (1991) Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav Brain Res* 45(2): 125-134.

Dirnagl U, Becker K, Meisel A (2009) Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 8(4): 398-412.

Dong H, Yuede CM, Coughlan C, Lewis B, Csernansky JG (2008) Effects of memantine on neuronal structure and conditioned fear in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 33(13): 3226-3236.

Duszczuk M, Gadamski R, Ziembowicz A, Danysz W, Łazarewicz JW (2005) NMDA receptor antagonism does not inhibit induction of ischemic tolerance in gerbil brain in vivo. *Neurotox Res* 7(4): 283-292.

Duszczuk M, Gadamski R, Ziembowicz A, Łazarewicz JW (2006) Antagonists of group I metabotropic glutamate receptors do not inhibit induction of ischemic tolerance in gerbil hippocampus. *Neurochem Int* 48(6-7):478-484.

Eimerl S, Schramm M (1994) The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J Neurochem* 62(3): 1223-1226.

Ehrlich I, Malinow R (2004) Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci* 24(4): 916-927.

Evin G, Weidemann A (2002) Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Aβ amyloid peptides. *Peptides* 23(7): 1285-1297.

Follesa P, Ticku MK (1996) NMDA receptor upregulation: molecular studies in cultured mouse cortical neurons after chronic antagonist exposure. *J Neurosci* 16(7): 2172-2178.

Fong DK, Rao A, Crump FT, Craig AM (2002) Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J Neurosci* 22(6): 2153-2164.

Foster AC, Kemp JA, Leeson PD, Grimwood S, Donald AE, Marshall GR, Priestley T, Smith JD, Carling RW (1992) Kynurenic acid analogues with improved affinity and selectivity for the glycine site on the N-methyl-D-aspartate receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 41(5): 914-922.

Foster AC, Gill R, Woodruff GN (1988) Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J Neurosci* 8(12): 4745-4754.

Friedman LK, Segal M (2010) Early exposure of cultured hippocampal neurons to excitatory amino acids protects from later excitotoxicity. *Int J Dev Neurosci* 28(2): 195-205.

- Fuentealba RA, Liu Q, Zhang J, Kanekiyo T, Hu X, Lee JM, LaDu MJ, Bu G (2010) Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates neuronal Abeta42 uptake and lysosomal trafficking. *PLoS One* 5(7): e11884.
- Gandy S, Caporaso G, Buxbaum J, Frangione B, Greengard P (1994) APP processing, A beta-amyloidogenesis, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15(2): 253-256.
- Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA (1998) Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* 4(7): 827-831.
- Ghiso J, Calero M, Matsubara E, Governale S, Chuba J, Beavis R, Wisniewski T, Frangione B (1997) Alzheimer's soluble amyloid beta is a normal component of human urine. *FEBS Lett* 408(1): 105-108.
- Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, Frangione B (1993) The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem J* 293 (Pt 1): 27-30.
- Gilland E, Hagberg H (1996) NMDA receptor-dependent increase of cerebral glucose utilization after hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(5): 1005-1013.
- Gilland E, Hagberg H (1997) Is MK-801 neuroprotection mediated by systemic hypothermia in the immature rat? *Neuroreport* 8(7): 1603-1605.
- Glabe CG (2001) Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17(2): 137-145.
- Glabe CG (2008) Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem* 283(44): 29639-29643.
- Gleichmann M, Mattson MP (2011) Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid Redox Signal* 14(7): 1261-173.
- Golabek AA, Soto C, Vogel T, Wisniewski T (1996) The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid beta-peptide is dependent on beta-peptide conformation. *J Biol Chem* 271(18): 10602-10606.
- Golde TE (2005) The Abeta hypothesis: leading us to rationally-designed therapeutic strategies for the treatment or prevention of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 15(1): 84-87.
- Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG (1992) Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255(5045): 728-730.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275(8): 5535-5544.
- Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 61(3): 921-927.

- Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(18): 10417-10422.
- Goto Y, Niidome T, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H (2006) Amyloid beta-peptide preconditioning reduces glutamate-induced neurotoxicity by promoting endocytosis of NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 351(1):259-65.
- Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH (2005) Intraneuronal A β accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26(9): 1235-1244.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu HX, Greengard P, Relkin NR (2000) Intraneuronal A β 42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 156: 15-20.
- Gray NM, Cheng BK, Mick SJ, Lair CM, Contreras PC (1989) Phencyclidine-like effects of tetrahydroisoquinolines and related compounds. *J Med Chem* 32(6): 1242-1248.
- Greene JG, Greenamyre JT (1996) Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* 66(2): 637-643.
- Gregori L, Fuchs C, Figueiredo-Pereira ME, Van Nostrand WE, Goldgaber D (1995) Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *J Biol Chem* 270(34): 19702-19708.
- Guan ZZ (2008) Cross-talk between oxidative stress and modifications of cholinergic and glutaminergic receptors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin* 29(7): 773-780.
- Guillaud L, Setou M, Hirokawa N (2003) KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23(1): 131-40.
- Gyls KH, Fein JA, Tan AM, Cole GM (2003) Apolipoprotein E enhances uptake of soluble but not aggregated amyloid-beta protein into synaptic terminals. *J Neurochem* 84(6): 1442-1451.
- Habas A, Kharebava G, Szatmari E, Hetman M (2006) NMDA neuroprotection against a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor, LY294002 by NR2B-mediated suppression of glycogen synthase kinase-3 β -induced apoptosis. *J Neurochem* 96(2): 335-348.
- Hagberg H (1997) Cerebroprotective strategies in the neonate based on agents that are in clinical use. *Prenat Neonat Med* 2(2): 3-16.
- Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nyström B, Jacobson I, Hamberger A (1985) Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb Blood Flow Metab* 5(3): 413-419.
- Han W, Ji T, Mei B, Su J (2011) Peptide p3 may play a neuroprotective role in the brain. *Med Hypotheses* 76(4): 543-546.
- Hansen RA, Gartlehner G, Kaufer DJ, Lohr KN, Carey T (2006) Drug Class Review on Alzheimer's Drugs: Final Report [Internet]. Portland (OR): Oregon Health & Science University.

Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256(5054): 184-185.

Harper JD, Lansbury PT Jr (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 66: 385-407.

Hartley DM, Kurth MC, Bjerkness L, Weiss JH, Choi DW (1993) Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci* 13(5): 1993-2000.

Hellström-Westas L, Rosén I, Svenningsen NW (1995) Predictive value of early continuous amplitude integrated EEG recordings on outcome after severe birth asphyxia in full term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 72(1): F34-8.

Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 3270-3274.

Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2(12): 880-888.

Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M (1995) Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K^{+} channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4666-4670.

Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21(9): 3017-3023.

Holtzman DM (2008) Alzheimer's disease: Moving towards a vaccine. *Nature* 454(7203): 418-420.

Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2892-2897.

Hort J, Laczó J, Vyhnálek M, Bojar M, Bures J, Vlcek K (2007) Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(10): 4042-4047.

Hu J, LaDu MJ, Van Eldik LJ (1998) Apolipoprotein E attenuates beta-amyloid-induced astrocyte activation. *J Neurochem* 71(4): 1626-1634.

Ida N, Masters CL, Beyreuther K (1996) Rapid cellular uptake of Alzheimer amyloid betaA4 peptide by cultured human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 394(2): 174-178.

Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC (2004) Early $\text{A}\beta$ accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62: 925-931.

Isaacs AM, Senn DB, Yuan M, Shine JP, Yankner BA (2006) Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium. *J Biol Chem* 281(38): 27916-27923.

Ishii K, Tamaoka A, Mizusawa H, Shoji S, Ohtake T, Fraser PE, Takahashi H, Tsuji S, Gearing M, Mizutani T, Yamada S, Kato M, St George-Hyslop PH, Mirra SS, Mori H (1997) Abeta1-40 but not Abeta1-42 levels in cortex correlate with apolipoprotein E epsilon4 allele dosage in sporadic Alzheimer's disease. *Brain Res* 748(1-2): 250-252.

Jarvis MF, Murphy DE, Williams M (1987) Quantitative autoradiographic localization of NMDA receptors in rat brain using [3H]CPP: comparison with [3H]TCP binding sites. *Eur J Pharmacol* 141(1): 149-152.

Jiang X, Zhu D, Okagaki P, Lipsky R, Wu X, Banaudha K, Mearow K, Strauss KI, Marini AM (2003) N-methyl-D-aspartate and TrkB receptor activation in cerebellar granule cells: an in vitro model of preconditioning to stimulate intrinsic survival pathways in neurons. *Ann N Y Acad Sci* 993:134-145.

Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Willson TM, Collins JL, Richardson JC, Smith JD, Comery TA, Riddell D, Holtzman DM, Tontonoz P, Landreth GE (2008) ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58(5): 681-693.

Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, Wagner SL, Troncoso JC, Kawas CH, Katzman R, Koo EH (2000) Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *Clin Invest* 106(9): 1159-1166.

Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300(5618): 486-489.

Khlistunova I, Biernat J, Wang Y, Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Mandelkow E, Mandelkow EM (2006) Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem* 281(2): 1205-1214.

Kim J, Castellano JM, Jiang H, Basak JM, Parsadanian M, Pham V, Mason SM, Paul SM, Holtzman DM (2009) Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron* 64(5): 632-644.

Kim WK, Pae YS. (1996) Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci. Lett* 216(2): 117-120.

Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, et al. (1990) "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528(1): 21-24.

Knauer MF, Soreghan B, Burdick D, Kosmoski J, Glabe CG (1992) Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16): 7437-7441.

Kohno M, Ohta S, Hirobe M Tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydroisoquinoline as novel endogenous amines in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 140(1): 448-454.

Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269(26): 17386-17389.

Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT, Younkin S, Ashe KH (2002) Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22(15): 6331-6335.

Kumari S, Mg S, Mayor S (2010) Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* 20(3): 256-275.

Kuszczyk M, Sadowski M (2009) Cell type specific uptake and clearance of β -amyloid peptides. *Acta Neurobiol Exp* 69(3): 341.

Kuszczyk M, Słomka M, Antkiewicz-Michaluk L, Salińska E, Łazarewicz JW. (2010) 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and established uncompetitive NMDA receptor antagonists induce tolerance to excitotoxicity. *Pharmacol Rep* 62(6): 1041-1050.

Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358(6381): 36-41.

Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24(45): 10191-10200.

Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27(4): 796-807.

LaDu MJ, Shah JA, Reardon CA, Getz GS, Bu G, Hu J, Guo L, van Eldik LJ (2000) Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures. *J Biol Chem* 275(43): 33974-33980.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8(7): 499-509.

LaFerla FM, Troncoso JC, Strickland DK, Kawas CH, Jay G (1997) Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apoE uptake and intracellular Abeta stabilization. *J Clin Invest* 100(2): 310-320.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6448-6453.

Le Roux PD, Reh TA (1996) Reactive astroglia support primary dendritic but not axonal outgrowth from mouse cortical neurons in vitro. *Exp Neurol* 137(1): 49-65.

Leeson PD, Carling RW, Moore KW, Moseley AM, Smith JD, Stevenson G, Chan T, Baker R, Foster AC, Grimwood S (1992) 4-Amido-2-carboxytetrahydroquinolines. Structure-activity relationships for antagonism at the glycine site of the NMDA receptor. *J Med Chem* 35(11): 1954-1968.

Leist M, Nicotera P (1998) Apoptosis, excitotoxicity and neuropathology. *Exp Cell Res* 239(2): 183-201.

Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293(5534): 1487-1491.

Li R, Lindholm K, Yang LB, Yue X, Citron M, Yan R, Beach T, Sue L, Sabbagh M, Cai H, Wong P, Price D, Shen Y. (2004) Amyloid β peptide load is correlated with increased β -secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101(10): 3632-3637.

Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D (2009) Soluble oligomers of amyloid beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*. 62:788-801.

Lipton SA (2004) Failure and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 1(1): 101-110.

Lipton SA (2005) The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Curr Alzheimer Res* 2(2): 155-165.

Lipton SA (2007) Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. *Curr Drug Targets* 8(5): 621-632.

Liu SJ, Zhang JY, Li HL, Fang ZY, Wang Q, Deng HM, Gong CX, Grundke-Iqbal, Wang JZ (2004) Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J Biol Chem* 279(48): 50078-50088.

Liu XQ, Sheng R, Qin ZH (2009) The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin* 30(8): 1071-1080.

Ludwiq M, Hoessl CE, Höfner G, Wanner KT (2006) Affinity of 1-aryl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives to the ion channel binding site of the NMDA receptor complex. *Eur J Med Chem* 41(8): 1003-1010.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155(3): 853-862.

Luo JH, Fu ZY, Losi G, Kim BG, Prybylowski K, Vissel B, Vicini S (2002) Functional expression of distinct NMDA channel subunits tagged with green fluorescent protein in hippocampal neurons in culture. *Neuropharmacology* 42(3): 306-18.

Lynch DR, Guttman RP (2002) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 300(3):717-723.

Łazarewicz JW (1996) Calcium transients in brain ischemia: role in neuronal injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 56(1): 299-311.

- Łazarewicz JW, Gadamski R, Parsons CG, Danysz W (1997) Protection against post-ischaemic neuronal loss in gerbil hippocampal CA1 by glycineB and AMPA antagonists. Short communication. *J Neural Transm* 104(11-12): 1249-1254.
- Łazarewicz JW, Salińska E (2005) Udział jonów wapnia w patologii niedokrwiennej mózgu. W: *Mózg a niedokrwienie*. Red. Strosznajder JB, Czernicki Z, Platan, Kraków, str. 16-46.
- Łazarewicz JW, Salińska E, Speina E, Gadamski R (1994) Effects of MK-801 and ganglioside GM1 on postischemic prostanoid release and hippocampal lesion in gerbil brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 54(4): 293-305.
- Ma J, Brewer HB Jr, Potter H (1996) Alzheimer A beta neurotoxicity: promotion by antichymotrypsin, ApoE4; inhibition by A beta-related peptides. *Neurobiol Aging* 17(5): 773-780.
- Ma J, Yee A, Brewer HB, Jr. Das S, Potter H (1994) Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372(6501): 92-94.
- Makarewicz D, Duszczyk M, Gadamski R, Danysz W, Łazarewicz JW. (2006) Neuroprotective potential of group I metabotropic glutamate receptor antagonists in two ischemic models. *Neurochem Int* 48(6-7):485-490.
- Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH (2006) Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 15(9): 1437-1449.
- Manelli AM, Bulfinch LC, Sullivan PM, LaDu MJ (2007) Abeta42 neurotoxicity in primary co-cultures: effect of apoE isoform and Abeta conformation. *Neurobiol Aging* 28(8): 1139-1147.
- Marini AM, Jiang X, Wu X, Pan H, Guo Z, Mattson MP, Blondeau N, Novelli A, Lipsky RH (2007) Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino Acids* 32(3): 299-304.
- Marini AM, Ueda Y, June CH (1999) Intracellular survival pathways against glutamate receptor agonist excitotoxicity in cultured neurons. Intracellular calcium responses. *Ann NY Acad Sci* 890: 421-437.
- Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23(1): 134-147.
- Martin BL, Schrader-Fischer G, Busciglio J, Duke M, Paganetti P, Yankner BA. (1995) Intracellular accumulation of β -amyloid in cells expressing the Swedish mutant amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* Nov 10;270(45):26727-30.
- Maslah, E., Samuel, W., Veinbergs, I., Mallory, M., Mante, M., and Saitoh, T. (1997). Neurodegeneration and cognitive impairment in apoE-deficient mice is ameliorated by infusion of recombinant apoE. *Brain Res.* 751:307–314.
- Matsuoka Y, Jouroukhin Y, Gray AJ, Ma L, Hirata-Fukae C, Li HF, Feng L, Lecanu L, Walker BR, Planel E, Arancio O, Gozes I, Aisen PS (2008) A neuronal microtubule-interacting agent, NAPVSIPQ, reduces tau pathology and enhances cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 325(1): 146-153.

Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, Herukka SK, van der Flier WM, Blankenstein MA, Ewers M, Rich K, Kaiser E, Verbeek M, Tsolaki M, Mulugeta E, Rosén E, Aarsland D, Visser PJ, Schröder J, Marcusson J, de Leon M, Hampel H, Scheltens P, Pirttilä T, Wallin A, Jönhagen ME, Minthon L, Winblad B, Blennow K (2009) CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 302(4): 385-393.

Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330(6012): 1774.

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46(6): 860-866.

McNaught KS, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD (1998) Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 56(8): 921-933.

Meller R, Thompson SJ, Lusardi TA, Ordonez AN, Ashley MD, Jessick V, Wang W, Torrey DJ, Henshall DC, Gafken PR, Saugstad JA, Xiong ZG, Simon RP (2008) Ubiquitin proteasome-mediated synaptic reorganization: a novel mechanism underlying rapid ischemic tolerance. *J Neurosci* 28(1): 50-59.

Merrick SE, Demoise DC, Lee VM (1996) Site-specific dephosphorylation of tau protein at Ser²⁰²/Thr²⁰⁵ in response to microtubule depolymerization in cultured human neurons involves protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 271(10): 5589-5594.

Miao B, Yin XH, Pei DS, Zhang QG, Zhang GY (2005) Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation. *J Biol Chem* 280(23): 21693-21699.

Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2002) Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* 70(3): 392-401.

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20(11): 4050-4058.

Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ, Wang HY (2002) Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 110:199-211.

Nakamura T, Lipton SA (2008) Emerging roles of S-nitrosylation in protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal* 10(1): 87-101.

Nakanishi H, Katsuta K, Koide T, Ueda Y, Shirakawa K, Yoshida K (1994) Protective effect of FR115427 against ischemic hippocampal damage in gerbils. *Jpn J Pharmacol* 64(3): 189-193.

Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Hashizume Y, Nakahara D, Takahashi T, Ota M (1996) Dopamine-derived endogenous 1(R),2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-

tetrahydroisoquinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies. *Brain Res* 709(2): 285-295.

Navon H, Bromberg Y, Sperling O, Shani E (2011) Neuroprotection by NMDA Preconditioning Against Glutamate Cytotoxicity is Mediated Through Activation of ERK 1/2, Inactivation of JNK, and by Prevention of Glutamate-Induced CREB Inactivation. *J Mol Neurosci*. 2011 May 10. [Epub ahead of print]

Nowak JZ, Zawilska JB Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.

Nyakas C, Buwalda B, Luiten GM (1996) Hypoxia and brain development. *Prog Neurobiol* 49: 1-51.

Obrenovitch TP (2008) Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiol Rev* 88(1): 211-247.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39(3): 409-421.

Oddo S, Caccamo A, Tran L, Lambert MP, Glabe CG, Klein WL, LaFerla FM (2006) Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. *J Biol Chem* 281(3): 1599-1604.

Ohtsuki T, Ruetzler CA, Tasaki K, Hallenbeck JM (1996) Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(6): 1137-1142.

Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA (1991) NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254(5037): 1515-1518.

Olney JW, Wozniak DF, Farber NB (1997) Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease. New hypothesis and new therapeutic strategies. *Arch Neurol* 54(10): 1234-1240.

Ott BR, Blake LM, Kagan E, Resnic M (2007) Open label, multicenter, 28-week extension study of the safety and tolerability of memantine in patients with mild to moderate Alzheimer`s disease. *J Neurol* 254(3): 351-358.

Pankiewicz J, Prelli F, Sy MS, Kascsak RJ, Kascsak RB, Spinner DS, Carp RI, Meeker HC, Sadowski M, Wisniewski T (2006) Clearance and prevention of prion infection in cell culture by anti-PrP antibodies. *Eur J Neurosci* 23(10): 2635-2647.

Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17(3): 553-565.

Parrado J, Absi E, Ayala A, Castaño A, Cano J, Machado A (2000) The endogenous amine 1-methyl-1,2,3,4- tetrahydroisoquinoline prevents the inhibition of complex I of the respiratory chain produced by MPP(+). *J Neurochem* 75(1): 65-71.

Parsons CG, Danysz W, Quack G (1999a) Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology* 38(6): 735-767.

Parsons CG, Gilling K (2007) Memantine as an example of a fast, voltage-dependent, open channel N-methyl-D-aspartate receptor blocker. *Methods Mol Biol* 403: 15-36.

Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D (1993) Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology* 32(12): 1337–1350.

Parsons CG, Hartmann S, Spielmanns P (1999b) The aminoalkyl-cyclohexane MRZ 2:579 is an uncompetitive NMDA Receptor antagonist with fast blocking kinetics and strong voltage-dependency. *Soc Neurosci Abs* 24(229): 7.

Parsons CG, Panchenko VA, Pinchenko VO, Tsyndrenko AY, Krishtal OA (1996) Comparative patch clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal neurones on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantine. *Eur J Neurosci* 8(3): 446–454.

Patsenka A, Antkiewicz-Michaluk L (2004) Inhibition of rodent brain monoamine oxidase and tyrosine hydroxylase by endogenous compounds, 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline alkaloids. *Pol J Pharmacol* 56(6): 727-734.

Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B (2011) Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. *Mol Biol Rep* 38(1): 453-460.

Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R (2002) A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16742-16747.

Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ (1994) Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci* 14(2): 667-696.

Pierrot N, Ghisdal P, Caumont AS, Octave JN (2004) Intraneuronal amyloid-beta1-42 reduction triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. *J Neurochem* 88(5): 1140-1150.

Pietraszek M, Michaluk J, Romańska I, Wasik A, Gołombiowska K, Antkiewicz-Michaluk L (2009) 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline antagonizes a rise in brain dopamine metabolism, glutamate release in frontal cortex and locomotor hyperactivity produced by MK-801 but not the disruptions of prepulse inhibition, and impairment of working memory in rat. *Neurotox Res* 16(4): 390-407.

Pigino G, Morfini G, Atagi Y, Deshpande A, Yu C, Jungbauer L, LaDu M, Busciglio J, Brady S (2009) Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(14): 5907-5912.

Pignataro G, Meller R, Inoue K, Ordonez AN, Ashley MD, Xiong Z, Gala R, Simon RP (2008) In vivo and in vitro characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(2): 232-241.

Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 262(29): 14352-14360.

Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA (2003) The production of amyloid β peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23(13):5531-5535.

- Prehn JH, Lippert K, Kriegstein J (1995) Are NMDA or AMPA/kainate receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury? *Eur J Pharmacol* 292(2): 179-189.
- Premkumar LS, Auerbach A (1997) Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J Gen Physiol* 110(5): 485-502.
- Prybylowski K, Wenthold RJ (2004) N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *J Biol Chem* 279(11):9673-9676.
- Rao A, Craig AM (1997) Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* 19(4): 801-812.
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362(4): 329-344.
- Rao A, Craig AM (1997) Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* 19(4): 801-812.
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 6364-6369.
- Rapp A, Gmeiner B, Hüttinger M (2005) Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie* 88(5): 473-483.
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT (1993) Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11(4): 575-580.
- Reddy PH. (2006) Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96(1): 1-13.
- Reddy PH, Beal MF (2008) Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14(2): 45-53.
- Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ (2003) Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 348(14): 1333-1341.
- Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9(2): 131-141.
- Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316(5825): 750-754.
- Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, Morabito M, Almeida OF (2005) Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 25(48): 11061-11070.
- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19(2): 105-111.

Saavedra L, Mohamed A, Ma V, Kar S, de Chaves EP (2007) Internalization of β -amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E. *J Biol Chem* 282:35722–35732.

Sadowski MJ, Pankiewicz J, Prelli F, Scholtzova H, Spinner DS, Kascsak RB, Kascsak RJ, Wisniewski T (2009) Anti-PrP Mab 6D11 suppresses PrP(Sc) replication in prion infected myeloid precursor line FDC-P1/22L and in the lymphoreticular system in vivo. *Neurobiol Dis* 34(2): 267-278.

Sadowski MJ, Pankiewicz J, Scholtzova H, Mehta PD, Prelli F, Quartermain D, Wisniewski T (2006) Blocking the apolipoprotein E/amyloid-beta interaction as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49): 18787-18792.

Sadowski M, Pankiewicz J, Scholtzova H, Ripellino JA, Li Y, Schmidt SD, Mathews PM, Fryer JD, Holtzman DM, Sigurdsson EM, Wisniewski T (2004) A synthetic peptide blocking the apolipoprotein E/beta-amyloid binding mitigates beta-amyloid toxicity and fibril formation in vitro and reduces beta-amyloid plaques in transgenic mice. *Am J Pathol* 165(3): 937-948.

Sadowski M, Wisniewski T (2004) Vaccines for conformational disorders. *Expert Rev Vaccines* 3(3): 279-290.

Sadowski MJ, Wisniewski T (2006) Protein misfolding, aggregation, and conformational diseases. *Z Protein Reviews* rozdz. 6: 101-122.

Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Miyamoto E, Kishimoto T, Hisanaga S (1995) In situ dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons. *FEBS Lett* 376(3): 238-242.

Salińska E, Danysz W, Łazarewicz JW (2005) The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 43(4): 322-339.

Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Doody R, van Dyck CH, Mulnard R, Barakos J, Gregg KM, Liu E, Lieberburg I, Schenk D, Black R, Grundman M; Bapineuzumab 201 Clinical Trial Investigators (2009) A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 73(24): 2061-2070.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309(5733): 476-81.

Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20): 9649-9653.

Scholtzova H, Wadghiri YZ, Douadi M, Sigurdsson EM, Li YS, Quartermain D, Banerjee P, Wisniewski T (2008) Memantine leads to behavioral improvement and amyloid reduction in Alzheimer's-disease-model transgenic mice shown as by micromagnetic resonance imaging. *J Neurosci Res* 86(12): 2784-2791.

Schousboe A (1999) Pharmacologic and therapeutic aspects of the developmentally regulated expression of GABA_A and GABA_B receptors: cerebellar granule cells as a model system. *Neurochem Int* 34(5): 373-377.

Schousboe A, Drejer J, Hansen GH, Meier E (1985) Cultured neurons as model systems for biochemical and pharmacological studies on receptors for neurotransmitter amino acids. *Dev Neurosci* 7(5-6): 252-262.

Selkoe DJ (2004) Alzheimer Disease: Mechanistic Understanding Predicts Novel Therapies. *Ann Intern Med* 140: 627-638.

Shah SB, Nolan R, Davis E, Stokin GB, Niesman I, Canto I, Glabe C, Goldstein LS (2009) Examination of potential mechanisms of amyloid-induced defects in neuronal transport. *Neurobiol Dis* 36(1): 11-25.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27(11): 2866-2875.

Shankar GM, Leissring MA, Adame A, Sun X, Spooner E, Masliah E, Selkoe DJ, Lemere CA, Walsh DM (2009) Biochemical and immunohistochemical analysis of an Alzheimer's disease mouse model reveals the presence of multiple cerebral Abeta assembly forms throughout life. *Neurobiol Dis* 36(2): 293-302.

Shie FS, LeBoeuf RC, Jin LW (2003) Early intraneuronal Abeta deposition in the hippocampus of APP transgenic mice. *Neuroreport* 14(1): 123-129.

Siemers ER, Quinn JF, Kaye J, Farlow MR, Porsteinsson A, Tariot P, Zoulnouni P, Galvin JE, Holtzman DM, Knopman DS, Satterwhite J, Gonzales C, Dean RA, May PC (2006) Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology* 66(4): 602-604.

Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS (1984) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226(4676): 850-852.

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8(8): 1051-1058.

Sobow T (2010) Combination treatments in Alzheimer's disease: risks and benefits. *Expert Rev Neurother* 10(5): 693-702.

Song MS, Baker GB, Todd KG, Kar S (2011) Inhibition of β -amyloid1-42 internalization attenuates neuronal death by stabilizing the endosomal-lysosomal system in rat cortical cultured neurons. *Neuroscience* 178: 181-188.

Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castano EM, Frangione B (1998) β -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* 4(7): 822-826.

Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 278(13): 11612-11622.

Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS (2005) Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307(5713): 1282-1288.

- Streltsov VA, Varghese JN, Masters CL, Nuttall SD (2011) Crystal structure of the amyloid- β p3 fragment provides a model for oligomer formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31(4): 1419-1426.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17): 8098-8102.
- Takahashi RH, Almeida CG, Kearney PF, Yu FM, Lin MT, Milner TA, Gouras GK (2004). Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *J Neurosci* 24: 3592–3599.
- Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, Beal MF, Xu H, Greengard P, Gouras GK (2002) Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol* 161(5): 1869-1879.
- Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, Mizui T, Kishi S, Shirao T (2003) Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci* 23(16): 6586-6595.
- Tang BL (2009) Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors. *Cell Adh Migr* 3(1): 118-128.
- Tomiyama T, Corder EH, Mori H (1999). Molecular pathogenesis of apolipoprotein E-mediated amyloidosis in late-onset Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 56: 268–279.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Tremblay R, Chakravarthy B, Hewitt K, Tauskela J, Morley P, Atkinson T, Durkin JP (2000) Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J Neurosci* 20(19): 7183-7192.
- Vazhappilly R, Sucher NJ (2002) Turnover analysis of N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 protein in PC12 cells. *Neurosci Lett* 318(3): 153-157.
- Venkitaramani DV, Chin J, Netzer WJ, Gouras GK, Lesne S, Malinow R, Lombroso PJ (2007) Beta-amyloid modulation of synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci* 27(44): 11832-11837.
- Wahl P, Schousboe A, Honofe T, Drejer J (1989) Glutamate-induced increase in intracellular Ca²⁺ in cerebral cortex neurons is transient in immature cells but permanent in mature cells. *J Neurochem* 1989 53(4): 1316-1319.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416(6880): 535–539.
- Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ (2000) The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39(35): 10831-10839.

- Wang XD, Chen XQ, Yang HH, Hu GY (1999a) Comparison of the effects of cholinesterase inhibitors on [3H]MK-801 binding in rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 272(1): 21-24.
- Wang H, Joseph JA (1999b) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27(5-6): 612-616.
- Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, Trommer BL (2002) Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* 924(2): 133-140.
- Waxman EA, Lynch DR (2005) N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* 11(1): 37-49.
- Weiner HL, Frenkel D (2006) Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol* 6(5): 404-416.
- Wenzel A, Scheurer L, Kunzi R, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1995) Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport* 7(1): 45-48.
- Wild-Bode C, Yamazaki T, Capell A, Leimer U, Steiner H, Ihara Y, Haass C (1997) Intracellular generation and accumulation of amyloid β -peptide terminating at amino acid 42. *J Biol Chem* 272(26): 16085-16088.
- Williamson R, Usardi A, Hanger DP, Anderton BH (2008) Membrane-bound beta-amyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism. *FASEB J* 22(5): 1552-1559.
- Wirhth O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA (2001) Intraneuronal A β accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 306: 116-120.
- Wisniewski HM, Barcikowska M, Kida E (1991) Phagocytosis of beta/A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. *Acta Neuropathol* 81(5): 588-90.
- Wisniewski T, Castano EM, Golabek AA, Vogel T, Frangione B (1994). Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 145: 1030-1035.
- Wisniewski T, Golabek A, Matsubara E, Ghiso J, Frangione B (1993) Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 192(2): 359-365.
- Wisniewski T, Sadowski M (2008) Preventing beta-amyloid fibrillization and deposition: beta-sheet breakers and pathological chaperone inhibitors. *BMC Neurosci* 9 Suppl 2:S5.
- Xing B, Chen H, Zhang M, Zhao D, Jiang R, Liu X, Zhang S (2008) Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke* 39(8): 2362-2369.
- Yamaguchi H (1995) Illustration of dynamic changes in Alzheimer pathology: from mild cognitive impairment to terminal stage. *Neuropathology* 25(4): 285-287.
- Yamin G (2009) NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid β -protein disruption of LTP in the hippocampus. *J Neurosci Res* 87: 1729-1736.

Yang DS, Small DH, Seydel U, Smith JD, Hallmayer J, Gandy SE, Martins RN (1999) Apolipoprotein E promotes the binding and uptake of beta-amyloid into Chinese hamster ovary cells in an isoform-specific manner. *Neuroscience* 90(4): 1217-1226.

Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989) Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245(4916): 417-420.

Yazawa H, Yu ZX, Takeda, Le Y, Gong W, Ferrans VJ, Oppenheim JJ, Li CC, Wang JM (2001) Beta amyloid peptide (Abeta42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *FASEB J* 15:2454-2462.

Ye S, Huang Y, Müllendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, Cohen FE, Kuntz ID, Weisgraber KH, Mahley RW (2005) Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(51): 18700-18705.

Yin XH, Zhang QG, Miao B, Zhang GY (2005) Neuroprotective effects of preconditioning ischaemia on ischaemic brain injury through inhibition of mixed-lineage kinase 3 via NMDA receptor-mediated Akt1 activation. *J Neurochem* 93(4): 1021-1029.

Yuan Y, Guo Q, Ye Z, Pingping X, Wang N, Song Z (2011) Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway. *Brain Res* 1367: 85-93.

Zerbinatti CV, Wahrle SE, Kim H, Cam JA, Bales K, Paul SM, Holtzman DM, Bu G (2006) Apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor-related protein facilitate intraneuronal Abeta42 accumulation in amyloid model mice. *J Biol Chem* 281(47): 36180-36186.

Zhang W, Miao Y, Zhou S, Jiang J, Luo Q, Qiu Y (2011) Neuroprotective effects of ischemic postconditioning on global brain ischemia in rats through upregulation of hippocampal glutamine synthetase. *J Clin Neurosci* 18(5): 685-689.

Zündorf G, Reiser G (2010) Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 14(7): 1275-1288.