

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
НАУКОВО-НАВЧАЛЬНИЙ ФІЗИКО-ТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
КАФЕДРА ПРИКЛАДНОЇ ФІЗИКИ

«На правах рукопису»
УДК 57.085.23

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

Геннадій
МОНАСТИРСЬКИЙ

(ініціали, прізвище)

(підпис)

«18» ____ червня ____ 2022 р.

Магістерська дисертація
на здобуття ступеня магістра

зі спеціальності 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»
(код та назва спеціальності)

на тему: Дослідження виживання культивованих нейронів гіпокампу в
умовах
інкубації з β -амілоїдом та моделювання ексайтотоксичності

Виконав: студент 2 курсу, групи ФФ-01мн

Барвінко Михайло Андрійович

(прізвище, ім'я, по батькові)

(підпис)

Керівник доктор біологічних наук, професор, Лук'янець О. О.

(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

(підпис)

Консультант 1 – 4 ст. н. с., к.б.н., Розумна Н. М.

(назва розділу)

(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали)

(підпис)

Рецензент м.н.с., кандидат біологічних наук, Ганжа В. В.

(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

(підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській
дисертації немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Студент

(підпис)

Київ – 2022 р.

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація за обсягом становить 41 сторінку, містить 7 рисунків, 3 таблиці та 85 джерел за переліком посилань.

Хвороба Альцгеймера — це нейродегенеративне захворювання, яке прогресує в повільному темпі й поступово знищує клітини мозку. Останні дані свідчать про те, що до 2050 року поширеність деменції подвоїться в Європі і потроїться в усьому світі.

β -амілоїдний (A β) білок є основним компонентом амілоїдних бляшок, асоційованих з ХА, і виробляється шляхом розщеплення протеазою трансмембранного APP типу I. За допомогою альтернативного транскрипційного сплайсингу можна отримати від 8 до 11 ізоформ APP, де 3 найпоширеніші ізоформи сплайсингу включають форму з 695 амінокислот (APP695), які переважно експресуються в нейронах, і 751 та 770 амінокислотних форм (APP751, APP770), що експресуються як в нейронах так і гліальних клітинах. Хоча APP було детально досліджено, специфічна фізіологічна функція APP залишається не зрозумілою. Наразі було запропоновано кілька фізіологічних ролей APP. Позаклітинний домен APP опосередковує адгезію клітини до клітини для підтримки синаптичних з'єднань. Гомодимери APP можуть функціонувати як рецептори, пов'язані з G-білком клітинної поверхні, які можуть зв'язувати A β і опосередковувати передачу сигналів нейронами та вивільнення нейромедіаторів через активацію кальцієвих каналів.

Ексайтотоксичність — це пошкодження або загибель клітин, спричинені надмірною активацією рецепторів збуджуючих передавачів, зокрема рецепторів глутамату. Ексайтотоксичність викликається надмірною активацією глутаматних рецепторів, що призводить до припливу Na⁺ і Ca²⁺ через плазматичну мембрану в результаті відкриття каналів рецепторів глутамату (AMPA/KAR і NMDA) і залежних від напруги Ca²⁺ каналів.

Як величина, так і тривалість підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} після активації глутаматного рецептора є важливими детермінантами того, чи відбудеться дегенерація нейронів. В умовах спокою концентрація Ca^{2+} в цитоплазмі в нейронах зазвичай становить приблизно 100 нМ. Великі підвищення внутрішньоклітинного Ca^{2+} (низькі мікромолярні концентрації) можна переносити до тих пір, поки вони є тимчасовими (відновлення від секунд до хвилин).

Метою даної роботи є дослідження виживання культивованих нейронів гіпокампу в умовах інкубації з β -амілоїдом та моделювання ексайтотоксичності.

Об'єктом дослідження є культивовані нейрони гіпокампу щурів лінії Вістар, яких утримували в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Предметом дослідження є вплив β -амілоїду та NMDA на культивовані нейрони гіпокампу щурів лінії Вістар.

Дослідження проводились за допомогою методу подвійного забарвлювання нейронів культури гіпокампу з барвниками Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США, індикатор ДНК, що знаходиться в ядрах клітин), та пропідіуму йодиду (ПЙ, Sigma-Aldrich, США, індикатор некротичних клітин). Контрольні, а також оброблені реагентами нейрони переносили на 10 хвилин у розчин ПЙ з кінцевою концентрацією 2 мкг/мл. Потім клітини фіксували, помістивши на 20 хвилин у 4 % розчин параформальдегіду. Згодом нейрони переносили на 20 хвилин у розчин Hoechst 33258 (кінцева концентрація 1 мкг/мл). Після кожного етапу клітини двічі промивали у 2 мл фосфатного буферу. Усі маніпуляції здійснювали при кімнатній температурі. Після забарвлювання покривні скельця з клітинами фіксували на предметному склі з використанням розчину Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc., США). Зафіксовані препарати аналізували, використовуючи, конфокальний мікроскоп.

В результаті проведеного дослідження виявилось, що 24-годинна інкубація нейронів гіпокампа щурів з NMDA або амілоїдом βA_{1-42} зумовлювала більш ніж подвійне підвищення кількості клітин з ознаками апоптозу та/або некрозу у порівнянні з контролем. Це свідчило про зниження життєздатності клітин в умовах ексайтотоксичності, індукованої додаванням NMDA, та моделювання хвороби Альцгеймера шляхом введення амілоїду βA_{1-42} .

Результати роботи було опубліковано в XX всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених.

Ключові слова: Хвороба Альцгеймера, β -амілоїд, гіпокамп, культура клітин, NMDA.

ABSTRACT

The master's dissertation consists of 90 pages, contains 21 figures, 3 tables and 96 sources according to the list of references.

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease that progresses slowly and gradually destroys brain cells. Recent data suggest that by 2050, the prevalence of dementia will double in Europe and triple worldwide.

β -amyloid ($A\beta$) protein is a major component of amyloid plaques associated with HA and is produced by protease cleavage of transmembrane APP type I. Alternative transcriptional splicing produces 8 to 11 APP isoforms, with the 3 most common amino acids (APP695), which are predominantly expressed in neurons, and 751 and 770 amino acid forms (APP751, APP770), which are expressed in both neurons and glial cells. Although APP has been studied in detail, the specific physiological function of APP remains unclear. So far, several physiological roles of APP have been proposed. The extracellular domain of APP mediates cell-to-cell adhesion to support synaptic connections. APP homodimers can function as G-protein-coupled receptors that can bind $A\beta$ and mediate neuronal signaling and neurotransmitter release through calcium channel activation.

Excitotoxicity is damage to or death of cells caused by over-activation of receptors for excitatory transmitters, including glutamate receptors. Excitotoxicity is caused by excessive activation of glutamate receptors, which leads to the influx of Na^+ and Ca^{2+} through the plasma membrane as a result of the opening of glutamate receptor channels (AMPA / KAR and NMDA) and voltage-dependent Ca^{2+} channels.

Both the magnitude and duration of the increase in intracellular Ca^{2+} concentration after glutamate receptor activation are important determinants of whether neuronal degeneration will occur. At rest, the concentration of Ca^{2+} in the cytoplasm in neurons is usually approximately 100 nm. Large increases in intracellular Ca^{2+} (low micromolar concentrations) can be tolerated as long as they are temporary (recovery from seconds to minutes).

The aim of this work is to study the survival of cultured hippocampal neurons in incubation with β -amyloid and simulation of excitotoxicity.

The object of the study are cultured neurons of the hippocampus of Wistar rats, which were kept in standard conditions of the vivarium of the Institute of Physiology. OO Bogomolets NAS of Ukraine.

The subject of the study is the effect of β -amyloid and NMDA on cultured hippocampal neurons of Wistar rats.

The studies were performed using the method of double staining of hippocampal culture neurons with Hoechst 33258 dyes (Sigma-Aldrich, USA, indicator of DNA in cell nuclei) and propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, USA, necrotic cell indicator). Control and reagent-treated neurons were transferred for 10 minutes to a PY solution with a final concentration of 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Then the cells were fixed by placing for 20 minutes in a 4% paraformaldehyde solution. Subsequently, the neurons were transferred for 20 minutes in Hoechst 33258 solution (final concentration 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$). After each step, the cells were washed twice in 2 ml of phosphate buffer. All manipulations were performed at room temperature. After staining, the cell slides were fixed on a glass slide using Aqua-Poly / Mount solution (Polysciences, Inc., USA). The recorded drugs were analyzed using a confocal microscope.

The study found that 24-hour incubation of rat hippocampal neurons with NMDA or amyloid $\beta\text{A1-42}$ resulted in more than a twofold increase in the number of cells with signs of apoptosis and/or necrosis compared to controls. This indicated a decrease in cell viability under NMDA-induced excitotoxicity and simulation of Alzheimer's disease by administration of $\beta\text{A1-42}$ amyloid.

The results of the work were published in the XX All-Ukrainian scientific-practical conference of students, graduate students, and young scientists.

Keywords: Alzheimer's disease, β -amiloyd, hippocampus, hippocampal neuron culture, NMDA, excitotoxicity.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	38
ВСТУП	10
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
Загальна характеристика хвороби Альцгеймера	12
1.1 Сучасні уявлення про механізми патогенезу хвороби Альцгеймера	13
1.2 Стан фармакотерапії нейродегенеративних захворювань	15
Роль β - амілоїду в патогенезі хвороби Альцгеймера	18
2.1 Молекулярні механізми нейродегенеративних процесів при хворобі Альцгеймера за участю β - амілоїду	18
2.2 Дисфункція синапсів при хворобі Альцгеймера	21
Роль NMDA-рецепторів в патогенезі хвороби Альцгеймера	24
3.1 Поняття ексайтотоксичності та її вплив на функції організму	24
3.2 Роль антагоністів NMDA-рецепторів в нейропротекції	27
МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ	31
Приготування первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампу	31
Покриття скелець полілізином та ламініном	32
Обробка клітин культури гіпокампу A β -амілоїдом та NMDA	32
Забарвлювання нейронів гіпокампу	32
Встановлення стану клітин	33
Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія	33
Статистичний аналіз	34
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ ПРОВЕДЕНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ	35
ВИСНОВКИ	40
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

A β чи β A – β -амілоїд

ХА – хвороба Альцгеймера

NMDA – N-метил-D-аспартат

ПЙ – пропідіум йодид

СМР – спинномозкова рідина

мл – мілілітер

мкг – мікрограм

ВСТУП

Хвороба Альцгеймера — це нейродегенеративне захворювання, яке прогресує в повільному темпі й поступово знищує клітини мозку. Останні дані свідчать про те, що до 2050 року поширеність деменції подвоїться в Європі і потроїться в усьому світі [1].

Відкладення А β призводять до утворення бляшок, амілоїдні фібрили накопичуються у зовнішньому просторі клітини і групуються у форму кулі. Амілоїд- β також може відкладатися в середовищі та адвентиції дрібних і середніх артерій, що схоже на церебральну амілоїдну ангіопатію [43]. Крім того, А β інгібує процес довгострокового потенціювання в гіпокампі (long term potentiation – LTP) *in vivo* [45]. Нейрофібрилярна дегенерація посилюється у трансгенних мишей, мутантних тау та APP [46]. Трансгенні миші, які високо експресують людський APP в мозку, демонструють спонтанні судоми, які можуть бути пов'язані з посиленням синаптичним гальмуванням ГАМКергічної активності та дефіцитом синаптичної пластичності [47]. У людини амілоїдну патологію можна виміряти безпосередньо за допомогою ПЕТ або опосередковано за рівнями А β_{1-42} в спинномозковій рідині (СМР), які, як вважають, відображають агрегацію А β в ЦНС. При ХА зміни концентрації А β з'являються в СМР, після чого послідовно відбувається накопичення А β в головному мозку, збільшення тау в СМР, втрата об'єму в гіпокампі та сірої речовини, зниження метаболізму глюкози, погіршення пам'яті та деменція [48].

Ексайтотоксичність — це пошкодження або загибель клітин, спричинені надмірною активацією рецепторів збуджуючих передавачів, зокрема рецепторів глутамату. Ексайтотоксичність викликається надмірною активацією глутаматних рецепторів, що призводить до припливу Na^+ і Ca^{2+} через плазматичну мембрану в результаті відкриття каналів рецепторів глутамату (AMPA/KAR і NMDA) і залежних від напруги Ca^{2+} каналів.

Як величина, так і тривалість підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} після активації глутаматного рецептора є важливими детермінантами того, чи дегенерується нейрон. В умовах спокою концентрація Ca^{2+} в цитоплазмі в нейронах зазвичай становить приблизно 100 нМ. Великі підвищення внутрішньоклітинного Ca^{2+} (низькі мікромольні концентрації) можна переносити до тих пір, поки вони є тимчасовими (відновлення від секунд до хвилин).

Рецептори NMDA також відіграють центральну роль в ексайтотоксичній загибелі нейронів, спричиненої ішемічним інсультом. Двома основними підтипами іонотропних глутаматних рецепторів є NMDA (N-метил-D-аспартат) рецептори (NMDAR) і AMPA (α -аміно-3-гідрокси-5-метилізоксазол-4-пропіонової кислоти) рецептори (AMPA). У стані спокою каналні пори NMDAR зазвичай блокуються Mg^{2+} . Коли глутамат вивільняється з пресинаптичних ділянок, активовані AMPAR викликають часткову деполяризацію в постсинаптичній мембрані, достатню для видалення блоку Mg^{2+} з NMDAR. Після того, як NMDAR активуються, в клітину надходять Na^+ і Ca^{2+} . Приплив Ca^{2+} через NMDAR є не тільки критичним для нормальних фізіологічних процесів у нейронах, але також відіграє важливу роль у ініціації ішемічної загибелі клітин [58-60, 62]. При ексайтотоксичності надлишкове вивільнення глутамату призводить до надмірної активації NMDAR і призводить до перевантаження кальцієм нейронів.

В нашій роботі ми вивчали виживання культивованих нейронів гіпокампу в умовах інкубації з β -амілоїдом та при моделюванні ексайтотоксичності.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Загальна характеристика хвороби Альцгеймера

Хвороба Альцгеймера (ХА) — це нейродегенеративне захворювання, яке прогресує в повільному темпі й поступово знищує клітини мозку.

Останні дані свідчать про те, що до 2050 року поширеність деменції подвоїться в Європі і потроїться в усьому світі[1].

Рисунок 1 демонструє три випадки клінічного спектру ХА:

- Випадок А демонструє ХА, яка визначається генетично, відповідно до поточних глобальних стандартів ініціатив “Мережа домінантної успадкованої хвороби Альцгеймера” та “Профілактики хвороби Альцгеймера” (initiatives “Dominantly Inherited Alzheimer Network” and “Alzheimer Prevention Initiative”), та пов’язаних з ними клінічних випробувань.
- Випадок В – так званий “мовний” варіант ХА, який зазвичай виникає в молодшому віці (до 70 років). У цьому випадку виникають труднощі розпізнавання ХА для тих, у кого проблеми з пам’яттю не є першою і найбільш помітною ознакою.
- Випадок С – типовий варіант амнезії, яка частіше спостерігається у пацієнтів старше 70 років. Саме цей варіант з’являється все частіше у світі, та демонструє потреби допомоги самотнім людям похилого віку в догляді за собою.

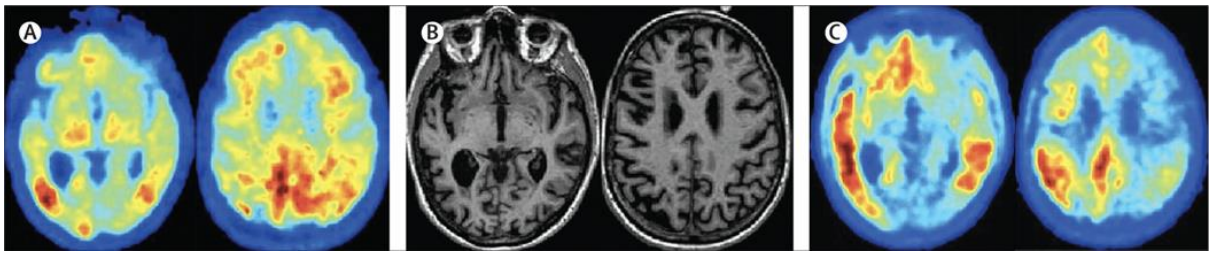


Рис. 1.1. Демонстрація випадків хвороби Альцгеймера.

(А) Сканування амілоїд-Піттсбург з'єднання В-РЕТ, що показує відкладення амілоїду переважно в задній поясній області (В) Т1-зважені зображення МРТ, що показують генералізовану атрофію кори, зліва направо. (С) Зображення Тау-РЕТ з використанням трасера AV1451, що демонструє ліву нижньо-скроневу частку, тім'яну та легку задню поясну відкладення тау[2].

1.1 Сучасні уявлення про механізми патогенезу хвороби Альцгеймера

ХА вважається мультифакторним захворюванням. На сьогоднішній день запропоновано декілько гіпотез розвитку ХА, серед яких дві найбільш популярні у дослідників : холінергічна та амілоїдна гіпотези. Крім того, деякі фактори ризику, такі як збільшення віку, генетичні фактори, травми голови, судинні захворювання, інфекції та фактори навколишнього середовища, відіграють роль у розвитку хвороби.

1.1.1 Холінергічна гіпотеза

Холінергічна гіпотеза була запропонована Пітером Девісом і А. Дж. Ф. Мелоні в 1976 році [3]. Вони вивчали та порівнювали активність ключових ферментів, які беруть участь у синтезі нейромедіаторів, включаючи ацетилхолін, γ -аміномасляну кислоту, дофамін, норадреналін та 5-гідрокситриптамін. Активність холінацетилтрансферази в мозку ХА була значно знижена в мигдалині, гіпокампі та корі, в яких концентрація ацетилхоліну була знижена в синапсах [4-6]. Активність декарбоксилази глутамінової кислоти, тирозину гідроксилази, ароматичної амінокислотної декарбоксилази, дофамін- β -гідроксилази та моноаміноксидази у всіх досліджених ділянках мозку ХА виявилось в межах норми. Холінацетилтрансфераза є ключовим ферментом у синтезі ацетилхоліну, і для його каталітичної активності потрібні такі субстрати: холін, ацетил-КоА та

аденозинтрифосфат. Це був перший випадок, коли концепція ХА була відзначена як збій холінергічної системи [3,7]. Цей висновок також був зареєстрований при інших неврологічних та психіатричних розладах, таких як хвороба Паркінсона та депресії [8,9].

Холінергічна гіпотеза ХА стверджує, що дегенерація холінергічних нейронів у базальних ядрах переднього мозку викликає порушення в пресинаптичних холінергічних терміналах в гіпокампі та неокортексі, що є одним з ключових факторів порушення пам'яті та інших когнітивних симптомів. Потенціювання активності центрального холінергічного шляху є однією зі стратегій симптоматичного лікування когнітивної дисфункції при ХА.

Сучасні клінічні препарати, що використовуються для лікування ХА, покращують якість життя пацієнтів з ХА, але не мають суттєвого впливу на корекцію виникнення або прогресування ХА.

1.1.2 Гіпотеза “амілоїдного каскаду”

Гіпотеза “амілоїдного каскаду” була вперше запропонована в 1991 році Джоном Харді та Девідом Оллсопом [11,12]. Вони виявили патогенну мутацію в гені білка-попередника (amyloid precursor protein (APP)) бета-амілоїду (amyloid- β ($A\beta$)) на хромосомі 21. Вони вважали, що патологічними каскадами при ХА були відкладення $A\beta$, фосфорилювання тау, утворення нейрофібрилярних клубків та загибель нейронів. Наявність відкладень $A\beta$ у трансгенній моделі APP-мутанту (APP751) підтвердила гіпотезу і додатково сприяла зміщенню гіпотези “амілоїдного каскаду” з описової гіпотези до механістичної [13,14]. Дослідження позитронно-емісійної томографії (ПЕТ) показали, що ~30% клінічно нормальних літніх людей мають ознаки накопичення $A\beta$ [15-18].

На далі, в цьому дослідженні розглядається тільки гіпотеза “амілоїдного каскаду”.

1.2 Стан фармакотерапії нейродегенеративних захворювань

Незважаючи на зростаючу популяцію пацієнтів з ХА, наразі схвалено лише п'ять варіантів лікування когнітивних симптомів ХА у Сполучених Штатах, останній з яких (мемантин) був схвалений більше десяти років тому [19]. Чотири з п'яти стандартних методів лікування також ліцензовані в Європейському Союзі; вони включають три інгібітори холінестерази (донепезил, галантамін і ривастигмін) і один антагоніст N-метил-D-аспартатних рецепторів (мемантин; рис. 1.2.1) [20-24]. У 2014 році п'ятий варіант лікування, що складається з комбінації фіксованих доз з донепезилом та мемантином, був схвалений для лікування пацієнтів як з помірною, так і з важкою деменцією з ХА, які отримують стабільну терапію донепезилом [25]. Більшість терапевтичних засобів, що розроблялися за останні 15 років, виявилися невдалими. Майже всі випробування були зроблені в монотерапії, у яких порівнювали активну речовину з плацебо з або без базових стандартних засобів лікування, таких як інгібітори холінестерази або мемантин.

На сьогоднішній день, більшість випробувань нових терапевтичних засобів при ХА проводяться на пацієнтів, які вже отримують інгібітори холінестерази, мемантин або обидва, і, таким чином, є новими типами додаткового лікування. Перевага комбінованих випробувань порівняно з додатковими полягає в тому, що комбінований дизайн дозволяє дослідникам аналізувати ефекти кожної терапії окремо та спільно з іншими, розрізняючи індивідуальні та синергічні ефекти пробної терапії.

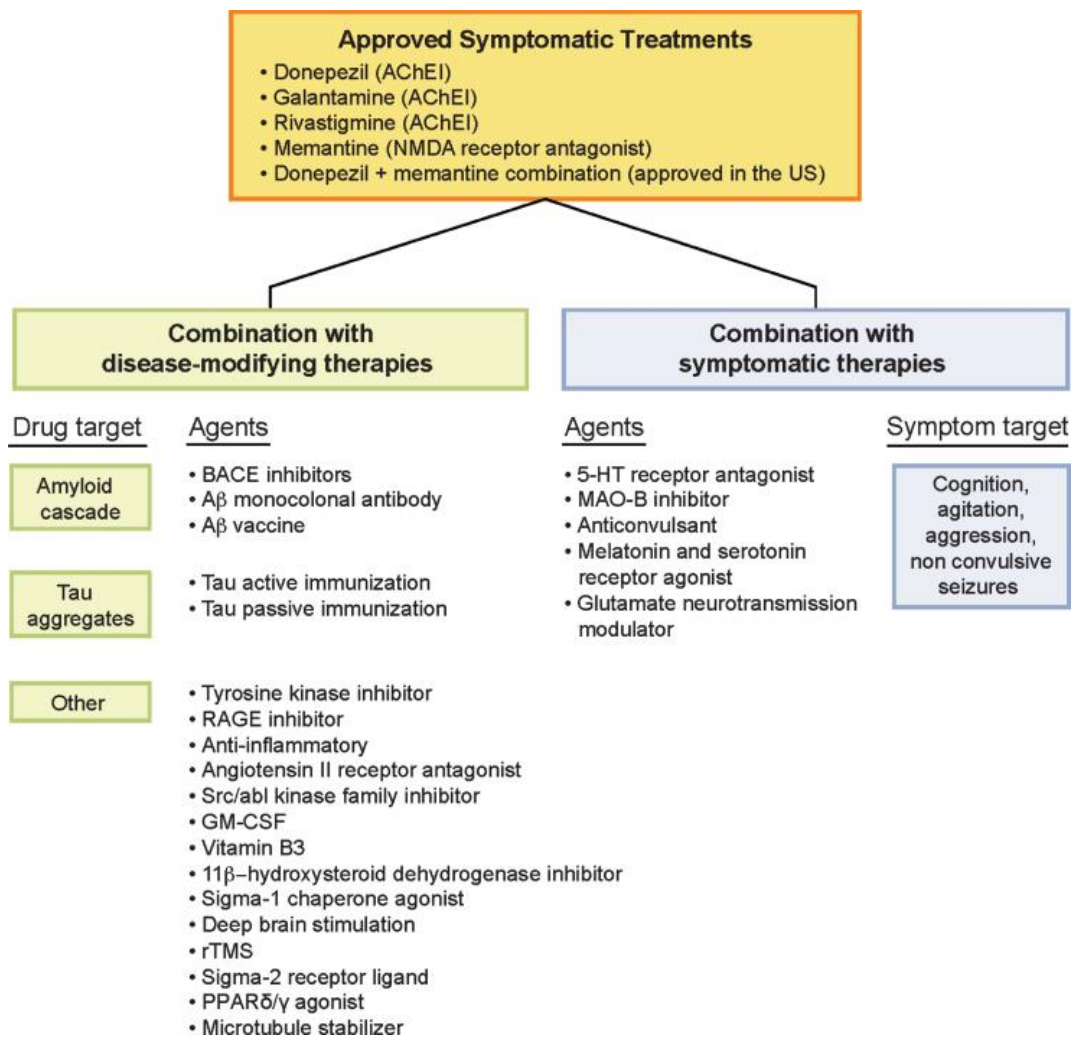


Рис 1.2.1. Комбінована терапія в процесі розробки ліків від ХА. 5-НТ, 5-гідрокситриптамін (серотонін); А β , амілоїд- β ; AChEI, інгібітор ацетилхолінестерази; AD, хвороба Альцгеймера; BACE, фермент, що розщеплює білковий попередник амілоїду β -сайту аспартилпротеази; GM-CSF, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор; MAO, моноаміноксидаза; NMDA, N-метил-D-аспартат; PPAR, рецептор, активований проліфератором пероксисом; RAGE, рецептор кінцевих продуктів глікації; rTMS, повторювана транскраніальна магнітна стимуляція.

Джерело рисунка[26].

Сучасні стратегії лікування ХА, засновані на гіпотезі А β . В основному стратегії лікування поділяються на такі категорії [27]:

1. інгібітори β - та γ -секретази, які використовуються для інгібування продукції А β ;
2. препарати проти агрегації (включаючи хелатори металів), які використовуються для інгібування агрегації А β ;

3. препарати, що регулюють активність протеази, які використовуються для очищення A β ; та імунотерапія.

Моноклональні антитіла (mAbs), націлені на A β , є основним засобом пасивної імунотерапії для лікування AD. Наприклад, соланезумаб, який може зв'язувати мономерний і розчинний A β , не виявив лікувальних ефектів у пацієнтів з ХА у фазі III, хоча соланезумаб ефективно знижував концентрацію вільного A β у плазмі більш ніж на 90% [28]. Гантенерумаб (Roche/Genentech) — це моноклональне антитіло, яке зв'язує олігомерний і фібрилярний A β і може активувати опосередкований мікроглією фагоцитарний кліренс бляшок. Однак він також зазнав невдачі на етапі III [29]. Кренезумаб (також відомий як Roche/Genentech/AC Immune) є mAb, яке може зв'язуватися з різними A β , включаючи мономери, олігомери та фібрили. Адуканумаб (Biogen Idec) — це моноклональне антитіло, яке націлено на агреговані форми A β . Хоча адуканумаб може значно зменшити відкладення A β , Biogen та Eisai оголосили про припинення випробувань адуканумабу 21 березня 2019 року.

Невдалий результат цих випробувань свідчить про те, що краще розглядати відкладення A β як патологічну ознаку, а не як головну частину механістичної гіпотези.

Роль β - амілоїду в патогенезі хвороби Альцгеймера

2.1 Молекулярні механізми нейродегенеративних процесів при хворобі Альцгеймера за участю β - амілоїду

β -амілоїдний (A β) білок є основним компонентом амілоїдних бляшок, асоційованих з ХА, і виробляється шляхом розщеплення протеазою трансмембранного APP типу I [30, 31]. За допомогою альтернативного транскрипційного сплайсингу можна отримати від 8 до 11 ізоформ APP, де 3 найпоширеніші ізоформи сплайсингу включають форму з 695 амінокислот (APP695), які переважно експресуються в нейронах, і 751 та 770 амінокислотних форм (APP751, APP770), що експресуються як в нейронах так і гліальних клітинах [32]. Хоча APP було детально досліджено, специфічна фізіологічна функція APP залишається не зрозумілою. Наразі було запропоновано кілька фізіологічних ролей APP. Позаклітинний домен APP опосередковує адгезію клітини до клітини для підтримки синаптичних з'єднань. Гомодимери APP можуть функціонувати як рецептори, пов'язані з G-білком клітинної поверхні, які можуть зв'язувати A β і опосередковувати передачу сигналів нейронами та вивільнення нейромедіаторів через активацію кальцієвих каналів [31, 33]. Точніше, APP може опосередковувати інгібування γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) гіпокампу через пряму білково-білкову взаємодію з K⁺-Cl⁻ котранспортером 2 (KCC2), стабілізуючи таким чином KCC2 на клітинних мембранах. Дефіцит APP збільшує деградацію KCC2 через фосфорилування тирозину та убіквітинування, таким чином призводячи до деполяризації потенціалу реверсії ГАМК та погіршення під час інгібування, опосередкованого ГАМК-рецепторами [34].

Після синтезу на рибосомах невелика частина молекул APP досягає плазматичної мембрани, де вони піддаються специфічному ендопроотеолізу трьома протеазами: α -, β - та γ -секретазами. На активність α -секретази виділяють наступні три сімейства ADAM (дезінтегрин і металопротеаза): ADAM-9, ADAM-10 і TACE (tumor necrosis factor- α converting enzyme)/ADAM-17 [35]. Білок, відповідальний за активність β -секретази, був

ідентифікований як аспартилпротеаза і названий BACE (ензим, що розщеплює β -сайт APP) [36]. Вважається, що за активність розщеплення γ -секретази відповідає великий комплекс різних білків, включаючи несприлизин, фермент, що розщеплює інсулін, і пресеніліни як частину каталітичного центру [37]. Завдяки дії секретаз утворюються пептиди A β довжиною від 40 до 43 залишків. α -секретаза розщеплює APP всередині послідовності A β , утворюючи неамілоїдогенні пептидні фрагменти: розчинну N-кінцеву частину APP (α APPs) і C-кінцевий фрагмент C83, закріплений на мембрані (рис 2.1).

β -секретаза розщеплює APP на N-кінцевій послідовності A β , що призводить до утворення N-кінцевої частини APP (β APPs) і C-кінцевого фрагмента C99. Подальше розщеплення проміжного білка C99 на C-кінцевій стороні послідовності A β γ -секретазою утворює амілоїдогенну форму пептиду. Процесинг γ -секретази є гетерогенною подією, що утворює A β з різними C кінцями. A β_{40} і A β_{42} є найбільш поширеними формами. γ -секретаза зазвичай розривається в Val в положенні 40 або/і в Ala в положенні 42. На відміну від A β_{40} , A β_{42} має більшу тенденцію до утворення фібрилярного A β . Відкладення «засівання» A β_{42} прискорює накопичення A β_{40} і стимулює каскад процесів, що ведуть до утворення бляшок і нейрофібрилярних клубків з наступною загибеллю нейронів [38]. Згідно з «гіпотезою амілоїдного каскаду» (рис. 2.1.1) [39; 40] порушення в метаболізмі APP з подальшим накопиченням пептидів A β в мозку є основною подією в патогенезі ХА. Інші патологічні ознаки (нейрофібрилярні клубки, пошкодження нейронів і загибель клітин) розглядаються як вторинні.

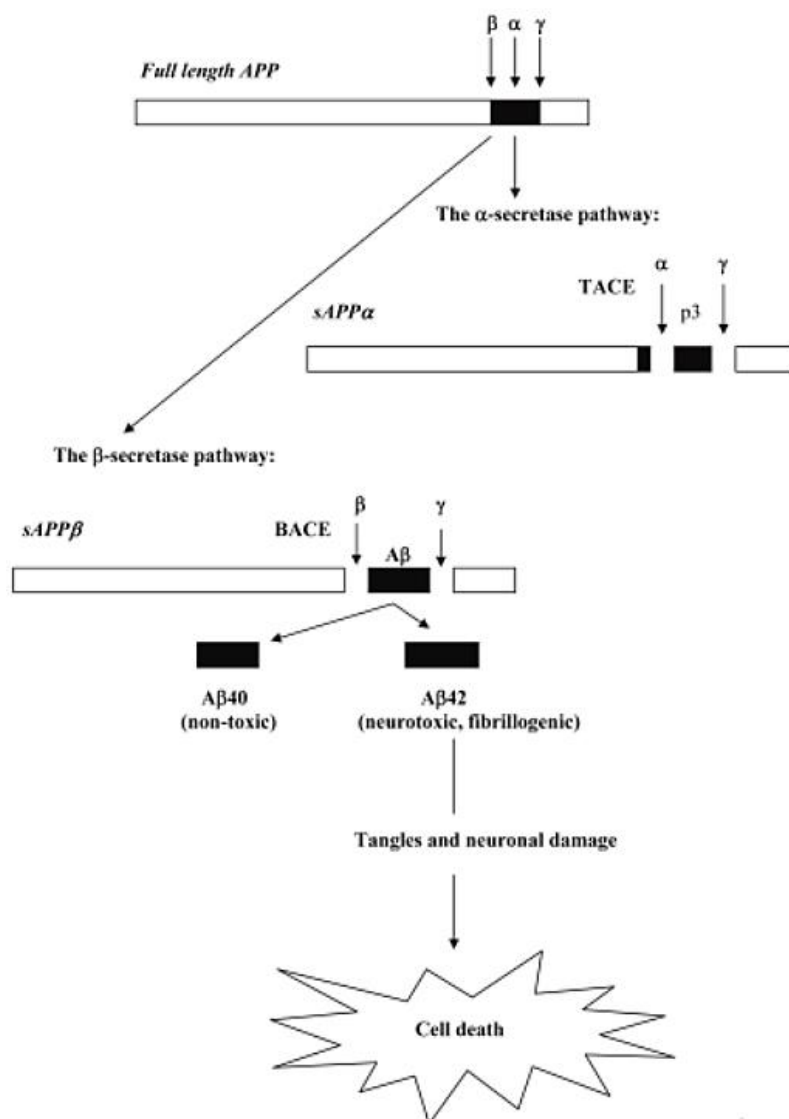


Рис. 2.1.1. Ендопротеолітичні розщеплення APP, що призводить до утворення неамілоїдогенних (шлях α -секретази) або амілоїдогенних (шлях β -секретази) продуктів, які є необхідними для патогенезу хвороби Альцгеймера [41].

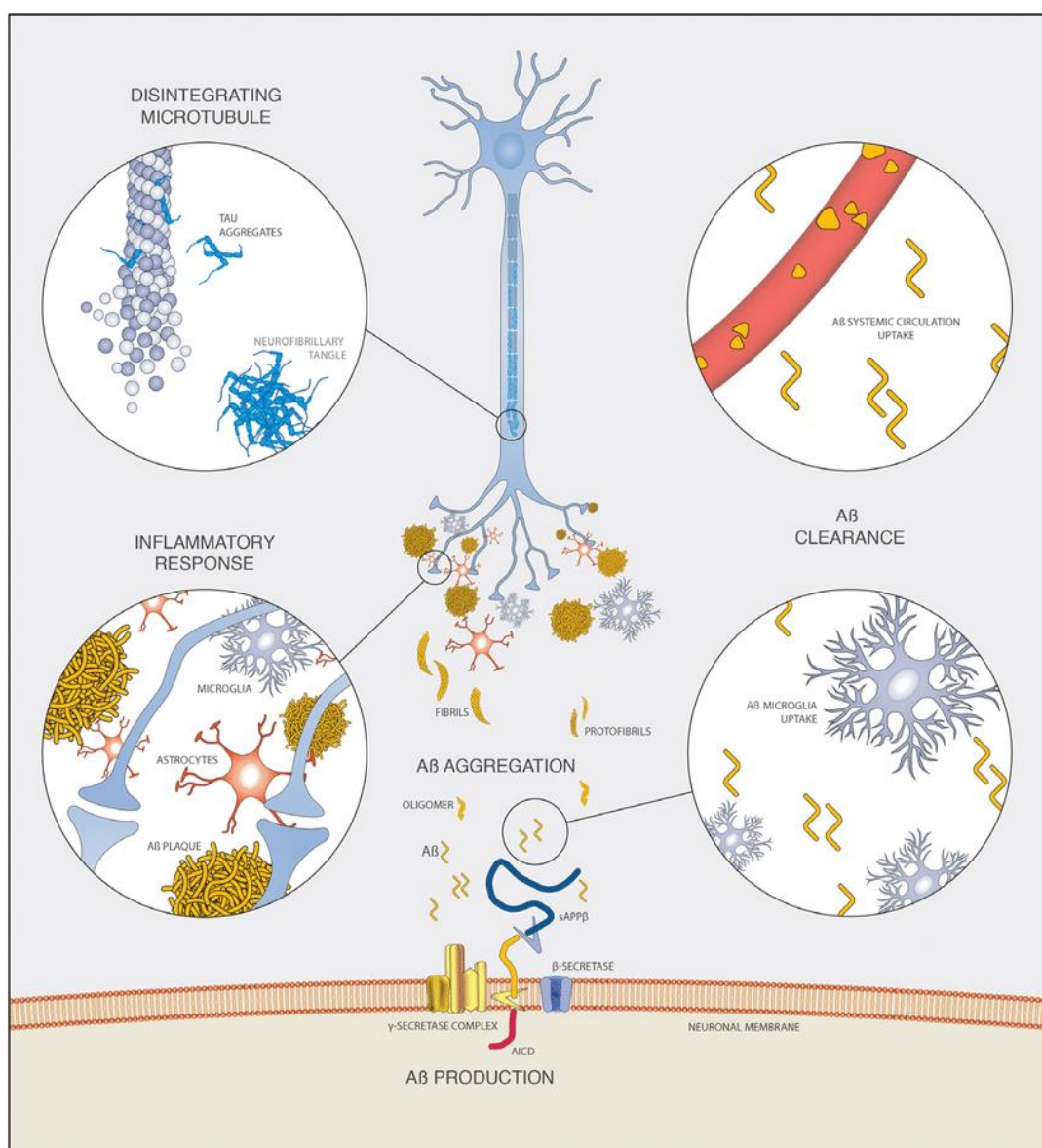


Рис. 2.2. Схематичне зображення гіпотези “амілоїдного каскаду” в хворобі Альцгеймера [42]

2.2 Дисфункція синапсів при хворобі Альцгеймера

Як було зазначено раніше, ХА в основному характеризується Аβ патологією, яка виявляється у попередника амілоїду ген білка (APP, 21q21) хромосоми 21. Відкладення Аβ призводять до утворення бляшок, амілоїдні фібрили накопичуються у зовнішньому просторі клітини і групуються у форму кулі. Амілоїд-β також може відкладатися в середовищі та адвентиції дрібних і середніх артерій, що схоже на церебральну амілоїдну ангіопатію [43].

Рівні нерозчинного Аβ корелюють зі зниженням пізнання [44]. Крім того, Аβ інгібує процес довгострокового потенціювання в гіпокампі (long term

potentiation – LTP) in vivo [45]. Нейрофібрилярна дегенерація посилюється у трансгенних мишей, мутантних тау та APP [46]. Трансгенні миші, які високо експресують людський APP в мозку, демонструють спонтанні судоми, які можуть бути пов'язані з посиленням синаптичним гальмуванням ГАМКергічної активності та дефіцитом синаптичної пластичності [47].

У людини амілоїдну патологію можна виміряти безпосередньо за допомогою ПЕТ або опосередковано за рівнями $A\beta_{1-42}$ в спинномозковій рідині (СМР), які, як вважають, відображають агрегацію $A\beta$ в ЦНС. При ХА зміни концентрації $A\beta$ з'являються в СМР, після чого послідовно відбувається накопичення $A\beta$ в головному мозку, збільшення тау в СМР, втрата об'єму в гіпокампі та сірої речовини, зниження метаболізму глюкози, погіршення пам'яті та деменція [48]. Поширеність амілоїдної патології збільшується з віком, і суб'єкти з амілоїдною патологією на початковому етапі зазвичай демонструють більш швидке зниження когнітивних функцій, ніж ті, хто не мав цього [49]. Вважається, що відкладення $A\beta$ передують симптоматичній ХА приблизно на 15-20 років [44, 50].

Багато досліджень in vivo підтвердили існування дистрофічних невритів (дистрофія визначається як набряк $>2,5$ мкм або об'єм, що в 2 рази перевищує нормальні аксони) поблизу бляшок [51-58]. Наявність дистрофічних невритів поблизу бляшок може означати, що бляшки викликають невритну дистрофію, або дистрофічні аксони сприяють утворенню бляшок. Вирішення цього питання вимагає моніторингу динаміки аксонів і бляшок з часом, що неможливо за допомогою традиційних підходів до візуалізації посмертних зрізів мозку. Поздовжнє зображення дистрофічних невритів і бляшок показує, що утворення бляшок передують дистрофічним аксонам [51, 54, 55].

У дослідженні [55] в одній з моделей мишей (APP^{swe}/PS1^{E9}), дистрофічні дендрити були присутні в областях без видимих бляшок. Поздовжнє зображення цих областей не виявило утворення de novo бляшок поблизу дистрофічних дендритів. Цікаво, що за цей час деякі неврити прийшли в норму або зникли. Лише 60% дистрофічних невритів залишалися

стабільними протягом 2 тижнів. Якщо дистрофічні неврити не сприяють утворенню бляшок, більш імовірно, що бляшки збільшують кількість дистрофічних невритів. Хоча дистрофічні аксони, не сприяють утворенню бляшок, вони все ж можуть сприяти зростанню попередньо сформованих бляшок. Зростання бляшок відбувається протягом тривалого періоду, демонструючи кінетику сигмовидного росту [56-58].

Роль NMDA-рецепторів в патогенезі хвороби Альцгеймера

3.1 Поняття ексайтотоксичності та її вплив на функції організму

Ексайтотоксичність – це пошкодження або загибель клітин, спричинені надмірною активацією рецепторів збуджуючих передавачів, зокрема рецепторів глутамату. Нейрони стають вразливими до ексайтотоксичності в умовах зниженої доступності енергії (глюкози) і підвищеного кисневого стресу.

Усі субклітинні компартменти зазнають впливу ексайтотоксичного процесу, причому зміни в цитозолі, мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі (ЕР) і ядрі є основними. Нормальна кількість активації рецепторів глутамату може пошкодити нейрони в умовах метаболічного та кисневого стресу, які виникають після інсульту або черепно-мозкової травми або при вікових нейродегенеративних розладах.

Ексайтотоксичність викликається надмірною активацією глутаматних рецепторів, що призводить до припливу Na^+ і Ca^{2+} через плазматичну мембрану в результаті відкриття каналів рецепторів глутамату (AMPA/KAR і NMDA) і залежних від напруги Ca^{2+} каналів (рис. 3.1.1). На рис. 3.1.1 зображено зв'язування глутамату з рецепторами AMPA і кайнатними рецепторами (KAR), відкриття рецепторних каналів, що призводить до припливу Na^+ і, як наслідок, деполяризації мембрани та відкриття залежних від напруги Ca^{2+} каналів (VDCC). Деякі форми рецепторів AMPA також проникні для Ca^{2+} . Зв'язування глутамату з NMDAR в умовах деполяризації відкриває канал NMDAR, що призводить до припливу великої кількості Ca^{2+} .

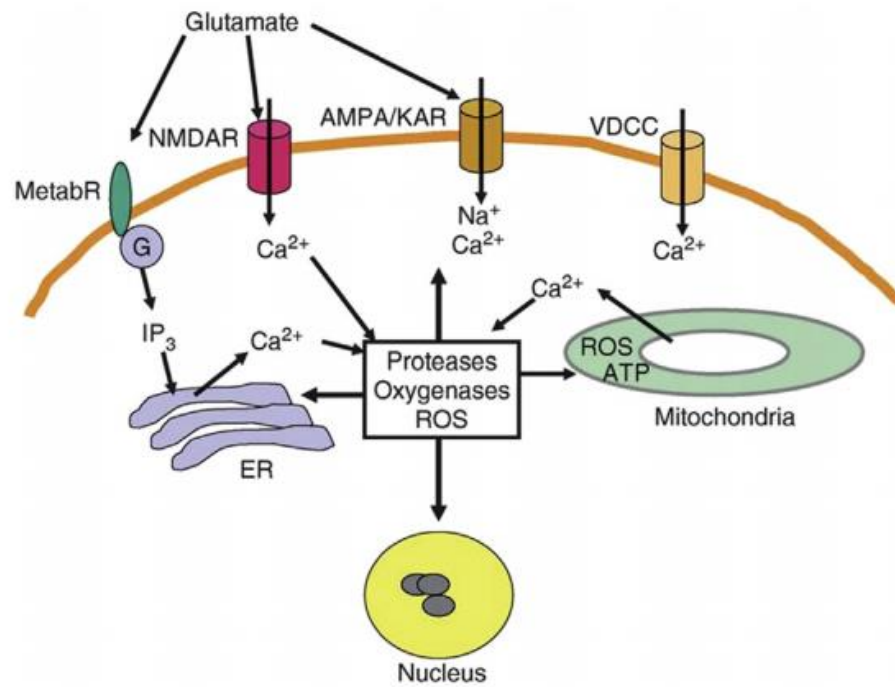


Рис. 3.1.1. Механізм ексайтотоксичності [59]

Активація метаботропних глутаматних рецепторів (MetR) індукує продукцію інозитолтрифосфату (IP₃) і активацію рецепторів IP₃ і ріанодинових рецепторних каналів в мембрані ендоплазматичної сітки (endoplasmic reticulum – ER), що призводить до вивільнення Ca²⁺ з ER в цитоплазму. Підвищення рівнів Ca²⁺ в цитоплазмі у відповідь на активацію рецепторів глутамату може викликати поглинання Ca²⁺ в мітохондрії, яке, якщо воно надмірне, може індукувати виробництво активних форм кисню та інгібувати виробництво АТФ. Активуючи протеази та викликаючи окислювальний стрес, Ca²⁺ є ключовим медіатором ексайтотоксичної загибелі клітин.

Крім того, активація метаботропних глутаматних рецепторів, пов'язаних з GTP-зв'язуючим білком, стимулює вироблення IP₃ і вивільнення Ca²⁺ з ER. Залежно від конкретного типу нейрона, стадії його розвитку та різних факторів навколишнього середовища, відносний внесок каїнату AMPAe, NMDA, метаботропних рецепторів і потенціал-залежних Ca²⁺-каналів в ексайтотоксичність може відрізнятися. Антагоніст, який вибірково блокує

один з різних глутаматних рецепторів або Ca^{2+} -каналів, може виявляти різну ефективність у захисті різних популяцій нейронів від ексайтотоксичності. Здатність нейрона видаляти та буферизувати Ca^{2+} також є важливими детермінантами його сприйнятливості до ексайтотоксичності. Прикладами таких ексайтотекторних механізмів є Ca^{2+} -АТФази в плазматичній мембрані та ER, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінники, мітохондріальний Ca^{2+} уніпортер і різні Ca^{2+} зв'язуючі білки [59].

Як величина, так і тривалість підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} після активації глутаматного рецептора є важливими детермінантами того, чи відбудеться дегенерація нейронів. В умовах спокою концентрація Ca^{2+} в цитоплазмі в нейронах зазвичай становить приблизно 100 нМ. Великі підвищення внутрішньоклітинного Ca^{2+} (низькі мікромолярні концентрації) можна переносити до тих пір, поки вони є тимчасовими (відновлення від секунд до хвилин). З іншого боку, навіть менше збільшення цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} (наприклад, до 500 нМ), яке підтримується більше 20–30 хвилин, може вбити нейрони. Ca^{2+} пошкоджує дендрити і вбиває нейрони, частково, активуючи цистеїнові протеази, які називаються кальпаїнами, які руйнують різноманітні субстрати, включаючи білки цитоскелета, мембранні рецептори та метаболічні енземи.

Ексайтотоксична загибель нейронів може відбуватися швидко в результаті масивного припливу Na^+ через рецептори AMPA/kainate і залежні від напруги Na^+ канали, що призводить до набряку та лізису клітин, процесу, який називається некрозом. Інша більш тонка форма загибелі нейронів, яка називається апоптозом, характеризується зморщуванням тіла клітини, утворенням бульбашок на поверхні клітинної мембрани, а також конденсацією та фрагментацією ядерного хроматину. Ексайтотоксичний апоптоз включає основні зміни мітохондрій, включаючи підвищення проникності мембрани та вивільнення цитохрому c. Потім цитохром c зв'язується з білком Araf-1, який опосередковує активацію каспаз 9 і 3. Ліки, які стабілізують мітохондріальну

мембрану, а також інгібітори каспази можуть захистити нейрони від ексайтотоксичної смерті.

Багато різних механізмів передачі сигналів можуть захистити нейрони від ексайтотоксичності. До них належать ті, які активуються нейротрофічними факторами, такими як нейротрофічний фактор головного мозку, основний фактор росту фібробластів та інсуліноподібні фактори росту. Два фактори транскрипції, які, як відомо, індукують експресію ексайтотекторних генів, — це ядерний фактор (NF)- κ B і білок, що зв'язує елемент відповіді цАМФ. Прикладами таких захисних генів є гени, що кодують антиоксидантний фермент марганцю супероксиддисмутази та антиапоптотичний білок Bcl-2. Ці ендогенні захисні шляхи можуть бути активовані певними препаратами. Наприклад, бактеріальні алкалоїди, які активують сигнальні шляхи нейротрофічного фактора, можуть захистити нейрони гіпокампу від ексайтотоксичного пошкодження, спричиненого судомми.

3.2 Роль антагоністів NMDA-рецепторів в нейропротекції

Глутамат є одним з основних збудливих нейромедіаторів в ЦНС. N-метил-D-аспартатний рецептор (NMDAR) є підтипом іонотропного рецептора глутамату і відіграє важливу роль у регуляції синаптичної пластичності, виживання нейронів, навчання та пам'яті [60]. Особи з ХА мали знижені рівні глутамату в спинномозковій рідині і менше NMDAR в гіпокампі та лобовій корі [61]. Посилення або модуляція активності NMDAR продемонструвала терапевтичний потенціал на початку ХА.

Консервант бензоат натрію посилює активність NMDAR шляхом інгібування оксидази D-амінокислоти (DAAO). D-серин, основний коагоніст NMDAR, метаболізується DAAO у гідроксипіруват. Інгібування DAAO збільшує рівень D-серину (рис. 3.2.1) [62].

Рецептори NMDA також відіграють центральну роль в ексайтотоксичній загибелі нейронів, спричиненої ішемічним інсультом.

Під час ішемії з'являється обмежений мозковий кровотік, що виснажує запас кисню та поживних речовин, які необхідні нейронам для підтримки іонного гомеостазу [63]. Порушені іонні градієнти деполяризують клітину і, серед іншого, запускають вивільнення збудливих нейромедіаторів, а саме глутамату, в синаптичний простір. У той же час, виснаження енергії також погіршує функцію транспортерів зворотного поглинання, тому вони не можуть очистити надлишок глутамату. Це призводить до накопичення збудливого глутамату в позаклітинному просторі і, як наслідок, надмірної активації глутаматних рецепторів постсинаптичних нейронів.

Іонотропні глутаматні рецептори є ліганд-керованими іонними каналами, які забезпечують швидкий приплив іонів у відповідь на глутамат і становлять ворота до ексайтотоксичності [64–66].

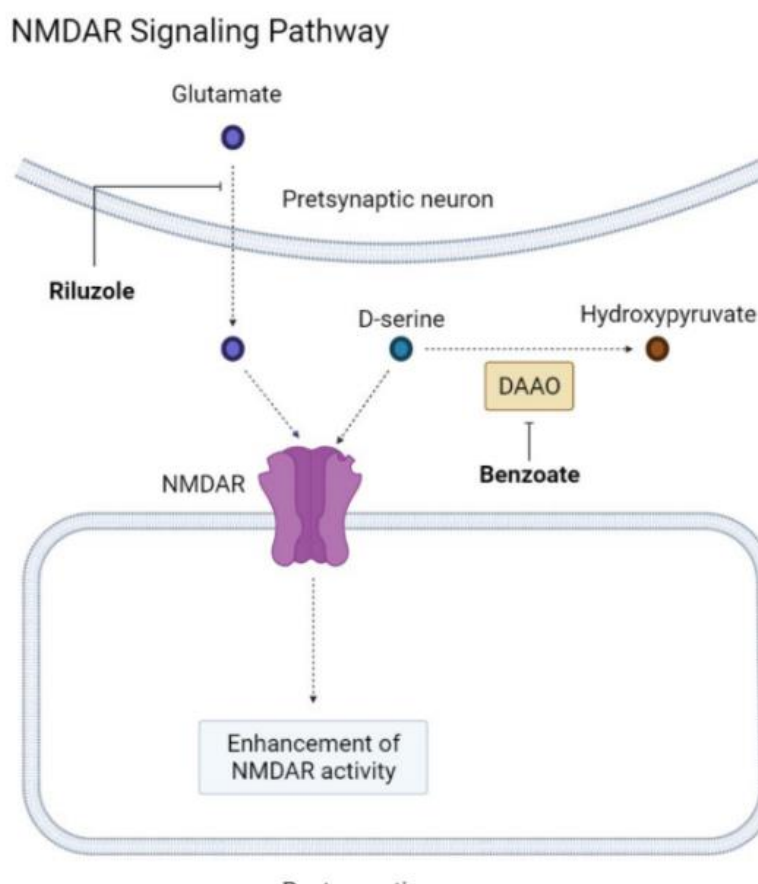


Рис. 3.2.1 Сигнальний шлях NMDAR. NMDAR—N-метил-D-аспартатний рецептор, DAAO—D-амінокислотна оксидаза. Стрілка Шаро означає активацію хімічної реакції. Пунктирна стрілка означає гальмування хімічної реакції [64].

Вони містять як позаклітинну ділянку зв'язування глутамату, так і трансмембранний іонний канал. Двома основними підтипами іонотропних глутаматних рецепторів є NMDA (N-метил-d-аспартат) рецептори (NMDAR) і AMPA (α -аміно-3-гідрокси-5-метилізоксазол-4-пропіонової кислоти) рецептори (AMPA). У стані спокою каналні пори NMDAR зазвичай блокуються Mg^{2+} . Коли глутамат вивільняється з пресинаптичних ділянок, активовані AMPAR викликають часткову деполяризацію в постсинаптичній мембрані, достатню для видалення блоку Mg^{2+} з NMDAR. Після того, як NMDAR активуються, через них надходять Na^+ і Ca^{2+} в клітину. Приплив Ca^{2+} через NMDAR є не тільки критичним для нормальних фізіологічних процесів у нейронах, але також відіграє важливу роль у ініціації ішемічної загибелі клітин [65–69]. При ексайтотоксичності надлишкове вивільнення глутамату призводить до надмірної активації NMDAR і призводить до перевантаження кальцієм нейронів. Воно викликає низку сигнальних подій, що передують смерті, таких як активація кальпаїну [70], утворення активних форм кисню (ROS) [67, 68] та пошкодження мітохондрій [69, 71, 73], що призводить до некрозу клітин або апоптозу.

Враховуючи ключову роль NMDAR в ексайтотоксичності, початковий терапевтичний підхід полягав у блокуванні рецепторів [68, 78]. Антагоністи NMDAR були розроблені для націлювання на різні ділянки зв'язків: неконкурентні антагоністи, які блокують іонні канали, конкурентні антагоністи, які запобігають зв'язуванню збудливих нейромедіаторів із сайтом розпізнавання глутамату, та інгібітори вивільнення глутамату, які блокують пресинаптичні чутливі канали напруги Na^+ [79]. У доклінічних дослідженнях на щурах антагоністи NMDAR захищали нейрони від ішемічної смерті на моделі оклюзії середньої мозкової артерії (middle cerebral artery occlusion – MCAO). У цих моделях MCA може бути закрита тимчасово або постійно, викликаючи інсульти різного ступеня тяжкості [80, 81]. Однак, незважаючи на початкові перспективи для гризунів, таких як щури, антагоністи NMDAR не

вдалося перевести для клінічного використання при гострому інсульті [82]. Пояснення цих невдач, ймовірно, багатофакторне [78]. Двома важливими недоліками є коротке терапевтичне терапевтичне вікно та питання безпеки, що обмежують дозу [83]. Для досягнення ефективності антагоністи NMDAR необхідно вводити до або відразу після інсульту [77, 82, 83]. Крім того, антагоністи NMDAR можуть викликати серйозні побічні ефекти, такі як нудота, блювота, серцево-судинні та психоміметичні ефекти у пацієнтів, які лікуються [81, 84, 85]. У ретроспективі виявляється, що блокада NMDAR буде перешкоджати нормальній функції нейронів і викликати значні побічні ефекти при потенційно терапевтичних дозах.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

Приготування первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампу

В експериментах використовували щурів лінії Вістар, яких утримували в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Всі експериментальні процедури було виконано згідно з міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин: Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV. Проведення всіх експериментальних досліджень було узгоджено з Комітетом з біоетики інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, протокол № 1/14 від 06.02.2014 р.

Для одержання клітин для культивування новонароджених щурів декапітували. Потім головний мозок вміщували в середовище Ігла (“Sigma”, США) з додаванням 20 мМ HEPES, 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну та 25 мкг/мл стрептоміцину сульфату. За допомогою скальпелю виділяли гіпокамп і нарізали його на частки 1-2 мм завтовшки та на 20 хвилин переносили у теплий (36°C) ферментативний розчин, який містив 0.05 % пронази Е (“Serva”, США). Далі шматочки гіпокампу промивали декілька разів холодним поживним середовищем до складу якого входили: мінімальне середовище Ігла, кінська сироватка (10%), інсулін (10 мкг/мл), бікарбонатний буфер (2,3 мг/мл), натрієва сіль бензилпеніциліну (50 од/мл) і сульфат стрептоміцину (50 мкг/мл). У камері Горяєва підраховували кількість клітин на одиницю об’єму в первинній суспензії. Для отримання необхідної кількості клітин у суспензії (густина клітин при посадці 30 тис. на 1 см²) додавали культуральне середовище. Потім 200 мкл суспензії клітин наносили на покривні скельця розміром 12x12 мм, що були попередньо оброблені сумішшю полілізину (0,05 мг/мл) та ламініну (0,005 54 мг/мл). Після 2 год інкубації при 36°C в атмосфері, збагаченій CO₂ до 5 %, в кожную чашку Петрі додавали по 2 мл поживного середовища. Нейрони культивували в інкубаторі два тижні при 36°C в атмосфері, збагаченій CO₂ до 5 %. З метою пригнічення

проліферації гліальних клітин через 3 доби *in vitro* культуру обробляли фторурацилом (1 мкМ/л), (Sigma-Aldrich, США) протягом 24 год.; після цього проводили повну заміну поживного середовища. Нейрони брали до експерименту на 12–13 день культивування.

Покриття скельця полілізином та ламініном

Покривні скельця (Fisherfinest, USA) обробляли розчином спирту (96 %) протягом 24 годин, потім промивали дистильованою водою та стерилізували в жарочній шафі при 180 °C протягом 2 годин. Скельця розміщували в стерильні чашки Петрі і на кожне скельце наносили 60 мкл суміш полілізину (0,05 мг/мл) та ламініну (0,005 мг/мл). Покриті скельця, витримувались протягом 24 год при 36 °C в атмосфері, збагаченій 5 % CO₂, після цього промивались тричі розчином для виділення гіпокампу.

Обробка клітин культури гіпокампу Aβ-амілоїдом та NMDA

В експериментах клітинну *in vitro* модель ХА одержували внаслідок 24-годинної інкубації нейронів культури гіпокампу з Aβ₁₋₄₂-амілоїдом (Sigma-Aldrich, США) у кінцевій концентрації 2 мкМ. Для отримання концентрованого розчину Aβ₁₋₄₂-амілоїду (“Sigma”, США) розчиняли в DMSO і зберігали при температурі –20°C. Кінцева концентрація DMSO не перевищувала 0,5 %.

З метою моделювання ексайтотоксичності використовували NMDA (Sigma-Aldrich, США) (10 мкМ) і інкубували нейрони культури гіпокампу 24-години з ним окремо та спільно з Aβ₁₋₄₂.

Забарвлювання нейронів гіпокампу

В експериментах використовували метод подвійного забарвлювання нейронів культури гіпокампу за допомогою барвників Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США, індикатор ДНК живих та апоптотичних клітин), та пропідіуму йодиду (ПЙ, Sigma-Aldrich, США, індикатор некротичних клітин).

Контрольні, а також оброблені реагентами нейрони переносили на 10 хвилин у розчин ПЙ з кінцевою концентрацією 2 мкг/мл. Потім клітини фіксували, помістивши на 20 хвилин у 4% розчин параформальдегіду. Згодом нейрони переносили на 20 хвилин у розчин Hoechst 33258 (кінцева концентрація 1 мкг/мл). Після кожного етапу клітини двічі промивали у 2 мл фосфатного буферу. Усі маніпуляції здійснювали при кімнатній температурі. Після забарвлювання покривні скельця з клітинами фіксували на предметному склі з використанням розчину Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc., США). Зафіксовані препарати аналізували, використовуючи, конфокальний мікроскоп.

Встановлення стану клітин

Кількість живих клітин і клітин з проявами апоптозу або некрозу оцінювали за допомогою подвійного забарвлювання Hoechst 33258 і пропідіум йодид (ПЙ). Перший із зазначених барвників проникає через неушкоджені мембрани клітин і забарвлює ядерний хроматин, забезпечуючи таким чином можливість виявлення живих та апоптотично змінених клітин, хроматин яких конденсується. В живих клітинах хроматин розподілений більш рівномірніше по всьому об'єму ядра, і Hoechst 33258 в них слабо флуоресцює синьо-блакитним світлом. В апоптотично змінених клітинах інтенсивність флуоресценції Hoechst 33342 в 3–4 рази вище, ніж в нормальних клітинах (яскраве блакитне світіння, що свідчить про 57 конденсацію хроматину та фрагментацію ядер; це відбувається при індукції апоптозу). ПЙ не здатний проникати через інтактну плазматичну мембрану і забарвлює тільки ядра клітин з істотно пошкодженою плазматичною мембраною, тобто клітини, в яких відбулась некротична трансформація (червона флуоресценція).

Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія

Зафіксовані препарати вивчали з використанням конфокальної мікроскопії. Для підрахунку кількості клітин на флуоресцентних зображеннях

у дослідженнях використовували конфокальний лазерний скануючий мікроскоп FV1000-BX61WI, програмне забезпечення FluoView «Olympus» (Японія) та Image J (National Institutes of Health, США). Довжини хвиль збуджуючого лазерного випромінення становили 352/405 нм (при використанні Hoechst 33258) та 543 нм (при використанні ПЙ) відповідно. В п'яти просторово віддалених ділянках кожного препарату здійснювався підрахунок нейронів, які відрізняли від гліальних клітин за допомогою фазового контрасту. Обсяг вибірок становив від 100 до 300 клітин; в їх межах підраховували кількості живих, апоптотичних і некротичних одиниць та розраховували середні значення відносних кількостей відповідних показників.

Статистичний аналіз

Отримані числові результати обробляли методами варіаційної статистики за допомогою програми Origin 7.0 («Microcall Inc.», США). Числові дані наведені у вигляді середніх $\pm$ похибка середнього. Результати характеризувалися нормальним розподілом, міжгрупове порівняння даних виконували з використанням дисперсійного аналізу ANOVA. Якщо міжгрупові відмінності були знайдені, застосовували критерій Tukey та t-тест Стьюдента. Міжгрупові відмінності вважали статистично значимими при $P < 0,05$.

4. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ ПРОВЕДЕНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Всього було проведено три серії експериментів: контрольна група, інкубування групи клітин з βA та інкубування клітин в присутності NMDA. Після цього використовували метод подвійного забарвлювання клітин двома барвниками (Hoechst та ПЙ), та проводилось оцінювання життєздатності нейронів. Оцінювання відбувалося шляхом підрахунку нейронів за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії, порівнюючи флуоресценцію клітин за контрольних умов та після 24-год інкубації з вище зазначеними реагентами.

Фотографії флуоросесценції клітин для контрольної групи та груп що були окермо інкубовані з βA та NMDA продемонстровані на рисунку 4.1.

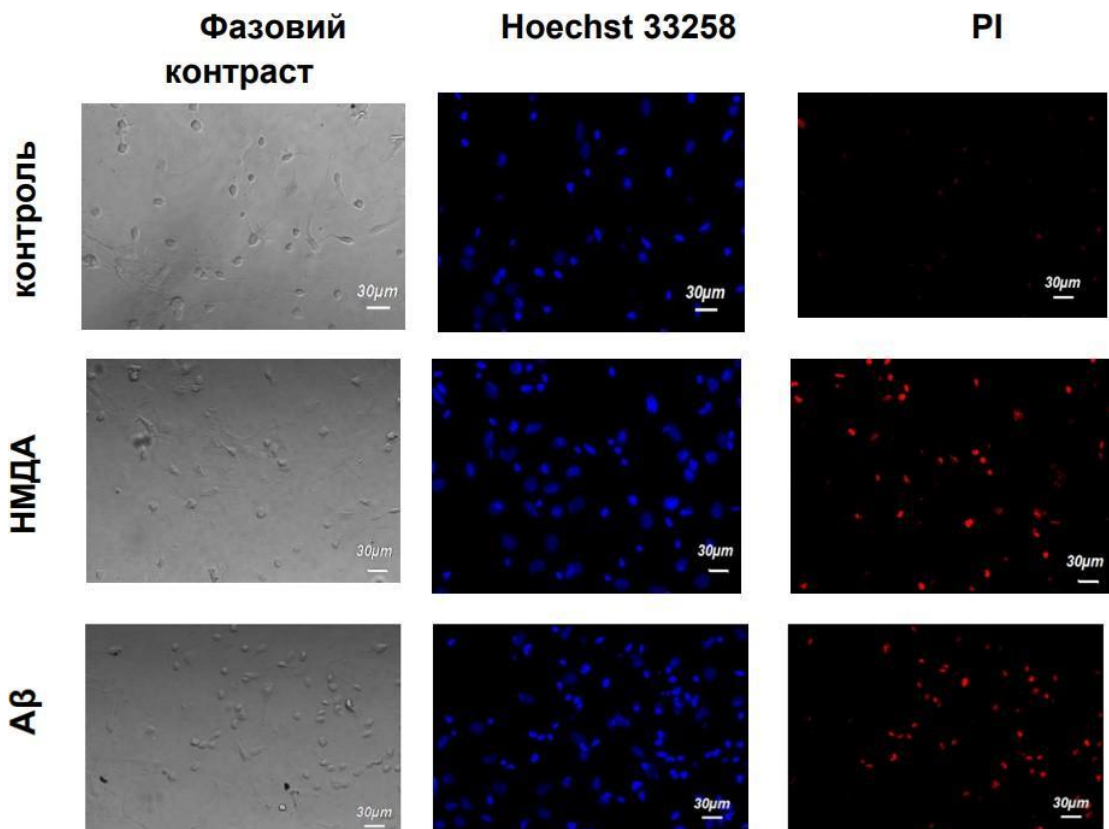


Рис. 4.1. Вплив βA та NMDA на життєздатність нейронів гіпокампу. Зображення отримані у фазово-контрастному режимі, використовуючи Hoechst 33258 для диференціації живих та апоптотичних клітин, та використовуючи пропідій йодид (PI) для виявлення некротичних клітин.

Після аналізу отриманих зображень встановлено, що у контрольних зразках культури клітин гіпокампу щурів ($n = 659$) переважна більшість клітин (в середньому $75,0 \pm 1,7 \%$) не проявляли ознаки патологічних змін (живі). Ядра таких клітин рівномірно накопичували нуклеофор Hoechst і характеризувалися слабо синьою флуоресценцією, мали чіткі контури та інтактну ядерну архітектуру. Ядра відносно невеликої частини нейронів в контрольних зразках ($10,7 \pm 1,3 \%$) із яскраво синьою флуоресценцією демонстрували фізіологічні зміни в ядерному хроматині, що є всіма ознаками апоптозу. Ядра нейронів, які забарвлювались ПЙ і давали червону флуоресценцію (тобто були в некротичному стані), склали $14,1 \pm 1,0 \%$ в середньому по групі (табл. 1).

Таблиця 1. Середні значення нормованих кількостей клітин у контрольній групі.

	Живі	Апоптоз	Некроз
Середнє значення	75,0	10,7	14,1
Похибка	1,7	1,3	1,0

У другому експерименті, культури клітин гіпокампу інкубувалися 24 години в середовищі з додаванням А β ($n = 790$). Введення в середовище інкубації амілоїду призводило до зменшення цитологічно нормальних(живих) клітини (в середньому $42,0 \pm 2,08 \%$). Нейрони ж з ознаками апоптозу в даних умовах спостерігалися приблизно в $24,5 \pm 2,29 \%$. Група клітин з некротичними змінами була також більш численною, ніж в контрольних зразках (в середньому їх кількість становила $33,5 \pm 2,45 \%$) (табл. 2).

Таблиця 2. Середні значення нормованих кількостей клітин у групі інкубованої з βA .

	Живі	Апоптоз	Некроз
Середнє значення	42,04	24,49	33,47
Похибка	2,08	2,29	2,45

В третьому експерименті, культури клітин гіпокампу інкубувалися разом NMDA (табл. 3, $n = 959$). Після інкубації зразків культури клітин гіпокампу в середовищі з додаванням $10 \mu M$ NMDA кількість живих клітин становила приблизно третину дослідженої групи. Нейрони з апоптотичними змінами в даних умовах спостерігалися у $20,6 \pm 1,11\%$ випадках. Група клітин з ознаками некрозу була більш численною, ніж в контрольних зразках приблизно на 33% ($P < 0.001$), в середньому їх кількість становила $47,5 \pm 2,21\%$. Виходячи з отриманих даних можна зробити висновок, що введення NMDA в середовище культивування індукувало інтенсивну загибель нейронів гіпокампу, у половині клітин дослідженої вибірки відзначалися виражені патологічні зміни.

Таблиця 3. Середні значення нормованих кількостей клітин у групі інкубованої з NMDA.

	Живі	Апоптоз	Некроз
Середнє значення	31,90	20,06	47,50
Похибка	2,18	1,11	2,21

Експерименти продемонстрували, що додавання амілоїду $A\beta_{1-42}$ в середовище культивування спричинювало нейротоксичний ефект та індукувало загибель нейронів гіпокампу. Такі ж дані про токсичний вплив і зниження життєздатності клітин під дією амілоїду $A\beta_{1-42}$ отримано і іншими дослідниками, наприклад, в органотиповій культурі гіпокампу [86], в

первинній культурі гіпокампу [87–91]. В цих роботах після інкубації зазначених клітин з амілоїдом спостерігали $A\beta_{1-42}$ - індуковані морфологічні зміни, такі як усадка тіл нейронів, збільшення кількості мертвих клітин та клітинних уламків.

24-годинна інкубація нейронів гіпокампа щурів з NMDA також зумовлювала більш ніж подвійне підвищення кількості клітин з ознаками апоптозу і/або некрозу у порівнянні з контролем. Це свідчило про зниження життєздатності клітин в умовах ексайтотоксичності, індукованої додаванням NMDA,. Виходячи з даних літератури, отримані результати пояснюються тим, що процеси, що лежать в основі розвитку ХА, призводять до каскаду ланцюгових клітинних подій, включаючи порушення зворотного захоплення глутамату пресинаптичними нейронами або порушення його захоплення гліальними клітинами, і, таким чином, посилене його вивільнення в синаптичну щілину. Тривала деполяризація мембрани, викликана аномальним накопиченням глутамату в синапсі, відкриває шлях для масивного входження всередину нейронів іонів кальцію, що зумовлює Ca^{2+} -індуковану ексайтотоксичність. Іони Ca^{2+} призводять до активації протеаз, фосфоліпази A2, дія яких направлена на порушення окислювального фосфорилування, мітохондріальної дисфункції, вивільнення арахідонової кислоти, що лежить в основі пошкодження і смерті нейронів шляхом апоптозу або некрозу.

Показано, що при наявності надмірної кількості глутамату, протеїнкіназа CaMK-II гіперактивується і починає неспецифічне фосфорилування нейрональних білків, порушуючи тим самим регуляцію всіх клітинних мембран з наступною зміною довготривалої потенціалізації на тривалу депресію, що призводить до погіршення пам'яті [92]. Про участь подібного роду механізмів в патогенезі ХА свідчить, наприклад, виявлення низького рівня зворотного захоплення глутамата в лобовій і скроневій корі, зниження рівня синаптофізіна (глікопротеїну мембрани синаптичних пухирців) і VGluT1 (білка синаптичних пухирців) [93–95]. Відносний надлишок глутамату може бути пов'язаний і з інтерналізацією (ендоцитозом) NMDA-рецепторів, яка

стимулюється А β [95]. Можливий і інший механізм патологічного впливу А β на NMDA-рецептори - через хронічну запальну відповідь, ініційовану в мікроглії. Процеси, що лежать в основі початку запалення, призводять до каскаду ланцюгових клітинних подій, включаючи блокування поглинання глутамату глією та посилене його вивільнення в синаптичну щілину. Запалення може також звільняти потенціал-залежні NMDA-канали від блокування іонами магнію, що призводить до збільшення потоку іонів кальцію через них, порушення мітохондріального дихання, запуску окисного стресу і в решті решт апоптозу, як вже було зазначено вище раніше [96].

ВИСНОВКИ

В даній роботі згідно з метою і поставленими завданнями було досліджено виживаємість культивованих нейронів гіпокампу в умовах інкубації з β -амілоїдом та при моделюванні ексайтотоксичності.

Встановлено, що додавання амілоїду $A\beta_{1-42}$ в середовище культивування спричинює нейротоксичний ефект та індукує загибель нейронів гіпокампу.

Моделювання умов ексайтотоксичності шляхом додавання NMDA в середовище культивування на 24 год. зумовлює зниження життєздатності нейронів, що призводить до збільшення кількості некротизованих нейронів. За кількісними і якісними показниками це зниження співставимо з окремою дією $A\beta_{1-42}$.

Отже, участь глутаматергічної ексайтотоксичності в розвитку апоптозу та некрозу нейронів гіпокампу при дії $A\beta_{1-42}$ є вірогідною. Результати наших досліджень доводять, що інгібування NMDA-рецепторів – перспективна терапевтична стратегія при ХА. Зниження активності рецепторів, які запускають каскад апоптозу, ймовірно може зменшити як швидкість розвитку нейродегенерації, так і симптоми хвороби внаслідок підвищення життєздатності тих чи інших популяцій нейронів.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health*. 2022 Feb;7(2):e105-e125.
2. Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet* (London, England), 397(10284), 1577–1590.
3. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976;2:1403
4. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1999;66:137–147
5. Fotiou D, Kaltsatou A, Tsiptsios D, Nakou M. Evaluation of the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease with neuropsychological methods. *Aging Clin. Exp. Res*. 2015;27:727–733.
6. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Curr. Neuropharmacol*. 2016;14:101–115.
7. Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. 1976;99:459–496.
8. White P, et al. Neocortical cholinergic neurons in elderly people. *Lancet*. 1977;1:668–671.
9. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet*. 1977;1:189.
10. Drugs for Alzheimer's disease: best avoided. No therapeutic advantage. *Prescrire Int*. 21, 150 (2012).
11. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*. 1991;6:487–498.

12. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the etiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 1991;12:383–388.
13. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297:353–356.
14. Quon D, et al. Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature.* 1991;352:239–241.
15. Bennett DA, et al. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology.* 2006;66:1837–1844.
16. De Meyer G, et al. Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. *Arch. Neurol.* 2010;67:949–956.
17. Fagan AM, et al. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch. Neurol.* 2007;64:343–349.
18. Gomperts SN, et al. Imaging amyloid deposition in Lewy body diseases. *Neurology.* 2008;71:903–910.
19. Cummings JL, Morstorf T, Zhong K (2014) Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Res Ther* 6, 37.
20. Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimers Dis.* 2019;67(3):779-794.
21. Golde TE. Open questions for Alzheimer's disease immunotherapy. *Alzheimer's. Res. Ther.* 2014;6:3.
22. Honig LS, et al. Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *New Engl. J. Med.* 2018;378:321–330.
23. Ostrowitzki S, et al. A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's. Res. Ther.* 2017;9:95.

24. Simunkova M, et al. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. *Arch Toxicol.* 2019;93(9):2491–513.
25. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34:185–204.
26. Matsui T, et al. Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2007;1161:116–23.
27. Ludewig S, Korte M. Novel insights into the physiological function of the APP (gene) family and its proteolytic fragments in synaptic plasticity. *Front Mol Neurosci.* 2016;9:161.
28. Chen M, et al. APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition. *Elife.* 2017;6:e20142.
29. Joseph D. Buxbaum, et al. Evidence That Tumor Necrosis Factor α -Converting Enzyme Is Involved in Regulated α -Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor. *The journal of biological chemistry* Vol. 273, No. 43.
30. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci.* 1999 Dec;14(6):419-27.
31. Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, et al. Activity-dependent isolation of the presenilin- γ -secretase complex reveals nicastrin and a γ substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):2720-2725.
32. Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1055-8.
33. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992 Apr 10;256(5054):184-5.
34. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002 Jul 19;297(5580):353-6.

35. Kirkitadze MD, Kowalska A. Molecular mechanisms initiating amyloid beta-fibril formation in Alzheimer's disease. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):417-23. Epub 2005 May 31.
36. Panza, Francesco & Lozupone, Madia & Seripa, Davide & Imbimbo, Bruno. (2019). Amyloid- β Immunotherapy for Alzheimer's Disease – Is It Now A Long Shot...?. *Annals of Neurology.* 85. 303-315. 10.1002/ana.25410.
37. Mentenopoulos G, Mpouras K. Eds. *The disease of Alzheimer.* University Studio Press, (2002).
38. Jansen WJ, Ossenkoppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FRJ, et al, the Amyloid Biomarker Study Group. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia. *JAMA* 313(19): 1924-38 (2015).
39. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid-beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science.* 1990;250:279–282.
40. Walsh DM, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 2002;416:535–539.
41. Lewis J, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science.* 2001;293:1487–1491.
42. Palop JJ, et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2007;55:697–711.
43. Lim HK, et al. Regional amyloid burden and intrinsic connectivity networks in cognitively normal elderly subjects. *Brain.* 2014;137:3327–3338.
44. Lim YY, et al. Effect of amyloid on memory and non-memory decline from preclinical to clinical Alzheimer's disease. *Brain.* 2014;137:221–231.

45. Lim YY, et al. Abeta and cognitive change: examining the preclinical and prodromal stages of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2014;10:743–751.e741.
46. Knopman DS, et al. Short-term clinical outcomes for stages of NIA-AA preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 2012;78:1576–1582.
47. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol* 2013;12:207–216.
48. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, et al; Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle (AIBL) Research Group. Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 2013;12:357–367.
49. Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Ochs, S. M., Hoffmann, N., Mitteregger, G., et al. (2010). Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLoS ONE* 5:e15477.
50. Blazquez-Llorca, L., Valero-Freitag, S., Rodrigues, E. F., Merchán-Pérez, A., Rodríguez, J. R., Dorostkar, M. M., et al. (2017). High plasticity of axonal pathology in Alzheimer's disease mouse models. *Acta Neuropathol. Commun.* 5:14.
51. Kuchibhotla, K. V., Goldman, S. T., Lattarulo, C. R., Wu, H. Y., Hyman, B. T., and Bacskai, B. J. (2008). Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* 59, 214–225.
52. Schmid, L. C., Mittag, M., Poll, S., Steffen, J., Wagner, J., Geis, H. R., et al. (2016). Dysfunction of somatostatin-positive interneurons associated with memory deficits in an Alzheimer's disease model. *Neuron* 92, 114–125.
53. Zou, C., Shi, Y., Ohli, J., Schuller, U., Dorostkar, M. M., and Herms, J. (2016). Neuroinflammation impairs adaptive structural plasticity of

- dendritic spines in a preclinical model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 131, 235–246.
54. Meyer-Luehmann, M., Spires-Jones, T. L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., de Calignon, A., Rozkalne, A., et al. (2008). Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451, 720–724.
 55. Peters, F., Salihoglu, H., Rodrigues, E., Herzog, E., Blume, T., Filser, S., et al. (2018). BACE1 inhibition more effectively suppresses initiation than the progression of beta-amyloid pathology. *Acta Neuropathol.* 135, 695–710.
 56. Bittner, T., Burgold, S., Dorostkar, M. M., Fuhrmann, M., Wegenast-Braun, B. M., Schmidt, B., et al. (2012). Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathol.* 124, 797–807.
 57. Christie, R. H., Bacskai, B. J., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Kajdasz, S. T., Webb, W. W., et al. (2001). Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer's disease observed by in vivo multiphoton microscopy. *J. Neurosci.* 21, 858–864.
 58. Condello, C., Schain, A., and Grutzendler, J. (2011). Multicolor time-stamp reveals the dynamics and toxicity of amyloid deposition. *Sci. Rep.* 1:19.
 59. Mattson MP. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromol Med.* 2003;3:65-94.
 60. Liu, J.; Chang, L. The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 2019, 13, 43.
 61. Huang, Y.J.; Lin, C.H. NMDA Neurotransmission Dysfunction in Behavioral and Psychological Symptoms of Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* 2012, 10, 272–285.

62. Lin, C.H.; Huang, Y.J. NMDA neurotransmission dysfunction in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 2014, 20, 5169–5179.
63. Lin, C.H.; Chen, Y.M. Novel Treatment for the Most Resistant Schizophrenia: Dual Activation of NMDA Receptor and Antioxidant. *Curr. Drug Targets* 2020, 21, 610–615.
64. Lin, C.H.; Yang, H.T. Precision Medicine of Sodium Benzoate for the Treatment of Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia (BPSD). *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2020, 16, 509–518.
65. Lin, C.H.; Lin, C.H. Sodium Benzoate, a D-Amino Acid Oxidase Inhibitor, Added to Clozapine for the Treatment of Schizophrenia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Biol. Psychiatry* 2018, 84, 422–432.
66. Yu T-W, Lane H-Y, Lin C-H. Novel Therapeutic Approaches for Alzheimer's Disease: An Updated Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(15):8208.
67. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391–397.
68. Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci.* 1993;13(5):2085–2104.
69. Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tymianski M. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem.* 1998;71(6):2349–2364.
70. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol.* 2001;24(1–3):107–129.
71. Aarts MM, Tymianski M. Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signaling from glutamate receptors. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(6):877–886.

72. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1988;1(8):623–634.
73. Curcio M, Salazar IL, Mele M, Canzoniero LM, Duarte CB. Calpains and neuronal damage in the ischemic brain: the swiss knife in synaptic injury. *Prog Neurobiol*. 2016;143:1–35.
74. Kristian T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke*. 1998;29(3):705–718.
75. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010;460(2):525–542.
76. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18(11):1239–1247.
77. Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM. Heart, Stroke Foundation of Ontario Centre of excellence in stroke R: toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke*. 2002;33(8):2123–2136.
78. Muir KW, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke*. 1995;26(3):503–513.
79. Bordi F, Pietra C, Ziviani L, Reggiani A. The glycine antagonist GV150526 protects somatosensory evoked potentials and reduces the infarct area in the MCAo model of focal ischemia in the rat. *Exp Neurol*. 1997;145(2 Pt 1):425–433.
80. Pearlstein RD, Beirne JP, Massey GW, Warner DS. Neuroprotective effects of NMDA receptor glycine recognition site antagonism: dependence on glycine concentration. *J Neurochem*. 1998;70(5):2012–2019.
81. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2014;115:157–188.
82. Wood PL, Hawkinson JE. N-methyl-D-aspartate antagonists for stroke and head trauma. *Expert Opin Investig Drugs*. 1997;6(4):389–397.

83. Dyker AG, Lees KR. Remacemide hydrochloride: a double-blind, placebo-controlled, safety and tolerability study in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. 1999;**30**(9):1796–1801.
84. Albers GW, Atkinson RP, Kelley RE, Rosenbaum DM. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the N-methyl-D-aspartate antagonist dextrorphan in patients with acute stroke. Dextrorphan study group. *Stroke*. 1995;**26**(2):254–258.
85. Grotta J, Clark W, Coull B, Pettigrew LC, Mackay B, Goldstein LB, Meissner I, Murphy D, LaRue L. Safety and tolerability of the glutamate antagonist CGS 19755 (Selfotel) in patients with acute ischemic stroke. Results of a phase IIa randomized trial. *Stroke*. 1995;**26**(4):602–605.
86. Arbo BD, Hoppe JB, Rodrigues K, Garcia-Segura LM, Salbego CG, Ribeiro MF. 4'-Chlorodiazepam is neuroprotective against amyloid-beta in organotypic hippocampal cultures. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017 Jul 1;**171**:281–7.
87. Calvo-Rodriguez M, Hernando-Perez E, Nuñez L, Villalobos C. Amyloid β oligomers increase ER-mitochondria Ca^{2+} cross talk in young hippocampal neurons and exacerbate aging-induced intracellular Ca^{2+} remodeling. *Front Cell Neurosci*. 2019 Jan 29;**13**.
88. Hooshmandi E, Ghasemi R, Iloun P, Moosavi M. The neuroprotective effect of agmatine against amyloid β -induced apoptosis in primary cultured hippocampal cells involving ERK, Akt/GSK-3 β , and TNF- α . *Mol Biol Rep*. 2019 Feb 1;**46**(1):489–96.
89. Hooshmandi E, Moosavi M, Katinger H, Sardab S, Ghasemi R, Maghsoudi N. CEPO (carbamylated erythropoietin)-Fc protects hippocampal cells in culture against beta amyloid-induced apoptosis: considering Akt/GSK-3 β and ERK signaling pathways. *Mol Biol Rep*. 2020 Mar 1;**47**(3):2097–108.

90. Ji ZH, Zhao H, Liu C, Yu XY. In-vitro neuroprotective effect and mechanism of 2 β -hydroxy- δ -cadinol against amyloid β -induced neuronal apoptosis. *Neuroreport*. 2020;245–50.
91. Glaser T, Arnaud Sampaio VF, Lameu C, Ulrich H. Calcium signalling: A common target in neurological disorders and neurogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2019 Nov 1;95:25–33.
92. Scott HA, Gebhardt FM, Mitrovic AD, Vandenberg RJ, Dodd PR. Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011;32(3):553.e1-553.e11.
93. Takahashi K, Foster JB, Lin CLG. Glutamate transporter EAAT2: Regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Sep 26;72(18):3489–506.
94. O'donovan SM, Sullivan CR, Mccullumsmith RE. The role of glutamate transporters in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. 2017;3:32.
95. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat Neurosci*. 2005 Aug;8(8):1051–8.
96. Wenk GL, Parsons CG, Danysz W. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: Focus on memantine. *Behav Pharmacol*. 2006 Sep;17(5–6):411–24.