

Alzheimer's disease beyond the amyloid accumulation

Melinda Urkon¹, Előd Ernő Nagy²

¹George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Targu Mures, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, ²George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Targu Mures, Department of Biochemistry and Environmental Chemistry

Abstract • Alzheimer's disease represents one of the unsolved problems of modern medicine, which assumes a significant financial burden in the research, medical, and social fields as well. Treatments intended for preventing and slowing neurodegenerative processes are the subject of a considerable amount of research and clinical trials, but the results are still insignificant regarding the clinical applicability. Initially, we believed that slow neurodegeneration can be traced back entirely to the accumulation of β -amyloid proteins with atypical structure and behavior in certain areas of the brain. This theory was constantly supplemented by the observation of intracellularly aggregating neurofibrillary tangles and the formulation of neuroinflammatory mechanisms. In this regard Alzheimer's disease-associated neuroinflammation is an immunological response to the presence of β -amyloid oligomers, which initially leads to microglial activation and inflammatory cytokine release. Over time, this process becomes chronic, extending to astrocytes, neurons, and brain microvascularization, and leading to functional impairment, which is clinically manifested in cognitive and memory deficits. The defined central role of neuroinflammation was overturned by the therapeutic failure of drugs with anti-inflammatory capacity. Subsequently, our knowledge was completed by the recognition of how oxidative stress and the altered brain insulin signaling influences metabolic processes, opening new perspectives for drug development. Despite this, new drug candidates are successively failing, as complex regulatory mechanisms have been identified that question the initial triggering role of the β -amyloid and the final impairing effect of the inflammation. The aim of this study is to summarize and present the biochemical and pathophysiological knowledge that contributed to the currently available more comprehensive picture and a more detailed understanding of the processes of Alzheimer's disease. Properly planned and executed preclinical experiments are essential to establish further clinical conclusions. By the comparison of the currently used rodent models, we tried to draw attention to the complexity of animal experiments and the importance of their multi-level (behavioral, biochemical, histological) evaluation.

Keywords • neurofibrillary tangles, neuroinflammation, insulin resistance, animal model

DOI: 10.2478/orvtudert-2022-0002

Bulletin of Medical Sciences 2022, 95(1): 11–30

Alzheimer's disease is a chronic neurodegenerative disease, the leading cause of dementia. According to data published by the World Health Organization (WHO) in 2015, dementia affects approximately 5% of the world's population over the age of 60, leaving around 50 million

people worldwide with age-related memory loss of various causes, with significant health and economic consequences [1]. The disease is characterized by a slow progression, with underlying pathophysiological processes preceding the onset of the disease by up to 20 years [2]. Diagnosis is usually made at the onset of clinical symptoms, however by this time synaptic loss and neuronal atrophy are so advanced that they severely limit the possible interventions. From this moment on, life expectancy for patients over 65 years of age is a further 4-8 years depending on comorbidities, while they need special care [3]. Considering the medical, social and economic aspects of Alzheimer's disease and the financial resources

Corresponding author

Melinda Urkon

George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy,
Science and Technology of Targu Mures
Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy
Postal address: Targu Mures, Romania
Gheorghe Marinescu st., no. 38, 540142
Email: melinda.urkon@umfst.ro

devoted to research, the care of patients is one of the major challenges of the 21st century [4].

Our current understanding of the basic pathophysiology of Alzheimer's disease is based on Hardy's revolutionary amyloid cascade theory, published in 1991, which opened up new perspectives of research [5]. At that time, the presence of insoluble amyloid beta peptide ($A\beta$, *amyloid- β*) plaques was already associated with the atrophy of brain tissue, which can be identified earliest in the hippocampus and entorhinal cortex [6,7]. This period coincides with the onset of the first symptoms, indicating mild cognitive impairment. This is followed by a decrease in volume of the temporal and frontal lobes and the development of a more characteristic set of symptoms [8]. Initially, neuronal dysfunction was thought to be due to increased $A\beta$ production in all cases, but it is now known to be a more complex pathophysiology involving both inflammatory and metabolic processes.

These tissue amyloid plaques are composed of hydrophobic $A\beta$ peptides which, due to their structure, tend to connect in a concentration-dependent manner into aggregates of different compositions: oligomers, protofibrils or mature amyloid fibers, which accumulate as extracellular plaques or intraneuronal aggregates [9]. $A\beta$ is a peptide of 36–43 amino acids, the product of proteolytic cleavage of amyloid precursor protein (APP) through the amyloidogenic pathway [9,10]. **Figure 1** illustrates possible ways of APP degradation. The most common forms in Alzheimer's disease are $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ (the latter has a higher toxicity). Post-translationally modified forms such as N-terminal truncation, modified pyroglutamate at positions 3 and 11 ($A\beta N3pE$, $A\beta N11pE$), or serine phosphorylation at positions

8 and 26 ($pSer8A\beta$, $pSer26A\beta$) have higher pathogenicity and are characteristic of the later stages of the disease. [11]. The presence of aggregates can be detected in both the pre-clinical and clinical, symptomatic stages of the disease, but this is not limited to amyloid plaques, soluble $A\beta$ fragments can also be identified and are of diagnostic significance [12].

Research into the causes of the disease has led to the conclusion that $A\beta$ accumulation may be due to increased synthesis and/or inadequate elimination of amyloid. Several genetic risk factors have been described (various ADAM10, APOE, PSEN1/2, TREM2 genotypes) that have been shown to increase the risk of developing Alzheimer's disease [13]. Some of them, such as mutations in APP or presenilins (PSEN1/2) are responsible for the development of early-onset Alzheimer's disease

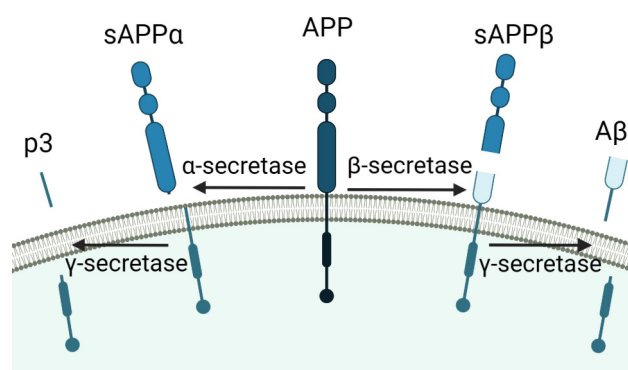


Figure 1. Proteolytic breakdown of amyloid precursor protein (APP). APP is a type I membrane protein that can be degraded by two pathways (amyloidogenic and non-amyloidogenic). APP is degraded by α -secretase into a soluble extracellular (sAPP α , *soluble amyloid precursor protein α*) and a membrane-bound carboxy-terminal fragment. The latter is further cleaved by γ -secretase to p3 and an intracellular amino acid sequence. In contrast, β - and γ -secretases are responsible for the synthesis of amyloid beta ($A\beta$, *amyloid- β*), with the release of the soluble amyloid precursor protein β (sAPP β) as a by-product, and an intracellular region that is also generated by non-amyloidogenic pathways.

(EOAD) through increased $A\beta$ synthesis [14,15]. Others are risk factors for sporadic late-onset Alzheimer's disease (LOAD). Of these, the apolipoprotein E e4 (APOE-e4) gene is considered the most important, with homozygous APOE-e4 allele carriers being 8–12 times more likely to develop the disease [16–18]. The ApoE protein, in addition to being a regulatory protein of cholesterol metabolism, plays a role in the binding and receptor-mediated endocytosis of $A\beta$ oligomers, but also indirectly affects neuronal cholesterol metabolism, APP synthesis and degradation, NMDA receptor function and synaptic plasticity [15,19]. Increased expression of the β -secretase (BACE-1, *beta-site APP cleaving enzyme 1*) responsible for cleavage of APP via the amyloidogenic pathway has also been described (**Figure 1**) [20–22]. The concentration of BACE-1 in cerebrospinal fluid has been proposed as an early biomarker for disease identification, but this has been disproved by subsequent studies [23]. Based on our current knowledge, BACE-1 concentrations correlate with the extent of neurodegeneration rather than $A\beta$ synthesis [24]. An alternative route for $A\beta$ removal is phagocytosis and lysosomal degradation by immune cells. The role of this system in the pathogenesis of the disease is discussed in the subsection on the role of neuroinflam-

mation. A specific form of A β accumulation, deposition in the cerebral vascular endothelium, is cerebral amyloid angiopathy, which is associated with acute brain complications of Alzheimer's disease [25].

The histological picture of Alzheimer's disease is characterized by the intracellular presence of neurofibrillary tangles (NFTs) in addition to amyloid plaques. These tangles are the result of inappropriate posttranslational modification of the Tau protein, that regulates microtubule function [26]. Although it was previously thought that only hyperphosphorylation of Tau causes its aggregation, it is now known that ubiquitination, acetylation and methylation all occur, although this transformation pattern is highly heterogeneous [27]. The protein encoded by the microtubule-associated protein Tau (MAPT) gene is a cytoskeletal phosphoprotein whose role is to help microtubule assembly and stabilization through its interaction with tubulin [28]. In the "hyperphosphorylated" state, Tau has low solubility and tends to organize into functionally inactive oligomers, paired helical fragments and bundles. These aggregates, resistant to enzymatic hydrolysis, may also be the result of genetic modification, but this mechanism is not as typical as in the case of A β [29,30]. Intraneuronal accumulation of NFT exerts neurotoxic effects by damaging the cytoskeleton and inhibiting axonal transport [31]. Like A β , NFT is observed in progressively increasing amounts in brain tissue as the disease progresses. Both total Tau and phosphorylated Tau concentrations increased in the cerebrospinal fluid of patients, predicting the progression and the disease progression and correlating with the degree of cognitive decline [32,33]. Braak's classification is one of the early methods for assessing disease severity, with the presence of NFTs in specific brain regions as a marker [34].

The literature classifies Alzheimer's disease as a secondary tauopathy, so the production of NFT is a consequence of amyloid pathology. The phosphorylation and further transformation of Tau is accelerated by an A β -dependent immune response. Microglial activation leads to the development of the NLRP3 inflammasome (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) in the cell, which leads to increased activity of the enzyme caspase-1, resulting in cytokine synthesis and release [35]. Venegas et al. have comprehensively characterized the relationship between inflammasome and A β in cell culture, animal experiments and human brain tissue samples, which is illustrated in **Figure 2** [36]. They also described that NLRP3 inflammasome gene knockout

mice had lower levels of Tau hyperphosphorylation and aggregation in the hippocampus, that was associated with the expression of certain kinases (GSK-3 β : *glycogen synthase kinase-3 beta*, CaMKII- α : *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) and a lack of negative regulation of PP2A phosphatase (*protein phosphatase 2A*) [37].

Pathophysiology and biochemistry of the disease

Neuroinflammation as cause and effect in the progression of neurodegeneration

In recent years, the theory of chronic neuroinflammation has received increasing attention as a third hallmark of Alzheimer's disease, alongside the tissular presence of A β and NFT plaques. Neuroinflammation is an inflammatory response in brain tissue and/or spinal cord characterized by the release of cytokines, chemokines and reactive oxygen species. It has both positive and negative consequences, depending on the cause, the intensity and duration of the inflammation [38]. Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases are characterized by prolonged, high-intensity neuroinflammation. The way to remove toxic A β oligomers, besides their excretion into cerebrospinal fluid and blood, is their phagocytosis and enzymatic hydrolysis by microglia. Genomic association studies of late Alzheimer's disease have identified genetic risk factors that lead to functional modifications of the immune system, resulting in excessive microglial activation and proliferation [39,40]. It has become clear that the microglial cell line is an essential participant in brain inflammatory processes, with a much more complex regulatory role than previously thought. As the cell line with phagocytic function in the CNS, microglia are a fundamental participant in the innate immune response. This myeloid cell type makes up about 10% of brain tissue and through highly active phagocytosis and macropinocytosis is essential in removing dysfunctional, damaged neurons and cellular debris, including misfolded proteins [41]. Toxic A β oligomers can cause direct damage to neurons, but also lead to neuronal loss by inducing inflammation, astrogliosis and gliosis. The accumulation of microglia and astrocytes around extracellular A β and NFT has been observed, suggesting a continuous communication and reciprocal regulation between microglia, astrocytes and neurons, the mechanism of which is not yet fully elucidated.

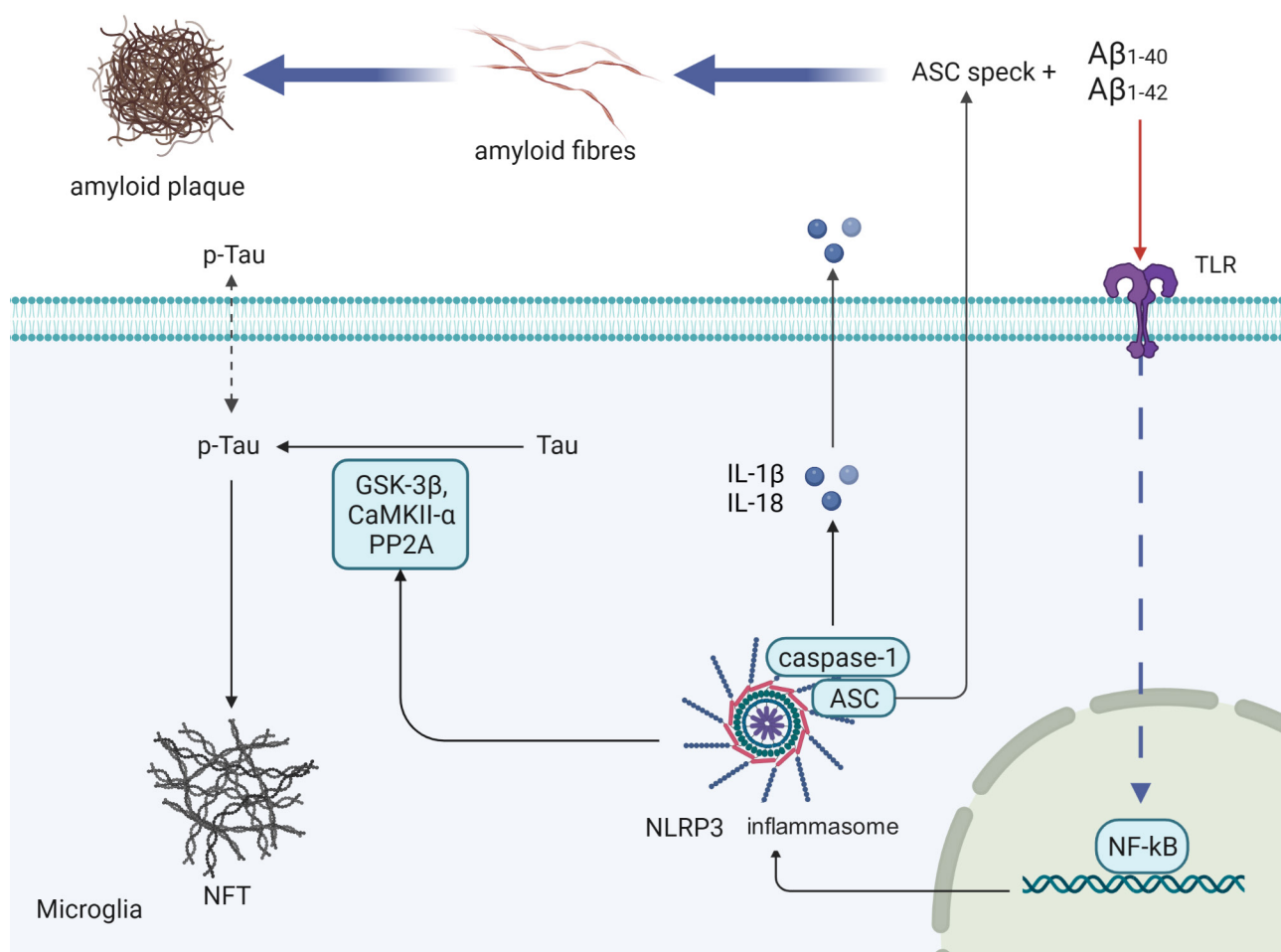


Figure 2. The role of NLRP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) inflammasome in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Certain amyloid beta ($A\beta$, amyloid- β) types induce the synthesis and assembly of NLRP3 inflammasome protein components in a receptor-mediated pathway. The caspase-1 active region of the inflammasome synthesizes cytokines (IL-1 β , IL-18) by cleavage of preproteins. As part of the NLRP3 complex, the ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) protein, is also observed in the extracellular space during microglial activation, where it promotes amyloid aggregation. The inflammasome has also been associated with a positive regulation of the activity of some kinases involved in the phosphorylation of Tau and a negative regulation of phosphatases. Thus, extracellular $A\beta$ triggers and amplifies the processes that lead to the progression of Tau pathology. (CaMKII- α : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II; GSK-3 β : glycogen synthase kinase 3 beta; IL-1 β /IL-18: interleukin 1 β /18; NF- κ B: nuclear factor- κ B; NFT: neurofibrillary tangles; PP2A: protein phosphatase 2A; p-Tau: phosphorylated Tau; TLR: Toll-like receptors)

Chemokine and integrin receptors regulate the migration and localization of microglia in the CNS, while pro- and anti-inflammatory cytokines modulate their phagocytic capacity. Extracellular $A\beta$ is identified by binding to danger associated molecular pattern receptors (DAMPs) including CD36, CD14, CD47 and Toll-like receptors 2, 4, 6 and 9 (TLR) [42]. This receptor-mediated interaction results in a coordinated response through the induction of several signaling pathways aimed at removing the threat molecule. This primarily requires the function of

the nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway, which mediates the synthesis of protein components (cytokine precursors, enzyme complexes) essential for the inflammatory process [43]. NLRP3 inflammasome and increased caspase-1 activity have been shown to be part of the neuroinflammatory process [44,45]. Co-activation of CD36, TLR4 or TLR6 receptors in this manner results in the synthesis, proteolytic activation and extracellular release of pro-inflammatory cytokines (TNF α : tumor necrosis factor α , and IL-1 β : interleukin 1 β) [46]. The

presence of tissue cytokines induces further transcriptional modifications in microglia and astrocytes through p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK) [47,48]. It increases NF- κ B-dependently the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), thus increasing the synthesis of reactive oxygen radicals and oxidative stress on neurons [49]. The resulting nitric oxide has been attributed to several negative consequences such as inhibition of neuronal cellular respiration, induction of apoptosis and glutamate excitotoxicity [50]. iNOS is also directly involved in the nitration of A β , increasing its aggregation propensity. Under neuroinflammatory conditions, the enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2), which is responsible for prostaglandin synthesis, is also increased in expression and may be associated with the activity of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 MAPK pathways [51,52]. The apoptosis-promoting activity of the ERK pathway is mediated by the chemokine CXCL10 - chemokine receptor CXCR3 interaction, which requires the synthesis of CXCL10 by astrocytes in response to interferon γ (IFN γ) [53]. It has also been described that interleukin-6 (IL-6) by its specific receptor (IL-6 R α) enhances APP transcription and metabolism, and the hyperphosphorylation of several Tau epitopes by increasing the activity of the STAT3/Cdk5 signaling pathway [54,55]. In addition to the synthesis of inflammatory cytokines and reactive oxygen radicals described above, pathological prolonged activation of microglia is also characterized by altered patterns of cell surface antigens and complement receptors.

The theory of functional polarization of macrophages is also applied by some authors to microglia. This approach assumes the existence of at least two distinct states of macrophages: while the M1 state is characterized by the secretion of pro-inflammatory cytokines and iNOS, the M2 state is characterized by increased expression of arginase-2 (ARG2, arginase 2) and release of growth factors [56,57]. However, subsequent transcriptome studies have shown that in the context of neurodegenerative diseases, microglia simultaneously express neurotoxic and neuroprotective factors [58]. The early recognition of the disease and the differentiation of Alzheimer's disease from dementias of other origins or age-related memory decline justify the identification of relevant biochemical markers. In their meta-analysis, Lai et al. investigated the use of those peripheral inflammatory mediators, which are the most frequently cited in the literature, as specific markers of Alzheimer's disease [59].

As a result, not only the inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-18, IFN γ), but also α 1-antichymotrypsin, C-reactive protein (CRP), soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2 (sTNFR1/2), epidermal growth factor (EGF) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) were also significantly elevated in Alzheimer's disease patients. In contrast, there was no change in the concentration of anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β).

Astrocytes are also involved in the process of neuroinflammation, amplifying the neurotoxic effects of microgliosis. When inactive, the astrocyte cell line is able to promote neuron survival and growth, synapse formation and function, but also plays a role in the clearance of synapses and myelin remnants. The mediators secreted by activated microglia (IL-1 α , TNF α , complement factor C1q and especially IL-23) induce polarization of astrocytes, whereby their phagocytic and neurodegenerative function is promoted. Liddel et al. showed that in Alzheimer's disease patients, almost 60% of the astrocyte population in the prefrontal cortex was C3 complement factor positive, suggesting that astrocytes are highly activated in CNS regions affected by the neurodegenerative process and are key to disease progression [60]. According to Lee et al. the release of acidic fibroblast growth factor (FGF) by previously activated astrocytes enhances the neurotoxic function of microglia [61]. In addition, the microglia-astrocyte interaction is confirmed by the release of ApoE-containing lipoprotein particles by astrocytes, which play a role in the uptake of microglial A β [62].

While soluble A β peptides are easily removed by the microglia, low solubility A β aggregates result in prolonged immune activity and chronic inflammation, which, through the mechanisms described above, contributes to synaptic dysfunction and neuronal loss. In addition to these direct damaging mechanisms, several factors involved in neuroinflammation indirectly promote the synthesis and aggregation of A β and the loss of function and organization of Tau into NFT. TNF α and IL-1 β enhance β -secretase gene expression and BACE-1 protein enzymatic activity [63]. The ASC helper protein of the NLRP3 inflammasome forms extracellular foci for A β aggregation [35], but hyperphosphorylation and post-translational modification of Tau are also prominent during chronic inflammation (see Figure 2) [64]. These are some of the mechanisms that may maintain a positive *feed-forward* loop in the pathogenesis of Alzheimer's disease as part of the inflammatory response of brain tissue. Some of these mechanisms are illustrated in **Figure 3**.

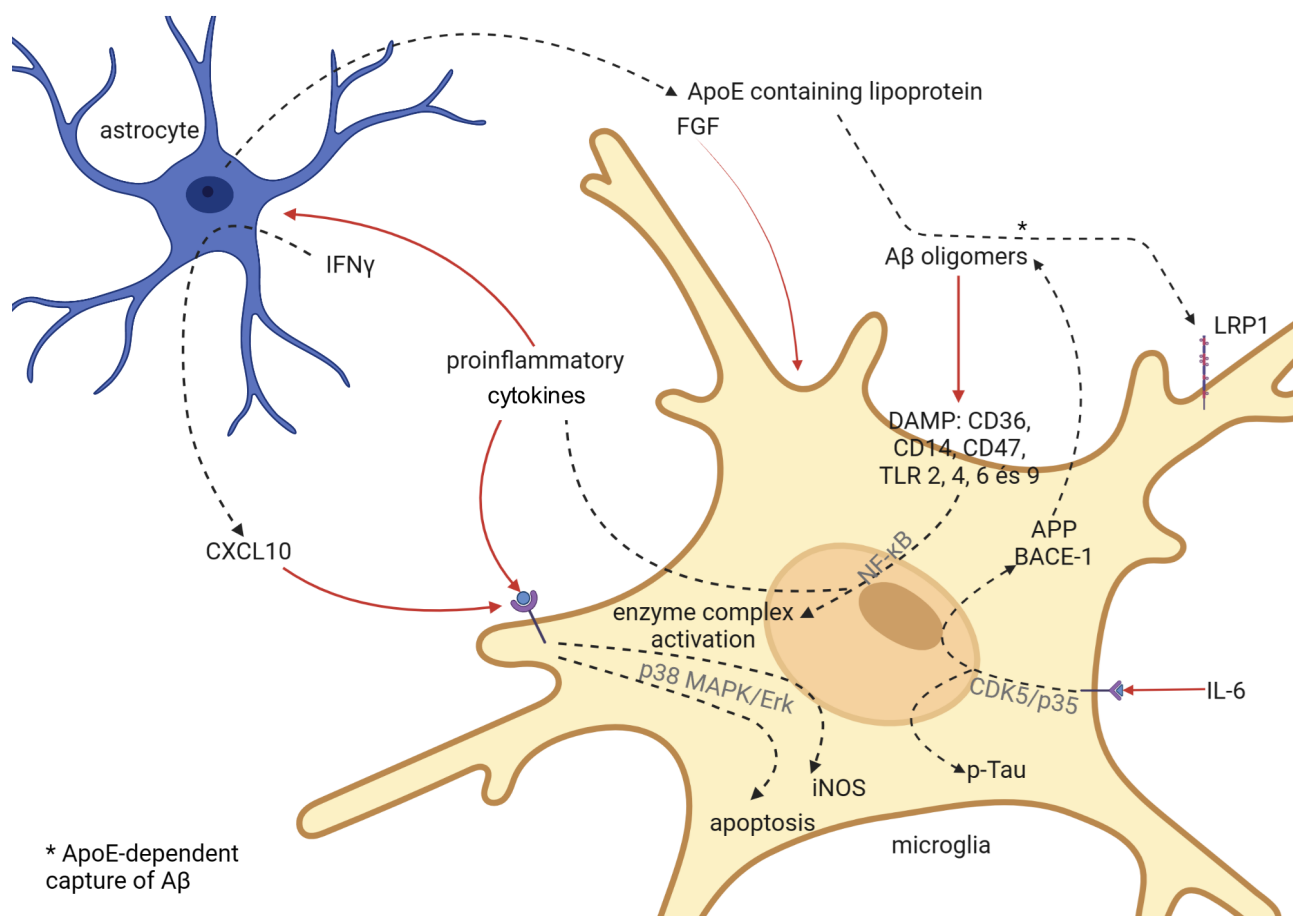


Figure 3. Mechanisms of microglia regulation in neuroinflammatory conditions. The figure shows the main possibilities for astrocyte-microglial communication with cytokines, chemokines and growth factors to enhance the efficiency of the immune response. The concomitant activation of the illustrated intracellular signaling pathways results in *feed-forward* loops, sustaining the inflammatory response, and triggering neurotoxicity-enhancing functions. (Aβ: amyloid-β; ApoE: apolipoprotein E; APP: amyloid precursor protein; BACE-1: beta-site APP cleaving enzyme 1; CDK5: cyclin-dependent kinase 5; CXCL10: C-X-C motif chemokine ligand 10; DAMP: danger associated molecular pattern; ERK: extracellular signal-regulated kinase; FGF: fibroblast growth factor; IFNγ: interferon γ; IL-6: interleukin 1β/18; iNOS: inducible nitric oxide synthase; NF-κB: nuclear factor-κB; p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinases; p-Tau: phosphorylated Tau; TLR: Toll-like receptor)

The effect of insulin resistance on neuronal function

The growing body of clinical and experimental evidence, as illustrated above, points to a highly complex pathogenesis, with recent findings suggesting that brain carbohydrate metabolism is also disturbed [65,66]. Positron emission tomography (PET) scans have shown that the rate of glucose metabolism decreases with time as microglial activation progresses in the affected areas [67]. Although the decrease in glycolysis tends to correlate with the degree of oxidative stress and neurodegeneration, these observations have led to the recognition of the role of insulin. In addition to its function in regulating systemic metabolism, insulin is mainly a neuromodulator in the central nervous system, influencing neuronal function

[68]. A reduction in the number of insulin receptors and impairment of the signaling pathway responsible for insulin action in neurons have been observed in Alzheimer's disease patients, a condition termed brain insulin resistance [69,70]. Activation of the insulin receptor (IR) by its tyrosine kinase activity results in tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate molecule (IRS), which triggers the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt kinase signaling pathway [71]. This mechanism is an important element in the regulation of protein synthesis, proliferation and apoptosis through mTOR complex 1 (mTORC1, *mammalian target of rapamycin complex 1*) among others. mTORC1 plays a role in maintaining a balance between protein synthesis and autophagy, which

in Alzheimer's disease is tilted in favor of the latter [72]. The neuroprotective effect of insulin seems to be confirmed by studies showing that acute, but especially prolonged intranasal insulin administration improves cognitive performance in patients with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and memory impairment associated with Parkinson's disease [73-75].

Although there has been a lot of research exploring the links between type 2 diabetes and Alzheimer's disease, our current knowledge is that brain insulin resistance can develop independently of peripheral sensitivity and plasma insulin concentrations. Its causes are mainly due to A β and Tau pathology and neuroinflammation. The presence of A β oligomers leads to impaired insulin signaling partly directly and partly through neuroinflammatory processes. The fact that TNF α reduces glucose uptake by adipocytes in the periphery and thereby induces a condition similar to insulin resistance has been described previously. TNF α induces serine phosphorylation of IRS-1 by activating c-Jun N-terminal kinase (JNK), thereby inhibiting the function of the IR complex [76]. Changes along these lines were subsequently identified in the pathogenesis of Alzheimer's disease, confirming the close link between neuroinflammation and insulin resistance [77]. In case of normal insulin sensitivity, the PI3K/Akt pathway negatively regulates GSK-3 β involved in the phosphorylation of Tau. Thus, in addition to the mechanisms discussed above, the development of insulin resistance also contributes to the accumulation of NFTs associated with Alzheimer's disease [78].

Experimental animal models to study Alzheimer's disease

Although more and more is known about the pathophysiological processes involved in the development of the disease, as described above, its therapy is still not solved. Despite extensive research in this area and attempts to intervene at all levels of the disease process with new or known drugs, 99.6% of clinical trials between 2002 and 2012 were unsuccessful, according to data published by Jeffrey Cummings in 2014 [4]. All the drugs used in clinical trials have previously been shown to be effective in animal studies. This may be due to either a lack of representative animal models or their high degree of heterogeneity. Transgenic and knockout rodent models, which induce increased APP, A β or NFT synthesis, are not the

most favorable for studying late-onset Alzheimer's disease. Transgenic mouse models containing mutations in APP and/or PSEN1 are widely used and are characterized by increased tissue expression of A β ₁₋₄₂, amyloid plaques and early onset of cognitive impairment [79]. Indeed, in this case, neurological features of the disease develop at 2-4 months of age, but these do not fully coincide with the pathological processes typical of multifactorial ageing. Nevertheless, the importance of genetic models is considerable, as they allow discrete processes and mechanisms to be well studied, but the results are limited when drug efficacy is investigated.

Interventional animal models are common in the study of Alzheimer's disease, which induce biochemical and tissular changes, mainly neuroinflammation and consequent neurodegeneration, by introducing chemicals into specific brain regions. The ideal animal model should represent the causes, lesions, and symptoms in a chronological order similar to the actual disease, which has not been fully achieved yet.

Alzheimer's disease caused by A β

Both the amyloid hypothesis and the identification of risk factors for EOAD suggest that A β oligomers play an important role in initiating and maintaining disease processes. Several studies have shown that high levels of recombinant A β ₁₋₄₂ oligomers exert toxic effects, leading to neuronal dysfunction and synaptic loss, thus providing an alternative to transgenic modifications [80,81]. Direct infusion of the A β ₁₋₄₂ oligomer into the brains of wild-type mice provides an *in vivo* model that reproduces neurodegeneration specific to each brain target area, in contrast to transgenic animal models displaying increased A β synthesis [82]. One week after treatment, a 20-50% reduction in the number of hippocampal cholinergic neurons was observed [82]. The major shortcoming of the model is that no tauopathy and insulin signaling dysfunction characteristic of late onset Alzheimer's disease (LOAD) is observed after induction.

Lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation

One of the most widely used models of Alzheimer's disease is LPS-induced neuroinflammation, which has been developed and used for more than 20 years and represents a fundamental method for both *in vivo* and *in vitro* experiments [83,84]. LPS, which plays the role of an endotoxin in the bacterial cell membrane, may have a variable composition due to its nature. These endo-

toxins have an antigenic potency similar to A β and bind to TLR4 receptors, among others, triggering microglial activation and the subsequent signaling cascades inducing rapid protein transcription and the production of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12, p40 and TNF α), chemokines (CCL2, CCL5 and CXCL8), complement system proteins (C3, C3a and C5a receptors), but also anti-inflammatory cytokines (IL-10) and growth factors (TGF- β) [85].

Chronic administration of LPS is possible both intracerebroventricularly (icv.) and systemically, with the development of cognitive impairment similar to the complex symptomatology of Alzheimer's disease [86]. However, it has been observed that the proportion of inflammatory cytokines released varies with the age of the experimental animals and the duration of LPS administration, limiting the conclusions based on biochemical mediators [87]. Therefore, for reliable experimental results localized in relevant brain areas (hippocampus and entorhinal cortex), low-dose continuous infusion of LPS into the fourth ventricle is recommended [88]. Taking this into account, the most significant shortcoming of LPS-induced neuroinflammation is that, although increased synthesis and aggregation of A β and hyperphosphorylation of Tau are observed in transgenic animals, these fundamental pathophysiological changes are not induced in wild-type animals [89].

Streptozotocin (STZ)-induced neuroinflammation

STZ has a glucosamine-nitrosourea structure, and is a substrate of glucose transporter 2 (GLUT2) and therefore selectively damages pancreatic β -cells when administered peripherally. Its administration via this route is a classical method of experimental induction of diabetes [90]. Its central administration was developed after the recognition of the importance of insulin resistance in Alzheimer's disease. Although some behavioral changes and frontal and hippocampal neurodegeneration can be observed after intravenous administration (probably as a consequence of diabetes), the lack of blood-brain barrier crossing of the molecule requires intracerebral administration to induce Alzheimer's disease. Immunohistochemical studies have confirmed that administration of low doses of STZ (1 mg/kg bw) induces extensive and rapid neuroinflammation (after only one week) in mice, characterized by high astroglial and microglial activation, particularly in the hippocampus [91,92]. The advantage of the model is that phosphorylation of Tau protein

and deposition of A β can be observed 6-12 weeks after induction, although these lesions are likely to be due to the cyto- and neurotoxic effects of STZ (reactive oxygen radicals and oxidative stress generated by DNA damage) [93]. The applicability of this method is limited by the fact that induction is associated with a particularly high mortality rate, which can be reduced by reducing and/or fractionating the administered dose and by controlling the rate of administration.

Conclusions

Even the most promising drug candidates, such as anti-A β immunotherapies targeting amyloid synthesis and deposition (solanezumab, gantenerumab), very often prove to be ineffective in clinical trials, despite their theoretical and preclinical efficacy. The reasons for this can be approached from several angles, but no concrete solution to the problem is offered.

On the one hand, there are the general limitations of preclinical studies. In any disease, we cannot ignore biochemical and functional differences between species, which often lead to failure to produce the expected effects or to unexpected toxicities. The models presented above also confirm that it is extremely difficult to model CNS disease processes whose complexity has not been fully explored by decades of research. Another Alzheimer's disease-specific challenge is to reliably assess behavioral aspects of rodents. Behavioral tests are available to quantify exploration and memory skills, but their reliability and reproducibility is always questionable.

On the other hand, the transferability of results to human trials is also made more difficult by the fact that, in many cases, partial results are sufficient in view of the high demand for therapeutic options. Numerous examples have already shown that it is not sufficient for a drug candidate molecule to reduce neuroinflammation but not to affect the accumulation of amyloid aggregates or to inhibit the formation of neurofibrillary tangles but not to affect insulin sensitivity. These compounds may be effective at the level of a specific disease process but have no clinically relevant beneficial effect in human studies.

Finally, the time of treatment initiation and treatment duration are important. As there are currently no reliable markers, formal recommendations and screening methodology for early diagnosis of Alzheimer's disease, we can only intervene with medication in advanced stages of

the disease (after the onset of symptoms). In contrast, in many preclinical studies, treatment is started at the same time as induction or within a short time. In this case, the preventive potential of treatment is considerably higher than in human cases with advanced neurodegeneration.

In this paper, we have tried to highlight the reasons behind the high failure rate of drug discovery by presenting the pathomechanisms of Alzheimer's disease and some available animal models. As described above, the complexity of the disease process makes the design and evaluation of preclinical studies more difficult than usual. The use of complex models and the design of studies covering inflammatory, metabolic and neurodegenerative markers as well as behavioral aspects are therefore justified.

References

- World Health Organization. Risk reduction of cognitive decline and dementia: WHO guidelines. In Geneva; 2019.
- Gordon BA, Blazey TM, Su Y, Hari-Raj A, Dincer A, Flores S, et al. Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Lancet Neurol*. 2018;17(3):241-50.
- Tom SE, Hubbard RA, Crane PK, Haneuse SJ, Bowen J, McCormick WC, et al. Characterization of dementia and Alzheimer's disease in an elderly population: updated incidence and life expectancy with and without dementia. *Am J Public Health*. 2015;105(2):408-13.
- Cummings JL, morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *alzheimers Res Ther*. 2014;6(4):37.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256(5054):184-5.
- Duara R, Loewenstein DA, Potter E, Appel J, Greig MT, Urs R, et al. Medial temporal lobe atrophy on MRI scans and the diagnosis of Alzheimer disease. *Neurology*. 2008;71(24):1986-92.
- Chen MK, Mecca AP, Naganawa M, Finnema SJ, Toyonaga T, Lin SF, et al. Assessing Synaptic Density in Alzheimer Disease with Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Positron Emission Tomographic Imaging. *JAMA Neurol*. 2018;75(10):1215-24.
- McDonald CR, McEvoy LK, Gharapetian L, Fennema-Notestine C, Hagler Jr DJ, Holland D, et al. Regional rates of neocortical atrophy from normal aging to early Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73(6):457-65.
- Sheppard O, Coleman M. Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Brisbane: Exon Publications; 2020. p. 1-22.
- Rosenberg RN, Lambrecht-Washington D, Yu G, Xia W. Genomics of Alzheimer's disease: a review *JAMA Neurol*. 2016;73(7):867-74.
- Thal DR, Walter J, Saido TC, Fändrich M. Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *acta Neuropathol*. 2015;129(2):167-82.
- Perneczky R, Guo LH, Kagerbauer SM, Werle L, Kurz A, Martin J, et al. Soluble amyloid precursor protein β as blood-based biomarker of Alzheimer's disease. *transl Psychiatry*. 2013;3(2):e227.
- Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *biol Psychiatry*. 2015;77(1):43-51.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin I variants elevate a β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 1996;17(5):1005-13.
- Cacace R, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's Dement*. 2016;12(6):733-48.
- Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(3):a006312.
- Loy CT, Schofield PR, Turner AM, Kwok JBJ. Genetics of dementia. *Lancet*. 2014;383(9919):828-40.
- Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. APOE and Alzheimer's Disease: Advances in Genetics, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Lancet Neurol*. 2021;20(1):68-80.
- Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med*. 2011;3(89):89ra57.
- Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease *Ann Neurol*. 2002;51(6):783-6.
- Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang XL, et al. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med*. 2003;9(1):3-4.
- Kandalepas PC, Sadleir KR, Eimer WA, Zhao J, Nicholson DA, Vassar R. The Alzheimer's β -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *acta Neuropathol*. 2013;126(3):329-52.
- Barão S, Moechars D, Lichtenthaler SE, De Strooper B. BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *trends Neurosci*. 2016;39(3):158-69.
- Barao S, Zhou L, Adamczuk K, Vanhoutvin T, Leuven F, Demedts D, et al. BACE1 Levels Correlate with Phospho-Tau Levels in Human Cerebrospinal Fluid. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(7):671-8.
- Cadavid D, Mena H, Koeller K, Frommelt RA. Cerebral Beta Amyloid Angiopathy Is a Risk Factor for Cerebral Ischemic Infarction: A Case Control Study in Human Brain Biopsies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(9):768-73.
- Wegmann S, Biernat J, Mandelkow E. A current view on tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2021;69:131-8.
- Wesseling H, Mair W, Kumar M, Schlaffner CN, Tang S, Beerepoot P, et al. Tau PTM Profiles Identify Patient Heterogeneity and Stages of Alzheimer's Disease. 2020 *Cell*. 183(6):1699-713.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer's Disease and Related Tauopathies. *curr Alzheimer Res*. 2010;7(8):656-64.
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*. 2009;15(3):112-9.

30. Guillozet-Bongaarts AL, Cahill ME, Cryns VL, Reynolds MR, Berry RW, Binder LI. pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: in vitro evidence and implications for tangle formation in vivo. *J Neurochem*. 2006;97(4):1005-14.
31. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF. Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *Science*. 2008;319(5866):1086–9.
32. Fagan AM, Xiong C, Jasielec MS, Bateman RJ, Goate AM, Benzinger TLS, et al. Longitudinal change in CSF biomarkers in autosomal dominant Alzheimer's disease. *sci Transl Med*. 2014;6(226):226ra30.
33. Toledo JB, Xie SX, Trojanowski JQ, Shaw LM. longitudinal change in CSF tau and A β biomarkers for up to 48 months in ADNI. *acta Neuropathol*. 2013;126(5):659-70.
34. Braak H, Braak E. Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *neurobiol Aging*. 1995;16(3):271-8.
35. Heneka MT, McManus RM, Latz E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(10):610-21.
36. Venegas C, Kumar S, Franklin BS, Dierkes T, Brinkschulte R, Tejera D, et al. Microglia-derived ASC specks crossseed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature*. 2017;552(7685):355-61.
37. Ising C, Venegas C, Zhang S, Scheiblich H, Schmidt S V, Vieira-Saecker A, et al. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *nature*. 2019;575(7784):669.
38. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016;139(Suppl 2):136-53.
39. Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. the role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *immunol Cell Biol*. 2020;98(1):28-41.
40. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *annu Rev Immunol*. 2017;26(35):441-68.
41. Sarlus H, Heneka MT. microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest*. 2017;127(9):3240.
42. Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol*. 2015;16(3):229-36.
43. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, Van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*. 2010;11(2):155-61.
44. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):397-411.
45. Youm YH, Grant RW, McCabe LR, Albarado DC, Nguyen KY, Ravussin A, et al. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab*. 2013;18(4):519-32.
46. El Khoury JB, Moore KJ, Means TK, Leung J, Terada K, Toft M, et al. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med*. 2003;197(12):1657–66.
47. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury JB, Landreth G, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *lancet Neurol*. 2015;14(4):388-405.
48. Kheiri G, Dolatshahi M, Rahmani F, Rezaei N. Role of p38/ MAPKs in Alzheimer's disease: implications for amyloid beta toxicity targeted therapy. *Rev Neurosci*. 2018;30(1):9-30.
49. Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, et al. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 1996;184(4):1425-33.
50. Dawson TM, Dawson VL. Nitric Oxide Signaling in Neurodegeneration and Cell Death. *Adv Pharmacol*. 2018;82:57-83.
51. Jang JH, Surh YJ. Beta-amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase-NF-kappaB signaling pathway. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(12):1604-13.
52. Guan PP, Wang P. Integrated communications between cyclooxygenase-2 and Alzheimer's disease. *fASEB J*. 2019;33(1):13-33.
53. Koper OM, Kaminska J, Sawicki K, Kemona H. CXCL9, CXCL10, CXCL11, and their receptor (CXCR3) in neuroinflammation and neurodegeneration. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27(6):849-56.
54. Wilkaniec A, Gassowska-Dobrowolska M, Strawski M, Adamczyk A, Czapski GA. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 affects early neuroinflammatory signalling in murine model of amyloid beta toxicity. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):1.
55. Quintanilla RA, Orellana DI, González-Billault C, Maccioni RB. interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res*. 2004;295(1):245-57.
56. Gordon S. Alternative activation of macrophages *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
57. Colton CA: Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009;4(4):399-418.
58. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*. 2016;19(8):987-91.
59. Lai KSP, Liu CS, Rau A, Lanctôt KL, Köhler CA, Pakosh M, et al. Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(10):876-82.
60. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-7.
61. Lee M, Kang Y, Suk K, Schwab C, Yu S, McGeer PL. Acidic fibroblast growth factor (FGF) potentiates glial-mediated neurotoxicity by activating FGFR2 IIIb protein. *J Biol Chem*. 2011;286(48):41230-45.
62. Terwel D, Steffensen KR, Verghese PB, Kummer MP, Gustafsson JÅ, Holtzman DM, et al. Critical Role of Astroglial Apolipoprotein E and Liver X Receptor- α Expression for Microglial A β Phagocytosis. *J Neurosci*. 2011;31(19):7049-59.
63. Sastre M, Dewachter I, Landreth GE, Willson TM, Klockgether T, Van Leuven F, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J Neurosci*. 2003;23(30):9796-804.
64. Didonna A. tau at the interface between neurodegeneration and neuroinflammation. *genes Immun*. 2020;21(5):288-300.
65. Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1316-38.
66. Hiltunen M, Khandelwal VKM, Yaluri N, Tiilikainen T, Tusa M, Koivisto H, et al. Contribution of genetic and dietary insulin resistance to Alzheimer phenotype in APP/PS1 transgenic mice. *J Cell Mol Med*. 2012;16(6):1206-22.
67. Fan Z, Okello AA, Brooks DJ, Edison P. Longitudinal influ-

- ence of microglial activation and amyloid on neuronal function in Alzheimer's disease. *Brain*. 2015;138(Pt 12):3685-98.
68. Pomytkin I, Costa-Nunes JP, Kasatkin V, Veniaminova E, Demchenko A, Lyundup A, et al. Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neurosci Ther*. 2018;24(9):763-74.
69. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease-is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*. 2005;7(1):63-80.
70. Folch J, Ettcheto M, Busquets O, Sánchez-López E, Castro-Torres RD, Verdager E, et al. The Implication of the Brain Insulin Receptor in Late Onset Alzheimer's Disease Dementia. *Pharm* 2018, Vol 11, Page 11. 2018;11(1):11.
71. Gabbouj S, Ryhänen S, Marttinen M, Wittrahm R, Takalo M, Kempainen S, et al. Altered Insulin Signaling in Alzheimer's Disease Brain - Special Emphasis on PI3K-Akt Pathway. *Front Neurosci*. 2019;13:629.
72. Querfurth H, Lee HK. mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration. *mol Neurodegener*. 2021;16(1):44.
73. Reger MA, Watson GS, Frey WH, Baker LD, Cholerton B, Keeling ML, et al. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol Aging*. 2006;27(3):451-8.
74. Novak P, Maldonado DAP, Novak V. Safety and preliminary efficacy of intranasal insulin for cognitive impairment in Parkinson's disease and multiple system atrophy: a double-blind placebo-controlled pilot study. *PLoS One*. 2019;14(4):e0214364.
75. Claxton A, Baker LD, Wilkinson CW, Trittschuh EH, Chapman D, Watson GS, et al. Sex and ApoE genotype differences in treatment response to two doses of intranasal insulin in adults with mild cognitive impairment or Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2013;35(4):789-97.
76. Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, et al. Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest*. 2001;107(2):181-9.
77. Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, et al. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci*. 2009;29(28):9078-89.
78. Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, et al. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2013;12(1):289-309.
79. Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *j Alzheimer's Dis*. 2017;57(4):1171-83.
80. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(2):101-12.
81. Knowles JK, Rajadas J, Nguyen TV V, Yang T, LeMieux MC, Vander Griend L, et al. The p75 neurotrophin receptor promotes amyloid- β (1-42)-induced neuritic dystrophy in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2009;29(34):10627-37.
82. sotthibundhu A, Sykes AM, Fox B, Underwood CK, Thangnipon W, Coulson EJ. beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci*. 2008;28(15):3941-6.
83. Hauss-Wegrzyniak B, Dobrzanski P, Stoehr JD, Wenk GL. Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1998;780(2):294-303.
84. Wang LM, Wu Q, Kirk RA, Horn KP, Salem AHE, Hoffman JM, et al. Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid- β and p-tau formation in the rat brain. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2018;8(2):86.
85. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(6):429-39.
86. sheppard O, Coleman MP, Durrant CS. lipopolysaccharide-induced neuroinflammation induces presynaptic disruption through a direct action on brain tissue involving microglia-derived interleukin 1 beta. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):106.
87. Bardou I, Kaercher RM, Brothers HM, Hopp SC, Royer S, Wenk GL. Age and duration of inflammatory environment differentially affect the neuroimmune response and catecholaminergic neurons in the midbrain and brainstem. *Neurobiol Aging*. 2014;35(5):1065-73.
88. Wenk GL, McGann K, Mencarelli A, Hauss-Wegrzyniak B, Del Soldato P, Fiorucci S. Mechanisms to prevent the toxicity of chronic neuroinflammation on forebrain cholinergic neurons. *Eur J Pharmacol*. 2000;402(1-2):77-85.
89. sheng J, Bora S, Xu G, Borchelt D, Price D, Koliatsos V. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2003;14(1):133-45.
90. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: a new model of diabetes mellitus. *Science*. 1976;193(4251):415-7.
91. Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai CL, Sun S, Lee MH, et al. 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):711-25.
92. Kraska A, Santin MD, Dorieux O, Joseph-Mathurin N, Bourrin E, Petit F, et al. In vivo cross-sectional characterization of cerebral alterations induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin. *PLoS One*. 2012;7(9):e46196.
93. Gáspár A, Hutka B, Ernyey AJ, Tajti BT, Varga BT, Zádori ZS, et al. Intracerebroventricularly Injected Streptozotocin Exerts Subtle effects on the Cognitive Performance of Long-Evans Rats. *Front Pharmacol*. 2021;12:662173.

Alzheimer-kór az amiloid felhalmozódáson túl

Urkon Melinda¹, Nagy Előd Ernő²

¹Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem, Farmakológia és Klinikai Gyógyszerészet Tanszék, ²Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem, Biokémia és Környezeti Kémia Tanszék

Összefoglaló • Az Alzheimer-kór terápiája a jelenkori orvoslás egyik nagy jelentőséggel bíró hiányossága, mely mind kutatási, mind orvosi és társadalmi téren jelentős anyagi terhet von maga után. A neurodegeneratív folyamatok megelőzését és lassítását célzó kezelések számos kutatás és klinikai vizsgálat tárgyát képezik, de az eredmények a klinikai alkalmazhatóság szempontjából mindeddig elhanyagolhatóak. Kezdetben úgy véltük, hogy a lassú lefolyású neurodegeneráció teljes mértékben az atipikus szerkezetű vagy viselkedésű béta-amiloid fehérjék agyszöveti felhalmozódására vezethető vissza. Ez az elmélet folyamatosan kiegészült a neurofibrillaris kötegek intracelluláris aggregátumainak felismerésével, majd a neuroinflammáció megfogalmazásával. Ennek fényében a az Alzheimer-kórral társult neuroinflammáció a béta-amiloid oligomerek jelenlétére adott immunológiai válaszreakció, mely kezdetben microglia aktivációhoz és gyulladásos citokinfelszabaduláshoz vezet. Idővel a folyamat idültté válik, astrocytákra, neuronokra és az agyi microvascularisatúra is kiterjed, működésbeli károsodáshoz vezet, mely klinikailag gondolkodási és memóriazavarokban nyilvánul meg. A neuroinflammáció egyértelmű központi szerepét megkérdőjelezte a gyulladáscsökkentő hatással rendelkező gyógyszerek terápiás sikertelensége. Ismereteink ezt követően kiegészültek annak felismerésével, hogy az oxidatív stressz és az agyi inzulin jelátvitel zavara hogyan befolyásolja a metabolikus folyamatokat, mely új távlatokat nyitott az ígéretes terápiás célpontok azonosításában. Ennek ellenére nagy számban bizonyulnak sikertelennek az újabb gyógyszerjelölt molekulák, melynek oka lehet, hogy olyan összetett szabályozási mechanizmusokat sikerült azonosítani, amelyek megkérdőjelezzik a béta-amiloid kezdeti és a gyulladás végső jelentőségét. Jelen tanulmány célja összefoglalni és bemutatni azon biokémiai és kórélettani ismereteket, amelyek az utóbbi években hozzásegítettek egy átfogóbb kép megalkotásához és az Alzheimer-kór folyamatainak részletesebb megismeréséhez. A megfelelően megtervezett és kivitelezett preklinikai kísérletek nélkülözhetetlenek a további klinikai tanulságok megállapításához. Néhány rágcslómodell összehasonlításával igyekeztünk felhívni a figyelmet az állatkísérletek összetettségére, valamint azok többszintű (viselkedéstan, biokémiai, szövettani) kiértékelésének fontosságára.

Kulcsszavak • neurofibrillaris kötegek, neuroinflammáció, inzulinrezisztencia, állatmodell

DOI: 10.2478/orvtudert-2022-0002

Bulletin of Medical Sciences 2022, 95(1): 11–30

Az Alzheimer-kór egy krónikus lefolyású neurodegeneratív betegség, a demencia vezető oka. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO-World Health Organization) által 2015-ben közzétett adatok alapján a demencia a világ 60 év feletti lakosságának hozzávetőleg 5%-át érinti, így világszerte körülbelül 50 millió ember szenved különböző eredetű időskori memóriaromlásban, jelentős egészségügyi és gazdasági következményeket vonva maga után [1]. A betegséget lassú progresszió jellemzi, az alapvető kórélettani folyamatok akár 20 évvel is megelőzhetik a betegség megnyilvánulását [2]. A diagnózis felállítása általában a klinikai tünetek megjelenésekor történik, viszont ekkorra már a szinaptikus veszteség és a neuron-sorvadás olyannyira előrehaladott, hogy súlyosan kor-

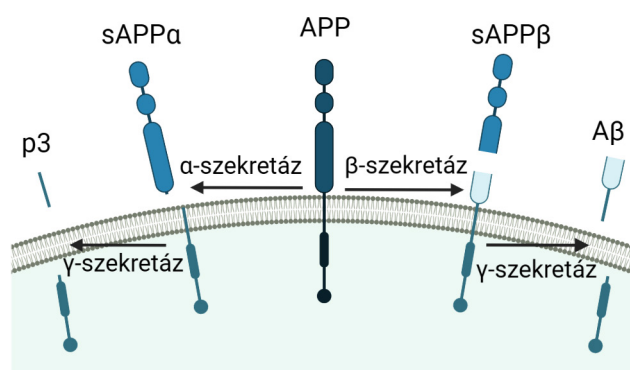
látozza a beavatkozási lehetőségeket. Ettől a pillanattól fogva, a 65 évnél idősebb betegek várható élettartama, a társbetegségek függvényében, további 4-8 év, mely időtartam nagy részében speciális gondozásra szorulnak [3]. Figyelembe véve az Alzheimer-kór orvosi, társadalmi és gazdasági vonatkozásait és a kutatásra fordított anyagi erőforrásokat, a betegek ellátása a 21. század egyik legjelentősebb kihívása [4].

Jelenlegi ismereteink az Alzheimer-kór alapvető kórfolyamatait illetően Hardy 1991-ben közzétett forradalmi amiloid kaszkád elméletén alapulnak, amely új távlatokat nyitott a kutatásban [5]. Ekkor már az oldhatatlan béta-amiloid (A β , amyloid- β) plakkok jelenlétével hozták összefüggésbe az agyszövet sorvadását, mely legkorábban

a hippocampus és entorhinalis cortex területén azonosítható [6,7]. Ez a periódus egybeesik az első tünetek megjelenésével, melyek ekkor még enyhe kognitív károsodásra utalnak. Ezt követi a temporális és frontális lebeny térfogatbeli csökkenése és egy jellegzetesebb tünetegyüttes kialakulása [8]. Kezdetben úgy vélték, a neuronális funkcióvesztés minden esetben a fokozott A β termelésre vezethető vissza, ma viszont már tudjuk, hogy ennél összetettebb fizioopatológiáról van szó, melyben egyaránt szerepet kapnak gyulladásos és metabolikus folyamatok.

Az említett szöveti amiloid plakkok olyan hidrofób A β peptidekből állnak, melyek szerkezetükből adódóan, koncentrációfüggő módon hajlamosak különböző összetételű aggregátumokká kapcsolódni: oligomerek, protofibrillumok vagy érett amiloid rostok, amelyek extracelluláris plakkok vagy intraneuronális aggregátumok formájában halmozódnak fel [9]. A A β egy 36-43 aminosavból álló peptid, az amiloid előfőhője (APP, *amyloid precursor protein*) amiloidogén úton történő proteolitikus hasításának terméke [9,10]. Az **1. ábra** az APP lebontásának lehetséges módjait szemlélteti. Az Alzheimer-kórban leggyakrabban előforduló formák a A β ₁₋₄₀ és A β ₁₋₄₂ (utóbbi toxicitása magasabb), de leírtak már magasabb patogenitású, a betegség későbbi szakaszára jellemző, poszttranszlációsan módosított változatokat is: N-terminális csonkítás, módosított piroglutamát a 3-as és 11-es pozícióban (A β N3pE, A β N11pE), vagy szerin-foszforiláció a 8-as és 26-os pozícióban (pSer8A β , pSer26A β) [11]. Az aggregátumok jelenléte a kór preklinikai és klinikai, tüneti szakaszában egyaránt kimutatható, ez azonban nem korlátozódik az amiloid plakkokra, az oldható A β fragmentumok is azonosíthatók, melyeknek diagnosztikai jelentősége van [12] as well as patients with behavioural variant frontotemporal dementia (bvFTD).

A kór okait kutatva arra a következtetésre jutottak, hogy a **A β felhalmozódás hátterében az** amiloid fokozott szintézise és/vagy elégtelen eliminációja állhat. Leírtak már több genetikai kockázati tényezőt (különböző ADAM10, APOE, PSEN1/2, TREM2 genotípusok), melyek igazoltan növelik az Alzheimer-kór kialakulásának kockázatát [13]. Néhányuk, mint az APP vagy a preszenilinek (PSEN1/2, *presenilin*) mutációja a megnövekedett A β szintézis révén a korai, genetikailag meghatározott Alzheimer-kór (EOAD, *early-onset Alzheimer's disease*) kialakulásáért felelősek [14,15] the A β 1-42(43). Mások, a szórványosan előforduló, kései Alzheimer-kór (LOAD, *late-onset Alzheimer's disease*) kockázati tényezői. Ezek közül az apolipoprotein E e4 (APOE-e4) gént



1. ábra. Az amiloid előfőhője (APP, amyloid precursor protein) proteolitikus bontása. Az APP egy I-es típusú membránfőhője, mely két úton (amiloidogén és nem amiloidogén) kerülhet lebontásra. Az α -szekretáz hatására az APP egy oldható extracelluláris (sAPP α , *soluble amyloid precursor protein α*) és egy membránhoz kötött karboxi-terminális fragmentumra bomlik. Utóbbit a γ -szekretáz hasítja tovább a p3-ra és egy intracelluláris aminosavszekvenciára. Ezzel szemben a béta-amiloid (A β , *amyloid- β*) szintéziséért a β - és γ -szekretázok felelősek, melléktermékként a béta oldható amiloid előfőhője (sAPP β , *soluble amyloid precursor protein β*) és a nem amiloidogén úton is keletkező, intracelluláris régió válik szabaddá.

tartják a legfontosabbnak, a homozigóta APOE-e4 állott birtoklók ugyanis 8-12-szer nagyobb valószínűséggel esnek a betegség áldozatául [16–18]. Ennek oka, hogy az ApoE főhője mindamelllett, hogy a koleszterin metabolizmus szabályozófőhője, szerepe van a A β oligomerek megkötésében és receptorközvetített endocytosisában, de közvetett módon befolyásolja a neuronális koleszterin metabolizmust, APP szintézist és degradációt, NMDA receptor funkciót és szinaptikus plaszticitást [15,19]. Leírtak továbbá azon β -szekretáz (BACE-1, *beta-site APP cleaving enzyme 1*) fokozott expresszióját, mely az APP amiloidogén útvonalon történő hasításáért felelős (**1. ábra**) [20–22]. Az agygerincvelői folyadék BACE-1 koncentrációját a betegség azonosításának korai biomarkerének javasolták, ezt azonban későbbi kutatások cáfolták [23]. Jelen tudásunk alapján a BACE-1 koncentráció sokkal inkább a neurodegeneráció **mértékével, mint a A β szintézisével korrelál** [24]. A A β eltávolításának alternatív útja az immunsejtek általi fagocitózis és lizoszomális lebontás. Ezen rendszer szerepét a betegség kórélettanában a neuroinflammáció szerepét tárgyaló alfejezetben részletezzük. A A β felhalmozódás sajátos formája, az agyi vasculáris endotheliumban **történő lerakódás a** cerebális amiloid angiopathia, melyet az Alzheimer-kór akut

agyi szövődményeivel hoznak összefüggésbe [25].

Az Alzheimer-kór szövettani képére az amiloid plakkok mellett a neurofibrillaris **kötegek (NFT, neurofibrillary tangles)** intracelluláris jelenléte is jellemző. Ezen kötegek a microtubulusok funkcióját szabályozó Tau fehérje nem megfelelő posztranszlációs módosításának eredményei [26]. Bár korábban úgy gondolták, hogy kizárólag a Tau hiperfoszforilációja okozza annak aggregálódását, ma már tudjuk, hogy ubiquitinatio, acetilálás és metilezés egyaránt végbemegy, bár ez az átalakulási mintázat rendkívül heterogén [27]. A microtubulusokhoz kapcsolódó Tau (MAPT, *microtubule associated protein Tau*,) gén által kódolt fehérje egy citoskeletális foszoprotein, melynek szerepe, hogy a tubulinnal való kölcsönhatása révén segítse a microtubulusok felépülését és stabilizálását [28]. A Tau „hiperfoszforilált” állapotban kis oldhatósággal rendelkezik és hajlamos funkcionálisan inaktív oligomerekké, páros spirális fragmentumokká és kötegekké szerveződni. Ezek az enzimatisz hidrolízisnek ellenálló aggregátumok szintén lehetnek genetikai módosulás eredményei, de ez a mechanizmus nem annyira jellemző, mint a A β esetében [29,30]. A NFT intraneuronális felhalmozódása a cytoskeleton **károsítása és az axonális szállítás gátlása** révén neurotoxikus hatást fejt ki [31]. Akárcsak a A β , úgy a NFT is fokozatosan növekvő mennyiségben figyelhető meg az agyszövetben a betegség előrehaladása során. Mind a teljes Tau, mind a foszforilált Tau koncentrációja növekedett a betegek agygerincvelői folyadékában, és előre jelzi a betegség kórfolyamatainak előrehaladottságát és súlyosságát, valamint korrelál a kognitív hanyatlás mértékével [32,33]. A Braak-féle besorolás az egyik korai módszer a betegség súlyosságának megállapítására, melynek markere az NFT jelenléte az egyes agyi régiókban [34].

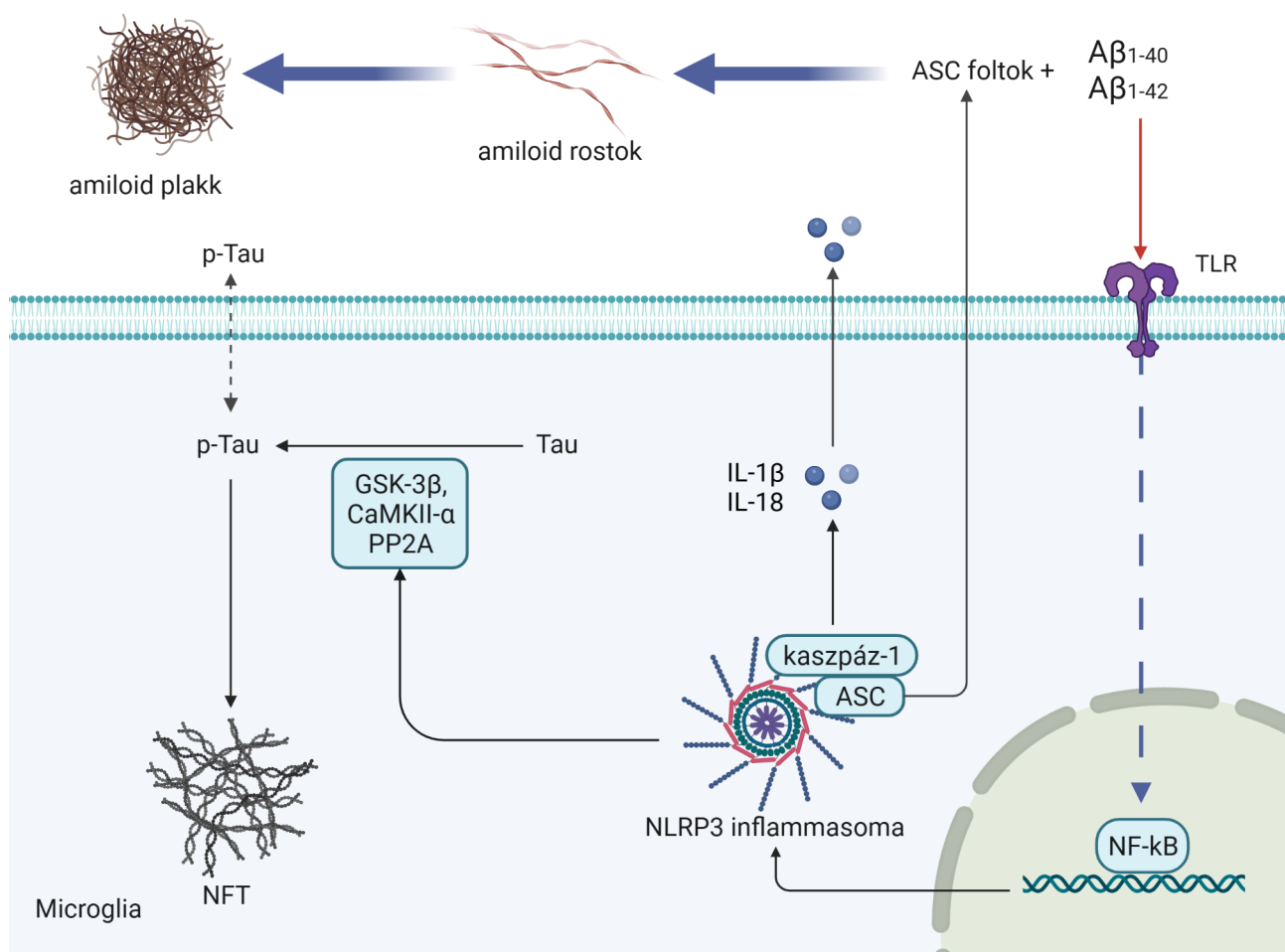
A szakirodalom az Alzheimer-kórt a másodlagos tauopathiák **közé sorolja, tehát a NFT keletkezése az amiloid patológiára** vezethető vissza, annak következménye. A Tau foszforilációját és további átalakítását a **A β -függő immunválasz gyorsítja**. Microglia aktiváció hatására a sejtben kialakul az NLRP3 inflammasoma (NACHT, LRR és PYD egységet tartalmazó fehérje, *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*), ami a kaszpáz-1 enzim megnövekedett aktivitásához, ezáltal citokinszintézishez és -felszabaduláshoz vezet [35]. Venegas és mtsai. sejt kultúrában, állatkísérletben és humán agyszövet mintákon is átfogóan jellemezték az inflammasoma és A β kapcsolatát, melyet a **2. ábra** hivatott szemléltetni [36]. Leírták továbbá, hogy az NLRP3 inflammasoma **génkiütött**

egereknél alacsonyabb szintű Tau hiperfoszforiláció és aggregáció volt megfigyelhető a hippocampusban, ami az egyes kinázok (GSK-3 β : *glycogen synthase kinase-3 beta*, CaMKII- α : *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) csökkent expressziójára és a PP2A foszfatáz (*protein phosphatase 2A*) negatív regulációjának hiányára vezethető vissza [37].

A betegség kórélettani és biokémiai háttere

Neuroinflammáció mint ok és okozat a neurodegeneráció előrehaladásában

Az elmúlt években a krónikus neuroinflammáció elmélete egyre nagyobb figyelemben részesül, mint az Alzheimer-kór harmadik ismertetőjele, a **A β és NFT** plakkok szöveti jelenléte mellett. A neuroinflammáció az agyszövetben és/vagy gerincvelőben lejátszódó gyulladásos válaszreakció, melyet citokinek, kemokinek és reaktív oxigén gyökök felszabadulása jellemez. A kiváltó ok, valamint a gyulladás erősségének és időtartamának függvényében egyaránt rendelkezik pozitív és negatív következményekkel [38]. Az Alzheimer-kórra és más neurodegeneratív betegségekre a hosszantartó, nagy intenzitású neuroinflammáció jellemző. A toxikus A β oligomerek eltávolításának módja, az agygerincvelői folyadékba és vérbe való kiválasztódásuk mellett, ezek microgliák általi fagocitózisa és enzimatisz hidrolízise. A kései Alzheimer-kór genomialis asszociációs vizsgálatai olyan genetikai kockázati tényezőket azonosítottak, amelyek az immunrendszer funkcionális módosulásaihoz vezetnek, ezáltal túlzott microglia aktivációt és proliferációt eredményeznek [39,40]. Nyilvánvalóvá vált, hogy a microglia sejt vonal nélkülözhetetlen résztvevője az agyi gyulladásos folyamatoknak, sokkal összetettebb szabályozó szereppel, mint azt korábban gondolták. A microglia, mint a központi idegrendszer szöveti fagocita funkciót betöltő sejt vonala, a veseszületett immunválasz alapvető résztvevője. Ez a myeloid sejt típus az agyszövet körülbelül 10%-át teszi ki és rendkívül aktív fagocitózis és macropinocytosis révén eltávolítja a diszfunkcionális, sérült neuronokat és sejt törmeléket, beleértve a hibás szerkezetű fehérjéket [41]. A toxikus A β oligomerek a neuronok közvetlen károsodását is okozhatják, de gyulladás, astrocytosis és gliosis indukálásával szintén az idegsejtek elvesztéséhez vezetnek. Megfigyelték a microgliák és az astrocyták felhalmozódását az extracelluláris A β



2. ábra. Az NLRP3 (NACHT, LRR és PYD egységet tartalmazó fehérje, NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) inflammasoma szerepe az Alzheimer-kór kórélettanában. Egyes béta-amiloid ($A\beta$, amyloid- β) típusok receptorközvetített úton az NLRP3 inflammasoma fehérjekomponenseinek szintézisét és összeállítását váltják ki. Az inflammasoma kaszpáz-1 aktivitású régiója az előfehérjék hasításával citokineket szintetizál (IL-1 β , IL-18). Szintén az NLRP3 komplex részét képező ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) fehérje, microglia aktiváció során az extracelluláris térben is megfigyelhető, ahol elősegíti az amiloid aggregációt. Az inflammasoma összefüggésbe hozható továbbá a Tau foszforilációjában résztvevő egyes kinázok aktivitásának pozitív irányú és foszfatázok negatív irányú szabályozásával. Ily módon az extracelluláris $A\beta$ kiváltja és felerősíti azokat a folyamatokat melyek a Tau-patológia előrehaladását eredményezik. (CaMKII- α : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II; GSK-3 β : glikogén-szintáz-kináz 3 béta, *glycogen synthase kinase-3 beta*; IL-1 β /IL-18: interleukin 1 β /18; NF- κ B: nukleáris faktor κ B, *nuclear factor- κ B*; NFT: neurofibrillaris kötegek, *neurofibrillary tangles*; PP2A: protein foszfatáz 2A, *protein phosphatase 2A*; p-Tau: foszforilált Tau; TLR: Toll-szerű receptor, *Toll-like receptors*)

és NFT körül, ami a microgliák, astrocyták és neuronok közötti folyamatos kommunikációt és kölcsönös szabályozást feltételezi, melynek mechanizmusa egyelőre nem teljesen tisztázott.

A kemokin- és integrinreceptorok szabályozzák a microglia migrációját és lokalizációját a központi idegrendszerben, míg a pro- és antiinflammatorikus citokinek modulálják ennek fagocitáló képességét. Az

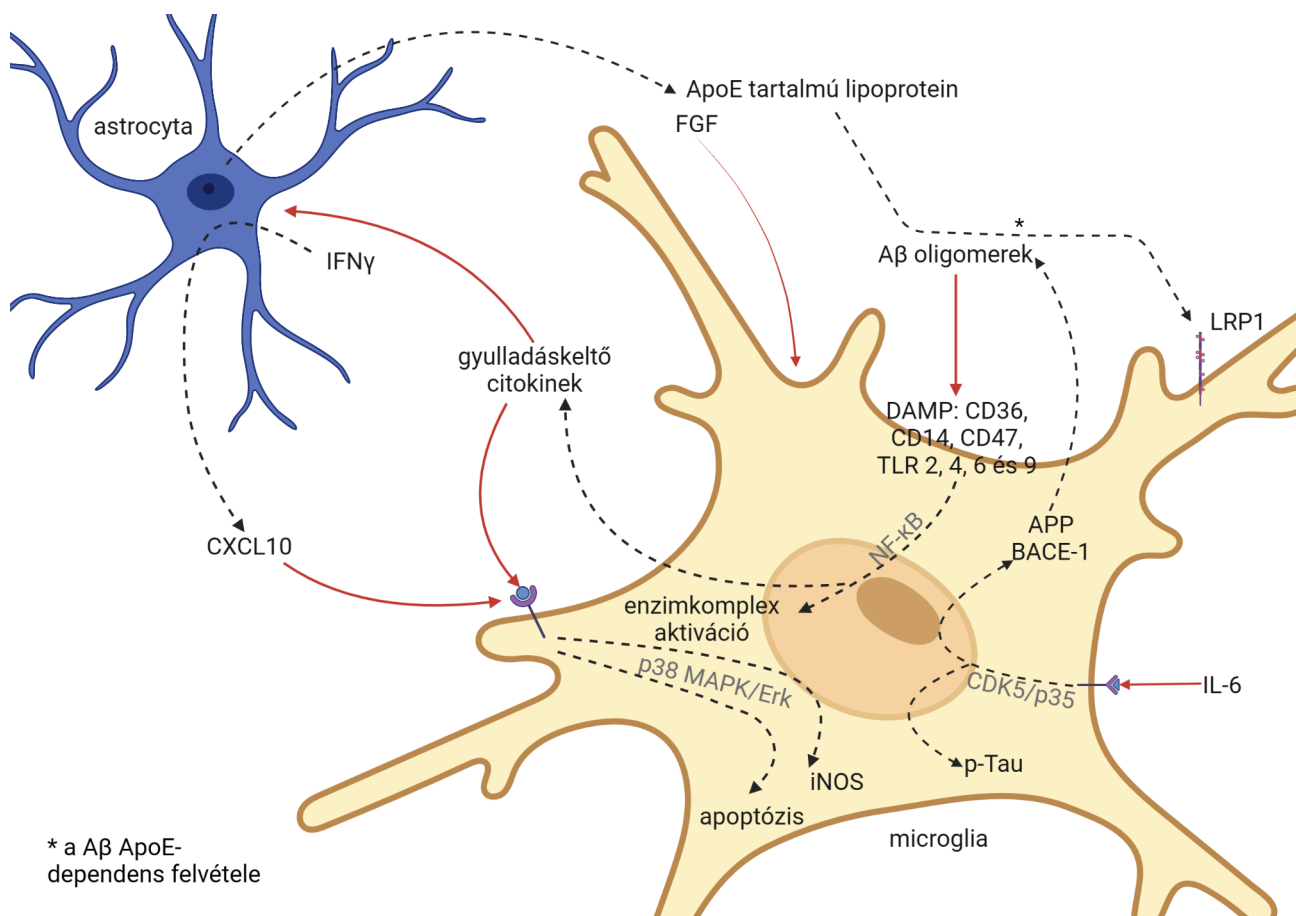
extracelluláris $A\beta$ azonosítása a veszélyhez kapcsolható molekuláris mintázat-receptorokhoz (DAMP, *danger associated molecular pattern*), köztük a CD36, CD14, CD47 és a Toll-szerű 2, 4, 6- és 9 receptorokhoz (TLR, *Toll-like receptors*) való kötődés révén történik [42]. Ez a receptor-közvetített kölcsönhatáshatás számos jelátviteli útvonal indukálásával összehangolt válaszreakciót eredményez, melynek célja a veszélyt jelentő molekula eltávo-

lítása. Ehhez elsősorban szükséges a nukleáris faktor κB (NF- κB , *nuclear factor- κB*) jelátviteli út vonal működése, mely a gyulladásos folyamathoz elengedhetetlen fehérjekomponensek (citokin előfőhőjék, enzimkomplexek) szintézisét közvetíti [43]. Az NLRP3 inflammasoma és megnővekedett kaszpáz-1 aktivitás bizonyítottan része a neuroinflammatorikus folyamatnak [44,45]. A CD36, TLR4 vagy TLR6 receptorok koaktivációja ily módon gyulladáskeltő citokinek (TNF α : tumor nekrosis faktor α , *tumor necrosis factor α* ; és IL-1 β : interleukin 1 β) szintézisét, proteolitikus aktivációját és extracelluláris felszabadulását eredményezi [46]. A szöveti citokinek jelenléte a p38 mitogén által aktivált protein kinázok (p38 MAPK: *p38 mitogen-activated protein kinases*) révén további transzkripció módosulásokat idéz elő a microgliákban és astrocytákban [47,48]. NF- κB -dependens **módon növeli az** indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) expresszióját, így növeli a reaktív oxigén gyökök szintézisét és a neuronokra kifejtett oxidatív stresszt [49]. A keletkező nitrogén-monoxidnak számos negatív következmény tulajdonítható, mint a neuronális sejtlegzés gátlása, apoptózisindukció és glutamát excitotoxicitás [50]. Az iNOS **közvetlenül is részt vesz a A β nitrálásában, növelve ennek** aggregációs hajlamát. Neuroinflammatorikus **körülmények között szintén megnővekedett** kifejeződést mutat a prosztaglandinszintézisért felelős ciklooxygenáz-2 (COX-2, *cyclooxygenase-2*) enzim, mely az extracelluláris szignál-szabályozott kináz (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*) és p38 MAPK út vonalak aktivitásához köthető [51,52]. Az ERK út vonal apoptózist elősegítő aktivitása a CXCL10 kemokin – CXCR3 kemokin-receptor kölcsönhatás által valósul meg, melyhez elengedhetetlen az astrocyták interferon γ (IFN γ) hatására történő CXCL10 szintézise [53]. Leírták továbbá, hogy az interleukin-6 (IL-6) specifikus receptora (IL-6 R α) révén fokozza az APP transzkripciót és metabolizmust, valamint számos Tau-epitóp hiperfoszforilációját eredményezi a STAT3/Cdk5 jelátviteli út vonal aktivitásának növelésével [54,55]. A microglia **kóros, hosszantartó aktiválódását, a fenti-ekben is bemutatott gyulladásos** citokinek és reaktív oxigén gyökök szintézisen kívül, a sejt felszíni antigének és a komplement receptorok megváltozott mintázata is jellemzi.

A makrofágok funkcionális polarizációjának elméletét egyes szerzők a microglia esetén is alkalmazzák. Ez a megközelítés a makrofágok legalább két különböző állapotának létezését feltételezi: míg az M1 állapotot a

gyulladáskeltő citokinek és az iNOS szekréciója, addig az M2 állapotot az argináz-2 (ARG2, *arginase 2*) fokozott expressziója és növekedési faktorok felszabadulása jellemzi [56,57]. Későbbi transzkriptom kutatások azonban kimutatták, hogy a neurodegeneratív betegségek összefüggésében a microglia egyidejűleg expresszál neurotoxikus és neuroprotektív faktorokat [58]. A betegség korai felismerése és az Alzheimer-kór elkülönítése más eredetű demenciáktól vagy az idősorhoz kötött memóriaromlástól indokolja a releváns biokémiai markerek azonosítását. Lai és mtsai. metaanalízisükben a szakirodalomban leggyakrabban emlegetett perifériás gyulladásos mediátorok Alzheimer-kór specifikus markerként valló felhasználását vizsgálták [59]. Ennek eredményeképpen nem csak a gyulladásos citokinek (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-18, IFN γ), de az **α 1-antikimotripszin, C reaktív protein (CRP, C-reactive protein)**, oldható TNF receptor 1 és 2 (sTNFR1/2, *soluble tumor necrosis factor receptor 1 and 2*), epidermális **nővekedési faktor (EGF, epidermal growth factor)** és vascularis sejt adhéziós molekula 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*) plazmakoncentrációja is szignifikánsan emelkedett az Alzheimer-kórban szenvedőknél. Ezzel szemben nem jellemző a gyulladáscsökkentő citokinek (IL-10, TGF- β) koncentrációjának változása.

Az astrocyták szintén részt vesznek a neuroinflammáció folyamatában, felerősítve a microgliosis neurotoxikus hatásait. Nyugalomban az astrocyta sejt vonal képes segíteni a neuronok túlélését és növekedését, a szinapszisek kialakulását és működését, de szerepet játszik a szinapszisek és mielinmaradványok felszámolásában is. Az aktivált microglia által kiválasztott mediátorok (IL-1 α , TNF α , a C1q komplement faktor és főleg IL-23) az astrocyták polarizációját váltják ki, mely során ezek fagocita és neurodegeneratív funkciója kerül előtérbe. Liddelov és mtsai. kimutatták, hogy Alzheimer-kórban szenvedő betegeknek a prefrontális **kéreg** astrocyta állományának csaknem 60%-a volt C3 komplement faktor pozitív, ami arra utal, hogy az astrocyták erősen aktiválódnak a neurodegeneratív folyamat által érintett központi idegrendszeri régiókban, és kulcsfontosságúak a betegség előrehaladásában [60]. Lee és mtsai. szerint az előzetesen aktivált astrocyták savas fibroblast **nővekedési faktor (FGF, fibroblast growth factor)** kibocsátása a microglia neurotoxikus funkcióját erősíti [61]. Ezenfelül a microglia-astrocyta **kölcsönhatást igazolja az ApoE** tartalmú lipoprotein **részecskék** astrocyták általi kibocsátása, mely szerepet játszik a microglia **A β felvételében** [62].



3. ábra. A microglia életfunkciók szabályozásának mechanizmusai neuroinflammatorikus közegben. Az ábrán megfigyelhetők az astrocyta-microglia kommunikáció citokinek, kemokinek és növekedési faktorok nyújtotta főbb lehetőségei, melynek célja az immunválasz hatékonyságának fokozása. A szemléltetett intracelluláris jelátviteli utak egybeeső aktivációja egyrészt előrecsatolási (*feed-forward*) hurkokat eredményez, fenntartva a gyulladásos válaszreakciót, másrészt neurotoxicitást fokozó életfunkciókat indít el. (A β : béta-amiloid, *amyloid- β* ; ApoE: apolipoprotein E; APP: amiloid előfehérje, *amyloid precursor protein*; BACE-1: APP hasító β -szekretáz 1, *beta-site APP cleaving enzyme 1*; CDK5: ciklinfüggő kináz 5, *cyclin-dependent kinase 5*; CXCL10: C-X-C motívum kemokin ligandum 10, *C-X-C motif chemokine ligand 10*; DAMP: veszélyhez kapcsolható molekuláris mintázat-receptorok, *danger associated molecular pattern*; ERK: extracelluláris szignál-szabályozott kináz, *extracellular signal-regulated kinase*; FGF: fibroblast növekedési faktor, *fibroblast growth factor*; IFN γ : interferon γ ; IL-6: interleukin 1 β /18; iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz, *inducible nitric oxide synthase*; NF- κ B: nukleáris faktor κ B, *nuclear factor- κ B*; p38 MAPK:p38 mitogén által aktivált protein kinázok, *p38 mitogen-activated protein kinases*; p-Tau: foszforilált Tau; TLR: Toll-szerű receptor, *Toll-like receptor*)

Míg az oldható A β peptideket a microglia könnyedén eltávolítja, a kis oldhatóságú A β aggregátumok hosszantartó immunaktivitást és krónikus gyulladást eredményeznek, mely az előzőekben leírt mechanizmusok révén, hozzájárul a szinaptikus diszfunkcióhoz és az idegsejtek elvesztéséhez. Ezen közvetlen károsító mechanizmusok mellett számos, a neuroinflammációban résztvevő faktor közvetve elősegíti a A β szintézisét és aggregálódását, illetve a Tau funkcióvesztését és NFT-be való szerveződését. A TNF α és az IL-1 β fokozza a β -szek-

retáz **génexpresszióját és a BACE-1 fehérje** enzimátikus aktivitását [63]. Az NLRP3 inflammasoma ASC segédfehérjéje extracelluláris góccokat képez a A β **összecsapódás** számára [35], de a krónikus gyulladás során előtérbe kerül a Tau hiperfoszforilációja és poszttranszlációs módosítása is (lásd 2. ábra) [64]. Ez néhány azon mechanizmusok közül, melyek az agyszövet gyulladásos válaszreakciójának részeként pozitív előrecsatolási (*feed-forward*) hurkot tarthat fenn az Alzheimer-kór patogenezisében. Néhány ilyen mechanizmust a 3. ábra szemléltet.

Az inzulinrezisztencia szerepe a neuronális életműködésekre

A növekvő mennyiségű klinikai és kísérletes bizonyítékok, a fentiekben is szemléltetett módon, rendkívül összetett kórélettanra utalnak, melyhez a legújabb eredmények alapján hozzájárul az agyi szénhidrát-anyagcsere zavara is [65,66]. Pozitron emissziós tomográfia (PET, *positron emission tomography*) vizsgálatok kimutatták, hogy a microglia aktiváció időbeni előrehaladásával, a kór által érintett területeken csökken a glükózmétabolizmus sebessége [67]. Habár a glikolízis csökkenése inkább az oxidatív stressz és neurodegeneráció **mértékével korrelál**, ezen megfigyelések az inzulin szerepének felismeréséhez vezettek. Az inzulin szisztémás anyagcserét szabályozó funkcióján túl a központi idegrendszerben főleg neuromodulátor szereppel rendelkezik, befolyásolva a neuronális életműködések [68]. Alzheimer-kórban szenvedőknél megfigyelték az inzulinreceptorok számának csökkenését és az inzulin hatásáért felelős jelátviteli út károsodását a neuronokban, ezt az állapotot elnevezték agyi inzulinrezisztenciának [69,70]. Az inzulin receptor (IR) aktivációja tirozin-kináz aktivitása révén az inzulin receptor szubsztrát molekula (IRS, *insulin receptor substrate*) tirozin-foszforilációját eredményezi, ami a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K)/Akt kináz jelátviteli út vonal működését váltja ki [71]. Ez a mechanizmus fontos eleme a fehérjeszintézis, proliferáció és apoptózis szabályozásának, többek között az 1-es mTOR komplex (mTORC1, *mammalian target of rapamycin complex 1*) révén. Az mTORC1 szerepe a fehérjeszintézis és autofágia egyensúlyának fenntartása, mely Alzheimer-kórban az utóbbi javára billen [72]. Az inzulin neuroprotektív hatását látشانak igazolni azon kutatások, melyek szerint az akut, de főleg a hosszantartó intranasalis inzulin adagolás javítja a betegek kognitív teljesítményét Alzheimer-kórhoz, enyhe kognitív károsodáshoz és Parkinson-kórhoz köthető memóriaromlás esetén [73–75].

Bár számos kutatás foglalkozott a 2-es típusú cukorbetegség és Alzheimer-kór összefüggéseinek feltárásával, jelen tudásunk szerint az agyi inzulinrezisztencia a perifériás érzékenységtől és plazma inzulinkoncentrációtól függetlenül is kialakulhat. Okai főleg a **A β és Tau patológiára, illetve** neuroinflammációra vezethetők vissza. A A β oligomerek jelenléte részben közvetlenül, részben a neuroinflammatorikus folyamatok által vezet az inzulin jelátvitel zavarához. Azt, hogy a TNF α a periférián csökken a adipocyták glükózfelvételét és ezáltal inzulinrezisztenciához hasonló állapotot hoz létre, már korábban

leírták. A TNF α a c-Jun N-terminális kináz (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*) aktiválásával az IRS-1 szerin-foszforilációját eredményezi, ezáltal az IR komplex működését gátolja [76]. Ilyen irányú változásokat később az Alzheimer-kór kórélettanában is azonosítottak, megerősítve a neuroinflammáció és inzulinrezisztencia szoros kapcsolatát [77]. Normál inzulin érzékenység esetén a PI3K/Akt út vonal negatívan szabályozza a Tau foszforilációjában **résztevő** GSK-3 β -t. Ily módon az Alzheimer-kórhoz köthető NFT felhalmozódáshoz az előzőekben tárgyalt mechanizmusokon kívül hozzájárul a kialakult inzulinrezisztencia is [78].

Kísérletes állatmodellek az Alzheimer-kór vizsgálatára

Bár egyre több ismerettel rendelkezünk a betegség kialakulásában szerepet játszó, fentiekben bemutatott kórélet-tani folyamatokról, a kór terápiája máig nem megoldott. Annak ellenére, hogy kiterjedt kutatás folyik ezen területen és a kórfolyamatok minden szintjén próbálnak új, vagy már ismert gyógyszerekkel beavatkozni, a Jeffrey Cummings által 2014-ben közölt adatok szerint 2002 és 2012 között a klinikai vizsgálatok 99,6%-a volt sikertelen [4] including four cholinesterase inhibitors and an N-methyl-D-aspartate (NMDA). A klinikai vizsgálatokban alkalmazott gyógyszerek mindegyike előzőleg állatkísérletekben hatékonynak bizonyult. Ennek oka lehet akár a reprezentatív állatmodellek hiánya vagy ezek nagyfokú heterogenitása. A kései Alzheimer-kór tanulmányozására nem a legkedvezőbbek a transzgenikus és kiütéses rácsálómodellek, melyek fokozott APP, A β vagy NFT szintézist váltják ki. Széles körben elterjedtek az APP és/vagy PSEN1 mutációit tartalmazó transzgenikus egérmodellek, melyekre a A β ₁₋₄₂ megnövekedett szöveti jelenléte, amiloid plakkok és a kognitív károsodás korai kialakulása jellemző [79]. Ebben az esetben valóban 2-4 hónapos korban kialakulnak a kór neurológiai jellemzői, de ezek nem esnek egybe teljes mértékben a multifaktoriális időskorra jellemző kórfolyamatokkal. Mindemellett a genetikai modellek jelentősége számottevő, mivel segítségükkel jól vizsgálhatók diszkrét folyamatok és mechanizmusok, gyógyszerhatékonyság vizsgálata esetén azonban az eredmények korlátozottak.

Az Alzheimer-kór tanulmányozásában elterjedtek az intervenciós vagy beavatkozási állatmodellek, melyek kémiai anyagok agyi régiókba történő bejuttatásával

váltak ki biokémiai és szöveti módosulásokat, főleg neuroinflammációt és következetes neurodegenerációt. Az ideális állatmodellnek az okokat, elváltozásokat és tüneteket a tényleges betegséghez hasonló időrendi sorrendben kell megjelenítenie, melyet mostanáig nem sikerült teljes mértékben megvalósítani.

A β által kiváltott Alzheimer-kór

Az amiloid hipotézis és az EOAD kockázati tényezőinek azonosítása egyaránt arra utal, hogy a A β oligomerek fontos szerepet játszanak a kórfolyamatok elindításában és fenntartásában. Számos tanulmány kimutatta, hogy a rekombináns A β_{1-42} oligomerek nagy mennyisége toxikus hatást fejt ki, neuronális diszfunkcióhoz és szinaptikus veszteséghez vezetve, ezáltal a transzgenikus módosítások alternatívájaként szolgálva [80,81]. Az A β_{1-42} oligomer vad típusú egerek agyába történő közvetlen infúziója, olyan *in vivo* modellt biztosít, amely reprodukálja az egyes agyi célterületekre jellemző neurodegenerációt, ellentétben a megnövekedett A β szintézist megjelenítő transzgenikus állatmodellekkel [82]. Egy héttel a kezelést követően a hippocampalis kolinerg neuronok számának 20-50%-os csökkenése volt megfigyelhető [82]. A modell legnagyobb hiányossága, hogy az indukciót követően nem figyelhető meg a kései Alzheimer-korra (LOAD) jellemző tauopathia és inzulin jelátviteli diszfunkció.

Lipopoliszacharid (LPS) által kiváltott neuroinflammáció

Az egyik legszélesebb körben használt Alzheimer-kór modell a több mint 20 éve kifejlesztett és alkalmazott LPS által indukált neuroinflammáció, amely mind az *in vivo*, mind az *in vitro* kísérletek alapvető módszerét képviseli [83,84] lipopolysaccharide (LPS). A bakteriális sejtmembránban endotoxin szerepet betöltő LPS természetéből adódóan változó összetétellel rendelkezhet. Ezen endotoxinok antigénpotenciálja a A β -hoz hasonló és kötődnek többek között TLR4 receptorokhoz, microglia aktivációt és jelátviteli kaszkádok aktiválódását idézve elő, ami gyors fehérjetranszkripcióhoz és proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , IL-6, IL-12, p40 és TNF α), kemokinek (CCL2, CCL5 és CXCL8), komplementrendszer fehérjék (C3, C3a és C5a receptorok), de gyulladásgátló citokinek (IL-10) és növekedési faktorok (TGF- β) kiválasztódását is kiváltja [85].

A LPS krónikus alkalmazása intracerebroventricularisan (icv.) és szisztémásan egyaránt lehetséges, az Alzheimer-kór tünetegyütteséhez hasonló kognitív káro-

sodás kialakulásával [86]. Megfigyelték azonban, hogy a kísérleti állatok életkorától és az LPS adagolás időtartamától függően a felszabaduló gyulladásos citokinek aránya változik, ami korlátozza a biokémia mediátorokon alapuló következtetések megállapítását [87]. Ezért a releváns agyi területekre (hippocampus és entorhinalis kéreg) lokalizált és megbízható kísérleti eredményekhez a LPS alacsony dózisu, folyamatos infúziója javasolt a negyedik agykamrába [88]. Mindezek mellett a LPS-indukálta neuroinflammáció legszámtovább hiányossága, hogy bár a transzgenikus állatokban megfigyelhető a A β fokozott szintézise és aggregációja, valamint a Tau hiperfoszforilációja, ezeket az alapvető kórélettani változásokat vad típusú állatokban nem váltja ki [89].

Streptozotocin (STZ) által kiváltott neuroinflammáció

A nitrozo-glükózamin-karbamid szerkezetű STZ a 2-es glükóztranszporter (GLUT2, *glucose transporter 2*) szubsztrátja, ezért perifériás adagolás során szelektíven károsítja a hasnyálmirigy β -sejtjeit. Ezúton történő alkalmazása a cukorbetegség kísérletes indukciójának klasszikus módja [90]. Centrális alkalmazására az inzulinrezisztencia Alzheimer-kórban betöltött jelentőségének felismerése után került sor. Annak ellenére, hogy bizonyos fokú viselkedési változások, valamint frontális és hippocampalis neurodegeneráció megfigyelhető intravénás alkalmazást követően is (valószínűsíthetően a cukorbetegség következményeként), a molekula vér-agy gáton történő átjutásának hiányában az Alzheimer-kór indukálásához agykamrai adagolás szükséges. Immunhisztokémiai vizsgálatok megerősítették, hogy az alacsony dózisu STZ (1 mg/testsúlykilogramm icv.) alkalmazása kiterjedt és gyors (már egy hét után jelentkező) neuroinflammációt vált ki egerekben, amelyet különösen a hippocampusban magas astroglia és microglia aktiváció jellemez [91,92]. A modell előnye, hogy az indukciót követő 6-12 hétben már megfigyelhető a Tau fehérje foszforilációja és a A β lerakódása, bár ezen elváltozások nagy eséllyel a STZ cito- és neurotoxikus hatására vezethetők vissza (reaktív oxigén gyökök és DNS-károsodás által generált oxidatív stressz) [93]. A módszer alkalmazhatóságát limitálja, hogy az indukció különösen nagy mortalitással társul, ami az alkalmazott dózis csökkentésével és/vagy frakcionálásával, valamint az adagolás sebességének szabályozásával csökkenthető.

Következtetések

A legígéretesebb gyógyszerjelöltek is, mint például az amiloid szintézist és lerakódás célzó A β ellenes immuno-
noterápia (solanezumab, gantenerumab) nagyon gyakran bizonyulnak hatástalannak klinikai vizsgálatokban, annak ellenére, hogy mind elméleti téren, mind preklinikai **kísérletekben hatékonynak tűnhetnek. Ennek okai több nézőpontból is** megközelíthetők, de konkrét megoldás nem kínálkozik a problémára.

Egyrészt adottak a preklinikai vizsgálatok általános korlátozó tényezői. Semmilyen kór esetén sem tekinthetünk el a biokémiai és működésbeli faji eltérésektől, melyek gyakran vezetnek a várt hatások elmaradásához, vagy nem várt toxicitás felléptéhez. A fentiekben bemutatott modellek is alátámasztják, hogy rendkívül nehéz azon központi idegrendszeri kórfolyamatok modellezése, amelyeknek összetettségét évtizedek kutatása sem tárta fel teljes mértékben. Szintén Alzheimer-kór specifikus kihívás a rágcsálók viselkedésbeli aspektusainak megbízható felmérése. A felfedezési- és memória-készségek számszerűsítésére viselkedéstani tesztek állnak rendelkezésre, ezek megbízhatósága, reprodukálhatósága mindig kérdéses.

Másrészt az is megnehezíti az eredmények **átvihetőségét** humán vizsgálatokba, hogy a terápiás lehetőségekre való nagy igény fényében, sok esetben részleges eredményekkel is megelégszünk. Számos példa alátámasztja már, hogy nem elégséges, ha a gyógyszerjelölt molekula csökkenti a neuroinflammáció **mértékét, de nem befolyásolja az** amiloid aggregátumok felhalmozódását vagy gátolja a neurofibrillaris **kötegek képződését, de nem befolyásolja az inzulinérzékenységet. Ezen vegyületek hatékonynak bizonyulhatnak egy bizonyos kórfolya-**

mat szintjén, de nem rendelkeznek klinikailag releváns jótékony hatással humán vizsgálatokban.

Nem utolsó sorban lényeges a kezelés elkezdésének pillanata és annak időtartama. Mivel jelenleg nem állnak rendelkezésre megbízható markerek, hivatalos ajánlások és szűrési módszertan az Alzheimer-kór korai diagnózisára, csak a kór előrehaladott állapotaiban (a tünetek megjelenése után) van lehetőségünk gyógyszeresen beavatkozni. Ezzel szemben sok preklinikai vizsgálatban az indukcióval párhuzamosan vagy rövid időn belül elkezdik a kezelést. Ebben az esetben a kezelés prevencióssá potenciálja számottevően nagyobb, mint az előrehaladott neurodegenerációval jellemezhető humán esetekben.

Jelen tanulmányban az Alzheimer-kór patomechanizmusainak és néhány rendelkezésre álló állatmodell bemutatásával igyekeztünk felhívni a figyelmet a gyógyszerkutatás kiemelkedő sikertelenségi rátája mögött meghúzódó okokra. Amint ismertettük, a kórfolyamatok összetettsége a szokásosnál is nehezebbé teszi a preklinikai vizsgálatok tervezését és eredményeinek kiértékelését. Indokolt tehát az összetett modellek használata, illetve az inflammatorikus, metabolikus és neurodegeneratív markerekre, valamint viselkedésbeli aspektusokra egyaránt kiterjedő vizsgálatok megtervezése.

Irodalom

(lásd az angol nyelvű cikk végén)