

mgr farm. Iga Wieczorek

**Analiza działania modulatorów receptorów dla
sfingozyno-1-fosforanu w eksperymentalnych
modelach choroby Alzheimerera**

Rozprawa na stopień naukowy doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Robert Piotr Strosznajder



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2023

Pragnę serdecznie podziękować:

- promotorowi niniejszej pracy Prof. dr. hab. n. med. Robertowi Strosznajderowi,
- koleżankom i kolegom z Pracowni Badań Przedklinicznych Związków Neuroprotekcyjnych i Czynników Środowiskowych oraz z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału.

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały częściowo opublikowane w pracy:

- Jęsko H*, **Wieczorek I***, Wencel PL, Gąssowska-Dobrowolska M, Lukiw WJ, Strosznajder RP. Age-Related Transcriptional Deregulation of Genes Coding Synaptic Proteins in Alzheimer's Disease Murine Model: Potential Neuroprotective Effect of Fingolimod. *Front Mol Neurosci.* 2021; 14: 660104. doi: 10.3389/fnmol.2021.660104.

*autorzy równorzędni

Badania, których wyniki przedstawiono w tej pracy, były finansowane w ramach projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki:

- OPUS 8 nr NCN/2014/15/B/NZ3/01049
- Preludium 20 nr NCN/2021/41/N/NZ5/02036

Spis treści

Wykaz skrótów	4
1. Wstęp.....	9
1.1 Choroba Alzheimerera	9
1.1.1 Epidemiologia i klasyfikacja choroby Alzheimerera.....	9
1.1.2 Patomechanizm choroby Alzheimerera	10
1.1.2.1 Amyloid β (A β)	10
1.1.2.2 A β i białko Tau.....	12
1.1.2.3 A β i zaburzenia przekąźnictwa synaptycznego	15
1.1.2.4 A β i zaburzenia mitochondrialne.....	20
1.1.2.5 A β i neurozapalenie	22
1.2 Bioaktywne sfingolipidy	25
1.2.1 Metabolizm sfingozyno-1-fosforanu (S1P)	26
1.2.2 Wewnątrzkomórkowe działanie S1P	27
1.2.3 Zewnątrzkomórkowe działanie S1P. Receptory dla S1P.....	29
1.2.4 Rola S1P w układzie nerwowym	33
1.2.5 Rola S1P w chorobach neurodegeneracyjnych.....	35
1.3 Związki działające na receptory dla S1P.....	37
1.3.1 Fingolimod	37
1.3.2 Siponimod	41
1.3.3 Ozanimod.....	42
1.3.4 Ponesimod.....	42
1.3.5 Pozostałe związki.....	43
2. Cele pracy	45
2.1 Cel ogólny	45
2.2 Cele szczegółowe	45
3. Materiały i metody.....	46
3.1 Model <i>in vivo</i>	46
3.2 Modele <i>in vitro</i>	46
3.2.1 Komórki linii HT22	46
3.2.2 Komórki linii BV2	47
3.2.3 Komórkowy model toksyczności oligomerów A β	47
3.2.3.1 Przygotowanie A β o	48

Spis treści

3.2.4	Charakterystyka związków stosowanych w modelach <i>in vitro</i>	48
3.3	Metody spektrofotometryczne.....	49
3.3.1	Badanie żywotności komórek za pomocą testu MTT	49
3.3.2	Oznaczanie poziomu białka metodą BCA	50
3.4	Metody fluorymetryczne	50
3.4.1	Oznaczanie poziomu wolnych rodników metodą DCF	50
3.4.2	Oznaczanie potencjału błony mitochondrialnej.....	51
3.5	Analiza ekspresji genów.....	51
3.5.1	Izolacja RNA i trawienie DNA.....	51
3.5.2	Odwrotna transkrypcja.....	52
3.5.3	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction, real-time PCR).....	53
3.6	Immunodetekcja białek metodą Western Blot (WB)	55
3.6.1	Przygotowanie materiału do analizy.....	55
3.6.2	Rozdział elektroforetyczny i transfer białek	56
3.6.3	Immunodetekcja białek.....	56
3.7	Statystyczne opracowanie wyników	61
4.	Wyniki	62
4.1	Badania <i>in vivo</i>	62
4.1.1	Wpływ modulatora receptorów dla S1P, FTY720, na zmiany w ekspresji genów i immunoreaktywności wybranych białek presynaptycznych w korze mózgu i hipokampie myszy transgenicznym z mutacją londyńską w genie dla APP	62
4.1.1.1	Białka kompleksu SNARE w korze mózgu 3- i 12-miesięcznych myszy.....	62
4.1.1.2	Białka kompleksu SNARE w hipokampie 3- i 12-miesięcznych myszy.....	64
4.1.1.3	Białka regulatorowe kompleksu SNARE w korze mózgu 3- i 12-miesięcznych myszy	67
4.1.1.4	Białka regulatorowe kompleksu SNARE w hipokampie 3- i 12-miesięcznych myszy	70
4.1.2	Wpływ modulatora receptorów dla S1P, FTY720, na zmiany w ekspresji genów i poziomie ufosforylowania kinazy AKT i jej białek efektorowych w korze mózgu i hipokampie myszy transgenicznym z mutacją londyńską w genie dla APP	74
4.1.2.1	Kinaza AKT i jej białka efektorowe w korze mózgu 3- i 12-miesięcznych myszy	74

Spis treści

4.1.2.2	Kinaza AKT i jej białka efektorowe w hipokampie 3- i 12-miesięcznych myszy.....	80
4.1.3	Wpływ modulatora receptorów dla S1P, FTY720, na zmiany w ekspresji genu i poziomie ufosforylowania białka Tau w korze mózgu i hipokampie myszy transgenicznych z mutacją londyńską w genie dla APP.....	86
4.1.3.1	Białko Tau w korze mózgowej 3- i 12-miesięcznych myszy.....	86
4.1.3.2	Białko Tau w hipokampie 3- i 12-miesięcznych myszy.....	89
4.2	Badania <i>in vitro</i>	93
4.2.1	Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane działaniem A β zmiany w ekspresji genów kodujących receptory dla S1P w komórkach HT22 i BV2.....	93
4.2.2	Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane działaniem A β zmiany poziomu wolnych rodników, potencjału błony mitochondrialnej oraz żywotności komórek HT22 i BV2.....	95
4.2.3	Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane działaniem A β zmiany w ekspresji genów kodujących białka pro- i antyapoptotyczne w komórkach HT22 i BV2	97
4.2.4	Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane działaniem A β zmiany w ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne w komórkach HT22 i BV2.....	99
5.	Dyskusja	102
6.	Podsumowanie i wnioski	124
7.	Streszczenie	125
8.	Streszczenie w języku angielskim	130
9.	Innowacyjność rozprawy	135
10.	Literatura.....	136

Wykaz skrótów

3xTg – myszy model rodzinnej postaci choroby Alzheimera, w którym zwierzęta wykazują mutacje w genie dla APP, PSEN1 i Tau

5xFAD – myszy model rodzinnej postaci choroby Alzheimera, w którym zwierzęta wykazują 3 mutacje w genie dla APP oraz 2 mutacje w genie dla preseniliny 1/PSEN1

6-OHDA – 6-hydroksydopamina

α -APP – N-końcowy fragment APP powstały na skutek działania α -sekreazy

ABC – białka transportowe posiadające kasetę wiążącą ATP (ang. ATP-binding cassette transporters)

ACTB – β -aktyna (ang. β -actin)

AICD – wewnątrzkomórkowa domena APP (ang. APP intracellular domain)

AIF – czynnik indukujący apoptozę (ang. apoptosis-inducing factor)

AKT/PKB – AKT/kinaza białkowa B (ang. protein kinase B)

ALAT – aminotransferaza alaninowa

ALS – stwardnienie boczne zanikowe (ang. amyotrophic lateral sclerosis)

ANOVA – analiza wariancji (ang. analysis of variance)

ApoE – apolipoproteina E

ApoM – apolipoproteina M

APP – białko prekursorowe peptydu amyloidu β (ang. amyloid- β precursor protein)

APP^{swE} – mutacja szwedzka w genie kodującym APP

ATP – adenozynotrifosforan (ang. adenosine triphosphate)

A β – peptyd amyloidu β

A β _o – oligomery peptydu amyloidu β

β -APP – N-końcowy fragment APP powstały na skutek działania β -sekreazy

BACE1 – β -sekreaza (ang. β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)

BCA – kwas bicinchoninowy (ang. bicinchoninic acid)

BDNF – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor)

BSA – albumina surowicy bydlęcej (ang. bovine serum albumine)

C1P – ceramido-1-fosforan (ang. ceramide-1-phosphate)

C83 – 83-aminokwasowy C-końcowy fragment APP powstały w wyniku działania α -sekreazy

C99 – 99-aminokwasowy C-końcowy fragment APP powstały w wyniku działania β -sekreazy

CaMKII – kinaza II zależna od wapnia i kalmoduliny (ang. calcium-calmodulin-dependent protein kinase II)

CDK5 – kinaza cyklozależna 5 (ang. cyclin-dependent kinase 5)

cdNA – DNA komplementarny do mRNA (ang. complementary DNA)

CEM – mikrodomena bogata w kaweolinę (ang. caveolin-enriched microdomain)

ChA – choroba Alzheimera

ChAT – acetylotransferaza cholinowa (ang. choline acetyltransferase)

ChH – choroba Huntingtona

Wykaz skrótów

- ChP** – choroba Parkinsona
- cPLA2** – cytozolowa fosfolipaza A2 (ang. cytosolic phospholipase A2)
- CPLX1** – kompleksyna 1 (ang. complexin 1)
- CPLX2** – kompleksyna 2 (ang. complexin 2)
- CRMP2** – białko pośredniczące w odpowiedzi na kolapsynę (ang. collapsin response-mediated protein 2)
- CTF β** – C-końcowy fragment białka prekursorowego peptydu amyloidu β (ang. C-terminal fragments of the amyloid precursor protein)
- DCF** – 2',7'-dichlorofluoresceina (ang. 2',7'-dichlorofluorescein)
- DEPC** – dietylopirowęglan (ang. diethyl pyrocarbonate)
- DMEM** – pożywka Eagle'a zmodyfikowana przez Dulbecco (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- DMSO** – dimetylosulfotlenek (ang. dimethyl sulfoxide)
- DRP1** – białko dynamino-podobne (ang. dynamin related protein 1)
- DTT** – ditiotreitol
- EBI** – wczesna faza urazu mózgu (ang. early brain injury)
- EDG** – błonowy receptor sprzężony z białkami G zaangażowany w różnicowanie komórek śródbłonna (ang. endothelial differentiation G-protein coupled receptor)
- EMA** – Europejska Agencja Leków (ang. European Medicines Agency)
- EOAD** – choroba Alzheimera o wczesnym początku (ang. early onset Alzheimer's Disease)
- ERK** – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. extracellular signal-regulated kinase)
- FAD** – rodzinna postać choroby Alzheimera (ang. familial Alzheimer's Disease)
- FBS** – płodowa surowica bydłęca (ang. fetal bovine serum)
- FDA** – Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)
- FIS1** – białko rozszczepienia mitochondriów 1 (ang. mitochondrial fission 1 protein)
- FTY720** – fingolimod
- GAPDH** – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
- GPCR** – błonowe receptory sprzężone z białkami G (ang. G-protein-coupled receptors)
- Gpx** – peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase)
- GSK-3** – kinaza 3 syntazy glikogenu (ang. glycogen synthase kinase-3)
- GSK-3 α** – kinaza 3 α syntazy glikogenu (ang. glycogen synthase kinase-3 α)
- GSK-3 β** – kinaza 3 β syntazy glikogenu (ang. glycogen synthase kinase-3 β)
- GUSB** – β -glukuronidaza (ang. β -glucuronidase)
- H2DCF** – 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina (ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein)
- H2DCF-DA** – dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)
- HB-EGF** – czynnik wzrostu wiążący heparynę podobny do EGF (ang. heparin-binding EGF-like growth factor)
- HDAC** – deacetylaza histonów (ang. histone deacetylase)
- HDL** – lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. high-density lipoprotein)
- HRP** – peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase)

Wykaz skrótów

- I2PP2A** – endogeny inhibitor fosfatazy białkowej 2A (ang. inhibitor 2 of protein phosphatase 2A)
- ICH** – krwotok śródmózgowy (ang. intracerebral hemorrhage)
- IGF-1R** – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. insulin-like growth factor 1 receptor)
- IR** – receptor dla insuliny (ang. insulin receptor)
- JC-1** – jodek 1,1',3,3'-tetraetylo-5,5',6,6'-tetrachloroimidokarbocyaniny
- JNK** – kinaza N-końcowa c-Jun (ang. c-Jun N-terminal kinase)
- LIF** – czynnik hamujący białaczkę (ang. leukemia inhibitory factor)
- LOAD** – choroba Alzheimera o późnym początku (ang. late onset Alzheimer's Disease)
- LPS** – lipopolisacharyd
- LTD** – długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. long-term depression)
- LTP** – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. long-term potentiation)
- m.c.** – masa ciała
- MAPK** – kinaza aktywowana mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase)
- MAPT** – białko Tau związane z mikrotubulami (ang. microtubule-associated protein Tau)
- MCI** – łagodne zaburzenia poznawcze (ang. mild cognitive impairment)
- MCP-1** – białko chemotaktyczne monocytów (ang. monocyte chemoattractant protein-1)
- Mfn1** – mitofuzyna 1 (ang. mitofusin 1)
- Mfn2** – mitofuzyna 2 (ang. mitofusin 2)
- mHtt** – zmutowana huntingtyna
- MIP** – białko zapalne makrofagów (ang. macrophage inflammatory protein)
- MMP** – potencjał błony mitochondrialnej (ang. mitochondrial membrane potential)
- MPP⁺** – 1-metylo-4-fenylopirydyna
- MPTP** – 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna
- mtDNA** – mitochondrialne DNA
- MTT** – bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy
- NFT** – spletki neurofibrylarne (ang. neurofibrillary tangles)
- NF-κB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- NGF** – czynnik wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor)
- NK** – komórki natural killers
- NL** – neuroliginy
- NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-methyl-D-aspartic acid)
- NMDAR** – receptor N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-methyl-D-aspartic acid receptor)
- NPC** – neuronalne komórki progenitorowe (ang. neural progenitor cells)
- NRF-1** – jądrowy czynnik oddechowy 1 (ang. nuclear respiratory factor 1)
- Nrf2** – jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
- NRXN** – neureksyny (ang. neurexins)
- NRXN1** – neureksyna 1 (ang. neurexin 1)
- NT** – neurotransmitter/neuroprzebieg
- OCR** – szybkość zużycia tlenu (ang. oxygen consumption rate)
- OD** – gęstość optyczna (ang. optical density)

Wykaz skrótów

- OPA1** – białko 1 zaniku nerwu wzrokowego (ang. optic atrophy protein 1)
- OPC** – komórki prekursorowe oligodendrocytów (ang. oligodendrocyte precursor cells)
- OUN** – ośrodkowy układ nerwowy
- p21** – inhibitor kinaz zależnych od cyklin (ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 1)
- p75^{NTR}** – receptor dla neurotrofin p75 (ang. neurotrophin receptor p75)
- PBS** – buforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. phosphate buffered saline)
- PDGFB** – podjednostka B płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. platelet-derived growth factor subunit B)
- PERK** – kinaza białkowa siateczki śródplazmatycznej (ang. protein kinase regulated by RNA-like ER kinase)
- pFTY720** – ufosforylowany fingolimod
- PGC-1 α** – koaktywator 1 α receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang. peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α)
- PGC-1 β** – koaktywator 1 β receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang. peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 β)
- PHB2** – prohibityna 2 (ang. prohibitin 2)
- PI3K** – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol 3-kinase)
- PKA** – kinaza białkowa A (ang. protein kinase A)
- PLK1** – kinaza typu polo 1 (ang. polo-like kinase 1)
- PMR** – płyn mózgowo-rdzeniowy
- PP2A** – fosfataza białkowa 2A (ang. protein phosphatase 2A)
- PPAR- γ** – receptor γ aktywowany przez proliferatory peroksysomów (ang. peroxisome proliferator-activated receptor γ)
- PrP^c** – prionowe białko komórkowe (ang. cellular prion protein)
- PSEN1** – presenilina 1
- PSEN2** – presenilina 2
- real-time PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction)
- RFT** – reaktywne formy tlenu
- RIP1** – białko 1 oddziałujące z receptorem (receptor interacting protein 1)
- ROCK** – kinaza związana z białkiem Rho (ang. Rho-associated protein kinase)
- RP** – pula rezerwowa pęcherzyków synaptycznych (ang. reserve pool of synaptic vesicles)
- RPMI** – pożywka Roswell Park Memorial Institute
- RRMS** – ustępująco-nawracająca postać stwardnienia rozsianego (ang. relapsing remitting multiple sclerosis,
- RRP** – pula łatwo uwalnianych pęcherzyków synaptycznych (ang. readily releasable pool of synaptic vesicles)
- RT** – temperatura pokojowa (ang. room temperature)
- S1P** – sfingozyno-1-fosforan (ang. sphingosine-1-phosphate)
- S1PP1** – fosfataza sfingozyno-1-fosforanu 1 (ang. sphingosine-1-phosphate phosphatase 1)
- S1PP2** – fosfataza sfingozyno-1-fosforanu 2 (ang. sphingosine-1-phosphate phosphatase 2)
- SAD** – sporadyczna postać choroby Alzheimera (ang. sporadic Alzheimer's Disease)

Wykaz skrótów

- SDS** – dodecylosiarczan sodu (ang. sodium dodecyl sulphate)
- SDS-PAGE** - rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS (ang. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
- SEM** – odchylenie standardowe średniej (ang. standard error of mean)
- SM** – stwardnienie rozsiane (łac. sclerosis multiples)
- SNAP-25** – białko związane z synaptosomami, 25 kDa (ang. synaptosomal-associated protein of 25 kDa)
- SNARE** – rozpuszczalny receptor białka przyłączającego czynnik wrażliwy na N-etylomaleimid (ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)
- SOD1** – dysmutaza ponadtlenkowa 1 (ang. superoxide dismutase 1)
- SOD2** – dysmutaza ponadtlenkowa 2 (ang. superoxide dismutase 2)
- Sph** – sfingozyna (ang. sphingosine)
- SphK1** – kinaza sfingozyny 1 (ang. sphingosine kinase 1)
- SphK2** – kinaza sfingozyny 2 (ang. sphingosine kinase 2)
- SPL** – liaza sfingozyno-1-fosforanu (ang. sphingosine-1-phosphate lyase)
- SPMS** – wtórnie postępująca postać stwardnienia rozsianego (ang. secondary progressive multiple sclerosis)
- Spns2** – białko transporterowe sfingozyno-1-fosforanu spinster 2
- SPT** – palmitoilotransferaza serynowa (ang. serine palmitoyltransferase)
- STX1A** – syntaksyna 1a (ang. syntaxin 1a)
- STZ** – streptozotocyna
- SV** – pęcherzyki synaptyczne (ang. synaptic vesicles)
- SYN1** – synapsyna 1
- SYP** – synaptofizyna (ang. synaptophysin)
- SYT1** – synaptotagmina 1
- TBS-T** – roztwór soli fizjologicznej buforowanej tris z dodatkiem Tween 20 (ang. tris-buffered saline with Tween 20)
- TCF-1** – czynnik transkrypcyjny dla limfocytów T (ang. T cell factor 1)
- TFAM** – mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (ang. mitochondrial transcription factor A)
- TNF- α** – czynnik martwicy nowotworów α (ang. tumor necrosis factor α)
- TOM** – translokaza błony zewnętrznej (ang. translocase of the outer membrane)
- TRAF2** – czynnik 2 związany z receptorem dla TNF (ang. TNF receptor-associated factor 2)
- URP** – odpowiedź na białka niesfałdowane (ang. unfolded protein response)
- VAMP1** – synaptobrewina 1 (ang. vesicle associated membrane protein 1)
- VAMP2** – synaptobrewina 2 (ang. vesicle associated membrane protein 2)
- VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)
- WB** – Western Blot

1. Wstęp

1.1 Choroba Alzheimerera

1.1.1 Epidemiologia i klasyfikacja choroby Alzheimerera

Choroba Alzheimerera (łac. morbus Alzheimer, ChA) jest neurodegeneracyjnym schorzeniem, charakteryzującym się postępującą utratą pamięci, osłabieniem funkcji poznawczych takich jak: orientacja przestrzenna, przyswajanie nowych informacji, zdolność wydawania osądów, rozwiązywanie problemów, rozumienie czy funkcje językowe (pisanie, czytanie, mówienie) [McKhan i wsp., 2011]. Obserwuje się także upośledzenie funkcji społecznych i wyrażania emocji [Levenson i wsp., 2014]. Choroba ta stanowi główną przyczynę otępienia (odpowiada za około 60%-80% przypadków) [Gauthier i wsp., 2022].

Szacuje się, że ChA dotyka około 30-40 milionów ludzi na całym świecie [Gauthier i wsp., 2022]. Metaanaliza epidemiologiczna dotycząca populacji europejskiej wykazała, że na ChA cierpi 5,05% ludności Europy, w tym 3,31% mężczyzn i 7,13% kobiet, a zapadalność (liczba nowo zarejestrowanych przypadków danej choroby) wynosi 11,8 na 1000 osób na rok i jest również wyższa u kobiet niż u mężczyzn (13,25 versus 7,02 przypadków na 1000 osób na rok) [Niu i wsp., 2017]. Prognozy wskazują, że w 2050 roku liczba chorych wyniesie 106,8 mln, w tym 16,51 mln w Europie [Brookmeyer i wsp., 2007]. Występowanie schorzenia silnie koreluje z wiekiem. W grupie osób powyżej 65. roku życia chorzy na ChA stanowią 1-5%, a odsetek ten wzrasta do 20-25% w populacji powyżej 80. roku życia [Brickel i wsp., 2006; Bekris i wsp., 2010].

Jednym z kryteriów klasyfikacji choroby stanowi wiek pacjenta w momencie wystąpienia pierwszych objawów. Wystąpienie objawów powyżej 65. roku życia jest charakterystyczne dla ChA o późnym początku (ang. late onset Alzheimer's Disease, LOAD), zazwyczaj związanej ze sporadyczną, niedziedziczną postacią (ang. sporadic Alzheimer's Disease, SAD), która to forma stanowi ponad 90% wszystkich przypadków. Natomiast wystąpienie objawów przed 65. rokiem życia cechuje postać o wczesnym początku (ang. early onset Alzheimer's Disease, EOAD), często związaną z dziedziczną, rodzinną formą schorzenia (ang. familial Alzheimer's Disease, FAD) [Guerreiro i wsp., 2012; Dorszewska i wsp., 2016].

Głównym czynnikiem ryzyka w przypadku SAD jest polimorfizm w genie *APOE*, kodującym apolipoproteinę E (ApoE) – białko transportujące lipidy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach oraz cholesterol do układu chłonnego, a następnie do krwi. *APOE* występuje w trzech wariantach: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$. Udowodniono, że u heterozygot posiadających allel $\epsilon 4$ trzykrotnie wzrasta ryzyko zachorowania na ChA, natomiast w przypadku homozygot prawdopodobieństwo pojawienia się schorzenia wzrasta 15-krotnie w porównaniu do homozygot $\epsilon 3$ [Ashford, 2004]. Występowanie allelu $\epsilon 4$ wpływa na zmniejszoną zdolność ApoE do usuwania rozpuszczalnego peptydu amyloidu β ($A\beta$) przy jednoczesnym wzroście odkładania się nierozpuszczalnej formy $A\beta$. W przeciwieństwie do $\epsilon 4$, nosicielstwo allelu $\epsilon 2$ może zapewniać ochronę przed rozwojem ChA [Castellano i wsp., 2011].

Występowanie FAD jest związane z dziedzicznymi (autosomalnie dominująco) mutacjami w genach: *APP*, które koduje białko prekursorowe peptydu amyloidu β (ang. amyloid- β precursor protein, APP), oraz *PSEN1* i *PSEN2*, kodujących, odpowiednio, białka presenilinę 1 i 2 (odpowiednio PSEN1 i PSEN2), tworzące katalityczną podjednostkę γ -sekretazy [Guerreiro i wsp., 2012] – enzymu biorącego udział w metabolizmie APP. Mutacje w powyższych genach są prawdopodobnie związane ze zwiększoną syntezą APP i wzrostem uwalniania $A\beta$, choć przypuszcza się, że mogą również wpływać na proces usuwania i odkładania $A\beta$ [Dorszewska i wsp., 2016].

1.1.2 Patomechanizm choroby Alzheimerera

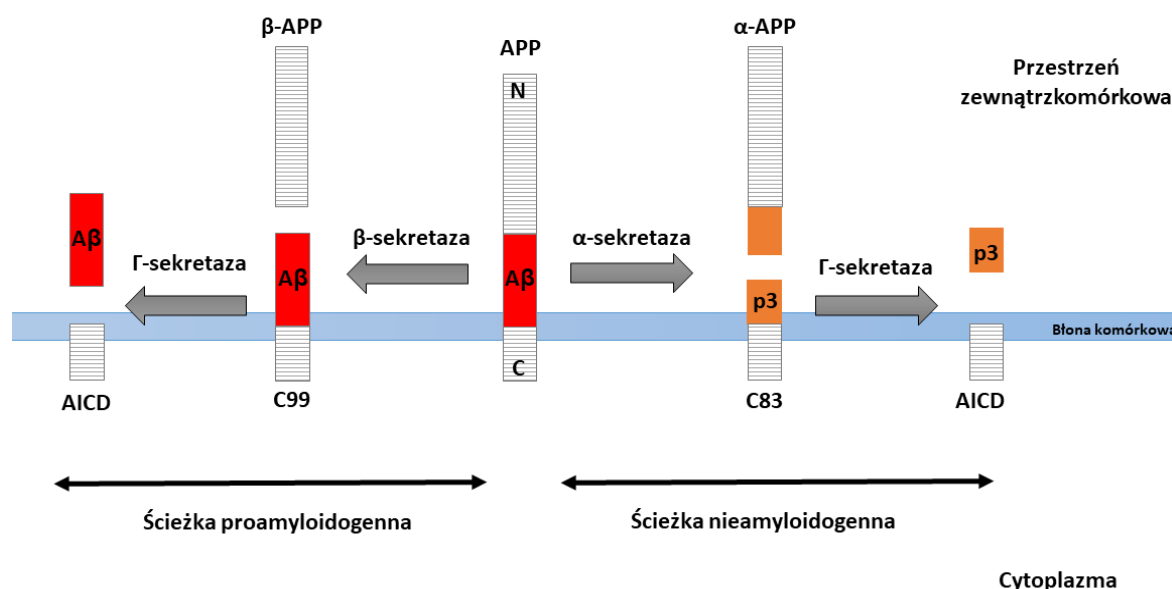
Zmiany neuropatologiczne leżące u podłoża ChA mogą pojawić się nawet 10-20 lat przed wystąpieniem wspomnianych wyżej objawów klinicznych choroby. Charakterystyczne w obrazie mózgu chorych na ChA są zewnątrzkomórkowe płytki starcze zbudowane ze złogów $A\beta$ oraz wewnątrzkomórkowe splątki neurofibrylarne (ang. neurofibrillary tangles, NFT) złożone z nadmiernie ufosforylowanego białka Tau. Te neuropatologiczne zmiany zaczynają się w korze śródwęchowej i w hipokampie, stopniowo rozszerzają się na korę skroniową, ciemieniową i finalnie obejmują czołową korę asocjacyjną (złożoną z kory przedczołowej i obszarów motorycznych z wyjątkiem pierwotnej kory ruchowej) [Jahn, 2013].

1.1.2.1 Amyloid β ($A\beta$)

Według powszechnie przyjętej hipotezy kaskady amyloidowej uważa się, że czynnikiem inicjującym powstawanie choroby są zaburzenia metabolizmu białka APP,

które ostatecznie prowadzą do wytwarzania A β [Selkoe, 1991; Bilousova i wsp., 2016; Selkoe i Hardy, 2016]. APP jest transbłonowym białkiem, które w warunkach fizjologicznych uczestniczy w powstawaniu i regulacji funkcji synaps [Müller i wsp., 2017]. APP może zostać poddane degradacji przez jedną z dwóch sekretaz: α -sekretazę lub β -sekretazę (ang. β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1). W wyniku aktywności α -sekretazy, która przecina APP wewnątrz sekwencji A β , produktem końcowym jest krótki, niepatogenny peptyd p3. Natomiast gdy w komórkach przeważa aktywność proamyloidogennej BACE1, od APP odcinany jest N-końcowy fragment β -APP, a pozostawiony w błonie 99-aminokwasowy C-końcowy fragment (ang. C-terminal fragment of the amyloid precursor protein, CTF β) poddawany jest kolejnym przekształceniom przez γ -sekretazę, w wyniku których powstaje 39-42-aminokwasowy A β [Takahashi i wsp., 2017] (**ryc. 1.**). Spośród istniejących izoform A β najważniejsze to A β_{1-40} i A β_{1-42} . Udowodniono, że A β_{1-42} jest bardziej toksyczny wobec komórek i szybciej tworzy fibryle niż A β_{1-40} , który z kolei jest w stanie hamować agregację A β_{1-42} [Qiu i wsp., 2015]. Badania przeprowadzone na materiale (płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR), kora mózgu) pochodzącym od pacjentów z ChA wykazały podwyższony poziom A β_{1-42} , ale obniżony A β_{1-40} , co sugeruje, że stosunek A β_{1-42} /A β_{1-40} , a nie całkowita ilość A β , może być lepszym wskaźnikiem występowania choroby [Wiltfang i wsp., 2007; Murray i wsp., 2012].

A β może występować w postaci rozpuszczalnych monomerów, oligomerów oraz nierozpuszczalnych fibryli i płytek starczych [Chen i wsp., 2017]. Pierwotnie za głównego sprawcę szkodliwych zmian w ChA uważano zewnątrzkomórkowe płytki starcze składające się ze zagregowanych fibryli A β [Selkoe i Hardy, 2016]. Jednak fakt, że zaburzenia funkcji poznawczych charakterystyczne dla ChA występowały, gdy poziom blaszek starczych był niski, natomiast poziom oligomerów A β był wysoki, skierował uwagę na tę postać peptydu. Od tego czasu liczne badania wykazały, że oligomery mogą być tak samo lub nawet bardziej toksyczne niż fibrylarne formy peptydu [Nimmrich i wsp., 2008; He i wsp., 2012; Ruiz i wsp., 2014] i są obecnie powszechnie uważane za najbardziej patogenną formę A β [Cline i wsp., 2018]. Oligomery A β (A β _o) wykazują wysoką heterogenność pod względem rozmiarów, struktury i cytotoksyczności. Występują w postaci di-, tri-, tetra-, penta-, deka- i dodekamerów [Sengupta i wsp., 2016], a ich toksyczność zdaje się być odwrotnie proporcjonalna do wielkości cząsteczki [Cizas i wsp., 2010; Sengupta i wsp., 2016, Yang i wsp., 2017], chociaż badania Ono i wsp., sugerują wyższą toksyczność tri- i tetramerów niż dimerów [Ono i wsp., 2009].



Rycina 1. Ścieżka proamyloidogenna i nieamyloidogenna metabolizmu białka prekursorowego peptydu amyloidu β (APP). Zmodyfikowano wg Cole i Vassar (2007).
 Objaśnienia skrótów: $A\beta$ – amyloid β ; AICD – wewnątrzkomórkowa domena APP; α -APP – N-końcowy fragment APP powstały w wyniku działania α -sekretazy; β -APP – N-końcowy fragment APP powstały w wyniku działania β -sekretazy; C99 – 99-aminokwasowy C-końcowy fragment APP powstały w wyniku działania β -sekretazy; C83 – 83-aminokwasowy C-końcowy fragment APP powstały w wyniku działania α -sekretazy.

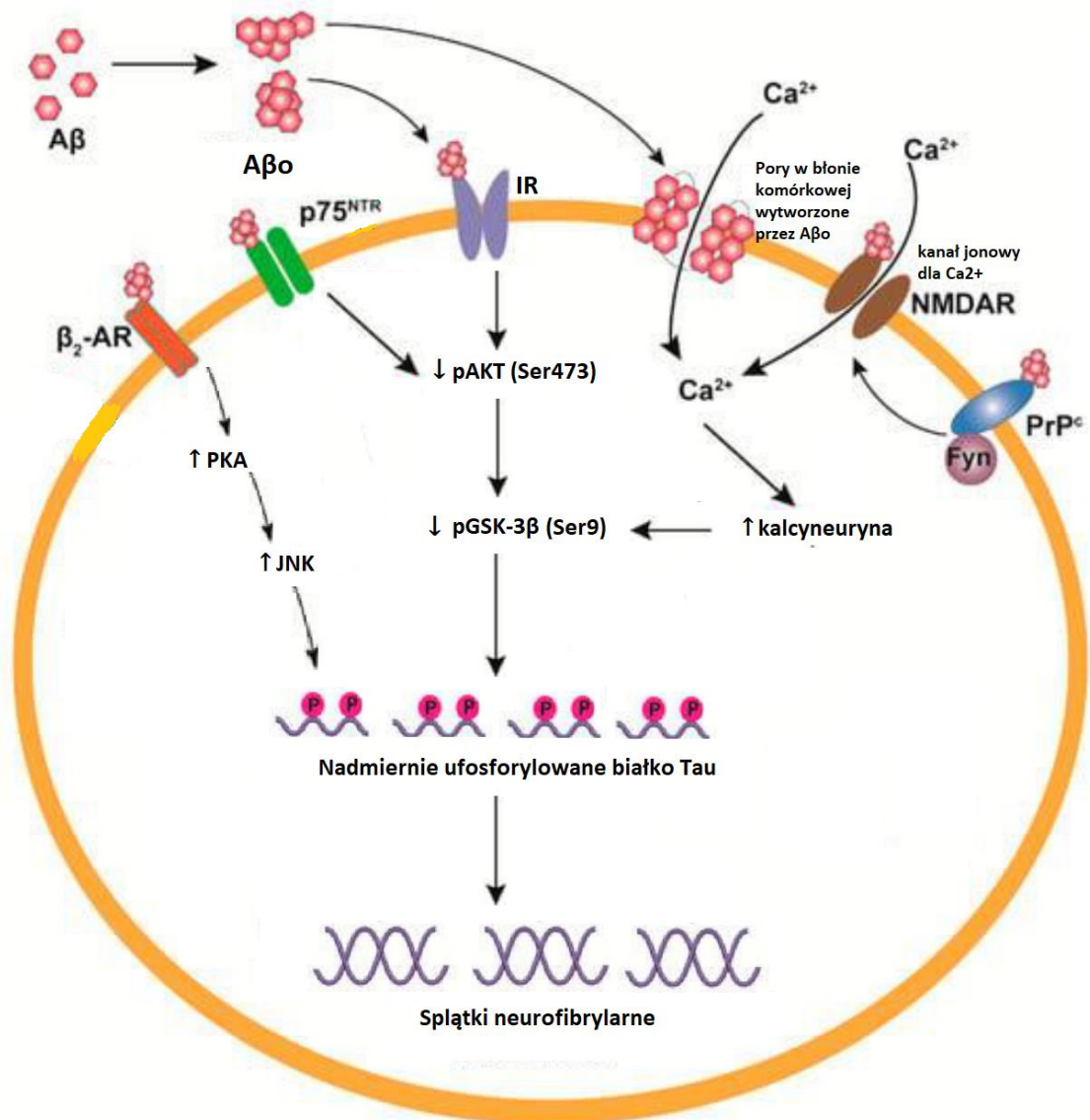
1.1.2.2 $A\beta$ i białko Tau

Białko Tau, białko Tau związane z mikrotubulami (ang. microtubule-associated protein Tau, MAPT) poprzez promowanie polimeryzacji tubuliny stabilizuje mikrotubule i w ten sposób zapewnia prawidłową organizację cytoszkieletu neuronów [Giacobini i Gold, 2013]. Aby białko Tau mogło spełniać swoją funkcję, musi ulec fosforylacji przeprowadzanej przez liczne kinazy, m.in.: kinazę 3 syntazy glikogenu (ang. glycogen synthase kinase-3, GSK-3), kinazę cyklinozależną 5 (ang. cyclin-dependent kinase 5, CDK5), kinazę aktywowaną mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase, MAPK) czy kinazę II zależną od wapnia i kalmoduliny (ang. calcium-calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) [Martin i wsp., 2013; Chong i wsp., 2018]. Dotychczas zidentyfikowano 85 miejsc fosforylacji białka Tau, z których 28 jest charakterystycznych tylko dla ChA, a w przypadku 16 miejsc fosforylacja zachodzi zarówno w ChA, jak i w warunkach fizjologicznych. Największy udział w przyłączaniu reszt fosforanowych do cząsteczki białka Tau ma serynowo-treoninowa kinaza GSK-3 – fosforyluje białko Tau

w 42 miejscach, z czego aż 29 ulega fosforylacji w ChA [Martin i wsp., 2013]. GSK-3 występuje w postaci 2 izoform: GSK-3 α i GSK-3 β , z których izoforma β wydaje się odgrywać dominującą rolę w patologii ChA [Muyliaert i wsp., 2008; Toral-Rios i wsp., 2020]. GSK-3 β jest białkiem efektorowym prożyciowej ścieżki kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) i kinazy serynowo-treoninowej AKT/kinazy białkowej B (ang. protein kinase, PKB). Katalizowana przez AKT fosforylacja GSK-3 β na serynie 9 powoduje zahamowanie jej aktywności. Podobny efekt ma fosforylacja enzymu na serynie 389, którą przeprowadza kinaza p38 MAPK. Z kolei autofosforylacja na tyrozynie 216 aktywuje enzym [Stambolic i Woodgett, 1994; Bhat i wsp., 2000; Cole i wsp., 2004; Thornton i wsp., 2008]. W warunkach fizjologicznych przyłączanie reszt fosforanowych do białka Tau jest równoważone defosforylacją katalizowaną przez fosfatazy, głównie fosfatazę białkową 2A (ang. protein phosphatase 2A, PP2A). Zaburzenie tej równowagi stanowi przyczynę powstawania nadmiernie ufosforylowanego białka, które wykazuje mniejsze powinowactwo do mikrotubul przy jednoczesnej zwiększonej tendencji do tworzenia NFT [Wang i wsp., 2007].

Badania post mortem mózgów pacjentów z ChA wykazały pozytywną korelację między zwiększoną aktywnością GSK-3 β i hiperfosforylacją białka Tau [Leroy i wsp., 2007]. Potwierdzają to doświadczenia na modelach *in vitro* (neurony powstałe z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych pacjentów z FAD i SAD) oraz *in vivo* (myszy z nadekspresją GSK-3 β w mózgu; szczurzy model SAD indukowany dokomorowym podaniem streptozotocyny, STZ) [Lucas i wsp., 2001; Gao i wsp., 2014; Ochalek i wsp., 2017]. Jednocześnie zarówno w modelach zwierzęcych ChA, jak i u pacjentów z ChA zaobserwowano obniżoną aktywność PP2A w mózgu, a u pacjentów również zmniejszoną ekspresję genu kodującego PP2A oraz poziom białka [Gong i wsp., 1995; Vogelsberg-Ragaglia i wsp., 2001; Sontag i wsp., 2004; Corcoran i wsp., 2010; van Eersel i wsp., 2010; Vitek i wsp., 2012]. Badania Yao i wsp. sugerują, że obniżona aktywność PP2A może być związana z jej fosforylacją oraz demetylacją stymulowaną przez GSK-3 β [Yao i wsp., 2011; 2012], z kolei Liu i wsp. wskazują na możliwość zwiększania przez GSK-3 β ekspresji endogennego inhibitora tej fosfatazy (ang. inhibitor 2 of protein phosphatase 2A, I2PP2A) [Liu i wsp., 2008]. Liczne badania wykazały, że A β przyczynia się do nadmiernego ufosforylowania białka Tau [Takashima i wsp., 1998; Zheng i wsp., 2002; Oliveira i wsp., 2015], co jest, m.in. spowodowane stymulowaniem przez A β aktywności GSK-3 β [Ma i wsp., 2006; Terwel i wsp., 2008; Jin i wsp., 2011;

Lloret i wsp., 2011; DaRocha-Souto i wsp., 2012]. Przyłączenie się A β o do receptora dla insuliny (ang. insulin receptor, IR) powoduje defosforylację i zmniejszenie aktywności kinazy AKT, co pociąga za sobą wzrost aktywności GSK-3 β i hiperfosforylację białka Tau [Townsend i wsp., 2007]. Podobny efekt wywołuje przyłączenie się A β o do receptora dla neurotrofin p75 (ang. neurotrophin receptor p75, p75NTR) [Shen i wsp., 2019]. A β o może zwiększać fosforylację białka Tau przez aktywację receptora adrenergicznego β 2 (ang. β 2 adrenergic receptor, β 2-AR) i jego białek efektorowych: kinazy białkowej A (ang. protein kinase A, PKA) i kinazy N-końcowej c-Jun (ang. c-Jun N-terminal kinase, JNK) [Wang i wsp., 2013]. Do zwiększonej fosforylacji białka Tau przyczynia się zaburzona homeostaza wapniowa w komórce. Oligomery mogą bezpośrednio aktywować jonotropowy receptor N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR), który przewodzi Ca²⁺ do wnętrza komórki [Liang i wsp., 2017]. Mogą także oddziaływać z prionowym białkiem komórkowym (ang. cellular prion protein, PrPc), które aktywuje kinazę tyrozynową Fyn fosforylującą NMDAR [Um i wsp., 2012]. A β o oddziałują także bezpośrednio na błonę komórkową, tworząc w niej pory, co zaburza strukturę błony i zwiększa jej przepuszczalność. W efekcie dochodzi do zwiększonego napływu jonów Ca²⁺ do komórki i aktywacji kalcyneuryny, Ca²⁺-zależnej fosfatazy. Aktywowana kalcyneuryna aktywuje GSK-3 β poprzez defosforylację na serynie 9, tym samym prowadząc do zwiększonej fosforylacji białka Tau [Kim i wsp., 2009; Huang i Liu, 2020] (**ryc. 2.**).



Rycina 2. Wpływ amyloidu β na fosforylację białka Tau. Zmodyfikowano wg Lloret i wsp. (2015) oraz Huang i Liu (2020).

Objaśnienia skrótów: $A\beta$ – amyloid β ; $A\beta_o$ – oligomery amyloidu β ; β_2 -AR – receptor adrenergiczny β_2 ; Ca^{2+} – kationy wapnia; Fyn – kinaza tyrozynowa; IR – receptor dla insuliny; JNK – kinaza N-końcowa c-Jun; NMDAR – receptor N-metylo-D-asparaginowy; $p75^{NTR}$ – receptor dla neurotrofin p75; pAKT (Ser473) – kinaza AKT ufosforylowana na serynie 473; pGSK-3 β (Ser9) – kinaza 3 β syntazy glikogenu ufosforylowana na serynie 9; PKA – kinaza białkowa A; PrP^c – prionowe białko komórkowe.

1.1.2.3 $A\beta$ i zaburzenia przekazywania synaptycznego

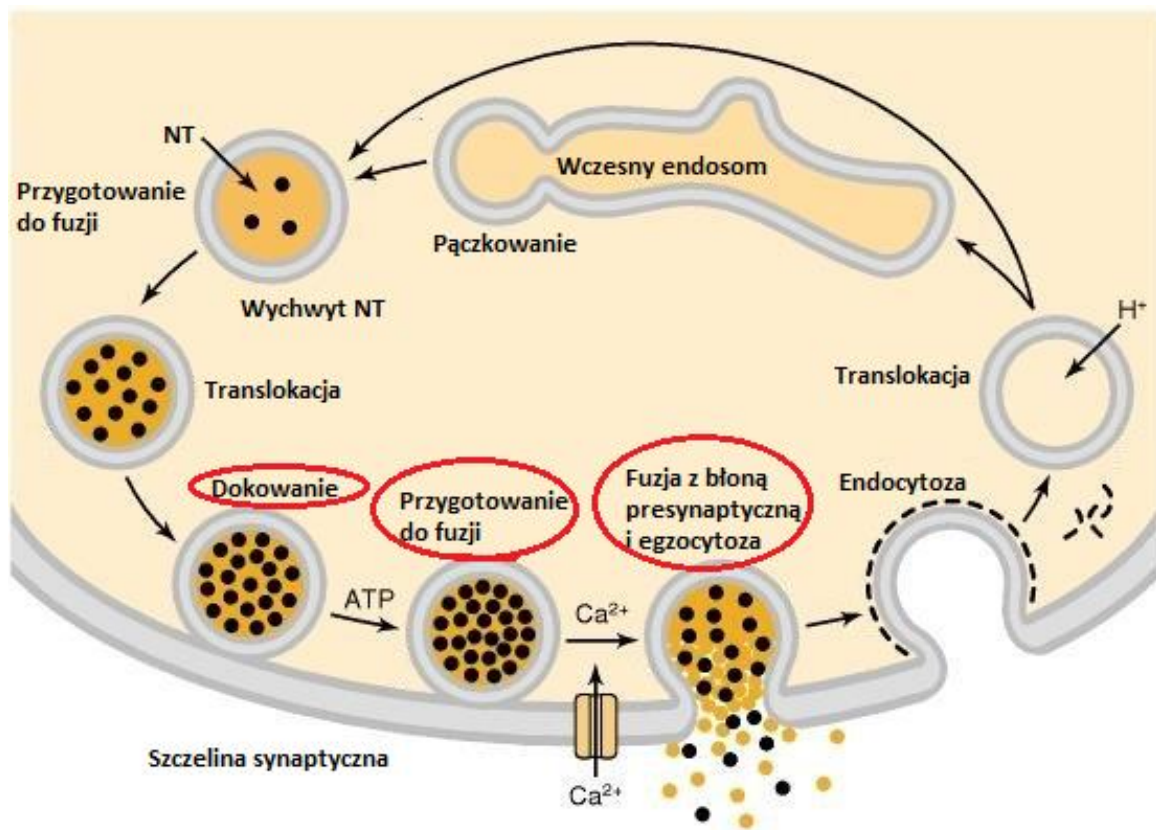
$A\beta$, szczególnie w postaci oligomerów [Ferreira i wsp., 2015], jest uznawany za przyczynę zaburzeń synaptycznych [Fu i wsp., 2014], które są jednym z wczesnych objawów neurodegeneracji w ChA [Davies i wsp., 1987] i obejmują m.in. zmienione

przebieżność synaptyczną [Guo i wsp., 2017]. Ważnym etapem tego złożonego procesu jest uwalnianie neuroprzebieżników (neurotransmiterów) poprzez egzocytozę pęcherzyków synaptycznych (ang. synaptic vesicles, SV), w czym uczestniczą wysoce wyspecjalizowane białka. Kluczową rolę odgrywa kompleks SNARE (ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), odpowiedzialny za przemieszczenie SV w pobliże błony presynaptycznej (dokowanie), ich przygotowanie do fuzji (ang. priming), fuzję z błoną i synchronizację uwalniania neuroprzebieżników (**ryc. 3.**). Tworzą go znajdujące się w błonie presynaptycznej syntaksyna 1a (STX1A) i białko związane z synaptosomami, 25 kDa (ang. synaptosomal-associated protein of 25 kDa, SNAP-25) oraz znajdujące się w błonie pęcherzykowej synaptobrewina 1 i synaptobrewina 2 (ang. vesicle associated membrane protein 1 and 2, VAMP1/VAMP2) [Südhof i Rizo, 2011; Ramakrishnan i wsp., 2012; Zimmermann i wsp., 2014].

Analiza pośmiertna mózgow osób z ChA z 3 grup wiekowych (70-81 lat, 82-88 lat oraz 89-103 lat) wykazała obniżony poziom białka i mRNA SNAP-25 w istocie szarej górnego zakrętu skroniowego we wszystkich badanych grupach wiekowych [Beeri i wsp., 2012]. Wskazuje to, że w przeciwieństwie do takich objawów neuropatologicznych, jak NFT czy płytki starcze, których udział w patomechanizmie ChA maleje wraz z wiekiem [Haroutunian i wsp., 2008], zaburzenia funkcji synaptycznych utrzymują się na stałym poziomie niezależnie od wieku [Beeri i wsp., 2012]. Badania innej grupy wykazały, że obniżona ekspresja *SNAP25* w korze śródwęchowej, korze słuchowej i hipokampie osób z SAD nie jest związana ze zmianami w metylacji promotora genu kodującego SNAP-25 [Furuya i wsp., 2012]. Z kolei zmniejszona immunoreaktywność SNAP-25 w korze przedczołowej, której towarzyszył spadek aktywności acetylotransferazy cholinowej (ang. choline acetyltransferase, ChAT), została zaobserwowana jedynie w zaawansowanym stadium ChA [Minger i wsp., 2001]. Obniżony poziom SNAP-25 zaobserwowano również w hodowli organotypowych skrawków hipokampa traktowanych A β ₂₅₋₃₅ (krótki fragment A β zachowujący właściwości cytotoksyczne peptydu pełnej długości) [Suh i wsp., 2008] oraz w hipokampie potrójnie transgenicznym myszy 3xTg (z mutacją szwedzką w genie dla APP (APP^{swe}) oraz mutacjami w genach dla PSEN1 i Tau) – zwierzęcym modelu FAD [Carvalho i wsp., 2015]. W przeciwieństwie do mózgu, w PMR stwierdzono podwyższony poziom SNAP-25 już u osób z postępującymi łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (ang. mild cognitive impairment, MCI) i we wczesnym stadium ChA [Brinkmalm i wsp., 2014; Zhang i wsp., 2018; Kivisäkk i wsp., 2022]. Ponadto poziom SNAP-25 w PMR w MCI był

wyższy u osób z genotypem ApoE ϵ 4, który jest jednym z czynników ryzyka rozwoju SAD [Wang, 2018a].

Badania wskazują również na zaburzenia dotyczące innych białek kompleksu SNARE. Znakowanie immunofluorescencyjne fragmentów hipokampa pochodzących od osób ze zdiagnozowaną ChA wykazało obniżony poziom kilku białek presynaptycznych, w tym STX1A oraz VAMP2. Wspomniane zmiany ograniczały się jedynie do zewnętrznej warstwy molekularnej (drobinowej) zakrętu zębatego i nie zaobserwowano zależności między stopniem obciążenia amyloidem ani dystroficznymi neuronami, wskazującymi na nadmierną fosforylację białka Tau [Haytural i wsp., 2021]. Dane kliniczne są zgodne z wynikami otrzymanymi w badaniach na modelu zwierzęcym. Obniżonemu poziomowi STX1A i VAMP2 w korze czołowej transgenicznych myszy z podwójną mutacją w genie dla APP (mutacja szwedzka i mutacja londyńska) towarzyszył wzrost poziomu monomerów, dimerów oraz oligomerów $A\beta$ wyższego rzędu [Pham i wsp., 2010]. Badania Yanga i wsp. sugerują, że silnie obniżony poziom kompleksu SNARE może być wynikiem bezpośredniej interakcji między $A\beta$ i STX1A [Yang i wsp., 2015].



Rycina 3. Cykl pęcherzyka synaptycznego. Na czerwono zaznaczono etapy, w których biorą udział białka kompleksu SNARE. Zmodyfikowano wg Südhof (1995).

Wstęp

Objaśnienia skrótów: ATP – adenosynotrifosforan; Ca^{2+} – kationy wapnia; H^+ – kationy wodoru; NT – neurotransmitter/neuroprzekaznik.

Zaburzenia kompleksu białek SNARE mogą również powstawać na skutek nieprawidłowości związanych z białkami regulatorowymi takimi jak synapsyna 1 (SYN1), synaptofizyna (ang. synaptophysin, SYP), synaptotagmina 1 (SYT1), kompleksyna 1 i kompleksyna 2 (ang. complexin 1/complexin 2, CPLX1/CPLX2) czy neureksyny (ang. neurexins, NRXN) [Cesca i wsp., 2010; Gordon i Cousin, 2014; Trimbuch i Rosenmund, 2016; Zhou i wsp., 2017].

Synapsyna 1 (SYN1) należy do rodziny presynaptycznych fosfoprotein, które dzięki naprzemiennej fosforylacji i defosforylacji regulują dostępność SV do udziału w uwalnianiu neuroprzekazników. W postaci nieufosforylowanej SYN1 wiąże SV z włóknami aktynowymi i w ten sposób utrzymuje je w tzw. puli rezerwowej (ang. reserve pool of synaptic vesicles, RP) z dala od błony presynaptycznej. Pod wpływem depolaryzacji SYN1 ulega fosforylacji na serynie 9 i odłącza się od powierzchni SV, co umożliwia części z nich zbliżenie się do błony presynaptycznej i utworzenie tzw. puli łatwo uwalnianych pęcherzyków (ang. readily releasable pool of synaptic vesicles, RRP) gotowych do egzocytozy [Cesca i wsp., 2010]. Badania na myszach ze znokautowanym genem dla APP wykazały zwiększoną RRP i zmniejszoną RP, którym towarzyszył wzrost fosforylacji SYN1 na serynie 9, co wskazuje, że APP za pośrednictwem SYN1 negatywnie reguluje uwalnianie neuroprzekazników [Liu i wsp., 2019]. Inaczej niż APP, A β powodowały, że poziom ufosforylowanej SYN1 pozostawał podwyższony również w okresie repolaryzacji [Marsh i wsp., 2017]. Nieprawidłowości dotyczące SYN1 w ChA wiążą się także z zaburzeniem jej ekspresji zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i translacyjnym. Podanie A β_{1-42} do hipokampa myszy było związane z obniżoną ekspresją *Syn1* w tej strukturze mózgu [Mirza i wsp., 2021]. Obniżony poziom SYN1 zaobserwowano natomiast w neuronalnych egzosomach pochodzących z osocza pacjentów z ChA oraz w hipokampie myszy po dokomorowym podaniu STZ (model SAD) – w tym ostatnim przypadku obniżeniu SYN1 towarzyszyły wzrost poziomu A β oraz fosforylacji białka Tau na serynie w pozycjach 199 i 202 [Goetzl i wsp., 2016; Ravelli i wsp., 2017]. Natomiast doświadczenia Maesako i wsp. wykazały, że SYN1 zwiększa aktywność BACE1 i w ten sposób stymuluje wytwarzanie A β [Maesako i wsp., 2019].

Obniżony poziom synaptofizyny (SYP), która reguluje dostępność VAMP2 do reakcji fuzji SV z błoną presynaptyczną [Gordon i Cousin, 2014], został stwierdzony

w neuronalnych egzozomach pochodzących z osocza pacjentów z ChA [Goetzl i wsp., 2016] oraz w organotypowych skrawkach hipokampa traktowanych $A\beta_{25-35}$ [Suh i wsp., 2008]. Ponadto bezpośrednia interakcja $A\beta$ z SYP hamowała tworzenie kompleksu VAMP2-SYP, co powodowało nadmierną liczbę dojrzałych SV i ich zwiększoną egzocytozę [Russell i wsp., 2012].

Egzocytoza SV jest zależna od kationów Ca^{2+} , których stężenie monitoruje znajdująca się na błonie pęcherzyków synaptycznych synaptotagmina 1 (SYT1) [Pang i Südhof, 2010]. Analiza post mortem mózgow osób we wczesnym stadium ChA ujawniła obniżony poziom SYT1 w korze czołowej [Reddy i wsp., 2005]. Z kolei podwyższony poziom SYT1 stwierdzono w PMR osób z MCI i otępieniem związanym z ChA [Öhrfelt i wsp., 2016]. Badania wskazują na istotną rolę SYT1 w powstawaniu $A\beta$. Mysie neurony z wyciszonym genem kodującym SYT1 odznaczały się niższym poziomem $A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$. Wykazano również, że SYT1 bezpośrednio przyłącza się do APP [Gautam i wsp., 2015], a także do PSEN1 i w ten sposób zwiększa aktywność γ -sekreazy [Kuzuya i wsp., 2016].

Do białek, które mogą współpracować z SYT1, ale również funkcjonować niezależnie [Xue i wsp., 2010] należy rodzina niewielkich (około 150 aminokwasów, 15-20 kDa) białek zwanych kompleksynami (CPLX), które regulują zarówno spontaniczną (występującą przy braku depolaryzacji presynaptycznej), jak i wywołaną przez Ca^{2+} egzocytozę SV [Lin i wsp., 2013]. Spośród 4 istniejących izoform najlepiej poznane są CPLX1 i CPLX2. CPLX1 występuje głównie w synapsach hamujących (GABA-ergicznych), natomiast CPLX2 jest charakterystyczna dla synaps pobudzających (glutaminergicznych) [Salimi i wsp., 2008; Xue i wsp., 2008]. Badania wskazują, że CPLX ułatwiają egzocytozę poprzez obniżenie energii aktywacji, tj. bariery energetycznej, którą dojrzałe SV muszą pokonać, aby przyłączyć się do błony presynaptycznej [Schotten i wsp., 2015]. Analiza post mortem mózgow osób z ChA wykazała obniżony poziom CPLX1 w dolnej korze skroniowej i CPLX2 w hipokampie [Tannenberg i wsp., 2006]. Co więcej, obniżony poziom CPLX2 był związany z większą atrofią korową, natomiast wyższy poziom obu izoform odpowiadał mniejszemu prawdopodobieństwu demencji i polepszeniu funkcji poznawczych [Honer i wsp., 2012]. Bardziej szczegółowe badania wskazują, że wpływ CPLX1 i CPLX2 na funkcje poznawcze w ChA zależy od zaawansowania choroby – zmiany w poziomie CPLX1 mają większe znaczenie we wczesnych etapach ChA, natomiast zmiany w poziomie CPLX2 w zaawansowanym stadium choroby [Ramos-Miguel i wsp., 2017].

Neureksyny (NRXN) to grupa białek presynaptycznych występujących w postaci 2 izoform: długiej α i krótkiej β . Razem z postsynaptycznymi neuroliginami (NL) tworzą trans-synaptyczne kompleksy i w ten sposób odpowiadają za powstawanie, dojrzewanie, różnicowanie i plastyczność synaps [Reissner i wsp., 2013]. Ponadto NRXN łączą się z SYT i w ten sposób mogą kontrolować uwalnianie SV [Hata i wsp, 1993]. Obniżony poziom NRXN1 β zaobserwowano w synaptosomach pochodzących z kory i hipokampa transgenicznych myszy z podwójną mutacją w genie dla APP (mutacja szwedzka i mutacja Indiana) [Naito i wsp., 2017]. Zarówno NRXN, jak i NL są mediatorami toksycznego działania A β . Badania wykazały, że A β o przyłączają się do różnych izoform NRXN oraz NL, co prowadzi do wzrostu wytwarzania reaktywnych form tlenu (RFT), utraty kolców dendrytycznych, niszczenia synaps i w konsekwencji do zaburzeń pamięci [Brito Moreira i wsp., 2017]. Ponadto interakcja A β o z NRXN, poprzez zmniejszenie powierzchniowej ekspresji izoformy β , hamuje różnicowanie presynaptyczne, w którym pośredniczą NRXN [Naito i wsp., 2017].

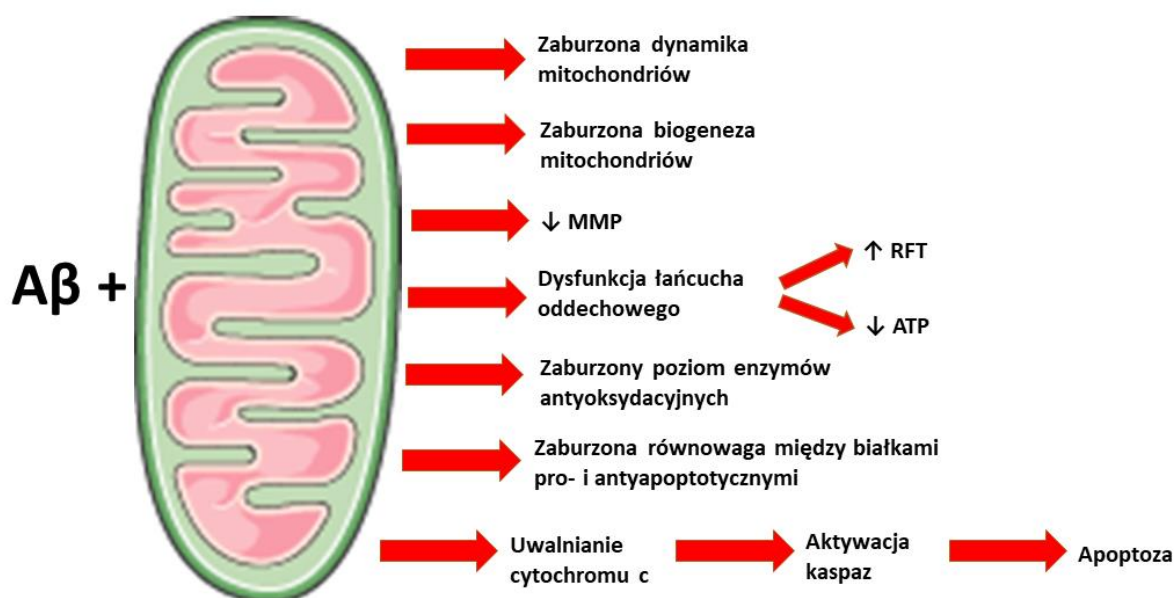
1.1.2.4 A β i zaburzenia mitochondrialne

Nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów uznaje się za jeden z najwcześniejszych objawów ChA, jednak jego znaczenie w patomechanizmie tej choroby jest niejednoznaczne. Według pierwotnej hipotezy mitochondrialnej to zaburzenia mitochondrialne i związane z nimi zmiany bioenergetyczne leżą u podstaw ChA i prowadzą do zachwiania homeostazy A β i jego odkładania się [Swerdlow i Khan, 2004; Swerdlow i Khan, 2009]. Natomiast wtórna hipoteza mitochondrialna, zgodna z hipotezą kaskady amyloidowej, zakłada, że zaburzenia mitochondrialne są skutkiem i pośrednikiem toksycznego działania A β [Swerdlow, 2018; Wang i wsp., 2020]. Liczne badania *in vitro* i *in vivo* wskazują na zdolność A β , w tym A β o, do odkładania się w mitochondriach, przede wszystkim w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i macierzy mitochondrialnej [Manczak i wsp., 2006; Hansson Petersen i wsp., 2008; Calkins i wsp., 2011]. Z badań Hansson Petersen i wsp. wynika, że transport A β do mitochondriów odbywa się przy udziale translokazy błony zewnętrznej (ang. translocase of the outer membrane, TOM) i jest niezależny od potencjału błony mitochondrialnej (ang. mitochondrial membrane potential, MMP) [Hansson Petersen i wsp., 2008]. Toksyczne działanie A β przejawia się już na etapie biogenezy mitochondrialnej. Obniżony poziom koaktywatora 1 α receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang. peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α), głównego regulatora biogenezy, stwierdzono w korze

transgenicznych myszy z mutacją szwedzką w genie dla APP (myszy Tg2576), a także w hodowli pierwotnej szczurzych neuronów i w komórkach ludzkiej neuroblastomy (SH-SY5Y) inkubowanych z A β [Porcellotti i wsp., 2015; de la Cueva i wsp., 2022]. Zarówno badania przeprowadzone na materiale autopsyjnym pochodzącym od pacjentów z ChA, jak i na modelach ChA *in vitro* i *in vivo* wykazały, że A β zaburza dynamikę mitochondriów. Widoczna jest obniżona ekspresja białek fuzji mitochondrialnej takich jak mitofuzyna 1 i 2 (ang. mitofusin 1/mitofusin 2, Mfn1/Mfn2) oraz białko 1 zaniku nerwu wzrokowego (ang. optic atrophy 1, OPA1) z jednoczesnym wzrostem ekspresji białek odpowiedzialnych za rozszczepienie mitochondriów, takich jak białko rozszczepienia mitochondriów 1 (ang. mitochondrial fission protein 1, FIS1) i białko dynamino-podobne (ang. dynamin-related protein 1, DRP1) [Wang i wsp., 2009; Calkins i wsp., 2011; Manczak i wsp., 2011; Chen i wsp., 2016; Joshi i wsp., 2018]. Efektem tej nierównowagi jest zwiększona fragmentacja i zmiany morfologiczne w tych organellach, które mogą prowadzić do zaburzeń transportu aksonalnego mitochondriów do zakończeń synaptycznych i finalnie do dysfunkcji przekąźnictwa synaptycznego [Wang i wsp., 2010; Calkins i wsp., 2011; Chen i wsp., 2016].

Oprócz negatywnego wpływu na biogenezę i dynamikę mitochondriów A β powoduje zaburzenia czynnościowe tych organelli. Liczne badania wskazują na wywołane przez A β dysfunkcje łańcucha oddechowego (w tym obniżenie aktywności oksydazy cytochromu c) [Rhein i wsp., 2009; Calkins i wsp., 2011; Bobba i wsp., 2013; Chiang i wsp., 2020] oraz redukcję MMP [Eckert i wsp., 2008; Dragicevic i wsp., 2010], co prowadzi do obniżenia poziomu adenosynotryfosforanu (ang. adenosine triphosphate, ATP) i niedoborów energii. Zachwianiu ulega równowaga redoks, prowadząc do wzrostu stresu oksydacyjnego, co przejawia się zwiększoną produkcją RFT oraz zmianami w ekspresji i aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa 1 i 2 (ang. superoxide dismutase 1/superoxide dismutase 2, SOD1/SOD2) czy peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase, Gpx) [Dragicevic i wsp., 2010; Li i wsp., 2011; Cha i wsp., 2012; Porcellotti i wsp., 2015; Fossati i wsp., 2016; Chiang i wsp., 2020]. A β powoduje zachwianie równowagi między pro- i antyapoptotycznymi białkami z rodziny Bcl2: obniża poziom antyapoptotycznych białek Bcl-w i Bcl2, a zwiększa poziom proapoptotycznych białek BAX i Bim [Yao i wsp., 2005; Cha i wsp., 2012; Kudo i wsp., 2012; Chiang i wsp., 2020]. Za pośrednictwem proapoptotycznego białka BAK A β powoduje uwalnianie cytochromu c z mitochondriów [Kim i wsp., 2014a], co aktywuje kaspazę 9 i kaspazę 3, prowadząc do apoptozy neuronów [Cha i wsp., 2012;

Fossati i wsp., 2016; Wang i wsp., 2017a; Chiang i wsp., 2020] (**ryc. 4.**). Wywołana przez A β apoptoza związana jest z hamowaniem prożyciowej ścieżki PI3K/AKT, natomiast jej aktywacja (związana z zahamowaniem aktywności GSK-3 β) prowadzi do zahamowania kaspazy 3, obniżenia poziomu BAX i wzrostu poziomu Bcl2 [Lou i wsp., 2011; Zhang i wsp., 2015]. Aktywacja ścieżki PI3K/AKT/GSK-3 β prowadzi także do obniżenia wytwarzania RFT [Park i wsp., 2021], zmniejszenia fosforylacji białka Tau [Yao i wsp., 2019a] i zwiększenia neurogenezy w hipokampie [Zheng i wsp., 2017]. Zaobserwowano również aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego pochodzenia erytroidalnego typu 2 (ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2), który chroni neurony przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i metabolicznymi wywołanymi przez A β [Sotolongo i wsp., 2020]. Obniżenie wywołanych przez A β wysokiej śmiertelności neuronów i zwiększonego wytwarzania wolnych rodników zostało osiągnięte również poprzez bezpośrednie hamowanie GSK-3 β [Koh i wsp., 2008].



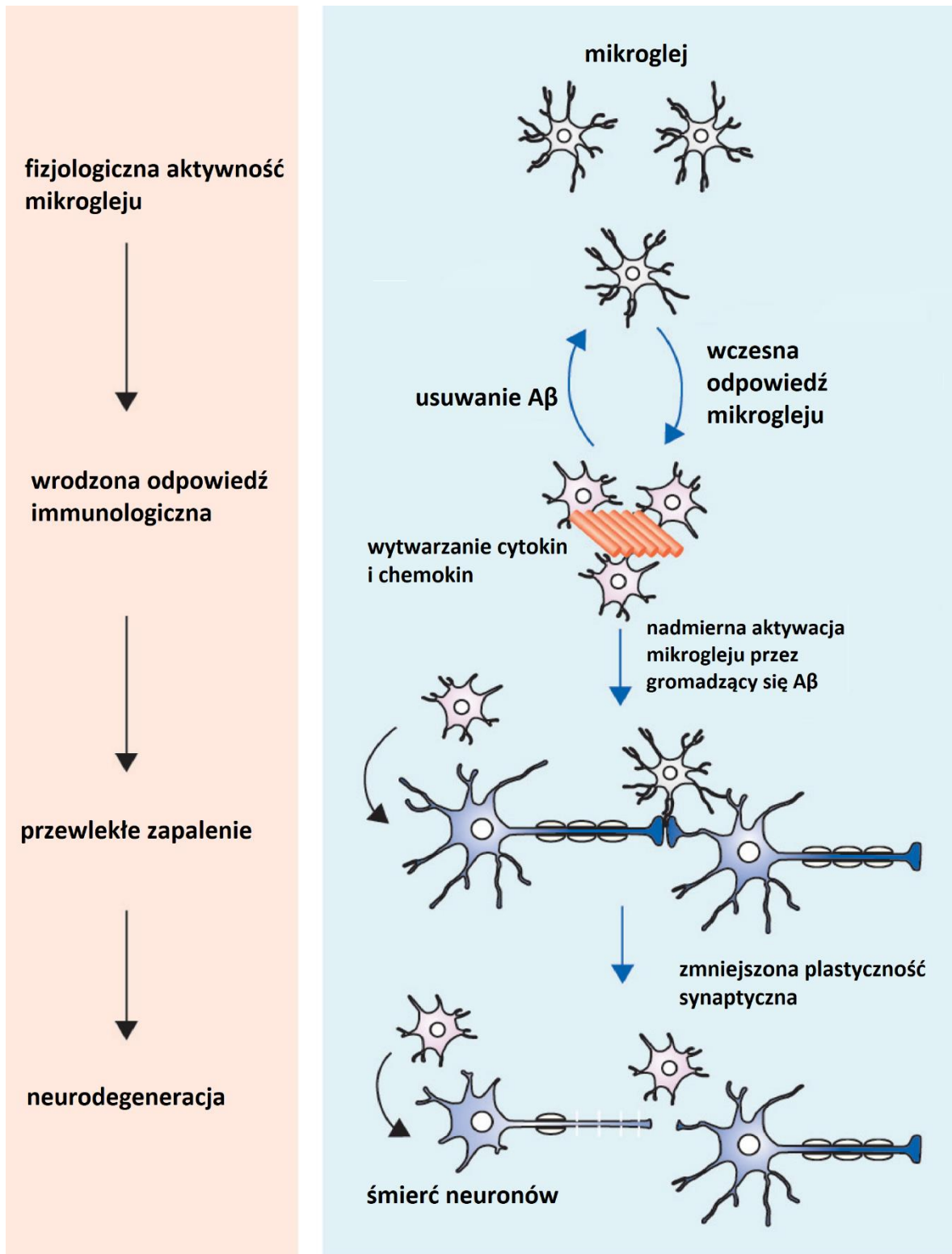
Rycina 4. Wpływ A β na funkcjonowanie mitochondriów. Schemat autorski.

Objaśnienia skrótów: ATP – adenozyntrifosforan; MMP – potencjał błony mitochondrialnej; RFT – reaktywne formy tlenu.

1.1.2.5 A β i neurozapalenie

Obok zaburzeń mitochondrialnych cechą towarzyszącą ChA jest neurozapalenie, czyli proces zapalny odbywający się w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), w którym uczestniczą komórki glejowe, przede wszystkim mikroglej [Leng i Edison,

2021]. W stanie fizjologicznym mikroglej kontroluje bieżącą aktywność synaptyczną, pośredniczy w usuwaniu zbędnych połączeń synaptycznych (ang. synaptic pruning), usuwa szczątki komórkowe i zapewnia wsparcie troficzne neuronom [Onyango i wsp., 2021]. W odpowiedzi na stany patologiczne w OUN, mikroglej zostaje aktywowany w celu wytworzenia czynników prozapalnych (fenotyp M1) lub czynników przeciwzapalnych (fenotyp M2). Analiza materiału autopsyjnego od pacjentów z ChA jak i badania z zastosowaniem neuroobrazowania *in vivo* wykazały, że aktywowany mikroglej otacza zarówno blaszki amyloidowe, jak i neurony zawierające NFT [Mattiace i wsp., 1990; Serrano-Pozo i wsp., 2011; Dani i wsp., 2018], jednak aktywację mikrogleju może również wywoływać A β w postaci fibryli i oligomerów [Jana i wsp., 2008; Sondag i wsp., 2009]. Po pojawieniu się blaszek amyloidowych w mózgu, mikroglej jest rekrutowany do udziału w ich usuwaniu na drodze fagocytozy. Jednocześnie aktywowany mikroglej w celu neutralizacji i eliminacji toksycznych cząsteczek uwalnia cytokiny prozapalne, takie jak interleukina 1 β (IL-1 β), interleukina 6 (IL-6), interleukina 18 (IL-18) czy czynnik martwicy nowotworów α (ang. tumor necrosis factor, TNF- α), chemokiny: białko chemotaktyczne monocytów (ang. monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) i białko zapalne makrofagów (ang. macrophage inflammatory protein, MIP), a także RFT, prostaglandyny, tlenek azotu i białka układu dopełniacza [Bronzuoli i wsp., 2016]. Choć początkowo aktywacja mikrogleju ma pozytywne znaczenie, to jego przedłużona aktywność wraz ze stałym wytwarzaniem mediatorów stanu zapalnego prowadzi, paradoksalnie, do zmniejszonej skuteczności w usuwaniu A β , a w konsekwencji do jego akumulacji [Kinney i wsp., 2018], czemu towarzyszy zmniejszenie plastyczności synaptycznej i żywotności neuronów [Yates i wsp., 2000; Kim i wsp., 2014b] (**ryc. 5**).

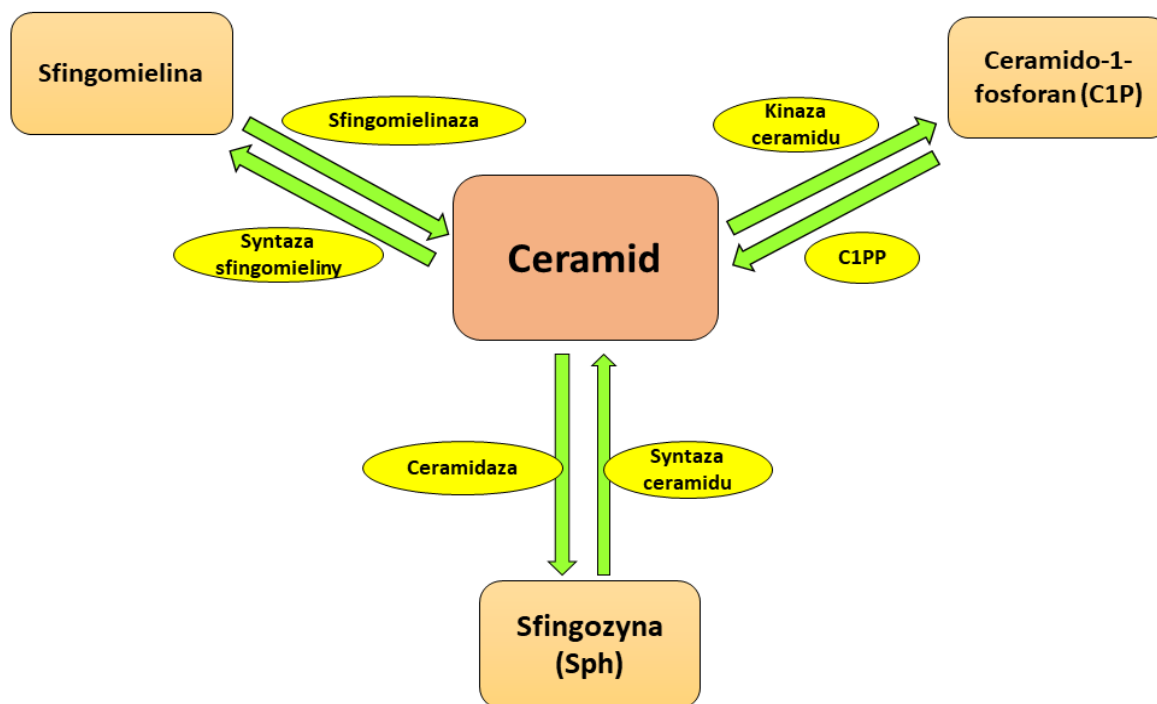


Rycina 5. Następstwa aktywacji mikrogleju pod wpływem Aβ. Zmodyfikowano wg Heneka i wsp. (2015).

1.2 Bioaktywne sfingolipidy

W ostatnich latach poszukiwania wyjaśnień dotyczących patomechanizmu ChA skierowały uwagę naukowców na sfingolipidy – rodzinę błonowych lipidów będących pochodną 18-węglowego nienasyconego aminoalkoholu sfingozyny (ang. sphingosine, Sph). Ze względu na różnice w budowie poszczególnych przedstawicieli wyróżniamy trzy duże grupy sfingolipidów: ceramidy, fosfosfingolipidy (w tym najczęściej występującą w błonach komórkowych sfingomielinę) oraz glikosfingolipidy, które z kolei dzielimy na cerebrozydy i gangliozydy [Quinville i wsp., 2021]. Sfingolipidy są ważnymi elementami strukturalnymi błon komórkowych. Razem z cholesterolem tworzą w błonie komórkowej tzw. tratwy lipidowe – heterogeniczne i dynamiczne nanodomeny błonowe (zdolne do łączenia się w mikrodomeny) o uporządkowanej strukturze, odgrywające ważną rolę w regulacji aktywności związanych z nimi białek, a przez to regulujące ważne funkcje komórkowe [Sezgin i wsp., 2017]. Oprócz istotnej roli w budowie błon komórek eukariotycznych, niektóre z nich, tj. ceramid, ceramido-1-fosforan (ang. ceramide-1-phosphate, C1P) i sfingozyno-1-fosforan (ang. sphingosine-1-phosphate, S1P) są także ważnymi cząsteczkami sygnałowymi o przeciwstawnym wpływie na los komórek.

Ceramid, centralny element metabolizmu sfingolipidów (jest substratem dla syntezy innych sfingolipidów) (**ryc. 6.**), sprzyja starzeniu się komórek, zatrzymaniu cyklu komórkowego i apoptozie komórek, w tym neuronów [Hannun i Obeid, 2008]. Ceramid może inicjować apoptozę poprzez bezpośrednie generowanie RFT, powodujących uszkodzenia oksydacyjne [Czubowicz i Strosznajder, 2014]. Inny mechanizm śmierci zakłada hamowanie przez ceramid szlaku PI3K/AKT, z następczą aktywacją GSK-3 β [Arboleda i wsp., 2010, Czubowicz i Strosznajder, 2014] oraz szlaku MAPK/ERK (ang. extracellular signal-regulated kinase) z następczą aktywacją kinazy JNK [Arboleda i wsp., 2010]. W postaci ufosforylowanej (przy udziale kinazy ceramidu) jako C1P, hamuje apoptozę, promuje przeżywalność i proliferację komórek [Gangoiti i wsp., 2008; Gangoiti i wsp., 2012], natomiast poprzez stymulację cytozolowej fosfolipazy A2 (ang. cytosolic phospholipase A2, cPLA2) zwiększa poziom prozapalnych eikozanoidów [Presa i wsp., 2020]. Podobnie jak C1P, wyraźnym działaniem prożyciowym charakteryzuje się S1P.

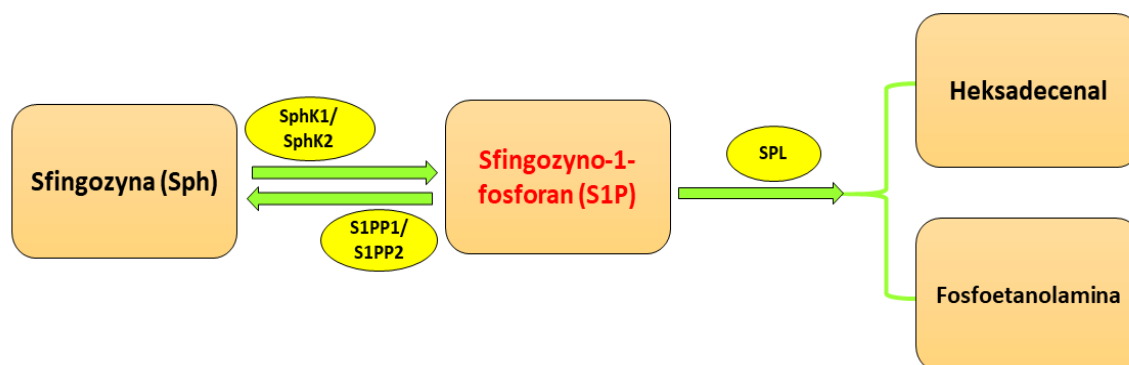


Rycina 6. Ceramid jako centralny element metabolizmu sfingolipidów. Schemat autorski. Objasnienia skrótów: C1P – ceramido-1-fosforan; C1PP – fosfataza ceramido-1-fosforanu; Sph – sfingozyna.

1.2.1 Metabolizm sfingozyno-1-fosforanu (S1P)

S1P jest fosforanową pochodną Sph, która z kolei powstaje w wyniku deacetylacji ceramidu przez kwaśną ceramidazę. Za fosforylację Sph do S1P odpowiadają dwie izoformy kinazy sfingozyny (ang. sphingosine kinase, SphK): SphK1 i SphK2 [Moruno Manchon i wsp., 2015]. Pomimo dużego podobieństwa sekwencji aminokwasów, te dwie izoformy są kodowane przez 2 różne geny, wykazują odmienną specyficzność substratową, różną ekspresję w tkankach, inną lokalizację subkomórkową oraz wpływ na losy komórki. SphK1 najliczniej występuje w płucach, śledzionie, limfocytach oraz grasicy i nerkach [Melendez i wsp., 2000], natomiast SphK2 najwyższą ekspresję wykazuje w nerkach i wątrobie [Liu i wsp., 2000a]. Obie izoformy występują w mózgu ludzkim i mysim [Liu i wsp., 2000a; Melendez i wsp., 2000], natomiast sprzeczne wyniki dotychczas prowadzonych badań nie pozwalają stwierdzić, która z nich jest formą dominującą [Fukuda i wsp., 2003; Blondeau i wsp., 2007]. Podczas gdy SphK1 znajduje się w cytozolu komórek eukariotycznych i jest aktywowana po translokacji do błony komórkowej, SphK2 zlokalizowana jest w organellach komórkowych, takich jak jądro komórkowe, siateczka śródplazmatyczna (ang. endoplasmic reticulum, ER) i mitochondria [Ghasemi i wsp.,

2016; Diaz Escarcega i wsp., 2021]. SphK1 pobudza proliferację komórek i hamuje apoptozę [Olivera i wsp., 2003], natomiast zwiększona ekspresja SphK2 prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego i apoptozy [Igarashi i wsp., 2003; Liu i wsp., 2003; Maceyka i wsp., 2005]. Proces degradacji S1P warunkowany jest działaniem 2 rodzajów enzymów zlokalizowanych w ER. Fosfatazy sfingozyno-1-fosforanu 1 i 2 (ang. sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 and 2, S1PP1/S1PP2) katalizują odwracalną reakcję defosforylacji S1P do Sph. Natomiast zależna od fosforanu pirydoksalu liaza sfingozyno-1-fosforanu (ang. sphingosine-1-phosphate lyase, SPL) pośredniczy w nieodwracalnym rozkładzie S1P do fosfoetanolaminy i heksadecenal, w ten sposób zmniejszając dostępną pulę S1P w komórce [Ikeda i wsp., 2004; Di Pardo i Maglione, 2018a] (ryc. 7.).



Rycina 7. Metabolizm sfingozyno-1-fosforanu. Schemat autorski.

Objaśnienia skrótów: S1P – sfingozyno-1-fosforan; S1PP1 – fosfataza sfingozyno-1-fosforanu 1; S1PP2 – fosfataza sfingozyno-1-fosforanu 2; Sph – sfingozyna; SphK1 – kinaza sfingozyny 1; SphK2 – kinaza sfingozyny 2; SPL – liaza sfingozyno-1-fosforanu.

Cechą wyróżniającą S1P wśród pozostałych sfingolipidów jest to, że wykazuje dwutorowe działanie: wewnątrzkomórkowo jako przekaźnik drugiego rzędu oraz zewnątrzkomórkowo poprzez specyficzne dla siebie receptory [Strub i wsp., 2010].

1.2.2 Wewnątrzkomórkowe działanie S1P

Wewnątrzkomórkowa pula S1P jest syntetyzowana głównie przez SphK2. Dotychczasowe badania wykazały, że jako przekaźnik drugiego rzędu S1P uczestniczy w wielu ważnych procesach komórkowych.

Wstęp

S1P syntetyzowany przez jądrową SphK2 (ta związana jest z histonem 3) specyficznie łączy się z deacetylazami histonów 1 i 2 (ang. histone deacetylase 1 and 2, HDAC1/HDAC2), zapobiegając w ten sposób usunięciu grup acetylowych z reszt lizynowych histonów. Skutkuje to zwiększoną transkrypcją genów kodujących inhibitor kinaz zależnych od cyklin (ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 1, p21) oraz czynnik transkrypcyjny c-fos [Hait i wsp., 2009].

Z kolei S1P wytwarzany przez mitochondrialną SphK2 przyłącza się z wysokim powinowactwem i specyficznością do prohibityny 2 (ang. prohibitin 2, PHB2) [Strub i wsp., 2011]. PHB2 jest wysoce konserwatywnym białkiem zlokalizowanym przede wszystkim w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, które odpowiada, m.in. za utrzymanie prawidłowej struktury tych organelli oraz biogenezę kompleksów łańcucha transportu elektronów [Merkwirth i Langer, 2009]. Homozygotyczna delekcja SphK2 (*sphk2*^{-/-}) u myszy prowadziła do zmniejszenia interakcji pomiędzy PHB2 i podjednostkami kompleksu IV łańcucha oddechowego (oksydaza cytochromu c) z następczym zaburzeniem fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach [Strub i wsp., 2011], co wskazuje na istotną rolę S1P w prawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów.

Wewnątrzkomórkowy S1P, powstały w wyniku działania SphK1, bierze udział w zależnej od TNF- α aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B), w czym pośredniczy czynnik 2 związany z receptorem dla TNF (ang. TNF receptor-associated factor 2, TRAF2). TRAF2 łączy się z Sphk1, powodując jej aktywację. To z kolei prowadzi do wzrostu wytwarzania S1P, który przyłącza się do domeny RING na N-końcu białka TRAF2 i stymuluje jego aktywność jako ligazy ubikwitynowej. Aktywowany TRAF2 katalizuje ubikwitynację białka 1 oddziałującego z receptorem (receptor interacting protein 1, RIP1). W ten sposób prowadzi do aktywacji kinazy I κ B z następczą fosforylacją (degradacją) I κ B α , białka hamującego NF- κ B, co ostatecznie umożliwia translokację NF- κ B z cytoplazmy do jądra komórkowego [Alvarez i wsp., 2010].

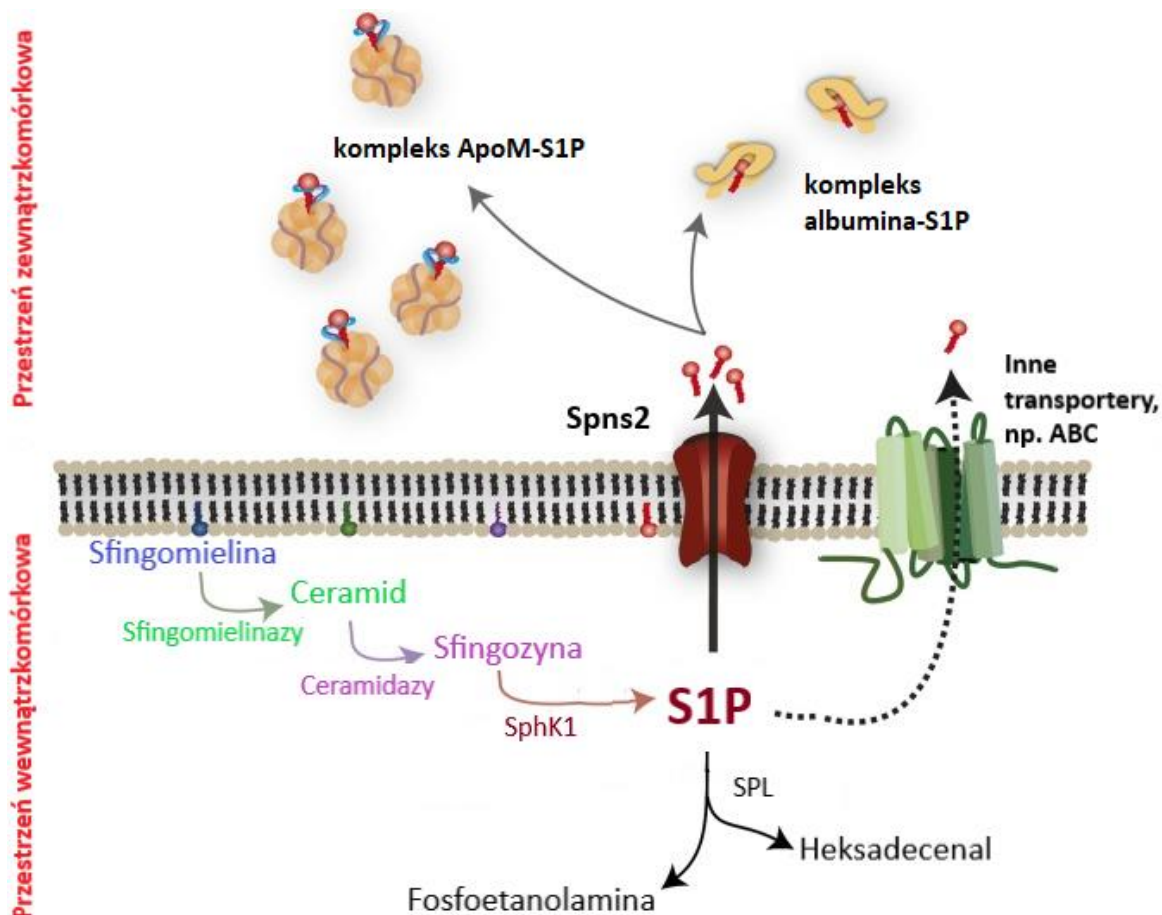
Innym białkiem efektorowym dla S1P jest receptor γ aktywowany przez proliferatory peroksysomów (ang. peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ), czynnik transkrypcyjny zaangażowany w regulowanie metabolizmu lipidów i homeostazy glukozowej. S1P wiąże się z PPAR- γ poprzez histydynę 323 w jego domenie wiążącej ligand, co pobudza tworzenie kompleksu PPAR- γ z koaktywatorem 1 β receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang. peroxisome proliferator-activated

receptor- γ coactivator-1 β , PGC-1 β) w komórkach śródbłonka naczyniowego, a to sprzyja tworzeniu nowych naczyń krwionośnych [Parham i wsp., 2015].

Autofagia jest wewnątrzkomórkowym procesem, który polega na degradacji zbędnych, uszkodzonych lub starzejących się białek i organelli komórkowych w celu zachowania homeostazy komórkowej. W komórkach z wyciszonym genem kodującym S1PP1 wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu S1P prowadził do pobudzenia autofagii, która wywoływała stres ER z następczym uruchomieniem mechanizmu tzw. odpowiedzi na białka niesfałdowane (ang. unfolded protein response, UPR), którego rolą jest zmniejszenie stresu i przywrócenie homeostazy białek (proteostazy). Autofagia wywołana przez S1P była niezależna od białka supresorowego nowotworów p53. Co więcej, w odróżnieniu od autofagii wywołanej przez ceramid, nie prowadziła do apoptozy komórek, co było związane z zależnym od kinazy białkowej siateczki śródplazmatycznej (ang. protein kinase regulated by RNA-like ER kinase, PERK) wzrostem ufosforylowania (aktywacją) prożyciowej kinazy AKT [Lépine i wsp., 2011].

1.2.3 Zewnątrzkomórkowe działanie S1P. Receptory dla S1P

Wytwarzanie zewnątrzkomórkowej puli S1P jest zadaniem SphK1 i ma miejsce głównie w erytrocytach, komórkach śródbłonka naczyń i płytkach krwi. Te ostatnie ze względu na brak ekspresji SPL pełnią funkcję magazynu dla S1P, natomiast erytrocyty i komórki śródbłonka są ukierunkowane na uwalnianie S1P poza komórkę [Yatomi, 2008]. S1P jest transportowany na zewnątrz komórki za pośrednictwem transporterów takich jak spinster 2 (Spns2) oraz białka transportowe posiadające kasetę wiążącą ATP/transportery ABC (ang. ATP-binding cassette transporters, ABC transporters) [Takabe i Spiegel, 2014]. Po opuszczeniu komórki S1P wiąże się z apolipoproteina M (ApoM) (~65%), elementem lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. high-density lipoprotein, HDL) lub w mniejszym stopniu z osoczną albuminą (~35%), a jedynie niewielka ilość S1P krąży w postaci wolnej (niezwiązanej) (**ryc. 8**). Zewnątrzkomórkowo S1P wykazuje aktywność autokrynną lub parakrynną poprzez specyficzne dla siebie błonowe receptory związane z białkami G (ang. G protein-coupled receptors, GPCR). Dotychczas zidentyfikowano 5 takich receptorów (S1PR1-5), z których każdy jest powiązany z określonym typem białka G, co determinuje funkcję receptora.



Rycina 8. Synteza i uwalnianie S1P poza komórkę. Zmodyfikowano wg Blaho i Hla (2014).

Objaśnienia skrótów: ABC – białka transportowe posiadające kasetę wiążącą ATP; ApoM – apolipoproteina M; S1P – sfingozyno-1-fosforan; SphK1 – kinaza sfingozyny 1; SPL – liaza sfingozyno-1-fosforanu; Spns2 – białko transporterowe sfingozyno-1-fosforanu spinster 2.

S1PR1, łączący się wyłącznie z podjednostką $G_{\alpha i}$, występuje w większości tkanek organizmu, a szczególnie wysoką ekspresję wykazuje w mózgu, płucach, śledzionie, układzie sercowo-naczyniowym i nerkach. Pierwotnie został zidentyfikowany jako sierocy GPCR zaangażowany w różnicowanie komórek śródbłónka (ang. endothelial differentiation G-protein coupled receptor-1, EDG-1) [Hla i Maciag, 1990]. S1PR1 odgrywa znaczącą rolę w angiogenezie. Delecja $slp1^{-/-}$ powodowała zahamowanie migracji komórek mięśni gładkich i perycytów oraz niepełne dojrzewania naczyń krwionośnych, co prowadziło do śmiertelnych dla mysich zarodków krwotoków [Liu i wsp., 2000b]. Zaburzenia w budowie naczyń krwionośnych spowodowane brakiem S1PR1 wywołują hipoksję, która prowadzi do zwiększonej ekspresji czynnika wzrostu śródbłónka

naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF) i hiperwaskularyzacji, co zaburza morfogenezę kończyn [Chae i wsp., 2004]. S1PR1 znajdujący się w mikrodomenach bogatych w kaweolinę (ang. caveolin-enriched microdomain, CEM) odpowiada również za utrzymanie integralności bariery śródbłonkowej. Dzieje się to poprzez aktywację kinazy AKT z następczą aktywacją białka Rac, co prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego i wzmocnienia bariery naczyniowej [Singleton i wsp., 2006; Singleton i wsp., 2009]. S1PR1 jest zaangażowany w recyrkulację limfocytów. Obecność S1PR1 na powierzchni limfocytów T i B umożliwia ich wyjście z węzłów chłonnych, a obniżenie ekspresji tego receptora skutkuje limfopenią [Matloubian i wsp., 2004].

S1PR2 (EDG-5) również charakteryzuje się ekspresją w większości tkanek organizmu (wysoka ekspresja w OUN, układzie odpornościowym i sercowo-naczyniowym). Jest sprzężony z białkami Gai, Gaq, oraz G12/13 [Fan i wsp., 2021]. U myszy z homozygotyczną delecją S1PR2 (*s1p2^{-/-}*) zaobserwowano wzrost pobudliwości neuronów piramidowych kory nowej, jak również sporadyczne napady padaczkowe pomiędzy 3 i 7 tygodniem życia [MacLennan i wsp., 2001, Akahoshi i wsp., 2011]. Dodatkowo myszy *s1p2^{-/-}* są głuche oraz występują u nich zaburzenia systemu przedsionkowego, co wskazuje, że S1PR2 jest niezbędny do prawidłowego rozwoju narządu słuchu i równowagi [MacLennan i wsp., 2006; Kono i wsp., 2007]. Jednoczesna delecja S1PR1 i S1PR2 powoduje poważniejsze defekty w budowie naczyń krwionośnych i wyższą śmiertelność embrionów myszy w porównaniu do myszy z delecją tylko S1PR1 [Kono i wsp., 2004]. W przeciwieństwie do S1PR1 i S1PR3, których aktywacja pobudza migrację komórek, aktywacja S1PR2 powoduje zahamowanie migracji komórek, co jest związane z aktywacją białka Rho i serynowo-treoninowej kinazy ROCK (ang. Rho-associated protein kinase) [Lepley i wsp., 2005]. Aktywacja S1PR2 z następczą aktywacją szlaku Rho/ROCK wiąże się ze zwiększoną przepuszczalnością naczyń [Sanchez i wsp., 2007]. S1PR2 odgrywa także istotną rolę w biogenezie mitochondriów. S1P poprzez S1PR2 aktywuje ścieżkę PKA/CREB, co prowadzi do zwiększenia poziomu PGC-1 α i jego białek efektorowych: jądrowego czynnika oddechowego 1 (ang. nuclear respiratory factor 1, NRF-1) oraz mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A (ang. mitochondrial transcription factor A, TFAM) [Shen i wsp., 2014]. Wykazano również, że S1PR2 jest niezbędny do prawidłowej degranulacji komórek tucznych, co ma istotne znaczenie w reakcjach alergicznych [Jolly i wsp., 2004].

S1PR3 (EDG-3), podobnie jak S1PR2, sprzężony jest z $G\alpha i$, $G\alpha q$, oraz G12/13 i występuje w większości tkanek (wysoka ekspresja w układzie sercowo-naczyniowym, płucach, nerkach, jelitach, śledzionie i tkance chrzęstnej). W OUN wykazuje wysoką ekspresję przede wszystkim w astrocytach i neuronach, chociaż istnieją doniesienia, że jest obecny również w mikrogleju [Noda i wsp., 2013; Blaho i Hla, 2014; Dusaban i wsp., 2017]. Myszy z delecją S1PR3 pozostają żywotne i nie wykazują nieprawidłowości rozwojowych [Ishii i wsp., 2001]. Jednoczesny brak S1PR2 i S1PR3 skutkuje nieznacznie zwiększoną śmiertelnością okołoporodową i zmniejszoną liczebnością miotu [Ishii i wsp., 2002], natomiast brak receptorów S1PR1-3 prowadzi do masowej śmierci mysich embrionów z powodu licznych nieprawidłowości naczyniowych. Efekt ten jest silniejszy niż w przypadku występowania pojedynczej delecji $s1p1^{-/-}$ oraz podwójnej delecji $s1p1^{-/-} s1p2^{-/-}$ [Kono i wsp., 2004]. S1PR3 występujący w miocytach i okołonaczyniowych komórkach mięśni gładkich odgrywa znaczącą rolę w regulacji rytmu serca – jego aktywacja prowadzi do bradykardii i podwyższenia ciśnienia tętniczego u myszy [Forrest i wsp., 2004].

W odróżnieniu od wcześniej omówionych receptorów, ekspresja S1PR4 i S1PR5 ogranicza się do określonych typów komórek. Oba receptory są sprzężone z białkami $G\alpha i$ oraz G12/13.

S1PR4 (EDG-6) występuje głównie w narządach limfatycznych i krwiotwórczych, włączając w to grasicę, śledzionę, szpik kostny, wyrostek robaczkowy i obwodowe leukocyty. Jego powinowactwo do S1P jest około 150 razy mniejsze niż pozostałych receptorów. Zwierzęta $s1p4^{-/-}$ charakteryzują się prawidłową liczbą limfocytów obwodowych i nie wykazują zaburzeń w budowie narządów limfatycznych. Brak S1PR4 jedynie nieznacznie wpływa na funkcję limfocytów T *in vivo*, natomiast wyraźnie zaburza migrację komórek dendrytycznych i wydzielanie cytokin oraz różnicowanie się subpopulacji limfocytów Th17 [Schulze i wsp., 2011]. Stymulacja receptora S1PR4 hamuje 5-lipooksygenazę i tym samym wytwarzanie prozapalnych leukotrienów oraz zmniejsza migrację makrofagów i neutrofilów w płucach w odpowiedzi na lipopolisacharyd (LPS) [Fettel i wsp., 2018]. Pobudzenie S1PR4 aktywuje kinazy ERK1/2 i fosfolipazę C oraz moduluje otwieranie wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia [Van Brocklyn i wsp., 2000; Yamazaki i wsp., 2000]. Najnowsze badania Hansen i wsp. wskazują na istotną rolę S1PR4 występującego w śródbłonku mikronaczyń mózgowych w utrzymaniu integralności bariery krew-mózg [Hansen i wsp., 2022].

S1PR5 (EDG-8) wykazuje najwyższą ekspresję w oligodendrocytach [Terai, 2003] oraz w komórkach NK (ang. natural killers) [Walzer i wsp., 2007]. U myszy z homozygotyczną delecją S1PR5 (*s1p5^{-/-}*) nie zaobserwowano zaburzeń mielinizacji [Jaillard i wsp., 2005] ani innych zaburzeń rozwojowych. Odnotowano natomiast zmniejszoną liczbę komórek NK we krwi, śledzionie i płucach, a zwiększoną w szpiku kostnym i węzłach chłonnych [Walzer i wsp., 2007], co wskazuje na istotną rolę S1PR5 w recyrkulacji tej subpopulacji limfocytów [Jenne i wsp., 2009; Mayol i wsp., 2011]. Fibroblasty pochodzące od tych zwierząt charakteryzowały się zwiększoną proliferacją oraz odpornością na starzenie komórkowe [Talmont i wsp., 2022]. Efekt aktywacji S1PR5 na powierzchni oligodendrocytów jest zależny od stadium zróżnicowania komórek. Aktywacja S1PR5 na powierzchni komórek prekursorowych oligodendrocytów (ang. oligodendrocyte precursor cells, OPC) hamuje migrację tych komórek [Novgorodov i wsp., 2007]. Stymulacja S1PR5 znajdujących się na preoligodendrocytach prowadzi do fosforylacji białka-2 pośredniczącego w odpowiedzi na kolapsynę (ang. collapsin response-mediated protein, CRMP2) przez kinazę Rho i cofnięcia procesu dojrzewania komórek. Natomiast aktywacja S1PR5 występujących na dojrzałych oligodendrocytach prowadzi do wzrostu żywotności komórek, co jest związane z aktywacją kinazy AKT poprzez G α i [Jaillard i wsp., 2005]. Występujący w komórkach śródbłonna naczyń włosowatych istoty białej S1PR5 ma istotne znaczenie w utrzymaniu integralności bariery krew-mózg oraz w regulacji stanu zapalnego. Delecja S1PR5 w komórkach śródbłonna wiązała się ze zwiększoną migracją przezśródbłonkową monocytów i zwiększoną syntezą prozapalnych cytokin i chemokin oraz białek adhezyjnych dla leukocytów [van Doorn i wsp., 2012]. Dodatkowo S1PR5 poprzez aktywację kinazy AKT oraz kinazy typu polo 1 (ang. polo-like kinase 1, PLK1) stymuluje podziały mitotyczne [Andrieu i wsp., 2017].

1.2.4 Rola S1P w układzie nerwowym

S1P odgrywa istotną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu układu nerwowego zarówno jako przekaźnik drugiego rzędu, jak i zewnątrzkomórkowo poprzez receptory. Pobudzenie SphK przez czynnik wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor, NGF) i wzrost poziomu S1P zwiększały przeżywalność neuronalnych komórek PC12 (szczurza linia komórek guza chromochłonnego nadnerczy) [Edsall i wsp., 1997]. Wewnątrzkomórkowy S1P pośredniczy również w wywołanej przez NGF zwiększonej pobudliwości neuronów czuciowych [Zhang i wsp., 2006]. Brak S1P spowodowany homozygotyczną podwójną

delecją obu izoform SphK powodował zaburzenia wzrostu i przeżywalności neuronalnych komórek progenitorowych (ang. neural progenitor cells, NPC) i neuronów w rozwijających się zwojach czuciowych [Meng i wsp., 2011]. Z kolei u myszy $SphK1^{-/-}$ $SphK2^{-/-}$ niezdolnych do wytwarzania S1P zaobserwowano niecałkowite zamknięcie cewy nerwowej [Mizugishi i wsp., 2005]. Działanie receptorowe S1P możliwe jest dzięki występowaniu S1PR w komórkach OUN. W NPC stwierdzono występowanie wszystkich receptorów dla S1P, przy czym największą ekspresję mRNA odnotowano dla S1PR1 i S1PR2 [Kimura i wsp., 2008; Blanc i wsp., 2015]. W neuronach najwyższą ekspresję wykazują S1PR1 i S1PR3, w mikrogleju S1PR1, w astrocytach S1PR3, a w oligodendrocytach S1PR5 (w odróżnieniu od OPC, gdzie dominującym receptorem jest S1PR1) [Chun i Hartung, 2010; Blaho i Hla, 2014; Dusaban i wsp., 2017; Roggeri i wsp., 2020]. Badania przeprowadzone na mysich zarodkach wykazały, że S1PR1-3 poprzedzają pojawianie się S1PR4 i S1PR5 w rozwijającym się układzie nerwowym [Meng i Lee, 2009]. Poprzez receptory S1P stymuluje proliferację i zmiany morfologiczne w NPC [Harada i wsp., 2004]. W odpowiedzi na NGF pobudzenie S1PR1 w sposób zależny od SphK1 promowało wydłużenie neurytów w neuronach zwojowych korzeni grzbietowych [Toman i wsp., 2004]. Aktywacja S1PR1 wzmacniała również neurogenezę w hipokampie w szczurzym modelu urazowego uszkodzenia mózgu [Ye i wsp., 2016] i stymulowała migrację NPC do uszkodzonych części OUN w szczurzym modelu urazu rdzenia kręgowego [Kimura i wsp., 2007]. Z kolei stymulacja S1PR2 hamowała migrację NPC do miejsc dotkniętych uszkodzeniem w mysim modelu udaru niedokrwiennego [Kimura i wsp., 2008]. Badania przeprowadzone na mysich i ludzkich astrocytach wykazały, że jednoczesna aktywacja S1PR1 i S1PR2 indukuje ekspresję genów kodujących czynniki neurotroficzne, takie jak neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF), czynnik wzrostu wiążący heparynę podobny do EGF (ang. heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF), czynnik hamujący białaczkę (ang. leukemia inhibitory factor, LIF) i podjednostka B płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. platelet-derived growth factor subunit B, PDGFB) [Tran i wsp., 2019]. S1P może również pośrednio chronić neurony hipokampa przed ekscytotoksycznością indukowaną przez kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-methyl-D-aspartic acid, NMDA), gdy neurony są hodowane w kokulturze z komórkami glejowymi [Tran i wsp., 2019].

1.2.5 Rola S1P w chorobach neurodegeneracyjnych

Istotne znaczenie S1P w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu OUN pozwoliło wysunąć hipotezę, którą potwierdziły badania na materiale klinicznym i na modelach zwierzęcych i komórkowych, że stany patologiczne układu nerwowego, w tym choroby neurodegeneracyjne mogą wiązać się z zaburzeniami sygnalizacji zależnej od tego sfingolipidu.

Analiza post mortem mózgow osób z ChA wykazała, że złogom A β w korze śródwęczowej towarzyszył obniżony poziom SphK1 i podwyższony poziom SPL. Sugeruje to, że niski poziom S1P wynikający ze wzrostu jego rozkładu może wiązać się z upośledzonym usuwaniem A β [Ceccom i wsp., 2014], co jest zgodne z negatywną korelacją pomiędzy poziomem S1P i A β zaobserwowaną w badaniach post mortem przeprowadzonych przez He i wsp. [2010]. Dodatkowo w korze czołowej i hipokampie wykazano obniżony poziom receptora dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R), którego pobudzenie przez IGF indukuje translokację SphK1 z cytoplazmy do błony komórkowej. W korze śródwęczowej i czołowej stwierdzono także obniżony poziom S1PR1 [Ceccom i wsp., 2014]. Inne badania na materiale autopsyjnym wykazały obniżoną aktywność obu izoform SphK w hipokampie oraz spadek aktywności SphK2 i S1PP w części skroniowej istoty szarej pacjentów z ChA. Stwierdzono także obniżony poziom S1P w rejonie CA1 hipokampa oraz w dolnym zakręcie skroniowym istoty szarej i białej, który negatywnie korelował z postępem zmian neuropatologicznych wg klasyfikacji Braaka. Co więcej, zaobserwowano zależność pomiędzy genotypem ApoE a poziomem S1P w hipokampie. U nosicieli allelu ApoE ϵ 2 poziom S1P w hipokampie był 2,5 razy wyższy niż w tej samej strukturze mózgu u osób posiadających allel ApoE ϵ 4. Nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy poziomem S1P i A β [Couttas i wsp., 2014]. SphK2 wydaje się odgrywać niejednoznaczną rolę w ChA, gdyż Takasugi i wsp. zaobserwowali zwiększoną aktywność SphK2 w korze mózgu chorych na ChA [Takasugi i wsp., 2011]. Dodatkowo badania *in vitro* wykazały, że S1P syntetyzowany przez SphK2 przyłącza się do β -sekreazy i zwiększa jej aktywność proteolityczną, natomiast zwiększona ekspresja enzymów odpowiedzialnych za rozkład S1P (SPL lub S1PP) powoduje obniżenie poziomu CTF β i A β [Takasugi i wsp., 2011].

W przeciwieństwie do SphK2 badania wskazują na neuroprotekcyjny charakter SphK1 w toksyczności A β . W komórkach ludzkiej (SH-SY5Y) i mysiej (N2a)

neuroblastomy poddanych działaniu A β ₂₅₋₃₅ stwierdzono obniżony poziom SphK1, który skutkował obniżeniem poziomu S1P oraz wzrostem poziomu ceramidu, a w konsekwencji zwiększoną śmiertelnością komórek [Gomez-Bouchet i wsp., 2007; Yang i wsp., 2014]. Natomiast nadekspresja SphK1 i związany z tym wzrost poziomu S1P zwiększała żywotność komórek obu linii, a w komórkach N2a dodatkowo hamowała apoptozę oraz zapobiegała zmianom strukturalnym w mitochondriach [Gomez-Bouchet i wsp., 2007; Yang i wsp., 2014]. Ochronę przed apoptozą wywołaną przez rozpuszczalne oligomery A β ₁₋₄₀ stwierdzono także w hodowli szczurzych neuronów korowych traktowanych egzogennym S1P. Neuroprotektoryjne działanie S1P było związane z hamowaniem aktywności kwaśnej sfingomielinazy, która katalizuje rozkład sfingomieliny do proapoptotycznego ceramidu [Malaplate-Armand i wsp., 2006].

Zaburzony metabolizm/poziom S1P może wiązać się z zaburzoną fosforylacją białka Tau. W mózgach osób z ChA zwiększona fosforylacja białka Tau na Ser396/404 negatywnie korelowała z poziomem S1P [He i wsp., 2010]. Inaczej niż w materiale klinicznym, analiza hipokampa i kory mózgu myszy z wyciszonym genem dla SPL w neuronach wykazała, że akumulacja S1P prowadzi do wzrostu ufosforylowania białka Tau w miejscach istotnych w patomechanizmie ChA (Ser396/404, Ser262/356) [Alam i wsp., 2020].

Zaburzenia metabolizmu S1P zaobserwowano również w innych chorobach neurodegeneracyjnych. Badania post mortem mózgow chorych na chorobę Huntingtona (ChH) ujawniły znacząco zwiększoną ekspresję SPL w prążkowiu i korze mózgowej, (strukturach mózgu szczególnie dotkniętych patologicznymi zmianami w ChH), a także obniżoną ekspresję SphK1 w prążkowiu. Podobne zmiany poziomu enzymów metabolizujących S1P zaobserwowano w mysich modelach ChH [Di Pardo i wsp., 2017]. Zaburzona równowaga pomiędzy ekspresją SphK1 i SPL została stwierdzona również w jelicie cienkim mysiego modelu ChH, a wzrost poziomu SPL miał miejsce już na wczesnym etapie choroby [Di Pardo i wsp., 2020]. Farmakologiczna aktywacja SphK1 powodowała zmniejszenie agregatów zmutowanej huntingtyny (mHtt) i wzrost poziomu BDNF w prążkowiu i korze. Ponadto aktywowała AKT i ERK oraz prowadziła do wzrostu ekspresji S1PR1 i S1PR5 w prążkowiu [Di Pardo i wsp., 2019]. Pobudzenie SphK1 zapobiegało także dysfunkcjom ruchowym [Di Pardo i wsp., 2019] i miało korzystny wpływ na zachowanie homeostazy jelitowej [Di Pardo i wsp., 2020]. W przeciwieństwie do obniżonego poziomu SphK1 badania na szczurzym modelu ChH wykazały zwiększoną fosforylację/aktywność SphK2 w korze mózgu [Hait i wsp., 2007; Moruno-Manchon

i wsp., 2017]. Farmakologiczna inhibicja SphK2 łagodziła zmiany neurodegeneracyjne (uszkodzenia DNA, zmniejszona przeżywalność neuronów) wywołane przez mHtt w komórkowym modelu ChH. Powyższe dane wskazują na przeciwstawną rolę obu izoform w patomechanizmie ChH i podkreślają istotne znaczenie SphK2 jako mediatora neurotoksyczności w tej chorobie [Moruno-Manchon i wsp., 2017].

Badania surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona (ChP) wykazały obniżony poziom S1P, co wiązało się ze zwiększonymi zaburzeniami ruchowymi [Schwedhelm i wsp., 2021]. W mysim modelu ChP wywołanym podaniem 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydiny/1-metylo-4-fenylpirydiny (MPTP/MPP⁺) zaobserwowano obniżoną ekspresję *Sphk2* oraz poziom SphK2 w substancji czarnej mózgu, co wiązało się z zaburzonym funkcjonowaniem mitochondriów. Odnotowano obniżenie ekspresji genów kodujących białka biogenezy mitochondriów, takie jak PGC-1 α i jego białka efektorowe NRF-1 i TFAM. Stwierdzono także znacząco zredukowany poziom ATP, SOD2 oraz wzrost poziomu RFT [Sivasubramanian i wsp., 2015]. W tym samym mysim modelu ChP zaobserwowano także obniżenie poziomu mRNA, immunoreaktywności oraz aktywności SphK1 w śródmózgowiu [Motyl i wsp., 2018].

Badania przeprowadzone na transgenicznym modelu stwardnienia bocznego zanikowego (ang. amyotrophic lateral sclerosis, ALS), wykazały znacząco zwiększoną ekspresję *Spl* (mysi gen kodujący SPL) wraz ze znacznie obniżonym poziomem mRNA *S1pp2* w rdzeniu kręgowym [Gutner i wsp., 2019]. W rdzeniu kręgowym w innym zwierzęcym modelu ALS (myszy z nadekspresją zmutowanego genu dla dysmutazy ponadtlenkowej 1, SOD1^{G86R}) ekspresja *Spl* wykazywała wzrost, jednak nie był on znamieny statystycznie. Zaobserwowano natomiast korelację między poziomem mRNA genów kodujących niektóre enzymy metabolizujące S1P i siłą mięśni: pozytywną w przypadku S1PP2 i negatywną w przypadku SphK1 [Henriques i wsp., 2018].

1.3 Związki działające na receptory dla S1P

1.3.1 Fingolimod

Fingolimod (FTY720), syntetyczny analog sfingozyny, został odkryty w wyniku modyfikacji myriocyny – metabolitu wyizolowanego z grzyba *Isaria sinclairii* o właściwościach immunosupresyjnych [Fujita i wsp., 1994; Adachi i wsp., 1995].

Myriocyna jest silnym inhibitorem palmitoilotransferazy serynowej (ang. serine palmitoyltransferase, SPT) – enzymu katalizującego pierwszy etap syntezy ceramidu [Miyake i wsp., 1995]. Radykalne uproszczenie struktury myriocyny znacząco zmniejszyło toksyczność i zwiększyło aktywność immunosupresyjną FTY720 w porównaniu ze związkiem wyjściowym (jednocześnie pozbawiając zdolności do hamowania SPT) [Adachi i wsp., 1995; Kiuchi et al., 2000], co pozwoliło myśleć nad jego zastosowaniem w praktyce klinicznej. Pierwotnie FTY720 w połączeniu z cyklosporyną A był stosowany w profilaktyce odrzucania przeszczepu po transplantacji nerki [Troncoso i wsp., 1999; Budde i wsp., 2002; Mulgaonkar i wsp., 2006; Salvadori i wsp., 2006]. W 2010 Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration, FDA), a w 2011 Europejska Agencja Leków (ang. European Medicines Agency, EMA) dopuściły fingolimod do leczenia ustępująco-nawracającej postaci stwardnienia rozsianego (ang. relapsing remitting multiple sclerosis, RRMS) jako pierwszy doustny lek w tej chorobie [Sharma i wsp., 2011]. FTY720 jest prolekiem, który w wątrobie pod wpływem SphK2 ulega fosforylacji do aktywnego farmakologicznie fosforanu FTY720 (pFTY720) [Paugh i wsp., 2003; Zemann i wsp., 2006]. Ufosforylowany fingolimod przyłącza się do czterech z pięciu specyficznych dla S1P receptorów (S1PR1, S1PR3, S1PR4, S1PR5) obecnych na szerokim spektrum komórek (neurony, astrocyty, mikroglej, oligodendrocyty, komórki endotelialne bariery krew-mózg). Immunomodulująca właściwość fingolimodu wykorzystywana w terapii stwardnienia rozsianego (łac. sclerosis multiples, SM) opiera się na interakcji z S1PR1 znajdującymi się na powierzchni limfocytów T. Początkowo, pFTY720 aktywuje receptory S1PR1, których liczba na skutek długotrwałej ekspozycji na agonistę obniża się (jest to antagonizm funkcjonalny). To sprawia, że limfocyty nie reagują na podwyższone stężenie S1P, co zapobiega ich uwalnianiu z grasicy i wtórnych narządów limfatycznych do krążenia obwodowego (limfopenia obwodowa), a w konsekwencji zmniejsza ich przenikanie do OUN [Matloubian i wsp., 2004; Chiba, 2005; Chiba i wsp., 2006; Chun i Hartung, 2010; Ingwersen i wsp., 2012]. Nieufosforylowany fingolimod hamuje aktywację limfocytów T, co może być wynikiem hamowania cPLA2, wzrostu ekspresji czynnika transkrypcyjnego dla limfocytów T (ang. T cell factor 1, TCF-1) lub zwiększonej acetylacji histonu 3 na lizynie 9 (H3K9) w limfocytach [Ntranos et al., 2014; Mazzola i in., 2015; Baer i in., 2018]. Nieufosforylowany FTY720 hamuje również aktywność SPL, nie wpływając przy tym na ekspresję genu czy poziom białka [Bandhuvula i wsp., 2005; Berdyshev i wsp., 2011; Park i wsp., 2014].

Ze względu na wysoką lipofilność, FTY720 może przenikać przez barierę krew-mózg i działać bezpośrednio w OUN, gdzie ulega fosforylacji pod wpływem SphK2 i wiąże się z receptorami dla S1P rozmieszczonymi zarówno na neuronach, jak i komórkach glijowych [Foster i wsp., 2007; Hunter i wsp., 2016]. Ta właściwość fingolimodu stała się podstawą badań nad jego zastosowaniem w innych niż SM chorobach neurodegeneracyjnych.

Traktowanie fingolimodem pierwotnych mysich neuronów korowych w sposób zależny od stężenia zmniejszało produkcję $A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$. Z kolei podanie fingolimodu myszom z podwójną mutacją w genie dla APP (mutacja szwedzka i austriacka) spowodowało obniżenie poziomu $A\beta_{1-40}$, natomiast podwyższenie poziomu $A\beta_{1-42}$ w korze mózgu [Takasugi i wsp., 2013]. Zależny od dawki wpływ fingolimodu na poziom $A\beta$ zaobserwowano w korze przedczołowej myszy 5xFAD (myszy z 3 mutacjami w genie dla APP oraz 2 mutacjami w genie dla PSEN1), którym podawano następujące dawki: 0,03; 0,1; 0,3, 1 mg/kg masy ciała (m.c.)/dzień. Poziom rozpuszczalnego $A\beta_{1-40}$ ulegał istotnemu obniżeniu już przy dawce 0,3 mg/kg m.c./dzień, natomiast tylko najwyższa dawka skutkowała znaczącym zmniejszeniem poziomu nierozpuszczalnego $A\beta_{1-40}$ i nierozpuszczalnego $A\beta_{1-42}$ [Carreras i wsp., 2019]. W tym samym badaniu zaobserwowano zależne od dawki obniżenie immunoreaktywności aktywnego mikrogleju oraz niezależne od zastosowanej dawki obniżenie immunoreaktywności astrocytów. Ponadto zwierzęta, które otrzymały najniższą dawkę fingolimodu, wykazywały poprawę zdolności uczenia się oraz pamięci krótko- i długotrwałej [Carreras i wsp., 2019]. W modelu *in vitro* oraz *in vivo* neurotoksyczności wywołanej oligomerami $A\beta_{1-42}$, podanie fingolimodu zwiększało poziom BDNF [Doi i wsp., 2013; Fukumoto i wsp., 2014] oraz obniżało poziom TNF- α i cyklooksygenazy II – markerów zapalenia [Kolahdooz i wsp., 2015]. Co więcej, podanie fingolimodu łagodziło zaburzenia pamięci spowodowane przez oligomery oraz poprawiało zdolność uczenia się przestrzennego [Asle-Rousta i wsp., 2013b; Fukumoto i wsp., 2014]. Poprawę pamięci przestrzennej i zmniejszenie stanu zapalnego po podaniu fingolimodu zaobserwowano także u myszy 3xTg. W tym modelu ChA stwierdzono również obniżoną fosforylację białka Tau w pozycji Ser202/Thr205 w korze i hipokampie i obniżenie poziomu APP w korze [Fagan i wsp., 2022]. Ponadto fingolimod częściowo przywracał zaburzony metabolizm S1P wywołany oligomerami $A\beta_{1-42}$ lub mutacją londyńską w genie dla APP [Kolahdooz i wsp., 2015; Jęsko i wsp., 2019].

Wstęp

W modelu ChP wywołanym podaniem 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) fingolimod hamował apoptozę komórek, aktywował prożyciowe ścieżki AKT i ERK1/2 oraz zwiększał poziom BDNF. Zaobserwowano również zmniejszenie stanu zapalnego oraz obniżoną śmiertelność neuronów dopaminergicznych w substancji czarnej i prążkowie, co wiązało się ze zmniejszeniem zaburzeń ruchowych wywołanych przez 6-OHDA [Ren i wsp., 2017]. Podobne pozytywne efekty fingolimodu zaobserwowano u myszy poddanych działaniu MPTP [Motyl i wsp., 2018; Yao i wsp., 2019b, Pépin i wsp., 2020].

Podanie fingolimodu prowadziło do zmniejszenia agregatów mHtt w prążkowie i poprawiało aktywność neuronów korowych myszy R2/6 (genetyczny model ChH). Ponadto stwierdzono poprawę funkcji ruchowych, a także wzrost poziomu BDNF w korze i prążkowie oraz zwiększoną fosforylację AKT i ERK w prążkowie [Di Pardo i wsp., 2014]. Długotrwałe stosowanie fingolimodu w innym genetycznym modelu ChH (myszy R6/1) zwiększało plastyczność synaptyczną w hipokampie i łagodziło zaburzenia pamięci długotrwałej, co było skutkiem hamowania aktywacji astrocytów [Miguez i wsp., 2015]. Zależne od dawki opóźnienie występowania zaburzeń neurologicznych i wydłużenie długości życia, a także zależne od czasu podawania leku oraz badanej struktury (kora ruchowa, odcinek szyjny i odcinek lędźwiowy rdzenia kręgowego) zmiany w poziomie markerów zapalnych odnotowano u myszy $mSOD1^{G93A}$, zwierzęcego modelu ALS [Potenza i wsp., 2016].

Ze względu na występowanie receptorów dla S1P w wielu tkankach i narządach, zaobserwowano szereg działań niepożądanych fingolimodu, do których zaliczamy biegunkę, bóle pleców, podwyższony poziom aminotransferazy alaninowej (ALAT), zaburzenia wzroku (przede wszystkim obrzęk plamki żółtej, ale mogą się również pojawić krwawienia z siatkówki czy niedrożność żył siatkówki) [Mandal i wsp., 2017], podwyższone ciśnienie krwi, infekcje dolnych dróg oddechowych, duszności i kaszel. Większość z nich związana jest z działaniem fingolimodu na receptory dla S1P zlokalizowane w śródbłonku naczyniowym lub mięśniach gładkich [Cohen i Chun, 2011; Ontaneda i Cohen, 2011]. Najcięższe działania niepożądane, chociaż występujące stosunkowo rzadko, to bradykardia po podaniu pierwszej dawki i czasowy blok przedsionkowo-komorowy [Behjati i wsp., 2014]. W tym przypadku przyłączenie się fingolimodu do receptorów znajdujących się na miocytach przedsionkowych początkowo prowadzi do aktywacji cholinergicznym kanałów potasowych, wywołując napływ K^+ do komórki, hiperpolaryzację błony komórkowej, spadek pobudliwości komórkowej

i obniżenie kurczliwości. Desensytyzacja receptorów sprawia, że zjawisko to ulega samowygaszeniu. Sporną kwestią jest udział poszczególnych receptorów w obniżaniu częstości akcji serca. Choć badania z fingolimodem przeprowadzone na myszach wykazały istotny udział S1PR3 w wywoływaniu bradykardii [Forrest i wsp., 2004; Sanna i wsp., 2004], to nowsze badania, również z udziałem selektywnego agonisty receptorów S1PR1 i S1PR5, siponimodu, przeprowadzone na szczurach i ludziach wskazują na mechanizm zależny od S1PR1 [Fryer i wsp., 2012; Gergely i wsp., 2012].

1.3.2 Siponimod

W wyniku zmian strukturalnych w cząsteczce fingolimodu powstał siponimod (BAF312), selektywny modulator receptorów S1PR1 i S1PR5. Zastąpienie ugrupowania n-oktylowego strukturą benzyloksyoksymu zniosło aktywność względem S1PR3. Z kolei wykorzystanie kwasów aminokarboksylowych do odtworzenia obecnego w aktywnym metabolicie fingolimodu aminofosforanu sprawiło, że siponimod nie wymaga fosforylacji *in vivo* do aktywności farmakologicznej [Dumitrescu i wsp., 2019]. Siponimod został zatwierdzony w 2019 przez FDA i w 2020 przez EMA do leczenia wtórnie postępującej postaci SM (ang. secondary progressive multiple sclerosis, SPMS) [Kipp, 2020]. W przeciwieństwie do fingolimodu siponimod, zarówno w dawkach terapeutycznych, jak i supratherapeutycznych, nie wykazuje klinicznie istotnego potencjału arytmogennego, mierzonego wydłużeniem odcinka QT zapisu elektrokardiograficznego [Shakeri-Nejad i wsp., 2015]. W badaniach klinicznych trzeciej fazy siponimod znacząco zmniejszał atrofię zarówno całego mózgu, jak i istoty szarej oraz poprawiał integralność i mielinizację tkanki mózgowej [Arnold i wsp., 2022]. Badania na modelach eksperymentalnych SM wykazały, że niezależnie od obwodowych właściwości immunomodulujących siponimod zapobiega degeneracji synaptycznej [Gentile i wsp., 2016] i poprawia funkcjonalność sieci korowej [Hundehege i wsp., 2019]. Zastosowanie siponimodu w ludzkich indukowanych astrocytach poddanych działaniu cytokin prozapalnych pobudzało aktywację czynnika transkrypcyjnego Nrf2, kluczowego czynnika ochronnego w neurozapaleniu, a także hamowało translokację NF-κB. Siponimod zwiększał również ekspresję transporterów glutaminianu GLAST i GLT1 odpowiedzialnych za utrzymanie stężenia zewnątrzkomórkowego glutaminianu poniżej poziomu neurotoksyczności. W hodowli neuronów rdzeniowych, którym podano pożywkę pochodzącą od astrocytów poddanych działaniu cytokin prozapalnych, siponimod hamował neurodegenerację [Colombo i wsp., 2020]. Zastosowanie siponimodu w kokulturze komórek śródbłonna mikronaczyń mózgu

oraz astrocytów (*in vitro* model bariery krew-mózg) poddanych działaniu TNF- α i interferonu γ przywracało integralność bariery krew-mózg. Obserwowany efekt był związany przede wszystkim ze wzrostem ekspresji białek połączeń ścisłych (klaudyna-5 i Zo-1) i zależał od czasu inkubacji z siponimodem [Spampinato i wsp., 2021].

1.3.3 Ozanimod

Innym modulatorem S1PR1 i S1PR5 jest ozanimod (RPC1063). W 2020 został dopuszczony przez FDA i EMA do leczenia RRMS [McGinley i Cohen, 2021], a w 2021 do terapii wrzodziejącego zapalenia jelita grubego [Cohen i wsp., 2022]. Podobnie jak siponimod ozanimod nie powoduje istotnej klinicznie bradykardii oraz innych zaburzeń kardiologicznych [Tran i wsp., 2018]. W mysim modelu krwotoku śródmózgowego (ang. intracerebral hemorrhage, ICH) ozanimod zmniejszał obrzęk mózgu oraz poprawiał sprawność ruchową. Zaobserwowano również obniżenie śmiertelności neuronów, zmniejszenie przepuszczalności bariery krew-mózg oraz złagodzenie stanu zapalnego [Wang i wsp., 2022; Li i wsp., 2023]. Hamowanie odpowiedzi zapalnej przez ozanimod było związane z aktywacją sirtuiny 3 i następczym hamowaniem jej białek efektorowych: NF- κ B i inflamasomu AIM2 [Li i wsp., 2023].

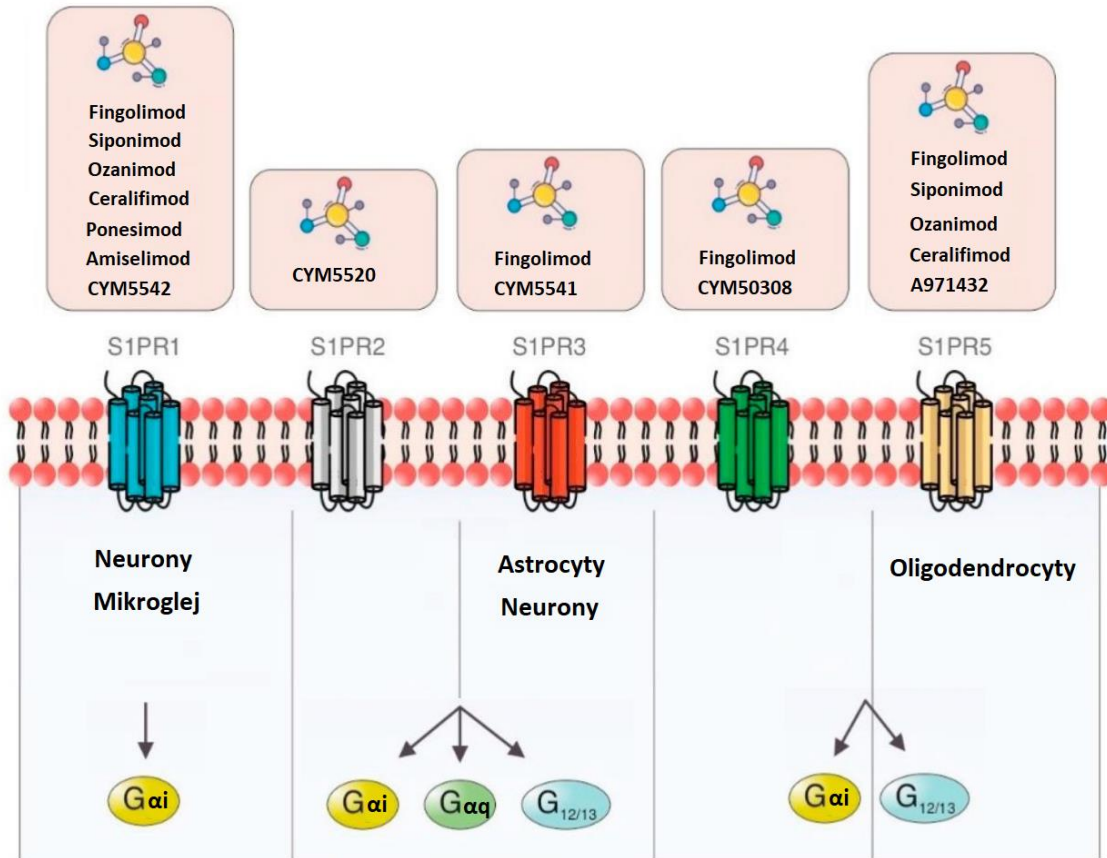
1.3.4 Ponesimod

Ostatnim, jak dotąd, zarejestrowanym lekiem, który oddziałuje poprzez receptory dla S1P, jest ponesimod (ACT-128800). W 2021 został dopuszczony przez FDA i EMA do leczenia nawracających aktywnych form SM. Podobnie jak w przypadku siponimodu i ozanimodu, odpowiedni schemat zwiększania dawki minimalizuje kardiologiczny efekt pierwszej dawki, dzięki czemu monitorowanie układu sercowo-naczyniowego na początku terapii nie jest konieczne. Tym co wyróżnia ponesimod w porównaniu do wcześniej omówionych modulatorów jest selektywność wobec S1PR1 oraz krótki okres półtrwania, co pozwala na szybkie zakończenie działania immunosupresyjnego [Ruggieri i wsp., 2022]. Zastosowanie ponesimodu w eksperymentalnych modelach krwawienia podpajęczynówkowego (ang. subarachnoid hemorrhage, SAH) zapobiegało śmierci neuronów we wczesnej fazie urazu mózgu (ang. early brain injury, EBI). Było to skutkiem hamowania polaryzacji reaktywnych astrocytów do prozapalnego podtypu A1, który jest odpowiedzialny za degradację tkanki nerwowej [Zhang i wsp., 2021]. Badanie na mysim modelu demielinizacji wywołanej kuprizonem wykazało, że długotrwałe podawanie ponesimodu może selektywnie (w zakręcie obręczy, ale nie w ciele modzelowatym)

hamować demielinizację i promować remielinizację. Prawdopodobnie jest to związane ze wzrostem liczby oligodendrocytów z jednoczesnym obniżeniem aktywności mikrogleju [Kihara i wsp., 2022]. Natomiast w modelu *in vitro* demielinizacji wywołanej przez kuprizon zastosowanie ponesimodu wraz z medium kondycjonowanym pochodzącym z hodowli komórek macierzystych nabłonka owodni prowadziło do zmniejszenia apoptozy (obniżony poziom BAX, kaspazy 3 i kaspazy 8 oraz wzrost poziomu Bcl2) szczyrzych oligodendrocytów [Safaeinejad i wsp., 2021].

1.3.5 Pozostałe związki

Oprócz wspomnianych wyżej leków w badaniach stosowane są również inne agonisty receptorów dla S1P, z których większość wykazuje selektywne działanie wobec wybranego receptora. Są to, m.in.: amiselimod, CYM5542 (S1PR1), CYM5520 (S1PR2), CYM5541 (S1PR3), CYM50308 (S1PR4), A971432 (S1PR5) i ceralifimod (S1PR1,5) [Bravo i wsp., 2022] (**ryc. 9**).



Rycina 9. Receptory dla sfingozyno-1-fosforanu (S1P) – wybrane modulatory, najwyższa ekspresja w OUN oraz białka G, z którymi są sprzężone. Zmodyfikowano wg Bravo i wsp. (2022).

Objaśnienia skrótów: S1PR1-5 – receptory 1-5 dla sfingozyno-1-fosforanu

2. Cele pracy

2.1 Cel ogólny

Celem rozprawy było zbadanie wpływu modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu na zmiany na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym wybranych białek zaangażowanych w: przekazywanie synaptyczne, apoptozę, proces zapalny oraz ścieżkę prożyciową zależną od kinazy AKT w doświadczalnych modelach choroby Alzheimera.

2.2 Cele szczegółowe

Realizacja celu badań w modelu zwierzęcym ChA (myszy szczepu FVB-Tg transfekowane ludzkim zmutowanym genem dla APP) obejmowała sprawdzenie wpływu mutacji w genie dla APP w dwóch grupach wiekowych oraz ocenę działania nieselektywnego modulatora S1PR, fingolimodu, na:

- poziom mRNA i immunoreaktywność białek presynaptycznych w hipokampie i korze mózgu,
- poziom mRNA i zmiany w poziomie ufosforylowania kinazy AKT i jej białek efektorowych (GSK-3 β , BAD) w hipokampie i korze mózgu,
- poziom mRNA genu kodującego białko Tau oraz zmiany w ufosforylowaniu tego białka w hipokampie i korze mózgu.

Realizacja celu rozprawy w modelach komórkowych ChA (komórki linii HT22 i BV2 traktowane oligomerami amyloidu β /A β) obejmowała sprawdzenie wpływu A β oraz weryfikację działania selektywnych agonistów receptorów dla S1P (ponesimod, CYM5541, CYM50308, A971432, siponimod) i nieselektywnego modulatora receptorów S1PR(1,3-5) (ufosforylowany fingolimod) na:

- żywotność komórek, potencjał błony mitochondrialnej oraz poziom wolnych rodników,
- ekspresję genów kodujących receptory dla S1P, białka pro- i antyapoptotyczne oraz cytokiny prozapalne.

3. Materiały i metody

3.1 Model *in vivo*

W eksperymentach *in vivo* wykorzystano transgeniczne myszy szczepu FVB-Tg (APP LD2/B6) pochodzące z hodowli prowadzonej przez zwierzętarnię Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Myszy te charakteryzują się występowaniem tzw. mutacji londyńskiej w genie kodującym APP w okolicach miejsca cięcia przez γ -sekretazę (zamiana waliny na izoleucynę w pozycji 717 łańcucha białkowego, V717I), co prowadzi do zaburzeń procesu proteolizy APP oraz zwiększonego stężenia i akumulacji A β w mózgu [Moechars i wsp., 1999, Van Dorpe i wsp., 2000]. W doświadczeniach wykorzystano osobniki żeńskie. Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (uchwała nr 67/2015) oraz zgodę Ministra Środowiska (nr 139 z dnia 22.08.2016) na zamknięte użycie organizmów genetycznie modyfikowanych. Myszy były hodowane w warunkach stabilnej temperatury i wilgotności, z 12-godzinnym cyklem dnia/nocy. Zwierzętom zapewniono swobodny dostęp do wody i paszy.

3- i 12-miesięczne myszy z mutacją w genie APP (APP⁺) oraz bez odziedziczonego transgenu (APP⁻) otrzymywały dootrzewnowo przez okres 2 tygodni FTY720 (Cayman Biochemicals, Ann Arbor, Michigan, USA; nr kat. 11975) w dawce 1 mg/kg m.c., która została wybrana na podstawie analizy danych literaturowych (Potenza i wsp., 2016; Becker-Krail i wsp., 2017; Gol i wsp., 2017). Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały rozpuszczalnik (0,9% NaCl). Po przeprowadzonych doświadczeniach myszy dekapitowano, a wybrane struktury mózgu, tj. korę i hipokamp, izolowano na lodzie do dalszych analiz.

3.2 Modele *in vitro*

3.2.1 Komórki linii HT22

HT22 jest nieśmiertelną linią mysich komórek hipokampa, pochodną linii HT4, która oryginalnie powstała w wyniku nieśmiertelnienia pierwotnych hodowli mysich neuronów hipokampa [Klenke i wsp., 2020] poprzez inkubację z onkogenem wrażliwym na temperaturę. W temperaturze 39°C działanie wspomnianego onkogenu zostaje wyeliminowane, natomiast komórki zachowują charakterystyczne cechy zróżnicowanych neuronów [Frederik i McKay, 1988]. Komórki tej linii nie wykazują ekspresji receptorów

cholinergicznym ani glutaminergicznym [He i wsp., 2013]. Komórki były hodowane w pożywce Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. D5796) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (ang. fetal bovine serum, FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. F2442) inaktywowanej w 56°C, 2 mM L-glutaminy (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. G7513) oraz antybiotyków (50 jednostek/ml penicyliny, 50 µg/ml streptomycyny) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. P433). Hodowlę prowadzono w standardowych warunkach (5% CO₂, 37°C) na sterylnych plastikowych szalkach lub płytkach (Falcon, Durham, Północna Karolina, USA). Morfologię komórek obserwowano w mikroskopie świetlnym Olympus CKX41 (Olympus, Tokio, Japonia).

3.2.2 Komórki linii BV2

BV2 jest mysią (szczep C57/BL6) linią komórek mikrogleju powstałą w wyniku unieśmiertelnienia za pomocą retrowirusa J2 przenoszącego onkogeny v-raf/v-myc. BV2 wykazuje ekspresję jądrowych produktów onkogeny v-myc i cytoplazmatycznych produktów onkogeny v-raf, jak również ekspresję antygenu env gp70 na powierzchni. Linia komórkowa BV2 zachowuje cechy morfologiczne i funkcjonalne mikrogleju. Komórki były hodowane w pożywce Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. R8758) z dodatkiem 10% FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. F2442) inaktywowanej w 56°C oraz antybiotyków (50 jednostek/ml penicyliny, 50 µg/ml streptomycyny) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. P433). Hodowlę prowadzono w standardowych warunkach (5% CO₂, 37°C) na sterylnych plastikowych szalkach lub płytkach (Falcon, Durham, Północna Karolina, USA). Morfologię komórek obserwowano w mikroskopie świetlnym Olympus CKX41 (Olympus, Tokio, Japonia).

3.2.3 Komórkowy model toksyczności oligomerów Aβ

W eksperymentach wykorzystano komórki pomiędzy 7 i 19 pasażem (linia HT22) oraz pomiędzy 8 i 14 (linia BV2). Komórki HT22 wysiewano z gęstością 7,5 x 10⁴/1 ml pożywki, natomiast komórki BV2 – z gęstością 1,5 x 10⁵/1 ml pożywki (dokładna liczba komórek wysiewana na poszczególne szalki/płytki została podana w **tabeli 1.**). Komórki liczono za pomocą automatycznego licznika komórek (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA). 24 godziny po wysianiu odciągano medium hodowlane, dodawano świeżo przygotowane oligomery Aβ (Aβ₀) w stężeniu końcowym 1 µM zawieszony

w pożywce Neurobasal-A bez czerwieni fenolowej (Life Technologies Corporation, Grand Island, Nowy Jork, USA; nr kat. 12349-015) z 2% dodatkiem suplementu B27 (Life Technologies Corporation, Grand Island, Nowy Jork, USA; nr kat. 17504-044) i poddawano komórki 24-godzinnej inkubacji. Stężenie amyloidu zostało wybrane na podstawie danych literaturowych (Cieślik i wsp., 2015; Czapski i wsp., 2018; Cieślik i wsp., 2020).

Tabela 1. Liczba komórek wysiewana na poszczególne szalki/płytki

	HT22	BV2
szalka 10 cm	7,5 x 10 ⁵ /10 ml	-----
szalka 6 cm	3,0 x 10 ⁵ /4 ml	6,0 x 10 ⁵ /4 ml
1 dołek – płytka 6-dołkowa	-----	3,0 x 10 ⁵ /2 ml
1 dołek – płytka 96-dołkowa	7,5 x 10 ³ /100 µl	1,5 x 10 ⁴ /100 µl

3.2.3.1 Przygotowanie A β

W badaniach wykorzystano bardziej toksyczną i podatną na agregację izoformę A β ₁₋₄₂. A β przygotowywano zgodnie z metodą opisaną przez Stine'a i wsp. [2003]. 1 mg peptydu A β ₁₋₄₂ (rPeptide, Watkinsville, Georgia, USA; nr kat. A-1163-2) rozpuszczano w 44,3 µl bezwodnego dimetylosulfotlenku (ang. dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. D2650). Następnie 5 mM roztwór A β ₁₋₄₂ rozcieńczano w zimnej pożywce Ham's F12 niezawierającej czerwieni fenolowej (PAN Bio-tech, Aidenbach, Niemcy; nr kat. P04-14559) do stężenia 100 µM, worteksowano przez 30 sekund i inkubowano w temperaturze 4°C przez 24 godziny.

3.2.4 Charakterystyka związków stosowanych w modelach *in vitro*

W badaniach stosowano poniżej wymienione związki, których stężenia zostały wybrane na podstawie dostępnej literatury. Wszystkie związki dodawano do komórek jednocześnie z A β . Działanie badanych związków w obecności A β porównywano do komórek traktowanych wyłącznie A β .

Ufosforylowany fingolimod (pFTY720) (Cayman Biochemicals, Ann Arbor, Michigan, USA; nr kat. 10008639) – agonista receptorów S1PR1, S1PR3, S1PR4, S1PR5; rozpuszczany w równoobjętościowej mieszaninie DMSO i chloroformu, stosowany w stężeniu końcowym 1 nM.

Siponimod (BAF312) (Cayman Biochemicals, Ann Arbor, Michigan, USA; nr kat. 22057) – agonista receptorów S1PR1 i S1PR5; rozpuszczany w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 100 nM.

Ponesimod (Cayman Biochemicals, Ann Arbor, Michigan, USA, nr kat. 22053) – agonista receptora S1PR1; rozpuszczany w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 100 nM.

CYM5541 (Cayman Biochemicals, Ann Arbor, Michigan, USA; nr kat. 15190) – agonista receptora S1PR3; rozpuszczany w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 1 μ M.

CYM50308 (Cayman Biochemicals, Ann Arbor, Michigan, USA; nr kat. 14667) – agonista receptora S1PR4; rozpuszczany w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 100 nM.

A971432 (Cayman Biochemicals, Ann Arbor, Michigan, USA; nr kat. 25326) – agonista receptora S1PR5; rozpuszczany w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 100 nM.

3.3 Metody spektrofotometryczne

3.3.1 Badanie żywotności komórek za pomocą testu MTT

Podstawą kolorymetrycznego testu MTT [Mosmann, 1983] jest zdolność mitochondrialnego enzymu, dehydrogenazy bursztynianowej, do przekształcania żółtej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej, bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego (MTT), do nierozpuszczalnego w wodzie (ale rozpuszczalnego w rozpuszczalnikach organicznych) formazanu o barwie fioletowej. Powyższa reakcja może zachodzić tylko w żywych i aktywnych metabolicznie komórkach, a stężenie formazanu jest proporcjonalne do żywotności komórek w hodowli.

Komórki wysiewano na przezroczystą płytkę 96-dołkową. Następnego dnia pożywkę hodowlaną wymieniano na medium do traktowania (Neurobasal-A z 2% dodatkiem suplementu B27), w którym podawano A β o i badane związki. Po upływie 24 godzin usuwano medium do traktowania, dodawano przygotowany w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (ang. phosphate buffered saline, PBS) roztwór MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. M5655) o stężeniu końcowym 0,25 mg/ml i inkubowano w 37°C przez 2 godziny. Następnie usuwano roztwór MTT i w celu rozpuszczenia kryształów formazanu dodawano 100 μ l DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis,

Missouri, USA; nr kat. D8418), po czym mierzono absorbancję przy $\lambda = 595$ nm za pomocą spektrofotometru Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.3.2 Oznaczanie poziomu białka metodą BCA

Do oznaczania poziomu białka wykorzystywano zestaw BCA Protein Assay Kit Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, nr kat. 23227). Podstawą oznaczeń jest zdolność białek do redukcji kationów Cu^{2+} do Cu^+ oraz zdolność tych ostatnich do tworzenia barwnych kompleksów z kwasem bicinchoninowym (ang. bicinchoninic acid, BCA) o maksimum absorbancji przy $\lambda = 562$ nm. Absorbancja kompleksów jest wprost proporcjonalna do zawartości jonów Cu^+ , co z kolei zależy od ilości białka w badanej próbce [Smith i wsp., 1985].

Próbki białka rozcieńczano 5-krotnie i 10 μl standardu lub badanej próby nanoszono na dołek na przezroczystej płytce 96-dołkowej w 3 powtórzeniach. Następnie do każdego dołka dodawano 80 μl odczynnika do oznaczeń BCA Working Reagent (przygotowanego przez zmieszanie odczynników „A” i „B” w stosunku 50:1). Po 30-minutowej inkubacji w temperaturze 37°C mierzono absorbancję przy $\lambda = 562$ nm za pomocą spektrofotometru Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zawartość białka obliczano na podstawie krzywej wzorcowej wykreślonej na podstawie wartości absorbancji roztworów wzorcowych albuminy surowicy bydlęcej (ang. bovine serum albumine, BSA) o stężeniach 0,025 – 2 mg/ml.

3.4 Metody fluorymetryczne

3.4.1 Oznaczanie poziomu wolnych rodników metodą DCF

Podstawą oznaczania poziomu wolnych rodników jest reakcja wewnątrzkomórkowej deacetylacji niewykazującego fluorescencji dioctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H2DCF-DA) do 2',7'-dichlorodihydrofluorescyny (ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, H2DCF), która następnie ulega utlenieniu przez wolne rodniki do silnie fluorescencyjnej 2',7'-dichlorofluoresceiny (ang. 2',7'-dichlorofluorescein, DCF) [Royall i Ischiropoulos, 1993]. Komórki wysiewano na 96-dołkowe czarne płytki z przezroczystym dnem. Następnego dnia pożywkę hodowlaną wymieniano na medium do traktowania, w którym podawano oligomery $\text{A}\beta$ i badane związki. Po 24 godzinach medium do traktowania zastępowano 10 μM roztworem H2DCF-DA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr

kat. D6883) w buforze Hanksa (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. H8264) i inkubowano w 37°C przez 50 minut bez dostępu światła. Fluorescencję mierzono przy użyciu spektrofluorymetru TECAN M100 PRO (Bioz, Los Altos, Kalifornia, USA) przy $\lambda_{\text{pobudzenia}} = 488 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{emisji}} = 525 \text{ nm}$. Otrzymane wyniki fluorescencji przeliczano na wartości absorbancji uzyskane z wykonywanego równolegle testu MTT.

3.4.2 Oznaczanie potencjału błony mitochondrialnej

Do oznaczenia potencjału błony mitochondrialnej (MMP) wykorzystano zestaw JC-10 Assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. MAK159). Podstawą metody jest reakcja agregacji kationowego, lipofilnego barwnika JC-10, który jest lepiej rozpuszczalny w wodzie pochodną jodku 1,1',3,3'-tetraetylo-5,5',6,6'-tetrachloroimidokarbocyaniny (JC-1) [Nuydens i wsp., 1999]. Selektowna akumulacja JC-10 w mitochondriach zależy od MMP. W komórkach ze spolaryzowaną błoną mitochondrialną barwnik tworzy w mitochondrium agregaty o czerwonej fluorescencji, natomiast w komórkach apoptotycznych spadek MMP prowadzi do przejścia barwnika do cytoplazmy i powrotu do formy monomerycznej o zielonej fluorescencji. Stosunek fluorescencji agregatów (czerwone) do fluorescencji monomerów (zielone) jest miarą poziomu uszkodzenia błony mitochondrialnej.

Komórki wysiewano na 96-dółkowe czarne płytki z przezroczystym dnem. Następnego dnia pożywkę hodowlaną wymieniano na medium do traktowania, w którym podawano oligomery A β i badane związki. Po 24 godzinach odciągano medium i na każdy dołek dodawano po 50 μl JC-10 Dye Loading Solution (sporządzonego przez zmieszanie odczynnika JC-10 x 100 i buforu A w stosunku 1:100) i inkubowano w 37°C przez 60 minut bez dostępu światła. Po inkubacji na każdy dołek dodawano po 50 μl buforu B, po czym mierzono fluorescencję przy użyciu spektrofluorymetru TECAN M100 PRO (Bioz, Los Altos, Kalifornia, USA) przy $\lambda_{\text{pobudzenia}} = 540 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{emisji}} = 590 \text{ nm}$ (czerwona fluorescencja) oraz $\lambda_{\text{pobudzenia}} = 490 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{emisji}} = 525 \text{ nm}$ (zielona fluorescencja).

3.5 Analiza ekspresji genów

3.5.1 Izolacja RNA i trawienie DNA

Tkanek zwierzęcą oraz komórki zebrane z szalek o średnicy 6 cm (linia HT22) lub z płytek 6-dółkowych (linia BV2), przepłukane dwukrotnie 2 ml zimnego buforu PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. D8537) zawieszano w 1 ml odczynnika

TRI-reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA nr kat. AM9738) w wolnych od RNaz i DNaz probówkach typu Eppendorf. Następnie homogenizowano za pomocą strzykawki z igłą o średnicy 0,6 mm (20 pociągnięć), po czym inkubowano w temperaturze pokojowej (ang. room temperature, RT) przez 5 minut. Do 1 ml homogenatu dodawano 200 µl chloroformu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. 288306) i energicznie wytrząsano przez 15 sekund. Po 5-minutowej inkubacji w RT próbki wirowano (12 000 x g, 15 minut, 4°C). Fazę górną (wodną) zawierającą RNA przenoszono do nowych probówek i w celu wytrącenia RNA dodawano 0,5 ml zimnego izopropanolu, mieszano, inkubowano przez 5 minut w RT i wirowano (12 000 x g, 10 minut, 4°C). Osad przemywano trzykrotnie 1 ml 75% etanolu. Po kilkuminutowym osuszeniu próbek, osad RNA zawieszano w 20 µl wody zawierającej 0,1% dietylopirowęgla (ang. diethyl pyrocarbonate, DEPC), który jest inaktywatorem RNaz (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA nr kat. 46-2224).

Stężenie i czystość otrzymanego RNA oznaczano spektrofotometrycznie w aparacie NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), mierząc gęstość optyczną (ang. optical density, OD) przy długości fali 260 nm (RNA) oraz 280 nm (białka i DNA). Iloraz OD₂₆₀/OD₂₈₀ dla materiału stosowanego do badań wynosił od 1,7 do 2,0. W celu oczyszczenia wyizolowanego mRNA z pozostałości DNA, do nowych probówek przenoszono objętość zawierającą 1 µg czystego mRNA i uzupełniano odczynnikami do trawienia DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. AMPD1) do objętości 10 µl. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 15 minut w temperaturze 25°C. Następnie dodawano 1 µl odczynnika zatrzymującego reakcję (Stop solution) i dalej prowadzono inkubację przez 10 minut w temperaturze 70°C. Po zakończeniu reakcji próbki przenoszono do lodu.

3.5.2 Odwrotna transkrypcja

Oczyszczony z pozostałości DNA mRNA (1 µg) był poddawany reakcji odwrotnej transkrypcji, której celem było uzyskanie DNA komplementarnego do mRNA (ang. complementary DNA, cDNA). Reakcję syntezy cDNA (skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w **tabeli 2.**) przeprowadzano z użyciem zestawu odczynników High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA, nr kat. 4368814) oraz inhibitora RNaz (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA, nr kat. N8080119) w termocyklerze SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) w następujących warunkach: 10 minut w 25°C,

120 minut w 37°C, 5 minut w 85°C. Otrzymane cDNA rozcieńczano 5-krotnie wodą wolną od RNaz (wyjątkowo do zbadania ekspresji *Il1b*, *Il6* i *Tnf* w linii komórkowej HT22 oraz ekspresji *Slpr3* w obu liniach komórkowych wykorzystano nierozcieńczony cDNA).

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej używanej do reakcji odwrotnej transkrypcji.

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Objętość [μ l]
10 \times RT Buffer (bufor do odwrotnej transkrypcji)	2,0
25 \times dNTP Mix (100mM) (deoksyrybonukleotydy)	0,8
10 \times RT Random Primers (startery)	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (odwrotna transkryptaza)	1,0
RNase inhibitor (inhibitor RNaz)	1,0
H ₂ O (woda wolna od RNaz)	2,2
mRNA (matryca)	11,0
Całkowita objętość	20,0

3.5.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)

Poziom mRNA genów kodujących białka wymienione w **tabeli 3**. oznaczano metodą real-time PCR, wykorzystując TaqMan Gene Expression Assay (mieszanina nieznakowanych starterów oraz fluorescencyjnej sondy Taqman) oraz TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (mieszanina zawierająca, m.in. deoksyrybonukleotydy i polimerazę DNA) (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA, nr kat. 4444557). Do reakcji używano 4,5 μ l matrycy cDNA, 0,5 μ l TaqMan Gene Expression Assay i 5,0 μ l TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (łączna objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10,0 μ l). Reakcje dla wszystkich badanych genów przeprowadzano na płytkach 96-dołkowych MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA, nr kat. 4346907), a każdą próbkę cDNA amplifikowano w 3 powtórzeniach. Real-time PCR wykonywano przy pomocy aparatu ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA), stosując następujące warunki: 20 minut aktywacji polimerazy w 95°C, 3 minuty denaturacji w 95°C, 40 cykli (30 sekund każdy) przyłączania w 60°C. Poziom mRNA wyrażano jako względny stosunek próbki badanej do próbki referencyjnej (kalibratora), po uprzedniej normalizacji obydwu względem genu referencyjnego (*Actb* w przypadku analiz wykonywanych na tkance i komórkach linii HT22 oraz *Gusb* w przypadku analiz

wykonywanych na linii komórkowej BV2). Względny poziom mRNA obliczano, stosując metodę $\Delta\Delta C_t$ [Livak i Schmittgen, 2001]. Wyniki analizy przedstawiano jako % kontroli.

Tabela 3. Sondy Taqman zastosowane w reakcjach real-time PCR

Symbol genu	Kodowane białko	Nr identyfikacyjny
<i>Cplx1</i>	kompleksyna 1/CPLX1 (ang. complexin 1)	Mm01198853_m1
<i>Nrxn1</i>	neureksyna 1/NRXN1 (ang. neurexin 1)	Mm00660298_m1
<i>Snap25</i>	białko związane z synaptosomem, 25 kDa/SNAP-25 (ang. synaptosomal-associated protein, 25 kDa)	Mm01276449_m1
<i>Stx1a</i>	syntaksyna 1a/STX1A (ang. syntaxin 1a)	Mm00444008_m1
<i>Syn1</i>	synapsyna 1/SYN1	Mm00449772_m1
<i>Syp</i>	synaptofizyna/SYP (ang. synaptophysin)	Mm00436850_m1
<i>Syt1</i>	synaptotagmina 1/SYT1	Mm00436858_m1
<i>Vamp1</i>	synaptobrewina 1/białko 1 związane z błoną pęcherzyka (ang. vesicle-associated membrane protein 1)	Mm01185107_g1
<i>S1pr1</i>	receptor 1 dla S1P/S1PR1	Mm02619656_s1
<i>S1pr3</i>	receptor 3 dla S1P/S1PR3	Mm02620181_s1
<i>S1pr4</i>	receptor 4 dla S1P/S1PR4	Mm00468695_s1
<i>S1pr5</i>	receptor 5 dla S1P/S1PR5	Mm02620565_s1
<i>Bad</i>	związany z Bcl2 agonista śmierci komórkowej/BAD (ang. Bcl2-associated agonist of cell death)	Mm00432042_m1
<i>Bax</i>	związane z Bcl2 białko X/BAX (ang. Bcl2-associated X protein)	Mm00432051_m1
<i>Bcl2</i>	Bcl2	Mm00477631_m1
<i>Bcl2l1</i>	Bcl-XL (ang. Bcl2-like 1)	Mm00437783_m1
<i>Tnf</i>	czynnik martwicy nowotworów α /TNF- α (ang. tumor necrosis factor α)	Mm00443258_m1
<i>Il1b</i>	interleukina 1 β /IL-1 β	Mm01336189_m1
<i>Il6</i>	interleukina 6/IL-6	Mm00446190_m1
<i>Il18</i>	interleukina 18/IL-18	Mm00434225_m1

Symbol genu	Kodowane białko	Nr identyfikacyjny
<i>Akt1</i>	kinaza białkowa B (PKB)/AKT (ang. protein kinase B)	Mm01331626_m1
<i>Gsk3b</i>	kinaza syntazy glikogenu 3 β /GSK-3 β (ang. glycogen synthase kinase-3 β)	Mm00444911_m1
<i>Mapt</i>	białko Tau związane z mikrotubulami/Tau (ang. microtubule associated protein Tau)	Mm00521988_m1
<i>Gusb</i>	β -glukuronidaza/GUSB (ang. β -glucuronidase)	Mm01197698_m1
<i>Actb</i>	β -aktyna/ACTB (ang. β -actin)	nr kat. 4352341E

3.6 Immunodetekcja białek metodą Western Blot (WB)

3.6.1 Przygotowanie materiału do analizy

Mrożoną tkankę rozdrabniano i mieszano z komercyjnym buforem do lizy T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, nr kat. 78510) w proporcji 20 μ l buforu na 1 mg tkanki. Bezpośrednio przed użyciem do buforu dodawano mieszaninę inhibitorów proteaz i fosfataz (1:100) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, nr kat. 78440). Tkanke homogenizowano za pomocą strzykawki z igłą o średnicy 0,6 mm (20 pociągnięć) i igłą o średnicy 0,4 mm (10 pociągnięć). Zhomogenizowane próbki poddawano krótkiej (15-sekundowej) sonikacji na lodzie i wirowano (10 000 x g, 5 minut, 4°C). Nadsącz zawierający białko przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf i oznaczano zawartość białka metodą BCA zgodnie z protokołem załączonym przez producenta (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, nr. kat. 23227). Następnie do homogenatu dodawano bufor obciążająco-barwiący (Bufor Laemmli 5x) o składzie podanym w **tabeli 4.** w proporcji objętościowej homogenatu do buforu 3:2 i denaturowano przez 5 minut w temperaturze 95°C.

Tabela 4. Skład buforu Laemmli 5x

Składnik	Stężenie
Tris HCl pH 6,8	156,25 mM
Glicerol	50%
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	5%
Błękit bromofenolowy	0,5%
Ditiotreitol (DTT)	250 mM

3.6.2 Rozdział elektroforetyczny i transfer białek

Rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzono metodą SDS-PAGE (ang. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS o gęstości 10% lub 15%, zależnej od masy badanego białka (**tabela 5.**). Na żel nakładano próbki w ilości 30-50 µg oraz 5 µl markera Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA; nr kat. 1610374) w celu identyfikacji masy cząsteczkowej prążków uzyskanych po rozdziale. Elektroforezę prowadzono w buforze o składzie podanym w **tabeli 5.** w aparacie Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA) przy stałym napięciu 100 V.

Następnie przeprowadzono mokry transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową o średnicy oczek 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA; nr kat. 1620115) w buforze do transferu (**tabela 5.**) w stałych warunkach (napięcie 50 V, 2 godziny). W celu sprawdzenia wydajności transferu membrany barwiono 0,1% roztworem Ponceau S w 5% kwasie octowym (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; nr kat. 141194).

3.6.3 Immunodetekcja białek

Aby zablokować miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał, membranę z białkami poddawano inkubacji (1 h, RT) w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w buforze TBS-T (ang. tris-buffered saline with Tween 20) o składzie przedstawionym w **tabeli 5.** Gdy roztwór, w którym przygotowywano przeciwciało pierwszorzędowe był inny niż roztwór blokujący, inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym poprzedzało płukanie membrany w TBS-T (3 razy po 5 minut). Następnie membranę inkubowano (noc, 4°C) z odpowiednio przygotowanym przeciwciałem pierwszorzędowym (**tabela 6.**). Kolejnego dnia membranę płukano trzykrotnie po 5 minut w TBS-T i inkubowano (1h, RT) z odpowiednim (anty-mysie lub anty-królicze) przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z peroksydazą chrzanową (ang. horseradish peroxidase, HRP) w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-T. W celu usunięcia niezwiązanych specyficznie przeciwciał membranę płukano trzykrotnie po 5 minut w TBS-T. W ostatnim etapie membranę poddawano reakcji chemiluminescencyjnej za pomocą Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA; nr kat. 1705061). Membrany wykorzystane uprzednio inkubowano 30 minut w buforze do strippingu (**tabela 5.**) w celu

odmycia związanych przeciwciał i płukano trzykrotnie po 5 minut w TBS-T, po czym używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych.

Chemiluminescencję mierzono za pomocą aparatu Fusion FX6 (Vilber, Collégien, Francja) lub naświetlając światłoczuły film (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy; nr kat. 11 666 916 001). Analizę densytometryczną przeprowadzono w programie TotalLab v1.11 (TotalLab Ltd., Gosforth, Wielka Brytania). Wyniki przedstawiano jako iloraz sygnału badanego białka do białka referencyjnego, którym była dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH).

Tabela 5. Skład żeli i buforów używanych do WB

Żel zagęszczający 4%	4% akrylamid/bisakrylamid; 125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,1% SDS; 0,1% TEMED; 0,5% nadsiarazan amonu
Żel rozdzielający 10%	10% akrylamid/bisakrylamid; 375 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,1% SDS; 0,05% TEMED; 0,5% nadsiarazan amonu
Żel rozdzielający 15%	15% akrylamid/bisakrylamid; 375 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,1% SDS; 0,05% TEMED; 0,5% nadsiarazan amonu
Bufor do elektroforezy (TGS 1x)	25 mM Tris; 192 mM glicyna; 0,6% SDS (pH 8,3)
Bufor do transferu (bufor C 1x)	10 mM NaHCO ₃ ; 3 mM NaCO ₃ ; 20% metanol (pH 9,9)
Bufor TBS-T 1x	20 mM Tris-HCl; 500 mM NaCl; 0,1% Tween [®] 20 (pH 7,6)
Bufor do strippingu	1% SDS; 50 mM glicyna-HCl (pH 2,0)

Tabela 6. Warunki immunodetekcji dla poszczególnych białek

Oznaczane białko	Gęstość żelu	Przeciwciało I-rzędowe (rozcieńczenie, producent, nr kat.)	Przeciwciało II-rzędowe (rozcieńczenie, producent, nr kat.)
SYP	10%	1:750 w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology; sc-5507)	anty-mysie, 1:4000 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102)
SYT1	10%	1:1000 w 5% BSA w TBS-T (Cell Signaling; 3347)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
SNAP-25	10%	1:1000 w 5% mleku w TBS-T (Cell Signaling; 5309)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
STX1	10%	1:1000 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology; sc-12736)	anty-mysie, 1:4000 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102)
VAMP1/2	15%	1:500 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology; sc-20039)	anty-mysie, 1:4000 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102)

Materiały i metody

Oznaczone białko	Gęstość żelu	Przeciwciało I-rzędowe (rozcieńczenie, producent, nr kat.)	Przeciwciało II-rzędowe (rozcieńczenie, producent, nr kat.)
CPLX1/2	15%	1:250 w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology; sc-365152)	anty-mysie, 1:4000 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102)
NRXN1	10%	1: 500 w TBS-T (Thermo Fisher Scientific; PA5-49444)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
SYN1A-B	10%	1:500 w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology; sc-390867)	anty-mysie, 1:4000 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102)
Tau	10%	1:250 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology; sc-32274)	anty-mysie, 1:4000 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102)
pTau (fosforylowane na Ser396)	10%	1:250 w TBS-T (Cell Signaling; 9632)	anty-mysie, 1:4000 w 5% mleku w TBS-T (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102)

Materiały i metody

Oznaczane białko	Gęstość żelu	Przeciwciało I-rzędowe (rozcieńczenie, producent, nr kat.)	Przeciwciało II-rzędowe (rozcieńczenie, producent, nr kat.)
pTau (fosforylowane na Ser199 i Ser202)	10%	1:1000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; T6819)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
pTau (fosforylowane na Ser416)	10%	1:500 w 5% mleku w TBS-T (Cell Signaling; 15013)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
AKT	10%	1:1000 w 5% mleku w TBS-T (Cell Signaling; 4691)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
pAKT (fosforylowane na Ser473)	10%	1:1000 w 5% mleku w TBS-T (Cell Signaling; 4060)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
GSK-3 β	10%	1:1000 w 5% mleku w TBS-T (Cell Signaling; 9315)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
pGSK-3 β (fosforylowane na Ser9)	10%	1: 500 w 5% mleku w TBS-T (Cell Signaling; 9336)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)

Oznaczane białko	Gęstość żelu	Przeciwciało I-rzędowe (rozcieńczenie, producent, nr kat.)	Przeciwciało II-rzędowe (rozcieńczenie, producent, nr kat.)
BAD	15%	1: 500 w 5% mleku w TBS-T (Cell Signaling; 9292)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
pBAD (fosforylowane na Ser136)	15%	1: 500 w 5% mleku w TBS-T (Cell Signaling; 4366)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)
GAPDH	10%, 15%	1: 40 000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma Aldrich; G9545)	anty-królicze, 1: 4000 w 5% mleku w TBS-T (Sigma-Aldrich; A0545)

3.7 Statystyczne opracowanie wyników

Wszystkie wyniki wyrażono jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe średniej (ang. standard error of mean, SEM). Liczbę doświadczeń podano w legendzie do każdej ryciny. W badaniach *in vivo* analizę statystyczną wyników przeprowadzono, stosując dwuczynnikową analizę wariancji (ang. analysis of variance, ANOVA) z testem post hoc Bonferroniego, natomiast analizę wyników z doświadczeń *in vitro* jednoczynnikową ANOVA z testem post hoc Sidaka, przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 8.0. Różnice były uznawane za znamienne statystycznie, gdy poziom istotności wynosił $p < 0,05$.

4. Wyniki

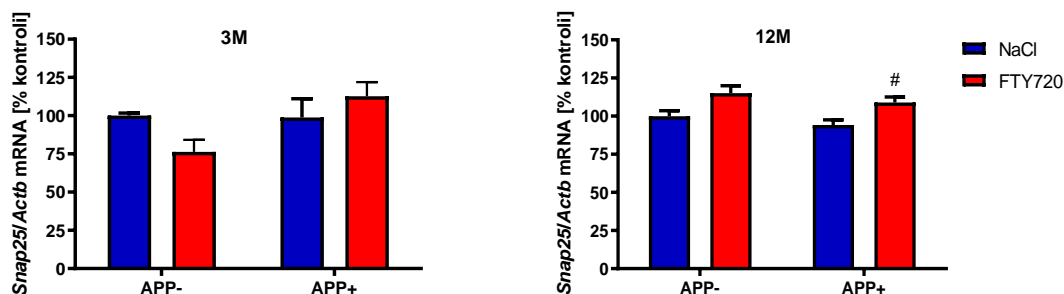
4.1 Badania *in vivo*

4.1.1 Wpływ modulatora receptorów dla S1P, FTY720, na zmiany w ekspresji genów i immunoreaktywności wybranych białek presynaptycznych w korze mózgu i hipokampie myszy transgenicznych z mutacją londyńską w genie dla APP

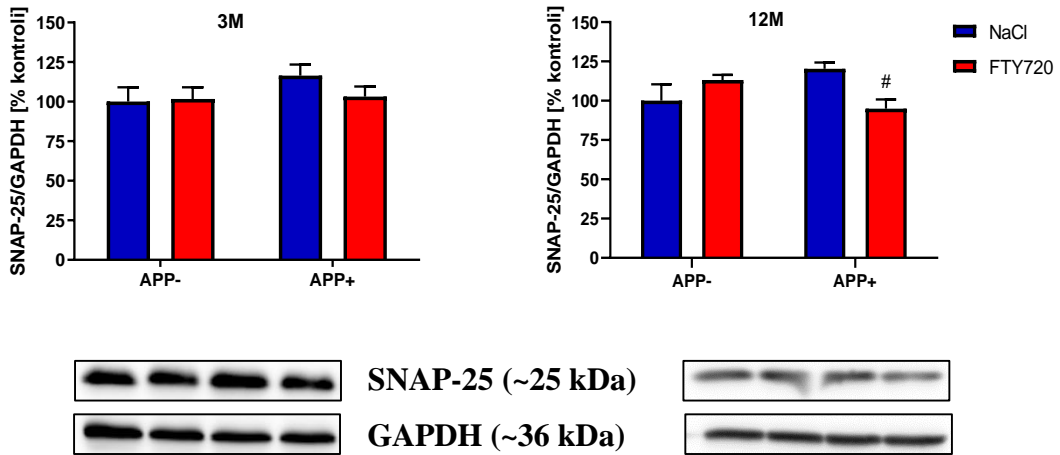
4.1.1.1 Białka kompleksu SNARE w korze mózgu 3- i 12-miesięcznych myszy

Jak wspomniano we wstępie, białka kompleksu SNARE, tj. STX1A, SNAP-25 oraz VAMP1 i VAMP2, odgrywają centralną rolę w przekaźnictwie synaptycznym poprzez koordynowanie egzocytozy pęcherzyków synaptycznych z następczym uwalnianiem neuroprzekaźników [Ramakrishnan i wsp., 2012]. Analiza poziomu mRNA genów kodujących STX1A, SNAP-25 i VAMP1 wykazała istotne statystycznie obniżenie poziomu mRNA *Vamp1* w korze mózgu myszy APP⁺ w obu badanych grupach wiekowych (**ryc. 10E**). Co ważne, u 12-miesięcznych zwierząt APP⁺ podanie fingolimodu znacząco zwiększało poziom mRNA *Vamp1* (**ryc. 10E**). Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w poziomie mRNA *Stx1a* ani *Snap25* pomiędzy myszami transgenicznymi (APP⁺) i myszami kontrolnymi (APP⁻) w żadnej z badanych grup wiekowych (**ryc. 10A,C**). Nie stwierdzono również istotnych zmian w poziomie immunoreaktywności badanych białek w żadnej z badanych grup wiekowych (**ryc. 10B,D,F**).

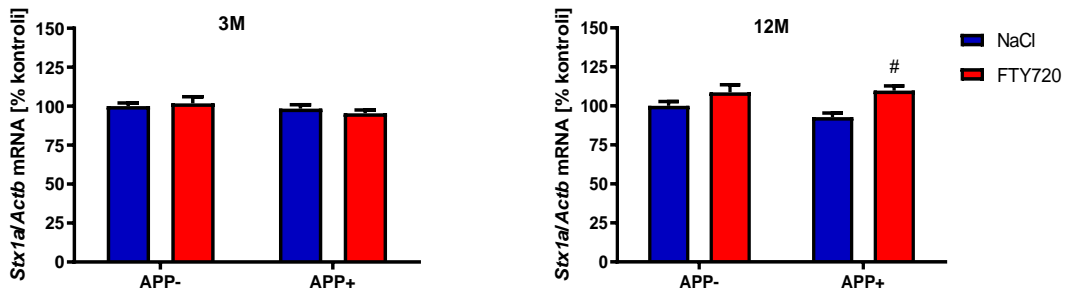
A



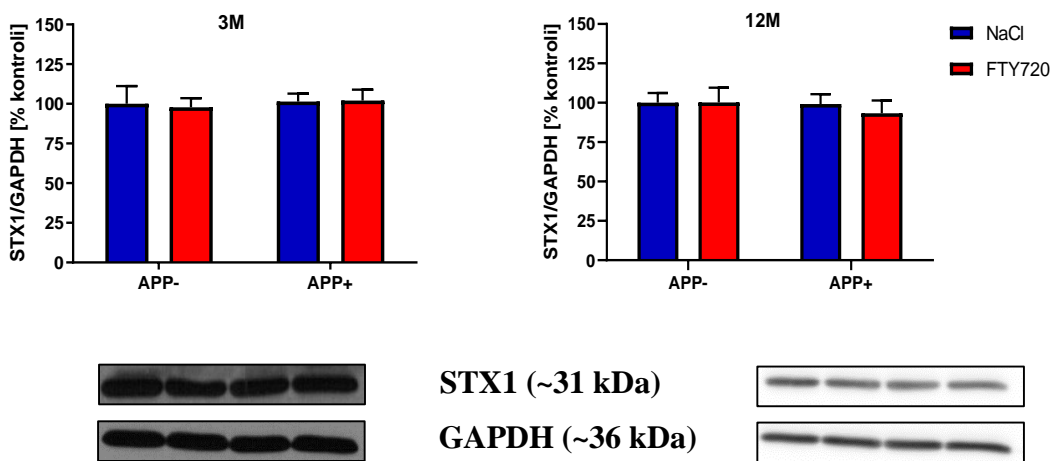
B



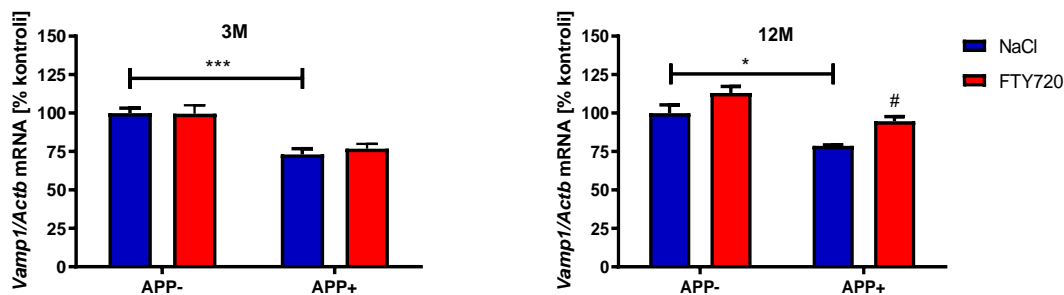
C



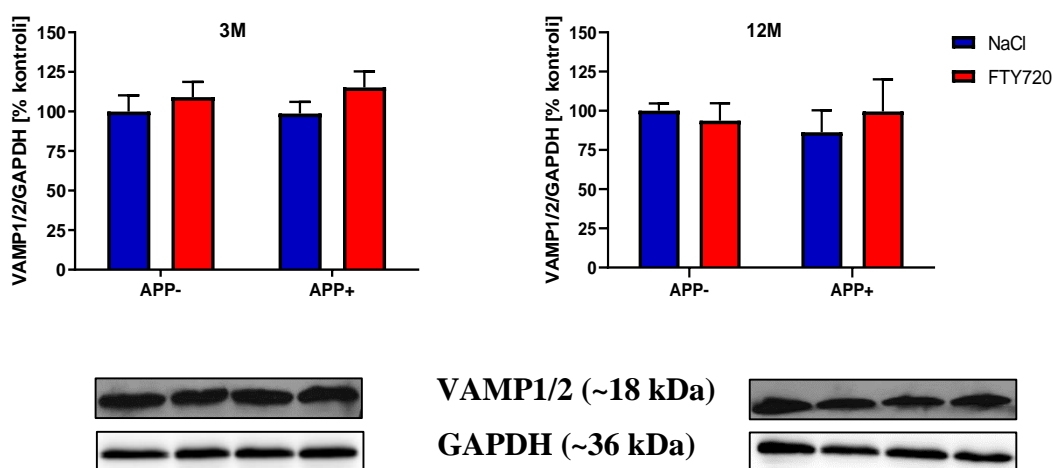
D



E



F



Rycina 10. Wpływ FTY720 na ekspresję genów (A,C,E) i immunoreaktywność (B,D,F) białek kompleksu SNARE w korze mózgowej 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 3-6 (dla *Stx1a*, *STX1*, *Vamp1*, VAMP1/2, SNAP-25 w grupie 12-miesięcznych zwierząt); n = 6-8 (dla doświadczeń przeprowadzonych na 3-miesięcznych zwierzętach); n = 7-9 (dla *Snap25* w grupie 12-miesięcznych zwierząt). * p < 0,05; *** p < 0,001 względem NaCl APP⁻. # p < 0,05 względem NaCl APP⁺. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

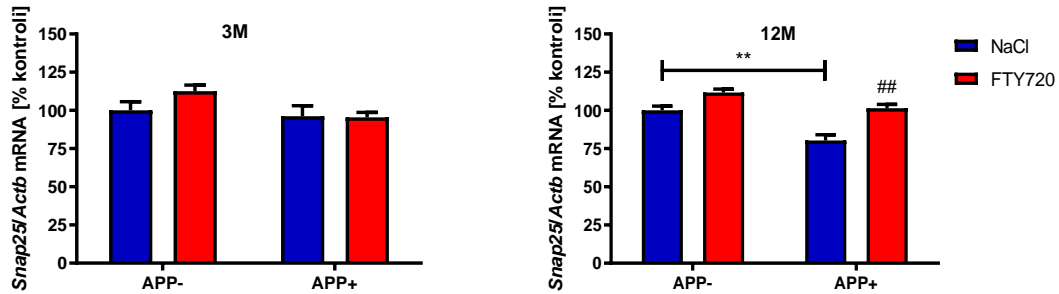
4.1.1.2 Białka kompleksu SNARE w hipokampie 3- i 12-miesięcznych myszy

W hipokampie 12-miesięcznych zwierząt transgenicznych zaobserwowano istotne obniżenie poziomu mRNA *Snap25* i *Stx1a*. Podanie fingolimodu w tej grupie zwierząt przywracało ekspresję badanych genów do/lub powyżej wartości kontrolnych (ryc. 11A,C). Natomiast w hipokampie 3-miesięcznych myszy APP⁺ odnotowano obniżenie poziomu mRNA *Vamp1* (ryc. 11E). Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie immunoreaktywności badanych białek w żadnej z badanych grup wiekowych

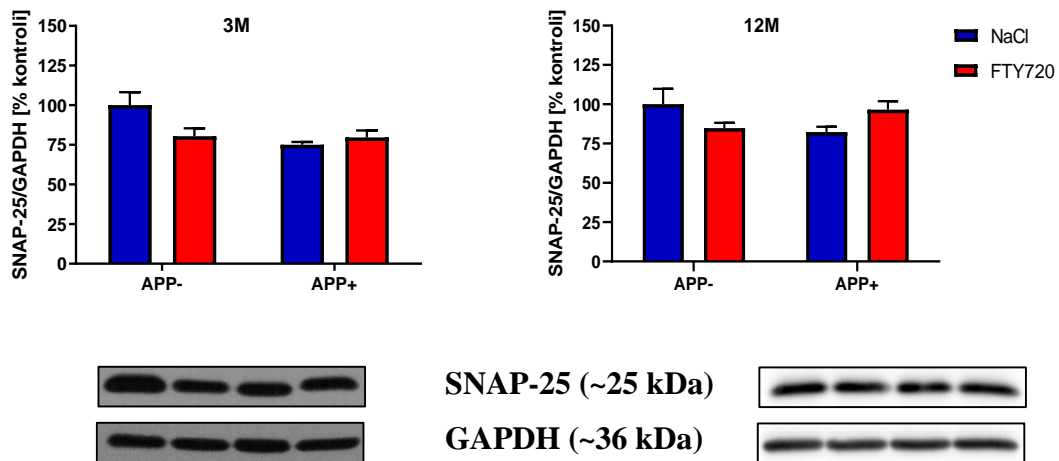
Wyniki

(ryc. 11B,D,F), choć zaobserwowano wyraźną tendencję do obniżenia poziomu immunoreaktywności SNAP-25 u 3-miesięcznych myszy transgenicznyc (p = 0,0565) (ryc. 11B).

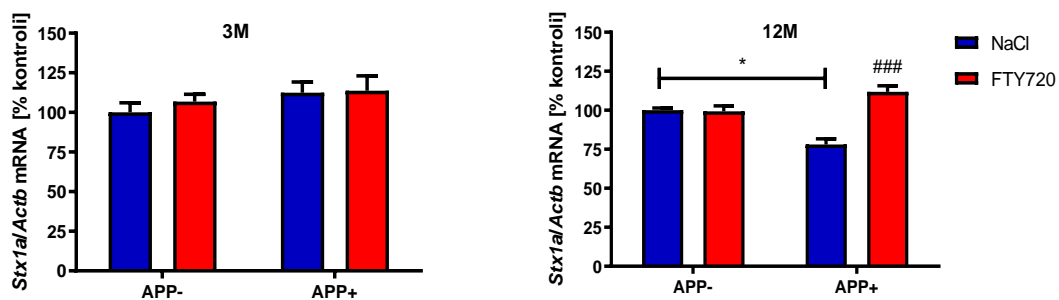
A



B

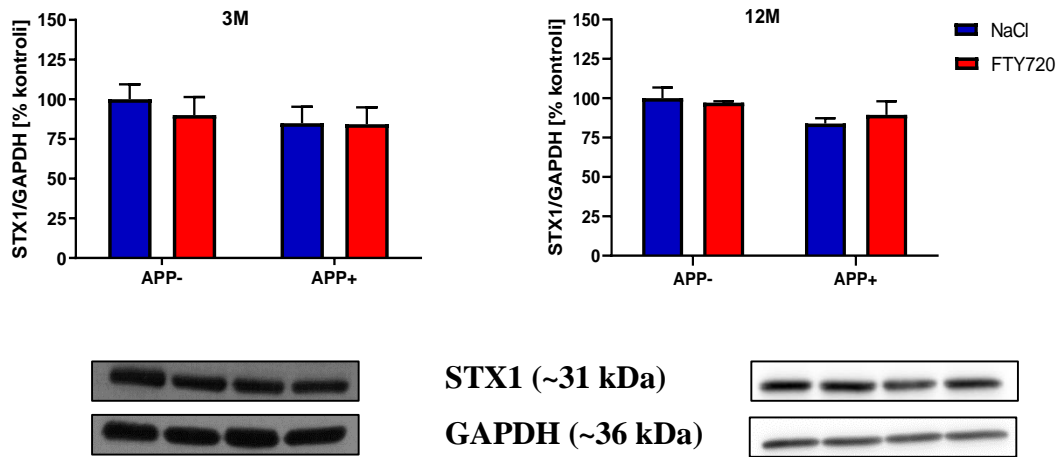


C

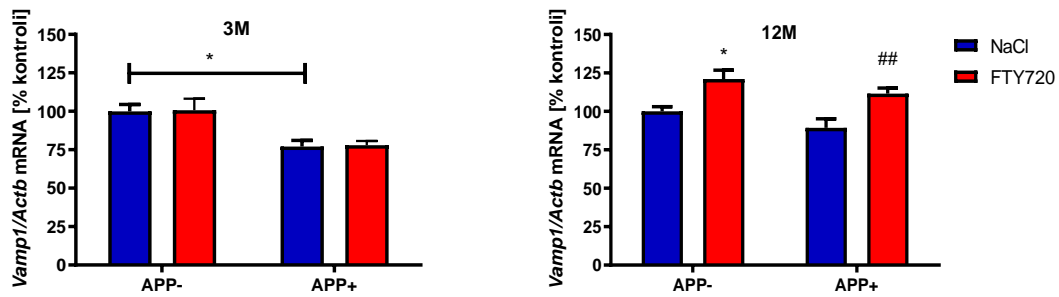


Wyniki

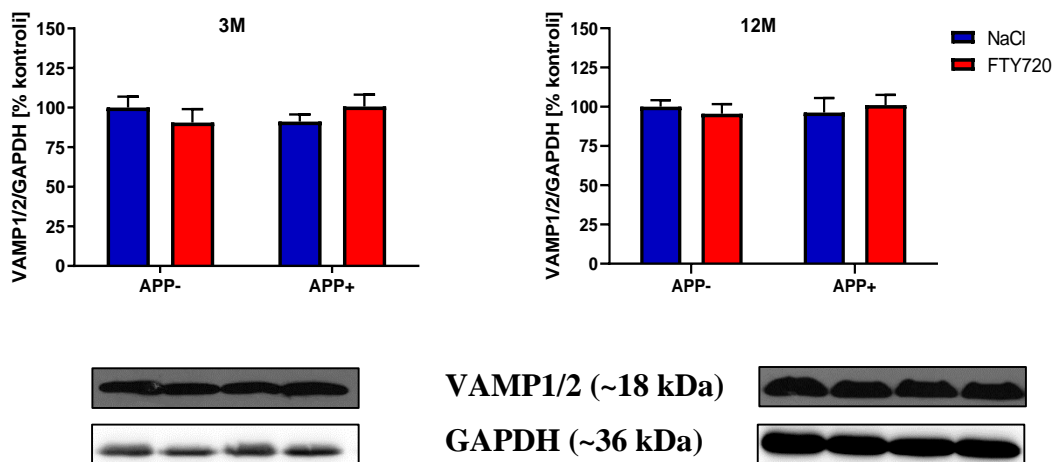
D



E



F



Rycina 11. Wpływ FTY720 na ekspresję genów (A,C,E) i immunoreaktywność (B,D,F) białek kompleksu SNARE w hipokampie 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

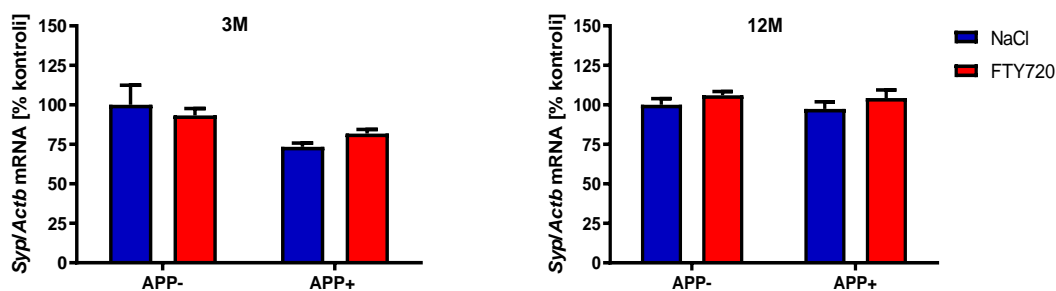
Wyniki

Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; $n = 3-6$ (dla *Snap25* i SNAP-25 w obu grupach wiekowych, *Stx1a* i STX1 w grupie 12-miesięcznych zwierząt, *Vamp1* w grupie 3-miesięcznych myszy, VAMP1/2 w grupie 12-miesięcznych myszy); $n = 6-8$ (dla *Stx1a*, STX1, VAMP1/2 w grupie 3-miesięcznych zwierząt); $n = 9-13$ (dla *Vamp1* w grupie 12-miesięcznych zwierząt). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ względem NaCl APP⁻. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ względem NaCl APP⁺. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

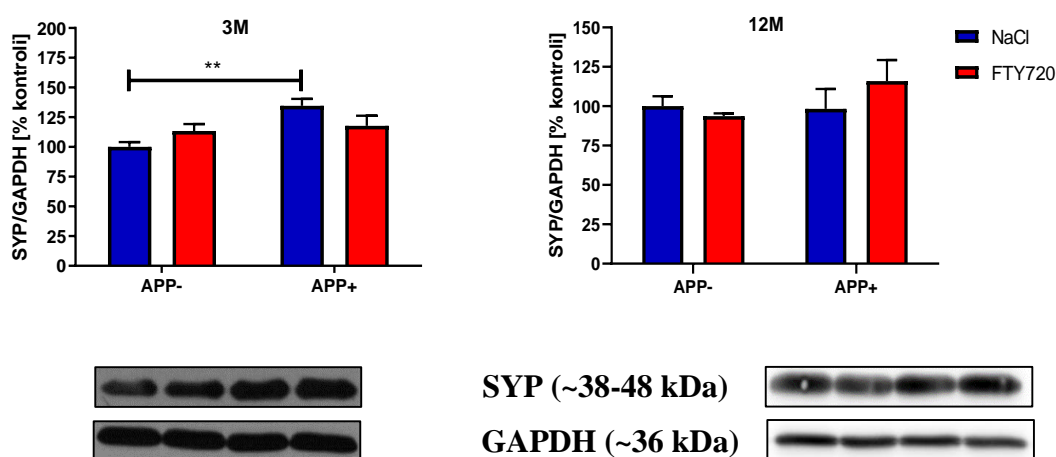
4.1.1.3 Białka regulatorowe kompleksu SNARE w korze mózgu 3- i 12-miesięcznych myszy

Analiza poziomu mRNA genów kodujących białka regulatorowe kompleksu SNARE w korze mózgowej wykazała istotne obniżenie poziomu mRNA *Nrxn1* u 12-miesięcznych myszy APP⁺ w porównaniu do myszy kontrolnych (APP⁻) z tej samej grupy wiekowej (ryc. 12E). Natomiast na podstawie badań immunoreaktywności stwierdzono znamienne wzrost poziomu SYP i SYT1 u 3-miesięcznych zwierząt transgenicznych (ryc. 12B,D).

A

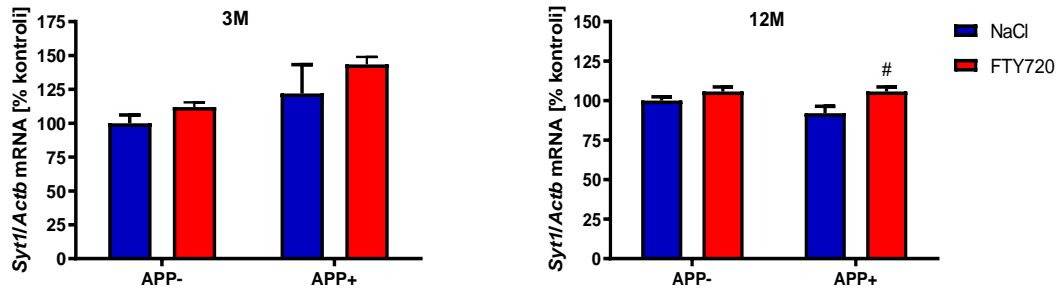


B

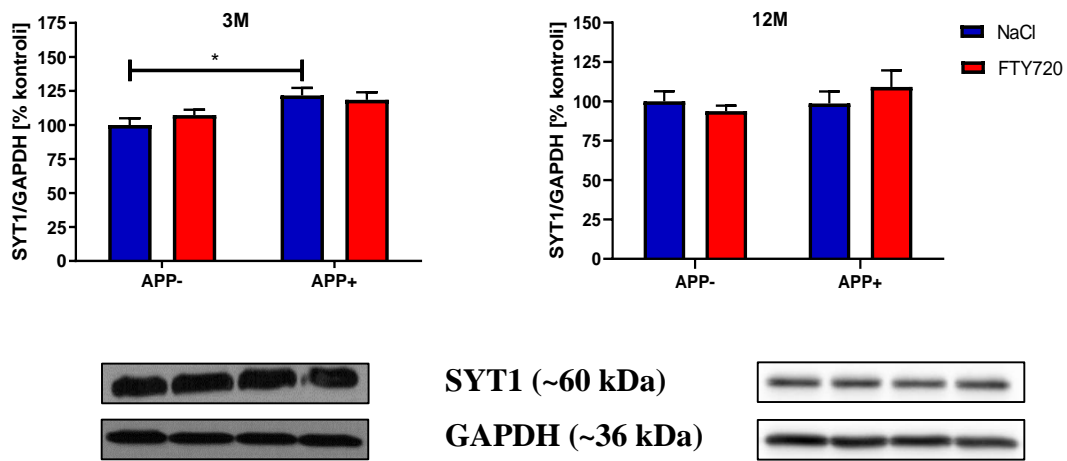


Wyniki

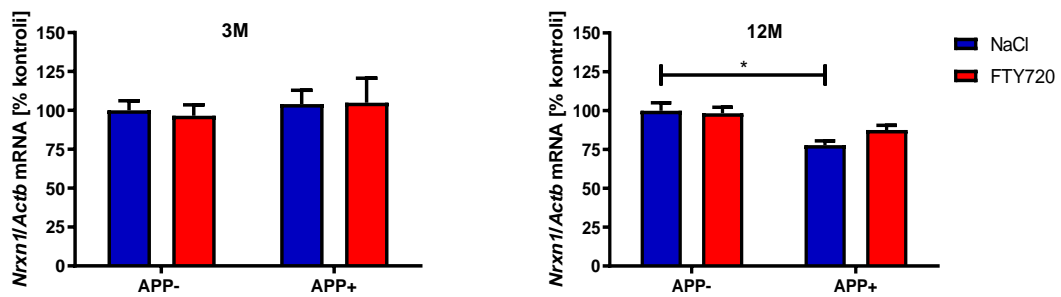
C



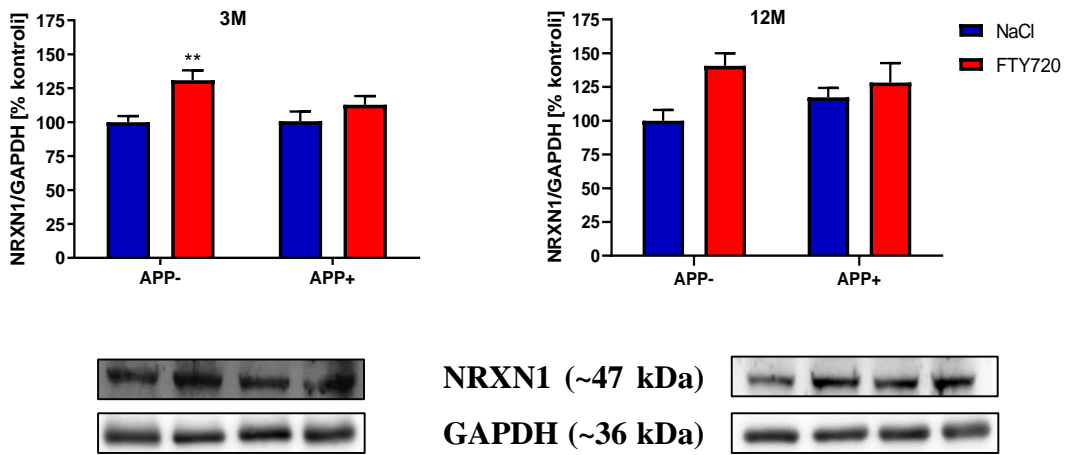
D



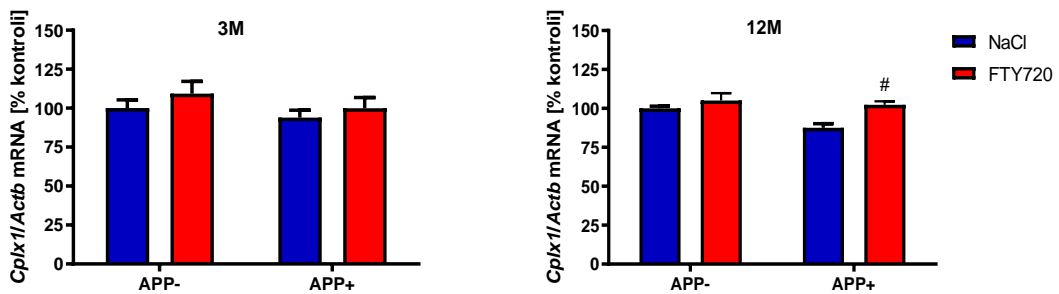
E



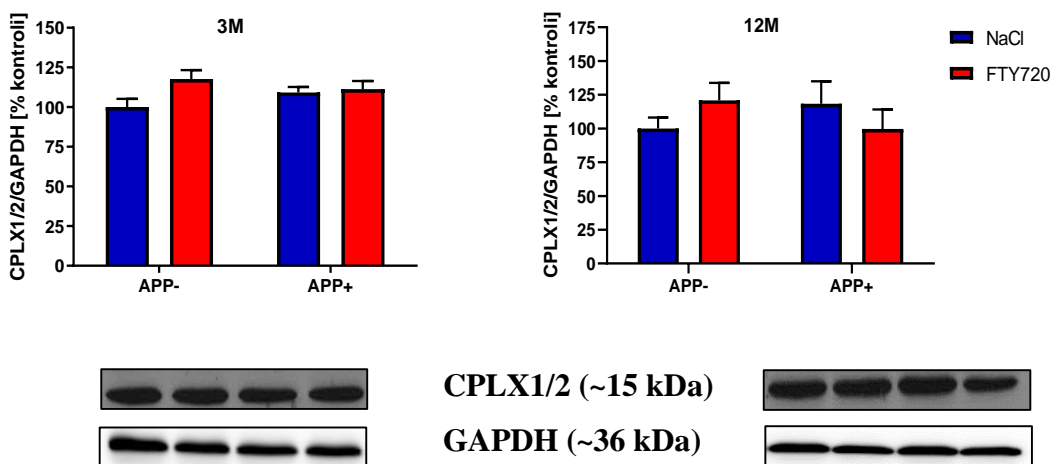
F



G

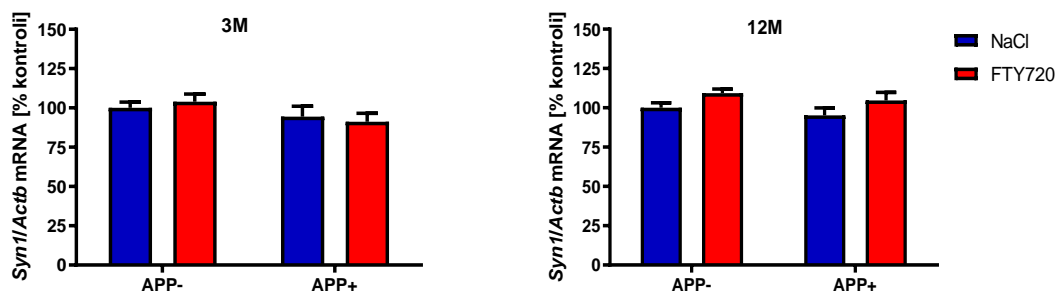


H

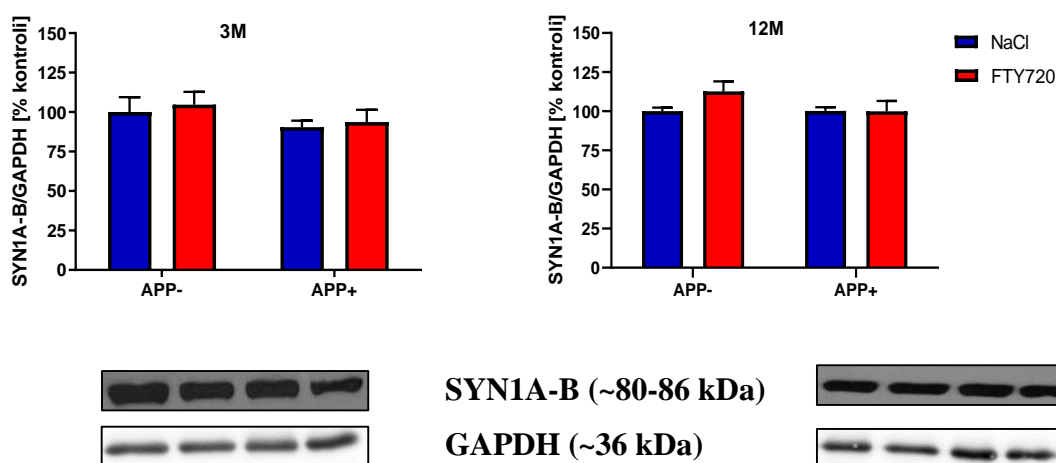


Wyniki

I



J



Rycina 12. Wpływ FTY720 na ekspresję genów (A,C,E,G,I) i immunoreaktywność (B,D,F,H,J) białek regulatorowych kompleksu SNARE w korze mózgowej 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 3-6 (dla *Syp*, *Syt1*, *Nrxn1* w obu grupach wiekowych, NRXN1 w grupie 12-miesięcznych myszy, *Cplx1* w grupie 3-miesięcznych myszy); n = 6-9 (dla SYP, SYT1, CPLX1/2, SYN1A-B, *Syn1* w obu grupach wiekowych, NRXN1 w grupie 3-miesięcznych myszy, *Cplx1* w grupie 12-miesięcznych zwierząt). * p < 0,05; ** p < 0,01 względem NaCl APP⁻. # p < 0,05 względem NaCl APP⁺. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

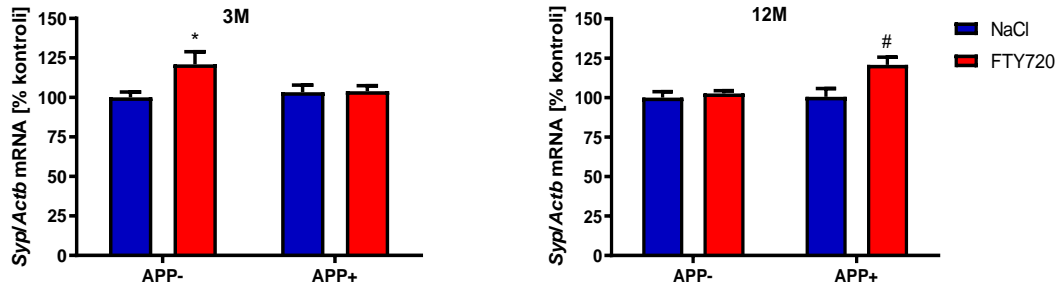
4.1.1.4 Białka regulatorowe kompleksu SNARE w hipokampie 3- i 12-miesięcznych myszy

Zarówno u 3-miesięcznych, jak i 12-miesięcznych zwierząt transgenicznych stwierdzono istotne obniżenie poziomu mRNA *Syt1* w hipokampie (ryc. 13C). U starszych zwierząt APP⁺ zaobserwowano również znamienne obniżenie ekspresji *Nrxn1* oraz *Cplx1*, która w przypadku obu genów istotnie zwiększała się powyżej wartości kontrolnych po podaniu fingolimodu (ryc. 13E,G). Nie odnotowano istotnych zmian w poziomie

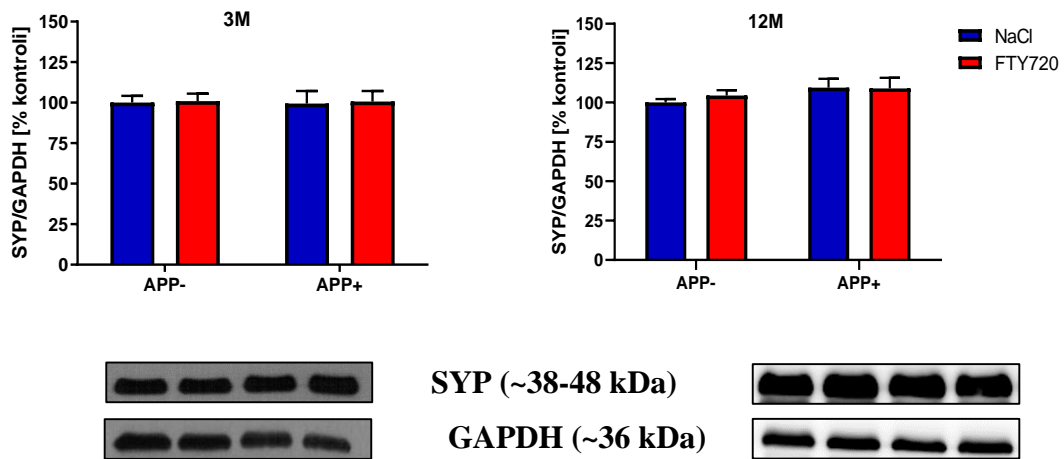
Wyniki

immunoreaktywności badanych białek w żadnej z badanych grup wiekowych (**ryc. 13B,D,F,H,J**).

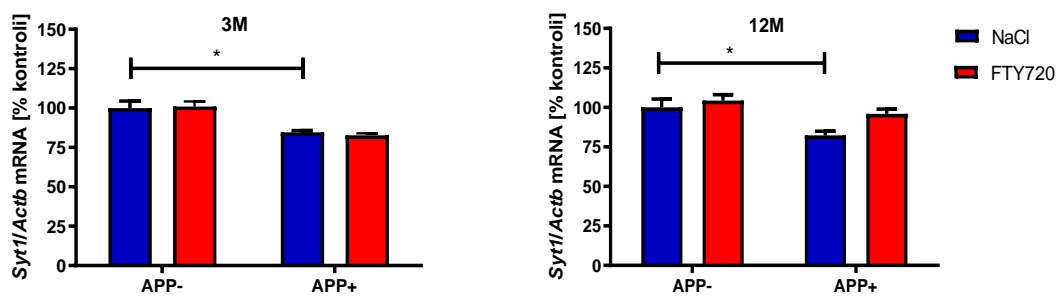
A



B

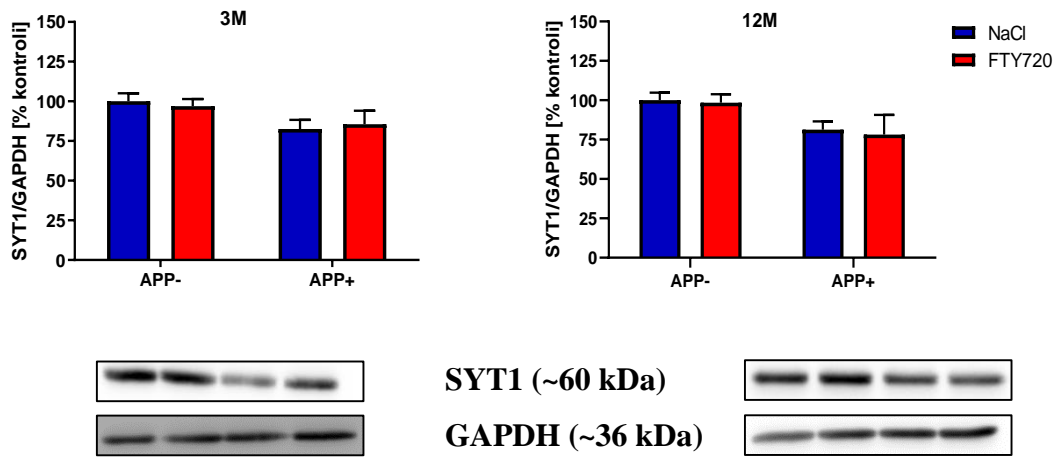


C

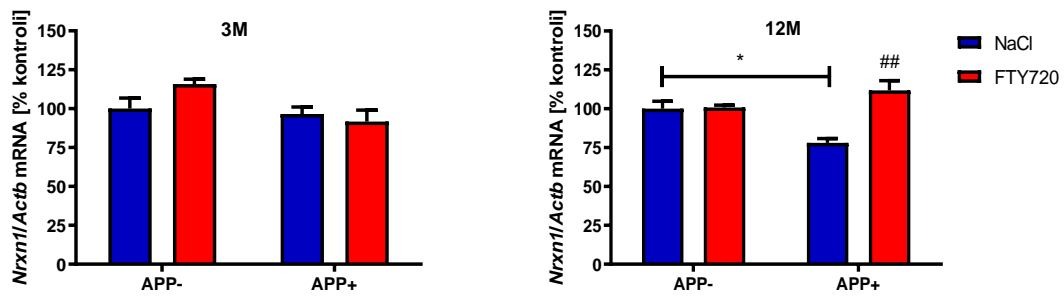


Wyniki

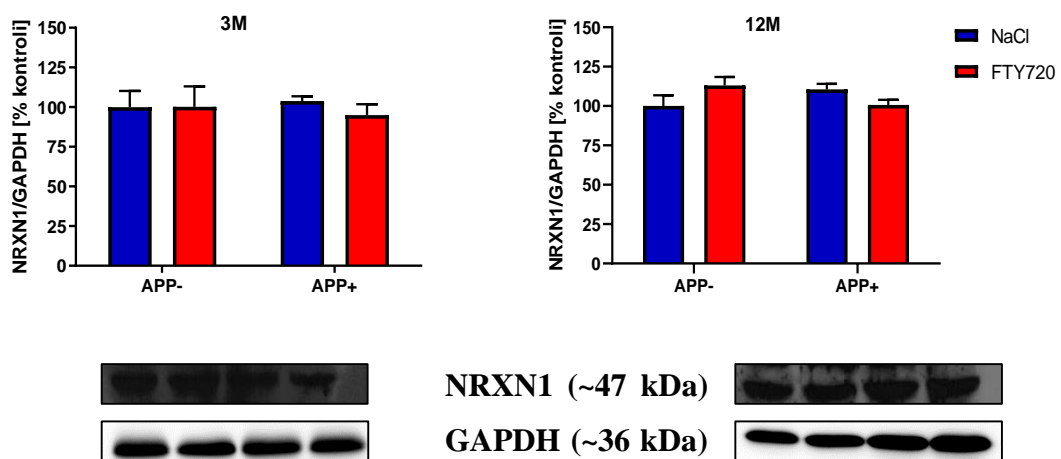
D



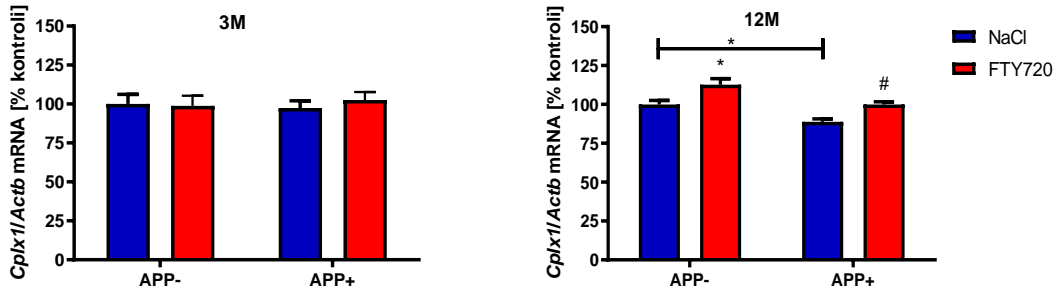
E



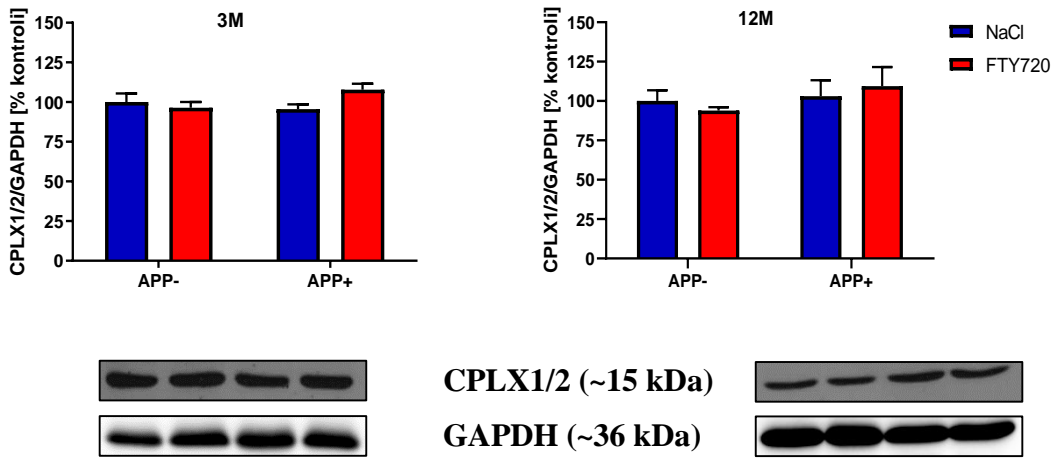
F



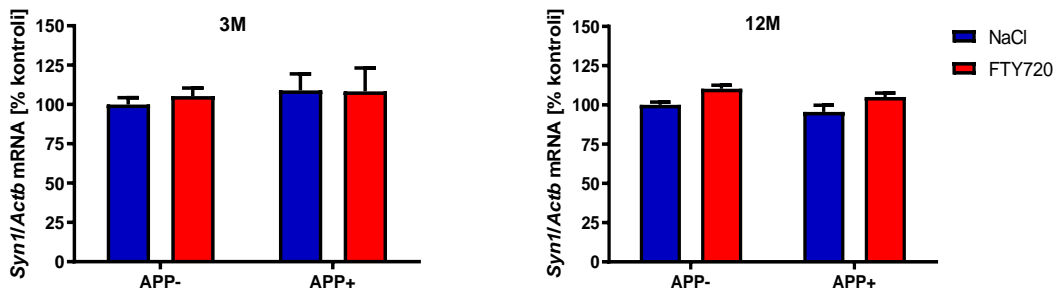
G



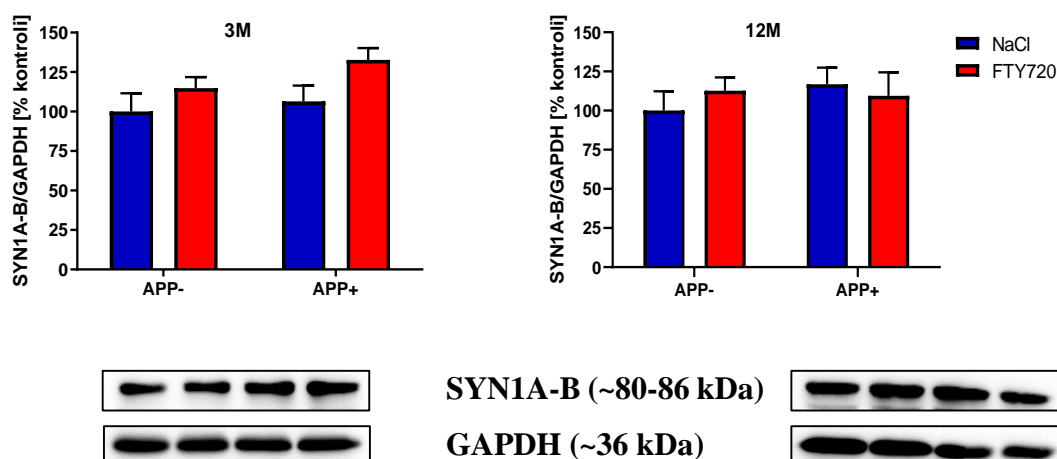
H



I



J



Rycina 13. Wpływ FTY720 na ekspresję genów (A,C,E,G,I) i immunoreaktywność (B,D,F,H,J) białek regulatorowych kompleksu SNARE w hipokampie 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 3-5 (dla *Syt1*, *Nrxn1*, NRXN1, SYN1A-B w obu grupach wiekowych, *Syp* i *Syn1* w grupie 3-miesięcznych myszy, SYP, SYT, CPLX1/2 w grupie 12-miesięcznych zwierząt); n = 6-9 (dla *Cplx1* w obu grupach wiekowych, SYP, SYT, CPLX1/2 w grupie 3-miesięcznych zwierząt, *Syn1* w grupie 12-miesięcznych zwierząt); n = 9-14 (dla *Syp* w grupie 12-miesięcznych myszy). * p < 0,05 względem NaCl APP⁻. # p < 0,05; ## p < 0,01 względem NaCl APP⁺. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

4.1.2 Wpływ modulatora receptorów dla S1P, FTY720, na zmiany w ekspresji genów i poziomie ufosforylowania kinazy AKT i jej białek efektorowych w korze mózgu i hipokampie myszy transgenicznym z mutacją londyńską w genie dla APP

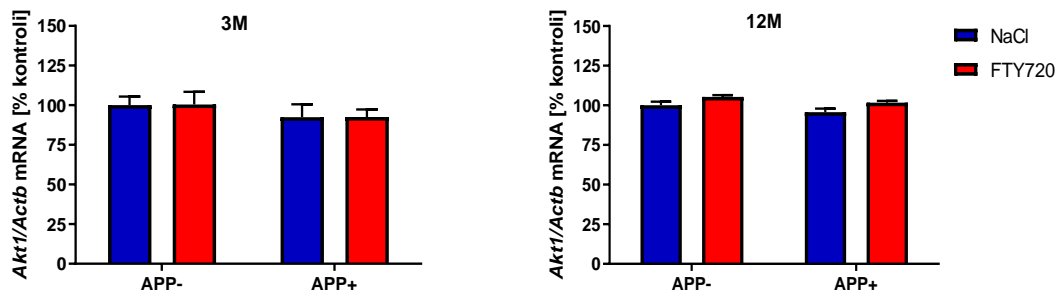
4.1.2.1 Kinaza AKT i jej białka efektorowe w korze mózgu 3- i 12-miesięcznych myszy

Ścieżka sygnałowa zależna od PI3K jest dobrze znanym regulatorem przeżycia i proliferacji komórek. Białkiem efektorowym dla PI3K jest serynowo-treoninowa kinaza AKT, która pośredniczy w sygnalizacji zależnej od receptorów dla S1P [Safarian i wsp., 2015; Gaire i wsp., 2018]. Kinaza AKT do całkowitej aktywacji wymaga ufosforylowania reszt serynowych w pozycji 473 C-końcowej domeny regulatorowej. W niniejszej pracy zbadano ekspresję genu kodującego kinazę AKT oraz poziom ufosforylowania AKT na serynie 473 w korze mózgu myszy z nadekspresją ludzkiego zmutowanego genu dla APP, którym podawano fingolimod, modulator receptorów dla S1P.

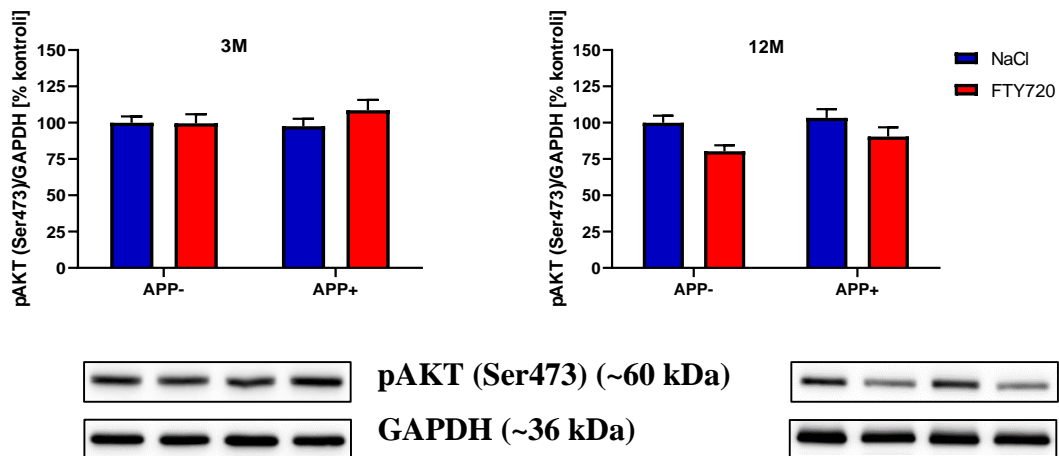
Wyniki

Nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie mRNA *Akt1* w korze mózgu zwierząt APP⁺ w żadnej z badanych grup wiekowych (ryc. 14A). Nie stwierdzono również znamiennych zmian w poziomie fosforylacji AKT, immunoreaktywności całkowitej kinazy AKT ani stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej (ryc. 14B,C,D), co wskazuje, że zwiększona ekspresja APP nie wpływa na aktywność tej kinazy w korze mózgowej w badanym modelu ChA.

A

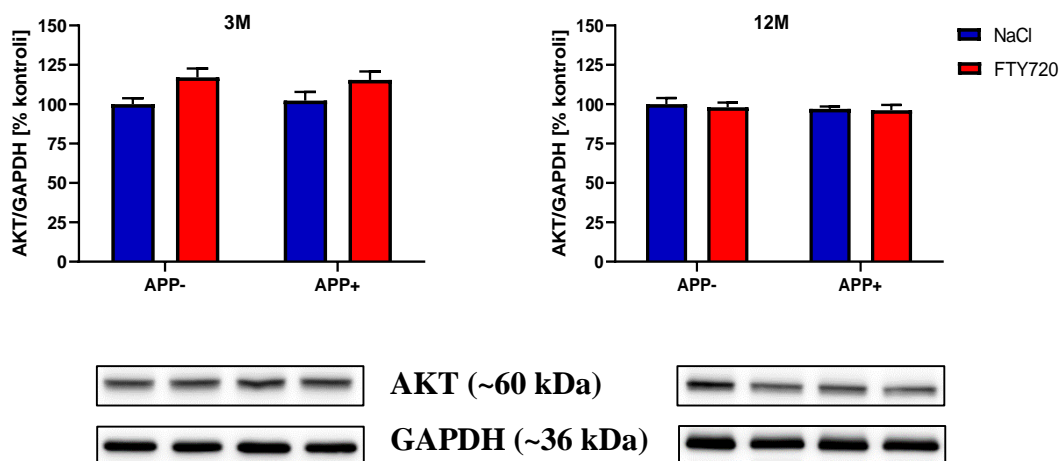


B

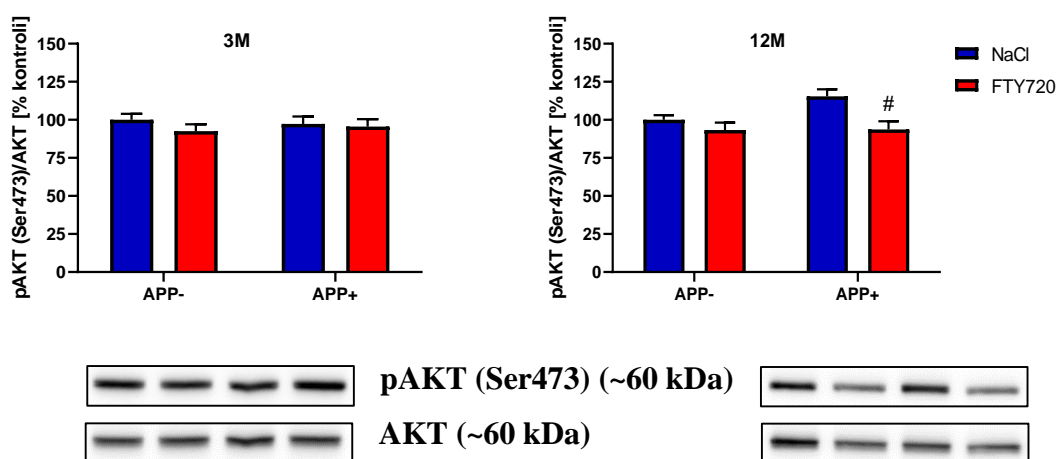


Wyniki

C



D



Rycina 14. Wpływ FTY720 na ekspresję genu (A) i immunoreaktywność całkowitej i ufosforylowanej formy (B,C,D) kinazy AKT w korze mózgowej 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

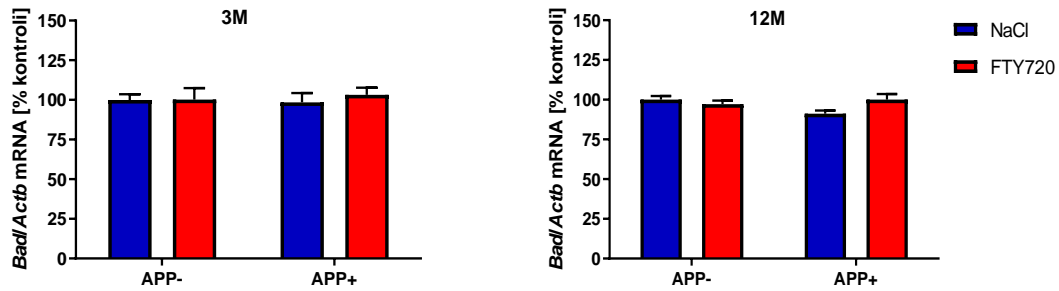
Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 7-8. # p < 0,05 względem NaCl APP⁺. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

Białkiem efektorowym kinazy AKT jest proapoptotyczne białko BAD z rodziny białek Bcl2. Nieufosforylowany BAD tworzy heterodimer z antyapoptotycznym białkiem Bcl-XL, co stymuluje uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy. Fosforylacja BAD na serynie 136 prowadzi do jego związania się z białkiem 14-3-3, co uniemożliwia łączenie się z Bcl-XL i tym samym hamuje proapoptotyczne działanie BAD

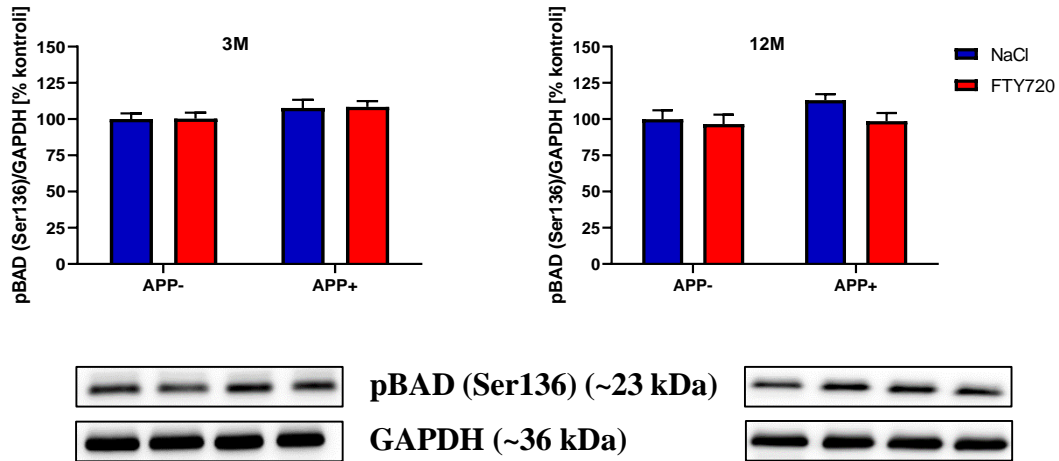
Wyniki

[Datta i wsp., 1997; Masters i wsp., 2001]. Nie wykazano istotnych różnic między poziomem mRNA *Bad* w korze mózgu myszy transgenicznych (APP⁺) i myszy kontrolnych (APP⁻) w żadnej z badanych grup wiekowych (**ryc. 15A**). Nie stwierdzono również znamiennych zmian w poziomie fosforylacji BAD, immunoreaktywności całkowitej białka BAD ani stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej (**ryc. 15B,C,D**).

A

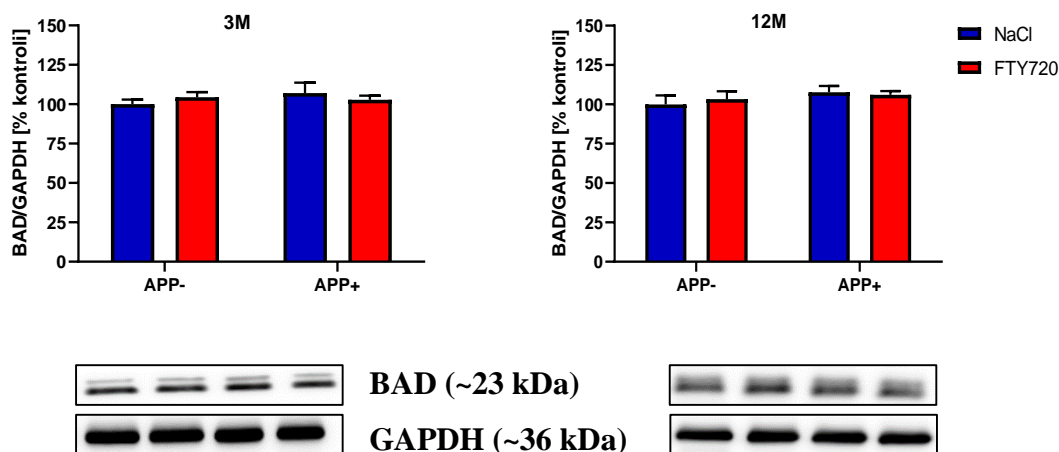


B

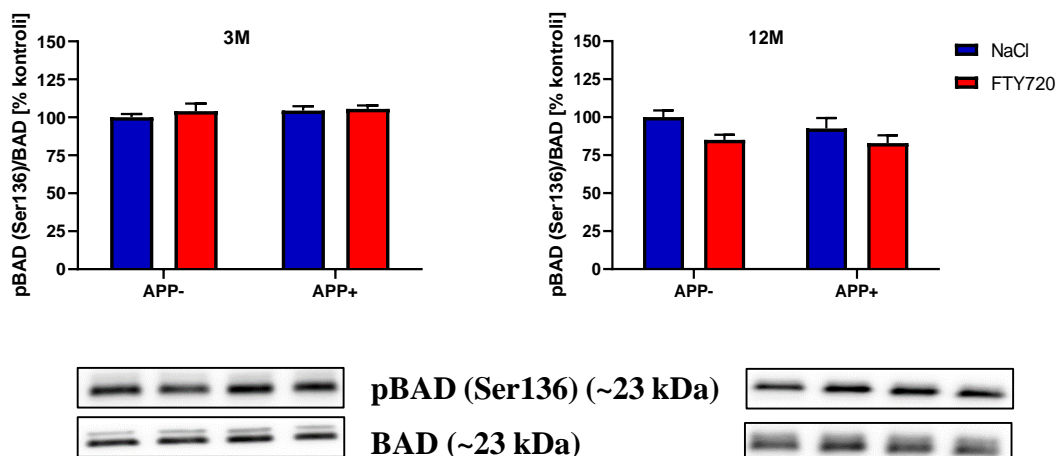


Wyniki

C



D



Rycina 15. Wpływ FTY720 na ekspresję genu (A) i immunoreaktywność całkowitej i ufosforylowanej formy (B,C,D) białka BAD w korze mózgowej 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

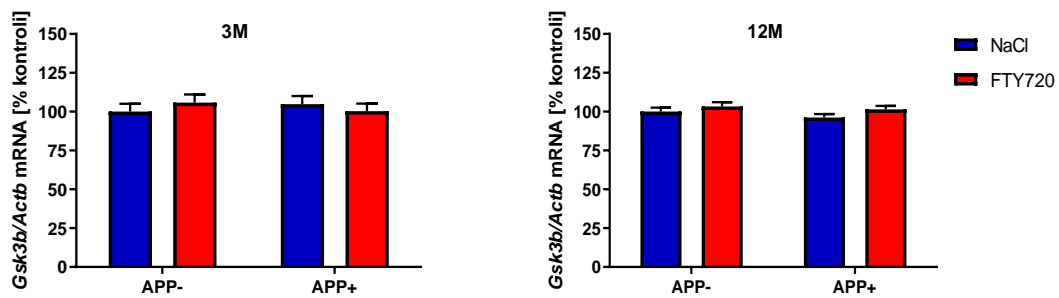
Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 7-8. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

Innym białkiem fosforylowanym przez AKT jest GSK-3 β . Jak wspomniano we wstępie, w zależności od miejsca fosforylacji GSK-3 β może być aktywowana lub hamowana. Kinaza AKT fosforyluje GSK-3 β na serynie 9, w ten sposób hamując aktywność tego enzymu [Cross i wsp., 1995]. Analiza poziomu mRNA nie wykazała znamiennych różnic pomiędzy ekspresją *Gsk3b* w korze mózgu myszy transgenicznym

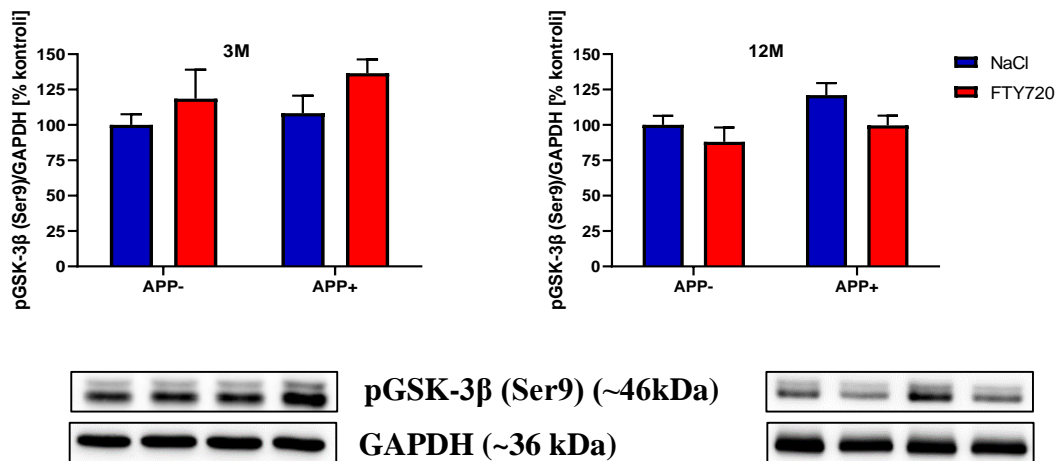
Wyniki

(APP⁺) i myszy kontrolnych (APP⁻) w żadnej z badanych grup wiekowych (**ryc. 16A**). Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie fosforylacji GSK-3 β ani immunoreaktywności całkowitej kinazy GSK-3 β w żadnej z badanych grup wiekowych (**ryc. 16B,C**). Zaobserwowano natomiast wyraźną tendencję wzrostową stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej ($p = 0,0896$) u 12-miesięcznych myszy transgenicznyc (ryc. 16D).

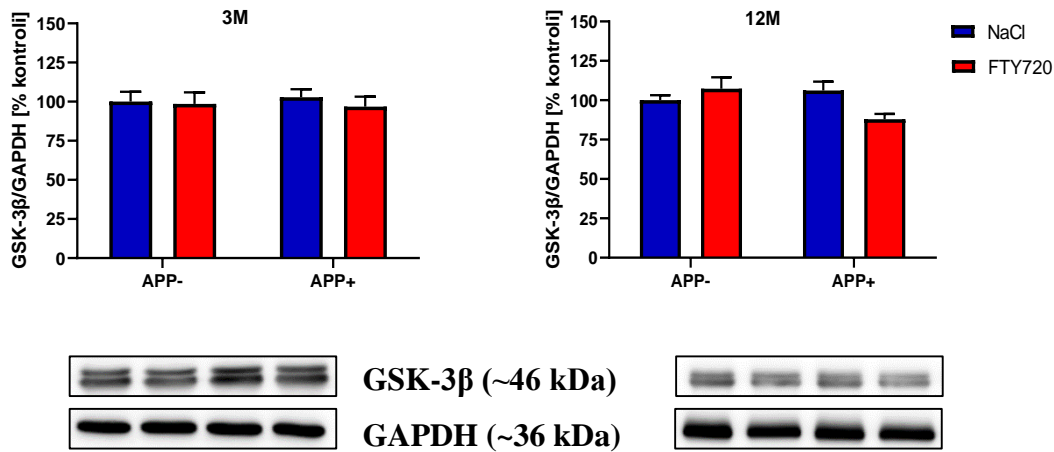
A



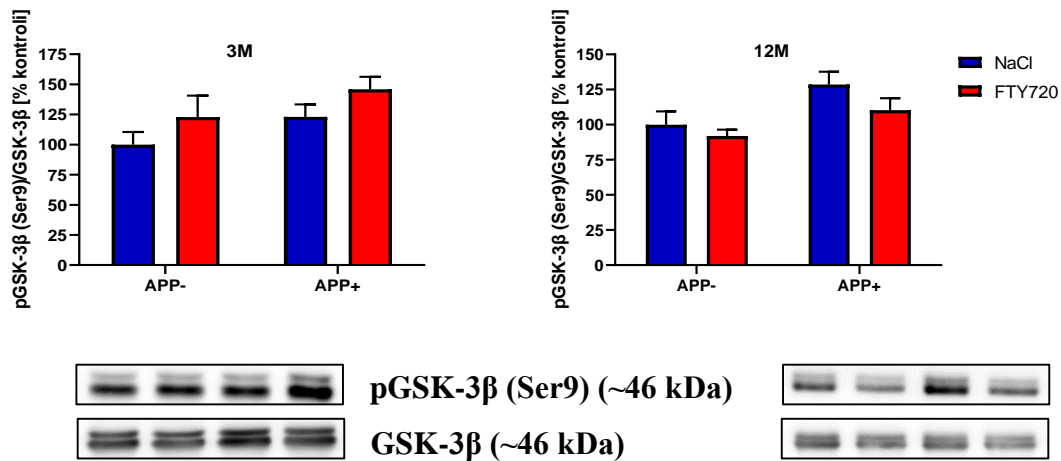
B



C



D



Rycina 16. Wpływ FTY720 na ekspresję genu (A) i immunoreaktywność całkowitej i ufosforylowanej formy (B,C,D) GSK-3β w korze mózgowej 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 6-8. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

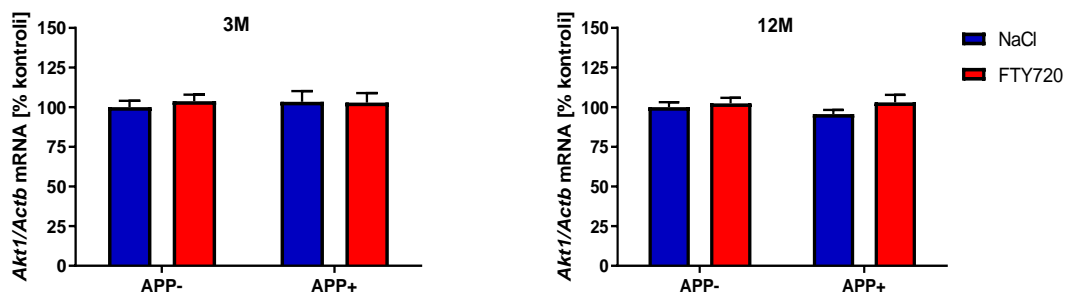
4.1.2.2 Kinaza AKT i jej białka efektorowe w hipokampie 3- i 12-miesięcznych myszy

Wpływ nadekspresji ludzkiego zmutowanego genu dla APP oraz fingolimodu na kinazę AKT oraz jej białka efektorowe zbadano również w hipokampie – części mózgu, w której, podobnie jak w korze, dochodzi do największych zmian neuropatologicznych w ChA. Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie mRNA *Akt1* w hipokampie w żadnej

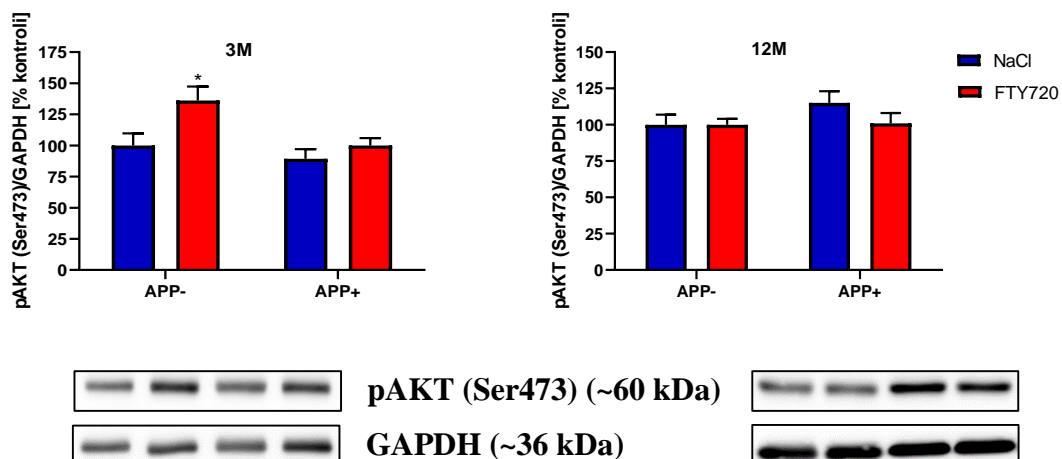
Wyniki

z badanych grup wiekowych (**ryc. 17A**). Nie wykazano zmian w poziomie ufosforylowania AKT na serynie 473 ani w poziomie immunoreaktywności całkowitej formy AKT w zastosowanym mysim modelu ChA (**ryc. 17B,C**). Zaobserwowano natomiast znamienne obniżenie stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej (pAKT (Ser473)/AKT) w hipokampie 3-miesięcznych myszy transgeniczných oraz istotny statystycznie wzrost stosunku pAKT (Ser473)/AKT w hipokampie 12-miesięcznych zwierząt APP⁺ (**ryc. 17D**). Podanie fingolimodu nie miało wpływu na zmiany w aktywności kinazy AKT. Otrzymane wyniki wskazują, że kierunek zmian aktywności AKT pod wpływem mutacji londyńskiej w genie dla APP zależy od wieku zwierząt.

A

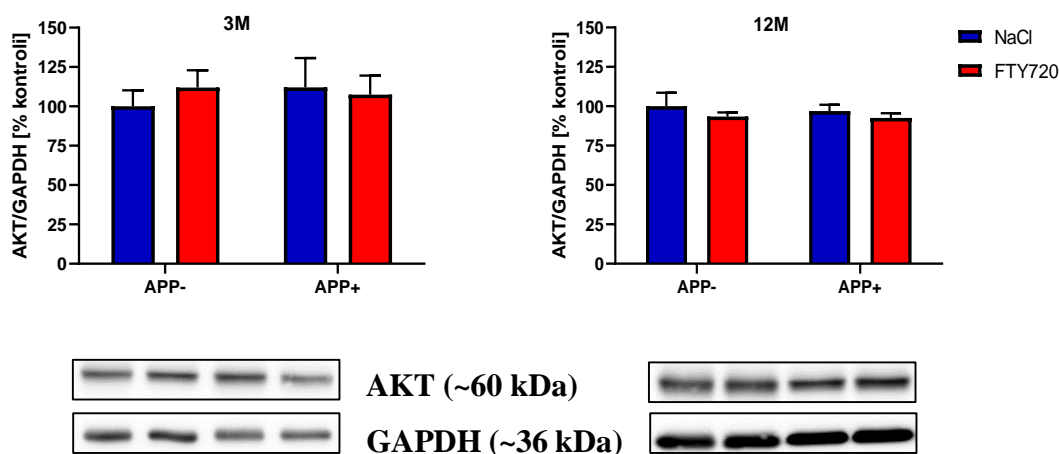


B

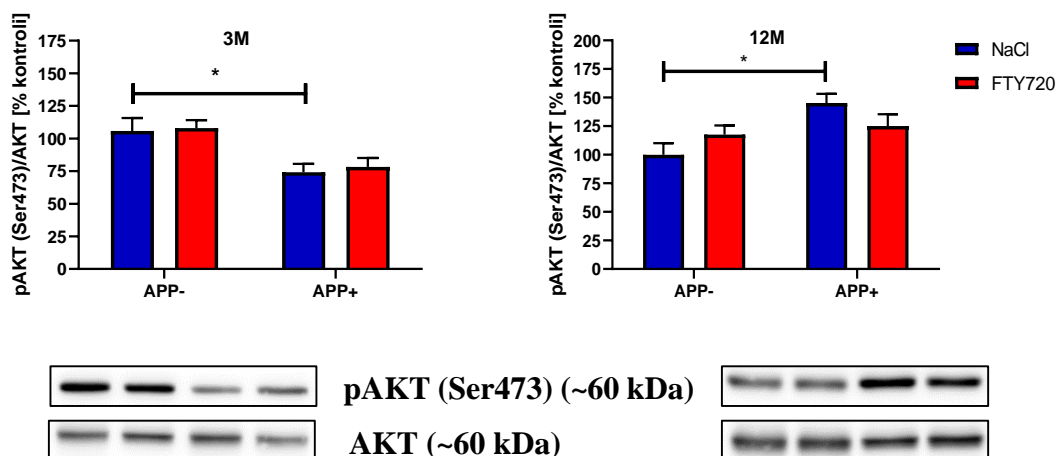


Wyniki

C



D



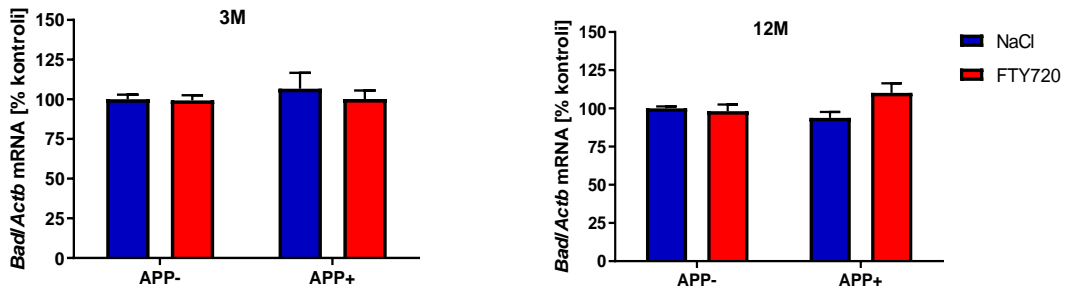
Rycina 17. Wpływ FTY720 na ekspresję genu (A) i immunoreaktywność całkowitej i ufosforylowanej formy (B,C,D) kinazy AKT w hipokampie 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 5-8. * p < 0,05 względem NaCl APP⁻. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

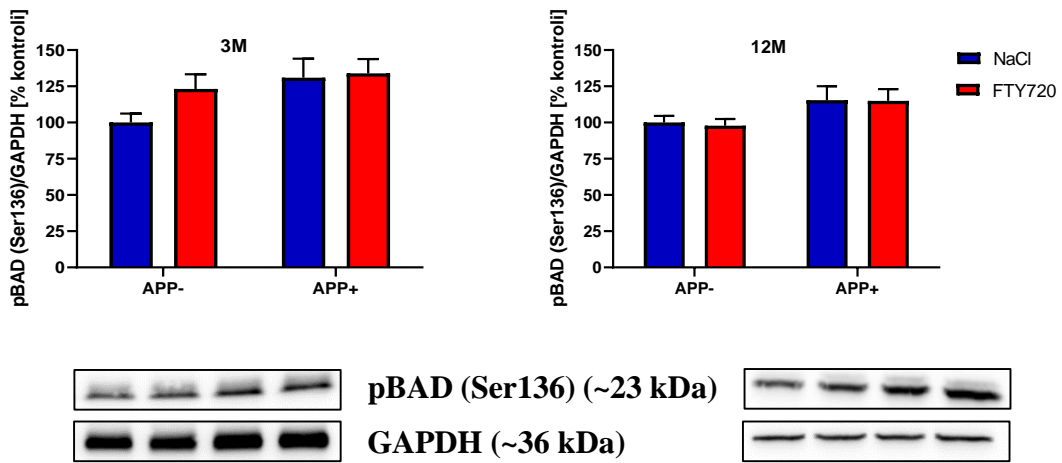
Nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie mRNA *Bad* w hipokampie zwierząt APP⁺ w żadnej z badanych grup wiekowych (ryc. 18A). Nie stwierdzono również znamiennych zmian w poziomie fosforylacji BAD, immunoreaktywności całkowitej BAD ani stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej (ryc. 18B,C,D).

Wyniki

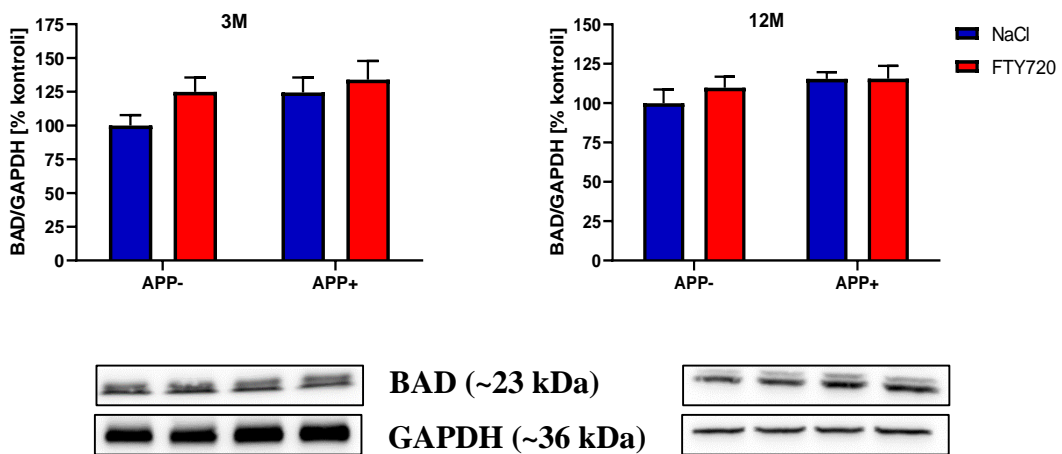
A



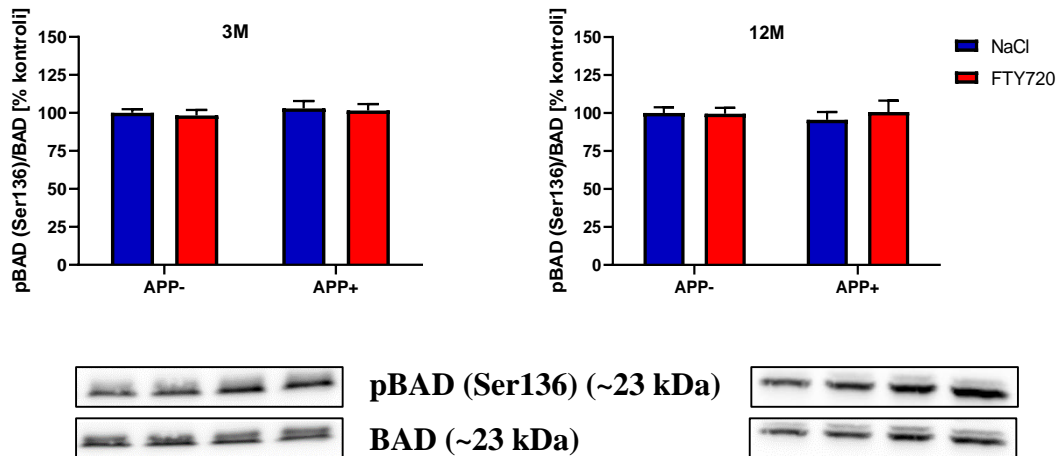
B



C



D

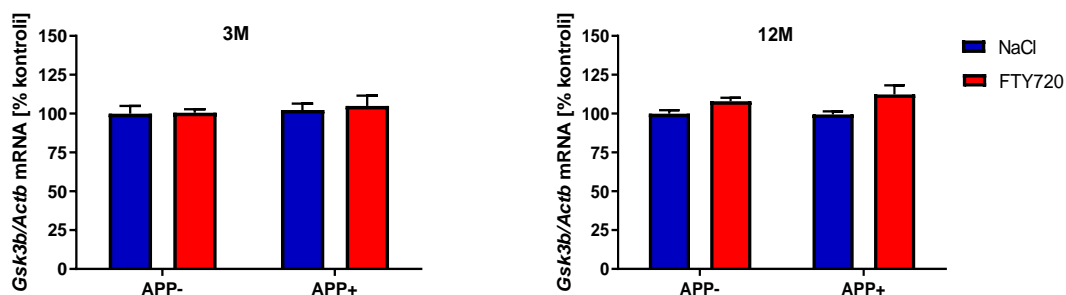


Rycina 18. Wpływ FTY720 na ekspresję genu (A) i immunoreaktywność całkowitej i ufosforylowanej formy (B,C,D) białka BAD w hipokampie 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

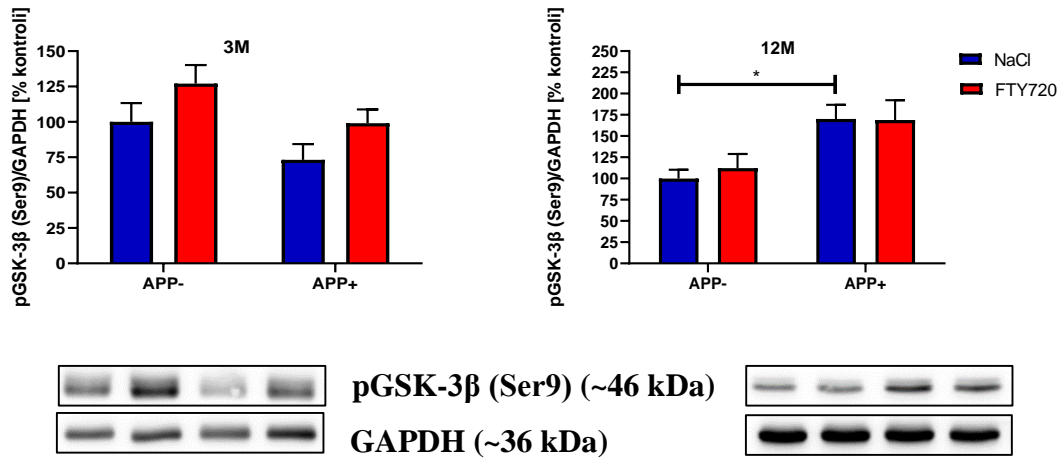
Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 5-8. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie mRNA *Gsk3b* w hipokampie w żadnej z badanych grup wiekowych (ryc. 19A). Wykazano znamienne wzrost ufosforylowania GSK-3 β na serynie 9 w hipokampie 12-miesięcznych zwierząt transgeniczných (ryc. 19B). Poziom immunoreaktywności całkowitej formy GSK-3 β nie ulegał zmianie w żadnej z badanych grup wiekowych (ryc. 19C). Zaobserwowano natomiast wyraźną tendencję do wzrostu ($p = 0,0718$) stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej (pGSK-3 β (Ser9)/GSK-3 β) w hipokampie 12-miesięcznych myszy transgeniczných (ryc. 19D).

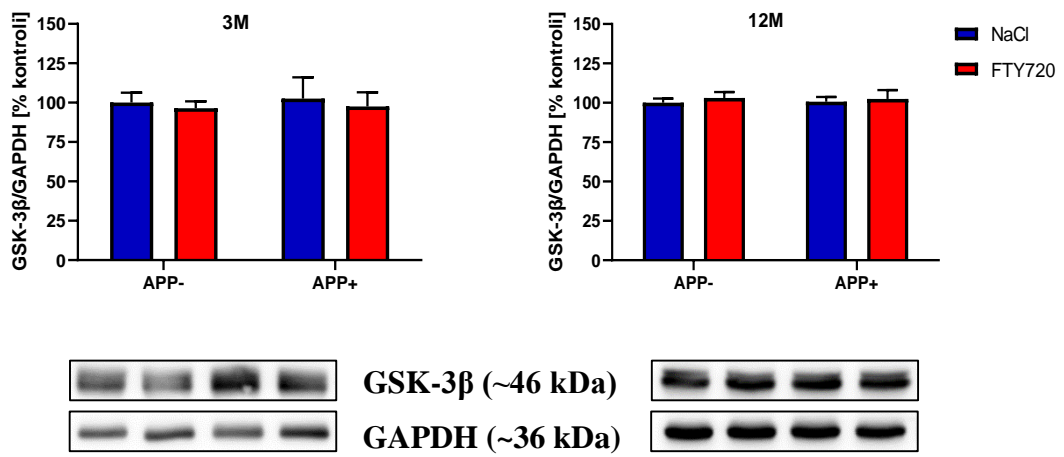
A



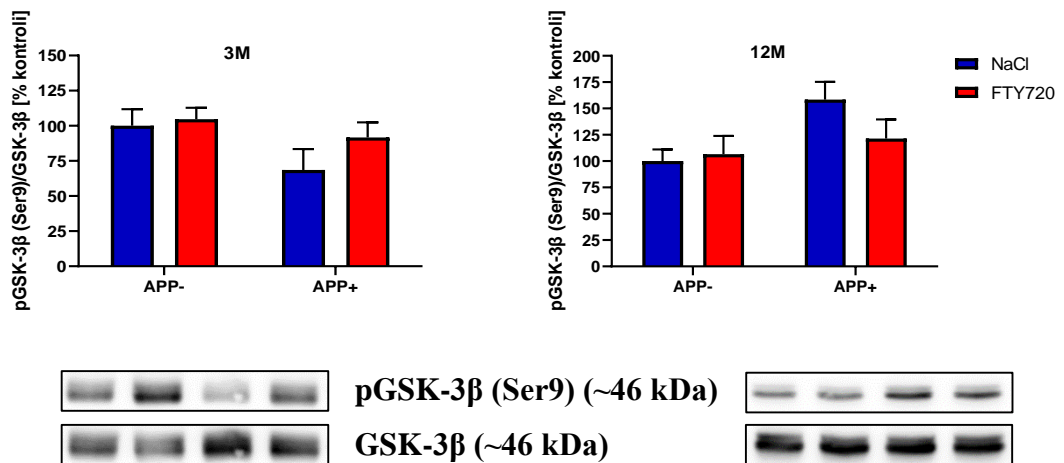
B



C



D



Rycina 19. Wpływ FTY720 na ekspresję genu (A) i immunoreaktywność całkowitej i ufosforylowanej formy (B,C,D) GSK-3 β w hipokampie 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 6-8. * p < 0,05 względem NaCl APP⁻. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

4.1.3 Wpływ modulatora receptorów dla S1P, FTY720, na zmiany w ekspresji genu i poziomie ufosforylowania białka Tau w korze mózgu i hipokampie myszy transgenicznym z mutacją londyńską w genie dla APP

4.1.3.1 Białko Tau w korze mózgowej 3- i 12-miesięcznych myszy

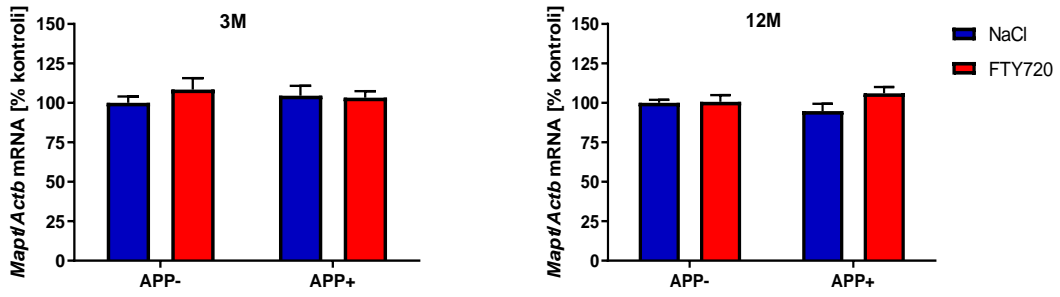
Głównym substratem kinazy GSK-3 β jest białko Tau, którego nadmierna fosforylacja jest jedną z cech charakterystycznych ChA. W pierwszym etapie zbadano wpływ mutacji londyńskiej w genie kodującym APP na poziom mRNA *Mapt* (gen kodujący białko Tau) oraz immunoreaktywność całkowitego białka Tau w korze mózgu. Nie wykazano zmian w poziomie mRNA *Mapt* (**ryc. 20A**) ani w immunoreaktywności całkowitego białka Tau w żadnej z badanych grup wiekowych (**ryc. 20B**).

Następnie zbadano poziom fosforylacji białka Tau przez kinazę GSK-3 β w dwóch charakterystycznych dla ChA miejscach (seryna 396 i seryna 199/202). Obie fosforylacje należą do najwcześniejszych modyfikacji białka Tau w przebiegu ChA [Utton i wsp., 1997; Li i wsp., 2013]. W zastosowanym modelu ChA nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie ufosforylowania białka Tau na Ser396 ani w stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej (pTau (Ser396)/Tau) w korze mózgowej w badanych grupach wiekowych (**ryc. 20C,D**). Nie zaobserwowano również istotnych zmian w poziomie ufosforylowania białka Tau na Ser199/202 ani w stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej (pTau (Ser199/202)/Tau) w korze mózgowej żadnej z badanych grup wiekowych (**ryc. 20E,F**).

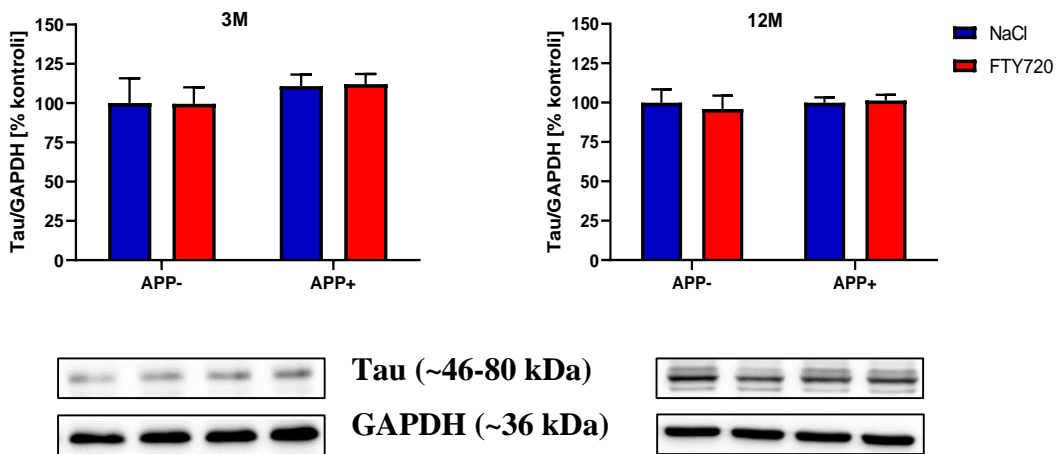
W fosforylacji białka Tau biorą również inne kinazy, dlatego dla porównania zbadano wpływ mutacji londyńskiej na poziom ufosforylowania białka Tau na serynie 416, za co odpowiada CaMKII [Steiner i wsp., 1990; Yamamoto i wsp., 2005]. Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie ufosforylowania białka Tau na Ser416 ani w stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej (pTau (Ser416)/Tau) w korze mózgowej żadnej z badanych grup wiekowych (**ryc. 20G,H**).

Wyniki

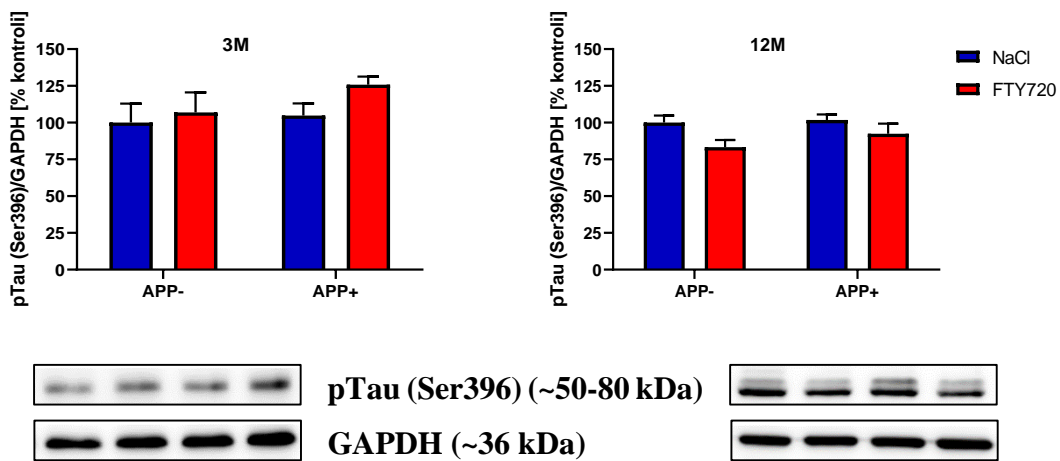
A



B

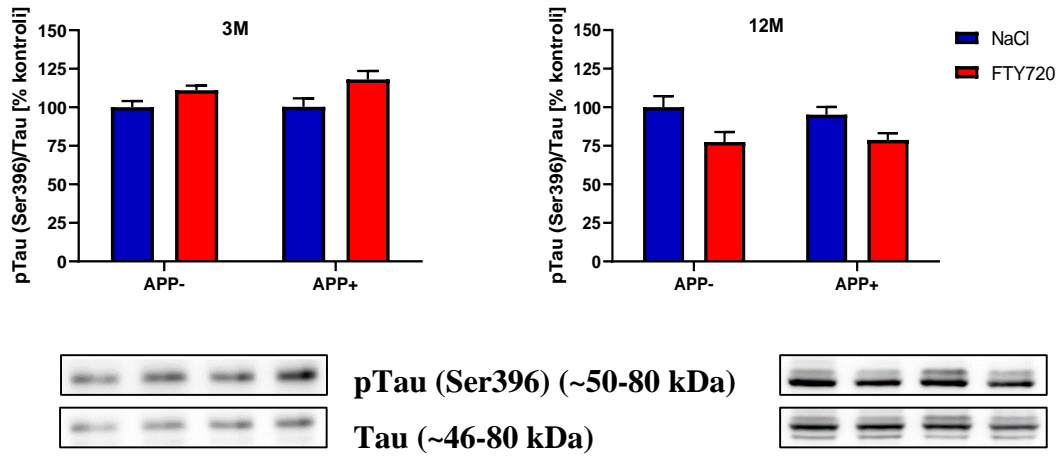


C

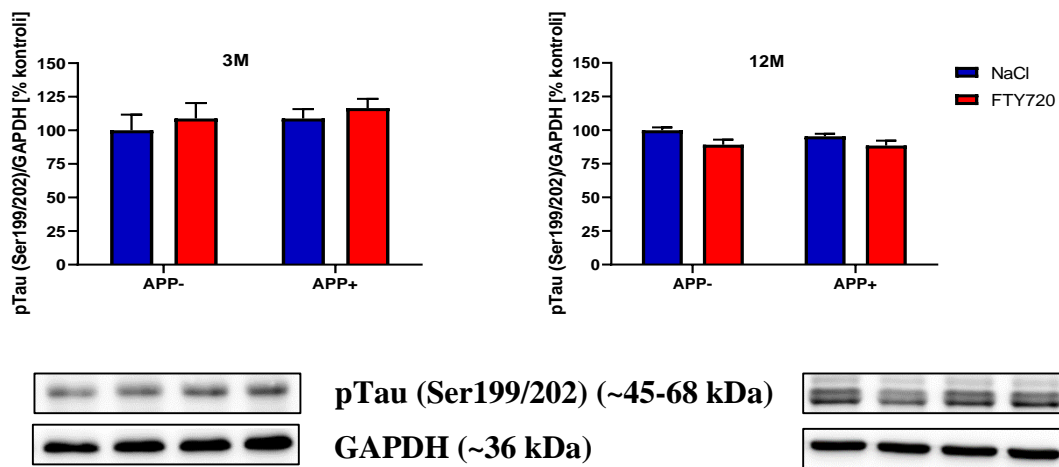


Wyniki

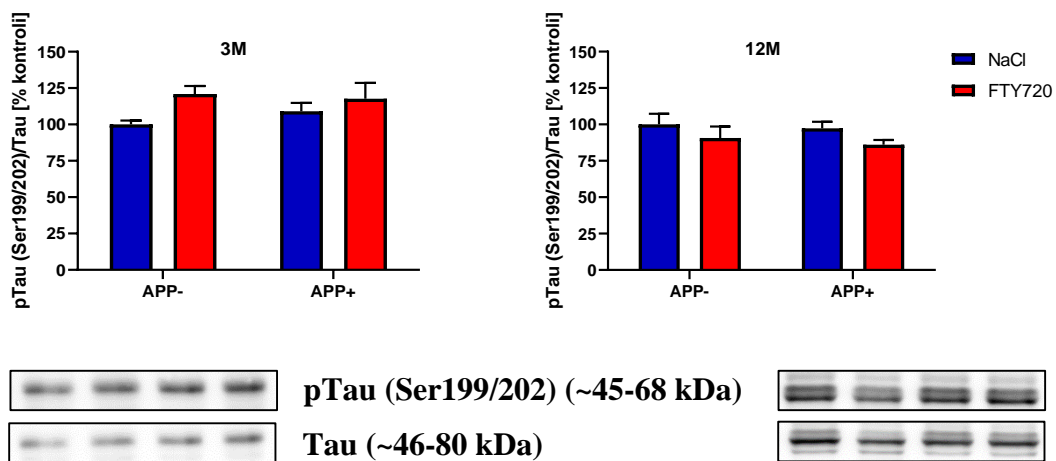
D



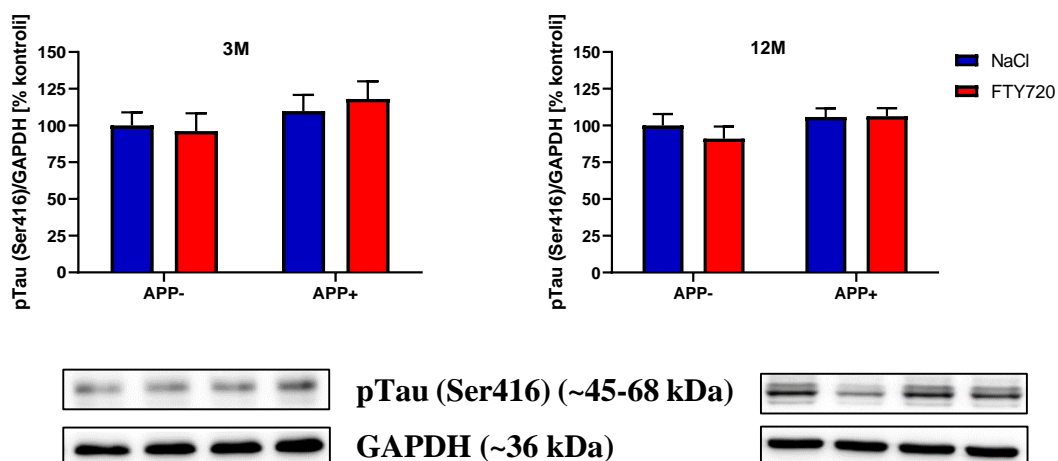
E



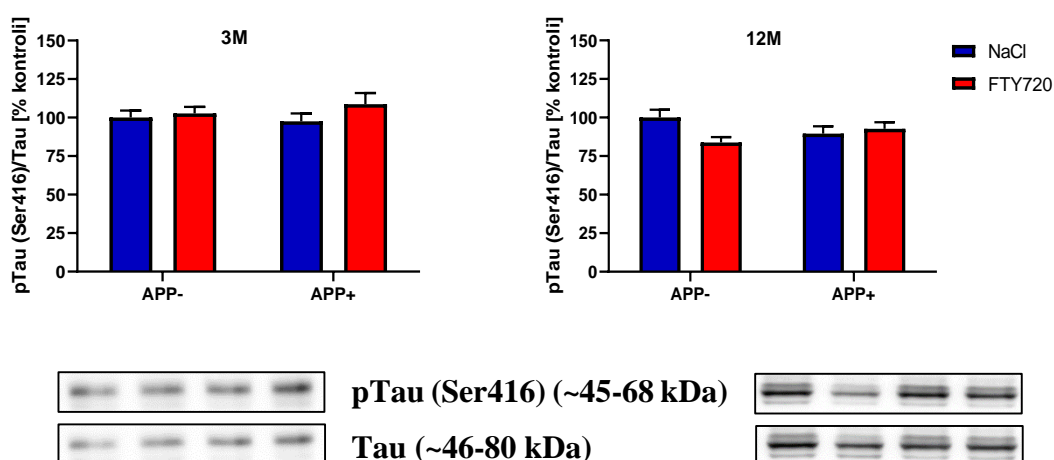
F



G



H



Rycina 20. Wpływ FTY720 na ekspresję genu (A) i immunoreaktywność całkowitej i ufosforylowanych form (B-H) białka Tau w korze mózgowej 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 5-8. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

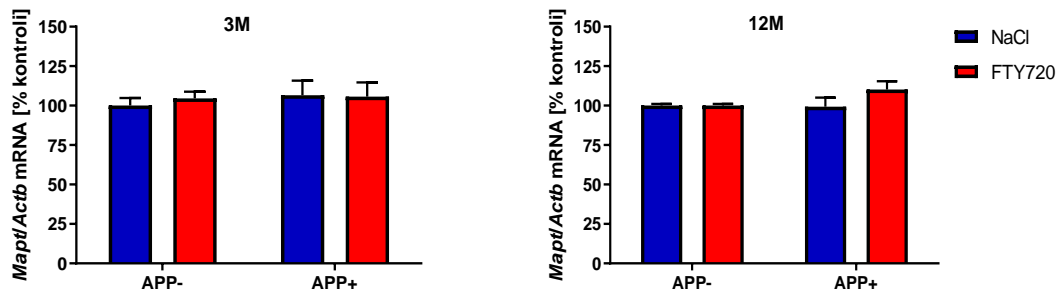
4.1.3.2 Białko Tau w hipokampie 3- i 12-miesięcznych myszy

Badania przeprowadzone w hipokampie nie wykazały istotnych zmian w poziomie mRNA *Mapt* (ryc. 21A) ani w immunoreaktywności całkowitego białka Tau w żadnej z badanych grup wiekowych (ryc. 21B). Stwierdzono natomiast znamiennej wzrost poziomu fosforylacji białka Tau na serynie 416 w hipokampie 12-miesięcznych zwierząt transgenicznym (ryc. 21G). Nie wykazano znamienych różnic w stosunku formy ufosforylowanej na Ser416 do całkowitego białka Tau (pTau (Ser416)/Tau) (ryc. 21H). Nie

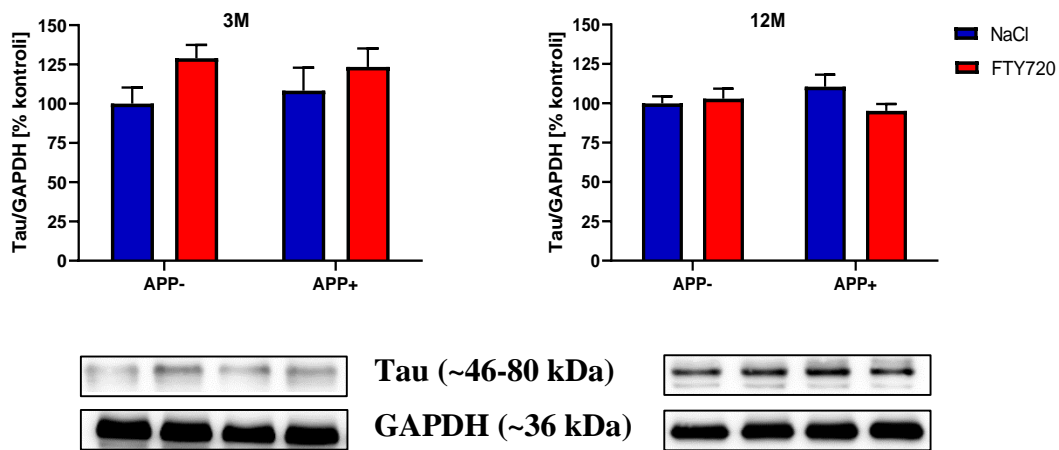
Wyniki

stwierdzono znamienne zmiany w poziomie fosforylacji na Ser396 (ryc. 21C,D) ani na Ser199/202 (ryc. 21E,F).

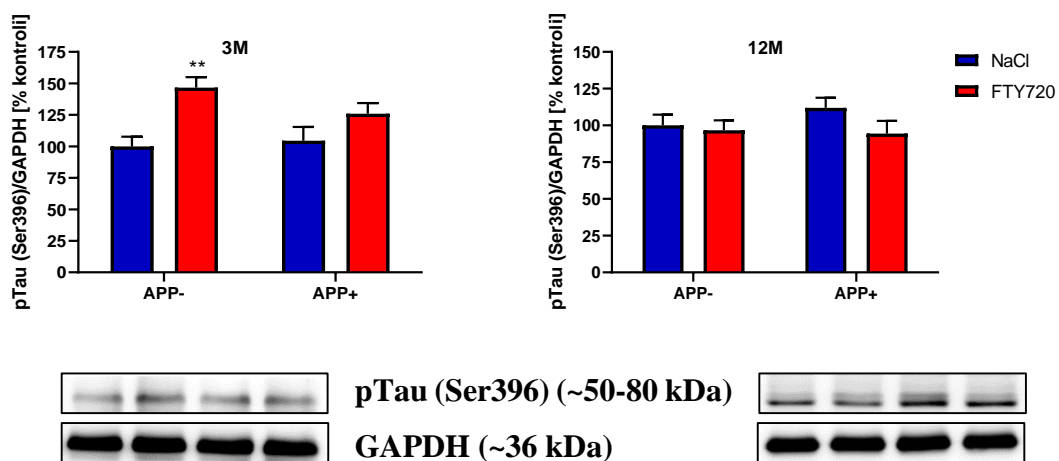
A



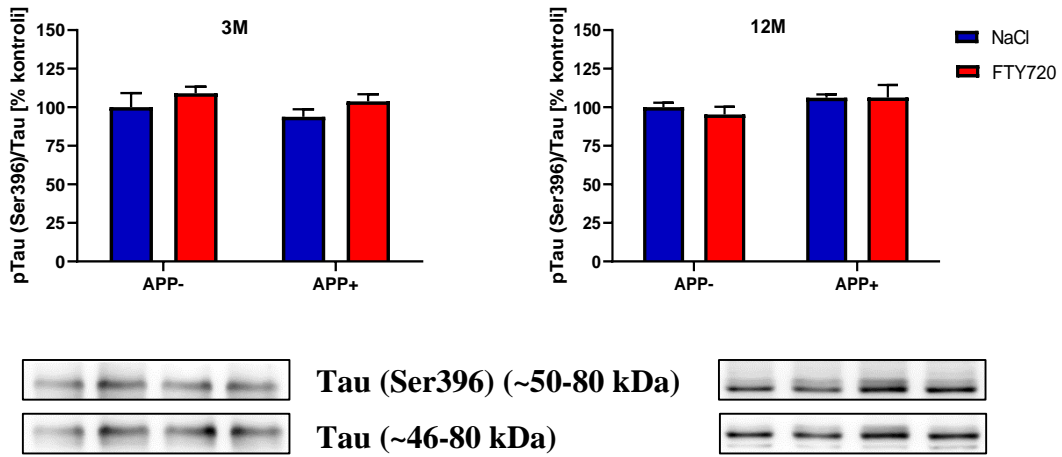
B



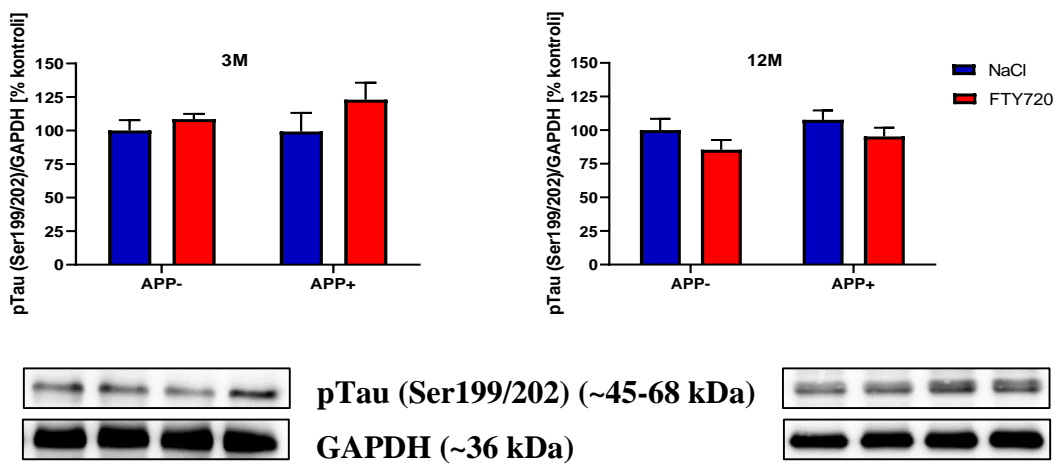
C



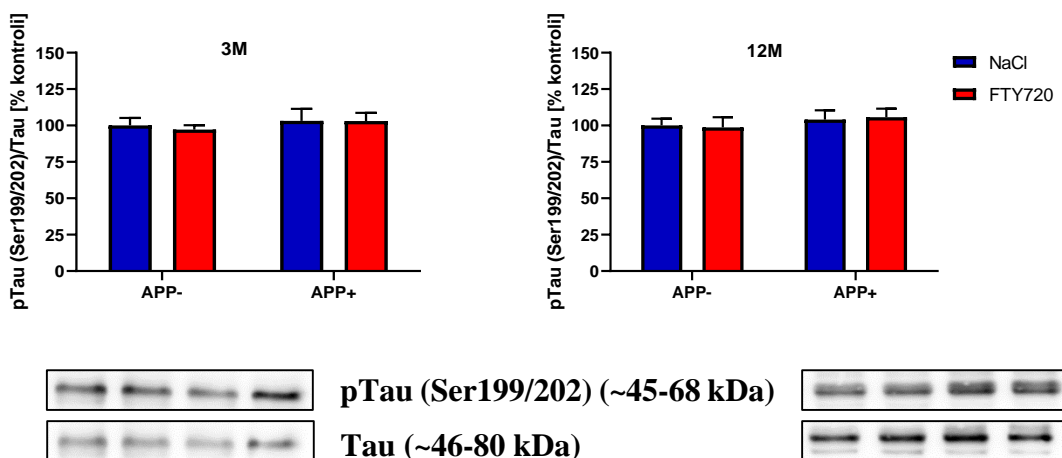
D



E

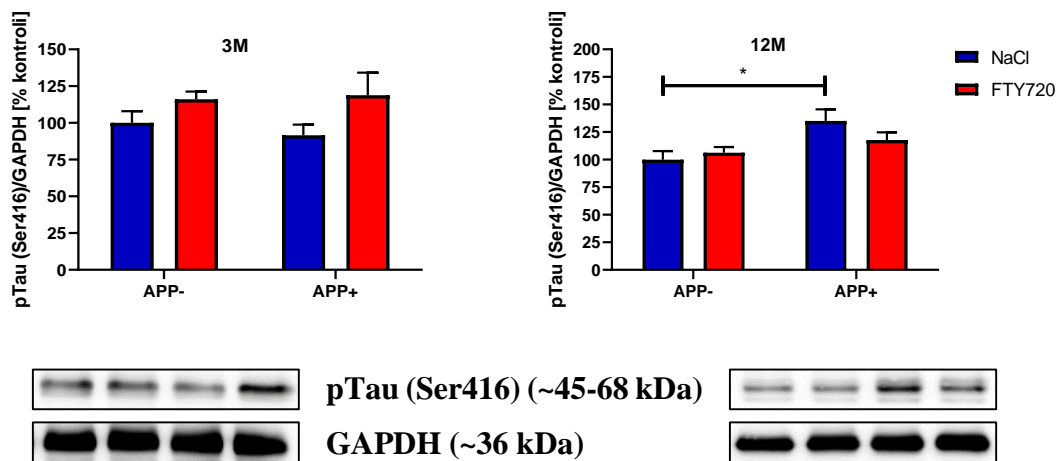


F

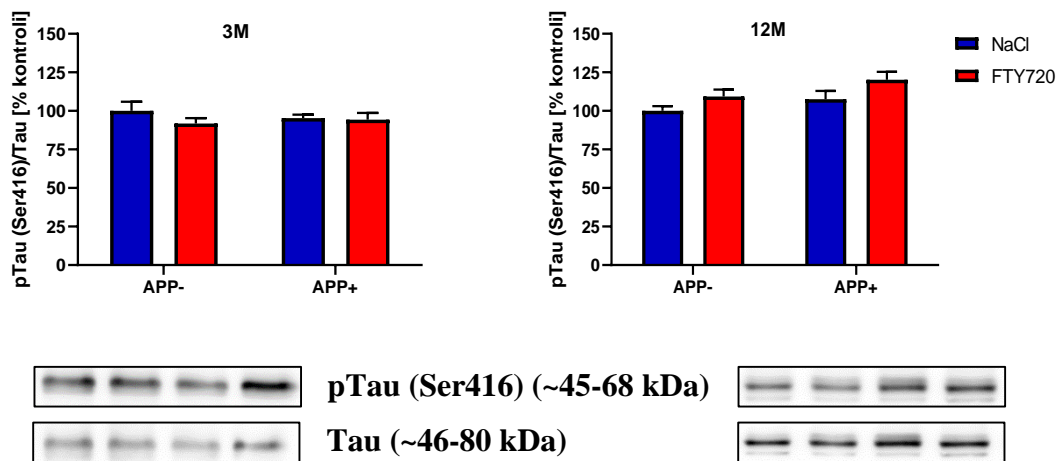


Wyniki

G



H



Rycina 21. Wpływ FTY720 na ekspresję genu (A) i immunoreaktywność całkowitej i ufosforylowanych form (B-H) białka Tau w hipokampie 3- (3M) i 12-miesięcznych (12M) myszy APP⁻ i APP⁺.

Dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya; n = 5-8. * p < 0,05; ** p < 0,01 względem NaCl APP⁻. Pod wykresami dotyczącymi wyników analizy Western Blot umieszczono reprezentacyjne obrazy immunodetekcji.

4.2 Badania *in vitro*

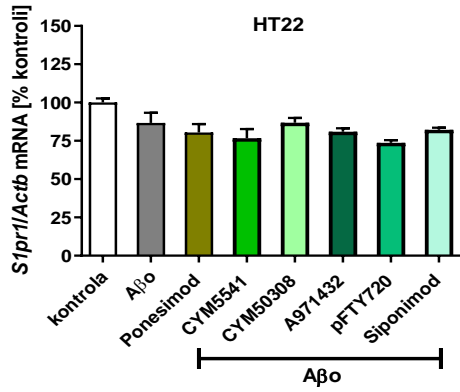
4.2.1 Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane działaniem A β zmiany w ekspresji genów kodujących receptory dla S1P w komórkach HT22 i BV2

Rozwinięciem badań *in vivo*, w których weryfikowano neuroprotektoryjne właściwości nieselektywnego modulatora S1PR, fingolimodu, był drugi etap badań przeprowadzony w warunkach *in vitro*. W doświadczeniach na modelach komórkowych ChA, tj. neuronach mysiego hipokampa (HT22) oraz komórkach mysiego mikrogleju (BV2) traktowanych oligomerami A β w stężeniu 1 μ M, wykorzystano selektywne agonisty S1PR (ponesimod, siponimod, CYM5541, CYM50308, A971432) oraz ufosforylowany fingolimod (aktywna farmakologicznie postać FTY720).

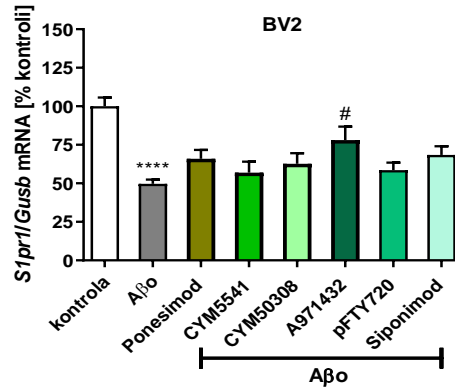
Ten etap badań rozpoczęto analizą wpływu wspomnianych związków na wywołane działaniem A β zmiany w ekspresji genów kodujących receptory dla S1P. Spośród pięciu zidentyfikowanych dotychczas receptorów wybrano cztery (S1PR1,3-5), poprzez które działa fingolimod. Zaobserwowano, że poziom mRNA *S1pr1* w komórkach linii BV2 uległ znamiennej obniżeniu do około 50% wartości kontrolnej po podaniu A β . Jednocześnie A971432 (agonista S1PR5) istotnie zwiększył ekspresję *S1pr1* do około 80% wartości kontrolnej (**ryc. 22B**). W komórkach linii BV2 ekspresja *S1pr3* była na bardzo niskim poziomie, który uniemożliwił jej oznaczenie za pomocą metody real-time PCR. Poziom ekspresji genów kodujących pozostałe receptory nie ulegał znamienym zmianom pod wpływem A β , chociaż w komórkach BV2 zaobserwowano wyraźną tendencję do obniżenia ekspresji *S1pr5* ($p = 0,0643$) (**ryc. 22G**). Odnotowano istotne obniżenie poziomu mRNA *S1pr4* po zastosowaniu A β z CYM5541 (agonista S1PR3) w komórkach HT22 (**ryc. 22D**) oraz znamienne podwyższenie ekspresji tego genu po podaniu A β z pFTY720 (modulator S1PR1,3-5) oraz siponimodem (agonista S1PR1,5) w komórkach BV2 (**ryc. 22E**).

Wyniki

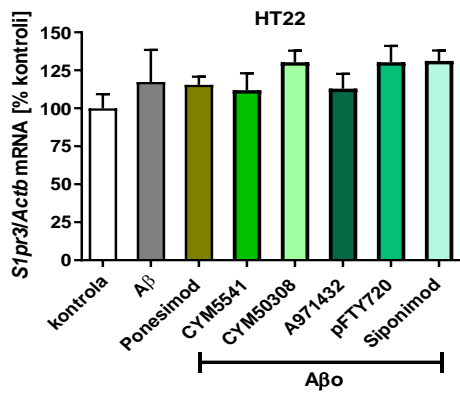
A



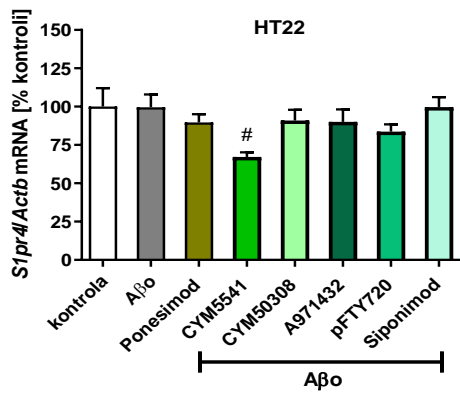
B



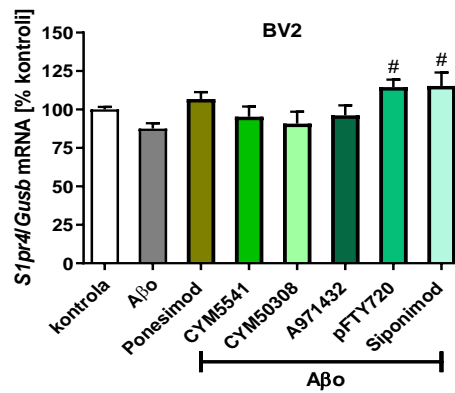
C



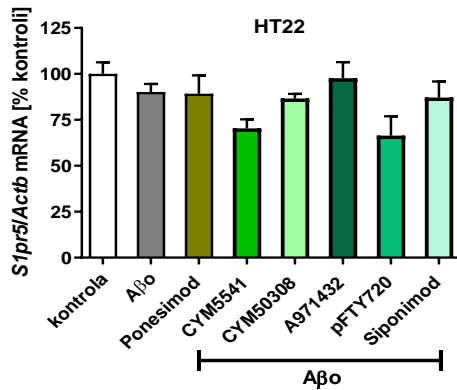
D



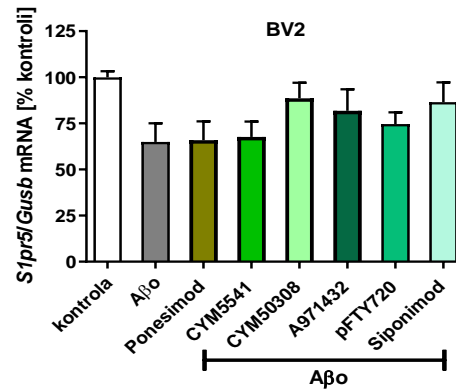
E



F



G



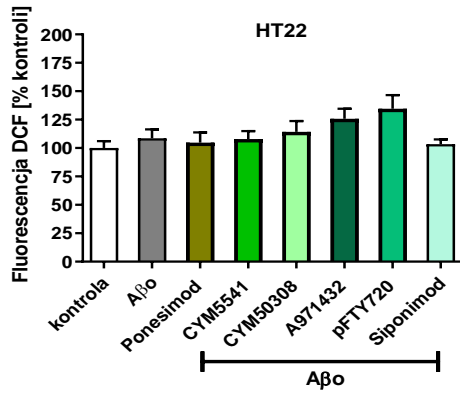
Rycina 22. Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane przez A β o zmiany ekspresji genów kodujących receptory dla S1P w komórkach HT22 (A,C,D,F) i BV2 (B,E,G).

Jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc Sidaka; n = 4-5. **** p < 0,0001 względem komórek kontrolnych (nietraktowanych A β o). # p < 0,05 względem komórek traktowanych A β o.

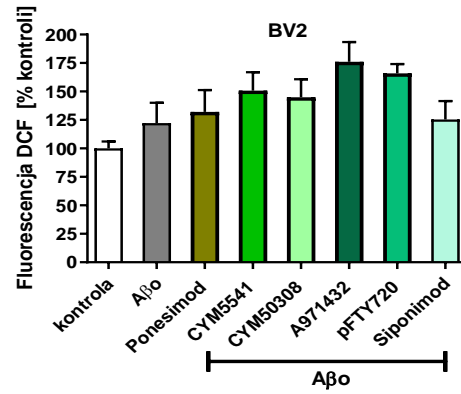
4.2.2 Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane działaniem A β o zmiany poziomu wolnych rodników, potencjału błony mitochondrialnej oraz żywotności komórek HT22 i BV2

Jak wskazują dane literaturowe przytoczone we wstępie, A β o może prowadzić do nieprawidłowości morfologicznych i funkcjonalnych mitochondriów, co prowadzi do niekorzystnych zmian energetycznych w komórce. Dlatego w kolejnym etapie zbadano wpływ modulatorów receptorów dla S1P na zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów wywołane przez A β o. Zarówno w komórkach HT22, jak i BV2 wykazano znamienne statystycznie obniżenie potencjału błony mitochondrialnej (**ryc. 23C,D**) oraz żywotności (**ryc. 23E,F**) komórek poddanych działaniu A β o, na co nie miały wpływu zastosowane modulatory S1PR. Nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie wolnych rodników po potraktowaniu komórek A β o (**ryc. 23A,B**), natomiast w komórkach BV2 odnotowano tendencję do zwiększonego stresu oksydacyjnego po podaniu A β o z badanymi modulatorami (**ryc. 23B**).

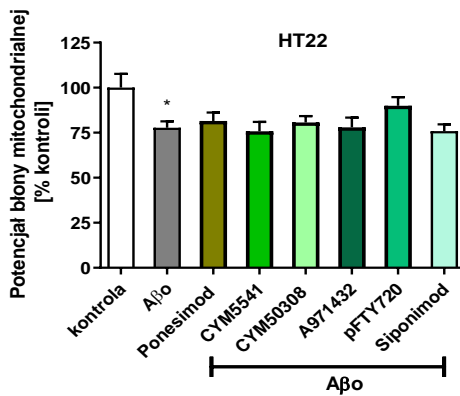
A



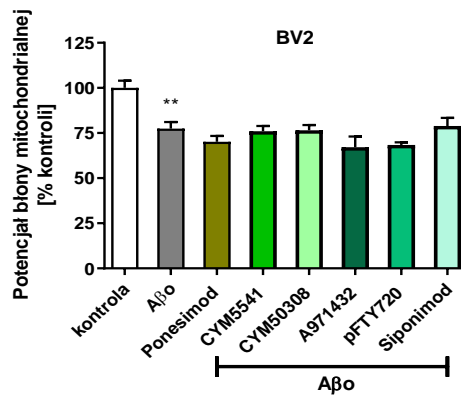
B



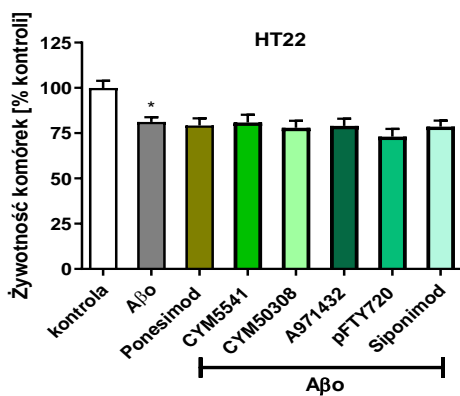
C



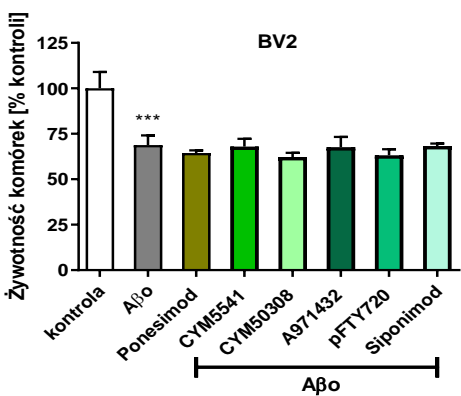
D



E



F



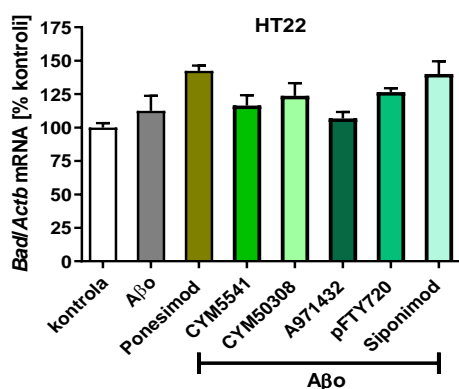
Rycina 23. Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane działaniem Aβo zmiany poziomu wolnych rodników (A,B), potencjału błony mitochondrialnej (C,D) i żywotności komórek (E,F) linii HT22 i BV2.

Jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc Sidaka; n = 4-6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 względem komórek kontrolnych (nietraktowanych Aβo).

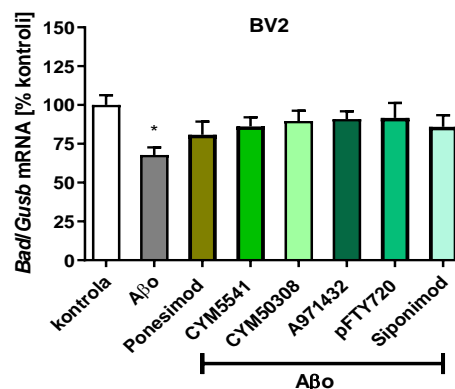
4.2.3 Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane działaniem A β zmiany w ekspresji genów kodujących białka pro- i antyapoptotyczne w komórkach HT22 i BV2

Zaburzenia czynnościowe mitochondriów mogą w konsekwencji prowadzić do apoptozy komórek. Dlatego w niniejszym podrozdziale zbadano wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane przez A β zmiany w ekspresji genów kodujących białka proapoptotyczne (BAD, BAX) oraz antyapoptotyczne (Bcl2, Bcl-XL). Podanie A β komórkom BV2 spowodowało znaczne obniżenie poziomu mRNA *Bad* (**ryc. 24B**), z kolei w komórkach HT22 odnotowano tendencję do wzrostu ekspresji tego genu pod wpływem A β (**ryc. 24A**). W obu liniach komórkowych zaobserwowano znaczne obniżony poziom mRNA antyapoptotycznego białka Bcl2 (**ryc. 24E,F**), który w komórkach HT22 został przywrócony do wartości kontrolnych po zastosowaniu CYM50308 (agonista S1PR4) i A971432 (agonista S1PR5) (**ryc. 24E**). Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie mRNA *Bax* po podaniu A β , natomiast zastosowanie A β z ponesimodem (agonista S1PR1), CYM5541 oraz CYM50308 znaczne zwiększało ekspresję tego genu w komórkach BV2 (**ryc. 24D**). Mimo znacznego obniżenia ekspresji *Bcl2* stosunek *Bax/Bcl2*, który jest lepszym wskaźnikiem podatności komórek na apoptozę, nie ulegał istotnym zmianom pod wpływem A β w żadnej z badanych linii komórkowych (**ryc. 24G,H**). Natomiast podanie A β z ponesimodem, A971432 i pFTY720 znaczne zwiększało stosunek *Bax/Bcl2* (i tym samym potencjał proapoptotyczny) w komórkach BV2 (**ryc. 24H**). W żadnej z badanych linii komórkowych nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji *Bcl2l1* (gen kodujący białko Bcl-XL) po podaniu A β (**ryc. 24I,J**).

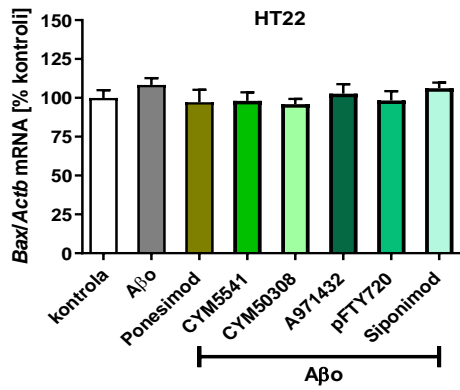
A



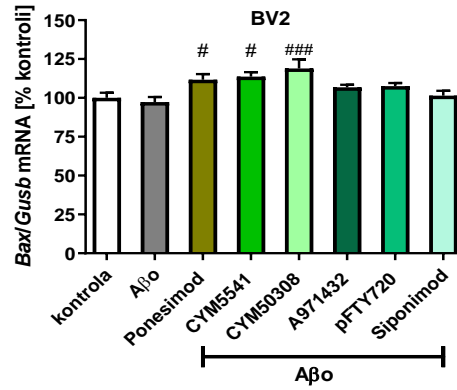
B



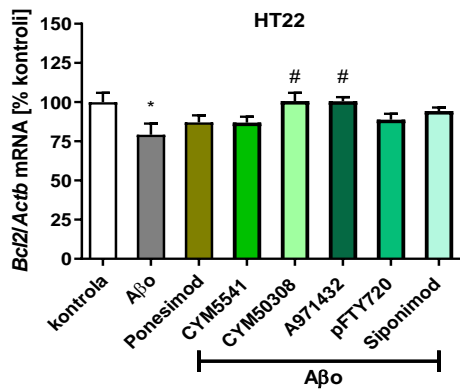
C



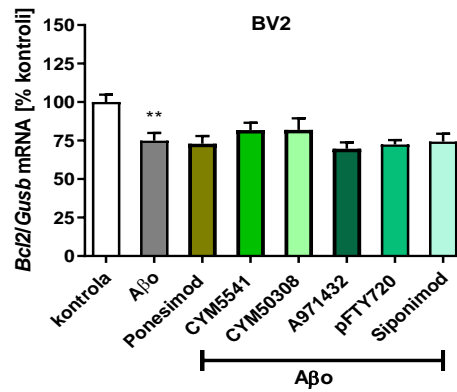
D



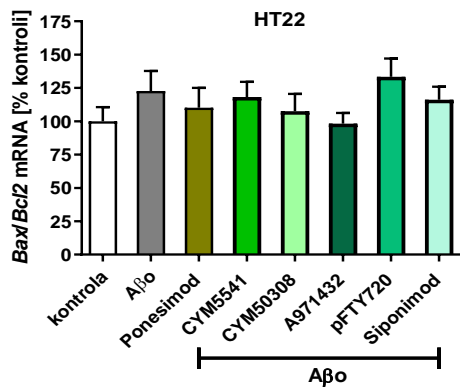
E



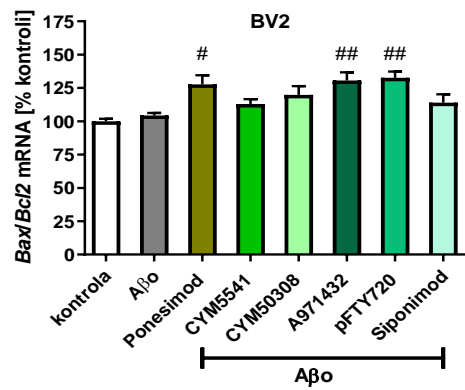
F



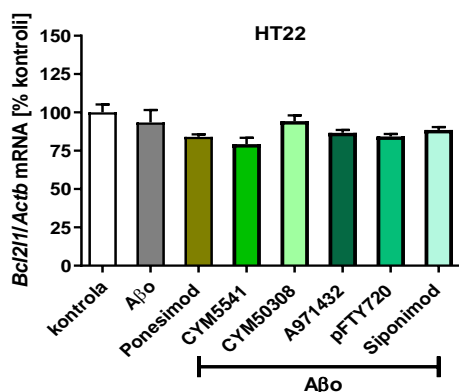
G



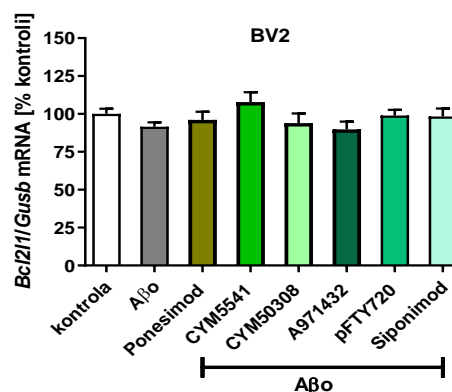
H



I



J



Rycina 24. Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane przez A β o zmiany ekspresji genów kodujących białka pro- i antyapoptotyczne w komórkach HT22 (A,C,E,G,I) i w komórkach BV2 (B,D,F,H,J).

Jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc Sidaka; n = 4-5. * p < 0,05; ** p < 0,01 względem komórek kontrolnych (nietraktowanych A β o). # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001 względem komórek traktowanych A β o.

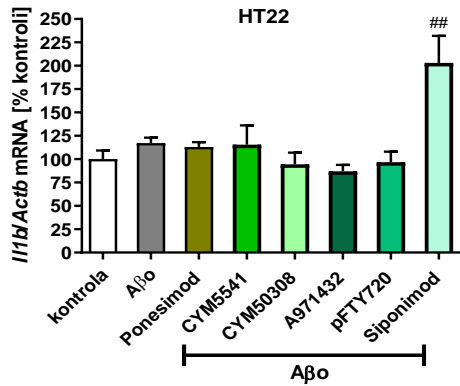
4.2.4 Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane działaniem A β o zmiany w ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne w komórkach HT22 i BV2

Neurozapalenie jest uznawane za istotny element przebiegu ChA, który wynika z zachwiania równowagi między pro- i przeciwzapalnymi cytokinami. W niniejszej pracy poddano analizie ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne. Badania wykazały znamienne wzrost poziomu mRNA *Il1b* w komórkach BV2 poddanych działaniu A β o (ryc. 25B), a podanie ponesimodu, CYM50308, A971432 i siponimodu potęgowało prozapalne działanie A β o. W komórkach HT22 A β o nie wywołały istotnych zmian w ekspresji *Il1b*, natomiast podanie A β o wraz z siponimodem powodowało znamienne wzrost ekspresji tego genu do ok. 200% wartości kontrolnej (ryc. 25A). Zarówno w komórkach HT22, jak i BV2 traktowanych A β o stwierdzono znamienne wzrost poziomu mRNA *Il6* (ryc. 25C,D), przy czym podanie pFTY720 komórkom HT22 powodowało istotne statystycznie obniżenie ekspresji tego genu, nie osiągając jednak wartości kontrolnej (ryc. 25C). W obu liniach komórkowych wykazano również znamienne obniżony poziom mRNA *Il18* wywołany przez A β o (ryc. 25E,F). Przeprowadzone doświadczenia wykazały znamienne wzrost poziomu mRNA *Tnf* w komórkach BV2 poddanych działaniu A β o (ryc. 25H). A β o nie

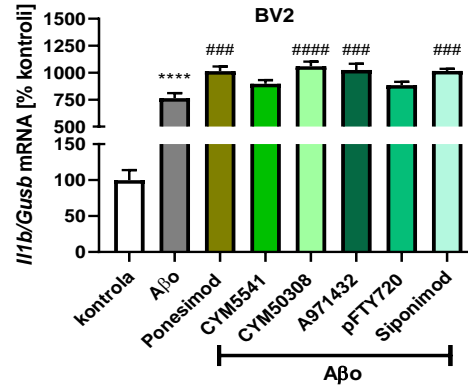
Wyniki

wywołały istotnych zmian w ekspresji *Tnf* w komórkach HT22, natomiast podanie A β z ponesimodem spowodowało w tej linii komórkowej znamieny wzrost poziomu mRNA *Tnf* do ok. 160% wartości kontrolnej (ryc. 25G).

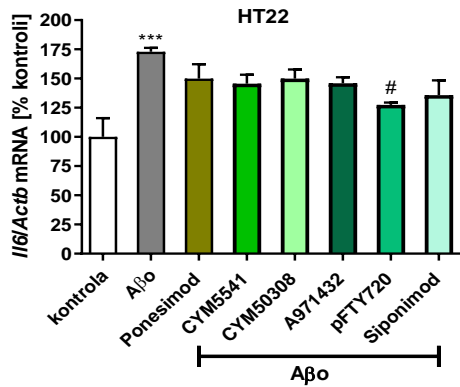
A



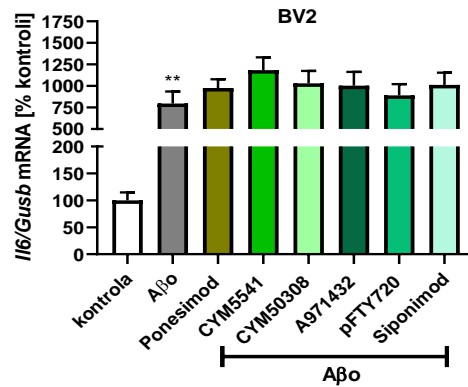
B



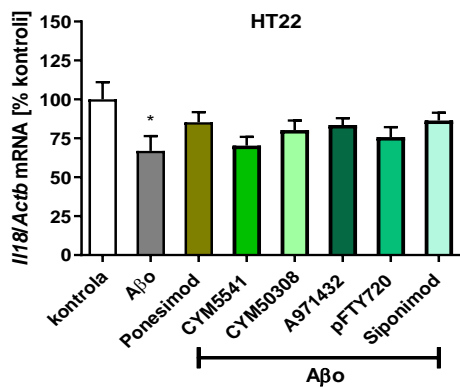
C



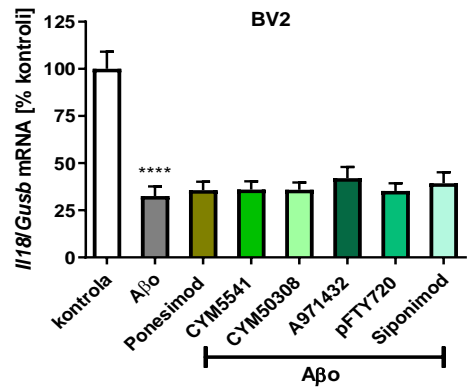
D



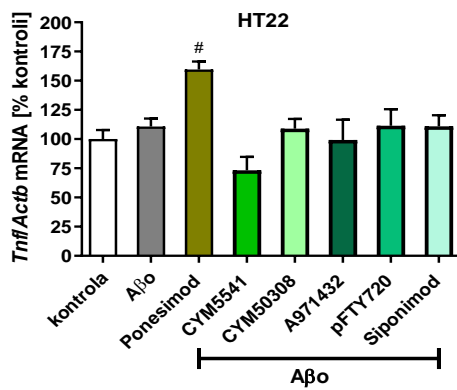
E



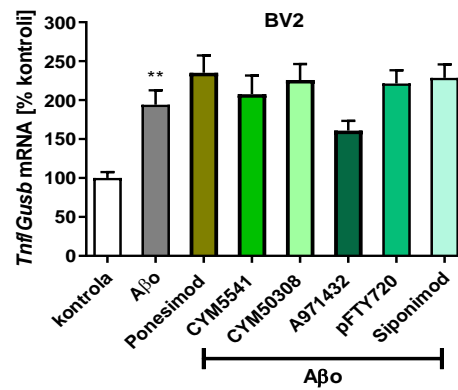
F



G



H



Rycina 25. Wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane przez Aβo zmiany ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne w komórkach HT22 (A,C,E,G) i BV2 (B,D,F,H).

Jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc Sidaka; n = 4-5. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 względem komórek kontrolnych (nietraktowanych Aβo). # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 względem komórek traktowanych Aβo.

5. Dyskusja

ChA jest dominującą formą otępienia, której częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem. Obecnie dostępne w Europie (w tym w Polsce) leki: inhibitory acetylocholinoesterazy (donepezyl, galantamina i rywastygmina) oraz antagonisty NMDAR (memantyna) poprzez poprawę funkcjonowania układów cholinergicznego i glutaminergicznego spowalniają postęp choroby, nie zapobiegając jednak jej powstawaniu [Graham i wsp., 2019]. Pewnym przełomem może wydawać się niedawne warunkowe dopuszczenie do obrotu przez FDA dwóch przeciwciał monoklonalnych: aducanumabu (2021) i lecanemabu (2023), których mechanizm działania ukierunkowany jest na usuwanie płytek starczych (aducanumab) lub protofibrili, czyli dużych rozpuszczalnych oligomerów A β (lecanemab). Jednak możliwość stosowania wspomnianych przeciwciał jedynie w leczeniu wczesnych stadiów ChA, liczne działania niepożądane (w tym zagrażające życiu obrzęki mózgu i krwawienia domózgowe) oraz brak dowodów na skuteczność kliniczną leków (nie udowodniono, że usuwanie A β wiąże się z poprawą funkcji poznawczych u chorych) [Beshir i wsp., 2022; Budd Haerberlein i wsp., 2022; van Dyck i wsp., 2023] wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań dotyczących terapii ukierunkowanych na leczenie przyczynowe. Co więcej, wcześniejsze niepowodzenia ze związkami ukierunkowanymi na hamowanie β - i γ -sekreazy [Doody i wsp., 2013; Imbimbo i Watling, 2019] sugerują poszukiwanie innych, mniej oczywistych punktów uchwytu. W niniejszej pracy podjęto badania dotyczące działania modulatorów receptorów dla bioaktywnego sfingolipidu sfingozyno-1-fosforanu (S1P) w zwierzęcym i komórkowych modelach ChA. Przeprowadzone badania, oprócz sprawdzenia potencjalnych właściwości neuroprotektoryjnych testowanych związków, w sposób pośredni miały również wskazać rolę S1P w patomechanizmie ChA.

Zgodnie z dominującą w badaniach nad ChA hipotezą kaskady amyloidowej przyczyną neurodegeneracji w ChA jest nieprawidłowy metabolizm białka prekursorowego peptydu amyloidu β (APP), w wyniku czego powstaje monomeryczny amyloid β (A β) podatny na tworzenie struktur wyższego rzędu takich jak oligomery, fibryle i płytki starcze [Selkoe i Hardy, 2016]. Zmieniony metabolizm APP jest w znacznej mierze związany z występowaniem mutacji w genie *APP*, co jest cechą charakterystyczną ChA o wczesnym początku (EOAD), często tożsamej z rodzinną postacią tej choroby (FAD). Dotychczas zidentyfikowano 52 mutacje, które mogą prowadzić do odkładania się A β w mięszu oraz naczyniach krwionośnych mózgu, z czego co najmniej 26 mutacji zmiany

sensu zlokalizowanych w obrębie lub bliskim sąsiedztwie sekwencji kodującej A β jest związanych z EOAD [Abondio i wsp., 2022]. Wspomniane mutacje dały podstawy tworzenia genetycznych modeli zwierzęcych i komórkowych ChA, które umożliwiają badanie mechanizmów choroby, jak również sprawdzenie działania związków farmakologicznie czynnych. W badaniach *in vivo* opisanych w niniejszej rozprawie wykorzystano transgeniczne myszy szczepu FVB-Tg transfekowane ludzkim genem dla APP z mutacją londyńską (oznaczane jako APP⁺), które stanowią jeden z modeli EOAD/FAD. Wybrany model charakteryzuje się zwiększonym wytwarzaniem bardziej toksycznego i podatnego na agregację A β ₁₋₄₂ i wzrostem stosunku A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀ [Eckman i wsp., 1997], co odróżnia go od równie popularnych modeli noszących mutację szwedzką, która powoduje ogólny wzrost wytwarzania A β (bez znaczącego wpływu na stosunek A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀) [Johnston i wsp., 1994]. Ponieważ zmiany neuropatologiczne w ChA obejmują przede wszystkim korę i hipokamp [Jahn, 2013], badaniom poddano te struktury mózgu.

Zaburzenia aktywności synaptycznej i utrata synaps należą do najwcześniejszych zmian w ChA poprzedzającą objawy kliniczne oraz odkładanie się blaszek starczych i są głównie powodowane przez zwiększony poziom oligomerów A β (A β o) [Marsh i Alifragis, 2018]. Zaobserwowano, że A β o wpływają na plastyczność synaptyczną, hamując długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. long-term potentiation, LTP), a promując długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. long-term depression, LTD), co przyczynia się do powstawania zaburzeń pamięci [Lambert i wsp., 1998; Walsh i wsp., 2002; Hsieh i wsp., 2006; Li i wsp., 2009]. Dzieje się to w wyniku długotrwałej ekspozycji i/lub przy wysokim stężeniu A β , gdyż krótkotrwała ekspozycja neuronów na bardzo niskie stężenia A β może zwiększać LTP [Puzzo i wsp., 2008; Russell i wsp., 2012]. Wywołane przez A β zaburzenia synaptyczne mogą być związane z pobudzeniem postsynaptycznych NMDAR, co wiąże się ze zwiększonym napływem Ca²⁺ do zakończeń postsynaptycznych, prowadząc do ekscytotoksyczności synaptycznej [Kelly i Ferreira, 2006; Shankar i wsp., 2007]. A β zaburza również wychwytywanie glutaminianu ze szczeliny synaptycznej zarówno poprzez hamowanie transporterów astrocytarnych, jak i neuronalnych [Matos i wsp., 2008; Li i wsp., 2009; Matos i wsp., 2012]. Równie istotnym zagadnieniem jest wpływ A β na przekaźnictwo synaptyczne, w tym na jego początkowe etapy, czyli na dynamikę pęcherzyków synaptycznych (SV) i uwalnianie neuroprzekaźników z zakończeń presynaptycznych. Liczne badania wskazują, że A β wpływa na białka, które regulują interakcję SV z błoną presynaptyczną oraz dostępność SV do udziału w uwalnianiu

neuroprzekaźników [Russell i wsp., 2012; Carvalho i wsp., 2015; Mirza i wsp., 2021]. W niniejszej rozprawie w pierwszej kolejności zbadano ekspresję genów i poziom immunoreaktywności białek tworzących kompleks SNARE. Białka kompleksu SNARE, czyli STX1A, SNAP-25 oraz VAMP1 i VAMP2, są bezpośrednio zaangażowane w fuzję SV z błoną presynaptyczną i przez to krytyczne dla regulacji uwalniania neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano istotne obniżenie ekspresji *Vamp1* w korze mózgu zwierząt APP⁺ w obu grupach wiekowych oraz w hipokampie myszy 3-miesięcznych, co pozostaje w zgodzie z wynikami uzyskanymi z badań przeprowadzonych na hipokampie i korze śródwęchowej pacjentów z ChA [Berchtold i wsp., 2013]. Zmiany w poziomie mRNA *Stx1a* i *Snap25* odnotowano jedynie w hipokampie 12-miesięcznych myszy APP⁺, gdzie oba geny wykazywały obniżoną ekspresję. Natomiast dane literaturowe pochodzące z badań na osobach z ChA wskazują na obniżoną ekspresję *SNAP25* w hipokampie oraz korze przedczołowej [Berchtold i wsp., 2013; Williams i wsp., 2021] oraz na obniżony poziom mRNA *STX1A* w korze czołowej oraz górnym zakręcie czołowym [Yao i wsp., 2003; Saetre i wsp., 2011; Williams i wsp., 2021]. Obniżenie ekspresji *Stx1a* zaobserwowano także w mózgu transgenicznych myszy z mutacją szwedzką w genie dla APP (APP^{swe}) [Yao i wsp., 2003]. Co ciekawe, analiza porównawcza mózgow osób z ChA i osób w podobnym wieku bez otępienia wykazała, że w obu przypadkach ekspresja większości genów synaptycznych ulega obniżeniu, natomiast dzieje się to w różnych regionach mózgu. W zdrowym, starzejącym się mózgu zmiany ekspresji genów synaptycznych dotyczą przede wszystkim obszary kory nowej (zakręt czołowy górny, zakręt postcentralny), podczas gdy w ChA najwięcej zmian obserwowanych jest w hipokampie [Berchtold i wsp., 2013]. Poza wyraźną tendencją do obniżenia poziomu SNAP-25 w hipokampie 3-miesięcznych zwierząt APP⁺ nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie immunoreaktywności białek kompleksu SNARE, chociaż obniżenie poziomu SNAP-25 i STX1A zostało zaobserwowano zarówno w badaniach post mortem mózgow pacjentów z ChA [Minger i wsp., 2011; Furuya i wsp., 2012; Williams i wsp., 2021], jak i w innych modelach doświadczalnych ChA [Pham i wsp., 2010; Carvalho i wsp., 2015]. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że wzrost wytwarzania A β ₁₋₄₂ spowodowany występowaniem mutacji londyńskiej w genie dla APP wpływa na regulację ekspresji tych białek głównie na poziomie transkrypcji. A to, które z białek przyczynia się do upośledzenia funkcji kompleksu SNARE, zależy od badanej struktury mózgu i grupy wiekowej.

Chociaż białka SNARE są wystarczające do fuzji SV z błoną presynaptyczną *in vitro*, proces ten w warunkach *in vivo* wymaga udziału dodatkowych białek, które regulują aktywność kompleksu SNARE [Sauvola i Littleton, 2021]. Dlatego w kolejnym etapie badań analizowano zmiany na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym w wybranych białkach regulatorowych kompleksu SNARE. W hipokampie 3- i 12-miesięcznych myszy APP⁺ zaobserwowano znacząco obniżoną ekspresję *Syt1*, co koresponduje z wynikami uzyskanymi w badaniach na materiale autopsyjnym pochodzącym od pacjentów z ChA [Berchtold i wsp., 2013]. Powszechnie uznaje się, że przyłączenie Ca²⁺ do SYT1, która pełni rolę czujnika stężenia tych jonów, wywołuje szybkie synchroniczne uwalnianie neuroprzekaźnika. Delecja genu dla SYT1 w neuronach przodomózgowia powodowała zablokowanie wyzwalanego przez Ca²⁺ szybkiego synchronicznego uwalniania neuroprzekaźnika [Maximov i Südhof, 2005; Xu i wsp., 2012], dlatego obniżony poziom mRNA *Syt1* może wiązać się ze wzrostem znaczenia asynchronicznego (i jednocześnie wolniejszego) uwalniania zależnego od Ca²⁺ lub zwiększoną częstotliwością spontanicznej egzocytozy SV przy braku potencjału czynnościowego. Zmianę w immunoreaktywności SYT1 stwierdzono jedynie w korze mózgu 3-miesięcznych zwierząt transgenicznych. Istotny statystycznie wzrost poziomu SYT1 uzyskany w przedstawionych w tej rozprawie badaniach różni się od wyników uzyskanych na podstawie analizy post mortem mózgow osób we wczesnym stadium ChA, gdzie stwierdzono obniżony poziom SYT1 w korze czołowej [Reddy i wsp., 2005]. Pozostaje on jednak w zgodzie z kierunkiem zmian ekspresji *Syt1* w korze mózgu 3-miesięcznych myszy APP⁺ zaprezentowanym w niniejszej pracy, co oznacza, że w młodszym wieku wpływ zmienionego metabolizmu APP na synaptotagminę 1 jest różny w korze i hipokampie. Oprócz zmian w ekspresji *Syt1*, w hipokampie 12-miesięcznych zwierząt APP⁺ stwierdzono również znamienne obniżony poziom mRNA *Cplx1*. CPLX1 jest cytozolowym białkiem, które uczestniczy w przygotowaniu SV do fuzji z błoną presynaptyczną (ang. priming) oraz, podobnie jak SYT1, promuje wywołane potencjałem czynnościowym synchroniczne uwalnianie neuroprzekaźnika [Yang i wsp., 2013; López-Murcia i wsp., 2019]. Obniżony poziom CPLX1 stwierdzono w dolnej korze skroniowej oraz górnym zakręcie skroniowym autopsyjnych mózgow osób z ChA [Tannenberg i wsp., 2006; Beerli i wsp., 2012]. Dodatkowo w górnym zakręcie skroniowym zaobserwowano wyraźną tendencję do obniżenia poziomu mRNA *CPLX1* [Beerli i wsp., 2012]. Biorąc pod uwagę, że zarówno SYT1, jak i CPLX1 pełnią istotną funkcję w synchronicznym uwalnianiu neuroprzekaźnika, obniżona ekspresja obu genów dla tych białek w hipokampie

12-miesięcznych myszy transgenicznych może powodować poważniejsze zaburzenia przekąźnictwa synaptycznego niż te obserwowane u myszy 3-miesięcznych, u których obniżeniu ulega jedynie *Syt1*. W przeciwieństwie do ekspresji *Syt1* i *Cplx1*, znacząco niższy poziom mRNA *Nrxn1* stwierdzono zarówno w korze, jak i hipokampie 12-miesięcznych myszy APP⁺. *Nrxn1* razem z postsynaptycznymi neuroliginami odpowiada za przebieg synaptogenezy [Reissner i wsp., 2013]. Obniżony poziom izoformy β zaobserwowano w szczurzym hipokampie po podaniu A β ₂₅₋₃₅ [Xiao i wsp., 2021] i w synaptosomach pochodzących z kory i hipokampa transgenicznych myszy z podwójną mutacją w genie dla APP (mutacja szwedzka i mutacja Indiana) [Naito i wsp., 2017]. Obniżona ekspresja *Nrxn1* w obu strukturach mózgu u 12-miesięcznych myszy APP⁺ przy braku istotnych zmian u młodszych zwierząt transgenicznych może wskazywać, że zaburzenia tworzenia synaps stają się istotną przyczyną zaburzeń przekąźnictwa synaptycznego dopiero w bardziej zaawansowanym stadium choroby. W przypadku SYP oraz SYN1 nie stwierdzono znamienych różnic w ekspresji genów kodujących te białka pomiędzy zwierzętami APP⁺ i kontrolnymi (APP⁻) w żadnej grupie wiekowej ani strukturze mózgu, choć dane literaturowe wskazują na istotnie obniżony poziom mRNA zarówno SYP, jak i SYN1 w hipokampie i zakręcie górnym czołowym oraz SYP w korze czołowej autopsyjnych mózgow osób z ChA [Heffernan i wsp., 1998; Berchtold i wsp., 2013]. Zaskakujący może wydawać się znamieny wzrost immunoreaktywności SYP w korze mózgu 3-miesięcznych myszy APP⁺, który nie koresponduje z kierunkiem zmian ekspresji genu dla tego białka oraz z wynikami uzyskanymi z analiz post mortem, gdzie poziom SYP w korze mózgu nie ulegał zmianom lub ulegał obniżeniu [Sze i wsp., 1997; Yuki i wsp., 2014; Poirel i wsp., 2018]. Zaobserwowana zmiana może być charakterystyczna dla mutacji londyńskiej w genie dla APP, co wymaga potwierdzenia na innych transgenicznych modelach ChA. Podsumowując, zarówno w przypadku białek kompleksu SNARE, jak i białek regulatorowych mutacja londyńska w genie dla APP powoduje przede wszystkim obniżenie ekspresji badanych białek na poziomie transkrypcyjnym. Częstsze zmiany w poziomie mRNA obserwowane w hipokampie sugerują, że w badanym modelu wpływ A β na białka presynaptyczne różni się w zależności od struktury mózgu. Dodatkowo występowanie zmian głównie u myszy 12-miesięcznych wskazuje, że niekorzystny wpływ mutacji londyńskiej na przekąźnictwo synaptyczne wzrasta wraz z wiekiem i zaawansowaniem choroby.

W ostatnich dwóch dekadach żywo dyskutowanym tematem stał się udział bioaktywnych sfingolipidów w patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych, w tym

ChA. Spośród licznych przedstawicieli tej rodziny szczególną uwagę zwraca sfingozyno-1-fosforan (S1P), fosforanowa pochodna sfingozyny, który według obecnego stanu wiedzy jako jedyny sfingolipid działa wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo. S1P poprzez hamowanie apoptozy i promowanie proliferacji komórek wykazuje wyraźny prożyciowy charakter [Donati i wsp., 2005; 2007; Pyne i Pyne, 2010; Calise i wsp., 2012; Rutherford i wsp., 2013]. Badania materiału autopsyjnego pochodzącego od osób z ChA wykazały obniżony poziom S1P w kilku obszarach mózgu, w tym w hipokampie, a także zaburzenia w poziomie enzymów biorących udział w metabolizmie S1P przesuwające równowagę w kierunku degradacji S1P [Ceccom i wsp., 2014; Couttas i wsp., 2014]. Choć S1P może działać dwutorowo, to większość badań skupia swoją uwagę na jego zewnątrzkomórkowym działaniu poprzez specyficzne receptory. Dlatego to one stały się głównym celem związków farmakologicznie czynnych, które mogą wpływać na sygnalizację zależną od S1P. Fingolimod (FTY720) jest pierwszym dopuszczonym do praktyki klinicznej lekiem z rodziny modulatorów receptorów dla S1P, który nieselektywnie przyłącza się do czterech z pięciu receptorów [Sharma i wsp., 2011]. Choć FTY720 jest definiowany jako agonista receptorów dla S1P, to zmniejszenie liczby S1PR1 pod wpływem fingolimodu sugeruje, że działa on jako funkcjonalny antagonist S1PR1 [Matloubian i wsp., 2004]. W praktyce klinicznej fingolimod jest stosowany w terapii ustępująco-nawracającej postaci SM, gdzie wykorzystywane są właściwości immunomodulujące tego związku. Jednak badania przeprowadzone na modelach różnych chorób neurodegeneracyjnych pokazują, że lek ten, ze względu na bezpośrednie działanie na układ nerwowy, może znaleźć zastosowanie kliniczne w innych schorzeniach niż SM [Bascuñana i wsp., 2020]. Istnieją dowody na to, że fingolimod może wpływać na przekaznictwo synaptyczne. W komórkach neuronalnych i neuroendokrynych fingolimod aktywował SYT i zwiększał egzocytozę w sposób zależny od stężenia [Darios i wsp., 2017]. W hodowli pierwotnej neuronów hipokampa pochodzących od podwójnie transgenicznych myszy APP/PSEN1 podanie fingolimodu zmniejszało funkcjonalność pozasynaptycznych NMDAR, natomiast aktywowało receptory znajdujące się na synapsach [Joshi i wsp., 2017]. Najnowsze badania Krivinko i wsp. na tym samym zwierzęcym modelu ChA wykazały wzrost poziomu białek gęstości postsynaptycznej w homogenacie korowym po podawaniu fingolimodu [Krivinko i wsp., 2022]. W niniejszej pracy po raz pierwszy zbadano wpływ fingolimodu na poziom mRNA i immunoreaktywność wybranych białek presynaptycznych w korze mózgu i hipokampie transgenicznych myszy FVB-Tg. Dootrzewnowe podanie fingolimodu 12-miesięcznym

zwierzętom APP⁺ znamienne zwiększało obniżoną ekspresję *Stx1a*, *Snap25*, *Cplx1* i *Nrxn1* w hipokampie oraz *Vamp1* w korze mózgu. W tej grupie wiekowej u myszy APP⁺ po podaniu fingolimodu zaobserwowano także znamienny wzrost poziomu mRNA *Syp* i *Vamp1* w hipokampie oraz *Stx1a*, *Snap25*, *Syt1* i *Cplx1* w korze mózgu. Fingolimod wywołał również istotnie statystycznie obniżenie immunoreaktywności SNAP-25 w hipokampie. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu fingolimodu na obniżony poziom mRNA *Syt1* w hipokampie myszy APP⁺ z żadnej grupy wiekowej ani na obniżony poziom mRNA *Vamp1* w korze i hipokampie 3-miesięcznych zwierząt transgenicznych. Nie zaobserwowano również znaczącego wpływu FTY720 na zwiększoną immunoreaktywność SYT1 i SYP w korze mózgu 3-miesięcznych myszy APP⁺. Uzyskane wyniki wskazują, że fingolimod może częściowo przywracać zaburzoną ekspresję genów dla białek synaptycznych, a przez to poprawiać zaburzone przekazywanie synaptyczne. Skuteczność fingolimodu w przeciwdziałaniu wywołanym przez mutację londyńską zmianom w ekspresji genów kodujących białka presynaptyczne w grupie starszych zwierząt wskazuje na istotne znaczenie sygnalizacji zależnej od S1P w bardziej zaawansowanych stadiach choroby.

Ścieżka sygnałowa PI3K-AKT jest uznawana za jednego z głównych regulatorów przeżycia i proliferacji komórek. Dodatkowo odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu układu nerwowego, w tym w funkcjonowaniu synaps. Stymulacja receptora dla melatoniny MT2 aktywowała AKT z następczym hamowaniem GSK-3 β i w ten sposób zwiększała aksonogenezę i przekazywanie synaptyczne w hodowli pierwotnej neuronów hipokampa [Liu i wsp., 2015]. W podobnym modelu aktywacja PI3K-AKT przez insulinę promowała rozwój kolców dendrytycznych i tworzenie synaps pobudzających [Lee i wsp., 2011]. Pobudzenie ścieżki PI3K-AKT wiązało się również z wywołaniem LTP w przyśrodkowej korze przedczołowej szczura [Sui i wsp., 2008]. W niniejszej rozprawie zbadano wpływ mutacji w genie dla APP na poziom mRNA *Akt1*. Nie zaobserwowano zmian w ekspresji *Akt1* w żadnej grupie wiekowej ani w żadnej z badanych struktur, co oznacza, że zwiększone wytwarzanie A β ₁₋₄₂ na skutek mutacji londyńskiej w genie dla APP nie wpływa na regulację ekspresji AKT na poziomie transkrypcji. Jest to zgodne z wynikami analizy poziomu mRNA *Akt1* przeprowadzonej w mózgu myszy z mutacją szwedzką w genie dla APP (myszy Tg2576) [Xia i wsp., 2019]. Kinaza AKT ulega aktywacji poprzez fosforylację na serynie 473, dlatego w kolejnym etapie zbadano poziom immunoreaktywności i stopień ufosforylowania kinazy AKT w mózgu transgenicznych myszy APP⁺. Brak istotnych zmian w immunoreaktywności AKT i poziomie

ufosforylowania tego białka stwierdzono w korze mózgu zwierząt APP⁺ z obu grup wiekowych. Dane literaturowe dotyczące poziomu immunoreaktywności oraz aktywności AKT w korze mózgu są rozbieżne. W innym modelu ChA – myszy NSE/hPS2m (z ludzkim zmutowanym genem dla PSEN2) – zaobserwowano obniżoną fosforylację kinazy AKT na serynie 473 [Gu i wsp., 2016] oraz stosunek formy ufosforylowanej na serynie 473 do całkowitej w korze mózgu [Koo i wsp., 2013]. Z kolei analiza post mortem kory skroniowej pacjentów z ChA (stadium IV i V wg Braaka) wykazała wzrost aktywności AKT (mierzonej stosunkiem pAKT (Ser473)/AKT) we frakcji podkomórkowej związanej z błoną komórkową oraz nieistotnie statystycznie obniżenie aktywności AKT we frakcji cytozolowej [Griffin i wsp., 2005]. Jeszcze inne badanie post mortem przeprowadzone na osobach ze zdiagnozowaną ChA (stadium V i VI wg Braaka) wykazało znamienne obniżony poziom całkowitej formy AKT oraz brak istotnych zmian w poziomie formy ufosforylowanej [Liu i wsp., 2011]. Biorąc pod uwagę powyższe dane, przedstawiony w tej pracy brak istotnych zmian w immunoreaktywności AKT oraz w poziomie ufosforylowania tego białka w korze mózgowej myszy z mutacją londyńską w genie dla APP może oznaczać, że jest to cecha charakterystyczna zastosowanego modelu badawczego. W przeciwieństwie do kory mózgowej, w hipokampie myszy transgenicznych odnotowano istotne statystycznie zmiany w stosunku pAKT (Ser473)/AKT – obniżenie u 3-miesięcznych zwierząt i wzrost u 12-miesięcznych myszy. Podobnie jak w przypadku zmian w korze mózgowej dostępne dane literaturowe nie dostarczają jednoznacznej odpowiedzi na temat roli AKT w hipokampie w ChA. Badania przeprowadzone przez Salkovic-Petrisic i wsp. na szczurzym modelu sporadycznej postaci ChA (SAD) wywołanej dokomorowym podaniem streptozotocyny (STZ) wykazały brak istotnych zmian w hipokampie w poziomie całkowitej kinazy AKT po 1 miesiącu od podania STZ oraz istotne statystycznie obniżenie po 3 miesiącach od podania STZ [Salkovic-Petrisic i wsp., 2006]. Yu i wsp., wykazali istotnie obniżony poziom pAKT i AKT w hipokampie w szczurzym modelu ChA wywołanym podaniem chlorku glinu [Yu i wsp., 2018]. Również badania post mortem osób z ChA (stadium V i VI wg Braaka) wykazały obniżony poziom pAKT w hipokampie [Steen i wsp., 2005]. Wyniki innej analizy na materiale autopsyjnym pokazały jednak wyraźną tendencję do wzrostu aktywności AKT (poziom pAKT oraz stosunek pAKT/AKT) w hipokampie osób z ChA w porównaniu do grupy kontrolnej bez ChA [Mufson i wsp., 2012]. Co ważne, stosunek pAKT (Ser473)/AKT u osób z ChA był istotnie podwyższony w porównaniu do osób z MCI, u których aktywność AKT była nieznacznie obniżona w porównaniu do zdrowej kontroli [Mufson

i wsp., 2012]. Wspomniany fakt wskazuje, że aktywność AKT nie jest stała we wszystkich stadiach zaburzeń poznawczych. Co więcej, aktywność AKT wydaje się ulegać przejściowemu obniżeniu we wczesnych fazach otępienia i wzrastać w bardziej zaawansowanych stadiach choroby, na co wskazują również wyniki uzyskane w niniejszej pracy.

PI3K-AKT poprzez liczne białka efektorowe reguluje różnorodne funkcje komórkowe, takie jak synteza białek, autofagia, przeżywalność komórkowa, cykl komórkowy, różnicowanie komórek i apoptoza [Kumar i Bansal, 2022]. Jednym z białek efektorowych kinazy AKT jest proapoptotyczne białko BAD. W postaci nieufosforylowanej BAD przyłącza się do prożyciowego białka Bcl-XL, co powoduje uwolnienie cytochromu c z mitochondriów i aktywację apoptozy. Kinaza AKT natomiast fosforyluje białko BAD na serynie 136, co prowadzi do jego związania się z białkiem adaptorowym 14-3-3 i uniemożliwia interakcję z Bcl-XL. W ten sposób zależny od BAD proces apoptozy ulega zahamowaniu. W ChA obserwuje się zwiększoną apoptozę neuronów [Smale i wsp., 1995; Eckert i wsp., 2003; Dickson, 2004], dlatego w niniejszej pracy zbadano wpływ mutacji londyńskiej w genie dla APP na ekspresję genu i poziom białka BAD oraz stopień jego ufosforylowania. W pierwszej kolejności skupiono się na analizie zmian na poziomie transkrypcji. Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie mRNA *Bad* w żadnej z badanych struktur mózgu ani w żadnej grupie wiekowej. Uzyskane wyniki pozostają w słuszności z wynikami ekspresji *Bad* w mózgach transgenicznych myszy APP/PSEN1 z trzech grup wiekowych: 6-, 9- i 12-miesięcznych [Abid i wsp., 2019], co sugeruje, że ani mutacja w *APP* ani w *PSEN1* nie prowadzą do zmian w ekspresji białka BAD na poziomie transkrypcji. Następnie zbadano poziom immunoreaktywności i ufosforylowania BAD, gdzie, podobnie jak w przypadku ekspresji *Bad*, nie stwierdzono istotnych zmian w żadnej z badanych struktur mózgu ani grup wiekowych. Brak istotnych zmian poziomu ufosforylowania BAD w korze mózgu myszy APP⁺ może być związany z brakiem znamienych różnic w poziomie ufosforylowania/aktywności AKT, inhibitora apoptotycznego działania białka BAD, w tej strukturze mózgu. W kontekście hipokampa, szczególnie w przypadku 3-miesięcznych myszy, u których zaobserwowano tendencje do wzrostu poziomu pBAD (Ser136), uzyskane wyniki wydają się przeczyć zależności (którą potwierdzono u myszy 5xFAD [Modi i wsp., 2014]), że fosforylacja BAD jest pozytywnie skorelowana z ufosforylowaniem kinazy AKT. Podobną rozbieżność do tej przedstawionej w niniejszej pracy zaobserwowano jednak w badaniach Li i wsp., gdzie brak zmian w poziomie pAKT powodował znamienne obniżenie poziomu pBAD w szczyrym

hipokampie po podaniu $A\beta_{1-42}$ [Li i wsp., 2010]. Może to sugerować, że w regulowanie fosforylacji białka BAD na Ser136 zaangażowane są inne kinazy.

W kontekście patomechanizmu ChA szczególną rolę odgrywa kinaza GSK-3 β , która w największym stopniu odpowiada za fosforylację (również tę patologiczną) białka Tau [Martin i wsp., 2013]. Ponadto GSK-3 β zaangażowana jest w proces apoptozy [Llorens-Martín i wsp., 2014]. W niniejszej pracy zbadano ekspresję *Gsk3b* w zwierzęcym modelu ChA. Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA *Gsk3b* w żadnej grupie wiekowej ani w żadnej z badanych struktur mózgu. Jedyne badanie dotyczące ekspresji *Gsk3b* w ChA przeprowadzone w mózgu podwójnie transgenicznych myszy APP/PSEN1 wykazało istotny statystycznie wzrost poziomu mRNA *Gsk3b*. Zaobserwowane zmiany były mniejsze u zwierząt 6-miesięcznych i wzrastały do podobnego poziomu u myszy 9- i 12-miesięcznych [Abid i wsp., 2019]. Przedstawione wyniki mogą sugerować, że mutacja w genie dla APP samodzielnie nie jest wystarczająca do zmiany ekspresji GSK-3 β na poziomie transkrypcyjnym. Aktywność GSK-3 β zależy od modyfikacji potranslacyjnych. Jedną z nich jest katalizowana przez AKT fosforylacja na serynie 9, która powoduje zahamowanie aktywności GSK-3 β . W kolejnym etapie badań sprawdzono zatem poziom immunoreaktywności i stopień ufosforylowania GSK-3 β na serynie 9 u myszy z mutacją londyńską w genie dla APP. W korze mózgu zaobserwowano wyraźny, choć nieznamienisty ($p = 0,0896$) wzrost stosunku pGSK-3 β (Ser9)/GSK-3 β u 12-miesięcznych myszy APP⁺, który koreluje z kierunkiem zmian aktywności AKT w korze (tendencja wzrostowa stosunku pAKT (Ser473)/AKT u tych zwierząt). Poza tym wzrostowy kierunek zmian stwierdzono w przypadku poziomu ufosforylowanej formy GSK-3 β . Nie odnotowano istotnych zmian w poziomie ufosforylowania/aktywności GSK-3 β u 3-miesięcznych myszy APP⁺, choć zaobserwowano niewielką tendencję wzrostową. Brak znamiennych zmian w poziomie całkowitej i ufosforylowanej formy GSK-3 β w korze czołowej wykazano również w badaniach post mortem mózgow osób z ChA, chociaż w tym przypadku zaobserwowano niewielką tendencję spadkową [Liu i wsp., 2011]. Z kolei obniżenie ufosforylowania GSK-3 β na serynie 9 stwierdzono w komórkach neuronalnych SH-SY5Y poddanych działaniu oligomerów $A\beta_{1-40}$, co jednak mogło być spowodowane wysokim stężeniem oligomerów (10 μ M) [Huang i wsp., 2014]. Zaobserwowane w niniejszej pracy tendencje pozostają natomiast w zgodzie z badaniami Griffin i wsp., w których stwierdzono wzrost ufosforylowania GSK-3 β na serynie 9 i stosunku GSK-3 β (Ser9)/GSK-3 β we frakcji podkomórkowej związanej z błoną komórkową kory czołowej osób z ChA [Griffin i wsp., 2005]. Istotny statystycznie wzrost

poziomu formy ufosforylowanej GSK-3 β , a tym samym spadek aktywności stwierdzono natomiast w hipokampie 12-miesięcznych myszy APP⁺. Podobnie stosunek formy ufosforylowanej do całkowitej wykazywał wyraźną ($p = 0,0718$), acz nieznamienne tendencję do wzrostu. W przypadku 3-miesięcznych zwierząt transgenicznych zarówno poziom ufosforylowanej GSK-3 β , jak i stosunek formy ufosforylowanej do całkowitej wykazywał tendencję do obniżenia. Oba wyniki pozostają w zgodzie z teorią negatywnej regulacji aktywności GSK-3 β przez kinazę AKT.

Podsumowując, przedstawione powyżej wyniki wskazują, że w zastosowanym modelu nadekspresja ludzkiego zmutowanego genu dla APP wywiera istotny wpływ na sygnalizację zależną od kinazy AKT jedynie w hipokampie. Co więcej, wpływ ten jest różny w zależności od wieku zwierzęcia (zaawansowania choroby). Zahamowanie prożyciowej sygnalizacji u 3-miesięcznych myszy APP⁺ i jej aktywacja u starszych zwierząt transgenicznych może sugerować wykształcenie w przebiegu schorzenia mechanizmów kompensacyjnych w odpowiedzi na toksyczne działanie A β .

Kinaza AKT jest jednym z białek efektorowych zaangażowanych w sygnalizację zależną od S1P. Aktywacja ścieżki PI3K/AKT wywołana aktywacją SphK1 przez TNF- α prowadziła do zahamowania apoptozy w hodowli ludzkich hepatocytów, co było niezależne od S1PR [Osawa i wsp., 2001]. AKT uczestniczy również w receptorowym działaniu S1P, m.in. w aktywacji śródbłonkowej izoformy syntazy tlenu azotu [Igarashi i wsp., 2001; Morales-Ruiz i wsp., 2001] czy neuroprotektynym działaniu izofluranu w zwierzęcym modelu hipoksji-ischemii (niedokrwienia) [Zhou i wsp., 2010]. Aktywacja AKT wywołana pobudzeniem receptorów S1PR2 i S1PR3 zwiększała przeżywalność kardiomiocytów w modelu *in vivo* ischemii-reperfuzji [Means i wsp., 2007]. W niniejszej pracy zbadano wpływ modulacji receptorów dla S1P przez fingolimod na zmiany aktywności ścieżki sygnałowej zależnej od AKT wywołane przez mutację londyńską w genie dla APP. Podanie fingolimodu transgenicznym zwierzętom nie miało istotnego wpływu na zaobserwowane zmiany w poziomie ufosforylowania/aktywności AKT ani GSK-3 β . Natomiast w badaniach Jung i wsp. podanie fingolimodu znacząco obniżało zwiększony stosunek pAKT (Ser473)/AKT w korze mózgu 8-miesięcznych transgenicznych myszy 5xFAD [Jung i wsp., 2023]. Zaobserwowane różnice mogą wynikać z innego dawkowania fingolimodu. Zwierzętom w badaniu Jung i wsp. podawano fingolimod w dawce 0,03 mg/kg m.c. przez 7 miesięcy, podczas gdy w badaniach zaprezentowanych w niniejszej pracy zwierzęta otrzymywały lek w dawce 1 mg/kg m.c.

przez 14 dni, co wskazuje, że zastosowanie niższych dawek przez dłuższy czas jest korzystniejsze niż stosowanie wysokich dawek w krótszym czasie.

Nadmierna fosforylacja białka Tau obserwowana w ChA zwiększa jego skłonność do odkładania się w neuronach w postaci spletków neurofibrylarnych (NFT), które obok płytek starczych stanowią główną cechę neuropatologiczną ChA. A β może przyczyniać się do zaostrzenia zmian neuropatologicznych zależnych od białka Tau. Badania wskazują, że A β zwiększa fosforylację białka Tau, w czym pośredniczy, m.in. GSK-3 β [Takashima i wsp., 1998; Zheng i wsp., 2002; Oliveira i wsp., 2015]. W niniejszej pracy zbadano wpływ mutacji londyńskiej w genie dla APP na regulację ekspresji genu oraz poziom ufosforylowania białka Tau w wybranych miejscach ufosforylowania istotnych dla ChA. Analiza poziomu mRNA *Mapt* (gen kodujący białko Tau) nie wykazała istotnych różnic pomiędzy zwierzętami kontrolnymi i transgenicznymi w żadnej z badanych grup wiekowych ani w żadnej strukturze mózgu. Istotnych zmian w ekspresji *Mapt* nie zaobserwowano również w mózgu podwójnie transgenicznych myszy APP/PSEN1, choć 3-miesięczne zwierzęta wykazywały tendencję do obniżenia, a 12-miesięczne do wzrostu [Metaxas i wsp., 2019]. Otrzymane wyniki wskazują, że mutacja londyńska nie wpływa na regulację ekspresji białka Tau na poziomie transkrypcji. Poziom całkowitego białka Tau również nie wykazywał istotnych zmian w badanych strukturach mózgu i grupach wiekowych, co pozostaje w zgodzie z brakiem zmian na poziomie transkrypcyjnym. Następnie zbadano poziom ufosforylowania białka Tau przez GSK-3 β w wybranych kluczowych dla patologii ChA miejscach. Fosforylacja białka Tau na serynie 396 jest jedną z najwcześniejszych w przebiegu ChA (pojawia się przed wystąpieniem zaburzeń uczenia się i pamięci) [Kanno i wsp., 2014; Mondragón-Rodríguez i wsp., 2014] i sprzyja tworzeniu sparowanych filamentów helikalnych – podstawowych elementów strukturalnych NFT [Li i Paudel, 2006]. To głównie fosforylacja na serynie 396 (wraz z fosforylacją na serynie 404) odpowiada za utratę przez białko Tau zdolności do regulowania organizacji mikrotubul [Evans i wsp., 2000]. W zastosowanym modelu ChA nie zaobserwowano istotnych różnic w ufosforylowaniu białka Tau na serynie 396 w analizowanych strukturach mózgu i grupach wiekowych. Istotnych zmian nie stwierdzono również w poziomie ufosforylowania białka Tau na serynie 199/202. Miejsca te są fosforylowane w kolejnym etapie zmian neuropatologicznych w ChA [Mondragón-Rodríguez i wsp., 2014], chociaż inne badania wskazują, że fosforylacja na serynie 199/202 poprzedza fosforylację na serynie 396 [Kimura i wsp., 1996]. Wzrost fosforylacji na serynie 396 oraz na serynie 199/202 odnotowano natomiast w neuronach hipokampa

pochozących od potrójnie transgenicznych myszy 3xTg (z mutacją szwedzką w genie dla APP (APP^{swe}) oraz mutacjami w genach dla PSEN1 i Tau) [Chen i wsp., 2012; Chen i wsp., 2016; Fan i wsp., 2018]. Podobne wyniki dla fosforylacji na serynie 396 zaobserwowano w ludzkich (SH-SY5Y) i mysich (neuro-2a) komórkach neuroblastomy podwójnie transfekowanych ludzkimi zmutowanymi genami dla APP i Tau, a także pojedynczo transfekowanych ludzkim zmutowanym genem kodującym białko Tau. Jednocześnie pojedyncza transfekcja tych samych komórek ludzkim zmutowanym genem dla APP nie powodowała istotnych zmian w ufosforylowaniu białka Tau na serynie 396 [Fan i wsp., 2018]. Przytoczone dane wskazują na to, że mutacja jedynie w genie kodującym APP może być niewystarczająca do zwiększenia fosforylacji białka Tau na serynie 396 (i być może również na serynie 199/202), co może częściowo wyjaśniać przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki. W fosforylacji białka Tau uczestniczą poza GSK-3 β również inne kinazy, takie jak CDK5, MAPK i CaMKII. Aby sprawdzić, czy mutacja londyńska w genie dla APP wpływa na fosforylację białka Tau niezależną od GSK-3 β , w niniejszej rozprawie zbadano poziom fosforylacji białka Tau na serynie 416, za którą odpowiada CaMKII [Yamamoto i wsp., 2005]. Nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie ufosforylowania białka Tau na serynie 416 w korze mózgu ani w hipokampie 3-miesięcznych myszy APP⁺. Istotnie zwiększoną fosforylację stwierdzono natomiast w hipokampie 12-miesięcznych myszy APP⁺, chociaż stosunek pTau (Ser416)/Tau nie wykazywał istotnych różnic. Otrzymane wyniki są w zgodzie z badaniami przeprowadzonymi na myszach 3xTg [Gondard i wsp., 2019] i sugerują, że mutacja londyńska w genie dla APP może aktywować CaMKII w hipokampie, co wymaga jednak dalszych badań. Badania Fagan i wsp., wykazały, że fingolimod może obniżać ufosforylowanie białka Tau [Fagan i wsp., 2022]. W niniejszej pracy podanie fingolimodu nie miało jednak istotnego wpływu na poziom badanej fosforylacji, choć zaobserwowano niewielką tendencję do jej obniżenia. Może to wynikać z krótkiego czasu (14 dni) podawania leku w niniejszych badaniach w porównaniu do 2- i 6-miesięcznego czasu leczenia zastosowanego w przytoczonej publikacji.

Jak wspomniano we wstępie poszczególne receptory dla S1P są w różnym stopniu zaangażowane w odbywające się w komórce procesy, a ich jednoczesne pobudzenie, jak ma to miejsce w przypadku fingolimodu, skutkuje licznymi działaniami niepożądanymi. Prace badawcze nad nowymi agonistami dla S1PR poszły zatem w kierunku poszukiwania związków o większej selektywności, działających na wybrany receptor. W części *in vitro* niniejszej rozprawy zbadano działanie selektywnych agonistów receptorów dla S1P:

siponimodu (S1PR1,5), ponosimodu (S1PR1), CYM5541 (S1PR3), CYM50308 (S1PR4), A971432 (S1PR5), a także ufosforylowanego fingolimodu/pFTY720 (aktywna farmakologicznie postać FTY720) w toksyczności A β . To właśnie rozpuszczalne oligomery uważane są bowiem za najbardziej patogenną postać A β [Sengupta i wsp., 2016]. Oprócz bezpośredniego toksycznego działania na komórki nerwowe, A β mogą wykazywać neurotoksyczność poprzez wpływ na mikroglej [Maezawa i wsp., 2011]. W niniejszej pracy właściwości proapoptotyczne i prozapalne A β , a także wpływ wymienionych wyżej modulatorów receptorów dla S1P sprawdzono w dwóch liniach komórkowych: mysich neuronach hipokampa (linia HT22) oraz komórkach mysiego mikrogleju (linia BV2), które poddano działaniu egzogennych A β w stężeniu 1 μ M wybranym na podstawie danych literaturowych.

W pierwszej kolejności zbadano wpływ A β na ekspresję genów kodujących cztery receptory dla S1P (S1PR1,3-5), poprzez które swoje działanie wywiera fingolimod. Dotychczas nie badano wpływu A β na poziom mRNA tych receptorów w neuronach ani w mikrogleju, jednak w niniejszej pracy wydaje się to uzasadnione, biorąc pod uwagę mechanizm działania zastosowanych w badaniach związków chemicznych. Przeprowadzona analiza wykazała znamienne obniżony pod wpływem A β poziom mRNA *S1pr1* w komórkach BV2, który został istotnie zwiększony do około 80% wartości kontrolnej przez agonistę S1PR5, A971432. Podobne obniżenie ekspresji *S1pr1* stwierdzono w szczurzych komórkach guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy (linia PC12) transfekowanych ludzkim genem dla APP typu dzikiego i z mutacją szwedzką [Gassowska i wsp., 2014]. To sugeruje, że skuteczność ponosimodu, który jest selektywnym agonistą S1PR1, może być ograniczona w mikrogleju, zakładając jedynie receptorowy mechanizm działania tego leku. W komórkach mikrogleju traktowanych A β zaobserwowano także wyraźną tendencję do obniżenia poziomu mRNA *S1pr5* ($p = 0,0643$). Jednocześnie ekspresja *S1pr1* i *S1pr5* w komórkach HT22 poddanych działaniu A β wykazała jedynie nieznaczne obniżenie. W przypadku *S1pr4* nie odnotowano wpływu A β zastosowanego samodzielnie na ekspresję tego genu w żadnej z badanych linii komórkowych. Natomiast istotne obniżenie poziomu mRNA *S1pr4* stwierdzono w komórkach HT22 traktowanych A β wraz z agonistą S1PR3, CYM5541. Z kolei znamienne wzrost ekspresji *S1pr4* wykazano w komórkach BV2 traktowanych A β z pFTY720 i siponimodem. Uzyskane wyniki wskazują, że A β wpływa na regulację ekspresji S1PR na poziomie transkrypcyjnym przede wszystkim w mikrogleju.

Jednym z objawów ChA powodowanych przez A β o jest nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów, co wiąże się ze zdolnością oligomerów do akumulowania się w tych organellach [Manczak i wsp., 2006; Calkins i wsp., 2011; Mota i wsp., 2021]. Zaburzeniom ulega potencjał błony mitochondrialnej (MMP) oraz łańcuch transportu elektronów, co prowadzi do obniżenia poziomu ATP i zwiększonego wytwarzania RFT. Obserwuje się także uwalnianie cytochromu c z mitochondriów [Rhein i wsp., 2009; Umeda i wsp., 2011; Alberdi i wsp., 2018; Wang i wsp., 2017a; Mota i wsp., 2021]. W niniejszej rozprawie zbadano wpływ modulatorów receptorów dla S1P na zmiany w: poziomie wolnych rodników, MMP i żywotności komórek wywołane przez A β o. 24-godzinna inkubacja z A β o w stężeniu 1 μ M nie spowodowała istotnych zmian w wewnątrzkomórkowym poziomie RFT w żadnej z badanych linii komórkowych, chociaż szczególnie w komórkach BV2 widoczna była tendencja do wzrostu wytwarzania wolnych rodników. Podobny brak zmian w poziomie RFT w komórkach mikrogleju poddanych działaniu 1 μ M A β o zaobserwowano również w innych badaniach [Wang i wsp., 2017b; Cieślik i wsp., 2020]. Z kolei A β o w stężeniu 2 μ M istotnie zwiększał poziom RFT w komórkach BV2 [Shukla i Sharma, 2011], co wskazuje na zależne od stężenia A β o wytwarzanie RFT w tej linii komórkowej. Zwiększony poziom RFT w identycznych jak zastosowane w niniejszej pracy warunkach inkubacji z A β o stwierdzono natomiast w komórkach neuronalnych SH-SY5Y [Cieślik i wsp., 2020], a także w hodowli pierwotnej neuronów korowych po 16-godzinnej inkubacji z 1 μ M A β o [He i wsp., 2011]. Może to sugerować, że do wywołania podobnej odpowiedzi na A β o w neuronach hipokampa może być potrzebne wyższe stężenie A β o. Inkubacja z 1 μ M A β o spowodowała natomiast znamienne obniżenie MMP w równym stopniu w neuronach i mikrogleju, co w przypadku komórek HT22 jest zgodne z innymi badaniami toksyczności A β o *in vitro* [Mota i wsp., 2021]. W przypadku komórek mikrogleju A β o w stężeniu 1 μ M nie powodowały istotnego obniżenia MMP ani w komórkach BV2 [Cieślik i wsp., 2020], ani w hodowli pierwotnej mikrogleju potraktowanej wcześniej LPS [Wang i wsp., 2017b], choć w obu badaniach zaobserwowano tendencję do obniżenia MMP. W niniejszej pracy w obu liniach komórkowych istotnemu obniżeniu pod wpływem A β o ulegała żywotność mierzona testem MTT, przy czym jej obniżenie było bardziej zaznaczone w komórkach BV2. Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi, gdzie przy zastosowaniu tego samego stężenia A β o i tego samego czasu inkubacji zaobserwowano obniżoną żywotność pierwotnych neuronów hipokampa [Mota i wsp., 2021] oraz komórek linii BV2 [Cieślik i wsp., 2020]. W badaniach Costa i wsp. zmniejszoną żywotność neuronów hipokampa

zaobserwowano już po 6-godzinnej inkubacji z A β w stężeniu 0,5 μ M [Costa i wsp., 2012], co wskazuje, że nawet mniejsze stężenie A β i krótszy czas inkubacji negatywnie wpływa na żywotność neuronów. Nie stwierdzono istotnego wpływu badanych związków w zastosowanych stężeniach na obniżone przez A β MMP i żywotność w żadnej z badanych linii komórkowych. Doniesienia literaturowe wskazują jednak, że modulacja receptorów dla S1P może łagodzić zaburzenia mitochondrialne w neuronach i mikrogleju. pFTY720 w stężeniu 100 nM istotnie zwiększał MMP i żywotność oraz znacząco obniżał poziom RFT w komórkach BV2 poddanych toksycznemu działaniu kwasu palmitynowego [Sood i wsp., 2023]. Co więcej, zastosowanie kondycjonowanego medium pochodzącego od mikrogleju traktowanego kwasem palmitynowym i pFTY720 znacząco zwiększało żywotność neuronalnych komórek N2a w porównaniu do medium zawierającego jedynie czynnik toksyczny. Podobnie w neuronach dopaminergicznych substancji czarnej (linia komórkowa SN4741) poddanych działaniu witaminy K ufosforylowany fingolimod w stężeniu 50 nM przywracał zaburzone funkcje mitochondrialne, w tym aktywność oksydazy cytochromu c, MMP i szybkość zużycia tlenu (ang. oxygen consumption rate, OCR), a także zwiększał żywotność komórek mierzoną poziomem dehydrogenazy mleczanowej [Martín-Montañez i wsp., 2019]. W świetle powyższych danych brak skuteczności pFTY720 w łagodzeniu skutków mitochondrialnej toksyczności A β wykazany w niniejszej rozprawie może wynikać z zastosowania zbyt niskiego (1 nM) stężenia pFTY720. Warto jednak zauważyć, że pFTY720 już w stężeniu 100 pM chronił neurony przed toksycznością wywołaną przez A β w stężeniu 5 μ M (wzrost żywotności mierzonej testem WST8) [Doi i wsp., 2013] oraz zwiększał żywotność komórek neuronalnych SH-SY5Y poddanych działaniu MPP⁺ [Pyszko i Strosznajder, 2014], choć w obu przypadkach podanie fingolimodu nastąpiło przed podaniem czynnika toksycznego. Podsumowując, wyjaśnienie braku skuteczności pFTY720 (jak również pozostałych związków) w przeciwdziałaniu toksycznemu działaniu A β na funkcjonowanie mitochondriów wymaga dalszych badań uwzględniających różne stężenia modulatorów oraz ewentualne podanie modulatorów przed traktowaniem A β .

Obniżenie lub całkowita utrata potencjału błony mitochondrialnej stanowi jedną z wczesnych oznak apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki [Marchetti i wsp., 1996], która jest cechą charakterystyczną ChA [Obulesu i Lakshmi, 2014]. Mitochondria są głównymi odpowiedzialnymi za tzw. wewnątrzpochodny szlak apoptozy. Wzrost przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej prowadzi do uwalniania białek proapoptotycznych takich jak cytochrom c, czynnik indukujący apoptozę (ang. apoptosis-

inducing factor, AIF) czy białko Smac/DIABLO, które aktywują kaspazy i dalsze mechanizmy śmierci komórkowej. Pro- i antyapoptotyczne białka z rodziny BCL-2 są ważnymi regulatorami wewnątrzpochodnego szlaku apoptotycznego, które bezpośrednio kontrolują integralność zewnętrznej błony mitochondrialnej, a tym samym translokację wspomnianych wcześniej białek proapoptotycznych do cytozolu [Eckert i wsp., 2012]. W niniejszej pracy zbadano wpływ modulatorów receptorów dla S1P na wywołane 24-godziną inkubacją z 1 μM A β zmiany w ekspresji genów kodujących wybrane białka pro- i antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2. Białko BAD jest białkiem proapoptotycznym, które reguluje działanie białek efektorowych apoptozy takich jak BAX. Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie mRNA *Bad* w komórkach HT22, chociaż odnotowano lekką tendencję do wzrostu ekspresji. Podobne wyniki otrzymano w badaniach na hodowli neuronów korowych poddanych działaniu zagregowanego A β_{25-35} w stężeniu 25 μM [Yao i wsp., 2005]. W przeciwieństwie do neuronów, w komórkach BV2 po podaniu A β w niniejszej rozprawie stwierdzono znamienne obniżenie ekspresji *Bad*, któremu nie przeciwdziałał żaden z zastosowanych modulatorów. Dotychczas nie badano poziomu mRNA *Bad* w mikrogleju traktowanym A β . Pewnym wytłumaczeniem otrzymanego wyniku może być analiza poziomu ufosforylowania białka BAD, która jest miarą działania apoptotycznego tego białka. 24-godzinna inkubacja komórek mysiego mikrogleju (linia EOC2) z A β w stężeniu 10 μM nie miała istotnego wpływu na poziom ufosforylowania białka (zaobserwowano jedynie tendencję do obniżenia). Natomiast znamienne obniżenie poziomu pBAD (Ser136) zaobserwowano po 6 i 12 godzinach inkubacji z 10 μM A β [Shang i wsp., 2012]. To sugeruje, że w niższych dawkach A β może działać antyapoptotycznie w mikrogleju nawet przy dłuższym czasie inkubacji. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań uwzględniających różne dawki A β i różne czasy inkubacji.

W żadnej z badanych linii komórkowych nie stwierdzono natomiast istotnych zmian w poziomie mRNA *Bax*, które jest uznawane za kluczowe białko proapoptotyczne. Dane literaturowe dotyczące komórek neuronalnych wskazują na wzrost ekspresji *Bax* w komórkach poddanych działaniu A β w postaci monomerów [Clementi i wsp., 2006] oraz A β_{31-35} (najkrótszy fragment A β zachowujący właściwości cytotoksyczne peptydu pełnej długości) [Misiti i wsp., 2006], a brak istotnego wpływu oligomerów [Cieślik i wsp., 2020]. Z kolei jedyna publikacja, w której badano poziom mRNA *Bax* w mikrogleju traktowanym A β , wykazała znamienne obniżenie ekspresji genu dla tego białka proapoptotycznego [Cieślik i wsp., 2020]. W niniejszej pracy podanie A β wraz

z ponesimodem, CYM5541 i CYM50308 komórkom BV2 powodowało istotny wzrost ekspresji *Bax* w porównaniu do komórek traktowanych wyłącznie A β . Również badania na mioblastach traktowanych TGF-1 β wykazały, że 6-godzinna inkubacja z CYM50308 w stężeniu 1 μ M stymuluje apoptozę [Cencetti i wsp., 2013]. Natomiast po 24 godzinach ponesimod w stężeniu 5,7 nM w połączeniu z kondycjonowanym medium pochodzącym z nabłonkowych komórek macierzystych owodni istotnie obniżał poziom BAX w oligodendrocytach poddanych toksycznemu działaniu kuprizonu [Safaeinejad i wsp., 2021]. Sugeruje to, że właściwości proapoptotyczne ponesimodu mogą zależeć od zastosowanego stężenia. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań. Nie można również wykluczyć, że obserwowany efekt jest specyficzny dla określonej linii komórkowej. Podobnie proapoptotyczne działanie CYM5541 w komórkach BV2 może zależeć od warunków inkubacji oraz badanych komórek, gdyż preinkubacja z 10 nM CYM5541 hamowała apoptozę wywołaną nadtlakiem wodoru w progenitorowych komórkach śródbłonna [Wang i wsp., 2018b]. Co istotne, ze względu na bardzo niską ekspresję *S1pr3* w komórkach linii BV2, proapoptotyczne właściwości CYM5541 mogą być związane z jego potencjalnym pozareceptorowym mechanizmem działania, co jednak wymaga dalszej weryfikacji.

W obu liniach komórkowych po podaniu A β o stwierdzono znamienne obniżoną ekspresję genu dla kluczowego białka antyapoptotycznego *Bcl2*, wyraźniej zaznaczoną w komórkach mikrogleju. Dane literaturowe dotyczące komórek neuronalnych poddanych działaniu A β wskazują na znaczące obniżenie [Clementi i wsp., 2006; Luo i wsp., 2021] lub jedynie niewielką tendencję do obniżenia ekspresji *Bcl2* [Yao i wsp., 2005; Cieślik i wsp., 2020], co wiąże się z różnicami w stosowanych stężeniach A β i długością łańcucha peptydowego (A β ₁₋₄₂ versus A β ₂₅₋₃₅). Natomiast jedyna do tej pory praca, w której zbadano poziom mRNA *Bcl2* w mikrogleju poddanemu działaniu A β o, wskazuje na brak zmian w ekspresji tego genu [Cieślik i wsp., 2020]. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie tego genu po zastosowaniu modulatorów S1PR w komórkach BV2. Natomiast w komórkach HT22 zastosowanie CYM50308 i A971432 znamienne zwiększało ekspresję *Bcl2*. Zaobserwowany wzrost pod wpływem pobudzenia S1PR5 może być spowodowany wzrostem aktywności kinazy AKT, która, jak już wcześniej wykazano, zwiększa ekspresję *Bcl2* [Pugazhenthii i wsp., 2000]. Podanie bowiem A971432 transgenicznym myszom R6/2 (model ChH) istotnie zwiększało poziom ufosforylowania tej kinazy w prążkowie [Di Pardo i wsp., 2018b]. Z kolei istotne zwiększenie ekspresji *Bcl2* pod wpływem CYM50308 w komórkach HT22 przy jednoczesnym wzroście ekspresji *Bax*

w komórkach BV2 wywołanym tym agonistą może sugerować, że pobudzenie S1PR4 ma inny wpływ na apoptozę komórek w neuronach (działanie antyapoptotyczne) i w mikrogleju (działanie proapoptotyczne).

W niniejszej pracy analizie poddano również stosunek *Bax/Bcl2* uważany za lepszą miarę potencjału apoptotycznego komórki niż poziom ekspresji poszczególnych genów [Salakou i wsp., 2007]. W komórkach HT22 zaobserwowano nieistotny statystycznie wzrost *Bax/Bcl2* wywołany $A\beta$, na co nie miało wpływu zastosowanie badanych modulatorów. W linii BV2 nie zaobserwowano zmian w stosunku *Bax/Bcl2* po podaniu $A\beta$, natomiast zastosowanie ponesimodu, A971432 i pFTY720 znamienne zwiększało stosunek *Bax/Bcl2*, co może wskazywać na proapoptotyczne działanie wymienionych modulatorów w komórkach mikrogleju.

Istotnych zmian nie stwierdzono w poziomie mRNA *Bcl2l1* (gen kodujący białko antyapoptotyczne Bcl-XL) w żadnej z badanych linii komórkowych. Podobny wynik otrzymano w doświadczeniach na komórkach ziarnistych mózdzku z użyciem $A\beta_{31-35}$ [Misiti i wsp., 2006], natomiast $A\beta_{25-35}$ znacząco obniżał ekspresję *Bcl2l1* w neuronach korowych [Yao i wsp., 2005]. Zastosowanie modulatorów receptorów dla S1P w niniejszej pracy nie powodowało znamienych różnic w ekspresji tego genu.

Podsumowując, $A\beta$ w stężeniu 1 μ M mają niewielki potencjał apoptotyczny w badanych liniach komórkowych, choć wyraźnie wyższy w komórkach HT22. Zastosowane modulatory S1PR wykazują różne działanie w zależności od linii komórkowej – w mikrogleju mogą wykazywać działanie proapoptotyczne, a w neuronach niektóre z nich mają charakter antyapoptotyczny.

Neurozapalenie jest uznawane za istotny element patomechanizmu ChA i wiąże się z przewlekłą nadmierną aktywnością mikrogleju. We wczesnych fazach ChA aktywacja mikrogleju w celu usunięcia gromadzącego się $A\beta$ ma charakter przeciwzapalny. Jednak wraz ze wzrostem obciążenia amyloidem w późniejszych etapach choroby nadmierna aktywność mikrogleju prowadzi do stanu zapalnego, który przyczynia się do zaostrzenia szkodliwych zmian w mózgu wywołanych przez $A\beta$. Jednym z objawów stanu zapalnego jest zachwianie równowagi pomiędzy pro- i przeciwzapalnymi cytokinami, które pośredniczą w prawidłowej pracy układu odpornościowego. IL- 1β jest kluczową cytokiną prozapalną powstającą w wyniku obróbki proteolitycznej nieaktywnego prekursora pro-IL- 1β przez kaspazę 1. IL- 1β wraz z IL-18 uczestniczy w pyroptozie, czyli zależnej od kaspazy 1 programowanej śmierci komórki [Bergsbaken i wsp., 2009]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono ponadsiedmiokrotny wzrost ekspresji *I11b* (gen

kodujący pro-IL-1 β) w komórkach BV2 wywołany podaniem A β , natomiast w komórkach HT22 jedynie nieznaczne zwiększenie ekspresji tego genu. Nieliczne dane literaturowe dotyczące poziomu mRNA *I11b* w mikrogleju (brak tego typu danych dotyczących neuronów) są niejednoznaczne. Parajuli i wsp., nie zaobserwowali istotnych zmian w ekspresji *I11b* w pierwotnej hodowli mikrogleju poddanej działaniu 5 μ M A β ₁₋₄₂. Natomiast 24-godzinna inkubacja z A β ₁₋₄₂ w tym samym stężeniu powodowała wzrost ekspresji *I11b* w mikrogleju wcześniej aktywowanym podaniem LPS [Liu i wsp., 2020]. Zaprezentowane w niniejszej rozprawie wyniki są jednak w zgodzie z licznymi pracami, które wskazują na zwiększone uwalnianie IL-1 β w mikrogleju pod wpływem A β , w tym A β [Kim i wsp., 2014b; Feng i Zhang, 2019; Jian i wsp., 2019]. Za wyjątkiem CYM5541 i pFTY720 wszystkie badane związki znamienne zwiększały ekspresję *I11b* w mikrogleju, co wskazuje, że modulacja receptorów dla S1P w tym przypadku pogłębia zmiany wywołane przez A β . W neuronach hipokampa, mimo braku znaczącego efektu A β , znamienne wzrost poziomu mRNA *I11b* wywołało natomiast podanie A β wraz z siponimodem. Wydaje się, że zaobserwowany negatywny efekt traktowania siponimodem może być specyficzny dla określonej choroby, gdyż w modelu demielinizacji wywołanej kuprizonem (zwierzęcy model SM) siponimod znacząco obniżał poziom mRNA *I11b* w ciele modelowatym [Al-Otaibi i wsp., 2023]. Podobny efekt miało traktowanie ozanimodem (mechanizm działania identyczny jak siponimodu) skrawków kory z prądkowiem pochodzących z innego modelu zwierzęcego SM [Musella i wsp., 2020].

Brak istotnych zmian w komórkach HT22 oraz znamienne wzrost w komórkach BV2 pod wpływem A β stwierdzono również w przypadku poziomu mRNA *Tnf*. Podobne wyniki otrzymano w innych badaniach na komórkach mikrogleju poddanych działaniu A β ₁₋₄₂ [Urrutia i wsp., 2017; Feng i Zhang, 2019; Liu i wsp., 2020]. Zastosowane modulatory (poza A971432, który nieznamienne obniżał ekspresję) wykazywały tendencję do zwiększania poziomu mRNA *Tnf* w mikrogleju, co pozostaje w zgodzie z wynikami dotyczącymi *I11b* w tej linii komórkowej. W komórkach HT22, mimo braku znaczącego efektu A β , znamienne wzrost poziomu mRNA *Tnf* stwierdzono po podaniu A β wraz z ponesimodem. Przymuszczalnie wynik modulacji S1PR1 zależy od modelu badawczego, gdyż zastosowanie ponesimodu istotnie zmniejszyło ekspresję *Tnf* w astrocytach poddanych działaniu oksyhemoglobiny (*in vitro* model SAH) [Zhang i wsp., 2021]. Z kolei dokanałowe podanie innego agonisty S1PR1, SEW2871, znacząco

zwiększało poziom TNF- α w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego [Doyle i wsp., 2019].

IL-1 stymuluje syntezę IL-6 zarówno w neuronach, jak i w komórkach glejowych [Parish i wsp., 2002; Tsakiri i wsp., 2008]. W niniejszej pracy w obu badanych liniach komórkowych stwierdzono istotny wzrost poziomu mRNA *Il6* po podaniu A β , przy czym był on dużo większy w komórkach BV2. Uzyskane wyniki są zgodne z innymi badaniami, gdzie komórki mikrogleju traktowano A β_{1-42} w różnych stężeniach [Urrutia i wsp., 2017; Feng i Zhang, 2019; Liu i wsp., 2020]. Zwiększony poziom IL-6 wywołany dokomorowym podaniem A β_{1-42} zaobserwowano także w szczurzym hipokampie [Zhang i wsp., 2013]. Podobnie jak w przypadku ekspresji *Il1b* i *Tnf* większość badanych związków (oprócz pFTY720) powodowała wyraźny, choć nieznamienisty wzrost ekspresji *Il6* w mikrogleju. Potwierdza to tym samym, że modulacja receptorów dla S1P w mikrogleju może potęgować prozapalne działanie A β . Z kolei w komórkach HT22 działanie poprzez receptory dla S1P może łagodzić stan zapalny wywołany przez A β , gdyż podanie pFTY720 znamienne obniżało poziom mRNA *Il6*. Co równie ważne, brak istotnego efektu przeciwzapalnego selektywnych agonistów przy skuteczności nieselektywnego modulatora sugeruje, że koniecznym warunkiem działania przeciwzapalnego w tym przypadku jest jednoczesne pobudzenie kilku receptorów.

Prozapalna IL-18, podobnie jak IL-1 β występuje w postaci nieaktywnej pro-IL-18, która ulega aktywacji pod wpływem kaspazy 1. Badania wskazują, że IL-18 może odgrywać znaczącą rolę w patomechanizmie ChA. W komórkach SH-SY5Y IL-18 zwiększała poziom APP, a także ekspresję BACE1, przez co stymulowała jego proamyloidogenny metabolizm [Sutinen i wsp., 2012]. Z kolei wywołana przez IL-18 zwiększona ekspresja IL-17 i IL-23 prowadziła do zaburzeń w usuwaniu A β przez mikroglej [Chen i wsp., 2019]. W przedstawionej rozprawie po raz pierwszy wykazano znamienne obniżony poziom mRNA *Il18* w liniach komórkowych HT22 i BV2 poddanych działaniu A β , na który nie miały istotnego wpływu badane modulatory S1PR. Zaobserwowane obniżenie było bardziej wyraźne w komórkach mikrogleju. Dla porównania, badania post mortem mózgow pacjentów z ChA wskazały na zwiększony poziom mRNA i immunoreaktywność IL-18 zwłaszcza w płacie czołowym. Co więcej, występowanie IL-18 pokrywało się z występowaniem płytek starczych oraz NFT [Ojala i wsp., 2007]. Odmienne niż u ludzi, nie zaobserwowano zwiększonej immunoreaktywności IL-18 w mózgu 16-miesięcznych podwójnie transgenicznych myszy APP/PSEN1 z w pełni rozwiniętymi płytkami starczymi [Ojala i wsp., 2007]. Wyniki te

Dyskusja

sugerują, że reakcja zapalna wywołana odkładaniem się A β może być inna w mózgu myszy i mózgu ludzkim. Może to częściowo tłumaczyć obserwacje przedstawione w niniejszej rozprawie, co wymaga jednak potwierdzenia na ludzkich liniach komórkowych. Poza tym dostępne dane literaturowe dotyczą odpowiedzi zapalnej wywołanej przez płytki starcze, nie przez A β , które zastosowano w badaniach prezentowanych w tej rozprawie. Może to wskazywać, że zarówno zmiany ekspresji genu, jak i przypuszczalnie w poziomie białka IL-18 mogą zależeć od postaci A β . I wreszcie odpowiedź w uproszczonym modelu *in vitro*, gdzie nie są uwzględnione zależności pomiędzy poszczególnymi strukturami mózgu, może różnić się od tej uzyskanej w modelu *in vivo*. Stąd wskazane byłoby przeprowadzenie analizy poziomu mRNA *Il18* w mysim modelu ChA wywołanym domózgowym podaniem A β .

Podsumowując ostatnią część badań *in vitro*, A β w stężeniu 1 μ M wykazują działanie prozapalne, które jest silniej zaznaczone w mikrogleju. Zastosowanie modulatorów receptorów dla S1P wpływało na łagodzenie stanu zapalnego w komórkach HT22, natomiast te same związki w komórkach BV2 miały tendencję do pogłębiania wywołanych przez A β zmian.

6. Podsumowanie i wnioski

- Mutacja londyńska w genie dla APP powoduje zmiany ekspresji badanych białek presynaptycznych głównie na poziomie transkrypcyjnym. Obniżenie poziomu mRNA białek presynaptycznych jest bardziej widoczne w hipokampie zwierząt transgenicznych i wzrasta wraz z wiekiem zwierzęcia/zaawansowaniem choroby.
- Fingolimod przeciwdziała obniżeniu ekspresji genów kodujących białka presynaptyczne u 12-miesięcznych myszy z nadekspresją zmutowanego genu dla APP. Wskazuje to na znaczenie sygnalizacji zależnej od S1P w bardziej zaawansowanych stadiach choroby Alzheimera.
- Istotny wpływ mutacji londyńskiej na prożyciową ścieżkę zależną od kinazy AKT w hipokampie zachodzi wyłącznie na poziomie modyfikacji potranslacyjnych.
- Mutacja londyńska może zwiększać aktywność kinazy CAMKII w hipokampie 12-miesięcznych zwierząt transgenicznych, na co wskazuje wzrost ufosforylowania białka Tau na serynie 416.
- Brak skuteczności fingolimodu w łagodzeniu spowodowanych przez mutację londyńską zmian w aktywności ścieżki zależnej od kinazy AKT i fosforylacji białka Tau na serynie 416 może sugerować, że w badanym modelu sygnalizacja zależna od S1P odgrywa niewielką rolę we wspomnianych zaburzeniach.
- Działanie prozapalne oligomerów A β (A β) może różnić się w zależności od badanych linii komórkowych, na co wskazują większe zmiany w ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne w mikrogleju.
- Agonisty S1PR4 (CYM50308) i S1PR5 (A971432) przywracają do wartości kontrolnych obniżony pod wpływem A β poziom mRNA antyapoptotycznego białka Bcl-2 w komórkach HT22.
- pFTY720 istotnie obniża wywołany przez A β wzrost ekspresji genu dla prozapalnej IL-6 w komórkach HT22. Z kolei w komórkach BV2 większość badanych agonistów S1PR pogłębia zwiększony pod wpływem A β poziom mRNA prozapalnej IL-1 β . Wskazuje to, że efekt pobudzenia S1PR może zależeć od badanej linii komórkowej.

7. Streszczenie

Choroba Alzheimera (ChA) jest neurodegeneracyjnym schorzeniem, które odpowiada za większość przypadków otępienia. Według powszechnie przyjętej hipotezy kaskady amyloidowej u podstaw ChA leżą zaburzenia metabolizmu białka prekursorowego peptydu amyloidu β (APP), które prowadzą do powstania amyloidu β (A β). A β występuje w postaci rozpuszczalnych monomerów i oligomerów oraz nierozpuszczalnych fibryli i płytek starczych, z których za najbardziej patogenne uważane są oligomery. Szkodliwe działanie A β związane jest z zaburzeniem funkcjonowania synaps, w tym z nieprawidłowościami dotyczącymi przekaźnictwa synaptycznego. Obserwuje się również zaburzenia biogenezy i dynamiki mitochondriów oraz dysfunkcje czynnościowe tych organelli, które finalnie prowadzą do zaburzeń energetycznych w komórce i zwiększonej apoptozy neuronów. Gromadzący się A β powoduje aktywację mikrogleju i wzrost wytwarzania mediatorów stanu zapalnego, które zaostrzają zmiany neurodegeneracyjne. Dodatkowo, A β poprzez hamowanie prożyciowej ścieżki PI3K-AKT/stymulowanie aktywności GSK-3 β przyczynia się do nadmiernej fosforylacji białka Tau i, co za tym idzie jego zwiększonej skłonności do agregacji w postaci wewnątrzkomórkowych splątków neurofibrylarnych (NFT), które obok płytek starczych są główną cechą obrazu neuropatologicznego ChA.

Jednocześnie w ostatnich latach istotnym tematem stała się rola bioaktywnych sfingolipidów w patogenezie/patomechanizmie ChA. Jednym z nich jest prożyciowy sfingozyno-1-fosforan (S1P), którego obniżony poziom i zaburzony metabolizm stwierdzono w mózgach osób z ChA. S1P wywiera swoje działanie dwutorowo. Wewnątrzkomórkowo działa jako przekaźnik drugiego rzędu, natomiast zewnątrzkomórkowo poprzez pięć receptorów (S1PR1-5) sprzężonych z białkami G. Niektóre agonisty (modulatory) S1PR, ze względu na ich właściwości immunosupresyjne, stały się lekami zatwierdzonymi do leczenia stwardnienia rozsianego. Jednak zdolność tych związków do przekraczania bariery krew-mózg i bezpośrednie działanie neuroprotektoryjne w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) umożliwiła ich zastosowanie w badaniach dotyczących innych chorób neurodegeneracyjnych, w tym w ChA.

Celem rozprawy było zbadanie wpływu modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu na zmiany na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym wybranych białek zaangażowanych w: przekaźnictwo synaptyczne, apoptozę, proces zapalny oraz ścieżkę prożyciową zależną od kinazy AKT w doświadczalnych modelach choroby Alzheimera.

Streszczenie

Badania *in vivo* prowadzono na modelu rodzinnej postaci ChA – 3 i 12-miesięcznych transgenicznym myszach szczepu FVB-Tg transfekowanych ludzkim zmutowanym genem dla APP (myszy APP⁺). Mutacja londyńska w genie dla APP powoduje zwiększone wytwarzanie bardziej toksycznej i podatnej na agregację izoformy A β ₁₋₄₂. Grupę kontrolną stanowiły myszy bez odziedziczonego transgeny (myszy APP⁻). Przez 14 dni zwierzętom podawano dootrzewnowo fingolimod (modulator S1PR1,3-5) w dawce 1 mg/kg m.c. lub jego nośnik (0,9% NaCl). Następnie zwierzęta dekapitowano, a wybrane struktury mózgu (kora mózgu i hipokamp) wykorzystywano do analizy zmian ekspresji genów oraz immunoreaktywności/poziomu ufosforylowania białek. W doświadczeniach na zwierzętach skupiono się na białkach presynaptycznych zaangażowanych w fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną i uwalnianie neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej (białka kompleksu SNARE i białka regulatorowe tego kompleksu), ścieżce prożyciowej zależnej od kinazy AKT i fosforylacji białka Tau.

Analiza ekspresji genów kodujących białka tworzące kompleks SNARE wykazała istotne obniżenie ekspresji *Vamp1* w korze mózgu w obu grupach wiekowych oraz w hipokampie 3-miesięcznych myszy APP⁺ (vs. APP⁻). Obniżenie poziomu mRNA *Stx1l* i *Snap25* odnotowano jedynie w hipokampie 12-miesięcznych myszy APP⁺. Nie stwierdzono natomiast istotnych zmian w poziomie immunoreaktywności białek kompleksu SNARE. W przypadku białek regulatorowych kompleksu SNARE zaobserwowano znacząco obniżoną ekspresję *Syt1*, *Cplx1* i *Nrxn1* w hipokampie 12-miesięcznych myszy APP⁺ (vs. APP⁻). Znacząco niższy poziom mRNA *Nrxn1* stwierdzono również w korze 12-miesięcznych myszy APP⁺, a niższą ekspresję *Syt1* w hipokampie 3-miesięcznych zwierząt transgenicznym. Zmiany w immunoreaktywności (znamienny wzrost poziomu SYP i SYT) zaobserwowano jedynie w korze mózgu 3-miesięcznych myszy APP⁺. Podanie fingolimodu 12-miesięcznym zwierzętom APP⁺ znamienne zwiększało obniżoną ekspresję *Stx1l*, *Snap25*, *Cplx1* i *Nrxn1* w hipokampie oraz *Vamp1* w korze mózgu. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu fingolimodu na pozostałe zmiany.

W następnym etapie zbadano wpływ mutacji w genie dla APP na ekspresję genów i poziom ufosforylowania prożyciowej kinazy AKT oraz jej dwóch białek efektorowych – kinazy GSK-3 β i proapoptycznego białka BAD. Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA *Akt1*, *Gsk3b* ani *Bad*. Istotnie statystycznie zmiany w stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej AKT odnotowano w hipokampie – obniżenie

u 3-miesięcznych i wzrost u 12-miesięcznych zwierząt transgenicznych. W hipokampie starszych zwierząt APP⁺ stwierdzono również wzrost ufosforylowania GSK-3 β . Podanie fingolimodu transgenicznym zwierzętom nie miało istotnego wpływu na zaobserwowane zmiany w poziomie ufosforylowania AKT ani GSK-3 β .

Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA *Mapt* (gen kodujący białko Tau) ani immunoreaktywności całkowitego białka Tau. Mutacja londyńska w genie dla APP nie wpływała również na ufosforylowanie białka Tau przez GSK-3 β na serynie 396 ani serynie 199/202 – kluczowych dla patomechanizmu ChA miejscach. W hipokampie 12-miesięcznych myszy APP⁺ stwierdzono natomiast istotnie zwiększoną fosforylację na serynie 416, która jest zależna od CAMKII. Podanie fingolimodu nie miało istotnego wpływu na zaobserwowaną zmianę.

Wyniki uzyskane w badaniach *in vivo* wskazują, że mutacja londyńska w genie dla APP powoduje przede wszystkim zmiany w hipokampie, których nasilenie zależy od wieku zwierząt/zaawansowania choroby. Mutacja w genie dla APP wpływa na ekspresję białek presynaptycznych głównie na poziomie transkrypcyjnym, natomiast wpływ tej mutacji na prożyciową ścieżkę zależną od AKT ma miejsce wyłącznie na poziomie modyfikacji potranslacyjnych. Skuteczność fingolimodu ograniczona jedynie do zmian w ekspresji genów dla białek presynaptycznych w grupie 12-miesięcznych myszy sugeruje, że w zastosowanym modelu badawczym zaburzenia sygnalizacji zależnej od S1P mają znaczenie przede wszystkim w regulacji przekazywania synaptycznego w bardziej zaawansowanych fazach choroby.

Badania *in vitro* przeprowadzono na mysich liniach komórkowych neuronów hipokampa (HT22) i mikrogleju (BV2) traktowanych przez 24 godziny oligomerami A β ₁₋₄₂ (A β) w stężeniu końcowym 1 μ M. W powyższych modelach sprawdzano wpływ modulatorów receptorów dla S1P: 0,1 μ M ponesimodu (S1PR1), 1 μ M CYM5541 (S1PR3), 0,1 μ M CYM50308 (S1PR4), 0,1 μ M A971432 (S1PR5), 0,1 μ M siponimodu (S1PR1,5) oraz 1 nM ufosforylowanego fingolimodu na: żywotność komórek, potencjał błony mitochondrialnej oraz poziom wolnych rodników, a także na ekspresję genów kodujących receptory dla S1P, białka pro- i antyapoptotyczne oraz cytokiny prozapalne.

Analiza ekspresji genów kodujących S1PR wykazała znamienne obniżony poziom mRNA *S1pr1* w komórkach BV2 po podaniu A β , który został istotnie zwiększony po podaniu A971432. W komórkach mikrogleju traktowanych A β zaobserwowano także wyraźną tendencję do obniżenia poziomu mRNA *S1pr5*. Nie odnotowano wpływu A β podanego samodzielnie na ekspresję *S1pr4* w żadnej z badanych linii komórkowych.

Natomiast istotne obniżenie poziomu mRNA *Slpr4* stwierdzono w komórkach HT22 traktowanych A β wraz z CYM5541, a znamienny wzrost w komórkach BV2 traktowanych A β z pFTY720 i siponimodem.

A β znamienne obniżały potencjał błony mitochondrialnej oraz żywotność komórek, przy czym obniżenie żywotności było bardziej zaznaczone w komórkach BV2. Badane modulatory w zastosowanych stężeniach nie miały wpływu na zaobserwowane zmiany. Nie stwierdzono istotnego wpływu A β na wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników w żadnej z badanych linii komórkowych.

W komórkach BV2 A β wywołały znamienne obniżenie ekspresji *Bad*, któremu nie przeciwdziałał żaden z zastosowanych modulatorów. Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie mRNA *Bax* po podaniu A β w żadnej z badanych linii komórkowych. Natomiast podanie A β wraz z ponesimodem, CYM5541 i CYM50308 powodowało istotny wzrost ekspresji *Bax* w komórkach BV2 w porównaniu do komórek traktowanych wyłącznie A β . W obu liniach komórkowych po podaniu A β stwierdzono znamienne obniżoną ekspresję *Bcl2*, wyraźniej zaznaczoną w komórkach mikrogleju. W komórkach HT22 zastosowanie CYM50308 i A971432 w toksyczności A β przywracało ekspresję *Bcl2* do wartości kontrolnych (ekspresji w komórkach nietraktowanych A β). Nie stwierdzono natomiast istotnych zmian w ekspresji *Bcl2l1* po podaniu A β w żadnej z badanych linii komórkowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono ponad siedmiokrotny wzrost poziomu mRNA *Il1b* w komórkach BV2 traktowanych A β , a badane modulatory (za wyjątkiem CYM5541 i pFTY720) pogłębiały prozapalny efekt A β . W komórkach BV2 stwierdzono również znamienny wzrost ekspresji *Tnf* pod wpływem A β . Zastosowane modulatory (poza A971432, który nieznacznie obniżał ekspresję) wykazywały tendencję do zwiększania poziomu mRNA *Tnf* w mikrogleju. W neuronach hipokampa, mimo braku znaczącego efektu A β , znamienny wzrost poziomu mRNA *Il1b* wywołało podanie A β wraz z siponimodem, a istotny wzrost ekspresji *Tnf* stwierdzono w komórkach traktowanych A β wraz z ponesimodem. W obu badanych liniach komórkowych stwierdzono istotny wzrost poziomu mRNA *Il6*, przy czym był on dużo większy w komórkach BV2. Większość badanych związków (oprócz pFTY720) powodowała wyraźny, choć nieznaczny wzrost ekspresji *Il6* w mikrogleju (w porównaniu z komórkami traktowanymi A β). Z kolei w komórkach HT22 podanie pFTY720 znamienne obniżało poziom mRNA *Il6*. W przedstawionej rozprawie po raz pierwszy wykazano istotnie obniżony poziom mRNA *Il18* w liniach komórkowych HT22 i BV2

poddanych działaniu A β , na który nie miały istotnego wpływu badane modulatory S1PR. Zaobserwowane obniżenie było wyraźniej zaznaczone w komórkach mikrogleju.

Wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* wskazują na niewielki potencjał apoptotyczny A β w badanych liniach komórkowych. Wyraźne działanie prozapalne A β jest silniej zaznaczone w mikrogleju. Modulacja receptorów dla S1P w komórkach HT22 ma działanie antyapoptotyczne, a także w niewielkim stopniu może łagodzić stan zapalny. Natomiast te same związki w komórkach BV2 mają tendencję do pogłębiania wywołanych przez A β zmian zapalnych oraz proapoptotycznych. Zaobserwowane zmiany wskazują, że zarówno toksyczność A β , jak i efekt pobudzenia S1PR zależy od linii komórkowej.

Podsumowując, w badaniach *in vivo* zaobserwowano negatywny wpływ mutacji londyńskiej w genie dla APP na ekspresję genów dla białek presynaptycznych oraz na prożyciową ścieżkę sygnałową zależną od kinazy AKT. Zastosowanie fingolimodu przeciwdziałało wywołanym przez mutację londyńską zmianom w ekspresji genów kodujących białka presynaptyczne u 12-miesięcznych zwierząt APP⁺, co wskazuje na istotne znaczenie sygnalizacji zależnej od S1P w regulacji przekąźnictwa synaptycznego w bardziej zaawansowanych stadiach choroby. Dodatkowo badania *in vitro* wykazały niekorzystne działanie A β na ekspresję genów dla białek pro- i antyapoptotycznych, cytokin prozapalnych i funkcjonowanie mitochondriów. Jednocześnie wyniki doświadczeń *in vitro* wskazują, że efekt modulacji receptorów dla S1P w toksyczności A β może różnić się w zależności od linii komórkowej, co należy uwzględnić w dalszych badaniach dotyczących zastosowania tych związków w chorobie Alzheimera.

8. Streszczenie w języku angielskim

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that accounts for the majority of dementia cases. According to the widely accepted amyloid cascade hypothesis, AD is caused by disturbances in the metabolism of the amyloid- β precursor protein (APP), which leads to the formation of amyloid β peptide (A β). A β occurs in the form of soluble monomers and oligomers as well as insoluble fibrils and senile plaques, of which oligomers are considered the most pathogenic. The harmful effects of A β are related to the dysfunction of synapses, including abnormalities in synaptic transmission. Disturbances in the biogenesis and dynamics of mitochondria together with functional dysfunctions of these organelles, which finally lead to cell energy disturbances and increased neuronal apoptosis, are also observed. Accumulating A β causes the activation of microglia and an increase in the production of inflammatory mediators that exacerbate neurodegenerative changes. In addition, A β , by inhibiting the prosurvival PI3K-AKT pathway/stimulating the activity of GSK-3 β , contributes to the excessive phosphorylation of Tau protein and, consequently, its increased tendency to aggregate in the form of intracellular neurofibrillary tangles (NFT), which, together with senile plaques, are the main neuropathological hallmarks of AD.

At the same time, the role of bioactive sphingolipids in the pathogenesis/pathomechanism of AD has recently become an important topic. One of them is the prosurvival sphingosine-1-phosphate (S1P), whose reduced level and disturbed metabolism have been found in the brains of AD patients. S1P exerts its action in a dual manner. Intracellularly, it acts as a second messenger, while extracellularly via five G protein-coupled receptors (S1PR1-5). Some S1PR agonists (modulators) have been approved for the treatment of multiple sclerosis due to their immunosuppressive properties. However, the ability of these compounds to cross the blood-brain barrier and direct neuroprotective effects in the central nervous system (CNS) allowed their use in studies concerning other neurodegenerative diseases, including AD.

The dissertation aimed to investigate the effect of sphingosine-1-phosphate receptor modulators on changes at the transcriptional and translational levels in selected proteins involved in: synaptic transmission, apoptosis, inflammation and AKT kinase-dependent prosurvival pathway in experimental models of Alzheimer's disease.

In vivo studies were carried out on 3- and 12-month-old FVB-Tg transgenic mice transfected with the human mutant gene for APP (APP⁺ mice) – a model of familial AD. The London mutation in the gene encoding APP causes increased production of the more

toxic and aggregation-prone A β ₁₋₄₂ isoform. Mice without the inherited transgene (APP⁻ mice) were used as a control. For 14 days, the animals were administered intraperitoneally fingolimod (S1PR1,3-5 modulator) at a dose of 1 mg/kg b.w. or its vehicle (0.9% NaCl). Then the animals were decapitated, and selected brain structures (brain cortex and hippocampus) were used to analyse changes in gene expression and immunoreactivity/level of protein phosphorylation. Animal experiments focused on presynaptic proteins involved in the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane and release of the neurotransmitter into the synaptic cleft (SNARE complex proteins and regulatory proteins of this complex), AKT kinase-dependent prosurvival pathway and Tau protein phosphorylation.

Analysis of the expression of genes encoding SNARE complex proteins showed a significant reduction in *Vamp1* expression in the brain cortex in both age groups and in the hippocampus of 3-month-old APP⁺ mice (vs. APP⁻). Downregulation of *Stx1* and *Snap25* mRNA level was only seen in the hippocampus of 12-month-old APP⁺ mice. No significant changes were found in the level of immunoreactivity of the SNARE complex proteins. In case of the regulatory proteins of the SNARE complex, significantly reduced expression of *Syt1*, *Cplx1* and *Nrxn1* was observed in the hippocampus of 12-month-old APP⁺ mice (vs. APP⁻). Markedly lower mRNA level of *Nrxn1* was also found in the cortex of 12-month-old APP⁺ mice, and lower expression of *Syt1* in the hippocampus of 3-month-old transgenic animals. Changes in immunoreactivity (substantial increase in SYP and SYT levels) were observed only in the brain cortex of 3-month-old APP⁺ mice. Administration of fingolimod to 12-month-old APP⁺ animals markedly increased the downregulated expression of *Stx1a*, *Snap25*, *Cplx1* and *Nrxn1* in the hippocampus and *Vamp1* in the brain cortex. There was no significant effect of fingolimod on other changes.

In the next step, the influence of mutation in the APP gene on gene expression and the level of phosphorylation of the prosurvival AKT kinase and its downstream proteins – GSK-3 β kinase and the proapoptotic BAD protein was examined. No changes in *Akt1*, *Gsk3b* or *Bad* mRNA level were observed. Statistically significant changes in the ratio of the phosphorylated AKT to total AKT were noted in the hippocampus – a decrease in 3-month-old and an increase in 12-month-old transgenic animals. An increase in GSK-3 β phosphorylation was also found in the hippocampus of older APP⁺ animals. Administration of fingolimod to transgenic animals had no significant effect on the observed changes in AKT or GSK-3 β phosphorylation level.

No changes were observed in the mRNA level of *Mapt* (the gene encoding Tau protein) or the immunoreactivity of the total Tau protein. The London mutation in the gene for APP also did not affect the phosphorylation of the Tau protein by GSK-3 β at serine 396 or serine 199/202, key sites for the pathomechanism of AD. In contrast, in the hippocampus of 12-month-old APP⁺ mice, substantial increase in phosphorylation at serine 416 was observed, which is dependent on CAMKII. Administration of fingolimod had no significant effect on the observed change.

Results from *in vivo* studies indicate that the London mutation in the APP gene primarily causes changes in the hippocampus, the severity of which depends on the age of the animals/the stage of the disease. Mutation in the gene for APP affects the expression of presynaptic proteins mainly at the transcriptional level, while the effect of this mutation on the pro-survival AKT-dependent pathway occurs only at the level of posttranslational modifications. The effectiveness of fingolimod, limited only to changes in the expression of genes for presynaptic proteins in a group of 12-month-old mice, suggests that in the model of AD used, disturbances in S1P-dependent signaling are primarily important in the regulation of synaptic transmission in more advanced phases of the disease.

In vitro studies were performed on murine hippocampal neuronal (HT22) and microglial (BV2) cell lines treated for 24 hours with A β ₁₋₄₂ oligomers (A β) at a final concentration of 1 μ M. In the aforementioned models, the influence of following S1P receptor modulators: 0.1 μ M ponesimod (S1PR1), 1 μ M CYM5541 (S1PR3), 0.1 μ M CYM50308 (S1PR4), 0.1 μ M A971432 (S1PR5), 0.1 μ M siponimod (S1PR1,5), and 1 nM phosphorylated fingolimod on the cell viability, mitochondrial membrane potential and level of free radicals, as well as on the expression of genes encoding S1P receptors, pro- and antiapoptotic proteins and proinflammatory cytokines was tested.

Analysis of the expression of genes for S1PRs showed a significantly reduced mRNA level of *S1pr1* in BV2 cells after administration of A β , which was markedly increased after administration of A971432. In A β -treated microglial cells, there was also a clear tendency to downregulate *S1pr5* mRNA level. There was no effect of A β administered alone on *S1pr4* expression in any of the cell lines tested. In turn, a significant decrease in the mRNA level of *S1pr4* was found in HT22 cells treated with a combination A β and CYM5541, and a significant increase in BV2 cells treated with A β together with pFTY720 and siponimod.

A β significantly decreased the mitochondrial membrane potential and cell viability, with the reduction in viability being more pronounced in BV2 cells. The tested

modulators in the concentrations used had no effect on the observed changes. No significant effect of A β on the intracellular level of free radicals was observed in any of the studied cell lines.

In BV2 cells, A β induced a significant decrease in *Bad* expression, which was not counteracted by any of the modulators used. There were no significant changes in *Bax* mRNA level after A β administration in any of the tested cell lines. In turn, the administration of A β together with ponesimod, CYM5541 and CYM50308 caused a significant increase in *Bax* expression in BV2 cells compared to cells treated with A β alone. Significantly reduced expression of *Bcl2* after A β treatment was found in both cell lines, more clearly marked in microglial cells. In HT22 cells, the use of CYM50308 and A971432 in A β toxicity restored *Bcl2* mRNA level to control values (those of A β -untreated cells). In contrast, there were no significant changes in *Bcl2l1* expression after A β administration in any of the studied cell lines.

An over sevenfold increase in mRNA level of *Il1b* in BV2 cells treated with A β was found, and the tested modulators (except for CYM5541 and pFTY720) enhanced the proinflammatory effect of A β . In BV2 cells, it was also found a significant increase in *Tnf* expression under the influence of A β . The modulators used tended to increase mRNA level of *Tnf* in microglia (except for A971432, which slightly decreased *Tnf* expression). In hippocampal neurons, despite the lack of a significant effect of A β alone, a marked increase in the mRNA level of *Il1b* was induced by the administration of A β together with siponimod, and a significant increase in *Tnf* expression was found in cells treated with A β together with ponesimod. A substantial increase in the mRNA level of *Il6* was found in both tested cell lines, and it was more pronounced in BV2 cells. Most of the tested compounds (except pFTY720) caused a clear, though insignificant, increase in *Il6* expression in microglia. On the other hand, in HT22 cells, the administration of pFTY720 significantly reduced the mRNA level of *Il6*. A significantly reduced mRNA level of *Il18* in the HT22 and BV2 cell lines treated with A β was shown for the first time, which was not affected by the studied S1PR modulators. The observed reduction was more pronounced in microglial cells.

The results obtained in *in vitro* studies indicate a low apoptotic potential of A β in the tested cell lines. The clear proinflammatory effect of A β is more pronounced in microglia. Modulation of S1P receptors in HT22 cells has an antiapoptotic effect and may mitigate inflammation to a small extent. In contrast, the same compounds in BV2 cells tend to exacerbate A β -induced inflammatory and proapoptotic changes. The observed

alterations indicate that both the toxicity of A β and the effect of S1PR stimulation depend on the cell line.

In summary, in *in vivo* studies, a negative effect of the London mutation in the APP gene on the expression of genes for presynaptic proteins and on the AKT kinase-dependent prosurvival signaling pathway was observed. The administration of fingolimod counteracted the London mutation-induced changes in the expression of genes encoding presynaptic proteins in 12-month-old APP⁺ animals, indicating the importance of S1P-dependent signaling in the regulation of synaptic transmission in more advanced stages of the disease. In addition, *in vitro* studies have shown the negative effect of A β on the expression of genes for pro- and antiapoptotic proteins, proinflammatory cytokines, and on the mitochondrial functions. At the same time, the results of *in vitro* experiments point out that the effect of S1P receptor modulation in A β toxicity may vary depending on the cell line, which should be taken into account in further studies on the use of these compounds in Alzheimer's disease.

9. Innowacyjność rozprawy

- Określenie wpływu fingolimodu na poziom mRNA i immunoreaktywność wybranych białek presynaptycznych w korze mózgu i hipokampie transgenicznym myszy FVB-Tg w różnych grupach wiekowych.
- Wykazanie zależnego od wieku wpływu mutacji londyńskiej w genie dla APP na funkcjonowanie prożyciowej ścieżki zależnej od kinazy AKT w hipokampie transgenicznym myszy FVB-Tg.
- Zbadanie wpływu selektywnych modulatorów receptorów dla S1P na wywołane oligomerami A β zmiany w ekspresji genów kodujących receptory dla S1P, białka pro- i antyapoptotyczne oraz cytokiny prozapalne, a także wybrane zmiany czynnościowe mitochondriów w komórkach mysiego mikrogleju i neuronach hipokampa.

10. Literatura

1. Abid NB, Naseer MI, Kim MO. Comparative gene-expression analysis of Alzheimer's disease progression with aging in transgenic mouse model. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(5): 1219. doi: 10.3390/ijms20051219.
2. Abondio P, Bruno F, Bruni AC, Luiselli D. Rare amyloid precursor protein point mutations recapitulate worldwide migration and admixture in healthy individuals: implications for the study of neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(24): 15871. doi: 10.3390/ijms232415871.
3. Adachi K, Kohara T, Nakao N, Arita M, i wsp. Design, synthesis and structure–activity relationships of 2-substituted-2-amino-1,3-propanediols: discovery of a novel immunosuppressant, FTY720. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995; 5: 853–856. doi: 10.1016/0960-894X(95)00127-F
4. Akahoshi N, Ishizaki Y, Yasuda H, Murashima YL, i wsp. Frequent spontaneous seizures followed by spatial working memory/anxiety deficits in mice lacking sphingosine 1-phosphate receptor 2. *Epilepsy Behav.* 2011; 22(4): 659-665. doi: 10.1016/j.yebeh.2011.09.002.
5. Alam S, Piazzesi A, Abd El Fatah M, et al. Neurodegeneration caused by S1P-lyase deficiency involves calcium-dependent tau pathology and abnormal histone acetylation. *Cells.* 2020; 9(10): 2189. doi: 10.3390/cells9102189.
6. Alberdi E, Sánchez-Gómez MV, Ruiz A, Cavaliere F, i wsp. Mangiferin and morin attenuate oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and neurocytotoxicity, induced by amyloid beta oligomers. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 2856063. doi: 10.1155/2018/2856063.
7. Al-Otaibi KM, Alghamdi BS, Al-Ghamdi MA, Mansouri RA, i wsp. Therapeutic effect of combination vitamin D3 and siponimod on remyelination and modulate microglia activation in cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Front Behav Neurosci.* 2023; 16: 1068736. doi: 10.3389/fnbeh.2022.1068736.
8. Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, i wsp. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature.* 2010; 465(7301): 1084-1088. doi: 10.1038/nature09128.
9. Andrieu G, Ledoux A, Branka S, Bocquet M, i wsp. Sphingosine 1-phosphate signaling through its receptor S1P₅ promotes chromosome segregation and mitotic progression. *Sci Signal.* 2017; 10(472): eaah4007. doi: 10.1126/scisignal.aah4007.
10. Arboleda G, Cárdenas Y, Rodríguez Y, Morales LC, i wsp. Differential regulation of AKT, MAPK and GSK3 β during C2-ceramide-induced neuronal death. *Neurotoxicology.* 2010; 31(6): 687-693. doi: 10.1016/j.neuro.2010.08.001.
11. Arnold DL, Piani-Meier D, Bar-Or A, Benedict RH, i wsp. Effect of siponimod on magnetic resonance imaging measures of neurodegeneration and myelination in secondary progressive multiple sclerosis: Gray matter atrophy and magnetization transfer ratio analyses from the EXPAND phase 3 trial. *Mult Scler.* 2022; 28(10): 1526-1540. doi: 10.1177/13524585221076717.
12. Ashford JW. APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci.* 2004; 23(3): 157-165. doi: 10.1385/JMN:23:3:157.
13. Asle-Rousta M, Kolahdooz Z, Oryan S, Ahmadiani A, i wsp. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (A β 42)-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *J Mol Neurosci.* 2013b; 50(3): 524-532. doi: 10.1007/s12031-013-9979-6.
14. Baer A, Colon-Moran W, Bhattarai N. Characterization of the effects of immunomodulatory drug fingolimod (FTY720) on human T cell receptor signaling pathways. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 10910. doi: 10.1038/s41598-018-29355-0.

15. Bandhuvula P, Tam YY, Oskouian B, Saba JD. The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *J Biol Chem.* 2005; 280(40): 33697-33700. doi: 10.1074/jbc.C500294200.
16. Bascuñana P, Möhle L, Brackhan M, Pahnke J. Fingolimod as a treatment in neurologic disorders beyond multiple sclerosis. *Drugs R D.* 2020; 20(3): 197-207. doi: 10.1007/s40268-020-00316-1.
17. Becker-Krail D, Farrand AQ, Boger HA, Lavin A. Effects of fingolimod administration in a genetic model of cognitive deficits. *J Neurosci Res.* 2017; 95(5): 1174-1181. doi: 10.1002/jnr.23799.
18. Beeri MS, Haroutunian V, Schmeidler J, Sano M, i wsp. Synaptic protein deficits are associated with dementia irrespective of extreme old age. *Neurobiol Aging.* 2012; 33(6): 1125.e1-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.017.
19. Behjati M, Etemadifar M, Abdar Esfahani M. Cardiovascular effects of fingolimod: a review article. *Iran J Neurol.* 2014; 13(3): 119-126.
20. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010; 23(4): 213-227. doi: 10.1177/0891988710383571.
21. Berchtold NC, Coleman PD, Cribbs DH, Rogers J, i wsp. Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2013; 34(6): 1653-1661. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.024.
22. Berdyshev EV, Goya J, Gorshkova I, Prestwich GD, i wsp. Characterization of sphingosine-1-phosphate lyase activity by electrospray ionization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantitation of (2E)-hexadecenal. *Anal Biochem.* 2011; 408(1): 12-8. doi: 10.1016/j.ab.2010.08.026.
23. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(2): 99-109. doi: 10.1038/nrmicro2070.
24. Beshir SA, Aadithsoorya AM, Parveen A, Goh SSL, i wsp. Aducanumab therapy to treat Alzheimer's disease: a narrative review. *Int J Alzheimers Dis.* 2022; 2022: 9343514. doi: 10.1155/2022/9343514.
25. Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, i wsp. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(20): 11074-11079. doi: 10.1073/pnas.190297597.
26. Bilousova T, Miller CA, Poon WW, Vinters HV, i wsp. Synaptic amyloid- β oligomers precede p-tau and differentiate high pathology control cases. *Am J Pathol.* 2016; 186(1): 185-198. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.09.018.
27. Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res.* 2014; 55(8): 1596-1608. doi: 10.1194/jlr.R046300.
28. Blanc CA, Grist JJ, Rosen H, Sears-Kraxberger I, i wsp. Sphingosine-1-phosphate receptor antagonism enhances proliferation and migration of engrafted neural progenitor cells in a model of viral-induced demyelination. *Am J Pathol.* 2015; 185(10): 2819-2832. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.06.009.
29. Blondeau N, Lai Y, Tyndall S, Popolo M, i wsp. Distribution of sphingosine kinase activity and mRNA in rodent brain. *J Neurochem.* 2007; 103(2): 509-517. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04755.x.
30. Bobba A, Amadoro G, Valenti D, Corsetti V, i wsp. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion.* 2013; 13(4): 298-311. doi: 10.1016/j.mito.2013.03.008.
31. Bravo GÁ, Cedeño RR, Casadevall MP, Ramió-Torrentà L. Sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P signaling pathway modulators, from current insights to future perspectives. *Cells.* 2022; 11(13): 2058. doi: 10.3390/cells11132058.

32. Brickel KL, Steinbart EJ, Rumbaugh M, Payami H, i wsp. Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2006; 63(9): 1307-1311. doi: 10.1001/archneur.63.9.1307.
33. Brinkmalm A, Brinkmalm G, Honer WG, Frölich L, et al. SNAP-25 is a promising novel cerebrospinal fluid biomarker for synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2014; 9: 53. doi: 10.1186/1750-1326-9-53.
34. Brito-Moreira J, Lourenco MV, Oliveira MM, Ribeiro FC, i wsp. Interaction of amyloid- β (A β) oligomers with neurexin 2 α and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice. *J Biol Chem.* 2017; 292(18): 7327-7337. doi: 10.1074/jbc.M116.761189.
35. Bronzuoli MR, Iacomino A, Steardo L, Scuderi C. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J Inflamm Res.* 2016; 9: 199-208. doi: 10.2147/JIR.S86958.
36. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2007; 3(3): 186-191. doi: 10.1016/j.jalz.2007.04.381.
37. Budd Haeberlein S, Aisen PS, Barkhof F, Chalkias S, i wsp. Two randomized phase 3 studies of aducanumab in early Alzheimer's disease. *J Prev Alzheimers Dis.* 2022; 9(2): 197-210. doi: 10.14283/jpad.2022.30.
38. Budde K, Schmuuder RL, Brunkhorst R, Nashan B, i wsp. First human trial of FTY720, a novel immunomodulator, in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(4): 1073-1083.
39. Calise S, Blescia S, Cencetti F, Bernacchioni C, i wsp. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of satellite cells: role of S1P receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1823(2): 439-450. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.11.016.
40. Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, i wsp. Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2011; 20(23): 4515-29. doi: 10.1093/hmg/ddr381.
41. Carreras I, Aytan N, Choi JK, Tognoni CM, i wsp. Dual dose-dependent effects of fingolimod in a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 10972. doi: 10.1038/s41598-019-47287-1.
42. Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Alzheimer's disease and type 2 diabetes-related alterations in brain mitochondria, autophagy and synaptic markers. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852(8): 1665-1675. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.05.001.
43. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, i wsp. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med.* 2011; 3(89): 89ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.3002156.
44. Ceccom J, Loukh N, Lauwers-Cances V, Touriol C, et al. Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2: 12. doi: 10.1186/2051-5960-2-12.
45. Cencetti F, Bernacchioni C, Tonelli F, Roberts E, i wsp. TGF β 1 evokes myoblast apoptotic response via a novel signaling pathway involving S1P4 transactivation upstream of Rho-kinase-2 activation. *FASEB J.* 2013; 27(11): 4532-4546. doi: 10.1096/fj.13-228528.
46. Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol.* 2010; 91(4): 313-348. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.04.006. Erratum in: *Prog Neurobiol.* 2011; 93(4): 549.
47. Cha MY, Han SH, Son SM, Hong HS, et al. Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PLoS One.* 2012; 7(4): e34929. doi: 10.1371/journal.pone.0034929.

48. Chae SS, Paik JH, Allende ML, Proia RL, i wsp. Regulation of limb development by the sphingosine 1-phosphate receptor S1p1/EDG-1 occurs via the hypoxia/VEGF axis. *Dev Biol.* 2004; 268(2): 441-447. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.01.001.
49. Chandrasekaran K, Giordano T, Brady DR, Stoll J, i wsp. Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994; 24(1-4): 336-340. doi: 10.1016/0169-328x(94)90147-3.
50. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin.* 2017; 38(9): 1205-1235. doi: 10.1038/aps.2017.28.
51. Chen JM, Li QW, Jiang GX, Liu JS, i wsp. IL-18 induced IL-23/IL-17 expression impairs A β clearance in cultured THP-1 and BV2 cells. *Cytokine.* 2019; 119: 113-118. doi: 10.1016/j.cyto.2019.03.003.
52. Chen Y, Han S, Huang X, Ni J, i wsp. The protective effect of icariin on mitochondrial transport and distribution in primary hippocampal neurons from 3 \times Tg-AD mice. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(2): 163. doi: 10.3390/ijms17020163.
53. Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai CL, i wsp. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Mol Neurobiol.* 2013; 47(2): 711-725. doi: 10.1007/s12035-012-8375-5.
54. Chiang MC, Nicol CJB, Cheng YC, Yen C, i wsp. Nanogold neuroprotection in human neural stem cells against amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *Neuroscience.* 2020; 435: 44-57. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.03.040.
55. Chiba K, Matsuyuki H, Maeda Y, Sugahara K. Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cell Mol Immunol.* 2006; 3(1): 11-9.
56. Chiba K. FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. *Pharmacol Ther.* 2005; 108(3): 308-319. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.05.002.
57. Chong FP, Ng KY, Koh RY, Chye SM. Tau proteins and tauopathies in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2018; 38(5): 965-980. doi: 10.1007/s10571-017-0574-1.
58. Chun J, Hartung HP. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 2010; 33(2): 91-101. doi: 10.1097/WNF.0b013e3181cbf825.
59. Cieřlik M, Czapski GA, Strosznajder JB. The molecular mechanism of amyloid β 42 peptide toxicity: the role of sphingosine kinase-1 and mitochondrial sirtuins. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0137193. doi: 10.1371/journal.pone.0137193.
60. Cieřlik M, Czapski GA, Wójtowicz S, Wieczorek I, i wsp. Alterations of Transcription of Genes Coding Anti-oxidative and Mitochondria-Related Proteins in Amyloid β Toxicity: Relevance to Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2020; 57(3): 1374-1388. doi: 10.1007/s12035-019-01819-y.
61. Cizas P, Budvytyte R, Morkuniene R, Moldovan R, i wsp. Size-dependent neurotoxicity of beta-amyloid oligomers. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 496(2): 84-92. doi:10.1016/j.abb.2010.02.001.
62. Clementi ME, Pezzotti M, Orsini F, Sampaolese B, i wsp. Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42) induces cell death in human neuroblastoma via bax/bcl-2 ratio increase: an intriguing role for methionine 35. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342(1): 206-213. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.137.
63. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL. The Amyloid- β oligomer hypothesis: beginning of the third decade. *J Alzheimers Dis.* 2018; 64(s1): S567-S610. doi:10.3233/JAD-179941.
64. Cohen JA, Chun J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2011; 69(5): 759-777. doi: 10.1002/ana.22426.

65. Cohen NA, Choi D, Choden T, Cleveland NK, i wsp. Ozanimod in the treatment of ulcerative colitis: initial real-world data from a large tertiary center. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022; S1542-3565(22)00310-X. doi: 10.1016/j.cgh.2022.03.035.
66. Cole A, Frame S, Cohen P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J*. 2004; 377(Pt 1): 249-255. doi: 10.1042/BJ20031259.
67. Cole SL, Vassar R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener*. 2007; 2: 22. doi: 10.1186/1750-1326-2-22.
68. Colombo E, Bassani C, De Angelis A, Ruffini F, i wsp. Siponimod (BAF312) activates Nrf2 while hampering NF κ B in human astrocytes, and protects from astrocyte-induced neurodegeneration. *Front Immunol*. 2020; 11: 635. doi: 10.3389/fimmu.2020.00635.
69. Corcoran NM, Martin D, Hutter-Paier B, Windisch M, i wsp. Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J Clin Neurosci*. 2010; 17(8): 1025-1033. doi: 10.1016/j.jocn.2010.04.020.
70. Costa RO, Lacor PN, Ferreira IL, Resende R, i wsp. Endoplasmic reticulum stress occurs downstream of GluN2B subunit of N-methyl-d-aspartate receptor in mature hippocampal cultures treated with amyloid- β oligomers. *Aging Cell*. 2012; 11(5): 823-833. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00848.x.
71. Couttas TA, Kain N, Daniels B, Lim XY, et al. Loss of the neuroprotective factor sphingosine 1-phosphate early in Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2: 9. doi: 10.1186/2051-5960-2-9.
72. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, i wsp. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995; 378(6559): 785-789. doi: 10.1038/378785a0.
73. Czapski GA, Cieřlik M, Wencel PL, Wójtcwicz S, i wsp. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters expression of mitochondria-related genes in PC12 cells: relevance to mitochondrial homeostasis in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018; 1865(2): 281-288. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.11.003.
74. Czubowicz K, Strosznajder R. Ceramide in the molecular mechanisms of neuronal cell death. The role of sphingosine-1-phosphate. *Mol Neurobiol*. 2014; 50(1): 26-37. doi: 10.1007/s12035-013-8606-4.
75. Dani M, Wood M, Mizoguchi R, Fan Z, i wsp. Microglial activation correlates in vivo with both tau and amyloid in Alzheimer's disease. *Brain*. 2018; 141(9): 2740-2754. doi: 10.1093/brain/awy188.
76. Darios FD, Jorgacevski J, Flařker A, Zorec R, i wsp. Sphingomimetic multiple sclerosis drug FTY720 activates vesicular synaptobrevin and augments neuroendocrine secretion. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 5958. doi: 10.1038/s41598-017-05948-z.
77. DaRocha-Souto B, Coma M, Pérez-Nievas BG, Scotton TC, i wsp. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2012; 45(1): 425-437. doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.002.
78. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, i wsp. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997; 91(2): 231-241. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80405-5.
79. Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1987; 78: 151-164. doi: 10.1016/0022-510x(87)90057-8.

80. de la Cueva M, Antequera D, Ordoñez-Gutierrez L, Wandosell F, i wsp. Amyloid- β impairs mitochondrial dynamics and autophagy in Alzheimer's disease experimental models. *Sci Rep.* 2022; 12(1): 10092. doi: 10.1038/s41598-022-13683-3.
81. Di Pardo A, Amico E, Basit A, Armirotti A, et al. Defective sphingosine-1-phosphate metabolism is a druggable target in Huntington's disease. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 5280. doi: 10.1038/s41598-017-05709-y. Erratum in: *Sci Rep.* 2018; 8(1): 8266.
82. Di Pardo A, Amico E, Favellato M, Castrataro R, i wsp. FTY720 (fingolimod) is a neuroprotective and disease-modifying agent in cellular and mouse models of Huntington disease. *Hum Mol Genet.* 2014; 23(9): 2251-2265. doi: 10.1093/hmg/ddt615.
83. Di Pardo A, Castaldo S, Amico E, Pepe G, i wsp. Stimulation of S1PR5 with A-971432, a selective agonist, preserves blood-brain barrier integrity and exerts therapeutic effect in an animal model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2018b; 27(14): 2490-2501. doi: 10.1093/hmg/ddy153.
84. Di Pardo A, Maglione V. Sphingolipid metabolism: A new therapeutic opportunity for brain degenerative disorders. *Front Neurosci.* 2018a; 12: 249. doi:10.3389/fnins.2018.00249.
85. Di Pardo A, Pepe G, Capocci L, Marracino F, i wsp. Treatment with K6PC-5, a selective stimulator of SPHK1, ameliorates intestinal homeostasis in an animal model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2020; 143: 105009. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105009.
86. Di Pardo A, Pepe G, Castaldo S, Marracino F, i wsp. Stimulation of sphingosine kinase 1 (SPHK1) is beneficial in a Huntington's disease pre-clinical model. *Front Mol Neurosci.* 2019; 12: 100. doi: 10.3389/fnmol.2019.00100.
87. Diaz Escarcega R, McCullough LD, Tsvetkov AS. The functional role of sphingosine kinase 2. *Front Mol Biosci.* 2021; 8: 683767. doi: 10.3389/fmolb.2021.683767.
88. Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest.* 2004; 114(1): 23-27. doi: 10.1172/JCI22317.
89. Doi Y, Takeuchi H, Horiuchi H, Hanyu T, i wsp. Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid β -induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One.* 2013; 8(4): e61988. doi: 10.1371/journal.pone.0061988.
90. Donati C, Cencetti F, Nincheri P, Bernacchioni C, i wsp. Sphingosine 1-phosphate mediates proliferation and survival of mesoangioblasts. *Stem Cells.* 2007; 25(7): 1713-1719. doi: 10.1634/stemcells.2006-0725.
91. Donati C, Meacci E, Nuti F, Becciolini L, i wsp. Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor. *FASEB J.* 2005; 19(3): 449-451. doi: 10.1096/fj.04-1780fje.
92. Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, i wsp. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013; 369(4): 341-350. doi: 10.1056/NEJMoa1210951.
93. Dorszewska J, Prendecki M, Oczkowska A, Dezor M, i wsp. Molecular basis of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2016; 13(9): 952-963. doi: 10.2174/1567205013666160314150501.
94. Doyle TM, Chen Z, Durante M, Salvemini D. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 in the spinal cord produces mechanohypersensitivity through the activation of inflammasome and IL-1 β pathway. *J Pain.* 2019; 20(8): 956-964. doi: 10.1016/j.jpain.2019.02.007.
95. Dumitrescu L, Constantinescu CS, Tanasescu R. Siponimod for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2019; 20(2): 143-150. doi: 10.1080/14656566.2018.1551363.
96. Dusaban SS, Chun J, Rosen H, Purcell NH, i wsp. Sphingosine 1-phosphate receptor 3 and RhoA signaling mediate inflammatory gene expression in astrocytes. *J Neuroinflammation.* 2017; 14(1): 111. doi: 10.1186/s12974-017-0882-x.

97. Eckert A, Hauptmann S, Scherping I, Meinhardt J, i wsp. Oligomeric and fibrillar species of beta-amyloid (A beta 42) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice. *J Mol Med (Berl)*. 2008; 86(11): 1255-1267. doi: 10.1007/s00109-008-0391-6.
98. Eckert A, Marques CA, Keil U, Schüssel K, i wsp. Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1010: 604-609. doi: 10.1196/annals.1299.113.
99. Eckert GP, Renner K, Eckert SH, Eckmann J, i wsp. Mitochondrial dysfunction--a pharmacological target in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2012; 46(1): 136-150. doi: 10.1007/s12035-012-8271-z.
100. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, i wsp. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet*. 1997; 6(12): 2087-2089. doi: 10.1093/hmg/6.12.2087.
101. Edsall LC, Pirianov GG, Spiegel S. Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J Neurosci*. 1997; 17(18): 6952-6960. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-18-06952.1997.
102. Evans DB, Rank KB, Bhattacharya K, Thomsen DR, i wsp. Tau phosphorylation at serine 396 and serine 404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*. 2000; 275(32): 24977-24983. doi: 10.1074/jbc.M000808200.
103. Fagan SG, Bechet S, Dev KK. Fingolimod rescues memory and improves pathological hallmarks in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2022; 59(3): 1882-1895. doi: 10.1007/s12035-021-02613-5.
104. Fan SJ, Huang FI, Liou JP, Yang CR. The novel histone de acetylase 6 inhibitor, MPT0G211, ameliorates tau phosphorylation and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Cell Death Dis*. 2018; 9(6): 655. doi: 10.1038/s41419-018-0688-5.
105. Fan X, Liu L, Shi Y, Guo F, i wsp. Recent advances of the function of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor S1P3. *J Cell Physiol*. 2021; 236(3): 1564-1578. doi: 10.1002/jcp.29958.
106. Feng L, Zhang L. Resveratrol suppresses a β -induced microglial activation through the TXNIP/TRX/NLRP3 signaling pathway. *DNA Cell Biol*. 2019; 38(8): 874-879. doi: 10.1089/dna.2018.4308.
107. Ferreira ST, Lourenco MV, Oliveira MM, De Felice FG. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 191. doi:10.3389/fncel.2015.00191.
108. Fettel J, Kühn B, Guillen NA, Sürün D, i wsp. Sphingosine-1-phosphate (S1P) induces potent anti-inflammatory effects in vitro and in vivo by S1P receptor 4-mediated suppression of 5-lipoxygenase activity. *FASEB J*. 2019; 33(2): 1711-1726. doi: 10.1096/fj.201800221R.
109. Forrest M, Sun SY, Hajdu R, Bergstrom J, i wsp. Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 309(2): 758-768. doi: 10.1124/jpet.103.062828.
110. Forrest M, Sun SY, Hajdu R, Bergstrom J, i wsp. Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 309(2): 758-768. doi: 10.1124/jpet.103.062828.
111. Fossati S, Giannoni P, Solesio ME, Cocklin SL, i wsp. The carbonic anhydrase inhibitor methazolamide prevents amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and caspase activation protecting neuronal and glial cells in vitro and in the mouse brain. *Neurobiol Dis*. 2016; 86: 29-40. doi: 10.1016/j.nbd.2015.11.006.
112. Foster CA, Howard LM, Schweitzer A, Persohn E, i wsp. Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during

- experimental autoimmune encephalomyelitis: consequences for mode of action in multiple sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 323(2): 469-475. doi: 10.1124/jpet.107.127183.
113. Frederiksen K, McKay RD. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci.* 1988; 8(4): 1144-1151. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-04-01144.1988.
114. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, i wsp. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell.* 2006; 126(1): 177-189. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.025.
115. Fryer RM, Muthukumarana A, Harrison PC, Nodop Mazurek S, i wsp. The clinically-tested S1P receptor agonists, FTY720 and BAF312, demonstrate subtype-specific bradycardia (S1P₁) and hypertension (S1P₃) in rat. *PLoS One.* 2012; 7(12): e52985. doi: 10.1371/journal.pone.0052985.
116. Fu AK, Hung KW, Huang H, Gu S, et al. Blockade of EphA4 signaling ameliorates hippocampal synaptic dysfunctions in mouse models of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(27): 9959–9964. doi:10.1073/pnas.1405803111.
117. Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, i wsp. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot (Tokyo).* 1994; 47(2): 208-215. doi: 10.7164/antibiotics.47.208.
118. Fukuda Y, Kihara A, Igarashi Y. Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 309(1): 155-160. doi: 10.1016/s0006-291x(03)01551-1.
119. Fukumoto K, Mizoguchi H, Takeuchi H, Horiuchi H, i wsp. Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid β -induced memory impairment. *Behav Brain Res.* 2014; 268: 88-93. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.046.
120. Furuya TK, Silva PN, Payão SL, Bertolucci PH, i wsp. Analysis of SNAP25 mRNA expression and promoter DNA methylation in brain areas of Alzheimer's Disease patients. *Neuroscience.* 2012; 220: 41-46. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.035.
121. Gaire BP, Song MR, Choi JW. Sphingosine 1-phosphate receptor subtype 3 (S1P₃) contributes to brain injury after transient focal cerebral ischemia via modulating microglial activation and their M1 polarization. *J Neuroinflammation.* 2018; 15(1): 284. doi: 10.1186/s12974-018-1323-1.
122. Gangoiti P, Bernacchioni C, Donati C, Cencetti F i wsp. Ceramide 1-phosphate stimulates proliferation of C2C12 myoblasts. *Biochimie.* 2012; 94(3): 597-607. doi: 10.1016/j.biochi.2011.09.009.
123. Gangoiti P, Granado MH, Wang SW, Kong JY, i wsp. Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cell Signal.* 2008; 20(4): 726-736. doi: 10.1016/j.celsig.2007.12.008.
124. Gao C, Liu Y, Jiang Y, Ding J, i wsp. Geniposide ameliorates learning memory deficits, reduces tau phosphorylation and decreases apoptosis via GSK3 β pathway in streptozotocin-induced alzheimer rat model. *Brain Pathol.* 2014; 24(3): 261-269. doi: 10.1111/bpa.12116.
125. Gassowska M, Cieslik M, Wilkaniec A, Strosznajder JB. Sphingosine kinases/sphingosine-1-phosphate and death signalling in APP-transfected cells. *Neurochem Res.* 2014; 39(4): 645-652. doi: 10.1007/s11064-014-1240-3.
126. Gassowska M, Cieslik M, Wilkaniec A, Strosznajder JB. Sphingosine kinases/sphingosine-1-phosphate and death Signalling in APP-transfected cells. *Neurochem Res.* 2014; 39(4): 645-652. doi: 10.1007/s11064-014-1240-3.
127. Gautam V, D'Avanzo C, Berezovska O, Tanzi RE, i wsp. Synaptotagmins interact with APP and promote A β generation. *Mol Neurodegener.* 2015; 10: 31. doi: 10.1186/s13024-015-0028-5.
128. Gauthier S, Webster C, Servaes S, Morais JA, Rosa-Neto P. World Alzheimer Report 2022: Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support. 2022; London, England: Alzheimer's Disease International.

129. Gentile A, Musella A, Bullitta S, Fresegna D, et al. Siponimod (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2016; 13(1): 207. doi: 10.1186/s12974-016-0686-4.
130. Gergely P, Nuesslein-Hildesheim B, Guerini D, Brinkmann V, i wsp. The selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator BAF312 redirects lymphocyte distribution and has species-specific effects on heart rate. *Br J Pharmacol*. 2012; 167(5): 1035-1047. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02061.x.
131. Ghasemi R, Dargahi L, Ahmadiani A. Integrated sphingosine-1 phosphate signaling in the central nervous system: From physiological equilibrium to pathological damage. *Pharmacol Res*. 2016; 104: 156-164. doi: 10.1016/j.phrs.2015.11.006.
132. Giacobini E, Gold G. Alzheimer disease therapy - moving from amyloid- β to tau. *Nat Rev Neurol*. 2013; 9(12): 677-686. doi: 10.1038/nrneurol.2013.223.
133. Goetzl EJ, Kapogiannis D, Schwartz JB, Lobach IV, i wsp. Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2016; 30(12): 4141-4148. doi: 10.1096/fj.201600816R.
134. Gol M, Ghorbanian D, Hassanzadeh S, Javan M, i wsp. Fingolimod enhances myelin repair of hippocampus in pentylenetetrazol-induced kindling model. *Eur J Pharm Sci*. 2017; 96: 72-83. doi: 10.1016/j.ejps.2016.09.016.
135. Gondard E, Soto-Montenegro ML, Cassol A, Lozano AM, i wsp. Transcranial direct current stimulation does not improve memory deficits or alter pathological hallmarks in a rodent model of Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 2019; 114: 93-98. doi: 10.1016/j.jpsychires.2019.04.016.
136. Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, i wsp. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem*. 1995; 65(2): 732-738. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65020732.x.
137. Gordon SL, Cousin MA. The Sybtraps: control of synaptobrevin traffic by synaptophysin, α -synuclein and AP-180. *Traffic*. 2014; 15(3): 245-254. doi: 10.1111/tra.12140.
138. Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP. Update on Alzheimer's disease therapy and prevention strategies. *Annu Rev Med*. 2017; 68: 413-430. doi: 10.1146/annurev-med-042915-103753.
139. Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, i wsp. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*. 2005; 93(1): 105-117. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02949.x.
140. Gu X, Cai Z, Cai M, Liu K, i wsp. Protective effect of paeoniflorin on inflammation and apoptosis in the cerebral cortex of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Med Rep*. 2016; 13(3): 2247-2252. doi: 10.3892/mmr.2016.4805.
141. Guerreiro RJ, Gustafson DR, Hardy J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(3): 437-456. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.025.
142. Guo L, Tian J, Du H. Mitochondrial dysfunction and synaptic transmission failure in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017; 57(4): 1071-1086. doi: 10.3233/JAD-160702.
143. Gutner UA, Shupik MA, Maloshitskaya OA, Sokolov SA, et al. Changes in the metabolism of sphingoid bases in the brain and spinal cord of transgenic FUS(1-359) mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemistry (Mosc)*. 2019; 84(10): 1166-1176. doi: 10.1134/S0006297919100055.
144. Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, i wsp. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science*. 2009; 325(5945): 1254-1257. doi: 10.1126/science.1176709.

145. Hait NC, Bellamy A, Milstien S, Kordula T, i wsp. Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* 2007; 282(16): 12058-12065. doi: 10.1074/jbc.M609559200.
146. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(2): 139-150. doi: 10.1038/nrm2329.
147. Hansen L, Lohfink N, Vutukuri R, Kestner RI, i wsp. Endothelial sphingosine-1-phosphate receptor 4 regulates blood-brain barrier permeability and promotes a homeostatic endothelial phenotype. *J Neurosci.* 2022; 42(10): 1908-1929. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0188-21.2021.
148. Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, i wsp. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(35): 13145-50. doi: 10.1073/pnas.0806192105.
149. Harada J, Foley M, Moskowitz MA, Waeber C. Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *J Neurochem.* 2004; 88(4): 1026-1039. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02219.x.
150. Haroutunian V, Schnaider-Beeri M, Schmeidler J, Wysocki M, i wsp. Role of the neuropathology of Alzheimer disease in dementia in the oldest-old. *Arch Neurol.* 2008; 65(9): 1211-1217. doi: 10.1001/archneur.65.9.1211.
151. Hata Y, Davletov B, Petrenko AG, Jahn R, i wsp. Interaction of synaptotagmin with the cytoplasmic domains of neurexins. *Neuron.* 1993; 10(2): 307-315. doi: 10.1016/0896-6273(93)90320-q.
152. Haytural H, Jordà-Siquier T, Winblad B, Mulle C, i wsp. Distinctive alteration of presynaptic proteins in the outer molecular layer of the dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Brain Commun.* 2021; 3(2): fcab079. doi: 10.1093/braincomms/fcab079.
153. He M, Liu J, Cheng S, Xing Y, i wsp. Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. *Neural Regen Res.* 2013; 8(14): 1297-1306. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.14.006.
154. He X, Huang Y, Li B, Gong CX, i wsp. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2010; 31(3): 398-408. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.010.
155. He Y, Cui J, Lee JC, Ding S, i wsp. Prolonged exposure of cortical neurons to oligomeric amyloid- β impairs NMDA receptor function via NADPH oxidase-mediated ROS production: protective effect of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate. *ASN Neuro.* 2011; 3(1): e00050. doi: 10.1042/AN20100025.
156. He Y, Zheng MM, Ma Y, Han XJ, i wsp. Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid β -peptide differentially affect cognitive functions and hippocampal inflammatory response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 429(3-4): 125-130. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.129.
157. Heffernan JM, Eastwood SL, Nagy Z, Sanders MW, i wsp. Temporal cortex synaptophysin mRNA is reduced in Alzheimer's disease and is negatively correlated with the severity of dementia. *Exp Neurol.* 1998; 150(2): 235-239. doi: 10.1006/exnr.1997.6772.
158. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, i wsp. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015; 14(4): 388-405. doi: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5.
159. Henriques A, Croixmarie V, Bouscary A, Mosbach A, et al. Sphingolipid metabolism is dysregulated at transcriptomic and metabolic levels in the spinal cord of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Mol Neurosci.* 2018; 10: 433. doi: 10.3389/fnmol.2017.00433.
160. Hla T, Maciag T. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 1990; 265(16): 9308-9313.
161. Honer WG, Barr AM, Sawada K, Thornton AE, i wsp. Cognitive reserve, presynaptic proteins and dementia in the elderly. *Transl Psychiatry.* 2012; 2(5): e114. doi: 10.1038/tp.2012.38.

162. Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, i wsp. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*. 2006; 52(5): 831-843. doi: 10.1016/j.neuron.2006.10.035.
163. Huang HC, Tang D, Xu K, Jiang ZF. Curcumin attenuates amyloid- β -induced tau hyperphosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells involving PTEN/Akt/GSK-3 β signaling pathway. *J Recept Signal Transduct Res*. 2014; 34(1): 26-37. doi: 10.3109/10799893.2013.848891.
164. Huang YR, Liu RT. The toxicity and polymorphism of β -amyloid oligomers. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(12): 4477. doi: 10.3390/ijms21124477
165. Hundehage P, Cerina M, Eichler S, Thomas C, et al. The next-generation sphingosine-1 receptor modulator BAF312 (siponimod) improves cortical network functionality in focal autoimmune encephalomyelitis. *Neural Regen Res*. 2019; 14(11): 1950-1960. doi: 10.4103/1673-5374.259622.
166. Hunter SF, Bowen JD, Reder AT. The direct effects of fingolimod in the central nervous system: implications for relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2016; 30(2): 135-147. doi: 10.1007/s40263-015-0297-0.
167. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, i wsp. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012; 8(1): 1-13. doi: 10.1016/j.jalz.2011.10.007.
168. Igarashi J, Bernier SG, Michel T. Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. differential regulation of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001; 276(15): 12420-12426. doi: 10.1074/jbc.M008375200.
169. Igarashi N, Okada T, Hayashi S, Fujita T, i wsp. Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J Biol Chem*. 2003; 278(47): 46832-46839. doi: 10.1074/jbc.M306577200.
170. Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325(1): 338-343. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.036.
171. Imbimbo BP, Watling M. Investigational BACE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019; 28(11): 967-975. doi: 10.1080/13543784.2019.1683160.
172. Ingwersen J, Aktas O, Kuery P, Kieseier B, i wsp. Fingolimod in multiple sclerosis: mechanisms of action and clinical efficacy. *Clin Immunol*. 2012; 142(1): 15-24. doi: 10.1016/j.clim.2011.05.005.
173. Ishii I, Friedman B, Ye X, Kawamura S, i wsp. Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem*. 2001; 276(36): 33697-33704. doi: 10.1074/jbc.M104441200.
174. Ishii I, Ye X, Friedman B, Kawamura S, i wsp. Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem*. 2002; 277(28): 25152-25159. doi: 10.1074/jbc.M200137200.
175. Jahn H. Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2013; 15(4): 445-454. doi: 10.31887/DCNS.2013.15.4/hjahn.
176. Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, Aigrot MS, i wsp. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci*. 2005; 25(6): 1459-1469. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4645-04.2005.
177. Jana M, Palencia CA, Pahan K. Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *J Immunol*. 2008; 181(10): 7254-7262. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7254.

178. Jenne CN, Enders A, Rivera R, Watson SR, i wsp. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J Exp Med*. 2009; 206(11): 2469-2481. doi: 10.1084/jem.20090525.
179. Ješko H, Wencel PL, Lukiw WJ, Strosznajder RP. Modulatory effects of fingolimod (FTY720) on the expression of sphingolipid metabolism-related genes in an animal model of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2019; 56(1): 174-185. doi: 10.1007/s12035-018-1040-x.
180. Jian M, Kwan JS, Bunting M, Ng RC, i wsp. Adiponectin suppresses amyloid- β oligomer (A β O)-induced inflammatory response of microglia via AdipoR1-AMPK-NF- κ B signaling pathway. *J Neuroinflammation*. 2019; 16(1): 110. doi: 10.1186/s12974-019-1492-6.
181. Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, i wsp. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(14): 5819-5824. doi: 10.1073/pnas.1017033108.
182. Johnston JA, Cowburn RF, Norgren S, Wiehager B, i wsp. Increased beta-amyloid release and levels of amyloid precursor protein (APP) in fibroblast cell lines from family members with the Swedish Alzheimer's disease APP670/671 mutation. *FEBS Lett*. 1994; 354(3): 274-278. doi: 10.1016/0014-5793(94)01137-0.
183. Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, i wsp. Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med*. 2004; 199(7): 959-970. doi: 10.1084/jem.20030680.
184. Joshi AU, Saw NL, Shamloo M, Mochly-Rosen D. Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction, bioenergetic failure and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Oncotarget*. 2017; 9(5): 6128-6143. doi: 10.18632/oncotarget.23640.
185. Joshi P, Gabrielli M, Ponzoni L, Pelucchi S, i wsp. Fingolimod limits acute A β neurotoxicity and promotes synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor functionality in hippocampal neurons. *Sci Rep*. 2017; 7: 41734. doi: 10.1038/srep41734.
186. Jung Y, Lopez-Benitez J, Tognoni CM, Carreras I, i wsp. Dysregulation of sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P receptor 1 signaling in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2023; 1799: 148171. doi: 10.1016/j.brainres.2022.148171.
187. Kanno T, Tsuchiya A, Nishizaki T. Hyperphosphorylation of Tau at Ser396 occurs in the much earlier stage than appearance of learning and memory disorders in 5XFAD mice. *Behav Brain Res*. 2014; 274: 302-306. doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.034.
188. Kelly BL, Ferreira A. beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 2006; 281(38): 28079-28089. doi: 10.1074/jbc.M605081200.
189. Kihara Y, Jonnalagadda D, Zhu Y, Ray M, i wsp. Ponesimod inhibits astrocyte-mediated neuroinflammation and protects against cingulum demyelination via S1P₁-selective modulation. *FASEB J*. 2022; 36(2): e22132. doi: 10.1096/fj.202101531R.
190. Kim HG, Moon M, Choi JG, Park G, i wsp. Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation in vitro and in vivo. *Neurotoxicology*. 2014b; 40: 23-32. doi: 10.1016/j.neuro.2013.10.004.
191. Kim J, Yang Y, Song SS, Na JH, i wsp. Beta-amyloid oligomers activate apoptotic BAK pore for cytochrome c release. *Biophys J*. 2014a; 107(7): 1601-1608. doi: 10.1016/j.bpj.2014.07.074.
192. Kim Y, Lee YI, Seo M, Kim SY, i wsp. Calcineurin dephosphorylates glycogen synthase kinase-3 beta at serine-9 in neuroblast-derived cells. *J Neurochem*. 2009; 111(2): 344-354. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06318.x.
193. Kimura A, Ohmori T, Kashiwakura Y, Ohkawa R, i wsp. Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor-2 enhances migration of neural progenitor cells toward an area of brain. *Stroke*. 2008; 39(12): 3411-34117. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.514612.

194. Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, i wsp. Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells*. 2007; 25(1): 115-124. doi: 10.1634/stemcells.2006-0223.
195. Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, i wsp. Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia*. 1996; 7(4): 177-181. doi: 10.1159/000106875.
196. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, i wsp. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2018; 4: 575-590. doi: 10.1016/j.trci.2018.06.014.
197. Kipp M. Does Siponimod Exert Direct Effects in the Central Nervous System? *Cells*. 2020; 9(8): 1771. doi: 10.3390/cells9081771.
198. Kiuchi M, Adachi K, Kohara T, Minoguchi M, i wsp. Synthesis and immunosuppressive activity of 2-substituted 2-aminopropane-1,3-diols and 2-aminoethanols. *J Med Chem*. 2000; 43(15): 2946-2961. doi: 10.1021/jm000173z.
199. Kivisäkk P, Carlyle BC, Sweeney T, Quinn JP, i wsp.. Increased levels of the synaptic proteins PSD-95, SNAP-25, and neurogranin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2022; 14(1): 58. doi: 10.1186/s13195-022-01002-x.
200. Klenke S, Specking C, Stegen M, Engler A, i wsp. Methylation in HT22 cells and primary hippocampal neurons with and without isoflurane exposure whether isoflurane causes. *BMC Anesthesiol*. 2020; 20(1): 66. doi: 10.1186/s12871-020-00981-4. Erratum in: *BMC Anesthesiol*. 2020; 20(1): 74.
201. Koh SH, Noh MY, Kim SH. Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Brain Res*. 2008; 1188: 254-262. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.064.
202. Kolahdooz Z, Nasoohi S, Asle-Rousta M, Ahmadiani A, i wsp. Sphingosin-1-phosphate receptor 1: a potential target to inhibit neuroinflammation and restore the sphingosin-1-phosphate metabolism. *Can J Neurol Sci*. 2015; 42(3): 195-202. doi: 10.1017/cjn.2015.19.
203. Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, i wsp. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *J Biol Chem*. 2007; 282(14): 10690-10696. doi: 10.1074/jbc.M700370200.
204. Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, i wsp. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem*. 2004; 279(28): 29367-29373. doi: 10.1074/jbc.M403937200.
205. Koo JH, Kwon IS, Kang EB, Lee CK, i wsp. Neuroprotective effects of treadmill exercise on BDNF and PI3-K/Akt signaling pathway in the cortex of transgenic mice model of Alzheimer's disease. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2013; 17(4): 151-60. doi: 10.5717/jenb.2013.17.4.151.
206. Krivinko JM, Erickson SL, MacDonald ML, Garver ME, i wsp. Fingolimod mitigates synaptic deficits and psychosis-like behavior in APP/PSEN1 mice. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2022; 8(1): e12324. doi: 10.1002/trc2.12324.
207. Kudo W, Lee HP, Smith MA, Zhu X, et al. Inhibition of Bax protects neuronal cells from oligomeric Ab neurotoxicity. *Cell Death Dis*. 2012; 3: e309. doi: 10.1038/cddis.2012.43.
208. Kumar M, Bansal N. Implications of phosphoinositide 3-kinase-Akt (PI3K-Akt) pathway in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2022; 59(1): 354-385. doi: 10.1007/s12035-021-02611-7.
209. Kuzuya A, Zoltowska KM, Post KL, Arimon M, i wsp. Identification of the novel activity-driven interaction between synaptotagmin 1 and presenilin 1 links calcium, synapse, and amyloid beta. *BMC Biology*. 2016; 14: 25. doi 10.1186/s12915-016-0248-3 B.

210. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, i wsp. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(11): 6448-6453. doi: 10.1073/pnas.95.11.6448.
211. Lee CC, Huang CC, Hsu KS. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology*. 2011; 61(4): 867-879. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.06.003.
212. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol*. 2021; 17(3): 157-172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y.
213. Lépine S, Allegood JC, Park M, Dent P, i wsp. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. *Cell Death Differ*. 2011; 18: 350-361. doi: 10.1038/cdd.2010.104.
214. Lepley D, Paik JH, Hla T, Ferrer F. The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res*. 2005; 65(9): 3788-3795. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2311.
215. Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP. Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007; 33(1): 43-55. doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00795.x.
216. Levenson RW, Sturm VE, Haase CM. Emotional and behavioral symptoms in neurodegenerative disease: a model for studying the neural bases of psychopathology. *Annu Rev Clin Psychol*. 2014; 10: 581-606. doi: 10.1146/annurev-clinpsy-032813-153653.
217. Li J, Wang G, Liu J, Zhou L, i wsp. Puerarin attenuates amyloid-beta-induced cognitive impairment through suppression of apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2010; 649(1-3): 195-201. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.045.
218. Li L, Li W, Jung SW, Lee YW, i wsp. Protective effects of decursin and decursinol angelate against amyloid β -protein-induced oxidative stress in the PC12 cell line: the role of Nrf2 and antioxidant enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011; 75(3): 434-442. doi: 10.1271/bbb.100606.
219. Li L, Liu Z, Liu J, Tai X, i wsp. Ginsenoside Rd attenuates beta-amyloid-induced tau phosphorylation by altering the functional balance of glycogen synthase kinase 3beta and protein phosphatase 2A. *Neurobiol Dis*. 2013; 54: 320-328. doi: 10.1016/j.nbd.2013.01.002.
220. Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, i wsp. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*. 2009; 62(6): 788-801. doi: 10.1016/j.neuron.2009.05.012.
221. Li T, Paudel HK. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry*. 2006; 45(10): 3125-3133. doi: 10.1021/bi051634r.
222. Li X, Zhang H, Zheng W, Sun J, i wsp. Ozanimod-dependent activation of SIRT3/NF- κ B/AIM2 pathway attenuates secondary injury after intracerebral hemorrhage. *Mol Neurobiol*. 2023; 60(3): 1117-1131. doi: 10.1007/s12035-022-03137-2.
223. Liang J, Kulasiri D, Samarasinghe S. Computational investigation of Amyloid- β -induced location- and subunit-specific disturbances of NMDAR at hippocampal dendritic spine in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2017; 12(8): e0182743. doi: 10.1371/journal.pone.0182743.
224. Lin MY, Rohan JG, Cai H, Reim K, i wsp. Complexin facilitates exocytosis and synchronizes vesicle release in two secretory model systems. *J Physiol*. 2013; 591(10): 2463-2473. doi: 10.1113/jphysiol.2012.244517.
225. Liu A, Zhang Y, Han L, He G, i wsp. Regulation of neurotransmitter release by amyloid precursor protein through synapsin phosphorylation. *Neurochem Res*. 2019; 44(3): 683-691. doi: 10.1007/s11064-017-2418-2.

226. Liu D, Wei N, Man HY, Lu Y, i wsp. The MT2 receptor stimulates axonogenesis and enhances synaptic transmission by activating Akt signaling. *Cell Death Differ.* 2015; 22(4): 583-596. doi: 10.1038/cdd.2014.195.
227. Liu GP, Zhang Y, Yao XQ, Zhang CE, i wsp. Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits protein phosphatase-2A and the underlying mechanisms. *Neurobiol Aging.* 2008; 29(9): 1348-1358. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.012.
228. Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, i wsp. Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem.* 2000a; 275(26): 19513-19520. doi: 10.1074/jbc.M002759200.
229. Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, i wsp. Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J Biol Chem.* 2003; 278(41): 40330-6. doi: 10.1074/jbc.M304455200.
230. Liu Y, Dai Y, Li Q, Chen C, i wsp. Beta-amyloid activates NLRP3 inflammasome via TLR4 in mouse microglia. *Neurosci Lett.* 2020; 736: 135279. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135279.
231. Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, i wsp. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol.* 2011; 225(1): 54-62. doi: 10.1002/path.2912.
232. Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, i wsp. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest.* 2000b; 106(8): 951-961. doi: 10.1172/JCI10905.
233. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
234. Llorens-Martín M, Jurado J, Hernández F, Avila J. GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci.* 2014; 7: 46. doi: 10.3389/fnmol.2014.00046.
235. Lloret A, Badia MC, Giraldo E, Ermak G, i wsp. Amyloid- β toxicity and tau hyperphosphorylation are linked via RCAN1 in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011; 27(4): 701-709. doi: 10.3233/JAD-2011-110890.
236. Lou H, Fan P, Perez RG, Lou H. Neuroprotective effects of linarin through activation of the PI3K/Akt pathway in amyloid- β -induced neuronal cell death. *Bioorg Med Chem.* 2011; 19(13): 4021-4027. doi: 10.1016/j.bmc.2011.05.021.
237. López-Murcia FJ, Reim K, Jahn O, Taschenberger H, i wsp. Acute complexin knockout abates spontaneous and evoked transmitter release. *Cell Rep.* 2019; 26(10): 2521-2530.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.030.
238. Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, i wsp. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. *EMBO J.* 2001; 20(1-2): 27-39. doi: 10.1093/emboj/20.1.27.
239. Ma QL, Lim GP, Harris-White ME, Yang F, i wsp. Antibodies against beta-amyloid reduce Abeta oligomers, glycogen synthase kinase-3 β activation and tau phosphorylation in vivo and in vitro. *J Neurosci Res.* 2006; 83(3): 374-384. doi: 10.1002/jnr.20734.
240. Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, i wsp. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem.* 2005; 280(44): 37118-37129. doi: 10.1074/jbc.M502207200.
241. MacLennan AJ, Benner SJ, Andringa A, Chaves AH, i wsp. The S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor is essential for auditory and vestibular function. *Hear Res.* 2006; 220(1-2): 38-48. doi: 10.1016/j.heares.2006.06.016.
242. MacLennan AJ, Carney PR, Zhu WJ, Chaves AH, i wsp. An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur J Neurosci.* 2001; 14(2): 203-209. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01634.x.

243. Maesako M, Zoltowska KM, Berezovska O. Synapsin 1 promotes A β generation via BACE1 modulation. *PLoS One*. 2019; 14(12): e0226368. doi: 10.1371/journal.pone.0226368.
244. Maezawa I, Zimin PI, Wulff H, Jin LW. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J Biol Chem*. 2011; 286(5): 3693-3706. doi: 10.1074/jbc.M110.135244.
245. Malaplate-Armand C, Florent-Bécharard S, Youssef I, Koziel V, i wsp. Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis*. 2006; 23(1): 178-189. doi: 10.1016/j.nbd.2006.02.010.
246. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, i wsp. 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*. 2006; 15(9): 1437-1449. doi: 10.1093/hmg/ddl066.
247. Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet*; 2011; 20(13): 2495-2509. doi: 10.1093/hmg/ddr139.
248. Mandal P, Gupta A, Fusi-Rubiano W, Keane PA, i wsp. Fingolimod: therapeutic mechanisms and ocular adverse effects. *Eye (Lond)*. 2017; 31(2): 232-240. doi: 10.1038/eye.2016.258.
249. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, i wsp. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*. 1996; 184(3): 1155-1160. doi: 10.1084/jem.184.3.1155.
250. Marsh J, Alifragis P. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: the effects of amyloid beta on synaptic vesicle dynamics as a novel target for therapeutic intervention. *Neural Regen Res*. 2018; 13(4): 616-623. doi: 10.4103/1673-5374.230276.
251. Marsh J, Bagol SH, Williams RSB, Dickson G, i wsp. Synapsin I phosphorylation is dysregulated by beta-amyloid oligomers and restored by valproic acid. *Neurobiol Dis*. 2017; 106: 63-75. doi: 10.1016/j.nbd.2017.06.011.
252. Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, i wsp. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2013; 12(1): 289-309. doi: 10.1016/j.arr.2012.06.003.
253. Martín-Montañez E, Pavia J, Valverde N, Boraldi F, i wsp. The S1P mimetic fingolimod phosphate regulates mitochondrial oxidative stress in neuronal cells. *Free Radic Biol Med*. 2019; 137: 116-130. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.022.
254. Masters SC, Yang H, Datta SR, Greenberg ME, i wsp. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol*. 2001; 60(6): 1325-1331. doi: 10.1124/mol.60.6.1325.
255. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, i wsp. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004; 427(6972): 355-360. doi: 10.1038/nature02284.
256. Matos M, Augusto E, Machado NJ, dos Santos-Rodrigues A, i wsp. Astrocytic adenosine A2A receptors control the amyloid- β peptide-induced decrease of glutamate uptake. *J Alzheimers Dis*. 2012; 31(3): 555-567. doi: 10.3233/JAD-2012-120469.
257. Matos M, Augusto E, Oliveira CR, Agostinho P. Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience*. 2008; 156(4): 898-910. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.08.022.
258. Mattiace LA, Davies P, Yen SH, Dickson DW. Microglia in cerebellar plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1990; 80(5): 493-498. doi: 10.1007/BF00294609.

259. Maximov A, Südhof TC. Autonomous function of synaptotagmin 1 in triggering synchronous release independent of asynchronous release. *Neuron*. 2005; 48(4): 547-554. doi: 10.1016/j.neuron.2005.09.006.
260. Mayol K, Biajoux V, Marvel J, Balabanian K, i wsp. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood*. 2011; 118(18): 4863-4871. doi: 10.1182/blood-2011-06-362574.
261. Mazzola MA, Raheja R, Murugaiyan G, Rajabi H, i wsp. Identification of a novel mechanism of action of fingolimod (FTY720) on human effector T cell function through TCF-1 upregulation. *J Neuroinflammation*. 2015; 12: 245. doi: 10.1186/s12974-015-0460-z.
262. McGinley MP, Cohen JA. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis and other conditions. *Lancet*. 2021; 398(10306): 1184-1194. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00244-0. Erratum in: *Lancet*. 2021; 398(10306): 1132.
263. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, i wsp. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011; 7(3): 263-269. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
264. Means CK, Xiao CY, Li Z, Zhang T, i wsp. Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292(6): H2944-2951. doi: 10.1152/ajpheart.01331.2006.
265. Melendez AJ, Carlos-Dias E, Gosink M, Allen JM, i wsp. Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene*. 2000; 251(1): 19-26. doi: 10.1016/s0378-1119(00)00205-5.
266. Meng H, Lee VM. Differential expression of sphingosine-1-phosphate receptors 1-5 in the developing nervous system. *Dev Dyn*. 2009; 238(2): 487-500. doi: 10.1002/dvdy.21852.
267. Meng H, Yuan Y, Lee VM. Loss of sphingosine kinase 1/S1P signaling impairs cell growth and survival of neurons and progenitor cells in the developing sensory ganglia. *PLoS One*. 2011; 6(11): e27150. doi: 10.1371/journal.pone.0027150.
268. Merkwirth C i Langer T. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793(1): 27-32. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.05.013.
269. Metaxas A, Thygesen C, Kempf SJ, Anzalone M, i wsp. Ageing and amyloidosis underlie the molecular and pathological alterations of tau in a mouse model of familial Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 15758. doi: 10.1038/s41598-019-52357-5.
270. Miguez A, Garcia-Diaz Barriga G, Brito V, Straccia M, i wsp. Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington's disease by preventing p75NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(17): 4958-4970. doi: 10.1093/hmg/ddv218.
271. Minger SL, Honer WG, Esiri MM, McDonald B, i wsp. Synaptic pathology in prefrontal cortex is present only with severe dementia in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60(10): 929-936. doi: 10.1093/jnen/60.10.929.
272. Mirza FJ, Amber S, Sumera, Hassan D, i wsp. Rosmarinic acid and ursolic acid alleviate deficits in cognition, synaptic regulation and adult hippocampal neurogenesis in an A β ₁₋₄₂-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Phytomedicine*. 2021; 83: 153490. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153490.
273. Misiti F, Clementi ME, Tringali G, Vairano M, i wsp.. Fragment 31-35 of beta-amyloid peptide induces neurodegeneration in rat cerebellar granule cells via bax gene expression and caspase-3 activation. A crucial role for the redox state of methionine-35 residue. *Neurochem Int*. 2006; 49(5): 525-532. doi: 10.1016/j.neuint.2006.03.014.

274. Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, i wsp. Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 211(2): 396-403. doi: 10.1006/bbrc.1995.1827.
275. Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, i wsp. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(24): 11113-11121. doi: 10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005.
276. Modi KK, Jana A, Ghosh S, Watson R, i wsp. A physically-modified saline suppresses neuronal apoptosis, attenuates tau phosphorylation and protects memory in an animal model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2014; 9(8): e103606. doi: 10.1371/journal.pone.0103606. Erratum in: *PLoS One.* 2017; 12(6): e0180602.
277. Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reversé D, i wsp. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem.* 1999; 274(10): 6483-6492. doi: 10.1074/jbc.274.10.6483.
278. Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino MC, i wsp. Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014; 40(2): 121-135. doi: 10.1111/nan.12084.
279. Morales-Ruiz M, Lee MJ, Zöllner S, Gratton JP, i wsp. Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(22): 19672-19677. doi: 10.1074/jbc.M009993200.
280. Moruno Manchon JF, Uzor NE, Dabaghian Y, Furr-Stimming EE, i wsp. Cytoplasmic sphingosine-1-phosphate pathway modulates neuronal autophagy. *Sci Rep.* 2015; 5: 15213. doi: 10.1038/srep15213.
281. Moruno-Manchon JF, Uzor NE, Blasco-Conesa MP, Mannuru S, i wsp. Inhibiting sphingosine kinase 2 mitigates mutant Huntingtin-induced neurodegeneration in neuron models of Huntington disease. *Hum Mol Genet.* 2017; 26(7): 1305-1317. doi: 10.1093/hmg/ddx046.
282. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
283. Mota SI, Pita I, Águas R, Tagorti S, i wsp. Mechanistic perspectives on differential mitochondrial-based neuroprotective effects of several carnitine forms in Alzheimer's disease in vitro model. *Arch Toxicol.* 2021; 95(8): 2769-2784. doi: 10.1007/s00204-021-03104-1.
284. Motyl J, Przykaza Ł, Boguszewski PM, Kosson P, i wsp. Pramipexole and fingolimod exert neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease by activation of sphingosine kinase 1 and Akt kinase. *Neuropharmacology.* 2018; 135: 139-150. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.02.023.
285. Mufson EJ, He B, Nadeem M, Perez SE, i wsp. Hippocampal proNGF signaling pathways and β -amyloid levels in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012; 71(11): 1018-1029. doi: 10.1097/NEN.0b013e318272caab.
286. Mulgaonkar S, Tedesco H, Oppenheimer F, Walker R, i wsp. FTY720/cyclosporine regimens in de novo renal transplantation: a 1-year dose-finding study. *Am J Transplant.* 2006; 6(8): 1848-1857. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01404.x. Erratum in: *Am J Transplant.* 2006; 6(12): 3044.
287. Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci.* 2017; 18(5): 281-298. doi: 10.1038/nrn.2017.29.
288. Murray PS, Kirkwood CM, Gray MC, Ikonomic MD, i wsp. β -Amyloid 42/40 ratio and kalirin expression in Alzheimer disease with psychosis. *Neurobiol Aging.* 2012; 33(12): 2807-2816. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.02.015.
289. Musella A, Gentile A, Guadalupi L, Rizzo FR, i wsp. Central modulation of selective sphingosine-1-phosphate receptor 1 ameliorates experimental multiple sclerosis. *Cells.* 2020; 9(5): 1290. doi: 10.3390/cells9051290.

290. Muyliaert D, Kremer A, Jaworski T, Borghgraef P, i wsp. Glycogen synthase kinase-3beta, or a link between amyloid and tau pathology? *Genes Brain Behav.* 2008; 7 Suppl 1: 57-66. doi: 10.1111/j.1601-183X.2007.00376.x.
291. Naito Y, Tanabe Y, Lee AK, Hamel E, i wsp. Amyloid- β oligomers interact with neurexin and diminish neurexin-mediated excitatory presynaptic organization. *Sci Rep.* 2017; 7: 42548. doi: 10.1038/srep42548.
292. Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, i wsp. Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J Neurosci.* 2008; 28(4): 788-797. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4771-07.2008.
293. Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurologia.* 2017; 32(8): 523-532. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2016.02.016.
294. Noda H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia. *J Neuroimmunol.* 2013; 256(1-2): 13-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.12.005.
295. Novgorodov AS, El-Alwani M, Bielawski J, Obeid LM, i wsp. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *FASEB J.* 2007; 21(7): 1503-1514. doi: 10.1096/fj.06-7420com.
296. Ntranos A, Hall O, Robinson DP, Grishkan IV, i wsp. FTY720 impairs CD8 T-cell function independently of the sphingosine-1-phosphate pathway. *J Neuroimmunol.* 2014; 270(1-2): 13-21. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.03.007.
297. Nuydens R, Novalbos J, Dispersyn G, Weber C, i wsp. A rapid method for the evaluation of compounds with mitochondria-protective properties. *J Neurosci Methods.* 1999; 92(1-2): 153-159. doi: 10.1016/s0165-0270(99)00107-7.
298. Obulesu M, Lakshmi MJ. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. *Neurochem Res.* 2014; 39(12): 2301-2312. doi: 10.1007/s11064-014-1454-4.
299. Ochalek A, Mihalik B, Avci HX, Chandrasekaran A, i wsp. Neurons derived from sporadic Alzheimer's disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation. *Alzheimers Res Ther.* 2017; 9(1): 90. doi: 10.1186/s13195-017-0317-z.
300. Öhrfelt A, Brinkmalm A, Dumurgier J, Brinkmalm G, i wsp. The pre-synaptic vesicle protein synaptotagmin is a novel biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2016; 8(1): 41. doi: 10.1186/s13195-016-0208-8.
301. Ojala J, Alafuzoff I, Herukka SK, van Groen T, i wsp. Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging.* 2009; 30(2): 198-209. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.006.
302. Oliveira JM, Henriques AG, Martins F, Rebelo S, i wsp. Amyloid- β modulates both A β PP and tau phosphorylation. *J Alzheimers Dis.* 2015; 45(2): 495-507. doi: 10.3233/JAD-142664.
303. Olivera A, Rosenfeldt HM, Bektas M, Wang F, i wsp. Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 2003; 278(47): 46452-46460. doi: 10.1074/jbc.M308749200.
304. Ono K, Condrón MM, Teplow DB. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(35): 14745-14750. doi: 10.1073/pnas.0905127106.
305. Ontaneda D, Cohen JA. Potential mechanisms of efficacy and adverse effects in the use of fingolimod (FTY720). *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2011; 4(5): 567-570. doi: 10.1586/ecp.11.46.
306. Onyango IG, Jauregui GV, Čarná M, Bennett JP Jr, i wsp. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Biomedicines.* 2021; 9(5): 524. doi: 10.3390/biomedicines9050524.

307. Osawa Y, Banno Y, Nagaki M, Brenner DA, i wsp. TNF-alpha-induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. *J Immunol.* 2001; 167(1): 173-180. doi: 10.4049/jimmunol.167.1.173.
308. Pang ZP, Südhof TC. Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22(4): 496-505. doi: 10.1016/j.ceb.2010.05.001.
309. Parajuli B, Sonobe Y, Horiuchi H, Takeuchi H, i wsp. Oligomeric amyloid β induces IL-1 β processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* 2013; 4(12): e975. doi: 10.1038/cddis.2013.503.
310. Parham KA, Zebol JR, Tooley KL, Sun WY, i wsp. Sphingosine 1-phosphate is a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- γ that regulates neoangiogenesis. *FASEB J.* 2015; 29(9): 3638-3653. doi: 10.1096/fj.14-261289.
311. Parish CL, Finkelstein DI, Tripanichkul W, Satoskar AR, i wsp. The role of interleukin-1, interleukin-6, and glia in inducing growth of neuronal terminal arbors in mice. *J Neurosci.* 2002; 22(18): 8034-8041. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-18-08034.2002.
312. Park M, Kim SH, Lee HJ. Ginsenoside Rh1 exerts neuroprotective effects by activating the PI3K/Akt pathway in amyloid- β induced SH-SY5Y cells. *Applied Sciences.* 2021; 11(12): 5654. <https://doi.org/10.3390/app11125654>
313. Park SM, Angel CE, McIntosh JD, Brooks AE, i wsp. Sphingosine-1-phosphate lyase is expressed by CD68+ cells on the parenchymal side of marginal reticular cells in human lymph nodes. *Eur J Immunol.* 2014; 44(8): 2425-2436. doi: 10.1002/eji.201344158.
314. Pépin É, Jalinier T, Lemieux GL, Massicotte G, i wsp. Sphingosine-1-phosphate receptors modulators decrease signs of neuroinflammation and prevent Parkinson's disease symptoms in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model. *Front Pharmacol.* 2020; 11: 77. doi: 10.3389/fphar.2020.00077.
315. Pham E, Crews L, Ubhi K, Hansen L, i wsp. Progressive accumulation of amyloid-beta oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J.* 2010; 277(14): 3051-3067. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07719.x.
316. Poirel O, Mella S, Videau C, Ramet L, i wsp. Moderate decline in select synaptic markers in the prefrontal cortex (BA9) of patients with Alzheimer's disease at various cognitive stages. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 938. doi: 10.1038/s41598-018-19154-y.
317. Porcellotti S, Fanelli F, Fracassi A, Sepe S, i wsp. Oxidative stress during the progression of β -amyloid pathology in the neocortex of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 967203. doi: 10.1155/2015/967203.
318. Potenza RL, De Simone R, Armida M, Mazziotti V, i wsp. Fingolimod: a disease-modifier drug in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2016; 13(4): 918-927. doi: 10.1007/s13311-016-0462-2.
319. Presa N, Gomez-Larrauri A, Dominguez-Herrera A, Trueba M, i wsp. Novel signaling aspects of ceramide 1-phosphate. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020; 1865(4): 158630. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158630.
320. Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, i wsp. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 2000; 275(15): 10761-10766. doi: 10.1074/jbc.275.15.10761.
321. Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, i wsp. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* 2008; 28(53): 14537-14545. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008.
322. Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(7): 489-503. doi: 10.1038/nrc2875.

323. Pyszko J, Strosznajder JB. Sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate in oxidative stress evoked by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) in human dopaminergic neuronal cells. *Mol Neurobiol.* 2014; 50(1): 38-48. doi: 10.1007/s12035-013-8622-4.
324. Qiu T, Liu Q, Chen YX, Zhao YF, i wsp. A β 42 and A β 40: similarities and differences. *J Pept Sci.* 2015; 21(7): 522-529. doi: 10.1002/psc.2789.
325. Quinville BM, Deschenes NM, Ryckman AE, Walia JS. A comprehensive review: sphingolipid metabolism and implications of disruption in sphingolipid homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(11): 5793. doi: 10.3390/ijms22115793.
326. Ramakrishnan NA, Drescher MJ, Drescher DG. The SNARE complex in neuronal and sensory cells. *Mol Cell Neurosci.* 2012; 50(1): 58-69. doi:10.1016/j.mcn.2012.03.009
327. Ramakrishnan NA, Drescher MJ, Drescher DG. The SNARE complex in neuronal and sensory cells. *Mol Cell Neurosci.* 2012; 50(1): 58-69. doi: 10.1016/j.mcn.2012.03.009.
328. Ramos-Miguel A, Sawada K, Jones AA, Thornton AE, i wsp. Presynaptic proteins complexin-I and complexin-II differentially influence cognitive function in early and late stages of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2017; 133(3): 395-407. doi: 10.1007/s00401-016-1647-9.
329. Ravelli KG, Rosário BD, Camarini R, Hernandez MS, i wsp. Intracerebroventricular streptozotocin as a model of Alzheimer's disease: neurochemical and behavioral characterization in mice. *Neurotox Res.* 2017; 31(3): 327-333. doi: 10.1007/s12640-016-9684-7.
330. Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, i wsp. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: Implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis.* 2005; 7(2): 103-117; discussion 173-180. doi: 10.3233/jad-2005-7203.
331. Reissner C, Runkel F, Missler M. Neurexins. *Genome Biol.* 2013; 14(9): 213. doi: 10.1186/gb-2013-14-9-213.
332. Ren M, Han M, Wei X, Guo Y, i wsp. FTY720 Attenuates 6-OHDA-associated dopaminergic degeneration in cellular and mouse Parkinsonian models. *Neurochem Res.* 2017; 42(2): 686-696. doi: 10.1007/s11064-016-2125-4.
333. Rhein V, Baysang G, Rao S, Meier F, i wsp. Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2009; 29(6-7): 1063-1071. doi: 10.1007/s10571-009-9398-y.
334. Roggeri A, Schepers M, Tiane A, Rombaut B, i wsp. Sphingosine-1-phosphate receptor modulators and oligodendroglial cells: beyond immunomodulation. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(20): 7537. doi: 10.3390/ijms21207537.
335. Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 302(2): 348-355. doi: 10.1006/abbi.1993.1222.
336. Ruggieri S, Quartuccio ME, Prosperini L. Ponesimod in the treatment of relapsing forms of multiple sclerosis: an update on the emerging clinical data. *Degener Neurol Neuromuscul Dis.* 2022; 12: 61-73. doi: 10.2147/DNND.S313825.
337. Ruiz A, Joshi P, Mastrangelo R, Francolini M, i wsp. Testing A β toxicity on primary CNS cultures using drug-screening microfluidic chips. *Lab Chip.* 2014; 14: 2860. doi: 10.1039/c4lc00174e
338. Russell CL, Semerdjieva S, Empson RM, Austen BM, i wsp. Amyloid- β acts as a regulator of neurotransmitter release disrupting the interaction between synaptophysin and VAMP2. *PLoS One.* 2012; 7(8): e43201. doi: 10.1371/journal.pone.0043201.
339. Rutherford C, Childs S, Ohotski J, McGlynn L, i wsp. Regulation of cell survival by sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 via reciprocal ERK-dependent suppression of Bim and PI-3-kinase/protein kinase C-mediated upregulation of Mcl-1. *Cell Death Dis.* 2013; 4(11): e927. doi: 10.1038/cddis.2013.455.

340. Saetre P, Jazin E, Emilsson L. Age-related changes in gene expression are accelerated in Alzheimer's disease. *Synapse*. 2011; 65(9): 971-974. doi: 10.1002/syn.20933.
341. Safaeinejad F, Asadi S, Ghafghazi S, Niknejad H. The synergistic anti-apoptosis effects of amniotic epithelial stem cell conditioned medium and ponesimod on the oligodendrocyte cells. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 691099. doi: 10.3389/fphar.2021.691099. PMID: 34234678; PMCID: 8281111.
342. Safarian F, Khallaghi B, Ahmadiani A, Dargahi L. Activation of S1P₁ receptor regulates PI3K/Akt/FoxO3a pathway in response to oxidative stress in PC12 cells. *J Mol Neurosci*. 2015; 56(1): 177-187. doi: 10.1007/s12031-014-0478-1.
343. Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, i wsp. Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo*. 2007; 21(1): 123-132.
344. Salimi K, Glantz LA, Hamer RM, German TT, i wsp. Regulation of complexin 1 and complexin 2 in the developing human prefrontal cortex. *Synapse*. 2008; 62(4): 273-282. doi: 10.1002/syn.20492.
345. Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, i wsp. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J Neurochem*. 2006; 96(4): 1005-1015. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03637.x.
346. Salvadori M, Budde K, Charpentier B, Klempnauer J, i wsp. FTY720 versus MMF with cyclosporine in de novo renal transplantation: a 1-year, randomized controlled trial in Europe and Australasia. *Am J Transplant*. 2006; 6(12): 2912-2921. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01552.x.
347. Sanchez T, Skoura A, Wu MT, Casserly B, i wsp. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(6): 1312-1318. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.143735.
348. Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, i wsp. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem*. 2004; 279(14): 13839-13848. doi: 10.1074/jbc.M311743200.
349. Sauvola CW, Littleton JT. SNARE Regulatory Proteins in Synaptic Vesicle Fusion and Recycling. *Front Mol Neurosci*. 2021; 14:733138. doi: 10.3389/fnmol.2021.733138.
350. Schotten S, Meijer M, Walter AM, Huson V, i wsp. Additive effects on the energy barrier for synaptic vesicle fusion cause supralinear effects on the vesicle fusion rate. *Elife*. 2015; 4: e05531. doi: 10.7554/eLife.05531. Erratum in: *Elife*. 2015; 4. doi: 10.7554/eLife.09036.
351. Schulze T, Golfier S, Tabeling C, Räbel K, i wsp. Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P₄) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. *FASEB J*. 2011; 25(11): 4024-4036. doi: 10.1096/fj.10-179028.
352. Schwedhelm E, Englisch C, Niemann L, Lezius S, et al. Sphingosine-1-phosphate, motor severity, and progression in Parkinson's disease (MARK-PD). *Mov Disord*. 2021; 36(9): 2178-2182. doi: 10.1002/mds.28652.
353. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016; 8(6): 595-608. doi: 10.15252/emmm.201606210.
354. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*. 1991; 6(4): 487-498. doi: 10.1016/0896-6273(91)90052-2.
355. Sengupta U, Nilson AN, Kaye R. The role of amyloid- β oligomers in toxicity, propagation, and immunotherapy. *EBioMedicine*. 2016; 6: 42-49. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.03.035.
356. Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky RA, i wsp. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2011; 179(3): 1373-1384. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.047.

357. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017; 18(6): 361-374. doi: 10.1038/nrm.2017.16.
358. Shakeri-Nejad K, Aslanis V, Veldandi UK, Mooney L, i wsp. Effects of therapeutic and suprathreshold doses of siponimod (BAF312) on cardiac repolarization in healthy subjects. *Clin Ther.* 2015; 37(11): 2489-2505.e2. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.09.006.
359. Shang YC, Chong ZZ, Wang S, Maiese K. Prevention of β -amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL. *Aging (Albany NY).* 2012; 4(3): 187-201. doi: 10.18632/aging.100440.
360. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, i wsp. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci.* 2007; 27(11): 2866-2875. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007.
361. Sharma S, Mathur AG, Pradhan S, Singh DB, i wsp. Fingolimod (FTY720): First approved oral therapy for multiple sclerosis. *J Pharmacol Pharmacother.* 2011; 2(1): 49-51. doi: 10.4103/0976-500X.77118
362. Shen LL, Li WW, Xu YL, Gao SH, i wsp. Neurotrophin receptor p75 mediates amyloid β -induced tau pathology. *Neurobiol Dis.* 2019; 132: 104567. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104567.
363. Shen Z, Liu C, Liu P, Zhao J, i wsp. Sphingosine 1-phosphate (S1P) promotes mitochondrial biogenesis in Hep G2 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha). *Cell Stress Chaperones.* 2014; 19: 541-548. doi: 10.1007/s12192-013-0480-5.
364. Sheng B, Wang X, Su B, Lee HG, i wsp. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2012; 120(3): 419-429. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07581.x.
365. Shukla SM, Sharma SK. Sinomenine inhibits microglial activation by A β and confers neuroprotection. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 117. doi: 10.1186/1742-2094-8-117.
366. Singleton PA, Chatchavalvanich S, Fu P, Xing J, i wsp. Akt-mediated transactivation of the S1P1 receptor in caveolin-enriched microdomains regulates endothelial barrier enhancement by oxidized phospholipids. *Circ Res.* 2009; 104(8): 978-986. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193367.
367. Singleton PA, Dudek SM, Ma SF, Garcia JG. Transactivation of sphingosine 1-phosphate receptors is essential for vascular barrier regulation. Novel role for hyaluronan and CD44 receptor family. *J Biol Chem.* 2006; 281(45): 34381-34393. doi: 10.1074/jbc.M603680200.
368. Sivasubramanian M, Kanagaraj N, Dheen ST, Tay SS. Sphingosine kinase 2 and sphingosine-1-phosphate promotes mitochondrial function in dopaminergic neurons of mouse model of Parkinson's disease and in MPP+ -treated MN9D cells in vitro. *Neuroscience.* 2015; 290: 636-648. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.01.032.
369. Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, i wsp. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 1995; 133(2): 225-230. doi: 10.1006/exnr.1995.1025.
370. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, i wsp. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150(1): 76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7. Erratum in: *Anal Biochem* 1987; 163(1): 279.
371. Sondag CM, Dhawan G, Combs CK. Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J Neuroinflammation.* 2009; 6: 1. doi:10.1186/1742-2094-6-1.
372. Sontag E, Luangpirom A, Hladik C, Mudrak I, i wsp. Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β 1C enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004; 63(4): 287-301. doi: 10.1093/jnen/63.4.287.

373. Sood A, Fernandes V, Preeti K, Khot M, i wsp. Fingolimod alleviates cognitive deficit in type 2 diabetes by promoting microglial M2 polarization via the pSTAT3-jmjd3 Axis. *Mol Neurobiol.* 2023; 60(2): 901-922. doi: 10.1007/s12035-022-03120-x.
374. Sotolongo K, Ghiso J, Rostagno A. Nrf2 activation through the PI3K/GSK-3 axis protects neuronal cells from A β -mediated oxidative and metabolic damage. *Alzheimers Res Ther.* 2020; 12(1): 13. doi: 10.1186/s13195-019-0578-9.
375. Spampinato SF, Merlo S, Sano Y, Kanda T, i wsp. Protective effect of the sphingosine-1 phosphate receptor agonist siponimod on disrupted blood brain barrier function. *Biochem Pharmacol.* 2021; 186: 114465. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114465.
376. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salvati L, i wsp. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc.* 2012; 7(6): 1235-1246. doi: 10.1038/nprot.2012.058.
377. Stambolic V, Woodgett JR. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J.* 1994; 303 (Pt 3)(Pt 3): 701-704. doi: 10.1042/bj3030701.
378. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, i wsp. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis.* 2005; 7(1): 63-80. doi: 10.3233/jad-2005-7107.
379. Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, i wsp. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca²⁺(+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J.* 1990; 9(11): 3539-3544. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07563.x.
380. Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem.* 2003; 278(13): 11612-11622. doi: 10.1074/jbc.M210207200.
381. Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, i wsp. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 688: 141-155. doi:10.1007/978-1-4419-6741-1_10.
382. Strub GM, Paillard M, Liang J, Gomez L, i wsp. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB J.* 2011; 25, 600-612. doi: 10.1096/fj.10-167502.
383. Südhof TC, Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(12): a005637. doi: 10.1101/cshperspect.a005637.
384. Südhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature.* 1995; 375(6533): 645-53. doi: 10.1038/375645a0.
385. Suh EC, Jung YJ, Kim YA, Park EM, et al. A beta 25-35 induces presynaptic changes in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurotoxicology.* 2008; 29(4): 691-699. doi: 10.1016/j.neuro.2008.04.001.
386. Sui L, Wang J, Li BM. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn Mem.* 2008; 15(10): 762-76. doi: 10.1101/lm.1067808.
387. Sutinen EM, Pirttilä T, Anderson G, Salminen A, i wsp. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid- β production in human neuron-like cells. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 199. doi: 10.1186/1742-2094-9-199.
388. Swerdlow RH, Khan SM. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses.* 2004; 63(1): 8-20. doi: 10.1016/j.mehy.2003.12.045.
389. Swerdlow RH, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: an update. *Exp Neurol.* 2009; 218(2): 308-315. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.01.011.

390. Swerdlow RH. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018; 62(3): 1403-1416. doi: 10.3233/JAD-170585.
391. Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, i wsp. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997; 56(8): 933-944. doi: 10.1097/00005072-199708000-00011.
392. Takabe K, Spiegel S. Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression. *J Lipid Res.* 2014; 55(9): 1839-1846. doi: 10.1194/jlr.R046656.
393. Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of b-amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int.* 2017; 67(4): 185-193. doi: 10.1111/pin.12520.
394. Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, i wsp. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res.* 1998; 31(4): 317-323. doi: 10.1016/s0168-0102(98)00061-3.
395. Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, et al. BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci.* 2011; 31(18): 6850-6857. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6467-10.2011.
396. Takasugi N, Sasaki T, Ebinuma I, Osawa S, i wsp. FTY720/fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- β production in neurons. *PLoS One.* 2013; 8(5): e64050. doi: 10.1371/journal.pone.0064050.
397. Talmont F, Mitri E, Dozier C, Besson A, i wsp. Sphingosine 1-phosphate receptor 5 (S1P5) deficiency promotes proliferation and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Cancers (Basel).* 2022; 14(7): 1661. doi: 10.3390/cancers14071661.
398. Tannenberg RK, Scott HL, Tannenberg AE, Dodd PR. Selective loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: evidence for an increased severity with APOE varepsilon4. *Neurochem Int.* 2006; 49(7): 631-639. doi: 10.1016/j.neuint.2006.05.004.
399. Terai K, Soga T, Takahashi M, Kamohara M, i wsp. Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience.* 2003; 116(4): 1053-1062. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00791-1.
400. Terwel D, Muyliaert D, Dewachter I, Borghgraef P, i wsp. Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am J Pathol.* 2008; 172(3): 786-798. doi: 10.2353/ajpath.2008.070904.
401. Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, i wsp. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science.* 2008; 320(5876): 667-670. doi: 10.1126/science.1156037.
402. Toman RE, Payne SG, Watterson KR, Maceyka M, i wsp. Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *J Cell Biol.* 2004; 166(3): 381-392. doi: 10.1083/jcb.200402016.
403. Toral-Rios D, Pichardo-Rojas PS, Alonso-Vanegas M, Campos-Peña V. GSK3 β and tau protein in Alzheimer's disease and epilepsy. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14:19. doi: 10.3389/fncel.2020.00019.
404. Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem.* 2007; 282(46): 33305-33312. doi: 10.1074/jbc.M610390200.
405. Tran C, Heng B, Teo JD, Humphrey SJ, et al. Sphingosine 1-phosphate but not Fingolimod protects neurons against excitotoxic cell death by inducing neurotrophic gene expression in astrocytes. *J Neurochem.* 2019; e14917. doi: 10.1111/jnc.14917.
406. Tran JQ, Hartung JP, Olson AD, Mendzelevski B, i wsp. Cardiac safety of ozanimod, a novel sphingosine-1-phosphate receptor modulator: results of a thorough QT/QTc study. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2018; 7(3): 263-276. doi: 10.1002/cpdd.383.

407. Trimbuch T, Rosenmund C. Should I stop or should I go? The role of complexin in neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci*. 2016; 17(2): 118-125. doi: 10.1038/nrn.2015.16.
408. Troncoso P, Stepkowski SM, Wang ME, Qu X, i wsp. Prophylaxis of acute renal allograft rejection using FTY720 in combination with subtherapeutic doses of cyclosporine. *Transplantation*. 1999; 67(1): 145-151. doi: 10.1097/00007890-199901150-00024.
409. Tsakiri N, Kimber I, Rothwell NJ, Pinteaux E. Interleukin-1-induced interleukin-6 synthesis is mediated by the neutral sphingomyelinase/Src kinase pathway in neurones. *Br J Pharmacol*. 2008; 153(4): 775-783. doi: 10.1038/sj.bjp.0707610.
410. Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, i wsp. Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci*. 2012; 15(9): 1227-1235. doi: 10.1038/nn.3178.
411. Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, i wsp. Intraneuronal amyloid β oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res*. 2011; 89(7): 1031-42. doi: 10.1002/jnr.22640.
412. Urrutia PJ, Hirsch EC, González-Billault C, Núñez MT. Hepcidin attenuates amyloid beta-induced inflammatory and pro-oxidant responses in astrocytes and microglia. *J Neurochem*. 2017; 142(1): 140-152. doi: 10.1111/jnc.14005.
413. Utton MA, Vandecandelaere A, Wagner U, Reynolds CH, i wsp. Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3beta affects the ability of tau to promote microtubule self-assembly. *Biochem J*. 1997; 323 (Pt 3): 741-747. doi: 10.1042/bj3230741.
414. Van Brocklyn JR, Gräler MH, Bernhardt G, Hobson JP, i wsp. Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6. *Blood*. 2000; 95(8): 2624-2629.
415. van Doorn R, Lopes Pinheiro MA, Kooij G, Lakeman K, i wsp. Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 133. doi: 10.1186/1742-2094-9-133.
416. Van Dorpe J, Smeijers L, Dewachter I, Nuyens D, i wsp. Prominent cerebral amyloid angiopathy in transgenic mice overexpressing the london mutant of human APP in neurons. *Am J Pathol*. 2000; 157(4): 1283-1298. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64644-5.
417. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ. Lecanemab in early Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2023; 388(1): 9-21. doi: 10.1056/NEJMoa2212948.
418. van Eersel J, Ke YD, Liu X, Delerue F, i wsp. Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(31): 13888-13893. doi: 10.1073/pnas.1009038107.
419. Vitek MP, Christensen DJ, Wilcock D, Davis J, i wsp. APOE-mimetic peptides reduce behavioral deficits, plaques and tangles in Alzheimer's disease transgenics. *Neurodegener Dis*. 2012; 10(1-4): 122-126. doi: 10.1159/000334914.
420. Vogelsberg-Ragaglia V, Schuck T, Trojanowski JQ, Lee VM. PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol*. 2001; 168(2): 402-412. doi: 10.1006/exnr.2001.7630.
421. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, i wsp. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002; 416(6880): 535-539. doi: 10.1038/416535a.
422. Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, i wsp. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol*. 2007 Dec; 8(12): 1337-1344. doi: 10.1038/ni1523.
423. Wang D, Fu Q, Zhou Y, Xu B, i wsp. β 2 adrenergic receptor, protein kinase A (PKA) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathways mediate tau pathology in Alzheimer disease models. *J Biol Chem*. 2013; 288(15): 10298-102307. doi: 10.1074/jbc.M112.415141.

424. Wang F, Zhang X, Liu Y, Li Z, i wsp. Neuroprotection by ozanimod following intracerebral hemorrhage in mice. *Front Mol Neurosci*. 2022; 15: 927150. doi: 10.3389/fnmol.2022.927150.
425. Wang H, Huang H, Ding SF. Sphingosine-1-phosphate promotes the proliferation and attenuates apoptosis of endothelial progenitor cells via S1PR1/S1PR3/PI3K/Akt pathway. *Cell Biol Int*. 2018b; 42(11): 1492-1502. doi: 10.1002/cbin.10991.
426. Wang HM, Zhang T, Huang JK, Xiang JY, i wsp. Edaravone attenuates the proinflammatory response in amyloid- β -treated microglia by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion. *Cell Physiol Biochem*. 2017b; 43(3): 1113-1125. doi: 10.1159/000481753.
427. Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci*. 2007; 25(1): 59-68. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x.
428. Wang M, Li Y, Ni C, Song G. Honokiol attenuates oligomeric amyloid β 1-42-induced Alzheimer's disease in mice through attenuating mitochondrial apoptosis and inhibiting the nuclear factor kappa-B signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017a; 43(1): 69-81. doi: 10.1159/000480320.
429. Wang S, Zhang J, Pan T; for Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. APOE ϵ 4 is associated with higher levels of CSF SNAP-25 in prodromal Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2018a; 685: 109-113. doi: 10.1016/j.neulet.2018.08.029.
430. Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, i wsp. Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Mol Neurodegener*. 2020; 15(1): 30. doi: 10.1186/s13024-020-00376-6.
431. Wang X, Perry G, Smith MA, Zhu X. Amyloid-beta-derived diffusible ligands cause impaired axonal transport of mitochondria in neurons. *Neurodegener Dis*. 2010; 7(1-3): 56-9. doi: 10.1159/000283484.
432. Wang X, Su B, Lee HG, Li X, i wsp. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2009; 29(28): 9090-9103. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1357-09.2009.
433. Williams JB, Cao Q, Yan Z. Transcriptomic analysis of human brains with Alzheimer's disease reveals the altered expression of synaptic genes linked to cognitive deficits. *Brain Commun*. 2021; 3(3): fcab123. doi: 10.1093/braincomms/fcab123.
434. Wilson DF, Vinogradov SA. Mitochondrial cytochrome c oxidase: mechanism of action and role in regulating oxidative phosphorylation. *J Appl Physiol* (1985). 2014; 117(12): 1431-1439. doi: 10.1152/jappphysiol.00737.2014.
435. Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Hüll M, i wsp. Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem*. 2007; 101(4): 1053-1059. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04404.x.
436. Xia L, Zhu X, Zhao Y, Yang G, i wsp. Genome-wide RNA sequencing analysis reveals that IGF-2 attenuates memory decline, oxidative stress and amyloid plaques in an Alzheimer's disease mouse model (AD) by activating the PI3K/AKT/CREB signaling pathway. *Int Psychogeriatr*. 2019; 31(7): 947-959. doi: 10.1017/S1041610219000383.
437. Xiao Y, Wang X, Wang S, Li J, i wsp. Celastrol attenuates learning and memory deficits in an Alzheimer's disease rat model. *Biomed Res Int*. 2021; 2021: 5574207. doi: 10.1155/2021/5574207.
438. Xu W, Morishita W, Buckmaster PS, Pang ZP, i wsp. Distinct neuronal coding schemes in memory revealed by selective erasure of fast synchronous synaptic transmission. *Neuron*. 2012; 73(5): 990-1001. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.036.
439. Xue M, Craig TK, Xu J, Chao HT, i wsp. Binding of the complexin N terminus to the SNARE complex potentiates synaptic-vesicle fusogenicity. *Nat Struct Mol Biol*. 2010; 17(5): 568-575. doi: 10.1038/nsmb.1791.

440. Xue M, Stradomska A, Chen H, Brose N, i wsp. Complexins facilitate neurotransmitter release at excitatory and inhibitory synapses in mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(22): 7875-7880. doi: 10.1073/pnas.0803012105.
441. Yamamoto H, Hiragami Y, Murayama M, Ishizuka K, i wsp. Phosphorylation of tau at serine 416 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in neuronal soma in brain. *J Neurochem*. 2005; 94(5): 1438-1447. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03307.x.
442. Yamazaki Y, Kon J, Sato K, Tomura H, i wsp. Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 268(2): 583-589. doi: 10.1006/bbrc.2000.2162.
443. Yang T, Li S, Xu H, Walsh DM, i wsp. Large soluble oligomers of amyloid β -protein from Alzheimer brain are far less neuroactive than the smaller oligomers to which they dissociate. *J Neurosci*. 2017; 37(1): 152-163. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1698-16.2016.
444. Yang X, Cao P, Südhof TC. Deconstructing complexin function in activating and clamping Ca²⁺-triggered exocytosis by comparing knockout and knockdown phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(51): 20777-20782. doi: 10.1073/pnas.1321367110.
445. Yang Y, Kim J, Kim HY, Ryoo N, et al. Amyloid- β oligomers may impair SNARE-mediated exocytosis by direct binding to syntaxin 1a. *Cell Rep*. 2015; 12(8): 1244-1251. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.044.
446. Yang Y, Wang M, Lv B, Ma R, i wsp. Sphingosine kinase-1 protects differentiated N2a cells against beta-amyloid₂₅₋₃₅-induced neurotoxicity via the mitochondrial pathway. *Neurochem Res*. 2014; 39(5): 932-940. doi: 10.1007/s11064-014-1290-6.
447. Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J Neurosci*. 2005; 25(5): 1149-1158. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4736-04.2005.
448. Yao PJ, Zhu M, Pyun EI, Brooks AI, i wsp. Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2003; 12(2): 97-109. doi: 10.1016/s0969-9961(02)00009-8.
449. Yao S, Li L, Sun X, Hua J, et al. FTY720 inhibits MPP⁺-induced microglial activation by affecting NLRP3 inflammasome activation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2019b; 14(3): 478-492. doi: 10.1007/s11481-019-09843-4.
450. Yao XQ, Li XC, Zhang XX, Yin YY, i wsp. Glycogen synthase kinase-3 β regulates leucine-309 demethylation of protein phosphatase-2A via PPMT1 and PME-1. *FEBS Lett*. 2012; 586(16): 2522-2528. doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.018.
451. Yao XQ, Zhang XX, Yin YY. Glycogen synthase kinase-3 β regulates Tyr307 phosphorylation of protein phosphatase-2A via protein tyrosine phosphatase 1B but not Src. *Biochem J*. 2011; 437(2): 335-344. doi: 10.1042/BJ20110347.
452. Yao Y, Wang Y, Kong L, Chen Y, i wsp. Osthole decreases tau protein phosphorylation via PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway in Alzheimer's disease. *Life Sci*. 2019a; 217: 16-24. doi: 10.1016/j.lfs.2018.11.038.
453. Yates SL, Burgess LH, Kocsis-Angle J, Antal JM, i wsp. Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem*. 2000; 74(3): 1017-1025. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741017.x.
454. Ye Y, Zhao Z, Xu H, Zhang X, i wsp. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor 1 enhances hippocampus neurogenesis in a rat model of traumatic brain injury: an involvement of MEK/Erk signaling pathway. *Neural Plast*. 2016; 2016: 8072156. doi: 10.1155/2016/8072156.
455. Yu S, Hei Y, Liu W. Upregulation of seladin-1 and nestin expression in bone marrow mesenchymal stem cell transplantation via the ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways in an Alzheimer's disease model. *Oncol Lett*. 2018; 15(5): 7443-7449. doi: 10.3892/ol.2017.7543.

456. Yuki D, Sugiura Y, Zaima N, Akatsu H, i wsp. DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2014; 4: 7130. doi: 10.1038/srep07130.
457. Zhang D, Wang Z, Sheng C, Peng W, i wsp. Icarin prevents amyloid beta-induced apoptosis via the PI3K/Akt pathway in PC-12 cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015: 235265. doi: 10.1155/2015/235265.
458. Zhang H, Therriault J, Kang MS, Ng KP, et. al. Cerebrospinal fluid synaptosomal-associated protein 25 is a key player in synaptic degeneration in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2018; 10(1): 80. doi: 10.1186/s13195-018-0407-6.
459. Zhang L, Guo K, Zhou J, Zhang X, i wsp. Ponesimod protects against neuronal death by suppressing the activation of A1 astrocytes in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurochem.* 2021; 158(4): 880-897. doi: 10.1111/jnc.15457.
460. Zhang YH, Vasko MR, Nicol GD. Intracellular sphingosine 1-phosphate mediates the increased excitability produced by nerve growth factor in rat sensory neurons. *J Physiol.* 2006; 575(Pt 1): 101-113. doi: 10.1113/jphysiol.2006.111575.
461. Zhang YY, Fan YC, Wang M, Wang D, i wsp. Atorvastatin attenuates the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the hippocampus of an amyloid β 1-42-induced rat model of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging.* 2013; 8: 103-110. doi: 10.2147/CIA.S40405.
462. Zheng R, Zhang ZH, Chen C, Chen Y, i wsp. Selenomethionine promoted hippocampal neurogenesis via the PI3K-Akt-GSK3 β -Wnt pathway in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 485(1): 6-15. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.069.
463. Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, i wsp. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience.* 2002; 115(1): 201-211. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00404-9.
464. Zhou Q, Zhou P, Wang A, Wu D, i wsp. The primed SNARE-complexin-synaptotagmin complex for neuronal exocytosis. *Nature.* 2017; 548. doi: 10.1038/nature23484
465. Zhou Y, Lekic T, Fathali N, Ostrowski RP, i wsp. Isoflurane posttreatment reduces neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats by the sphingosine-1-phosphate/phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway. *Stroke.* 2010; 41(7): 1521-1527. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.583757.
466. Zimmermann J, Trimbuch T, Rosenmund C. Synaptobrevin 1 mediates vesicle priming and evoked release in a subpopulation of hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 2014; 112(6): 1559-1565. doi: 10.1152/jn.00340.2014.