

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Silvija Jankevičiūtė

**MIKROGLIJOS IR BETA AMILOIDO
OLIGOMERŲ SAVEIKOS, SUKELIANČIOS
NEURONŲ ŽŪTĮ, MOLEKULINIŲ
MECHANIZMŲ TYRIMAS**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai,
biologija (01B)

Kaunas, 2017

Disertacija rengta 2012–2016 metais Lietuvos sveikatos mokslų universitete Medicinos akademijos Neuromokslų instituto Biochemijos laboratorijoje.

Mokslinė vadovė

prof. dr. Vilmantė Borutaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

doc. dr. Gytis Svirskis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

Nariai:

prof. habil. dr. Daiva Rastenytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

prof. dr. Edgaras Stankevičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

prof. dr. Maija Dambrova (Latvijos organinės sintezės institutas, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Disertacija ginama viešame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 m. birželio 20 d. 12 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto „Santakos“ slėnio Naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centre, 203 auditorijoje.

Adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50166 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Silvija Jankevičiūtė

**INVESTIGATION OF MOLECULAR
MECHANISMS OF MICROGLIA AND BETA
AMYLOID OLIGOMERS INTERACTION
CAUSING NEURONAL DEATH**

Doctoral Dissertation
Biomedical Sciences,
Biology (01B)

Kaunas, 2017

Dissertation has been prepared at the laboratory of Biochemistry of Neuroscience Institute of Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences during period of 2012–2016.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Vilmantė Borutaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Dissertation is defended in the Biology Research Council of the Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences.

Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Gytis Svirskis (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Members:

Prof. Habil. Dr. Daiva Rastenytė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Edgaras Stankevičius (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Prof. Dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Prof. Dr. Maija Dambrova (Latvian Institute of Organic Synthesis, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Dissertation will be defended at the open session of the Biology Research Council at 12 p.m. on the 20th of June 2017 in the auditorium 203 of Lithuania University of Health Sciences “Santaka” Valley Centre for the Advanced Pharmaceutical and Health Technologies.

Address: Sukilėlių 13, LT-50166 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
IVADAS	9
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Alzheimerio liga: ligos vystymąsi lemiantys veiksniai	13
1.2. AL patogenezė ir ryšys su beta amiloido (A β) baltymu	14
1.2.1. Amiloido baltymo pirmtakas (APP)	14
1.2.2. Beta amiloido (A β_{1-42}) agregacija ir toksiškumas	17
1.2.3. A β baltymas ir jo ryšys su amiloidinės kaskados hipoteze	18
1.2.4. AL mechanizmai ir jų ryšys su A β baltymu	20
1.2.5. A β agregatų tiesioginis poveikis sinapsėms ir neuronų gyvybingumui	23
1.2.6. Netiesioginis A β agregatų toksinis poveikis neuronams	25
1.2.7. Anti-A β imunoterapija ir A β šalinimas	27
1.3. Mikroglia ir jos sąveika su A β	31
1.3.1. Mikroglijos ląstelės ir jų funkcijos	31
1.3.2. Mikroglijos ląstelių aktyvacija ir toksiškumas	33
2. METODIKA	36
2.1. Pirminių ląstelių kultūrų paruošimas	36
2.1.1. Lėkštelių paruošimas ląstelių kultivavimui ir eksperimentiniams tyrimams	36
2.1.2. Smegenėlių neuronų–glijos ląstelių kultūros paruošimas	37
2.1.3. Gryna mikroglijos ląstelių kultūra	39
2.1.4. Gryna smegenėlių neuronų ląstelių kultūra	40
2.2. Monokloninių antikūnų ir A β_{1-42} peptido agregatų paruošimas ląstelių gyvybingumo ir toksiškumo tyrimams	41
2.2.1. Sintetinių A β_{1-42} agregatų paruošimas	41
2.2.2. Monokloniniai antikūnai	42
2.3. Neuronų žūties ir ląstelių skaičiaus įvertinimas	43
2.4. Sinapsių pokyčių vertinimas imunofluorescenciniu metodu	45
2.5. Ląstelių membranos potencialo neuronų–glijos ir mikroglijos ląstelių kultūrose nustatymas	46
2.6. Glutamato kiekio nustatymas ląstelių augimo terpėje	47
2.7. TNF- α nustatymas ląstelių augimo terpėje	47
2.8. Biologinių skysčių poveikio neuronų–glijos ląstelių kultūroms vertinimas	47
2.8.1. Tiriamieji pacientų biologiniai skysčiai	47
2.8.2. Ląstelių inkubacija su pacientų biologiniais skysčiais	48
2.9. Duomenų analizė	48

3. REZULTATAI.....	49
3.1. Mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikio smegenų ląstelių membranos potencialui mechanizmų tyrimas	49
3.2. Monokloninių antikūnų prieš $A\beta_{1-42}$ peptidą toksinio poveikio mechanizmų tyrimas	57
3.2.1. Imuninių kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui ilgalaikėse smegenėlių ląstelių kultūrose.....	69
3.2.2. $A\beta_{1-42}$ peptidų ir monokloninių antikūnų anti- $A\beta$ kompleksų poveikis neuronų sinapsiniams ryšiams CGC kultūroje.....	72
3.3. Pacientų biologinių skysčių poveikio CGC ląstelių kultūrose tyrimas	77
4. REZULTATŲ APTARIMAS	84
IŠVADOS.....	100
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS	101
MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS.....	122
SUMMARY.....	150
CURRICULUM VITAE.....	185
PADĖKA	186

SANTRUMPOS

ACh	–	acetilcholininas
AChE	–	acetilcholinesterazė
AL	–	Alzheimerio liga
AMPA-R	–	α -amino-3-hidroksi-5-methilisoksazol-4-propiono rūgšties receptoriai
APH-1	–	γ sekretazės komplekso subkomponentas, atsakingas už γ sekretazės aktyvumą
APP	–	A β pirmtako baltymas
Ara-C	–	citozino arabinozidas
ATD	–	Alzheimerio tipo demencija
Aβ	–	amiloido- β peptidas
Aβ₁₋₄₂	–	1–42 amino rūgščių sekos A β formos peptidas
ChAT	–	cholino acetiltransferazė
BSA	–	jaučio kraujo serumo albuminas
CGC	–	smegenėlių ląstelės (neuronai ir glija)
CNS	–	centrinė nervų sistema
COX	–	citochromo oksidazė
DiBAC4(3)	–	bis(1,3-dibutylbarbitūrinė rūgštis) trimetin oksanolis
DMEM	–	ląstelių augimo terpė
DMSO	–	dimetilsulfoksidas
Fab	–	monovalentinis antigeną prijungiantis antikūno fragmentas, antikūno aktyvusis centras
FBS	–	fetalinis veršelio serumas
Fc	–	sąveikoje su antigenu nedalyvaujantis antikūno molekulės fragmentas, lemiantis antikūno funkcijas
GABA-R	–	postsinapsinėje membranoje esantys jonotropinių ir metabotropinių jonų kanalų receptoriai.
HFIP	–	heksafluorizopropanolis
IgG	–	G klasės imunoglobulinas
IK	–	antigenų ir jiems specifinių antikūnų imuniniai kompleksai
IL	–	interleukinas
KD	–	kita demencijos forma sergantys pacientai
KS	–	kraujo serumas
L-ATD	–	lengva Alzheimerio tipo demencijos forma
LDH	–	laktato dehidrogenazė
LPS	–	lipopolisacharidas
LTA	–	lipoteichoinė rūgštis

LTP	– ilgalaikė potenciacija
MFS	– organizmo makrofagocitų sistemos
MHC I/II	– audinių suderinamumo kompleksas (I ir II klasės)
MIP-1α	– chemokinas, makrofagų uždegiminis baltymas 1 α
MK-801	– dizocilpinas (C ₁₆ H ₁₅ N)
NADPH	– nikotinamido adenino dinukleotidas, fosforilinta redukuota forma
NFT	– neurofibriliniai raizginiai
NMDA-R	– N-metil-D-aspartato receptoriai
ONOO⁻	– peroksonitritas
PBS	– fosfatinis druskų tirpalas
PNS	– periferinė nervų sistema
PS-1 ir PS-2	– presenilino genai
RAGE	– imuninės sistemos signalinė molekulė; galutinių gliukozilinimo produktų receptoriai
ROS	– aktyvios deguonies formos
SP	– kognityvinių sutrikimų neturintys pacientai
SNAP-25	– su sinaptosomomis susijęs presinapsinio poliaus baltymas 25
SS	– smegenų skystis
Tau	– Tau baltymas
TGF-β	– citokinas, transformuojantis augimo veiksnys – β
TLR	– „toll-like“ receptoriai
TNF-α	– naviko nekrozės veiksnys – α
V-ATD	– vidutinė Alzheimerio tipo demencijos forma
α7nACh-R	– α 7 acetilcholino receptoriai

IVADAS

Alzheimerio liga (AL) – tai labiausiai paplitusi su amžiumi susijusi demencijos forma, kurios atsiradimą lemia laipsniškas ir lėtinis beta amiloido (A β) baltymo gamybos ir šalinimo pusiausvyros sutrikimas. Ilgėjant gyvenimo trukmei AL tampa viena iš pagrindinių sveikatos problemų pasaulyje [1]. Naujausi duomenys rodo, kad šia liga serga apie 50 milijonų žmonių. Teigiama, jog šis skaičius po dvidešimties metų padidės dvigubai [2]. Sparčiai augant AL paplitimui, efektyvių diagnostinių bei gydymo priemonių kūrimas tampa svarbia mokslinių tyrimų sritimi. A β baltymas yra laikomas vienu pagrindinių veiksnių, inicijuojančių AL patogenezės vystymąsi [3–5], tačiau A β toksiškumo molekuliniai mechanizmai iki šiol nėra aiškūs. Sinapsiniai ir ne sinapsiniai neuronų pokyčiai, o taip pat ir kitų, ne neuroninių ląstelių funkciniai bei struktūriniai kitimai gali pasireikšti beveik tuo pačiu metu kaip AL vystymasis, todėl manoma, kad A β gali veikti neuronus tiesiogiai, pažeisdamas sinapses ar sukeldamas neuronų žūtį, ir netiesiogiai per mikroglijos ląstelių aktyvaciją [6, 7]. Neurotoksinis A β poveikis ir uždegiminių procesų pasireiškimas taip pat gali būti siejamas su šių peptidų gebėjimu jungtis prie ląstelių membranų, todėl didelis dėmesys skiriamas neurouždegiminiams procesams bei A β sąveikai su kitomis smegenų ląstelėmis. Neteisingai susiformavę ir agreguoti baltymai, jungdamiesi prie mikroglijos receptorių, gali sukelti imuninę reakciją ir taip inicijuoti AL progresiją [8, 9]. Mažai yra žinoma apie mechanizmus, kurie lemia A β patogeninių darinių toksinį poveikį gyvybiškai svarbiems biocheminiams procesams, todėl iki šiol nėra sukurta efektyvių priemonių ligos progresijos stabdymui ar jos gydymui. Vienais perspektyviausių yra laikomi imunoterapija paremti AL gydymo metodai, panaudojant antikūnus prieš toksiškas A β formas. Nors daugelis *in vitro* ir *in vivo* tyrimų su gyvūnų modeliais buvo veiksmingi mažinant A β sankaupą ir neuritų pažaidą bei pagerino kognityvines funkcijas, tačiau pasireiškus smegenų uždegimui, ikiklininiai tyrimai buvo nutraukti. Priežastys, kodėl imunoterapija nebuvo sėkminga bei kas lėmė uždegimo pasireiškimą, nėra aiškios iki šiol. Mažai žinomi ir patogeninių A β darinių sąveikos su mikroglijos ląstelėmis sukeltos neuronų žūties molekuliniai mechanizmai.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas

Ištirti Alzheimerio ligos (AL) patogenezėje dalyvaujančių beta amiloido (A β) peptidų neurotoksinio poveikio molekulinis mechanizmus.

Darbo uždaviniai

1. Ištirti mažų A β_{1-42} oligomerų poveikį smegenėlių ląstelių membranos potencialui ir įvertinti sukeltų pokyčių bei A β_{1-42} oligomerų sukeltos neuronų žūties priklausomybę nuo NMDA receptorių.
2. Ištirti įvairaus oligomerizacijos laipsnio A β_{1-42} agregatų ir antikūnų prieš A β neurotoksinio poveikio mechanizmą.
3. Įvertinti anti-A β ir skirtingų A β_{1-42} agregatų kompleksų poveikį sinapsinių ryšių tankiui.
4. Ištirti Alzheimerio tipo demencija sergančių pacientų biologinių skysčių poveikį smegenėlių neuronų–glijos ląstelių kultūroms bei palyginti jį su pacientų, neturinčių kognityvinių sutrikimų, ir kita demencijos forma sergančių pacientų biologinių skysčių poveikiu.

Darbo aktualumas ir mokslinis naujumas

Tirpių A β_{1-42} peptidų formavimasis ir kaupimasis yra laikomi pagrindiniais Alzheimerio ligos vystymąsi lemiančiais veiksniais. Žinoma, kad maži ir dideli A β_{1-42} oligomerai gali tiesiogiai veikti neuronus ir aktyvinti juose ląstelių žūties mechanizmus bei netiesiogiai per glijos ląstelių aktyvaciją sukelti citokinų išsiskyrimą ir taip inicijuoti neuronų žūtį. Visgi, kaip A β sąveikauja su smegenų ląstelėmis ir kokie yra toksinio poveikio pasireiškimų mechanizmai nėra iki galo žinoma. Šiame darbe pirmą kartą parodyta, kad toksiški maži A β_{1-42} oligomerai (1–3 nm) esant koncentracijoms, būdingoms smegenų patologijos sąlygoms, sukelia greitą neuronų ir mikroglijos ląstelių membranų depoliarizaciją neuronų–glijos, grynose mikroglijos, žievės ir smegenėlių neuronų kultūrose. Nustatėme, kad mikroglijos ląstelių membranų depoliarizacija, sukelta A β_{1-42} oligomerų, gali būti susijusi su NMDA receptorių aktyvacija, o A β_{1-42} oligomerai neuronus veikia tiesiogiai ir NMDA receptoriai ankstyvajame neuronų depoliarizacijos procese nedalyvauja. Mūsų tyrimai atskleidė, kad A β_{1-42} oligomerų sukelta ląstelių membranų depoliarizacija sąlygoja glutamato išsiskyrimą iš ląstelių, kuris susijęs su pokyčiais vykstančiais neuronuose, bet ne mikroglijos ląstelėse. Nustatėme, kad NMDA receptorių antagonistas MK-801 normalizavo mikroglijos ląstelių membranos potencialą, neląstelinio glutamato koncentraciją ir iš dalies

apsaugojo neuronus nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukeltos žūties CGC kultūroje, kas rodo, kad NMDA receptoriai dalyvauja $A\beta_{1-42}$ oligomerų neurotoksiškumo mechanizme. Parodėme, kad NMDA receptoriai nedalyvauja mikroglijos ląstelių aktyvacijoje ir $A\beta_{1-42}$ oligomerų toksiškumas nėra susijęs su mikroglijos aktyvacijos žymens – TNF- α išsiskyrimu į ląstelių augimo terpę.

Manoma, kad $A\beta$ gamybos slopinimas yra vienas potencialių AL gydy-mo strategijų [10], todėl gydymo metodai, paremti imunizacijos taikymu, naudojant antikūnus prieš $A\beta$ peptidus, iki šiol yra laikomi vienais perspektyviausių. Nors yra žinoma, kad antikūnai prieš $A\beta$ oligomerines formas geba apsaugoti neuronus nuo $A\beta$ oligomerų sukeltos toksinio poveikio neuronų kultūrose, *in vivo* AL gyvūnų modeliuose, tikslūs mechanizmai, kodėl antikūnai kai kuriais atvejais veikia toksiškai bei lemia uždegimo pasireiškimą – nėra aiškūs iki šiol. Dėl šios priežasties imunizacija paremti tyrimai yra ypač aktualūs. Šiame darbe pirmieji parodėme, kad $A\beta_{1-42}$ toksinis poveikis didėja sąveikoje su $A\beta$ specifiniais antikūnais. Nustatėme, kad monokloninių anti-kūnų anti- $A\beta$ bei visų $A\beta_{1-42}$ agregacinių būsenų peptidų imuniniai kompleksai pasižymi stipriu toksiniu poveikiu CGC kultūroms ir sukelia neuronų žūtį. Mūsų tyrimai atskleidė, kad imuniniai kompleksai gali sukelti ne tik neuroninių ląstelių žūtį, bet ir jų tankio mažėjimą bei mikroglijos proliferaciją. Pirmieji nustatėme, kad oligomerinė antigeno struktūra lemia imuninių kompleksų toksiškumą ląstelėms. Parodėme, kad imuninių kompleksų toksiškumą sąlygoja antikūno Fc dalis, kuri jungdamasi prie mikroglijos ląstelių Fc receptorių gali sukelti šių ląstelių proliferaciją ir neuronų žūtį. Taip pat parodėme, kad sinaptotoksinis anti- $A\beta$ ir $A\beta_{1-42}$ kompleksų poveikis CGC kultūroje siejamas su $A\beta_{1-42}$ agregacine būsena ir peptidų dydžiu, bei priklauso nuo imuninių kompleksų inkubacijos trukmės.

Iki šiol nėra paskelbtų duomenų apie AL ir kita demencijos forma sergančių pacientų kraujo serumo ir smegenų skysčio poveikį ląstelių kultūroms. Šiame darbe pirmą kartą nustatėme, kad skirtingai nuo pacientų, neturinčių kognityvinių sutrikimų, ir kita demencijos forma sergančių pacientų, kraujo serumas ir smegenų skystis paimtas iš AL sergančių pacientų, pasižymi stipriu toksiniu poveikiu smegenų ląstelėms. Parodėme, jog egzistuoja skirtumai tarp AL ir kita demencija sergančių pacientų biologinių skysčių ir tik sergančiųjų AL smegenų skystis sukelia neuronų gyvybingumo ir ląstelių skaičiaus sumažėjimą, o kraujo serumas pasižymi uždegimą mažinančiu poveikiu.

Darbo praktinė reikšmė

Gauti nauji duomenys apie skirtingus A β patogeninių darinių toksiškumo mechanizmus, kurių supratimas gali prisidėti prie neuronų žūties sustabdymo ar efektyvių farmakologinių preparatų kūrimo. Anti-A β antikūnų sąlygoto A β_{1-42} neurotoksiškumo tyrimai gali prisidėti prie uždegimo mechanizmų suvokimo bei potencialių prevencijos įrankių ar gydymo priemonių, stabdančių Alzheimerio ligos progresavimą, kūrimo. AL pacientų biologinių skysčių, kraujo serumo ir smegenų skysčio, poveikio smegenėlių kultūroms analizė gali būti taikoma kaip potencialus pirminis arba klinikinius biologinių žymenų tyrimus papildantis ankstyvosios Alzheimerio diagnostikos metodas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Alzheimerio liga: ligos vystymąsi lemiantys veiksniai

Alzheimerio liga (AL) – viena iš dažniausiai pasitaikančių demencijos formų senatvėje. Tai negrįžtamas neurodegeneracinis sutrikimas, kuriam būdingas progresuojantis atminties funkcijų praradimas, pažintiniai bei elgsenos pokyčiai, sutrikdantys kasdienį asmens funkcionavimą [11]. Priešingai nei natūralaus senėjimo metu, AL sergančiųjų pacientų smegenyse stebimi tokie ryškūs bei palaipsniui progresuojantys pokyčiai kaip smegenų žievės atrofija bei smegenų keteros susiaurėjimas. Labiausiai paveikiamos smilkininės sritys dalys (hipokampus, parahipokampinis vingis, migdolinis kūnas), kurie kaip manoma, yra atsakingi ir sudaro ilgalaikės atminties sistemą [12, 13]. Senėjimas yra vienas iš pagrindinių šios ligos vystymąsi lemiančių veiksnių, todėl senyvo amžiaus žmonių populiacija yra pagrindinė rizikos grupė, kuriai gali pasireikšti AL [14]. AL pagal pasireiškimą skirstoma į du tipus – ankstyvąją ir vėlyvąją. Vėlyvoji AL forma yra labiausiai paplitusi ir sudaro apie 90–95 proc. visų ligos atvejų, esant vyresniam nei 65 metai amžiui. Likę 5–10 proc. priskiriami ankstyvajai AL ir jos pasireiškimą amžius siekia 30–65 metus [15]. Kai kurie iš ankstyvųjų AL atvejų, dar kitaip vadinamų šeiminiais, paveldimi autosominiu dominantiniu būdu. Šeiminė Alzheimerio liga (šAL) yra susijusi su mutacijomis, vykstančiomis trijuose genuose, kurie atsakingi už Aβ gamybą: *amiloido baltymo pirmtakas* (APP) aptinkamas 21 chromosomoje, *presinilinas 1* (PS-1) aptinkamas 14 chromosomoje ir *presinilinas 2* (PS-2) aptinkamas 1 chromosomoje [16].

Visgi, didžioji dalis AL atvejų yra savaiminiai (sporadiniai), kurių priežastys nėra aiškos, tačiau manoma, jog didžioji dalis jų yra apspręsti ne genetinių veiksnių, o aplinkos poveikio [15].

AL vystymąsi lemia keli pagrindiniai morfologiniai pokyčiai, tokie kaip sinapsinės pažaidos ir sinapsių praradimas lydimas neuronų žūties. Jie siejami su neuropatologinių AL sukeliančių veiksnių – amiloidinių plokštelių bei neurofibrilinių raizginių formavimusi [17, 18], lydimu astrogliazės [19] ir mikroglijos ląstelių aktyvacijos, kuri sukelia toksinio amiloido beta (Aβ) baltymo [20, 21]. Užląstelių amiloidinių (senilinių) plokštelių formavimasis, sąlygojamas Aβ kaupimosi bei viduląstelių neurofibrilinių Tau-baltymo raizginių formavimasis yra pagrindiniai AL charakterizuojantys veiksniai [4, 5, 22], kurie lemia pataloginių procesų pasireiškimą ligos metu [23]. Aβ baltymas laikomas vienu iš pagrindinių iniciatorių, skatinančių viduląstelinio Ca^{2+} koncentracijos didėjimą, oksidacinio streso pasireiškimą bei receptorių tarpininkaujamos ląstelių žūties kaskados aktyvaciją [23].

1.2. AL patogenezė ir ryšys su beta amiloido (A β) baltymu

1.2.1. Amiloido baltymo pirmtakas (APP)

Amiloido baltymo pirmtakas (APP) – 110–130 kDa integralusis transmembraninis baltymas, randamas įvairių tipų ląstelėse [24]. Dažniausiai yra aptinkamos keturios baltymo izoformos, sudarytos iš 695, 563, 751 ir 770 amino rūgščių [25]. APP751 ir APP770 izoformos, turinčios Kunitz serininės proteazės slopiklio domeną (KPI), dažniausiai nustatomos daugelyje audinių, o trumpiausioji izoforma APP695, neturinti KPI domeno, gausiausiai sintetinama neuronuose ir yra laikoma pagrindine APP forma CNS [26]. Ląstelėse APP sutinkamas plazminėje membranoje, endoplazminiame tinkle, Goldžio komplekse bei lizosomų, endosomų ir mitochondrijų membranose [24, 27]. Žinoma, kad APP yra daugiafunkcinis baltymas, kuris dalyvauja daugelyje biologinių procesų bei įtraukiamas į įvairius signalinius kelius: APP siejamas su ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos procesais [28–30], dalyvauja sinaptogenezėje [31, 32] bei neuronų vystymesi [33–35], o anti-APP antikūnai blokuoja atminties formavimąsi *in vivo* [36]. Manoma, kad APP baltymas skatina NMDA receptorių (NMDA-R) kaupimąsi neuronų posinapsiniame regione. Nustatyta, kad CGC bei hipokampo neuroninių ląstelių kultūrose APP skatina NMDA-R kaupimąsi neuroninių ląstelių paviršiuje, slopindamas receptorių endocitozę, parodant, jog ši APP funkcija gali būti bendra visoms ląstelėms, ekspresuojančioms NMDA-R [31]. APP brendimas yra reguliuojamas žievės neuronų diferenciacijos metu ir siejamas su subrendusių neuronų fenotipu ir funkcijomis [35].

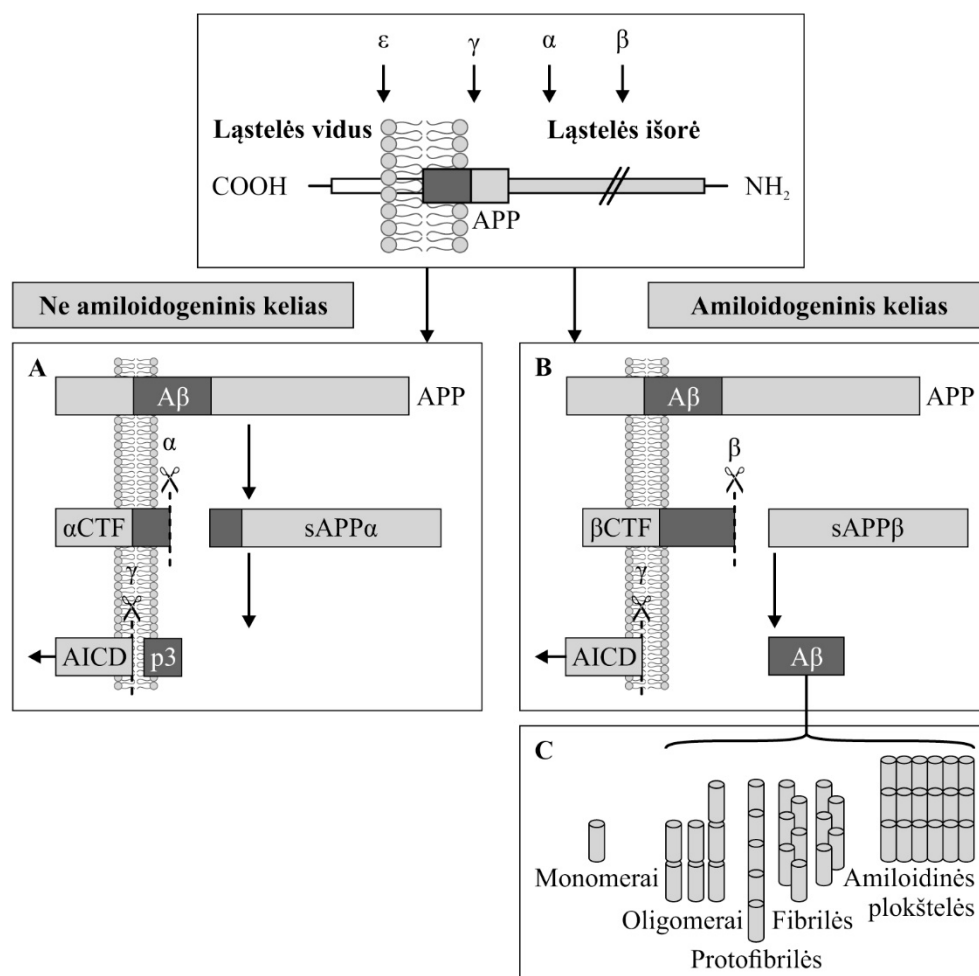
APP proteolitinis skilimas vyksta dalyvaujant trimis skirtingoms sekretazėms bei jų kompleksams, kurie siejami su AL vystymusi [37]. Išskiriami du APP skaidymo ir apdorojimo keliai (1.2.1.1 pav.): išorinis (β/γ sekretazės skėlimas) – amiloidogeninis kelias ir transmembraninis (α/γ sekretazės skėlimas) – ne amiloidogeninis kelias. Ne amiloidogeninio skilimo metu (1.2.1.1 pav. A) α -sekretazė skelia APP baltymą ties 83 a. r. nuo peptido C-galo, ties A β sekos viduriu. Šio proceso metu į ląstelės išorę yra atpalaiduojamas didelis, tirpus APP fragmentas sAPP α bei membranoje lieka C-galinis fragmentas α CTF (C83) [35], kurį skaido γ -sekretazė. Šio α/γ sekretazės skėlimo metu nesusiformuoja A β peptidai [4, 38, 39]. Membranoje pasilikęs amiloido domenas AICD, perduoda signalus iš membranos į branduolį per epigenetinę moduliaciją genų ekspresijos metu [40].

APP skilimo kelias kurio metu susiformuoja kelių tipų A β peptidai (38, 40, 42 aminorūgščių liekanų ilgio), vadinamas amiloidogeniniu (1.2.1.1 pav. B). Jo metu APP baltymo skilimas vyksta dalyvaujant β - ir γ -sekretazėms (β/γ sekretazės skėlimas). Šio skilimo metu už ląstelės ribų atpalaiduojamas tirpus

peptidas sAPP β bei membranoje lieka 99 a. r. β CTF (C99) peptidas [35]. Tolesnio β CTF skėlimo metu, veikiant γ -sekretazei inicijuojama A β gamyba. Tokiu būdu sintetinami apie 90 proc. A β_{1-40} bei 10 proc. A β_{1-42} peptidai, kurie agreguojasi į didesnius darinius. Susidarę A β oligomerinės ir galiausiai netirpios makroskopinės fibrilinės struktūros suformuoja amiloidines plokšteles (1.2.1.1 pav. C), kurios laikomos vienomis pagrindinių AL patologinių veiksnių [4, 24, 35, 39].

Žinoma, kad APP geno mutacijos padidina A β_{1-42} peptido kiekį, kuris amiloidinių plokštelių pavidalu kaupiasi smegenyse [43]. Nustatyta, kad veikdamas per serpino receptorių, APP geba pats inicijuoti toksinio poveikio pasireiškimą neuronams [44, 45]. *In vivo* tyrimų metu, atliekant A β_{1-40} mikroinjekcijas į suaugusių žiurkių patinų smegenų žievę, imunohistocheminė audinių analizė parodė, kad mikroinjekcijų zonose bei hipokampo srityse buvo stebimos A β_{1-40} sankaupos. Jos iniciavo neuronų ir neuritų degeneraciją ir nuo koncentracijos priklausomą neuronų žūtį. Kontrolinėse žiurkių grupėse, kurioms buvo atliktos smegenų mikroinjekcijos ne su amiloidiniu peptidu A37, neuritų bei neuronų degeneracija nebuvo nustatyta [44].

Žinoma, kad pats APP nėra neurotoksiškas, tačiau prisideda prie neuronų jautrumo, esant neląstelinėms pažaidoms [46]. Nustatyta, kad pirminės pelių žievės neuroninių ląstelių kultūras veikiant sintetiniu A β_{1-42} bei padidintu kiekiu glutamato, buvo stebima pilna neuronų degeneracija. Tirdami NMDA receptorių specifiškumą A β poveikiui tyrėjai nustatė, kad ilgalaikė ląstelių inkubacija su A β_{1-42} padidino tolesnį neurotoksiškumo pasireiškimą per mažo intensyvumo glutamato receptorių veikimą [46]. Nors iki galo nėra aišku kaip APP sukelia neurofibrilinių raizginių formavimąsi ir neuronų žūtį, žinoma, kad jis dalyvauja kalcio homeostazės sutrikdyje ir sukelia viduląstelinio kalcio koncentracijos didėjimą, kas gali paaiškinti neurofibrilinių raizginių susiformavimą [45]. Kaip APP sutrikdo kalcio homeostazę nėra iki galo žinoma, tačiau bendras mechanizmas siejamas su kalcio tarpininkaujamu neuronų žūties mechanizmu [45].



1.2.1.1 pav. APP proteolizės schema

(A) – APP proteolitinis skilimas, dalyvaujant α/γ sekretazių kompleksams (ne amiloidogeninis kelias). α -sekretazė skiria APP baltymą A β sekos viduryje: atpalaiduojamas tirpus sAPP α fragmentas, membranoje paliekamas α CTF fragmentas, kuris veikiant γ -sekretazei skiriamas iki p3 peptido bei amiloidinio viduląstelinio domeno AICD; (B) – APP proteolitinis skilimas, dalyvaujant β/γ sekretazių kompleksams (amiloidogeninis kelias). β -sekretazė skiria APP baltymą už A β , atpalaiduojamas sAPP β fragmentas, membranoje paliekamas β CTF fragmentas, kuris veikiant γ -sekretazei skiriamas iki AICD domeno ir atpalaiduojamas 38–42 a. r. ilgio A β peptidas. Paveikslas pritaikytas naudojantis [35, 41] šaltiniais. (C) – A β agregacijos schema: APP amiloidogeninio skilimo metu susidaranti A β monomerinė forma agreguoja ir sudaro dimerines bei oligomerines formas, kurios suformuoja fibriles. Amiloidinių fibrilių kaupimosi metu susidaro amiloidinės plokštelės [42].

Detalesnis A β agregacijos aprašymas pateikiamas 1.2.2 skyriuje (žr. 17 psl.).

1.2.2. Beta amiloido (A β ₁₋₄₂) agregacija ir toksiškumas

Proteolitinis APP skilimas, susidarant A β monomerams, yra fiziologinis procesas, kurio metu A β yra pašalinamas iš smegenų ir degraduojamas, o sutrikus pusiausvyrai tarp A β gamybos bei šalinimo gali būti inicijuojami patologiniai procesai, sukeliantys AL simptomus [3]. Fiziologinėmis sąlygomis užląstelinės monomerinės A β formos su lipoproteinų receptoriais susijusio baltymo 1 (LRP1) yra pernešamos per smegenų kraujo barjerą ir patekusios į kraują, proteazių, tokių kaip neprilizinas, nuo cinko priklausomų metaloproteinazių, insulino degradacijos fermentų ar angiotenzino konvertuojančio fermento yra degraduojamos [47]. Nustatyta, kad mažos monomerinio A β koncentracijos pasižymi antioksidacinėmis ir neuroapsauginėmis savybėmis. Slopindamos superoksido sukeltą Fe(III) redukciją, jos apsaugo ląsteles *in vitro* nuo galimos lipidų peroksidacijos ir pereinamųjų metalų sukeltų oksidacinių pažeidimų [48]. Mažos pikomolinės A β ₁₋₄₂ koncentracijos padidina sinapsių plastiškumą ir dalyvauja atminties formavimosi procesuose [49] bei skatina neurogenezės procesą esant *in vitro* bei *in vivo* sąlygoms [50]. Tai rodo, jog A β atlieka daug fiziologinių funkcijų, kurios svarbios neuroninių ląstelių išgyvenamumui. Visgi, A β laikomas vienu pagrindinių AL pataloginių veiksnių, kurio agregacija vaidina svarbų vaidmenį ligos patogenezėje [51]. Beta amiloido baltymas (A β) yra ~4 kDa dydžio ir mažos molekulinės masės, savaime besiagreguojantis polipeptidas [38, 43, 52, 53]. Nors A β gaminamas monomerinės formos, šios molekulės yra linkusios greitai agreguoti ir sudaryti įvairių dydžių multimerinius kompleksus nuo mažų tirpių oligomerų, profibrilių bei netirpių fibrilių ir galiausiai amiloidinių plokštelių sankauptų (1.2.1.1 pav. C) [38, 43, 52, 53].

Yra išskiriami du pagrindiniai dominuojantys A β peptidai – A β ₁₋₄₀ ir A β ₁₋₄₂. Monomeriniai A β ₁₋₄₀ ir A β ₁₋₄₂ gaminami įvairių tipų ląstelėse ir esant fiziologiškai reikšmingoms koncentracijoms nepasižymi citotoksiniu poveikiu [54]. A β monomerai dažniausiai būna sudaryti iš α spiralinės struktūros, tuo tarpu pakitusios formos polimerai turi daug β klostinių struktūrų. Vyksiant konformaciniams pokyčiams, β klosčių skaičiaus gausėjimas padidina homofilines sąveikas ir sukelia A β oligomerų susidarymą [39, 55]. Nustatyta, kad tirpūs 3–10 nm A β ₁₋₄₂ oligomerai [56], lyginant su A β ₁₋₄₂ monomerais ir netirpiomis fibrilėmis, yra toksiškiausia forma [4, 52, 53]. A β ₁₋₄₂ oligomerai skirstomi į dimerus, trimerus, tetramerus [57], pentameras ir dekameras [58], iš A β kildinamus difuzinius ligandus, dodekameras ir A β *56 [59]. Toksiškiausios peptido dalelės, manoma, yra nuo dimero, trimero iki dvylikos peptido ilgio dodekamerų [60]. *In vitro* sąlygomis A β ₁₋₄₀ būna stabilesni ir ilgesnį laiką išlieka monomerinės būsenos, lyginant su ilgesniąja A β ₁₋₄₂ forma [61]. A β ₁₋₄₂ monomerai yra linkę greičiau sudaryti didesnius darinius bei

pasižymi savybe suformuoti stabilias tirpių $A\beta_{1-42}$ oligomerinių formų struktūras [62] bei išlaikyti įvairiasnę struktūrą, sudarytą iš monomerų, dimerų, trimerų, tetramerų iki tol, kol agreguojasi į fibriles [61, 63]. $A\beta_{1-42}$ gebėjimas greičiau oligomerizuotis siejamas su didesniu peptido toksiškumu ląstelėms. Nustatyta, kad $A\beta_{1-42}$ lyginant su $A\beta_{1-40}$ peptidais, labiau veikia ląstelių gyvybingumą, o oligomerinės $A\beta_{1-42}$ formos pasižymi didesniu toksiškumo laipsniu ląstelėms, lyginant su monomerinėmis ir fibrilinėmis $A\beta_{1-42}$ formomis [64]. Toksiškumo ląstelėms priklausomybė nuo $A\beta_{1-42}$ agregatų dydžio ir koncentracijos buvo patvirtinta ir kitų tyrėjų, kurie atliko tyrimus su pelių neuroblastomos ląstelių N2 linijomis. Parodyta, kad $A\beta_{1-42}$ agregatai, lyginant su $A\beta_{1-40}$, pasižymi stipresniu toksiniu poveikiu jau esant mažoms agregatų koncentracijoms (50 nM–5 μ M) ir citotoksiškumo laipsnis didėja atitinkamai didėjant peptidų agregacinei būsenai. Visgi, mažiausiai toksiniu poveikiu pasižymėjusi monomerinė $A\beta_{1-42}$ forma, esant didesnėms koncentracijoms (5 μ M) taip pat sukelia ląstelių žūtį, priešingai nei $A\beta_{1-40}$ monomerai, kurie net esant didesnėms koncentracijoms (15 μ M) nėra toksiški [65]. Nustatyta, kad neuronai išskirti iš skirtingų smegenų regionų yra panašiai jautrūs $A\beta_{1-42}$ oligomerams, bet nėra jautrūs $A\beta_{1-42}$ monomerams bei fibrilėms [52]. Tyrimai su pirminėmis neuronų bei mišriomis neuronų-glijos ląstelių kultūromis parodė, kad tik maži $A\beta_{1-42}$ oligomerai sukelia nuo koncentracijos priklausomą neuronų žūtį žiurkių smegenėlių ir didžiųjų pusrutulių kultūrose. Nustatyta, kad $A\beta_{1-42}$ oligomerų toksiškumas tiesiogiai priklauso nuo agregatų dydžio. Maži 1 μ M $A\beta_{1-42}$ oligomerai po 24 val. inkubacijos ląstelių kultūrose sukelia stiprią neuronų žūtį ir CGC ląstelių gyvybingumas išlieka tik 10–40 proc. Parodyta, kad poveikis mažėjo atitinkamai didėjant $A\beta_{1-42}$ agregatų dydžiui ir esant 5–9 nm $A\beta_{1-42}$ poveikio ląstelėms nebuvo nustatyta [52].

$A\beta$ agregatų koncentracija, agregacinė būsena bei peptido dalelių dydis yra svarbūs veiksniai, lemiantys agregatų toksiškumo laipsnį. Dėl skirtingo $A\beta$ agregatų toksinio poveikio iki šiol nėra žinoma, kaip $A\beta$ struktūra veikia peptido funkcijas bei per kokius mechanizmus pasireiškia tiesioginis ir netiesioginis $A\beta$ neurotoksinis poveikis ląstelėms.

1.2.3. $A\beta$ baltymas ir jo ryšys su amiloidinės kaskados hipoteze

Amiloidinės kaskados hipotezė teigia, kad smegenyse vykstantis laipsniškas ir lėtinis $A\beta$ gamybos ir šalinimo pusiausvyros sutrikimas veda prie komplekso ląstelių ir molekulinų pokyčių. Šie pokyčiai tiesiogiai siejami su amiloidinių plokštelių formavimusi ir laikomi AL patogenezės priežastimi. Atsiranda vis daugiau tyrimų rodančių, jog ne amiloidinės sankaupos, o įvairios $A\beta$ peptido formos koreliuoja su sinapsių pažeidimu ir pažinimo funkcijų sutrikimu gyvūnų modeliuose ir yra siejamos su glijos ir neuronų

disfunkcijomis [66]. Amiloidinės kaskados hipotezė išlieka prieštaringa ir dėl to, jog neurotoksinės A β rūšys ir jų poveikio pobūdis neuronų funkcijoms nėra nustatytos *in vivo*. Visgi, yra duomenų, jog tirpūs A β oligomerai, bet ne monomerai ar netirpios amiloidinės fibrilės gali sukelti sinapsių pažaidas AL sergančių pacientų ir modeliųjų gyvūnų smegenyse [43]. Nustatyta, kad transfekuotų žiurkėnų kiaušidžių ląstelių augimo terpės mikroinjekcijos į žiurkės smegenis *in vivo* sukėlė ilgalaikės potenciacijos (LTP), susijusios su atminties formavimusi, slopinimą [67]. Injekuotose terpėse buvo aptinkamos fiziologiškai randamos A β oligomerų koncentracijos. Tai rodo, kad tirpūs A β oligomerai, o ne monomerai ar fibrilės yra atsakingi už sinapsių plastiškumo sutrikdymą. Kita amiloidinės hipotezės problema siejama su nenustatytu tiesioginiu A β sankaupų ryšiu su neuronų žūtimi [43]. *In vitro* PDAPP transgeninių pelių modelių tyrimai parodė, kad A β sukelia neuronų distrofiją ir gliozę, tačiau poveikio neuronų gyvybingumui neturi [68]. Nustatyti neuritų ir glijos morfologiniai pokyčiai rodo, kad neurodegeneraciniai AL pokyčiai siejami su specifinių A β sankaupų subtipais [69]. Oligomerinė amiloidinės kaskados hipotezė išskiriama kaip vienas iš galimų AL aiškinančių mechanizmų [70, 71]. Remiantis ja, tirpūs mažos molekulinės masės A β oligomerai atlieka svarbesnį vaidmenį sinapsių bei neuronų pažeidimuose, lyginant su netirpiais fibriliniiais A β komponentais [71], o A β toksiskumas apsprendžiamas tirpios A β frakcijos, todėl daugelyje tyrimų stebimas būtent tirpių A β oligomerų toksinis poveikis [72]. *In vitro* bei *in vivo* tyrimai rodo, kad AL simptomų pasireiškimas ir neuronų žūtis nekoreliuoja su amiloidinių sankaupų kiekiu skirtinguose smegenų regionuose [72, 73]. Didesnė toksinio poveikio koreliacija su AL sunkumo laipsniu yra nustatoma su tirpiomis oligomerinėmis, bet ne fibrilinėmis A β formomis [74]. *In vivo* tyrimai su pelių smegenų pjūviais bei ląstelių linijomis parodė, kad A β oligomerai pakeičia dendritinių ataugų tankį ir taip pažeidžia hipokampo neuronų sinapsių plastiškumą [75, 76]. Nustatyta, kad dimerai yra mažiausia sinaptotoksiniu poveikiu pasireiškianti A β oligomerų forma [72, 77]. Transgeninių pelių tyrimai parodė, kad senyvo amžiaus pelių smegenyse daugiausia aptinkamos tirpios mažų A β oligomerų formos (dimerai, trimerai). Jų kaupimasis smegenyse patobimas anksčiau nei susiformuoja fibrilinės amiloidinės plokštelės bei įvyksta neuronų žūtis, astrogljos proliferacija ar pasireiškia atminties sutrikimai [72]. Tačiau transgeninių pelių modeliuose, kuriuose amiloidinių plokštelių patologija atitinka AL patologiją, neuronų žūtis pasireiškia jau ankstyvuojų laikotarpiu ir vėlyvame amžiuje nestebima [68, 72]. Atlikta suaugusių (17 mėn.) transgeninių pelių, jaunesnio amžiaus pelių (9, 12 mėn) ir kontrolinių laukinio tipo pelių palyginamoji analizė parodė, kad 17 mėn. pelėse amiloidinių plokštelių kiekis buvo didžiausias lyginant su kitomis

grupėmis, tačiau jų poveikyje nebuvo stebima neuronų žūtis. Nustatyta pažeidžiamiausia limbinė smegenų sritis [68, 72].

Žinoma, kad toksinio poveikio pasireiškimui transgeninių gyvūnų modeliuose reikalingos mikromolinės Aβ koncentracijos [78, 79], tuo tarpu smegenyse Aβ koncentracijos yra milijoną kartų mažesnės ir siekia pikomolines koncentracijas [74, 80, 81]. Teigiama, kad būtent dėl šios priežasties Aβ toksinio poveikio pasireiškimą AL metu sąlygoja ir kiti veiksniai. Manoma, jog viduląstelių Aβ sankauptų sukeltas uždegiminis atsakas, kuris vėliau sustiprinamas tau baltymo agregacijos [82] gali lemti AL pasireiškimą. Amiloidinė kaskados/uždegiminė hipotezė išskiriama kaip dar vienas galimas AL aiškinantis mechanizmas, kuriame svarbią vietą užima mikroglijos ląstelės.

1.2.4. AL mechanizmai ir jų ryšys su Aβ baltymu

Uždegiminė hipotezė teigia, kad toksinis Aβ peptidų poveikis neuronams gali pasireikšti netiesiogiai per mikroglijos ląstelių aktyvinimą. Aktyvacijos metu inicijuojami prouždegiminiai procesai, lemiantys citokinų, chemokinų, aktyvių deguonies ir azoto formų bei įvairių skilimo fermentų išleidimą, lydimą degeneracinių pokyčių neuronuose [83–85]. Ankstyvuojant AL laikotarpiu mikroglijos ląstelių aktyvinimas skatina Aβ šalinimą per mikroglijos receptorių gaudykles (angl. *microglia's scavenger receptors*) [63]. Nuolatinė mikroglijos ląstelių aktyvacija, veikiant Aβ per CD36 [86], Fc ir „toll-like“ receptorius (TLR) [87], bei galutinių glikozilinimo produktų receptorius (RAGE) [88] padidina Aβ gamybą bei sumažina Aβ šalinimą ir yra siejami su neuronų žūtimi [89]. Yra išskiriami du neurouždegimą sukeliantys keliai – Aβ sukeltas neurouždegimas per mikroglijos ląstelių aktyvaciją ir Aβ sukelta mikroglijos ląstelių aktyvacija, vedanti prie neurouždegiminių procesų [90].

Aβ sukelta mikroglijos ląstelių aktyvacija skatina prouždegiminių citokinų, tokių kaip (IL)-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, aktyvių deguonies ir azoto junginių bei chemokinų išsiskyrimą [91] bei neuroninių pažaidų atsiradimą [92]. Prouždegiminiai citokinai sukuria chronišką ir save palaikančią uždegiminę sąveiką tarp aktyvuotos mikroglijos ląstelių, astrocytų, paveiktų neuronų ir Aβ plokštelių. Pagrindinis tokios sąveikos veiksnys – padidėjusi IL-1 gamyba [85]. Esant IL-1 pertekliui inicijuojama neuronų žūtis [93]. Nustatyta, kad padidėjusi IL-1 raiška lemia distrofinių neuritų formavimąsi amiloidinėse plokštelėse [94, 95]. Parodyta, kad neuronų žūtis gali būti susijusi su tiesioginiu IL-1 neuronų β-APP sintezę skatinančiu poveikiu, vedančiu prie Aβ gamybos. Šiuo atveju Aβ tiesiogiai aktyvina mikroglijos ląsteles ir taip padidina IL-1β raišką [96]. Mišrioje astrocytų–mikroglijos ląstelių kultūrose TNF-α ir IL-1 tiesiogiai skatina mikroglijos proliferaciją [97] ir padidina IL-1 bei IL-6 gamybą [98, 99].

Vienas seniausių mechanizmų, aiškinančių A β vaidmenį AL patologijoje, paremtas cholinergine neuronų disfunkcija [100]. Teigiama, kad padidėjusi A β gamyba, kuri siejama su sAL ir šAL yra lydimas ne tik pagrindinių pataloginių žymenų – amiloidinių plokštelių ar neurofibrilinių raizginių formavimosi, tačiau taip pat aiškinama atsirandančia nervinių impulsų disfunkcija [101]. Nustatyta, kad A β oligomerai sukelia sinapsių pažaidas, incijuoja pakitusią glutamato pernašą ir sąlygoja ilgalaikės potenciacijos pažeidimus, lydimus neuronų žūtis [102]. *In vitro* ir *in vivo* tyrimai rodo ryšį tarp cholino acetiltransferazės (ChAT) ir acetilcholinesterazės (AChE) aktyvumo, acetil-cholino (ACh) lygio mažėjimo [103] bei A β agregacijos ir toksiškumo [104, 105]. Šie procesai siejami su pažintinių funkcijų blogėjimu AL metu [106]. Nustatyta, kad suaugusių žiurkių hipokampo, smegenų žievės ir dryžuotojo smegenų kūno pjūviuose aptinkami A β peptidai (A β _{1–40}, A β _{1–42}, A β _{1–28}, A β _{25–35}) slopina cholinerginių signalų perdavimą *in vitro* [103]. Pastebėta, jog visi A β peptidai ekvivalentiškai sumažino signalų perdavimą ir būtent 25–38 a.r. A β regionas buvo atsakingas už minėtuosius efektus. Kitame tyrime, atliktame su neuroninių ląstelių linijomis tyrėjai nustatė, kad A β _{25–35} ir A β _{1–28}, lyginant su A β _{1–42}, pasižymi mažesniu acetilcholino lygį mažinančiu poveikiu cholinerginėse neuroblastomos SN56 ląstelių kultūrose ir šis mažėjimas siejamas su minėtąja 25–38 a.r. A β seka [107]. Ilgalaikis A β poveikis (2–14 d.) sumažina acetilcholino aktyvumą tam tikruose smegenų regionuose [108] bei ląstelių kultūrose [107], sukeldamas cholinerginių neuronų pažeidimus ir praradimą [108] priklausomą nuo inkubacinės trukmės bei koncentracijos [107]. Visgi, parodyta, kad A β gali ne tik sumažinti, tačiau ir padidinti AChE aktyvumą neuroninėse ląstelėse. Tai buvo patvirtinta karcinomos ir neuroblastomos ląstelės veikiant A β _{1–40} ir A β _{25–35} peptidais [109]. Žinoma, kad toksinio A β peptido monomerinės ir oligomerinės formos prisideda prie neuronų degeneracijos labiau nei netirpios A β formos, tačiau pasireiškęs toksinis poveikis nebūtinai siejamas su cholinerginių funkcijų sutrikdymu [110, 111]. Nustatyta, kad amiloidinės sankaupos sukelia cholinerginių skaidulų praradimą smegenų žievėje, nepažeidžiant neuronų. Transgeninių pelių tyrimai rodo, kad žievės cholinerginis praradimas yra sukeltas amiloidinių sankaupų, tačiau nėra lydimas neuronų žūtis [112]. Ryšys tarp cholinerginių parametrų ir A β sankaupų pateikiamas įvairiuose tyrimuose, tačiau iki šiol trūksta žinių, ar šis ryšys gali būti susijęs su ankstyvąja AL patologija [113]. Manoma, kad neurotoksinis A β peptidų poveikis cholinerginiams parametrų yra antrinis reiškinys, sekantis po cholinerginių neuronų žūtis [107]. Ryšys tarp A β toksinio poveikio neuronams ir cholinerginių mechanizmų yra laikomas amiloidinės hipotezės dalimi [114].

Kitas AL pažaidų mechanizmas toksinio Aβ poveikio pasireiškimą aiškina per poveikį mitochondrijoms. Teigiama, kad su amžiumi susijusi mitochondrijų disfunkcija inicijuoja Aβ kaupimąsi, sinapsių degeneraciją ir neurofibrilinių raizginių formavimąsi [115]. Nustatyta, kad dviejų mėnesių transgeninių AL pelių žievės neuronų mitochondrijose ir N2a neuroninių ląstelių mitochondrijose aptinkamos monomerinės ir oligomerinės Aβ formos, kurios sąveikauja su mitochondrijų baltymais. Šios sąveikos metu stebima padidėjusi H₂O₂ gamyba, sumažėjęs citochromo c oksidazės aktyvumas (COX) bei ATP kiekis [116]. Tyrėjai taip pat nustatė, kad tik tirpios Aβ₁₋₄₀ ir Aβ₁₋₄₂ formos tiesiogiai siejamos su H₂O₂ lygio kitimu, netirpių Aβ formų poveikis nebuvo nustatytas. Autoriai teigia, kad padidėjusi H₂O₂ ir karbonil baltymų gamyba, bei sumažėjęs citochromo c oksidazės aktyvumas rodo Aβ gebėjimą pereiti mitochondrijų membraną ankstyvuojų ligos laikotarpiu, sukelti mitochondrijų oksidacinius pažeidimus bei inicijuoti neuronų žūtį [117]. Tyrimai su transgeninių AL pelių modeliais taip pat parodė, kad neuroninės ląstelės išskirtos iš transgeninių pelių (TgmAβPP/ABAD), kurios ekspresuoja mutuotą AβPP formą ir Aβ-jungiančią alkoholdehidrogenazę, pasižymi sumažėjusiu ATP lygiu, citochromo c oksidazės aktyvumu ir sumažėjusiu gliukozės sunaudojimu [118]. Kiti tyrėjai nustatė, kad neuronai, išskirti iš TgmAβPP/ABAD transgeninių pelių, generuoja daugiau H₂O₂ ir O₂⁻ bei turi mažiau ląstelinio ATP. Parodyta, kad transgeninių pelių neuronuose buvo stebimas citochromo c oksidazės aktyvumo sumažėjimas bei kaspazės-3 aktyvumo padidėjimas, kuris sukėlė neuronų apoptozę [117]. Tyrimai, paremti citoplazminių AL hibridų (cibridų) modeliais, Aβ toksinio poveikio pasireiškimą taip pat aiškina per jų poveikį mitochondrijoms [119, 120]. Tyrimai su cibridinėmis ląstelių kultūromis, kurios buvo sukurtos neuroblastomos SH-SY5Y ląstelių mitochondrinę DNR pakeitus į žmonių sergančių sAL trombocitų mitochondrinę DNR, parodė, kad cibriduose buvo stebimas dvigubai didesnis Aβ₁₋₄₀ ir Aβ₁₋₄₂ kiekis ir kaspazės-3 aktyvumas [119]. Cibridinių AL ląstelių inkubacija su antioksidantu S(-)-pramipeksolu, kuris yra efektyvi H₂O₂ ir O₂⁻ gaudyklė [121], pasižymėjo Aβ sintezę mažinančiu poveikiu [119]. Duomenys leidžia teigti, kad mitochondrijų pažaidos AL pažeistose smegenyse sustiprina Aβ sintezę, tačiau mitochondrinių pažaidų mechanizmas Aβ apibūdina kaip smegenų biožymenį, tačiau ne kaip AL priežastį [71].

Nors AL patogenezę siejama su įvairiais pažaidų mechanizmais [122–126], tačiau Aβ laikomas pagrindiniu veiksniu inicijuojančiu AL pasireiškimą per skirtingus kelius. Todėl manoma, kad amiloidinė kaskados hipotezė yra pagrindinis AL patogenezę aiškinantis mechanizmas, o Aβ laikomas vienu iš svarbiausių AL veiksnių [10, 43].

1.2.5. Aβ agregatų tiesioginis poveikis sinapsėms ir neuronų gyvybingumui

Aβ agregatų toksiškumas siejamas su tiesiogine jų sąveika su ląstelių membranomis ir ląstelės paviršiaus receptoriais. Manoma, kad Aβ peptidų jungimasis su ląstelės paviršiaus baltymais skatina jų pernašą į ląstelę ir lemia membranos integralumo pažeidimus [127–129]. Užląsteliniai Aβ oligomerai jungdamiesi prie ląstelių membranų paviršiaus sutrikdo receptorių funkcinę veiklą, sąlygodami sinapsines pažeidas ir neurodegeneraciją [130]. *In vitro* ir *in vivo* tyrimų duomenys rodo, kad sintetiniai ir natūralūs Aβ oligomerai gali sukelti sinapsių pažeidimus [67, 131] ir sutrikdyti nuo NMDA-R priklausomą ilgalaikę potenciaciją (LTP) [127, 132]. *In vivo* tyrimai, kurių metu buvo naudojamos AL sergančių žmonių likvoro aptinkamoms koncentracijoms artimos Aβ peptidų koncentracijos, parodė, kad tirpios oligomerinės, bet ne monomerinės ar fibrilinės Aβ formos sutrikdo sinapsių funkcijas [67]. Nustatyta, kad Aβ dimerų bei trimerų poveikyje yra stebimas žiurkės hipokampo piramidinių neuronų ramybės potencialo sutrikdymas bei aktyvių sinapsių kiekio bei dendritinių spyglių kiekio sumažėjimas [67]. Kitame tyrime minėtoji tyrėjų grupė parodė, jog Aβ sutrikdo sinapsių funkcijas ir *in vitro* sąlygomis [131]. Autoriai nustatė, kad sintetiniai Aβ peptidai sutrikdo sinapsių funkcijas slopindami LTP, tačiau poveikio stiprumas lyginant su fiziologiškai aptinkamu Aβ buvo 200 kartų silpnesnis. Manoma, kad Aβ oligomerų sukeltas LTP slopinimas bei sinapsių pokyčiai yra susiję su NMDA-R pažeidimu ir kofilino bei kalcineurino aktyvinimo keliais [127].

Žinoma, kad Aβ peptidų toksiškumas gali pasireikšti jiems jungiantis prie plazminės membranos receptorių, tokių kaip NMDA, nikotininio acetilcholino receptoriaus ir tachikinino [133]. Oligomerinės Aβ formos gali jungtis su NMDA-R ir α7 acetilcholino (α7nACh-R) receptoriais, ko pasekoje stebima kalcio jonų prietaka į ląstelės vidų, taip sutrikdant kalcio homeostazę [128], kuri reikalinga neuronų fiziologinėms funkcijoms bei gyvybingumui palaikyti. α7nACh-R gali aktyvinti kalcio jonams jautrias baltymų fosfatazes, kurios reguliuoja NMDA-R perdavimą ir sinapsių plastiškumą [134, 135]. *In vitro* tyrimuose nustatyta, kad Aβ_{1–42} oligomerai sukelia žievės neuroninių ląstelių NMDA-R endocitozę, kuri yra susijusi su α7nACh-R ir baltymų fosfatazės aktyvinimu [110]. Aktyvinti α7nACh-R gali prisidėti prie NMDA-R signalų slopinimo [134, 135].

Pagrindinis mechanizmas, kuriuo Aβ sutrikdo kalcio jonų pusiausvyrą yra siejamas su membranos pralaidumu kalcio jonams [128]. Žinoma, kad Aβ ląstelių kultūrose sukelia nereguliuojamą kalcio srautą [128]. Nuo Aβ peptidų priklausomas kalcio jonų paėmimas gali atsirasti netiesiogiai per selektyvius kalcio jonų kanalus, bei tiesiogiai per Aβ formuojamus kanalus [133]. *In vitro*

tyrimai su imortalizuotų pagumburio neuroninių ląstelių kultūrų GT1-7 linijomis [136] bei žmogaus neuroblastomos ląstelėmis SH-SY5Y [137] parodė, kad $A\beta_{1-40}$ ir $A\beta_{1-42}$ oligomerai sukelia membranos pralaidumo didėjimą, lydimą greito viduląstelinio kalcio jonų koncentracijos didėjimo. Autorių teigimu, toks mobilus kalcio judėjimas ląstelėse siejamas su vienu iš $A\beta$ peptidų veikimo mechanizmų, susijusių su šių peptidų gebėjimu įsiterpti į ląstelių membranas ir formuoti jose katijonams nelaidžias poras [136–138].

Žinoma, kad tiesioginė ar netiesioginė $A\beta$ peptidų sąveika su membranos lipidais ar baltymais sutrikdo membranos takumą [139, 140]. Visgi iki šiol nėra aiškiai žinoma kaip vyksta $A\beta$ įsiskverbimas į membranas ir kaip kinta susiformavusių kanalų savybės sąveikoje su $A\beta$ peptidais. Nustatyta, kad $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ peptidai pažeidžia rūgštines lipidines membranas, esant pH 6.0 ir gali prasiskverbti pro lipidų dvisluoksnį [140]. Minėtieji peptidai pažeidžia endosomines membranas sukelia toksinį poveikį, kuris gali pasireikšti iškart po viduląstelinės $A\beta$ gamybos [140]. Tyrimai su dirbtinėmis fosfolipidinėmis membranomis, sudarytomis iš lipidų monosluoksnių mišinio parodė, jog 3–5 nm $A\beta_{1-42}$ ir $A\beta_{1-40}$ oligomerai sukelia membranų laidumo padidėjimą, kuris proporcingas oligomerų koncentracijos didėjimui [138], tuo tarpu monomerinės ir dimerinės formos poveikio membranos laidumui neturi. *In vitro* tyrimai patvirtino ankstesnių tyrėjų rezultatus, jog tirpių $A\beta$ oligomerų poveikyje yra stebimas lipidų dvisluosnio laidumo padidėjimas [138] bei padidėjęs kalcio patekimas į ląstelių vidų [137]. Nustatyta, kad tik $A\beta$ oligomerai pasižymi tokiu pačiu membranos laidumo didėjimu dirbtinėse fosfolipidinėse membranose bei gyvose ląstelėse [141].

Žinoma, kad $A\beta$ suformuoti kanalai tiesiogiai siejami su neurotoksinio poveikiu tada, kai sukelia morfologinius ląstelių pokyčius, esant fiziologinėms nanomolinėms $A\beta$ koncentracijoms [133]. Nustatyta, jog inkorporuoti į fosfolipidines membranas sintetiniai $A\beta_{1-42}$ peptidai greitai suformuoja multimerines į jonų kanalus panašias struktūras [133]. Parodyta, kad jau po 15 min. inkubacinio laikotarpio pelių neuroblastomos ląsteles N2A veikiant tirpiaisiais $A\beta_{1-42}$ oligomerais stebimi greiti neuroninių ląstelių morfologiniai pokyčiai: neuritų granuliacija, neuritų nykimas, neuronų kūno brinkimas, lydimas nuo koncentracijos ir laiko priklausomos neuronų žūties. Autoriai teigia, kad trumpas inkubacinis laikotarpis yra pakankamas $A\beta_{1-42}$ įsiskverbti į neuronų plazminę membraną ir formuoti jonų kanalus, taip sukeliant nuo kalcio priklausomą neuronų žūtį [133], kuri kaip buvo nustatyta, nebuvo sąlygota NMDA-R.

Nors $A\beta$ peptidai sutrikdydami membranų integralumą ir takumą, bei formuodami membranines poras ar kanalus, vedančius prie jonų homeostazės pokyčių, gali prisidėti prie neuroninių ląstelių žūties, visgi, $A\beta$ toksiškumo mechanizmai, kurie lemia neuronų žūtį nėra aiškūs [142].

1.2.6. Netiesioginis A β agregatų toksinis poveikis neuronams

Manoma, kad mikromolinės A β oligomerų koncentracijos siejamos su tiesioginiu toksiniu poveikiu neuronams [64, 143], tuo tarpu nanomolinės A β koncentracijos pasižymi netiesioginiu, neuroninių ląstelių žūtį sukeliančiu poveikiu, kuris pasireiškia per mikroglijos ląstelių aktyvaciją [143, 144].

Mikroglijos ląstelių aktyvacija sąlygoja prouždegiminių citokinų, tokių kaip IL-1 α / β , IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β , MIP-1 α , o taip pat aktyvių deguonies ir azoto junginių gamybą ir išleidimą, ko pasekoje stebimas uždegiminio atsako sustiprinimas, lydimas neuronų žūties [145, 146]. Tyrimai su pirminėmis žiurkės smegenų žievės mikroglijos ląstelių kultūromis parodė, kad ląsteles inkubuojant su sintetinių A β _{1–42} ir A β _{1–40} peptidų fibrilėmis ir fibriliniiais sferoidais (20–200 μ M), stebimas nuo koncentracijos priklausomas IL-1 β padidėjimas. Nustatyta, kad inkubacija su šviežiais A β _{1–42} sąlygojo IL-1 α ir INF- γ gamybą, o A β _{1–40} sferoidai pasižymėjo IL-1 α didinančiu poveikiu. Autoriai teigia, kad šviežiai ištirpinti A β peptidai pasižymi stipresniu uždegiminių citokinų išsiskyrimą skatinančiu atsaku. Manoma, kad IL-1 β , IL-1 α ir INF- γ citokinų ekspresija mikroglijos ląstelėse [146] taip pat siejama su neuronų žūtimi ląstelių kultūrose [147–149] bei distrofinių neuritų formavimusi amiloidinėse plokštelėse AL metu [94]. Kitame tyrime, naudojant cianino3 NHS (Cy3) dažus, žyminčius biomolekulių amino grupes, buvo nustatytas įvairių A β peptidų formų nespecifinis jungimasis prie mikroglijos ląstelių. Žievės mikroglijos ląstelių kultūrą inkubuojant su Cy3 dažais, žyminčiais A β _{1–40} ir A β _{1–42} peptidus, parodyta, kad mikroglijos ląstelės fagocituoja A β _{1–42} oligomerus, protofibriles ir fibriles bei A β _{1–40} fibriles. Mikroglijos bei A β _{1–42} ir A β _{1–40} sąveikos metu buvo nustatyta IL-1 α gamyba, kuri skatino uždegiminio atsako pasireiškimą mikroglijos ląstelėse [150], netiesiogiai inicijuojant tolimesnę neuronų žūties kaskadą. Tyrėjai nustatė, kad A β _{1–42} oligomerai sukėlė stipriausią neuronų žūtį neuroninių ląstelių kultūrose.

Žinoma, kad A β gali veikti astrogliją, kuri išskiria citokinus ir kitas citokines medžiagas, galinčias paveikti neuronus [145]. Tyrimai atlikti su pirminėmis žiurkės neuronų, astrocitų ir mišriomis žievės neuroninėmis ląstelių kultūromis parodė, kad 48 val. ir 72 val. A β _{1–42} oligomerų inkubacija su mišriomis kultūromis sukėlė laktatdehidrogenazės (LDH), kuri siejama su ląstelių žūtimi, padidėjimą. Tačiau pastebėta, kad grynose neuronų kultūrose LDH padidėjimas buvo stebimas tik po 72 val. inkubacijos. Greitesnis ir didesnis LDH išsiskyrimas buvo sąlygotas astrocitų būvimo mišrioje kultūrose. Nustatyta, kad mišrią kultūrą inkubuojant su antiuždegimine medžiaga minociklinu, buvo stebimas LDH sumažėjimas. Autoriai teigia, kad minociklino poveikis apsaugojo ląsteles nuo astrocitų aktyvacijos ir A β _{1–42} oligomerų

sukelto astrocitų uždegiminio atsako pasireiškimo mišriose kultūrose [151]. Kiti tyrimai taip pat rodo, kad astrocitai aktyviai reaguodami į $A\beta_{1-42}$ sukelia neuronų žūties pasireiškimą mišriose kultūrose. Nustatyta, kad astrocitų išleidžiami tirpūs veiksniai jungiasi su neuronų plazminės membranos receptoriais, skatindami įvairius ląstelės signalinius kelius. Žinoma, kad $TNF-\alpha$ jungiasi prie neuronų $Cd120a/b$ receptorių, skatinančių kaspazių aktyvaciją, kuri inicijuoja neuroninių ląstelių žūtį [152]. Mišrias kultūras veikiant $A\beta_{1-42}$ oligomerais taip pat buvo stebimas kaspazės-3 aktyvumo ir prouždegiminių citokinų $CINC2\alpha/\beta$, $IFN-\gamma$, $IL-1\beta$, $IL-1ra$, $IL-6$, $IL-13$, $IL-17$, $IP-10$ ir $INF-\gamma$ kiekio padidėjimas ląstelių augimo terpėje [151]. Šie procesai rodo svarbų astrocitų vaidmenį nulemiant $A\beta$ toksinį poveikį neuronams.

Naujausi *in vitro* tyrimai su mišriomis smegenėlių neuronų ląstelių kultūromis parodė, kad $A\beta$ sukeltas neuronų praradimas ir žūtis fagoptozės būdu inicijuojamas proteinkizacės C ir NADPH oksidazės aktyvacijos [153]. Parodyta, kad selektyvūs proteinkizacės C slopikliai apsaugo nuo $A\beta$ sukulto gyvų neuronų praradimo fagoptozės būdu. Tai patvirtina, kad proteinkinazė C dalyvauja $A\beta$ sukultoje neuronų žūtyje. Nustatyta, kad panašų į $A\beta$ poveikį sukelia proteinkinazės C aktyviklis forbolio-miristato acetatas (PMA). Jo sukeltas neuronų praradimas stebimas tik kultūroje esant mikroglijos ląstelėms [153].

In vitro tyrimuose nustatyta, kad $A\beta$ fibrilių aktyvintos tirozinkinazės signalinis atsakas pirminėse pelių mikroglijos ir žmogaus monocitinių ląstelių THP-1 linijose, sukelia prouždegiminių citokinų ir aktyvių deguonies junginių gamybą [154]. Parodyta, kad mikroglijos ir THP-1 ląstelės veikiant $A\beta_{1-40}$ ir $A\beta_{25-35}$ fibrilėmis, stebima nuo Syk kinazės ir $NF\kappa B$ priklausoma $TNF-\alpha$ gamyba. Žievės neuronų kultūrą 48 val. inkubuojant su THP-1 ląstelių, kurios buvo veiktos $A\beta_{1-40}$ fibrilėmis, terpe buvo stebima neuronų DNR fragmentacija ir neuronų apoptozė. Tyrėjai nustatė, kad $A\beta$ fibrilių sukeltas $TNF-\alpha$ kiekio didėjimas ląstelių auginimo terpėje skatino nuo indukuojamos azoto oksido sintazės (iNOS) priklausomą peroksonitrito ($ONOO^-$) gamybą ir neuronų žūtį [154]. THP-1 ir mikroglijos ląstelių, inkubuotų su $A\beta_{1-40}$ ir $A\beta_{25-35}$ fibrilėmis, augimo terpę preinkubuojant su anti- $TNF-\alpha$ ir vėliau ją inkubuojant su žievės neuronais, buvo nustatytas stiprus neuronų apoptozės sumažėjimas. Visgi, pastebėta, kad augimo terpę papildomai inkubuojant su $TNF-\alpha$, esant anti- $TNF-\alpha$, vėl buvo stebima neuronų žūtis. Tai rodo, kad $TNF-\alpha$ tiesioginio poveikio neuronų gyvybingumui neturi, tačiau dalyvauja iNOS sukultoje ląstelių žūtyje.

Neuronų žūtis taip pat gali būti iššaukta $TNF-\alpha$ inicijuoto glutamato išėjimo ir po to sekančių oksidacinių pažeidimų neuroninėse ląstelėse [147], kurias sukelia sinergistinė $TNF-\alpha$ bei NMDA-R stimuliacija mikroglijos ląstelėse. Veikiamos $A\beta$ peptidų, aktyvintos mikroglijos ląstelės sukelia uždelstą

neuronų žūtį per pažeistų, bet vis dar gyvybingų neuronų fagoptozę [155], [149]. Žinoma, kad TNF- α aktyvina mikroglijos ląsteles ir sukelia NADPH aktyvaciją [154,156], bei nuo mikroglijos ląstelių priklausomą neuronų žūtį fagocitozės būdu [149]. Nustatyta, kad gryną mikroglijos ląstelių kultūrą inkubuojant su TNF- α stebima padidėjusi ląstelių proliferacija, o mišrią ląstelių kultūrą papildžius gryna mikroglijos ląstelių kultūra, veikta TNF- α , stebima padidėjusi neuronų fagocitozė. TNF- α poveikio neuronų skaičiui mišrioje smegenėlių kultūroje neturėjo. Tai rodo, kad TNF- α nėra tiesiogiai toksiškas neuronams, tačiau sukelia nuo mikroglijos ląstelių priklausomą neuronų praradimą [149].

A β peptidams jungiantis prie mikroglijos TLR-2 ir TLR-4, stebimas mikroglijos ląstelių fagocitinis aktyvumas ir NADPH oksidazės sąlygotas aktyvių deguonies formų (ROS) susidarymas [157], kuris kaip teigiama ankstesniuose darbuose, taip pat siejamas su neuronų žūtimi [156]. Žinoma, kad mikroglijos ląstelėse aptinkama NADPH oksidazė aktyvinimo metu sintetina superoksidadą, kuris katalizuojant superoksido dismutazei virsta vandenilio peroksidu (H_2O_2), o NO reaguojant su H_2O_2 susidaro peroksonitritas ($ONOO^-$) [158, 159]. Nustatyta, kad mišrią CGC ląstelių kultūrą inkubuojant su lipoteichoine rūgštimi, kuri skatina uždegiminio atsako pasireiškimą glijos ląstelėse, stebima padidėjusi mikroglijos ląstelių proliferacija ir TNF- α , IL-1 β bei NO gamyba. Pastebėta, kad lipoteichoinė rūgštis taip pat sukelia neuronų tankio sumažėjimą kultūroje, nesukeliant neuronų žūties. Pašalinus mikroglijos ląsteles iš kultūros, lipoteichoinė rūgštis poveikio neuronų skaičiui neturėjo. Tai rodo, jog uždegiminė mikroglijos ląstelių aktyvacija skatina neuronų fagocitozę, o neuronų tankio sumažėjimas buvo nulemtas ne tik prouždegiminių citokinų produkcijos, tačiau taip pat tiesioginės mikroglijos ir neuronų sąveikos. Parodyta, kad mišrią neuronų–glijos ląstelių kultūrą veikiant A β_{25-35} , buvo taip pat stebimas neuronų praradimas, nesukeliant neuronų žūties. Iš mišrios kultūros pašalinus mikroglijos ląsteles A β_{25-35} neuronų skaičiaus taip pat nesumažino [155]. Rezultatai rodo, kad įvairūs ląstelių dirgikliai, tokie kaip LPS, LTA ar A β , sukelia nuo mikroglijos ląstelių priklausomą neuronų tankio sumažėjimą, nulemtą $ONOO^-$ ar mikroglijos ląstelių vykdomos neuronų fagocitozės.

1.2.7. Anti-A β imunoterapija ir A β šalinimas

Manoma, kad A β peptidai yra vieni iš svarbiausių molekulinų AL veiksnių [160]. Tyrimai paremti imunoterapija, taikant antikūnus prieš A β , yra laikomi vienais perspektyviausių ieškant potencialių gydymo priemonių, kurios prisidėtų prie veiksmingo mokymosi, atminties sutrikimų, elgesio pakitimų bei mirštamumo sumažinimo [161] ar amiloidinių plokštelių formavimosi,

distrofinių neuritų bei astrogliozės vystymosi sustabdymo [162]. Imunoterapija, atsižvelgiant į jos taikymo formą, yra skirta dvi pagrindines grupes: aktyviąją ir pasyviąją. Aktyviosios imunoterapijos tikslas sukelti stiprų ląstelinį ir humoralinį antikūnų atsaką per B- ir T-imunines ląsteles [163]. Aktyviosios Aβ-imunizacijos metu naudojamas sintetinis viso ilgio Aβ peptidas ar jo fragmentas konjuguotas su „nešėju“, t. y. egzogeniniu baltymu, leidžiančiu T- ir B-limfocitų sąveikavimą, kuris reikalingas veiksmingam antikūnų atsakui [164, 165]. Ja siekiama sužadinti B limfocitus gaminti specifinius antikūnus, kurie atskirtų Aβ iš smegenų į periferinę sistemą, pašalintų amiloidines plokšteles ir užkirstų kelią jų susiformavimui [166]. Aktyvi imunizacija sukelia taip pat ir T ląstelių atsaką, kuris gali sukelti žalingus imuninius atsakus, tokius kaip prouždegiminių citokinų išleidimą [167]. Pasyviosios imunoterapijos metu naudojami monokloniniai anti-Aβ antikūnai [168–171], kurie pasižymi savybe nesukelti endogeninio imuninio atsako. Ji leidžia sustabdyti antikūnų taikymą pasireiškus nepageidaujamam antikūno poveikiui [167]. Pasyvi imunizacija nukreipta prieš netaisyklingai susilankčiusį toksinį baltymą Aβ ir yra laikoma viena iš perspektyviausių AL gydymo strategijų [171].

Žinoma, kad aktyvi Aβ_{1–42} imunizacija gali apsaugoti jaunas ir suaugusias transgenines peles nuo Aβ kaupimosi [162, 172], o ilgalaikė pasyvi imunizacija, naudojant anti-Aβ antikūnus, sumažina Aβ sankaupų kiekį [173]. Kiekybinė hipokampo Aβ analizė parodė, kad imunizuotose pelėse yra stebimas beveik visiškas amiloidinių sankaupų ir pažeistų neuritų sumažėjimas [162]. Transgeninių pelių tyrimai atskleidė, kad ląstelių imuninis atsakas, nukreiptas prieš Aβ, yra pakankamas norint sustabdyti tolesnį neuropatologinių procesų pasireiškimą AL metu. Nustatyta, kad Aβ_{1–42} imunizacija gali sumažinti ir astrocitozės – su amiloidinėmis plokštelėmis susijusio žymens – pasireiškimą, o monokloninių antikūnų taikymas gali prisidėti prie gliozės formavimosi sustabdymo. Toks Aβ_{1–42} imunizacijos taikymas apsaugo nuo AL vystymosi ir gali būti taikomas kaip prevencinė ar gydymo priemonė [162], apsauganti nuo mokymosi ir atminties sutrikimų [172] bei kognityvinių funkcijų susilpnėjimo [174].

Ikiklinikiniai tyrimai, kurių metu taikoma Aβ imunizacija, leidžia patvirtinti, jog Aβ gamybos ir šalinimo sutrikdymas yra esminis veiksnys, lemiantis AL pasireiškimą [162, 172, 173]. Visgi ryšys tarp Aβ kaupimosi ir atminties funkcijų blogėjimo iki šiol nėra aiškus [175].

Ex vivo pasyvios imunizacijos metu nustatyta, kad anti-Aβ pereina smegenų kraujo barjerą, jungiasi prie amiloidinių plokštelių ir sukelia jų šalinimą per mikroglijos ląstelių Fc receptorių sąlygotą fagocitozę [176]. Anti-Aβ antikūnų aktyvintos mikroglijos ląstelės gausiai aptinkamos susitelkusios aplink amiloidines plokšteles [177]. Nustatyta, kad transgenines peles

injekuoiant anti-A β , stebima padidėjusi mikroglijos ląstelių Fc γ I ir III (CD16 ir CD32) receptorių ir CD45 ekspresija, skatinanti šių imuninių ląstelių aktyvaciją bei amiloidinių san kaupų fagocitozę [177]. Sumažėjęs amiloidinių san kaupų skaičius lydimas minėtų receptorių raiškos sumažėjimo, parodant mikroglijos aktyvacijos sumažėjimo ryšį su amiloidinių plokštelių sumažėjimu.

Ankstesni tyrimai su pelių modeliais parodė teigiamą imunizacijos poveikį kognityvinėms funkcijoms, kuris dažnai buvo lydimas amiloidinių plokštelių skaičiaus mažėjimo. Pirmieji klinikiniai tyrimai su vidutine ir sunkia forma sengančiais AL pacientais [178], taikant aktyviąją imunizaciją nebuvo sėkmingi. Nors tyrimuose naudota sintetinio A β ₁₋₄₂ baltymo ir adjuvanto (Qs-21) vakcina AN1792 iššaukė teigiamą antikūnų atsaką į A β ₁₋₄₂ ir daugiau nei pusei senyvo amžiaus pacientų pagerino kognityvines funkcijas. Visgi, tarp pacientų buvo nustatyti dideli imuninio atsako skirtumai. Daliai pacientų pasireiškė šalutiniai poveikiai, o šešioms procentams pacientų išsivystė aseptinis meningoencefalitas, ko pasekoje tolimesni klinikiniai tyrimai buvo nutraukti [178]. Imunologiniai šių procesų mechanizmai vis dar lieka neaiškūs, kadangi ląstelinis imuninis atsakas į A β nebuvo vertintas su antikūnų sukeltu atsaku. Pacientai su aukštesniu antikūnų lygiu smegenyse turėjo mažiau amiloidinių plokštelių, kas rodė, jog antikūnai šalino A β san kaupus. Visgi, toks šalinimas nebuvo efektyvus ir nepagerino klinikinės ligos eigos [165, 179, 180].

Pasyvios imunoterapijos taikymas AL pacientams, naudojant monokloninius žmogaus antikūnus Bapineuzumabą (antikūnas prieš N-galinį A β regioną) [181, 182] ir Solanezumabą (antikūnas prieš vidurinį A β domeną) [183] taip pat nebuvo sėkmingi ir nesugebėjo pagerinti AL pacientų kognityvinių ir funkcinių savybių. Tiriamosios grupės, kurioms buvo taikoma anti-A β imunoterapija, nesiskyrė nuo placebo pacientų grupių. Manoma, kad tai gali būti siejama su amiloido kaupimusi jau ankstyvuoju AL periodu dar prieš pasireiškiant ligos simptomams [184]. Didžiausias klinikinis tyrimas „EXPEDITION“, kuris buvo pradėtas 2013 metais ir tęsėsi iki 2016 metų, siekė ištirti monokloninio anti-A β Solanezumabo, kuris priskiriamas IgG1 klasei ir rišasi prie A β peptido vidurinio domeno, poveikį AL sergantiems pacientams [185]. Ankstesni transgeninių APP^{V717F} pelių tyrimai parodė, kad monokloniniai anti-A β antikūnai m266.2, iš kurių kildinamas Solanezumabas, sumažino amiloidinių plokštelių kiekį smegenyse ir pasižymėjo stipria sąveika tarp plazmos A β kaupimosi ir plokštelių san kaupų formavimosi [186]. Pirmųjų „EXPEDITION“ ir „EXPEDITION2“ klinikinio tyrimo etapų metu taip pat buvo nustatytas nuo Solanezumabo dozės priklausantis bendro A β kiekio kraujo plazmoje ir smegenų skystyje didėjimas. Autoriai teigia, jog nesurišto A β ₁₋₄₂ kiekis smegenyse rodo Solanezumabo gebėjimą pakeisti A β

pusiausvyrą taip, kad iš amiloidinių plokštelių būtų šalinamas A β [187]. Antro klinikinio tyrimo etapo metu buvo nustatyta, kad jau po 12 savaičių Solanezumabo injekcijų, stebėtas nuo dozės priklausantis smegenų skystyje esančio laisvo A β_{1-42} lygio didėjimas ir priešingai – A β_{1-40} lygio mažėjimas, kuris buvo siejamas su nevienodu A β peptidų santykiu amiloidinėse plokštelėse [185, 187]. Visgi, abiejų tyrimų metu nebuvo nustatytas teigiamas Solanezumabo poveikis vidutine AL forma sergančių pacientų kognityvinėms funkcijoms, nors antrojo etapo metu ir buvo patvirtintas 34 proc. efektyvesnis kognityvinių funkcijų ir 18 proc. funkcinio lygio slopinimo sumažėjimas pacientams su lengva AL forma [185]. Trečioji Solanezumabo klinikinė fazė nebuvo sėkminga. Antikūnas nepagerino kognityvinių ir funkcinio AL pacientų savybių ir tyrimai buvo nutraukti [183]. Kodėl imunoterapijos taikymas klinikuose tyrimuose buvo nesėkmingas ir kokie tikslūs anti-A β sukkelto neurotoksinio poveikio ir uždegiminių reakcijų pasireišimo mechanizmai, nėra žinoma iki šiol. Tikėtina, kad tai gali būti susiję su antikūnų netinkamu ar netikslu taikiniu smegenyse pasirinkimu, ar dėl netinkamai pasirinktos pacientų populiacijos [171]. Naujausi klinikiniai tyrimai su žmogaus monokloniniu antikūnų Adukanumabu siekia sukurti saugią, farmokinetinę bei farmodinaminę Adukanumabo vakciną pacientams, kuriems patvirtinta A β patologija [171]. Nustatyta, kad Adukanumabas (BIIB037), kuris priklauso IgG1 klasei ir selektyviai reaguoja su A β agregatais, įskaitant tirpius oligomeras ir netirpias fibriles, geba pereiti smegenų kraujo barjerą ir pašalinti A β iš amiloidinių plokštelių sankaupų transgeninių pelių modeliuose [188]. Šių ikiklinikinių tyrimų pagrindu tęsiama naujausia klinikinė studija. Adukanumabas sukurtas panaudojant kraujo limfocitus išgautus iš kognityviniu požiūriu sveikų bei neįprastai lėta kognityvinių funkcijų mažėjimo tendencija pasižyminčių senyvo amžiaus pacientų. Pirmojo Adukanumabo klinikinių tyrimų etapo metu, atliekant pozitronų emisijos tomografijos tyrimo analizę parodyta, kad 61 proc. tyrime dalyvavusių pacientų pasižymėjo teigiama A β patologija, didžiausi amiloidinio PET tyrimo balai pasireiškė pacientams su lengva AL, kurie kartu buvo nustatyti kaip ir APOE ϵ 4 nešiotojai. Adukanumabo grupės pasižymėjo geresniu klinikinės demencijos įvertinimu bei A β plokštelės mažinančiu poveikiu jau po 54 savaičių tyrimo, priklausomai nuo dozės ir infuzijos taikymo laiko, tuo tarpu placebo grupės pokyčiai buvo minimalūs. Detalizuota smegenų regioninė analizė, priklausomai nuo taikyto dozės kiekio, parodė A β plokštelių mažėjimą visuose smegenų srityse, išskyrus užpakalinių smegenų tiltą ir požievinę baltąją medžiagą, kuriose A β plokštelės nelinkę kauptis. Įvertinus klinikinius pokyčius po metų infuzijų su Adukanumabu, buvo stebimas nuo dozės priklausomas klinikinės progresijos mažėjimas. Įvertinus Adukanumabo farmokinetines savybes nustatyta, kad viso tyrimo metu farmakokinetika išliko

linijinė (stabili) ir nepriklausė nuo preparatų dozių vartojimo laiko. Vienkar-
tinė Adukanumabo dozė nepaveikė kraujo plazmos ar smegenyse esančio Aβ
koncentracijos. Autoriai teigia, kad tai rodo, jog Adukanumabas nesijungia
prie tirpių Aβ monomerų [171], priešingai nei buvo stebima ankstesniuose
klinikiniuose tyrimuose [170], kurių metu Bapineuzumabo pirmtako antikū-
nas 3D6 pasižymėjo savybe jungtis prie Aβ monomerų, sukeliant trumpalaikį
plazmoje esančio Aβ koncentracijos išaugimą. Tolimesnės Adukanumabo
infuzijos metu panaši plazmoje esančio Aβ koncentracija išliko ir po pakarto-
tinio dozavimo. *In vivo* nustatyta, kad Adukanumabas jungiasi prie visų
smegenyse esančių morfologiškai skirtingų amiloidinių plokštelių tipų, įskai-
tant išsisklaidžiusias Aβ sankaupas ir susiformavusias Aβ plokšteles, bei
sumažina įvairių dydžių amiloidinių plokštelių kiekį [171]. Ankstesni tyrimai
su transgeninių APP751^{swedish}×PS2N141I (PS2APP) pelių modeliais parodė,
kad anti-Aβ monokloninis žmogaus antikūnas Gantenerumas, prisijungiantis
prie visų agregacinės formos Aβ peptidų ir suformuojantis stabilius imuninius
kompleksus su oligomerinėmis ir fibrilinėmis Aβ formomis, jungiasi prie
įvairių amiloidinių plokštelių tipų visuose smegenų regionuose [169]. Nusta-
tyta, kad aplink amiloidines plokšteles su kuriomis reagavo Gantenerumas
buvo aptinkamos išsišakojusios mikroglijos ląstelės, kurių citoplazmoje buvo
aptinkamas ir pats Gantenerumas. Tai rodo, kad antikūnai aktyvina mikro-
glijos ląsteles ir amiloidinių sankaupų šalinimas vyksta fagocitozės būdu
[169], kas taip pat patvirtinta su antikūnu Adukanumabu [171], kurio kliniki-
niai tyrimai tęsiami.

Daug žadantys transgeninių pelių modelių tyrimai ir klinikinės studijos
su AL pacientais rodo, kad Aβ gali būti vienu iš AL veiksmų. Nepaisant pla-
taus kiekio ikiklinikinių ir klinikinių tyrimų, tikslūs mechanizmai, kodėl visi
tyrimai baigiasi nesėkme ir uždegiminio atsako pasireiškimu nėra aiškūs.

1.3. Mikroglija ir jos sąveika su Aβ

1.3.1. Mikroglijos ląstelės ir jų funkcijos

Mikroglijos ląstelės yra pagrindiniai smegenų makrofagai, atliekantys
svarbų vaidmenį neuritų formavimosi, sinapsių plastiškumo bei atkūrimo
procesuose [189]. Šios imuninės ląstelės sudaro apie 10 proc. CNS ląstelių
populiacijos ir priklauso nuo smegenų regiono jų tankis yra pasiskirstęs
ne vienodai [190,191]. Didžiausias mikroglijos ląstelių tankis randamas
pilkoje ir baltoje smegenų medžiagoje. Ypatingai didelis šių ląstelių pasis-
kirstymas stebimas hipokampe, smegenų pusrutulio pamato mazguose ir
juodojoje medžiagoje. Mažesnis tankis nustatytas smegenėlėse ir smegenų
kamiene [190].

Mikroglijos ląstelės atlieka dvi pagrindines funkcijas – imuninę gynybą ir CNS homeostazės palaikymą [192]. Paprastai šios imuninės ląstelės aptinkamos „ramybės“ būsenoje ir pasižymi šiais formai būdinga morfologine išraiška – mažu ląstelės kūnu bei ilgomis, plonomis ir išsišakojusiomis ataugomis [193]. „Ramybės“ būsenoje mikroglijos ląstelės yra mobilios. Judrių ataugų pagalba jos saugo CNS nuo galimų pažeidimų [193, 194], kontroliuodamos neuronų diferenciacijos procesus, bei dalyvaudamos sinapsių formavimesi [192]. *In vivo* tyrimai su transgeninių pelių modeliais rodo, kad mikroglijos ląstelės reaguoja į sinapsių funkcinę būklę ir išsišakojusių ataugų pagalba palaiko trumpalaikius ryšius su neuronų sinapsėmis, prisidedamos prie sinapsinių struktūrų modifikacijos ir nefunkcionuojančių sinapsių šalinimo [195]. Sveikose smegenyse mikroglijos ląstelės palaiko neuronus jų vystymosi metu į aplinką išleisdamos insulino-tipo augimo faktorių 1 (IGF-1), nervų augimo faktorių ir iš smegenų skilties kilusį neurotrofinį faktorių (BDNF) [196]. Netiesiogiai šalindamos neuronų nuolaužas bei fagocituodamos apoptozines ląsteles, mikroglijos ląstelės palengvina naujų neuronų kūrimosi procesą [193].

Fagocitozė yra pagrindinė mikroglijos ląstelių funkcija. Jos metu imunoglobulinai ir komplemento baltymai apsprendžia nepageidaujamų medžiagų fagocitinį šalinimą [191]. *In vitro* tyrimuose su AL sergančių bei neurologiniu požiūriu sveikų žmogaus smegenų žievės mėginiais nustatyta, kad „ramybės“ būsenoje esančios mikroglijos ląstelės išskiria visus β -2 integrinų šeimos baltymus CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1, CR3), CD11c (P150, 95; CR4), CD18 (β -2) bei Fc γ klasės receptorius, kurių raiška padidėja mikroglijos aktyvacijos metu [191]. Pažeidus ląsteles jos išskiria ATP, vyksta ląstelių aktyvacija ir telkiamasis aplink pažeistus regionus [197]. Nustatyta, kad atsipalaidavęs iš apoptozinių bei pažeistų ląstelių, ATP inicijuoja mikroglijos ląstelių fagocitozę [198]. Parodyta, kad pirminę pelės mikroglijos ląstelių kultūrą veikiant A β ₁₋₄₂ oligomerais ir fibrilėmis, stebima ląstelių membranos nuo ATP priklausomų jonų kanalų aktyvacija ir ATP atpalaidavimas, kuris yra lydimas padidėjusios mikroglijos ląstelių migracijos, skatinančios A β fagocitozę per P2Y₂R receptorių aktyvinimą [198]. ATP per P2X₄, P2X₇, P2Y₂, P2Y₆ ir P2Y₁₂ receptorių aktyvaciją iššaukia mikroglijos ląstelių chemotaksį [199], morfologinius membranos pokyčius – membranos susiraukšlėjimą, viduląstelinio kalcio lygio padidėjimą [200]. ATP taip pat sukelia ERK, JNK ir p38 MAP kinazių aktyvaciją ir skatina TNF- α sintezę bei išsiskyrimą iš mikroglijos ląstelių [201]. Tai rodo, kad ATP atlieka svarbų vaidmenį mikroglijos ląstelių aktyvacijoje [202].

Viena iš svarbiausių mikroglijos ląstelių funkcijų AL metu – A β šalinimas [203], kuris siejamas su mikroglijos aktyvacija ir amiloidinių plokštelių

kaupimusi, bei uždegiminio atsako pasireiškimu. Mikroglijos ląstelių receptoriai gaudyklės SCARA-1, SCARB-1, CD36 ir CD40, sąveikauja su A β . Žinoma, kad mikroglijos ląstelės gali jungtis ir fagocituoti A β per SCARA-1 [204]. SCARA-1 receptoriai sąveikaudami su komplemento receptoriais Mac-1/CD11b skatina fibrilinio A β fagocitozę ir prisideda prie A β šalinimo [205]. A β gali aktyvuoti mikroglijos ląsteles per TLR-2 ir TLR-4, kartu inicijuojant fagocitinį mikroglijos ląstelių atsaką į fibrilinio A β ₁₋₄₂ poveikį [157], bei veikiant šių receptorių antagonistams lipotechoinei rūgščiai ar lipopolisacharidui sukelti neuronų praradimą fagocitozės būdu [155]. *In vitro*, *in vivo* ir *in situ* mikroglijos ląstelių kultūrų bei smegenų pjūvių tyrimai rodo, kad mikroglijos ląstelės ekspresuoja glutaminerginius [206], GABA [207], dopaminerginius [208] receptorius, kurie keičia ląstelių elektrofiziologines membranų savybes. Funkciniai glutamato receptoriai (GluR) nėra priskiriami vien neuroninėms ląstelėms, tačiau yra stebimi ir mikroglijos ląstelėse [206]. Funkcinė NMDA receptorių reguliacija mikroglijos ląstelėse iki šiol nėra gerai ištirta [209]. Nustatyta, kad NMDA injekcijos į žiurkės naujagimių smegenų somatosensorinę žievę sukelia neuronų praradimą bei trumpalaikę mikroglijos ląstelių aktyvaciją [210], tuo tarpu NMDA-R antagonistas MK-801 apsaugo mikroglijos ląsteles nuo minėtųjų procesų ir piramidinių hipokampo neuronų žūties [211] ar LPS sukeltos mikroglijos ląstelių aktyvacijos [212]. Aktyvintos mikroglijos ląstelės prisideda prie neurosiuntiklių homeostazės pokyčių per egzotoksinų, tokių kaip glutamatas [213], D-serinas [214] bei ATP išskyrimą, glutamato įsisavinimo trukdymą, lydimą užląstelinio glutamato kaupimosi ir sinapsinio perdavimo pokyčių [209]. Žinoma, kad mikroglijos ląsteles veikiant minėtaisiais neurosiuntikliais, išskyrus glutamatą, stebimas LPS sukeltos NO, IL-1 β , TNF- α , IL-6 išleidimo slopinimas [208].

Charakteriškiausias mikroglijos ląstelių atsakas į patogenus – greita mikroglijos ląstelių aktyvacija. Aktyvacijos procesas laikomas svarbiausiu gynybiniu šių ląstelių atsaku, kuris gali pasireikšti uždegimine ląstelių reakcija į dirgiklius. Nors mikroglijos ląstelės atlieka neuronų regeneracijos ar audinių atstatymo funkcijas, visgi, aktyvinta mikroglija daugiausia funkcionuoja kaip ląstelė „maitėda“ ir gali prisidėti prie neuronų žūties [215].

1.3.2. Mikroglijos ląstelių aktyvacija ir toksiškumas

Mikroglijos ląstelės gali būti aktyvintos veikiant pavieniams dirgikliams (pvz., LPS) ar esant neuronų pažaidoms, o taip pat mikroglijos ląstelių aktyvacija gali būti sąlygota kelių dirgiklių kaip atsakas į didėjančią neuronų praradimą [216].

Mikroglijos ląstelių aktyvacija skirstoma į du pagrindinius tipus: klasikinį (M1) bei alternatyvų (M2), kuris papildomai išskiriamas į tris rūšis – M2a, M2b ir M2c [217]. Nustatyta, kad mikroglijos ląsteles veikiant LPS, stebima mikroglijos ląstelių aktyvacija [217], lydima prouždegiminių citokinų, tokių kaip TNF- α , IL-6, IL-1, proteazių, superoksido anijonų, aktyvių azoto ir deguonies junginių gamybos [218]. Tyrimų su transgeninėmis APP/PS1 pelėmis metu parodyta, kad LPS aktyvina mikroglijos ląsteles, skatindamas komplemento receptoriaus 3 (CD11b), CD45 ir Fc γ II bei III raišką [219, 220]. Alternatyvios aktyvacijos M2a tipas siejama su IL-4 [221, 222] bei IL-13 [223]. Ji pasižymi didele IL-1 receptoriaus antagonistu IL-1Ra ir arginazės bei chitinazės [224], o taip pat ir kitų veiksmų, atsakingų už užląstelinio užpildo pertvarkymą, raišką. Imuniniai kompleksai (IgG antikūno-antigeno kompleksai), TLR aktyvacija ar IL-1 receptorių ligandai skatina M2b tipo mikroglijos ląstelių aktyvaciją [225, 226]. M2b aktyvaciją sudaro M1 ir M2a tipų kombinacija. Šios aktyvacijos metu stebimas mažas IL-12 ir aukštas arginazės, IL-1 β , IL-6 ir TNF- α lygis, o CD86 laikomas specifiniu šio aktyvacijos tipo žymeniu [227]. M2c aktyvacijos kelias yra aktyvinamas IL-10 ir kartais vadinamas reguliaciniu makrofaginiu keliu su antiuždegiminiu aktyvumu [227, 228]. Jo metu mikroglijos ląstelės išskiria TGF β ir IL-10, o taip pat pasižymi matrikso baltymų, tokių kaip pentraksinas ir versicinas raiška. Žinoma, kad M2c pasižymi anti-uždegiminių citokinų gamybą slopinančiu ir patogenus žudančiu poveikiu [226, 228].

Ramybės būsenoje esančios neaktyvintos mikroglijos ląstelės, veikiant tokiems stimulams kaip A β , pereina į aktyvacijos etapą ir įgauna aktyvintą ameboidinę morfologinę formą. Ramybės ir aktyvios (ameboidinės) būsenos tarpusavyje skiriasi ne tik savo fenotipine išraiška, tačiau pasižymi ir skirtingu fagocitiniu aktyvumu. Didžioji dalis mikroglijos ląstelių, išskirtų iš žiurkės naujagimių smegenų pusrutulių, yra ameboidinės formos [229]. Bręstant šių ląstelių skaičius mažėja dėl mikroglijos diferenciacijos į išsiskojusias „ramybės būsenos“ mikroglijos ląsteles, o reaguodamos į dirgiklius ir pažeidus neuronus jos vėl keičia savo morfologinę išraišką ir virsta ameboidinėmis. Aktyvintos (ameboidinės) mikroglijos ląstelės įtraukia ataugas, jos tampa storesnės, padidėja ląstelės kūnas, kuris įgauna apvalią formą [229]. Ląstelės pasižymi padidėjusia proliferacija ir migracija, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir IFN- γ padidėjusia gamyba ir išleidimu [145, 229].

Vienas iš ramybės būsenoje esančių mikroglijos ląstelių atsakų į smegenų pažeidimus ar uždegimą – ląstelių proliferacija. *In vitro* ir *in vivo* tyrimai su pirminėmis mikroglijos ląstelių kultūromis rodo, kad mikroglijos ląstelės išskiria neurotrofinus BDNF ir N3, kurie pasižymi ląstelių proliferaciją skatinančius ir fagocitinį aktyvumą didinančiu poveikiu [230]. Žinoma, kad mikroglijos ląstelės atlieka svarbų vaidmenį ir antikūnų inicijuotame A β

agregatų šalinimo procese pirminėse ląstelių kultūrose [231, 232]. Antikūnų gebėjimas pereiti smegenų kraujo barjerą ir jungtis su Aβ agregatais, gali lemti ir mikroglijos aktyvaciją [233]. Nustatyta, kad pelių smegenų parenchimoje susiformavusių imuninių kompleksų sukeltas toksinio poveikio pasireiškimas siejamas su mikroglijos ląstelių Fcγ receptorių aktyvacija [234], o netiesioginis Aβ agregatų toksinis poveikis – su mikroglijos ląstelių aktyvacijos sąlygotu prouždegiminių veiksnių inicijuotu neuronų praradimu [144] ir žūtimi [6].

Žinoma, kad maži ir dideli Aβ₁₋₄₂ oligomerai gali tiesiogiai veikti neuronus ir aktyvinti juose ląstelių žūties mechanizmus bei netiesiogiai per glijos ląstelių aktyvaciją sukelti citokinų išsiskyrimą ir taip inicijuoti neuronų žūtį. Visgi, kaip Aβ sąveikauja su smegenų ląstelėmis ir kokie yra toksinio poveikio pasireiškimo molekuliniai mechanizmai nėra iki galo žinoma.

2. METODIKA

Disertacinio darbo metu atlikti eksperimentai su gyvūnais buvo vykdomi remiantis LR bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimais darbui su laboratoriniais gyvūnais Nr. 0217 ir Nr. 0228.

Tyrimams su pacientų biologiniais skysčiais (kraujo serumu ir smegenų skysčiu) atlikti buvo gautas Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas (2011-12-12, No.P1-71/2010). Biologinė medžiaga gauta iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Neurologijos klinikos (med. gyd. G. Pšemenekienė, med. gyd. E. Grušauskienė ir prof. dr. K. Petrikonis).

Antikūnų–antigenų kompleksų bei įvairių $A\beta_{1-42}$ agregatų poveikio žiurkės smegenėlių ląstelių kultūroms tyrimams buvo naudojami anti- $A\beta$ (#11E12) antikūnai, gauti iš Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto (dr. A. Žvirblienė).

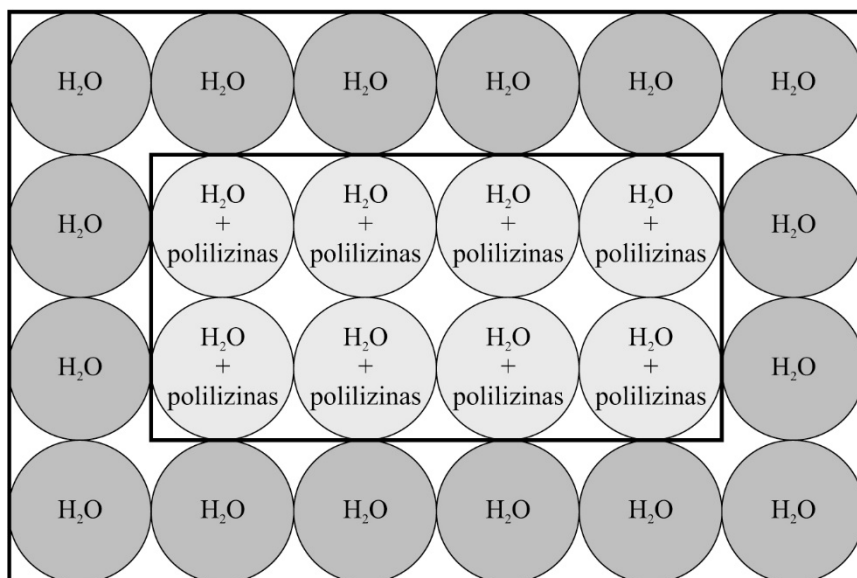
Disertacinis darbas atliktas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Neuromokslų instituto Biochemijos laboratorijoje ir „Santakos“ slėnio Naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centre 2012–2016 m.

Visų tyrimų metu, jei nenurodyta kitaip, buvo naudoti *Sigma-Aldrich* firmos reagentai.

2.1. Pirminių ląstelių kultūrų paruošimas

2.1.1. Lėkštelių paruošimas ląstelių kultivavimui ir eksperimentiniams tyrimams

Darbe naudotos 24 šulinėlių ląstelių auginimo lėkštelės *TPP* (*Zellkultur testplatte* 24, Šveicarija). Lėkštelių vidurinieji aštuoni šulinėliai padengiami 0,5 ml 0,0001 proc. vandeniniu polilizino tirpalu, į išorinius šulinėlius įpilama sterilaus vandens su penicilino–streptomicino tirpalu (2.1.1.1 pav).



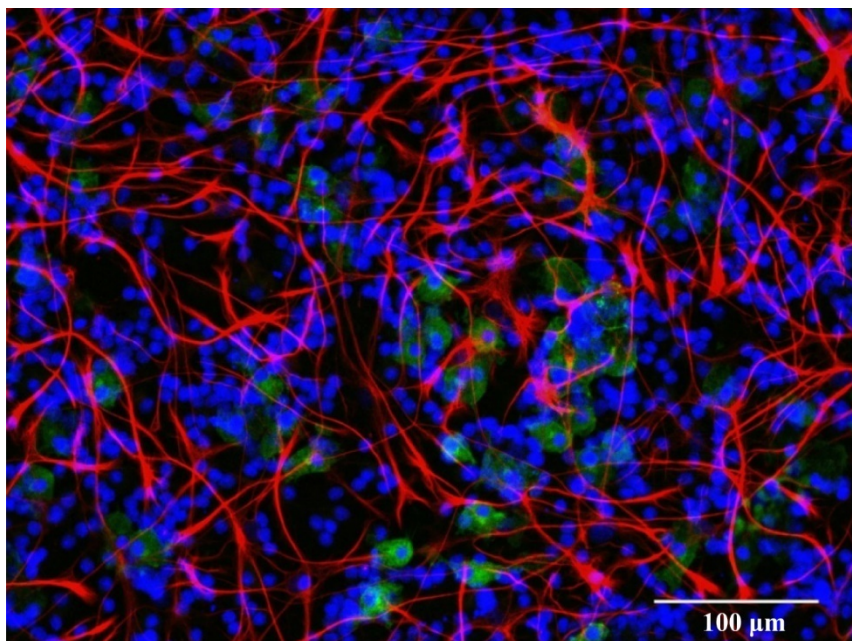
2.1.1.1 pav. Eksperimentinės lėkštelės užpildymas
0,0001 proc. vandeniniu polilizinio tirpalu

Ląstelės inkubuojamos 30–60 min. Tada tirpalas švelniai nusiurbiamas ir šulinėliai du kartus nuplaunami fosfatiniu druskų tirpalu (PBS) ir trečiąjį kartą – steriliu vandeniu. Ląstelės sėjamos į 8 vidinius lėkštelės šulinėlius, padengtus 0,0001 proc. vandeniniu polilizinio tirpalu.

2.1.2. Smegenėlių neuronų–glijos ląstelių kultūros paruošimas

Smegenėlių neuronų–glijos ląstelių kultūros (CGC) paruošimui buvo naudojami 5–7 dienų amžiaus *Wistar* veislės žiurkių jaunikliai. Gyvūnai buvo užmigdomi CO₂ dujomis ir vėliau dekapituojami. Ląstelių išskyrimo procedūra buvo atliekama sterilioje aplinkoje (laminaras *HERASAFE KS*, Vokietija), naudojant sterilius instrumentus ir terpes. Išpreparuotos smegenys perkeliama į Petri lėkštelę su PBS tirpalu (4° C) papildytu 13 mM gliukozės ir 1 proc. penicilino–streptomicino tirpalu (10000 IU/ml – 10000 µg/ml). Skalpelio atskiriama smegenėlių zona nuo likusių smegenų, pašalinamos kraujagyslės ir smegenėlės perkeliama į kitą Petri lėkštelę su nauju PBS (4° C) tirpalu. Smegenėlės skalpeliu supjaustomos į mažus (0,5 mm³) gabalėlius ir inkubuojamos flakonėlyje su Verseno tirpalu (1:5000, *Gibco*, Anglija) 5 min. 37° C ląstelių auginimo inkubatoriuje (*Thermo Scientific*, JAV), kas minutę švelniai pavartant flakonėlį. Po inkubacijos mišinys trituruojamas sterilia 2 mm diametro Pastero pipete, paskui 1 mm diametro pipete. Gautas trituras perpilamas į sterilų 50 ml tūrio mėgintuvėlį, o likusi nesuardyto

audinio dalis užpilama 6 ml 37° C temperatūros Verseno tirpalu ir toliau trituruojama su 1 mm diametro pipete. Gautas trituras supilamas į tą patį 50 ml tūrio mėgintuvėlį su pirminiu tritratu. Gautas tirpalas centrifuguojamas 270 × g, 5 min. kambario temperatūroje (centrifuga *Eppendorf 5810R*, Kanada). Po centrifugavimo supernatantas pašalinamas, nusėdusios ląstelės resuspenduojamos 5 ml naujos ląstelių kultūrų terpės DMEM GlutaMAX (*Gibco*, Anglija), papildytos 5 proc. veršelio serumo, 5 proc. arklio serumo, 38 mM gliukozės, 25 mM KCl ir penicilino–streptomicino (10 000 IU/ml – 10 000 µg/ml) tirpalu. Gauta ląstelių suspensija filtruojama per sterilų filtrą, kurio akutės diametras 0,4 µm. Ląstelių tankis ir gyvybingumas įvertinamas naudojantis hemocitometru ir tripano mėlio dažo testu. Išskirta CGC ląstelių suspensija tiesiogiai sumaišoma su 0,4 proc. tripano mėlio dažų suspensija santykiu 1:1. Ląstelių gyvybingumo ir tankumo įvertinimui tripano mėlio ir ląstelių suspensijos tirpalas pipete pernešamas ir tolydžiai užpildomas hemocitometro kameroje, padengtoje dengiamuoju stikleliu. Hemocitometro kamera inkubuojama kambario temperatūroje 1–2 min. ir atliekamas ląstelių vertinimas, vaizdinimui naudojant šviesinį mikroskopą (*Olympus CKX41*, Japonija). Ląstelės skaičiuojamos keturiuose 1x1 mm vienos kameros kvadratuose, suskaičiuojant mėlynai nenusidažiusias (bespalves, gyvybingas) ląsteles. Ląstelės skaičiuojamos kvadratių dugne ir ant kairiojo kvadratių perimetro, tuo tarpu į ląstelių skaičių neįskaičiuojamos tos ląstelės, kurios lokalizuojasi ant viršutinio ir dešiniojo kvadratių perimetro pusių. Suskaičiuotos ląstelės yra susumuojamos ir dauginamos iš skiedimų skaičiaus (2x), ląstelių skaičiaus skaičiuojamuosiuose 16-oje kvadratuose (4x) ir toliau dauginamos iš vieno kvadrato tūrio dalies mililitre (5000x). Gautas ląstelių skaičius atspindi gyvų ląstelių skaičių viename mililitre išskirtos ląstelių suspensijos. Tolimesniame etape gautas ląstelių skaičius dauginamas iš turimo ląstelių suspensijos tūrio ir skiedžiamas ląstelių kultūrų augimo terpe. Ląstelės sėjamos į šulinėlius 1 000 000 ląst./ml tankiu. Ląstelės laikomos 4–7 dienas ląstelių auginimo inkubatoriuje 37° C temperatūroje, atmosferos slėgio oro mišinyje papildytame 5 proc. CO₂ dujomis. Po atitinkamo inkubacinio laikotarpio, CGC kultūra (2.1.2.1 pav.) naudojama tyrimams atlikti. Neuronų skaičius CGC kultūroje sudarė 84,2 proc., astrocitai ir mikroglijos ląstelės sudarė atitinkamai 7,3 ± 4,9 proc. ir 8,5 ± 2,1 proc.



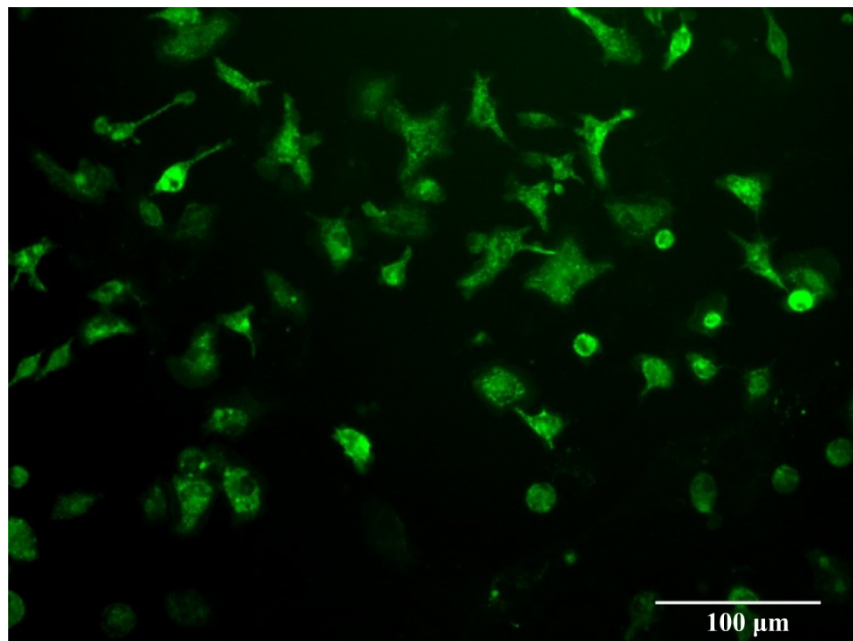
2.1.2.1 pav. Pavyzdinė smegenėlių CGC ląstelių kultūros nuotrauka

Fluorescencinė nuotrauka (mikroskopas *OLYMPUS IX71SIF-3*), 2D RGB nuotrauka, objektyvas $\times 20$, padidinimas – 500 kartų, skalė – 100 μm . **Mėlyna spalva** – ląstelių branduoliai (Hoechst 33342, DAPI filtras), **žalia spalva** – mikroglijos ląstelės (izolektino (GS-IB4) ir AlexaFluor488 dažų konjugatas, FITC filtras); **raudona spalva** – astroцитai (GFAP ir mAb Alexa Fluor 555 konjugatas, TXRED filtras).

2.1.3. Gryna mikroglijos ląstelių kultūra

Grynos mikroglijos ląstelių kultūros išskyrimui buvo naudojami 5–7 dienų amžiaus *Wistar* veislės žiurkių jaunikliai. Gyvūnai buvo užmigdomi CO_2 dujomis ir vėliau dekapituojami. Po dekapitacijos buvo atskiriama smegenų žievė nuo likusių smegenų sričių. Ląstelių išskyrimo procedūra buvo atliekamas sterilioje aplinkoje kaip nurodyta 2.1.2 skyriuje, naudojant sterilius instrumentus ir terpes. Skyrimo procedūra buvo atliekama analogiškai CGC ląstelių kultūros skyrimo procedūrai su tam tikrais nurodytais pakeitimais. Išpreparuoti smegenų pusrutuliai skalpeliu supjaustomi į mažus ($0,5 \text{ mm}^3$) gabalėlius ir inkubuojami flakonėlyje su Verseno tirpalu (1:5000, *Gibco*, Anglija) 5 min. 37°C ląstelių auginimo inkubatoriuje, kas minutę švelniai flakonėlį pavartant. Po inkubacijos mišinys trituruojamas Verseno tirpalu ir gautas trituras centrifuguojamas $290 \times g$, 5 min. kambario temperatūroje. Po centrifugavimo supernatantas pašalinamas, nusėdusios ląstelės resuspenduojamos 5 ml naujos mikroglijos ląstelių kultūrų terpės DMEM

GlutaMAX, papildytos 10 proc. veršelio serumo ir 1 proc. penicilino–streptomicino tirpalu 50 ml terpės. Gauta ląstelių suspensija filtruojama per sterilų filtrą, kurio akutės diametras 0,1 μm . Ląstelių suspensija užsėjama į 25 cm^2 ląstelių auginimo flakonus, padengtus 0,0005 proc. vandeniniu polilizino tirpalu ir inkubuojamos 4 dienas ląstelių auginimo inkubatoriuje. Po 4 dienų inkubacijos, iš auginimo flakonėlio pašalinama pusė senos terpės ir papildoma nauja mikroglijos ląstelių augimo terpe. Ląstelės toliau auginamos dar 6–10 dienų. Po bendro 10–14 dienų ląstelių augimo laikotarpio, gryna mikroglijos ląstelių kultūra naudojama tyrimams (2.1.3.1 pav.).



2.1.3.1 pav. Pavyzdinė grynos mikroglijos ląstelių kultūros nuotrauka

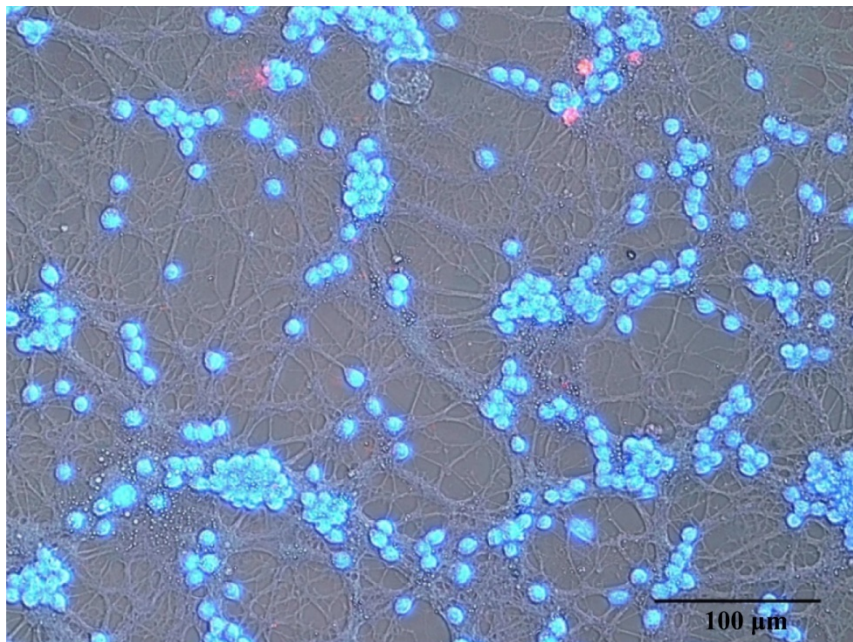
Fluorescencinė nuotrauka (mikroskopas *OLYMPUS IX71SIF-3*), 2D RGB nuotrauka, objektyvas $\times 20$, padidinimas – 500 kartų, skalė – 100 μm). **Žalia spalva** – mikroglijos ląstelės (izolektino dažų (GS-IB4) ir AlexaFluor 488 dažų konjugatas, FITC filtras).

2.1.4. Gryna smegenėlių neuronų ląstelių kultūra

Tyrimams buvo naudojami 5–7 dienų *Wistar* veislės žiurkių jaunikliai. Ląstelių skyrimo procedūra buvo atliekama identišškai kaip ir CGC ląstelių skyrimas (2.1.2 skyrius) su atitinkamais pakeitimais nurodomais žemiau.

Ląstelės išsėjamos į 24 šulinėlių lėkšteles 1 000 000 ląst./ml tankiu. Po 48 val. ląstelių kultūra buvo papildoma 10 μM citozino arabinozido tirpalu (10 μM Ara-C), kuris sustabdo mikroglijos ląstelių proliferaciją kultūroje. To pasekoje glijos ląstelių skaičius buvo sumažintas iki 2 proc. (neuronų skaičius

kultūroje sudarė ~98 proc.) (2.1.4.1 pav.). Ląstelių kultūros toliau buvo auginamos taip pat kaip ir CGC ląstelių kultūra. Darbe buvo naudojamos ilgalaikės (28 dienų) grynos neuronų ląstelių kultūros išskirtos iš smegenėlių (toliau grynos smegenėlių neuronų ląstelių kultūros).



2.1.4.1 pav. Pavyzdinė smegenėlių grynos neuronų ląstelių kultūros nuotrauka

Fluorescencinės mikroskopijos nuotrauka (mikroskopas *OLYMPUS IX71SIF-3*), 2D RGB ir fazių kontrasto (PhC) nuotraukų perdengimas, objektyvas $\times 20$, padidinimas – 500 kartų, skalė – 100 μm). **Mėlyna spalva** – neuronų branduoliai (Hoechst 33342, DAPI filtras); **raudona spalva** – nekrozės būdu žuvusių neuronų branduoliai (PI, DAPI filtras).

2.2. Monokloninių antikūnų ir $\text{A}\beta_{1-42}$ peptido agregatų paruošimas ląstelių gyvybingumo ir toksiškumo tyrimams

2.2.1. Sintetinių $\text{A}\beta_{1-42}$ agregatų paruošimas

Sintetiniai $\text{A}\beta_{1-42}$ peptidai buvo ruošiami naudojant komercinį sintetinį $\text{A}\beta$ peptidą, gautą iš *Bachem* (Šveicarija) arba *American Peptide* (Kalifornija, JAV). Buvo ruošiami skirtingos agregacinės būsenos $\text{A}\beta_{1-42}$ junginiai: monomerai, oligomerai, fibrilės. Paruoštų agregatų morfologija ir dydis buvo įvertinami atominės jėgos mikroskopijos metodu (AJM) VU mokslininkų [52].

A β ₁₋₄₂ monomerų tirpalo paruošimas

1 mg A β ₁₋₄₂ buvo ištirpintas 400 μ l HFIP (heksafluorizoproponolyje), kambario temperatūroje. Į silikonizuotą Eppendorf mėgintuvėlį įpilama 100 μ l paruošto HFIP ir A β tirpalo. Mėgintuvėlyje esantis HFIP išgarinamas ir papildomas 50 μ l DMSO. Tirpalas centrifuguojamas 12 000 rpm 15 min. (centrifuga *Eppendorf 5414*, JAV). Gautas supernatantas perkeliamas į kitą silikonizuotą Eppendorf mėgintuvėlį ir užšaldomas -20° C temperatūroje.

A β ₁₋₄₂ oligomerų tirpalo paruošimas

I protokolas: 1 mg sintetinio A β ₁₋₄₂ peptido ištirpinama su 400 μ l HFIP kambario temperatūroje. Iš paruošto tirpalo paimama 100 μ l ir įpilama į silikonizuotą Eppendorf mėgintuvėlį. Į mėgintuvėlį taip pat įpilama 900 μ l bidistiliuoto vandens. Gautas tirpalas 10–20 min. inkubuojamas kambario temperatūroje. Po inkubacijos tirpalas centrifuguojamas 12 000 rpm 15 min., gautas supernatantas perkeliamas į kitą silikonizuotą mėgintuvėlį ir išgarinamas HFIP. Po išgarinimo amiloido tirpalas oligomerizuojamas 24 val. 20° C temperatūroje. Gauti oligomerai išpilstomi dalimis į atskirus Eppendorf mėgintuvėlius ir užšaldomi; saugomi -20° C temperatūroje.

II protokolas: 0,3 mg sintetinio A β ₁₋₄₂ peptido ištirpinama 33 μ l HFIP nesilikonizuotame Eppendorf mėgintuvėlyje, kambario temperatūroje. Po perkėlimo į mėgintuvėlį HFIP išgarinamas ir mėgintuvėlis papildomas 33 μ l 100 mM NaOH tirpalu, kuris 30 min. buvo laikomas kambario temperatūroje. Po to įpilama 800 μ l 10 mM Na₂HPO₄. Gautas tirpalas 48 val. laikomas kambario temperatūroje ir vėliau saugomas 4° C temperatūroje.

A β ₁₋₄₂ fibrilių tirpalo paruošimas

1 mg sintetinio A β ₁₋₄₂ buvo ištirpinta su 400 μ l HFIP kambario temperatūroje. Iš paruošto tirpalo buvo paimama 100 μ l tirpalo ir įpilama 900 μ l bidistiliuoto vandens. Iš paruošto tirpalo išgarinamas HFIP ir gautas tirpalas inkubuojamas 7 paras 37° C temperatūroje. Gautos fibrilės išpilstomos dalimis į atskirus Eppendorf mėgintuvėlius; saugomos -20° C temperatūroje.

2.2.2. Monokloniniai antikūnai

Darbe naudoti pelių monokloniniai antikūnai anti-A β prieš A β ₁₋₄₂ peptido N-galinės pozicijos epitopus (klonas #11E12, subtipas IgG2b) ir sąveikaujantys su A β ₁₋₄₂ ir A β ₁₋₄₀ formomis [235], gauti iš Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto (dr. A. Žvirblienė). Imuninių kompleksų toksiskumo tyrimuose taip pat buvo naudojami ir kiti monokloniniai antikūnai: anti-VP1 prieš rekombinantinę į virusą panašią oligomerinę struktūrą

VP1 (klonas #6D11, IgG2a), monokloniniai antikūnai prieš žmogaus metapneumoviruso N baltymą (MTP-N) (klonas #4A2, IgG2b) ir monokloniniai antikūnai prieš raudoniukės N baltymą (MeNP) (klonas #10F7, IgG2b) [236–238], komercinis monokloninis antikūnas anti-A β _{1–42} (klonas #G2-13, IgG1) (*Millipore*, JAV) bei komercinis polikloninis antikūnas anti-A β _{1–42} (*Abbiotec LLC*, JAV).

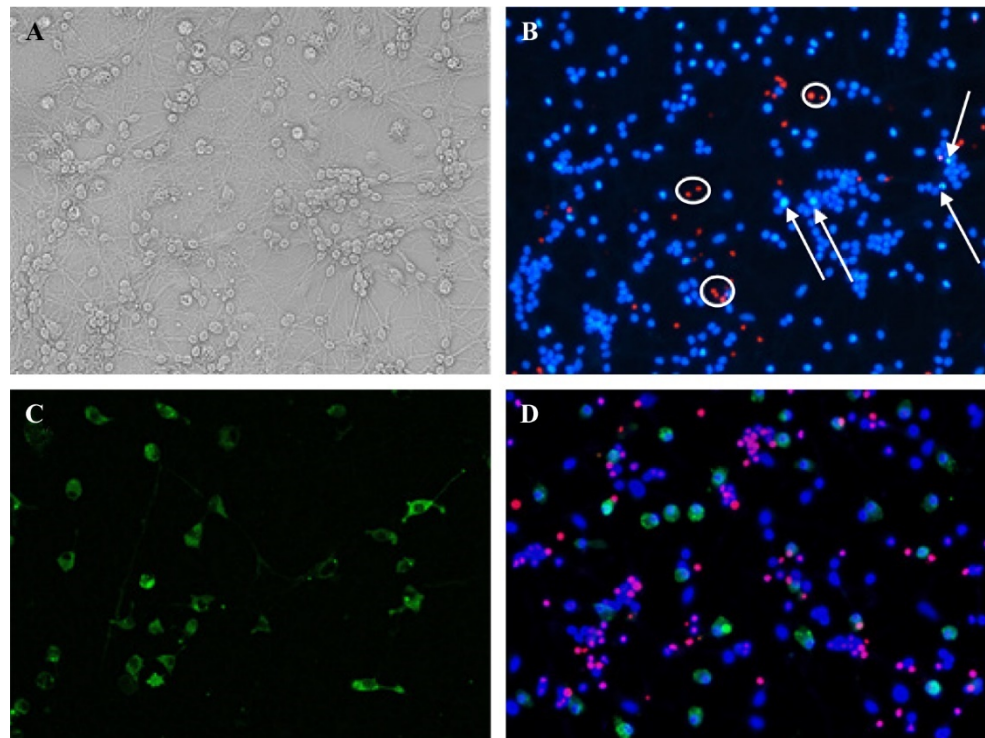
Antikūnai (2 μ g/ml) 15 min. buvo pre-inkubuojami su 1 μ M A β _{1–42} arba A β _{1–40}, ar kitais antigenais, ir po pre-inkubacijos perkelti į CGC ląstelių kultūras 24 val. inkubacijai.

Imuninių kompleksų toksinio poveikio tyrimams naudotos ilgalaikės (28 dienų) CGC ląstelių kultūros, kurios 15 min. buvo pre-inkubuojamos su anti-A β (4 μ g/ml) ir 1 μ M A β _{1–42}. Susidarę kompleksai perkelti į 28 dienų CGC ląstelių kultūras ir inkubuojami 24 val. Kiti imuninių kompleksų toksinio poveikio tyrimai 28 dienų grynose smegenėlių neuronų kultūrose buvo atliekami anti-A β + A β _{1–42} kompleksus inkubuojant grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje. Gryna mikroglijos ląstelių kultūra buvo auginama CGC auginimo terpėje ir veikama anti-A β + A β _{1–42} oligomerų kompleksais 24 val. Vėliau terpė buvo nusiurbama, užpilama ant grynos smegenėlių neuronų ląstelių kultūros ir inkubuojama papildomai 24 val. Kitoje eksperimentinėje grupėje ilgalaikė (28 dienų) gryna smegenėlių neuronų kultūra buvo papildyta 10 proc. mikroglijos ląstelių (25 000 ląst./ml) ir užpilama terpe, nusiurbta nuo imuniniais kompleksais veiktų mikroglijos ląstelių.

2.3. Neuronų žūties ir ląstelių skaičiaus įvertinimas

Ląstelių pokyčiai (neuronų gyvybingumo bei neuronų ir mikroglijos ląstelių skaičiaus kitimas) buvo vertinami fluorescencinės mikroskopijos metodu, naudojant fluorescencinę mikroskopą *OLYMPUS IX71SIF-3* su 20x objektyvu (mikroskopinio vaizdo didinimas ~500 kartų). Ląstelės identifikuojamos pagal būdingas formas ir branduolio morfologinius požymius. Ląstelės kiekviename šulinėlyje 5–10 min. kambario temperatūroje buvo inkubuojamos su dažais: propidžio jodidu (PI, 7 μ M), bisbenzimidu (Hoechst 33342, 4 μ g/ml). Mikroglijos ląstelių skaičiui įvertinti buvo naudojamas izolektino ir AlexaFluor 488 (7 ng/ml) dažų konjugatas. Propidžio jodidu nudažytos ląstelės, kurių branduoliai fluorescavo raudona spalva, buvo vertinamos kaip nekrozinės ląstelės. Ląstelės, kurių branduoliai buvo kondensuoti ir fragmentuoti, buvo vertinamos kaip apoptozinės ląstelės. Ląstelės, kurių branduoliai nebuvo pažeisti ir buvo homogeniški bei švytėjo mėlyna spalva, buvo vertinami kaip sveiki ir gyvybingi (2.3.1 pav.). Mikroglijos ląstelės identifikuotos naudojant mikroglijos ląstelėms specifinius izolektino dažus,

kurie rišasi prie mikroglijos ląstelėms specifinio RET (angl. *receptor tyrosine kinase*) receptoriaus ir švyti žaliai.



2.3.1 pav. Pavyzdinės smegenėlių CGC ląstelių kultūros nuotraukos

Fluorescencinės nuotraukos (mikroskopas *OLYMPUS IX71SIF-3*), 2D RGB bei fazių kontrasto nuotraukos, objektyvas $\times 20$, padidinimas – 500 kartų. **(A)** – šviesinė (fazių kontrasto) mikroskopijos nuotrauka (kontrolinė CGC ląstelių kultūra); **(B)** – CGC ląstelės nudažius PI ir Hoechst 33342 dažais (**baltomis rodyklėmis** pažymėtos apoptozinės ląstelės, **baltas apskritimas** žymi raudonas, nekrozės būdu žuvusias ląsteles, **tamsiai mėlyna spalva** – gyvos ląstelės); **(C)** – mikroglijos ląstelės (izolektino dažų (GS-IB4) ir AlexaFluor 488 konjugatas); **(D)** – bendras CGC kultūros fluorescencinis vaizdas (pateiktas perdengtas visų ląstelių tipų vaizdas).

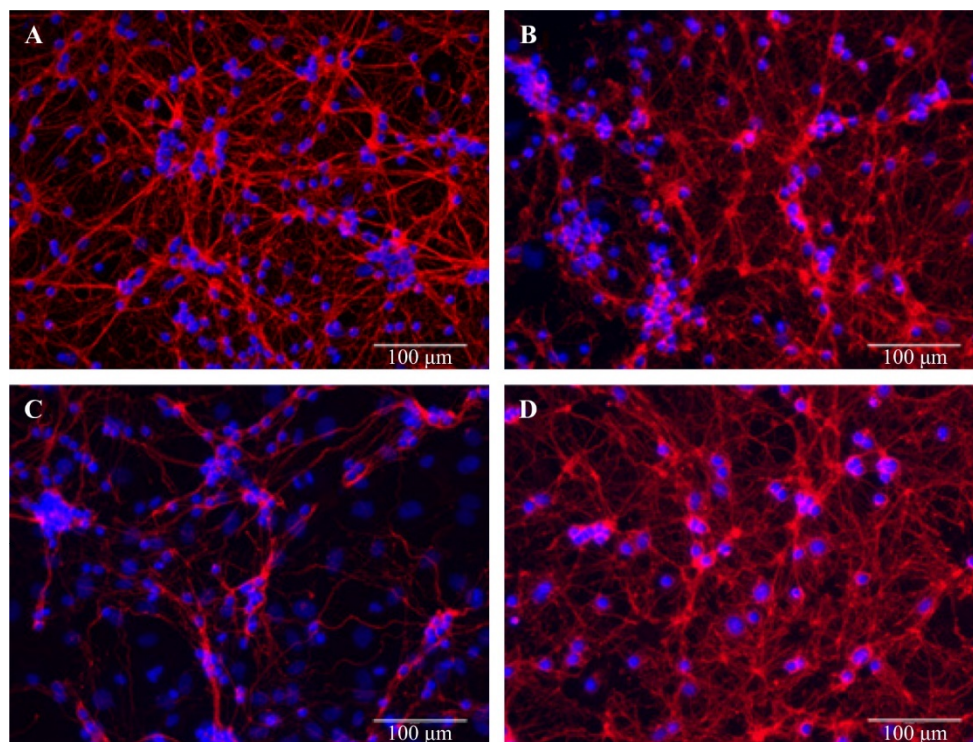
Vaizdinė duomenų analizė

Ląstelių vaizdinimas buvo atliekamas naudojant integruotą mikroskopo *OLYMPUS IX71SIF-3* kamerą. Eksperimentinių duomenų fluorescencinė analizė (kokybinis bei kiekybinis vertinimas) buvo atliekama naudojant duomenų apdorojimo ir vaizdinimo programų paketus *ImageJ* ir *ImageProExpress 6.3*. Atliekant kiekybinį fluorescencinių nuotraukų sisteminimą bei rezultatų vertinimą, ląstelės buvo skaičiuojamos penkiuose atsitiktiniuose 24 šulinėlių lėkštelės laukeliuose (du šulinėliai tiriamajai medžiagai), fotografuojant

tiriamuosius laukelius objektyvu $\times 20 - 500$ kartų padidiniu. Tyrimuose su gryna smegenėlių neuronų ląstelių kultūra buvo naudojamas objektyvas $\times 10 - 250$ kartų padidinimas (tik mikroglijos ląstelių skaičiaus įvertinimui).

2.4. Sinapsių pokyčių vertinimas imunofluorescenciniu metodu

Sinapsių pokyčiai buvo vertinami imunohistocheminio dažymo metodu. Sinapsių pokyčių tyrimams CGC kultūra buvo auginama *in vitro* 4–7 paras ir inkubuojama 24 val. su $1 \mu\text{g/ml}$ anti- $\text{A}\beta\#11\text{E}12$ ir $1 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ agregatais. Po inkubacijos, augimo terpė pašalinama ir atliekamas ląstelių kultūros fiksavimas bei tolesnis imunohistocheminis dažymas. Ląstelės fiksuojamos 4 proc. paraformaldehido tirpalu ir inkubuojamos 20 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos paraformaldehidas nusiurbiamas ir ląstelės tris kartus kas 15 min. švelniai perplaunamos PBS tirpalu. Po trijų plovimų ląstelių kultūra permeabilizuojama su 0,3 proc. tritono X-100 tirpalu 5 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės pakartotinai tris kartus kas 15 min. perplaunamos PBS tirpalu. Atlikus paskutinį plovimą, PBS tirpalas nusiurbiamas ir ląstelės inkubuojamos su 10 proc. BSA tirpalu 60 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos BSA tirpalas nusiurbiamas ir ląstelės inkubuojamos su pirminiais ir antriniais antikūnais. Pirma ląstelės inkubuojamos su pirminiu pelių monokloniniu antikūnu anti-SNAP-25 (*Abcam*, JAV). Antikūnas skiedžiamas su PBS santykiu 1:1000. Antikūnas išpilstomas į šulinėlius su ląstelėmis ir inkubuojamas kambario temperatūroje 60 min. (tamsoje). Po inkubacijos pirminis antikūnų tirpalas nusiurbiamas ir plaunamas tris kartus kas 15 min. su PBS. Ožkos antrinių antikūnų Alexa Fluor 555 tirpalas skiedžiamas su PBS santykiu 1:200 ir ląstelės inkubuojamos 30 min. kambario temperatūroje (tamsoje). Po inkubacijos tirpalas nusiurbiamas ir nuplaunamas tris kartus kas 15 min. su PBS. Po imunohistocheminio dažymo sinapsių baltymo sinapsino SNAP-25 raiška ir išsidėstymas buvo įvertinami vaizdinant ląstelių kultūras fluorescenciniu mikroskopu *OLYMPUS IX71SIF-3* bei atliekant vaizdų analizę. Antikūnų–antigenų kompleksų poveikio sinapsino fluorescencijos intensyvumui ląstelėse lyginamoji analizė buvo atliekama standartizavus matavimo sąlygas, pašalinant fono triukšmą (*ImageJ* programa). Tyrimo metu kontrolinė ląstelių grupė (CGC kultūra) buvo lyginama su eksperimentinėmis ląstelių grupėmis, veiktomis imuniniais kompleksais, esant skirtingiems inkubaciniams laikotarpiams, rezultatus išreiškiant standartiniais fluorescenciniais vienetais (2.4.1 pav.).



2.4.1 pav. Sinapsių baltymo SNAP-25 išsidėstymas CGC kultūroje po 24 val. inkubacijos su anti- $A\beta$ #11E12 + $A\beta_{1-42}$ kompleksais

Fluorescencinės nuotraukos po imunofluorescencinio dažymo su pelių monokloniniu pirminių antikūnų anti-SNAP-25 ir ožkos antriniu antikūnu Alexa Fluor 555, (mikroskopas *OLYMPUS IX71SIF-3*), 2D RGB nuotrauka, objektyvas $\times 20$, padidinimas – 500 kartų, skalė – 100 μm . **Raudona spalva** nudažytas sinapsinas (TXRED filtras), **mėlyna spalva** nudažyti ląstelių branduoliai (Hoechst 33342, DAPI filtras). CGC ląstelių kultūros 24 val. inkubacija su 1 $\mu\text{g/ml}$ anti- $A\beta$ #11E12 ir 1 μM $A\beta_{1-42}$ agregatų (monomerų, oligomerų, fibrilių) kompleksais. **(A)** – kontrolinė CGC kultūra; **(B)** – CGC veikta imuniniais kompleksais su dideliais $A\beta_{1-42}$ oligomerais (4–6 nm); **(C)** – CGC veikta imuniniais kompleksais su mažais $A\beta_{1-42}$ oligomerais (1–3 nm); **(D)** – CGC veikta imuniniais kompleksais su $A\beta_{1-42}$ fibrilėmis (> 6 nm).

2.5. Ląstelių membranos potencialo neuronų–glijos ir mikroglijos ląstelių kultūrose nustatymas

Ląstelių plazminės membranos potencialo vertinimas po inkubacijų su tiriamomis medžiagomis buvo atliekamas fluorescencinės mikroskopijos metodu (mikroskopas *OLYMPUS IX71SIF-3*), naudojant trimetin oksanolio DiBAC4(3) dažus. Membranos įtampai įvertinti ląstelių augimo terpė buvo nusiurbama ir ant ląstelių buvo užpilama nauja augimo terpė, papildyta 3 μM

DiBAC4(3). Ląstelės inkubuojamos 10 min. ir fotografuojamos integruota *OLYMPUS IX71SIF-3* kamera skirtingais inkubaciniais periodais. Membranos įtampos pokyčiai buvo vertinami mažiausiai trijuose atsitiktiniuose eksperimentinių šulinėlių laukeliuose. Ląstelių kultūrų fluorescencinių vaizdų matematinė analizė atlikta LSMU Neuromokslų instituto biofizikos ir bioinformatikos laboratorijoje (dr. R. Petrolis).

2.6. Glutamato kiekio nustatymas ląstelių augimo terpėje

Glutamato kiekio ląstelių augimo terpėje nustatymas buvo atliekamas taikant spektrofotometrinį metodą, naudojant komercinį *Amplex red glutamic acid/glutamate oxidase* rinkinį (*Invitrogen*, Anglija), remiantis gamintojo pateiktomis rinkinio naudojimosi instrukcijomis. Po CGC ir grynos mikroglijos ląstelių kultūros inkubacijos buvo paimami terpės mėginiai ir inkubuojami 30 min. 37° C temperatūroje (tamsoje). Glutamato kiekis mėginiuose buvo nustatomas fluorescenciniu lėkštelių skaitytuvu (*Fluoroskan Ascent*, *Thermo Scientific*, JAV) esant 530–560 nm sužadavimo ir 590 nm išspinduliavimo bangos ilgiui. Glutamato koncentracijos tirtuose pavyzdžiuose buvo apskaičiuojamos naudojant L-glutamato rūgšties standartines kreives.

2.7. TNF- α nustatymas ląstelių augimo terpėje

TNF- α kiekio grynoje mikroglijos ląstelių kultūros terpėje nustatymui buvo paimami ląstelių terpės mėginiai ir TNF- α kiekis mėginiuose buvo nustatomas naudojant TNF- α ELISA rinkinį (*IBL International GmbH*, Vokietija). Matavimai buvo atliekami pagal gamintojo rekomendacijas ir protokolus.

2.8. Biologinių skysčių poveikio neuronų–glijos ląstelių kultūroms vertinimas

2.8.1. Tiriamieji pacientų biologiniai skysčiai

Buvo tirti penkiasdešimt penkių pacientų biologiniai skysčiai. Pacientai buvo suskirstyti pagal pacientų neurologinę būklę ir pažinimo funkcijas. Pagrindinę AL sergančiųjų grupę sudarė 55–85 m. amžiaus asmenys, kuriems diagnozuota lengva (L-ATD) ar vidutinė (V-ATD) Alzheimerio tipo demencija (ATD). Neurologinė būklė ir pažinimo funkcijos tiriamiesiems pacientams buvo vertinamos gydytojų-neurologų Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Neurologijos klinikoje bent du kartus per visą tyrimo laikotarpį –

įtraukimo į tyrimą ir pakartotinio vizito po 6–12 mėn. metu (prof. dr. K. Petrikonis, med. gyd. G. Pšemeneckienė ir med. gyd. E. Grušauskienė). Pažinimo funkcijos tirtos taikant trumpąją protinės būklės klausimyną (MMSE, angl. *Mini-Mental State Examination*), skaičių sujungimo testą (TMT-A, angl. *Trail Making Test part A*), laikrodžio piešimo užduotį (CDT, angl. *Clock Drawing Test*) AL įvertinimo skalę (ADAS-cog., angl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale cognitive subscale*). Kasdienės veiklos, asmenybės pokyčiai, depresinė simptomatika vertinta taikant Blessed'o geriatrinę depresijos skales.

Tiriamąsias grupes sudarė: pacientai neturintys kognityvinių sutrikimų (SP) – devyniolika pacientų; kita demencijos forma sergančiųjų grupė (KD) – vienuolika pacientų ir Alzheimerio tipo demencija sergančių pacientų grupė (ATD) – dvidešimt penki pacientai, kurie papildomai buvo išskiriami pagal ligos sunkumo laipsnį, atitinkamai L-ATD – penkiolika pacientų bei V-ATD – dešimt pacientų. Iš šių pacientų buvo gauti biologinių skysčių pavyzdžiai.

2.8.2. Ląstelių inkubacija su pacientų biologiniais skysčiais

Tyrimuose kraujo serumo (KS) ir smegenų skysčio (SS) mėginiai buvo centrifuguoti 15 min. 5000 aps./min. ir inkubuojami 24 val. su CGC ląstelėmis, 1:5 ir 1:2,5 biologinių skysčių ir ląstelių augimo terpės santykiu, t. y. 100 µl ir 200 µl serumo bei smegenų skysčio buvo pridedama į 400 µl bei 300 µl terpės. Po inkubacijos buvo atliekamas neuronų gyvybingumo, neuronų skaičiaus ir mikroglijos ląstelių skaičiaus nustatymas (2.3 skyrius).

2.9. Duomenų analizė

Statistinė ir matematinė duomenų analizė

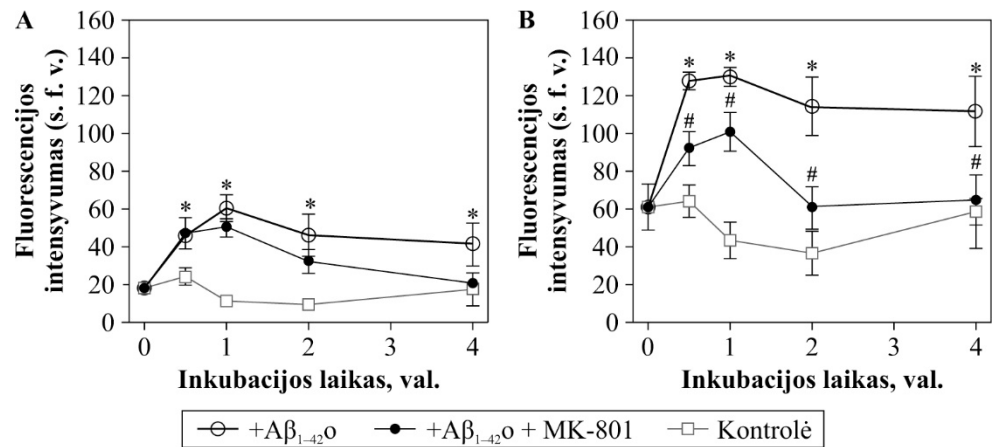
Duomenų analizė atlikta naudojant kompiuterines duomenų kaupimo ir analizės programas *SigmaPlot 2011* (*Systat Software Inc*, Anglija) ir *SPSS* (*SPSS Inc.*, JAV), pateikiant bendrus eksperimentinių duomenų grafikus su vidutinėmis kvadratinėmis paklaidomis, statistiniam jų palyginimui naudojant Stjudento t-testą ir ANOVA (Tukey ir LSD) testus. Statistinių hipotezių tikrinimui pasirinktas reikšmingumo lygmuo $p \leq 0,05$.

3. REZULTATAI

3.1. Mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikio smegenų ląstelių membranos potencialui mechanizmų tyrimas

Tirpūs $A\beta$ oligomerai atlieka svarbų vaidmenį AL patogenezėje, sukeldami sinapsių degeneraciją, mikroglijos ląstelių aktyvaciją ir neuronų žūtį. Detalūs mechanizmai, kurių pagalba $A\beta$ oligomerai sukelia minėtuosius efektus, nėra gerai ištirti. Žinoma, kad toksiški maži $A\beta_{1-42}$ oligomerai sąveikauja su dirbtinėmis membranomis ir sutrikdo jų stabilumą bei vientisumą [52, 239]. Manoma, kad toks membranų vientisumo sutrikdymas yra susijęs su tiesiogine įvairių membranos receptorių aktyvacija ir veda prie plazminės membranos depoliarizacijos. Mažai žinoma apie mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikį pirminių neuroninių ląstelių membranos potencialui, bei minėtųjų peptidų vaidmenį sukeliant mikroglijos ląstelių membranos potencialo pokyčius.

Pirmajame darbo etape siekėme ištirti $A\beta_{1-42}$ oligomerų ($A\beta_{1-420}$) poveikį ląstelių plazminės membranos potencialo pokyčiams CGC kultūrose bei jų sąsajas su NMDA receptoriais, kurie prisideda prie membranos laidumo. Šiam tikslui CGC ir grynų neuronų bei mikroglijos ląstelių kultūros buvo inkubuotos su mažais $A\beta_{1-42}$ oligomerais nuo 30 min. iki 4 val. Ląstelių membranos potencialo pokyčiai buvo nustatomi naudojant potencialui jautrius fluorescencinius trimetin oksanolio DiBAC4 (3) dažus (žr. 2.5 skyrius, 46 psl.). Kai ląstelių membranos potencialas yra didelis, šis dažas nepatenka į ląsteles, tačiau jam sumažėjus (įvykus plazminės membranos depoliarizacijai), jis įeina į ląsteles ir susijungia su citoplazminiais komponentais [240]. Intensyvėjantis fluorescencinis ląstelių švytėjimas rodo ląstelių depoliarizaciją, o fluorescencinio intensyvumo mažėjimas – membranos hiperpoliarizaciją. Kaip matyti 3.1.1 pav., jau po 30 min. inkubacijos su $A\beta_{1-42}$ oligomerais ląstelių fluorescencijos intensyvumas statistiškai reikšmingai padidėjo, oligomerai sukėlė greitą neuronų ir mikroglijos ląstelių depoliarizaciją.



3.1.1 pav. Mažų Aβ₁₋₄₂ oligomerų poveikis neuronų ir mikroglijos ląstelių membranos potencialui CGC kultūroje

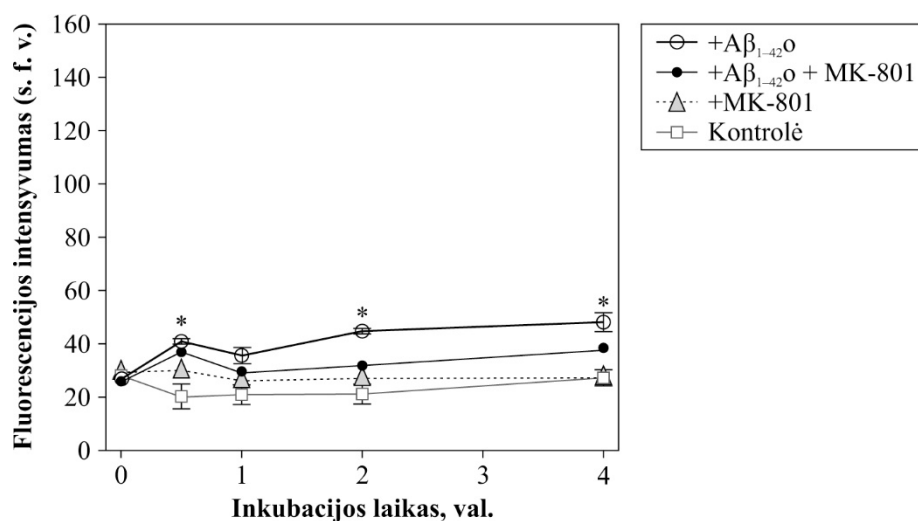
(A) – santykinis CGC neuronų fluorescencijos intensyvumas; (B) – santykinis CGC mikroglijos ląstelių fluorescencijos intensyvumas. Ląstelių inkubacija su mažais 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomerais (Aβ₁₋₄₂o) ir 10 μM MK-801. Fluorescencijos intensyvumas išreikštas santykiniais fluorescenciniais vienetais (s. f. v.). * – p < 0,05 lyginant su kontroline grupe, # – p < 0,05 lyginant su Aβ₁₋₄₂ oligomerų grupe; n = 5 – 8.

Po 30–60 min. inkubacijos neuronų fluorescencija siekė atitinkamai 45 s. f. v. ir 60 s. f. v. Po 2–4 val. inkubacijos neuronų fluorescencijos intensyvumas išliko stabilus, kas rodo, kad neuronų plazminės membranos depoliarizacija greičiausiai įvyksta 60 min. laikotarpyje ir sugrįžta iki lygmens koks buvo po 30 min. Ląstelių kultūros taip pat buvo inkubuotos su nekonkurenciniu NMDA receptorių antagonistu MK-801 (dizocilpinu). Inkubacija su MK-801 neapsaugojo neuronų nuo Aβ₁₋₄₂ oligomerų sukeltos ląstelių depoliarizacijos (3.1.1 pav. A) ir neuronų fluorescencijos intensyvumas po 30 min. – 2 val. išliko panašus kaip Aβ₁₋₄₂ oligomerų grupėje. Tai leidžia manyti, kad NMDA receptoriai nedalyvauja ankstyvoje neuronų depoliarizacijoje, sukeltose mažų Aβ₁₋₄₂ oligomerų (3.1.1 pav. A).

Mikroglijos ląstelių depoliarizacija CGC kultūroje, lyginant su neurotais vyko greičiau ir per pirmąsias 30 min. fluorescencija atitinkamai išaugo nuo 61 s. f. v. iki 128 s. f. v. ir išliko panašiam lygyje 4 val. (3.1.1 pav. B). Kitaip nei neuronuose, MK-801 apsaugojo mikroglijos ląsteles nuo Aβ₁₋₄₂ oligomerų sukeltos membranos depoliarizacijos. Kaip pateikta 3.1.1 B pav., 30–60 min. laikotarpiu fluorescencijos intensyvumas sumažėjo iki 92 s. f. v. ir 101 s. f. v., lyginant su Aβ₁₋₄₂ oligomerų grupe, o 2–4 val. laikotarpiu Aβ₁₋₄₂ oligomerų sukelta mikroglijos membranos depoliarizacija statistiškai patikimai buvo sumažinta iki kontrolinių ląstelių lygio. Todėl galima teigti, kad maži Aβ₁₋₄₂

oligomerai turi poveikį ne tik neuronų, bet ir mikroglijos ląstelių membranos potencialui, tačiau tik mikroglijos ląstelių membranos depoliarizacija yra susijusi su NMDA receptorių aktyvacija.

Yra žinoma, kad skirtingų smegenų regionų neuronai pasižymi nevienodu pažeidžiamumu bei reakcija į stimulus [241]. Todėl tyrėme, ar $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukelta plazminės membranos depoliarizacija yra būdinga tik smegenėlių neuronams ir ar minietieji peptidai veikia ir kitų smegenų sričių neuronus. Šiuose eksperimentuose naudojome smegenų žievės neuronų kultūras, kurios buvo veikiamos $A\beta_{1-42}$ oligomerais ir MK-801. Kaip matyti 3.1.2 pav. $A\beta_{1-42}$ oligomerai padidino smegenų žievės neuronų fluorescenciją jau po 30 min. inkubacijos ir ji išliko panaši per visą 4 val. inkubacinį laikotarpį, atitinkamai 41 s. f. v. po 30 min., 36 s. f. v. po 60 min., 44 s. f. v. po 2 val. ir 48 s. f. v. po 4 val. Taip pat nustatėme, kad MK-801 neapsaugojo žievės neuronų nuo ląstelių membranų potencialo pokyčių po 30 min. – 4 val. inkubacijos (3.1.2 pav.).

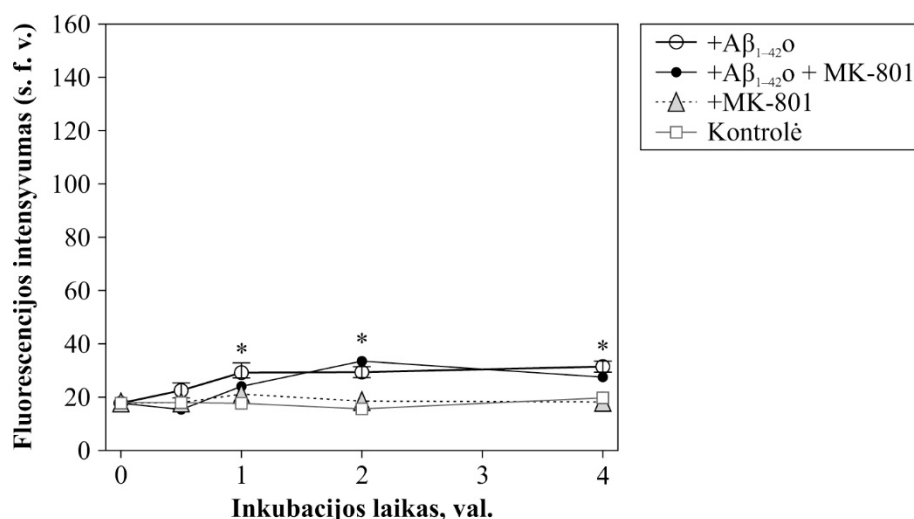


3.1.2 pav. Mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikis neuronų ląstelių membranos potencialui smegenų žievės neuronų ląstelių kultūroje

Ląstelių inkubacija su mažais 1 μM $A\beta_{1-42}$ oligomerais ir 10 μM MK-801. Fluorescencijos intensyvumas išreikštas santykiniais fluorescenciniais vienetais (s. f. v.). * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline grupe, $n=4$.

Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, kad tirtieji maži $A\beta_{1-42}$ oligomerai sukelia nuo NMDA receptorių nepriklausomą smegenėlių ir smegenų žievės neuronų membranos depoliarizaciją.

CGC ląstelių kultūroje neuronai yra apsupti glijos ląstelių, kurios veikiant $A\beta$, gali išskirti įvairius prouždegiminius veiksnius ir prisidėti prie neuronų pokyčių ir žūties [149, 242]. Todėl tyrėme, ar $A\beta_{1-42}$ oligomerai sukelia neuronų membranos depoliarizaciją tiesiogiai, ar veikia netiesiogiai sukeldami glijos ląstelių atsakus. Tyrimams buvo naudojama gryna iš smegenėlių išskirta neuronų kultūra (žr. 2.1.4 skyrių, 40 psl.). Kaip matyti 3.1.3 pav. 0–4 val. laikotarpiu neuronus veikiant mažais $A\beta_{1-42}$ oligomerais stebimas statistiškai reikšmingas neuronų fluorescencinio intensyvumo didėjimas, rodantis neuronų depoliarizaciją. Neuronus veikiant $A\beta_{1-42}$ oligomerais ir MK-801, neuronų membranų potencialas išliko panašus kaip ir $A\beta_{1-42}$ oligomerų grupėje.

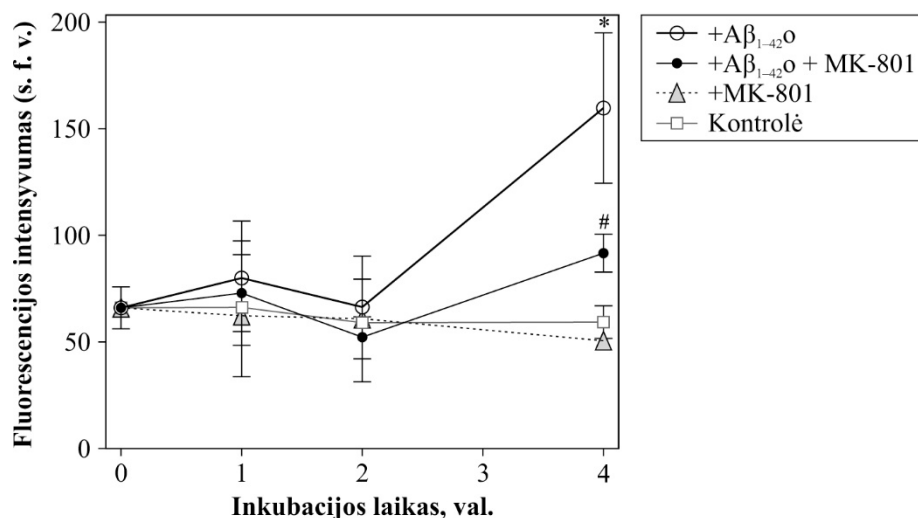


3.1.3 pav. Mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikis neuronų membranos potencialui grynoje smegenėlių neuronų ląstelių kultūroje

Ląstelių inkubacija su mažais 1 μ M $A\beta_{1-42}$ oligomerais ir 10 μ M MK-801. Fluorescencijos intensyvumas išreikštas santykiniais fluorescenciniais vienetais (s. f. v.). * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline ląstelių grupe, $n=3$.

Analogiškai buvo tiriamas mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikis grynai mikroglijos ląstelių kultūrai. Nustatėme, kad kaip ir mišrioje CGC ląstelių kultūroje, taip ir grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje, buvo stebimas mikroglijos ląstelių fluorescencijos intensyvumo didėjimas (3.1.4 pav.). $A\beta_{1-42}$ oligomerai pasižymėjo membranos potencialą mažinančiu poveikiu ir sukėlė mikroglijos ląstelių depoliarizaciją. Kaip matyti 3.1.4 pav. MK-801 sumažino mikroglijos ląstelių fluorescencinį intensyvumą, lyginant su $A\beta_{1-42}$ oligomerų

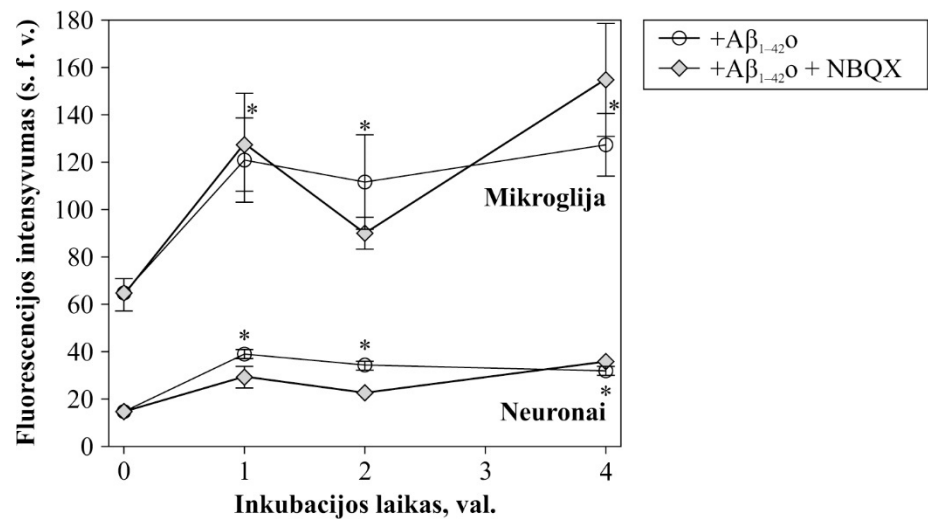
grupe. Todėl galime teigti, kad mikroglijos ląstelių membranų depoliarizacija, sukelta $A\beta_{1-42}$ oligomerų, gali būti susijusi su NMDA receptorių aktyvacija, tuo tarpu $A\beta_{1-42}$ oligomerai neuronus veikia tiesiogiai ir NMDA receptoriai ankstyvajame neuronų depoliarizacijos procese nedalyvauja.



3.1.4 pav. Mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikis mikroglijos ląstelių membranų potencialui grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje

Ląstelių inkubacija su mažais 1 μ M $A\beta_{1-42}$ oligomerais ir 10 μ M MK-801. Fluorescencijos intensyvumas išreikštas santykiniais fluorescenciniais vienetais (s. f. v.). * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline grupe; # – $p < 0,05$ lyginant su $A\beta_{1-42}$ oligomerų grupe. $n=5-9$.

Kitas galimas mechanizmas, kuriuo $A\beta$ oligomerai gali sukelti ląstelių membranų depoliarizaciją ir neuronų žūtį yra siejamas su jonotropiniais AMPA receptoriais. Kad įvertintume šių receptorių vaidmenį $A\beta$ sukeltose neuronų ir mikroglijos membranų depoliarizacijoje, naudojome AMPA receptorių antagonistą NBQX. Kaip matyti 3.1.5 pav., $A\beta_{1-42}$ oligomerai padidino neuronų ir mikroglijos ląstelių fluorescencinį intensyvumą ir sukėlė minėtųjų ląstelių membranų depoliarizaciją, o NBQX 4 val. inkubacijos laikotarpiu poveikio neuronų ir mikroglijos depoliarizacijai neturėjo. Rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad AMPA receptoriai nedalyvauja $A\beta_{1-42}$ sukeltose ląstelių depoliarizacijoje.

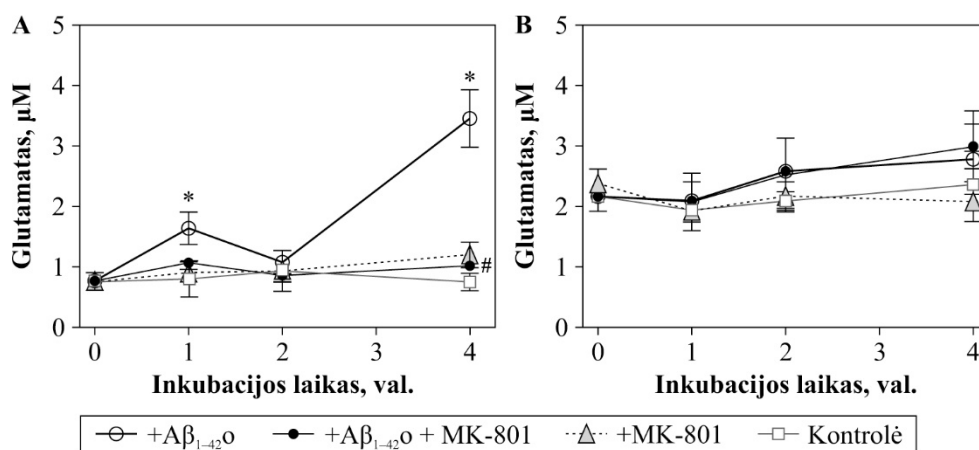


3.1.5 pav. Mažų Aβ₁₋₄₂ oligomerų poveikis neuronų ir mikroglijos ląstelių membranos potencialui CGC kultūroje

Ląstelių inkubacija su mažais 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomerais ir 10 μM NBQX. Fluorescencijos intensyvumas išreikštas santykiniais fluorescenciniais vienetais (s. f. v.). * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline grupe, $n=3$.

Žinoma, kad ląstelių plazminės membranos depoliarizacija gali sąlygoti glutamato išsiskyrimą [243] ir neuronų žūtį [244], todėl siekėme nustatyti, ar Aβ₁₋₄₂ oligomerai gali sukelti glutamato išsiskyrimą į ląstelių augimo terpę. 3.1.6 pav. (A) matyti, kad po 60 min. inkubacijos su Aβ₁₋₄₂ oligomerais, glutamato koncentracija CGC augimo terpėje statistiškai patikimai išaugo iki 1,48 μM, lyginant su kontrolinių ląstelių terpe (0,69 μM). Po 4 val. inkubacijos glutamato koncentracija terpėje siekė 3,4 μM, tačiau esant MK-801, glutamato koncentracija terpėje nedidėjo (3.1.6 pav. A).

Gauti rezultatai rodo, kad Aβ₁₋₄₂ oligomerai sukelia glutamato išsiskyrimą iš ląstelių.



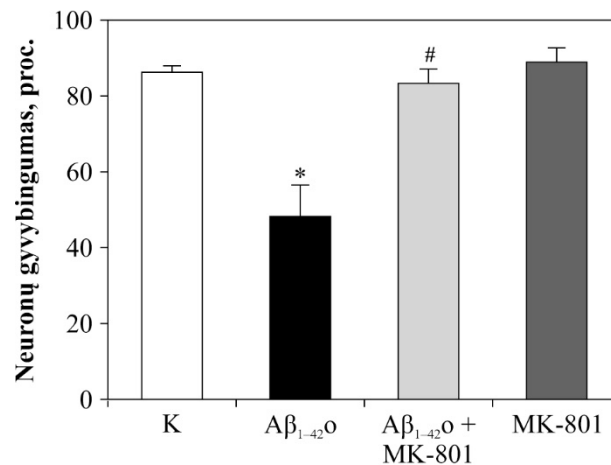
3.1.6 pav. Glutamato koncentracijos pokyčiai ląstelių kultūrų terpėse

(A) – glutamato koncentracija CGC kultūros terpėje; (B) – glutamato koncentracija grynos mikroglijos ląstelių kultūros terpėje. Ląstelių inkubacija su mažais 1 µM Aβ₁₋₄₂ oligomerais ir 10 µM MK-801. * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline ląstelių grupe, # – $p < 0,05$ lyginant su Aβ₁₋₄₂ oligomerų grupe, $n=5-8$.

CGC kultūroje be neuronų yra ir apie 13 proc. mikroglijos ląstelių. Kad įvertintume, kurios ląstelės – neuronai ar mikroglijos – išskiria glutamatą kaip atsaką į Aβ₁₋₄₂ oligomerų poveikį, atlikome eksperimentus, naudodami grynas mikroglijos ląstelių kultūras. Matuojant glutamato koncentracijos kitimą grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje, nustatėme, kad 4 val. laikotarpyje neląstelinė glutamato koncentracija visose tirtose grupėse nekito ir siekė 2,0–2,78 µM (3.1.6 pav. B). Tai leidžia teigti, jog neuronai, o ne mikroglijos ląstelės išskiria glutamatą į terpę.

Neuronų membranos depoliarizacija ir padidėjusi glutamato koncentracija terpėje, gali sąlygoti NMDA receptorių aktyvaciją. Aktyvinti NMDA receptoriai tampa pralaidūs kalcio jonams, kurie gali sustiprinti plazminės membranos depoliarizaciją ar sutrikdyti neuronų veiklą [245]. Norint nustatyti ar NMDA receptorių slopinimas gali apsaugoti neuronus nuo mažų Aβ₁₋₄₂ oligomerų sukeltos neuronų žūties, tyrėme NMDA slopiklio MK-801 poveikį CGC ląstelių gyvybingumui. Kaip matyti 3.1.7 pav., neuronų gyvybingumas statistškai patikimai sumažėjo nuo 88 proc. kontrolinėje grupėje iki 51 proc. Aβ₁₋₄₂ oligomerų grupėje. Ląsteles inkubuojant kartu su Aβ₁₋₄₂ oligomerais ir MK-801, neuronų gyvybingumas statistškai patikimai atsistatė iki kontrolinių ląstelių lygio ir siekė 82 proc. (3.1.7 pav.).

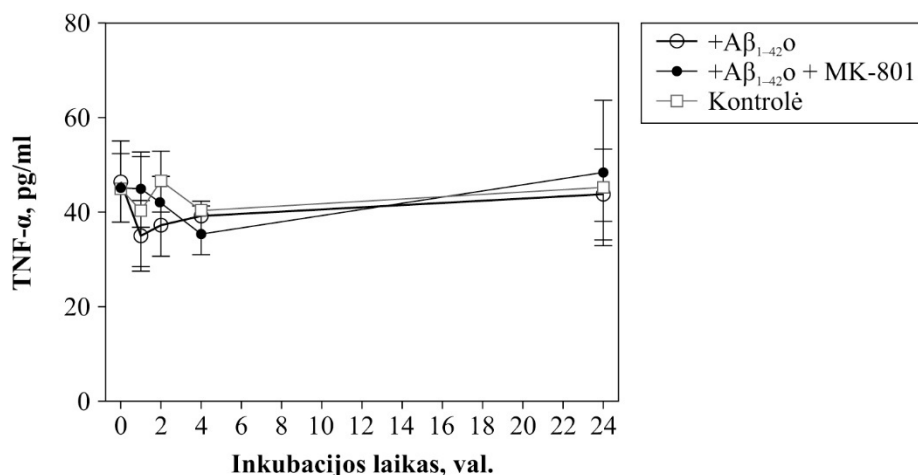
Šie rezultatai rodo, kad NMDA receptorių aktyvacija yra svarbi Aβ₁₋₄₂ oligomerams sukeliant neuronų žūtį.



3.1.7 pav. MK-801 poveikis Aβ₁₋₄₂ oligomerų sukeltai neuronų žūčiai CGC kultūroje

K – kontrolinė CGC ląstelių kultūra; **Aβ₁₋₄₂o** – ląstelės inkubuotos su mažais 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomerais; **Aβ₁₋₄₂o + MK-801** – ląstelės inkubuotos su mažais 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomerais ir 10 μM MK-801; **MK-801** – ląstelės inkubuotos su 10 μM MK-801. * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline grupe; # – $p < 0,05$ lyginant su Aβ₁₋₄₂ oligomerų grupe, $n=4$.

Aβ₁₋₄₂ oligomerų sukelta neuronų žūtis gali būti susijusi su Aβ₁₋₄₂ oligomerų sukelta mikroglijos ląstelių aktyvacija. Vienas iš mikroglijos ląstelių aktyvacijos požymių yra uždegiminių citokinų, tokių kaip TNF-α, išskyrimas į augimo terpę [246]. Norėdami nustatyti ar Aβ₁₋₄₂ oligomerai sukelia mikroglijos ląstelių aktyvaciją matavome TNF-α kiekį grynos mikroglijos ląstelių kultūrų terpėse. Kaip matyti 3.1.8 pav., Aβ₁₋₄₂ oligomerai nekeitė bendro TNF-α lygio mikroglijos ląstelių kultūrose ir jis svyravo tarp 31 pg/ml ir 48 pg/ml kontrolinėje bei Aβ₁₋₄₂ oligomerų grupėse. MK-801 neveikė bendro TNF-α lygio mikroglijos ląstelių kultūroje, inkubuojamoje su mažais Aβ₁₋₄₂ oligomerais. Tai leidžia teigti, jog Aβ₁₋₄₂ oligomerų toksiškumas nėra susijęs su TNF-α išsiskyrimu į ląstelių augimo terpę (3.1.8 pav.).



3.1.8 pav. Aβ₁₋₄₂ oligomerų poveikis TNF-α išsiskyrimui grynoje mikroglijos ląstelių kultūros terpėje

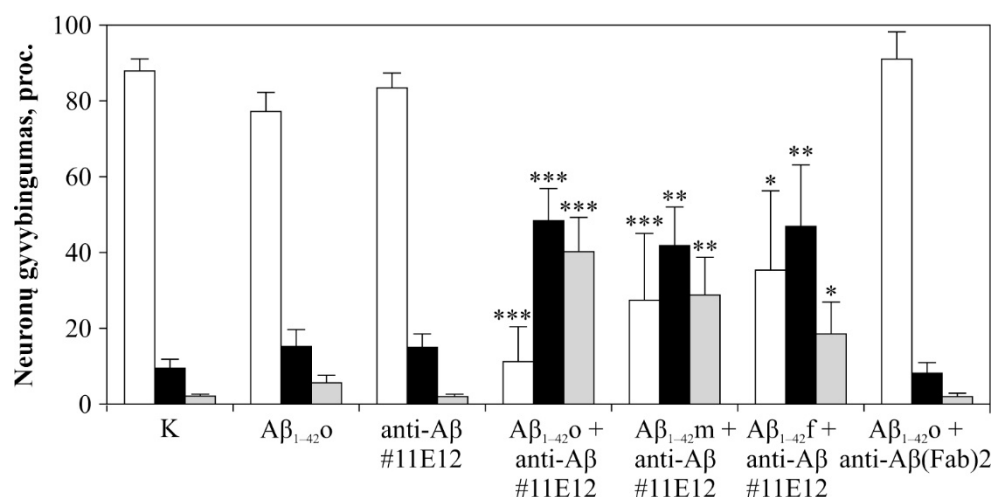
Ląstelių inkubacija su mažais 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomerais ir 10 μM MK-801. n=3–6.

Detalesnis tyrimo eigos ir duomenų analizės aprašymas pateiktas straipsnyje [247] (žr. 138 psl.).

3.2. Monokloninių antikūnų prieš Aβ₁₋₄₂ peptidą toksinio poveikio mechanizmų tyrimas

Imunoterapija, naudojant specifinius prieš toksinį Aβ nukreiptus antikūnus, yra laikoma viena perspektyviausių priemonių AL gydymui. Tačiau vykdant klinikinius tyrimus buvo pastebėta, kad imunoterapijai naudojami antikūnai kai kada sukelia imunines reakcijas, kurių mechanizmai nėra aiškūs. Savo tyrimuose siekėme nustatyti imuninių kompleksų, sudarytų iš antikūnų prieš Aβ ir Aβ₁₋₄₂ agregatų, poveikį smegenų ląstelėms. Eksperimentuose CGC ląstelių kultūra buvo inkubuojama su anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ skirtingos agregacinės būsenos junginių kompleksais. Šiuose tyrimuose naudojome monokloninius antikūnus #11E12, pagamintus kolegų iš VU Biotechnologijos instituto.

Kaip parodyta 3.2.1 pav., stipriausias neuronines ląsteles žudantis poveikis buvo imuninių kompleksų grupėje su Aβ₁₋₄₂ oligomerais (anti-Aβ #11E12 + Aβ₁₋₄₂o), kurių poveikyje buvo stebima stipriai išaugusi neuronų apoptozė (40 proc.) ir nekrozė (49 proc.) ir tik 11 proc. neuronų išliko gyvybingi.



3.2.1 pav. Anti-Aβ #11E12 + Aβ₁₋₄₂ kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui

Ląstelių gyvybingumas įvertintas po 24 val. inkubacijos su imuniniais kompleksais, sudarytais iš pilnų 2 µg/ml anti-Aβ bei fragmentuotų 2 µg/ml anti-Aβ(Fab)2 antikūnų ir skirtingos agregacinės būsenos 1 µM Aβ₁₋₄₂ peptidų. Ląstelių gyvybingumas vertintas fluorescencinės mikroskopijos metodu, naudojant propidžio jodido ir Hoechst dažus. Ląstelių pokyčiai buvo vertinami penkiuose eksperimentinės lėkštelės šulinėlio laukeliuose (du šulinėliai vienam eksperimentui). Aβ₁₋₄₂o – Aβ₁₋₄₂ oligomerai; Aβ₁₋₄₂m – Aβ₁₋₄₂ monomerai; Aβ₁₋₄₂f – Aβ₁₋₄₂ fibrilės. Aβ₁₋₄₂o + anti-Aβ(Fab)2 – monokloninių antikūnų anti-Aβ(Fab)2 fragmentų + Aβ₁₋₄₂ oligomerų kompleksai. **K** – kontrolinė CGC ląstelių kultūros grupė. Stulpelinės diagramos **balta spalva** – gyvų neuronų procentinė dalis, **juoda** – nekrozinų ir **pilka** spalva pažymėtos apoptozinių neuronų procentinės dalys (proc.). *** – p < 0,001, ** – p < 0,01, * – p < 0,05 lyginant su kontroline CGC ląstelių kultūros grupe, n=4–8.

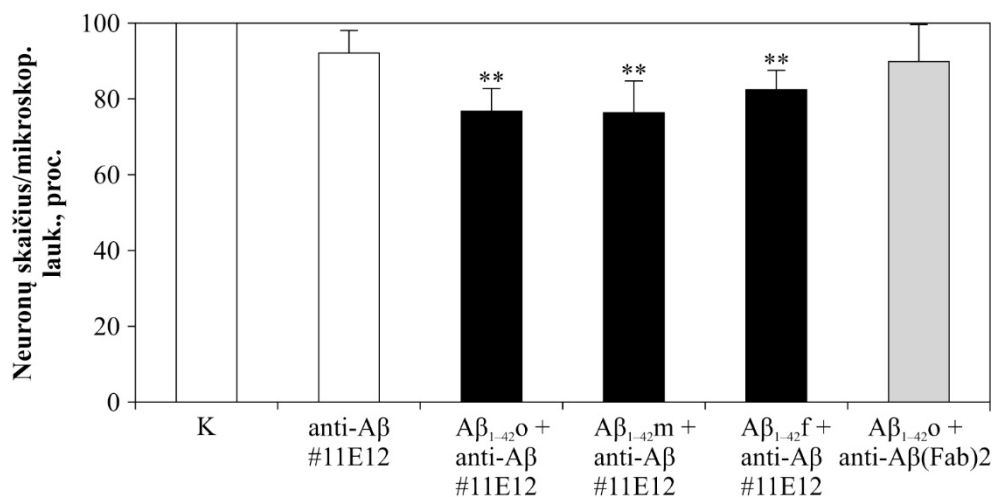
Kiek mažesnis, tačiau panašus neuronų gyvybingumo sumažėjimas buvo matomas veikiant imuniniams kompleksams su Aβ₁₋₄₂ monomeriais bei Aβ₁₋₄₂ fibrilėmis. Šių imuninių kompleksų poveikyje taip pat buvo stebima išaugusi neuronų apoptozė (atitinkamai 29 proc. ir 18 proc.) ir nekrozė (atitinkamai 42 proc. ir 47 proc.) ir tik 27 proc. (anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ monomerai), bei 35 proc. (anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ fibrilės) neuronų išliko gyvybingi (3.2.1 pav.). Patys vieni nei antikūnai, nei Aβ₁₋₄₂ oligomerai neuronų žūtį nesukėlė.

Žinoma, kad antikūnų ir antigenų kompleksai per antikūnų Fc domeną sąveikauja su mikroglijos Fcγ receptoriais, o tokia sąveika gali sukelti mikroglijos aktyvaciją [234]. Mikroglijos ląstelių aktyvacijos metu išskiriami citokinai ir kiti junginiai gali sukelti neuronų žūtį [6,144]. Todėl tyrėme, ar citotoksiniams imuninių kompleksų poveikiui pasireikšti yra reikalinga antikūno Fc domeno sąveika su ląstelių Fcγ receptoriais. Tam buvo pagaminti antikūno #11E12 Fab fragmentai be Fc domeno. Gautieji Fab fragmentai

buvo pre-inkubuoti su $A\beta_{1-42}$ oligomerias ir susidarę kompleksai perkelti į CGC ląstelių kultūras.

Nustatėme, kad imuniniai kompleksai sudaryti iš antikūnų Fab fragmentų nesukėlė neuronų žūties ir neuronų gyvybingumas išliko panašus kaip kontrolinėje grupėje (3.2.1 pav.). Tai rodo, kad imuninių kompleksų toksiniam poveikiui pasireikšti yra reikalinga antikūnų Fc dalis.

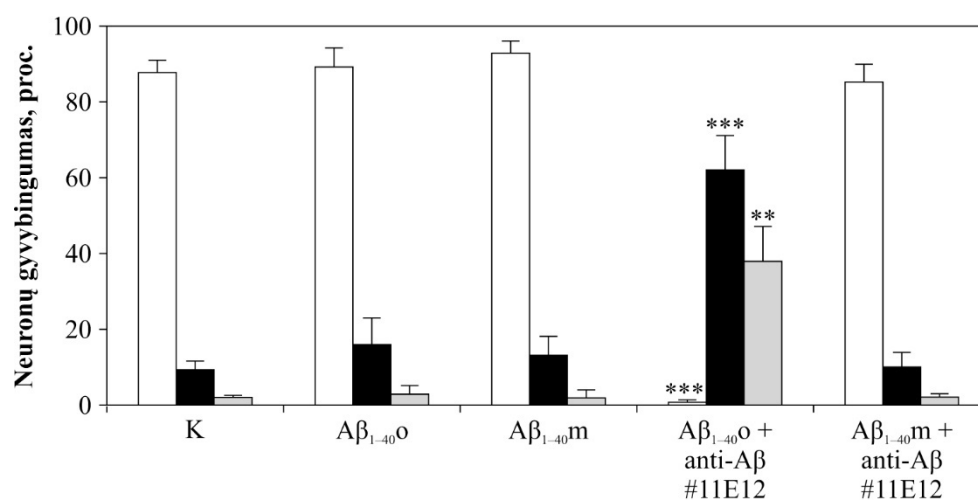
Anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksai statistiškai patikimai sumažino neuronų skaičių 23 proc., lyginant su kontrolinių ląstelių grupe (3.2.2 pav.). Statistiškai reikšmingas neuronų skaičiaus sumažėjimas buvo stebimas ląsteles inkubuojant su anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-42}$ monomerų bei anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-42}$ fibrilių kompleksais, kurie lyginant su kontrole, neuronų skaičių sumažino atitinkamai 24 proc. ir 18 proc. (3.2.2 pav.). Antikūnų Fab-fragmentų (anti- $A\beta$ (Fab)2) ir $A\beta_{1-42}$ oligomerų imuniniai kompleksai poveikio bendram neuronų skaičiui neturėjo, kas leidžia patvirtinti prieš tai darytą prielaidą, jog būtent imuninius kompleksus sudarančių antikūnų Fc dalis lemia kompleksų toksiškumą.



3.2.2 pav. Anti- $A\beta$ #11E12 + $A\beta_{1-42}$ kompleksų poveikis bendram neuronų skaičiui

Tikslūs grafiko žymėjimai bei koncentracijos pateikti 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.). Bendras neuronų skaičius (gyvų, nekrozinių ir apoptozinių neuronų suma) buvo vertinamas penkiuose eksperimentinės lėkštelės šulinėlio laukeliuose (du šulinėliai vienam eksperimentui), kontrolinės grupės ląstelių skaičių prilyginant 100 proc. Stulpelinės diagramos **balta spalva** – kontrolinės ląstelių grupės: **K** – CGC ląstelių kultūra; **anti- $A\beta$ #11E12** – ląstelės veiktos tik monokloniniais anti- $A\beta$ antikūnais; **juoda spalva** – imuniniai kompleksai, sudaryti iš skirtingos agregacinės būsenos $A\beta_{1-42}$ peptidų; **pilka spalva** – antikūnų Fab-fragmentų (anti- $A\beta$ (Fab)2) ir $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksai. ** – $p < 0,01$, lyginant su kontrole CGC ląstelių kultūros grupe, $n=4-8$.

Žinoma, kad $A\beta_{1-42}$ peptidai yra linkę greitai agreguotis į didesnius darinius, o $A\beta_{1-40}$ peptidai pasižymi mažesniu oligomerizacijos/fibrilizacijos greičiu [61, 62]. Manoma, kad ši $A\beta_{1-42}$ savybė gali turėti įtakos peptido toksiškumui. Tyrimuose naudojamo monokloninio antikūno epitopas #11E12 yra antikūno anti- $A\beta$ molekulės N-galinėje pozicijoje ir gali sudaryti kompleksus ne tik su $A\beta_{1-42}$, tačiau taip pat su $A\beta_{1-40}$ peptidais. Tolesnių tyrimų metu įvertinome $A\beta$ peptido oligomerinės struktūros reikšmę imuninių kompleksų toksiškumui. CGC ląstelių kultūra 24 val. buvo inkubuojama su anti- $A\beta$ ir trumpesnės $A\beta_{1-40}$ formos monomerų ir oligomerų kompleksais. 3.2.3 pav. matome, kad tik anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-40}$ oligomerų kompleksai drastiškai sumažino neuronų gyvybingumą ir šis neuronų gyvybingumo sumažėjimas buvo statistiškai reikšmingas lyginant su kontroline ląstelių grupe. Anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-40}$ oligomerų poveikyje buvo stebima stipriai išaugusi neuronų nekrozė (68 proc.) ir apoptozė (38 proc.). Patys vieni $A\beta_{1-40}$ oligomerai neuronų žūties nesukėlė. Anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-40}$ monomerų kompleksai poveikio neuronų gyvybingumui neturėjo.

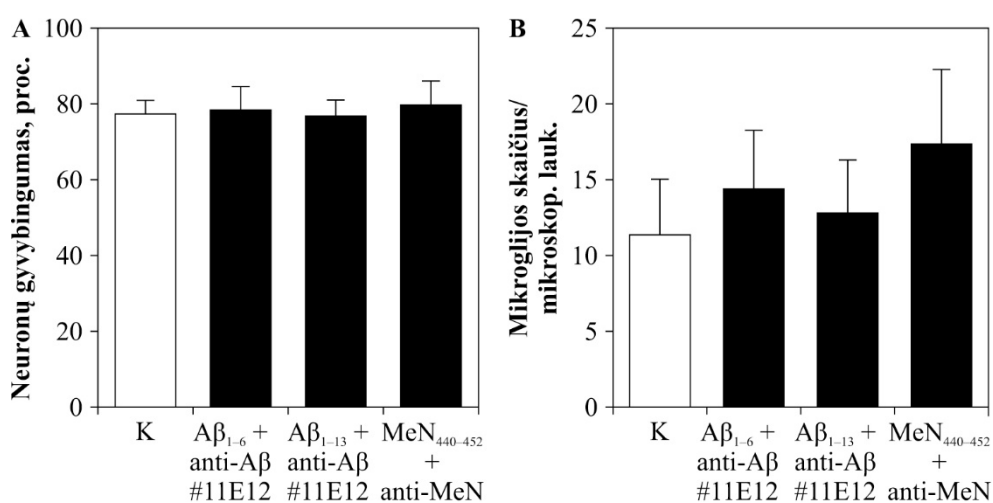


3.2.3 pav. Anti- $A\beta$ #11E12 + $A\beta_{1-40}$ kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui

Ląstelių gyvybingumas įvertintas po 24 val. inkubacijos su imuniniais kompleksais, sudarytais iš pilnų 2 μ g/ml anti- $A\beta$ #11E12 antikūnų ir skirtingos agregacinės būsenos 1 μ M $A\beta_{1-40}$ peptidų. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas bei stulpelinių diagramų žymėjimai pateikti 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.). *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, lyginant su kontroline CGC ląstelių kultūros grupe, $n=4-8$.

Mes taip pat tyrėme mažų, linijinės struktūros neagreguotų peptidų $A\beta_{1-6}$ ir $A\beta_{1-13}$ kompleksų su antikūnais poveikį CGC ląstelių kultūrai. Kolegų iš

VU BTI buvo nustatyta, kad monokloninio antikūno anti-A β #11E12 prisijungimo vieta yra A β ₁₋₄₂ peptido N-galo pozicijoje tarp 1–6 A β aminorūgščių ir pasižymi stipria sąveika su 1–13 aminorūgščių ilgio A β peptidais (A β ₁₋₁₃) [235]. Neuronų gyvybingumui įvertinti CGC ląstelių kultūra buvo veikiamą anti-A β ir A β ₁₋₆ ir A β ₁₋₁₃ peptidų imuniniais kompleksais. Kaip matyti 3.2.4 pav. A, minėti peptidų fragmentai kompleksuose su jiems specifiniais antikūnais (anti-A β + A β ₁₋₆ ir anti-A β + A β ₁₋₁₃) neuronų gyvybingumui poveikio neturėjo. Vertinant kitų imuninių kompleksų citotoksinį poveikį neuronų ląstelėms, CGC ląstelių kultūra buvo veikiamą imuniniais kompleksais, sudarytais iš antikūno #10F7 prieš raudoniukės baltymą MeNP (anti-MeNP) ir sintetinio monomerinio MeNP₄₄₀₋₄₅₂ peptidų. Nustatyta, kad anti-MeNP + MeNP₄₄₀₋₄₅₂ kompleksai neuronų gyvybingumui poveikio neturėjo (3.2.4 pav. A). Patys vieni sintetinių peptidų fragmentai (A β ₁₋₆, A β ₁₋₁₃ ir MeNP₄₄₀₋₄₅₂) taip pat nesukėlė neuronų žūties. Nustatyta, kad antikūnų–peptidų fragmentų kompleksai mikroglijos ląstelių skaičiaus taip pat nekeitė (3.2.4 pav. B).

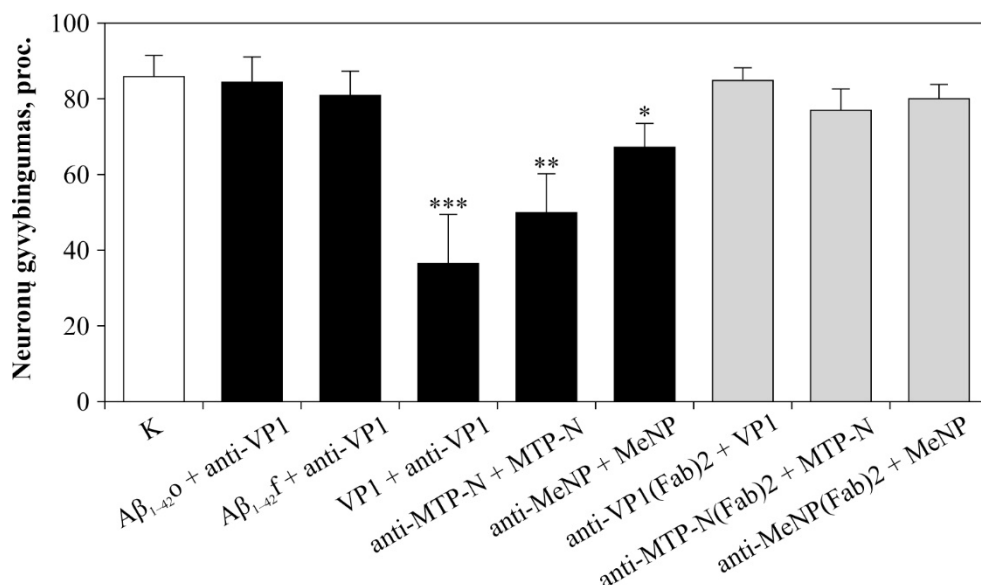


3.2.4 pav. Mažų, linijinės struktūros, neagreguotų peptidų kompleksų su specifiniais antikūnais poveikis neuronų gyvybingumui ir mikroglijos ląstelių skaičiui

(A) – neuronų gyvybingumas ir (B) – mikroglijos ląstelių skaičius CGC ląstelių kultūroje įvertintas po 24 val. inkubacijos su imuniniais kompleksais, sudarytais iš pilnų 2 μ g/ml anti-A β #11E12 antikūnų ir trumpų 1 μ M A β ₁₋₆ ir A β ₁₋₁₃ (anti-A β + A β ₁₋₆ ir anti-A β + A β ₁₋₁₃) peptidų, bei 2 μ g/ml anti-MeN ir MeN₄₄₀₋₄₅₂ (anti-MeN + MeN₄₄₀₋₄₅₂). Ląstelių gyvybingumo įvertinimas buvo atliekamas kaip pateikta 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.). Mikroglijos ląstelių skaičiui įvertinti buvo naudojamas izolektino ir AlexaFluor488 (7 ng/ml) dažų konjugatas. Ląstelių pokyčiai buvo vertinami penkiuose eksperimentinės lėkštelės šulinėlio laukeliuose (du šulinėliai vienam eksperimentui). n=6.

Apibendrinant gautus rezultatus (3.2.3 pav. ir 3.2.4 pav.) galime teigti, kad oligomerinė/multimerinė A β struktūra lemia imuninių kompleksų toksinį poveikį CGC ląstelių kultūrai.

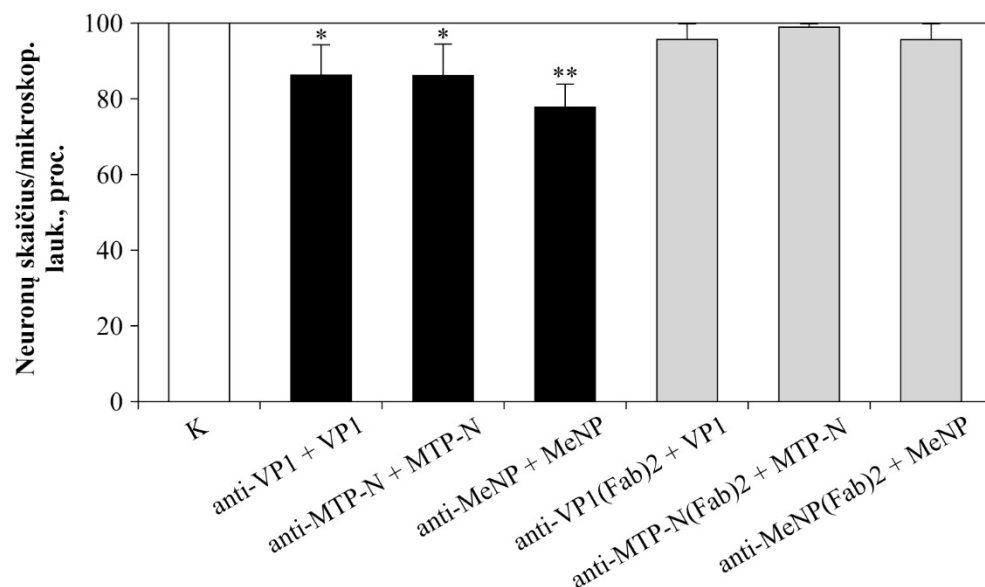
Buvo svarbu išsiaiškinti, ar kiti oligomerinių baltymų ir jiems specifinių antikūnų kompleksai veikia panašiai kaip ir A β imuniniai kompleksai. Šiam tikslui buvo naudojami monokloniniai antikūnai prieš rekombinantines į virusą (VLPs) ir nukleokapsides panašias (NLPs) daleles, kurios taip pat sudaro oligomerines struktūras [248, 237]. Monokloniniai antikūnai #6D11 prieš žiurkėno poliomos viruso pagrindinį kapsidės baltymą VP1 (anti-VP1), pre-inkubuoti su A β ₁₋₄₂ oligomerais ar fibrilėmis, neveikė CGC ląstelių gyvybingumo, matyt, todėl, kad šiuo atveju imuniniai kompleksai nesusidaro. Tačiau anti-VP1 ir jo specifinio antigeno VP1 kompleksai neuronų gyvybingumą sumažino nuo 80 proc. kontrolinėje iki 37 proc. anti-VP1 + VP1 grupėje (3.2.5 pav.). Šio antikūno Fab-fragmentų ir VP1 imuniniai kompleksai neuronų gyvybingumo neveikė. Tai rodo, jog Fc dalies pašalinimas nuo anti-VP1 monokloninio antikūno sumažino imuninių kompleksų toksiškumą. Tyrėme dar dviejų oligomerinių baltymų ir jiems specifinių monokloninių antikūnų kompleksų poveikį smegenų ląstelėms ir nustatėme, kad antikūnų prieš žmogaus metapneumoviruso N baltymą MTP-N (anti-MTP-N) ir antikūnų prieš raudoniukės N baltymą MeNP (anti-MeNP) imuniniai kompleksai sumažino neuronų gyvybingumą atitinkamai iki 50 proc. anti-MTP-N + MTP-N ir 67 proc. anti-MeNP + MeNP grupėse (3.2.5 pav.). Imuniniai kompleksai sudaryti iš antikūnų Fab-fragmentų (anti-MTP-N(Fab)₂ + MTP-N ir anti-MeNP(Fab)₂ + MeNP) gyvybingumo nekeitė (3.2.5 pav.). Tai patvirtina anksčiau minėtą prielaidą, kad antikūnų Fc dalis sąlygoja imuninių kompleksų citotoksiškumo pasireiškimą CGC kultūroje.



3.2.5 pav. Oligomerinių baltymų ir specifinių antikūnų kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui

Ląstelių gyvybingumas įvertintas po 24 val. inkubacijos su imuniniais kompleksais, sudarytais iš pilnų 2 µg/ml bei fragmentuotų 2 µg/ml antikūnų ir 2 µg/ml oligomerinių baltymų, o taip pat 1 µM Aβ₁₋₄₂ agregatų. Grafike pateiktų trumpinių reikšmės pateiktos metodų dalyje, 2.2.2 skyrius (žr. 42 psl.). Stulpelinės diagramos **balta spalva** – kontrolinė CGC ląstelių kultūra; **juoda spalva** – pilnų (su Fc domenu) antikūnų ir oligomerinių baltymų imuniniai kompleksai; **pilka spalva** – antikūnų Fab-fragmentų ir oligomerinių baltymų imuniniai kompleksai. **anti-VP1 + Aβ₁₋₄₂ o/f anti-VP1 ir Aβ₁₋₄₂ oligomerų ir fibrilių imuniniai kompleksai**. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas buvo atliekamas kaip pateikta 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.). *** – p < 0,001, ** – p < 0,01, * – p < 0,05 lyginant su kontroline CGC ląstelių kultūros grupe, n=3–11.

Taip pat buvo nustatyta, kad visi trys kitų oligomerinių baltymų ir jiems specifinių antikūnų kompleksai po 24 val. inkubacijos statistiškai reikšmingai sumažino neuronų skaičių kultūroje atitinkamai 14 proc. (anti-VP1 + VP1; anti-MTP-N + MTP-N) ir 22 proc. (anti-MeNP + MeNP), lyginant su kontroline grupe, tuo tarpu tirtų antikūnų Fab-fragmentai kompleksuose su atitinkamais antigenais (anti-VP1(Fab)2 + VP1; anti-MTP-N(Fab)2 + MTP-N; anti-MeNP(Fab)2 + MeNP) poveikio neuronų skaičiui neturėjo (3.2.6 pav.).



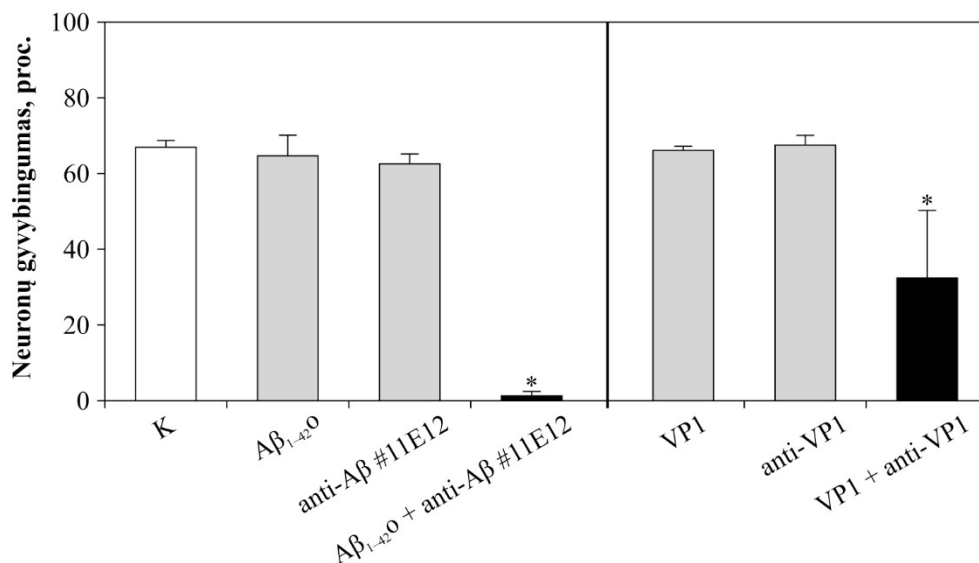
3.2.6 pav. Oligomerinių baltymų ir specifinių antikūnų kompleksų poveikis bendram neuronų skaičiui

Grafike pateiktų trumpinių reikšmės bei koncentracijos pateiktos bei aprašytos metodų dalies 2.2.2 skyriuje (žr. 42 psl.) bei 3.2.5 pav. (žr. 63 psl.). Bendras neuronų skaičius vertintas kaip aprašyta 3.2.2 pav. (žr. 59 psl.). ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline CGC ląstelių kultūros grupe, $n=3-11$.

Gauti rezultatai leidžia teigti, kad monokloninių antikūnų anti-A β ir visų A β_{1-42} agregacinių būsenų peptidų imuniniai kompleksai (anti-A β + A β_{1-42}), o taip pat ir kitų oligomerinių baltymų ir jiems specifinių antikūnų kompleksai (anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N ir anti-MeNP + MeNP) pasižymi stipriu toksiniu poveikiu CGC ląstelių kultūroms. Taip pat parodėme, kad antigeną prisijungianti antikūno Fc domeno dalis, yra svarbus veiksnys sukeliant neuronų žūtį.

Nustatant imuninių kompleksų poveikį žiurkės CGC kultūrai, tyrimams buvo naudoti pelių monokloniniai antikūnai, todėl kilo klausimas ar pasireiškęs toksinis imuninių kompleksų poveikis ląstelėms nėra susijęs su tarprūšine kryžmine reakcija. Tai tikrinome, naudodami pelių CGC kultūras, kurios buvo veikiamos anti-A β + A β_{1-42} oligomerų bei anti-VP1 + VP1 kompleksais, aukščiau aprašytų tyrimų metu pasižymėjusiais ryškiausiu toksiniu poveikiu neuronų gyvybingumui. Rezultatai parodė, kad kaip ir žiurkės CGC kultūroje, taip ir pelės CGC kultūroje didžiausiu statistiškai reikšmingu neuronų gyvybingumą mažinančiu poveikiu pasižymėjo anti-A β ir A β_{1-42} oligomerų kompleksai. Jie neuronų gyvybingumą sumažino iki 1 proc. (3.2.7 pav.). Anti-VP1 + VP1 kompleksai, lyginant su kontroline ląstelių grupe (66 proc.)

neuronų gyvybingumą sumažino dvigubai ir jis siekė 32 proc. Patys vieni nei antikūnai, nei antigenai neuronų žūties nesukėlė. Toks pat imuninių kompleksų toksinis poveikis žiurkės ir pelės CGC kultūrų neuronams rodo, kad abi kultūros yra vienodai jautrios pelių antikūnų ir antigenų kompleksų poveikiui.



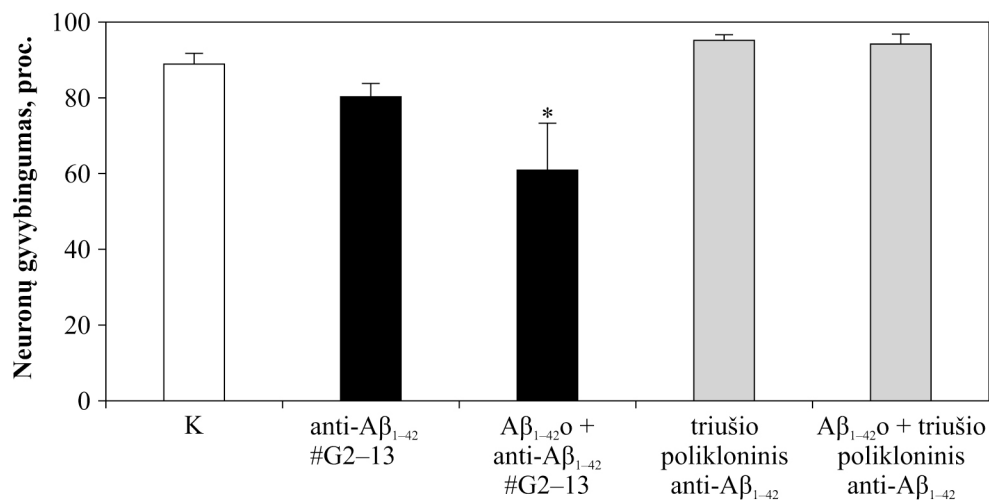
3.2.7 pav. Anti-Aβ #11E12 + Aβ₁₋₄₂ oligomerų ir anti-VP1 + VP1 kompleksų poveikis pelės neuronų gyvybingumui

Ląstelių gyvybingumas įvertintas po 24 val. inkubacijos su imuniniais kompleksais, sudarytais iš 2 μg/ml anti-Aβ #11E12 antikūnų ir 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomerų, bei 2 μg/ml anti-VP1(#6D11) antikūnų ir 2 μg/ml VP1. Ląstelių gyvybingumas įvertintas kaip aprašyta 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.).

* – $p < 0,05$ lyginant su kontroline pelės CGC ląstelių kultūros grupe, $n=3-6$.

Žinoma, kad mikroglijos ląstelių Fcγ receptorių specifiskumas IgG gali priklausyti nuo antikūno izotipo bei epitopo pozicijos antigene. Nustatyta, kad antikūno izotipas atlieka svarbų vaidmenį mikroglijos ląstelių Fcγ receptorių ir komplemento sistemos sukeltose Aβ fagocitozėje. Tyrimai su transgeninių pelių modeliais parodė, kad antikūnai nukreipti prieš epitopą esantį Aβ N-galinėje pozicijoje gali dalyvauti amiloidinių sancaupų šalinime ir neuronų apsaugoje, veikdami per mikroglijos Fc receptorių [249]. Dėl to kėlėme klausimą ar IgG1 tipo komerciniai antikūnai, kurie atpažįsta Aβ₁₋₄₂ C- galinę poziciją (anti-Aβ₁₋₄₂#G2-13) ir Aβ₁₋₄₂ oligomerų kompleksai bei, kaip papildoma neigiama kontrolė pasirinkti kiti komerciniai polikloniniai triušio anti-Aβ₁₋₄₂ antikūnai kompleksuose su Aβ₁₋₄₂ oligomerais gali sąlygoti toksinį poveikį smegenų ląstelėms. Buvo nustatyta, kad anti-Aβ₁₋₄₂ #G2-13 + Aβ₁₋₄₂ statistiškai patikimai sumažino neuronų gyvybingumą apie 30 proc.

lyginant su kontroline grupe, tačiau poveikio neuronų ir mikroglijos ląstelių skaičiui neturėjo. Triušio polikloninio antikūno anti- $A\beta_{1-42}$ + $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksai poveikio CGC ląstelių kultūrai neturėjo ir neuronų gyvybingumas kultūroje išliko kontrolinių ląstelių lygyje (3.2.8 pav.).

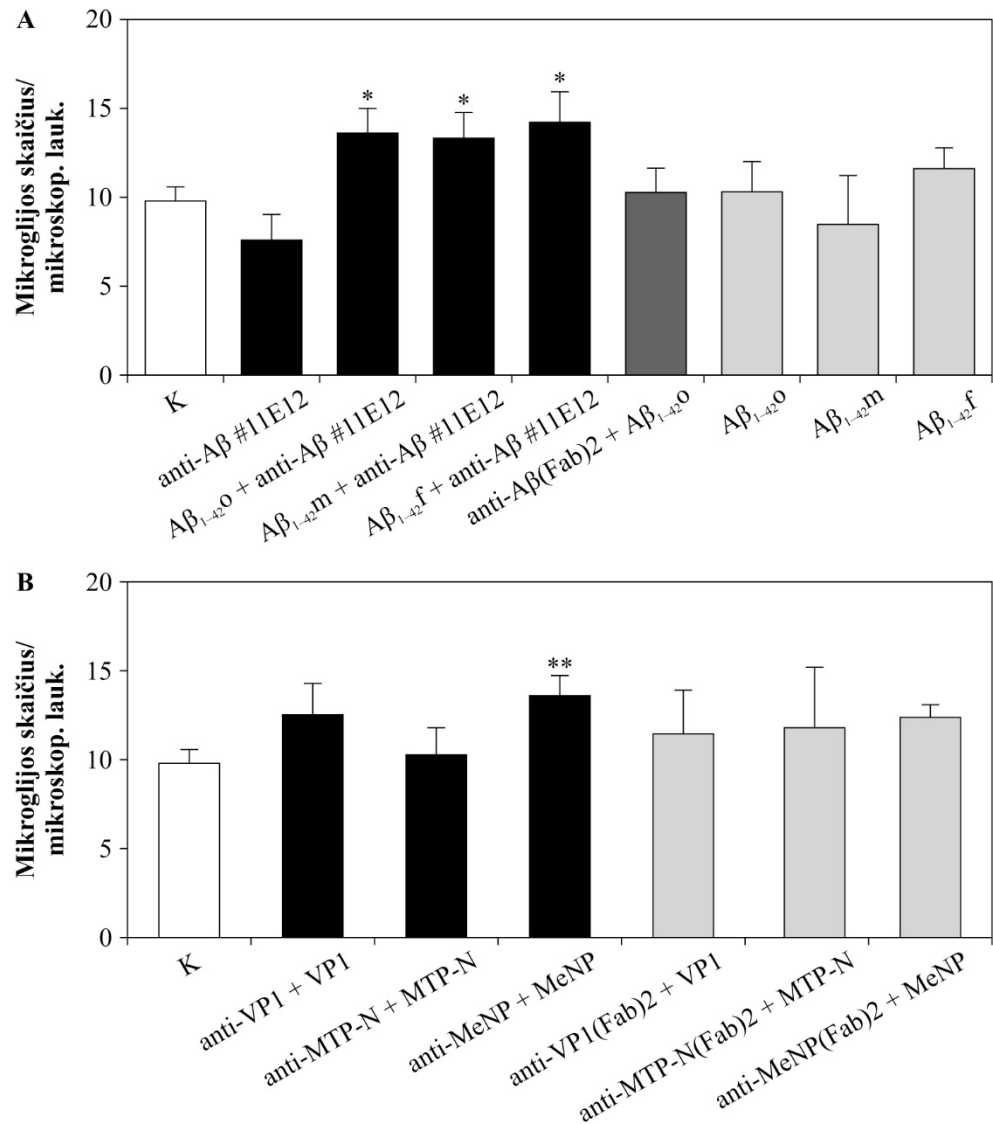


3.2.8 pav. *Anti- $A\beta_{1-42}$ #G2-13 + $A\beta_{1-42}$ oligomerų ir polikloninio antikūno anti- $A\beta_{1-42}$ + $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui*

Ląstelių gyvybingumas įvertintas po 24 val. inkubacijos, veikiant komerciniams antikūnams 2 μ g/ml anti- $A\beta_{1-42}$ #G2-13 (stulpelinės diagramos **juoda spalva**) bei polikloniniams triušio antikūnams anti- $A\beta_{1-42}$ (stulpelinės diagramos **pilka spalva**) vieniems ar kompleksuose su 1 μ M $A\beta_{1-42}$ oligomerais. Stulpelinės diagramos **balta spalva**– kontrolinė CGC ląstelių kultūros grupė. Ląstelių gyvybingumas įvertintas kaip aprašyta 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.). * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline CGC ląstelių kultūros grupe, $n=3-6$.

Rezultatai rodo, kad monokloniniai antikūnai, nukreipti prieš epitopą esantį $A\beta$ N- galinėje pozicijoje (anti- $A\beta$ #11E12) ir epitopą esantį C- galinėje pozicijoje (komercinis anti- $A\beta_{1-42}$ #G2-13) statistiškai reikšmingai mažina neuronų gyvybingumą. Polikloninis triušio antikūnas, kuris neatpažįsta žiurkės ląstelių Fc γ receptorių, poveikio neuronų gyvybingumui neturi.

CGC kultūra sudaryta iš kelių tipų smegenų ląstelių – neuronų, astrocitų ir mikroglijos. Žinoma, kad A β inicijuoja mikroglijos ląstelių vykdomą neuronų fagocitozę, kurios metu stebimas neuronų praradimas ir žūtis [153]. Yra nustatyta, kad pašalinus mikroglijos ląsteles iš mišrių kultūrų ir jose palikus neuronus ir astroцитus, mažos A β koncentracijos nesukelia neuronų žūtis, taip parodant mikroglijos ląstelių svarbą, sukeliant neuronų žūtį [144]. Todėl kėlėme klausimą, ar A β imuniniai kompleksai veikia mikroglijos ląstelių proliferaciją CGC kultūrose. Kaip pateikta 3.2.9 pav. A, po 24 val. inkubacijos, anti-A β + A β _{1–42} kompleksai, sudaryti iš skirtingos agregacinės būsenos A β _{1–42} peptidų, lyginant su kontrolinės CGC kultūros grupe, statistiškai patikimai didino mikroglijos ląstelių skaičių. Anti-A β (Fab)₂ ir A β _{1–42} oligomerų imuniniai kompleksai nepasižymėjo mikroglijos proliferaciją skatinančiu poveikiu ir mikroglijos skaičius išliko kontrolinių ląstelių lygyje (3.2.9 pav. A). Patys vieni A β _{1–42} monomerai, oligomerai ir fibrilės poveikio mikroglijos ląstelių skaičiui neturėjo.



3.2.9 pav. Anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ ir kitų oligomerinių baltymų ir jų specifinių antikūnų kompleksų poveikis mikroglijos ląstelių proliferacijai

(A) – anti-Aβ #11E12 + Aβ₁₋₄₂ (oligomerų, monomerų ir fibrilių) kompleksų poveikis mikroglijos ląstelių skaičiui CGC kultūroje. Grafike pateikti trumpiniai bei koncentracijos pateikti bei aprašyti 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.). (B) – anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N ir anti-MeNP + MeNP kompleksų poveikis mikroglijos ląstelių skaičiui CGC kultūroje. Tyrimė naudotų antikūnų ir antigenų koncentracijos aprašytos 3.2.5 pav. (žr. 63 psl.). Mikroglijos ląstelių skaičius įvertintas kaip aprašyta 3.2.4 pav. B (žr. 61 psl.). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, lyginant su kontroline CGC ląstelių kultūros grupe, $n = 4-8$.

Anti-VP1 ir anti-MTP-N ir jiems specifinių oligomerinės kilmės antigenų kompleksai poveikio mikroglijos ląstelėms neturėjo, tuo tarpu anti-MeNP + MeNP kompleksai, lyginant su kontroline ląstelių grupe (9,8 ląstelių mikroskopiniame laukelyje) statistiškai reikšmingai skatino mikroglijos ląstelių proliferaciją (13,6 ląstelių mikroskopiniame laukelyje) (3.2.9 pav. B). Anti-VP1(Fab)2 + VP1, anti-MTP-N(Fab)2 + MTP-N ir anti-MeNP(Fab)2 + MeNP kompleksai statistiškai patikimo poveikio mikroglijos ląstelių skaičiui neturėjo.

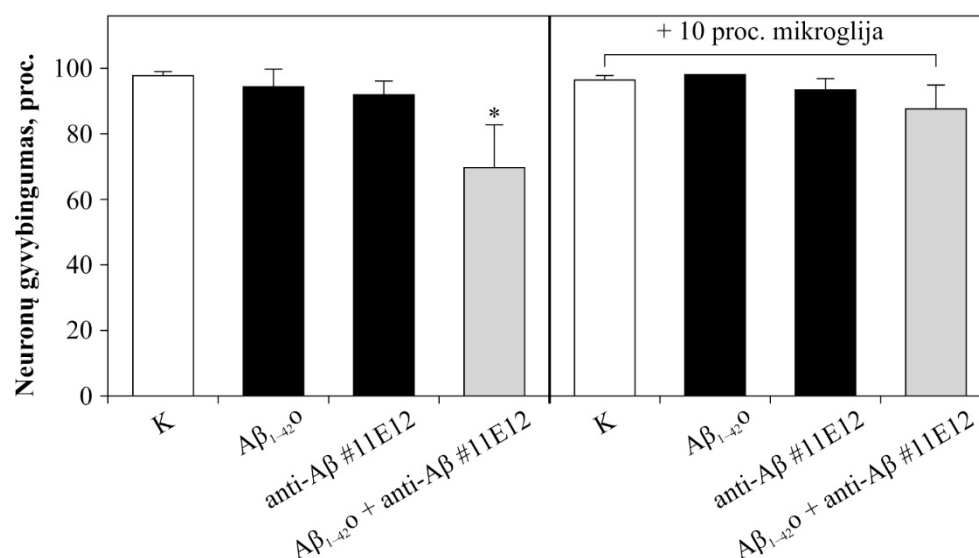
Gauti rezultatai leidžia teigti, jog antikūnų–antigenų kompleksų toksiskumą sąlygojanti antikūno Fc dalis, prisijungusi prie mikroglijos Fcγ receptorių, stimuliuoja mikroglijos ląstelių proliferaciją.

Vienas iš svarbių mikroglijos ląstelių aktyvacijos požymių yra uždegiminių citokinų, tokių kaip TNF- α , išskyrimas į augimo terpę [246]. Todėl buvo svarbu įvertinti, ar CGC kultūrą inkubuojant su anti-A β + A β _{1–42} kompleksais yra stebimas TNF- α kiekio kitimas ląstelių kultūros terpėje. Kolegų iš LSMU Biochemijos laboratorijos nustatyta, kad po 24 val. inkubacijos su anti-A β + A β _{1–42} kompleksais, buvo stebimas statistiškai patikimas TNF- α kiekio didėjimas, tuo tarpu CGC kultūrą veikiant tik anti-A β ar A β _{1–42} oligomerais, TNF- α kiekio didėjimas ląstelių augimo terpėje nebuvo nustatytas. TNF- α lygio didėjimas buvo stebimas ir ląsteles veikiant kitais oligomerinės kilmės baltymų ir jų specifinių antikūnų kompleksais (anti-VP1 + VP1; anti-MTP-N + MTP-N; anti-MeNP + MeNP), iš kurių stipriausiu poveikiu išsiskyrė anti-VP1 + VP1. Patys vieni oligomeriniai baltymai ar antikūnai poveikio TNF- α neturėjo. Tyrimų metu naudotas priešuždegiminis vaistas minociklinas apsaugojo smegenų ląsteles nuo imuninių kompleksų sąlygoto TNF- α lygio didėjimo ir neuronų žūties, parodant imuninių kompleksų vaidmenį mikroglijos ląstelių aktyvacijos procesuose. Detalesnis eksperimentinio tyrimo eigos ir analizės aprašymas pateiktas paskelbtame straipsnyje [250] (žr. 126 psl.).

3.2.1. Imuninių kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui ilgalaikėse smegenėlių ląstelių kultūrose

Ankstesni tyrimai parodė, kad monokloninių antikūnų prieš A β oligomeras ir A β _{1–42} oligomerinių junginių kompleksai *in vitro* sąlygomis sukelia stiprią neuronų žūtį ir skatina mikroglijos ląstelių proliferaciją (3.2 skyrius). Tiriant anti-A β + A β _{1–42} oligomerų poveikį neuronų gyvybingumui pastebėjome, kad imuninių kompleksų poveikis neuronams CGC kultūroje pakito, t. y. neuronai po 24 val. inkubacijos su anti-A β + A β _{1–42} oligomerų kompleksais išliko gyvybingi arba buvo stebima tik nežymi neuronų žūtis. Tuo tarpu imuninių kompleksų poveikis mikroglijos ląstelėms išliko nepakitęs. Tokie rezultatai leidžia manyti, kad anti-A β + A β _{1–42} oligomerų kompleksų toksinio

poveikio neuronams kitimas gali būti susijęs su mikroglijos ląstelėmis. Žinoma, kad ilgalaikių CGC kultūrų neuronai, lyginant su trumpalaikių kultūrų neuronais, yra jautresni įvairių patogeninių medžiagų ar dirgiklių poveikiui [251]. Todėl tyrėme anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksų poveikį neuronų gyvybingumui ilgalaikėse 28 dienų smegenėlių ląstelių kultūrose. CGC kultūra buvo inkubuojama 24 val. su anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksais. Imuninių kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui taip pat buvo nustatomas papildžius CGC kultūrą su 10 proc. mikroglijos ląstelių. Kaip ir ankstesnių tyrimų metu, nustatyta, kad patys vieni nei antikūnai, nei $A\beta_{1-42}$ oligomerai nesukėlė neuronų žūties (3.2.1.1 pav.). Ląstelių inkubacija su anti- $A\beta$ ir $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksais be papildomo mikroglijos ląstelių kiekio, sumažino neuronų gyvybingumą 28 proc., lyginant su kontroline ląstelių grupe (98 proc.). Tiriamojoje grupėje su papildomu mikroglijos ląstelių kiekiu buvo stebima tik neuronų gyvybingumo mažėjimo tendencija (3.2.1.1 pav.).



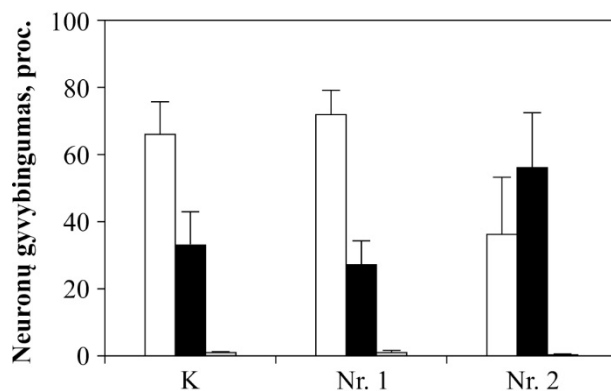
3.2.1.1 pav. Anti- $A\beta$ #11E12 + $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui 28 dienų CGC kultūrose

Ląstelių gyvybingumas įvertintas po 24 val. inkubacijos su imuniniais kompleksais, sudarytais iš 4 $\mu\text{g/ml}$ anti- $A\beta$ #11E12 antikūnų ir 1 μM $A\beta_{1-42}$ oligomerų. 28 dienų CGC kultūra buvo papildyta/nepapildyta 10 proc. mikroglijos ląstelių. Ląstelių gyvybingumas įvertintas kaip aprašyta 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.). * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline 28 dienų CGC ląstelių kultūros grupe, $n=2-5$.

Tai rodo, kad imuninių kompleksų toksinio poveikio išnykimas gali būti susijęs su didesniu mikroglijos ląstelių skaičiumi kultūroje, t. y. padidėjus

mikroglijos skaičiui, jos gali efektyviau ir greičiau pašalinti pažeistas ar žuvusias neuronines ląsteles.

Aktyvinta mikroglijos kultūra į terpę išskiria įvairius prouždegiminius veiksnius, kurie gali sukelti neuronų žūtį. Kad patikrintume, ar imuniniais kompleksais paveikta mikroglia išskiria į terpę neuronų žūtį galinčius sukelti tirpius junginius, atlikome seriją eksperimentų. Juose gryna žievės mikroglijos ląstelių kultūra buvo auginama CGC kultūros augimo terpėje ir veikiama anti-A β + A β ₁₋₄₂ oligomerų kompleksais 24 val. Tada terpė buvo nusiurbama, užpilama ant grynų smegenėlių neuronų ląstelių kultūros ir inkubuojama 24 val. (grupė Nr. 1). Kitoje eksperimentinėje grupėje (Nr. 2) gryna smegenėlių neuronų kultūra buvo papildyta 10 proc. mikroglijos ląstelių ir ant tokios kultūros užpilama terpės, nusiurbtos nuo imuniniais kompleksais veiktų mikroglijos ląstelių. Kaip matyti 3.2.1.2 pav., po 24 val. inkubacijos Nr. 2 grupėje buvo stebima neuronų gyvybingumo mažėjimo tendencija. Neuronų gyvybingumo mažėjimas buvo nulemtas nekrozinės ląstelių žūties. Tiriamoji grupė Nr. 1 neuronų žūties nesukėlė. Tarp grupių su papildyta ir nepapildyta gryna mikroglijos ląstelių kultūra statistiškai patikimas skirtumas nebuvo nustatytas. Gauti duomenys leidžia daryti prielaidą, jog toksiniam anti-A β + A β ₁₋₄₂ oligomerų poveikiui didelę reikšmę turi mikroglijos ląstelių ir neuronų sąveika, o taip pat imuninių kompleksų poveikis ląstelėms gali būti siejamas su kitų baltyminių veiksnių veikimu.



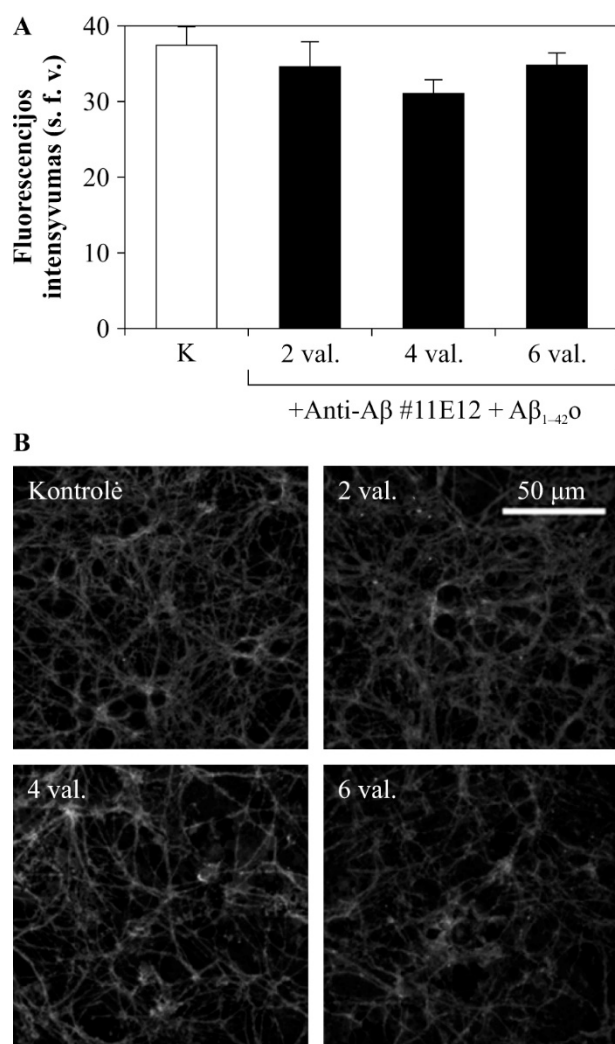
3.2.1.2 pav. Anti-A β #11E12 + A β ₁₋₄₂ oligomerų kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui grynoje smegenėlių neuronų ląstelių kultūroje

K – kontrolinė, gryna 28 dienų smegenėlių neuronų kultūra; **Nr. 1** – 28 dienų gryna smegenėlių neuronų kultūra užpilta terpės, nusiurbtos nuo anti-A β + A β ₁₋₄₂ veiktų mikroglijos ląstelių. **Nr. 2** – 28 dienų gryna smegenėlių neuronų kultūra papildyta 10 proc. mikroglijos ląstelių, užpilta terpės, nusiurbtos nuo anti-A β + A β ₁₋₄₂ veiktų mikroglijos ląstelių. Tikslus grafike pateiktų tiriamųjų grupių (**Nr. 1** ir **Nr. 2**) aprašymas pateiktas metodų dalies 2.2.2 skyriuje (žr. 42 psl.). Stulpelinės diagramos **balta spalva** – gyvi neuronai (proc.), **juoda** – nekrozės būdu ir **pilka spalva** pažymėti apoptozės būdu žuvę neuronai (proc.). Ląstelių gyvybingumas įvertintas kaip aprašyta 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.). n = 4.

3.2.2. $A\beta_{1-42}$ peptidų ir monokloninių antikūnų anti- $A\beta$ kompleksų poveikis neuronų sinapsiniams ryšiams CGC kultūroje

Sinapsių praradimas yra laikomas vienu iš ankstyvųjų AL patologinių įvykių, tiesiogiai siejamų su neuronų degeneracija [252]. $A\beta$ oligomerų poveikyje susilpnėjęs sinapsių aktyvumas yra siejamas su glutamato receptorių funkcijų praradimu, vedančiu prie neuronų dendritinių ataugų degradacijos [253]. Todėl tyrėme ar imuniniai kompleksai gali sukelti sinaptotoksinį poveikį CGC ląstelių kultūroms. Šiuose tyrimuose CGC kultūra buvo veikama skirtingos agregacinės būsenos $A\beta_{1-42}$ peptidų ir anti- $A\beta$ kompleksais. Imuninių kompleksų poveikis ląstelėms buvo nustatomas po imunofluorescencinio ląstelių dažymo su specifiniu presinapsinio poliaus žymeniu, su sinaptosomomis susijusiu SNAP-25 baltymu, kuris dalyvauja sinapsinių pūslelių susidaryme. Didžioji šio baltymo dalis yra aptinkama neuronų aksonuose – neurituose. Pagal šio baltymo (SNAP-25) pasiskirstymą buvo įvertinamas sinapsinių ryšių tankis, atliekant nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumo analizę po CGC inkubacijos su imuniniais kompleksais.

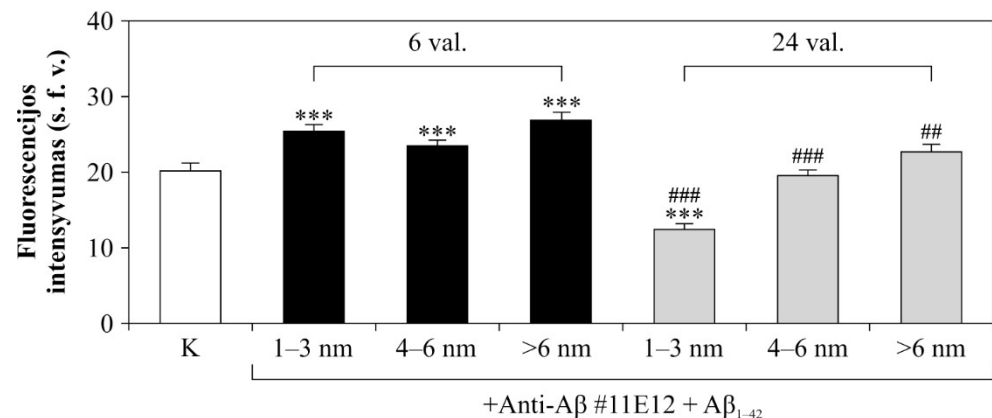
Kaip parodyta 3.2.2.1 pav. A, po 6 val. inkubacijos su anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksais, pokyčių nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumui nebuvo nustatyta ir jis išliko panašus kaip kontrolinėje ląstelių grupėje (37 s. f. v.). Tai rodo, kad imuniniai kompleksai po 2–6 val. inkubacijos poveikio SNAP-25 raiškai neturėjo. Įvertinus SNAP-25 baltymo pasiskirstymą neuronų aksonuose po 6 val. inkubacijos su anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksais, buvo stebima neuritų tankio mažėjimo bei nykimo tendencija (3.2.2.1 pav. B). Šis 6 val. inkubacinis laikas buvo pasirinktas tolesniems sinapsinių ryšių pokyčiams įvertinti, jį laikant kaip galimą imuninių kompleksų inicijuotų sinapsinių pažeidimų pradžią CGC ląstelių kultūroje.



3.2.2.1 pav. Anti-Aβ #11E12 + Aβ₁₋₄₂ oligomerų kompleksų poveikis sinapsiniams ryšiams CGC kultūrose

CGC ląstelių kultūros 2 val., 4 val. ir 6 val. inkubacija su 1 μg/ml anti-Aβ ir 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomerų (Aβ₁₋₄₂o) kompleksais. **(A)** – anti-Aβ#11E12 + Aβ₁₋₄₂o kompleksų poveikis nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumui. Vidutinis fluorescencijos intensyvumas standartizuotuose (0,02 mm²) mikroskopiniuose laukeliuose, išreikštas standartiniais fluorescenciniais vienetais (s. f. v.). **K** – kontrolinė CGC ląstelių kultūra. **(B)** – SNAP-25 baltymo pasiskirstymas neurituose po inkubacijos su anti-Aβ#11E12 + Aβ₁₋₄₂o. Fluorescencinės nuotraukos po imunofluorescencinio dažymo (žr. 2.4 skyrius, 45 psl.), objektyvas ×20, nuotraukų mastelis – 50 μm, padidinimas – 200 kartų, n=3.

Vertinant monokloninių anti-A β ir skirtingų A β_{1-42} oligomerizacijos formos peptidų (mažų oligomerų – 1–3 nm, didelių oligomerų – 4–6 nm ir fibrilių – >6 nm) kompleksų poveikį SNAP-25 raiškai po 6 ir 24 val. inkubacijos nustatyta, kad po 6 val. inkubacijos imuniniai kompleksai buvo stebimas statistiškai reikšmingas nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumo didėjimas, lyginant su kontroline ląstelių grupe (3.2.2.2 pav.). Nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumą labiausiai didino imuniniai kompleksai su mažais A β_{1-42} oligomerais ir fibrilėmis: jiems veikiant fluorescencinis intensyvumas padidėjo atitinkamai 5 ir 7 s. f. v., lyginant su kontroline grupe. Kaip matyti 3.2.2.2 pav., kompleksai su dideliais A β_{1-42} oligomerais taip pat didino nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumą. Šioje grupėje su SNAP-25 susijusi fluorescencija išaugo 4 s. f. v., lyginant su kontroline ląstelių grupe. Statistiškai patiko skirtumo tarp imuninių kompleksų grupių nebuvo nustatyta.



3.2.2.2 pav. Anti-A β #11E12 + A β_{1-42} kompleksų poveikis nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumui

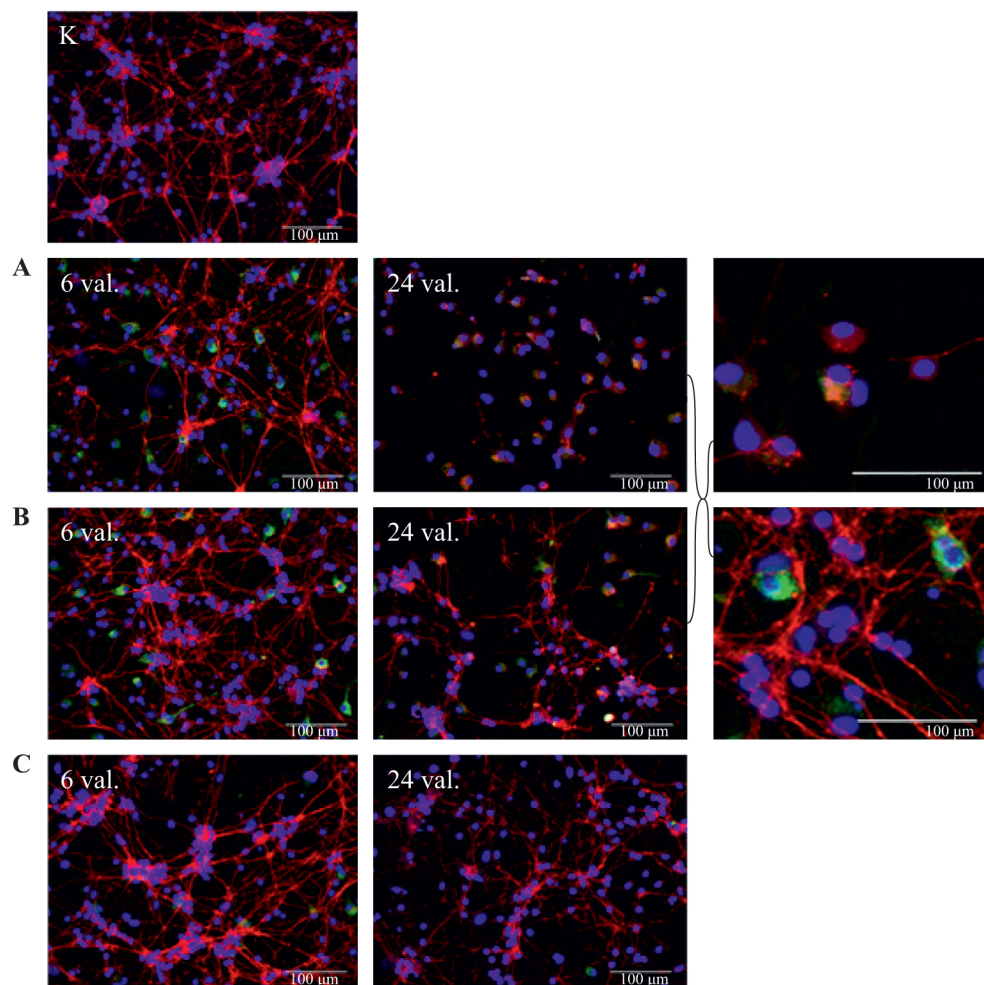
1 μ g/ml anti-A β ir 1 μ M A β_{1-42} kompleksų, sudarytų iš mažų (1–3 nm), didelių (4–6 nm) oligomerų bei fibrilių (>6 nm), poveikis nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumui CGC kultūroje po 6 val. (stulpelinės diagramos **juoda spalva**) ir 24 val. (stulpelinės diagramos **pilka spalva**). Stulpelinės diagramos **balta spalva** – kontrolinė CGC ląstelių kultūra. Fluorescencijos intensyvumas išreikštas santykiniais fluorescenciniais vienetais (s. f. v.). *** – $p < 0,001$ – statistiškai patikimas fluorescencijos intensyvumo pokytis, lyginant su kontroline ląstelių grupe, ### – $p < 0,001$, ## – $p < 0,01$ – statistiškai patikimas fluorescencijos intensyvumo pokytis, lyginant su imuninių kompleksų grupe po 6 val. inkubacijos, $n=3$.

Nustatyta, kad po 24 val. inkubacijos su imuniniais kompleksais, nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumą mažino antikūnai kompleksuose su mažais $A\beta_{1-42}$ oligomerais, t. y. fluorescencijos intensyvumas, lyginant su kontroline ląstelių grupe sumažėjo 8 s. f. v. (3.2.2.2 pav.). Kiti $A\beta_{1-42}$ peptidų agregatų (didelių oligomerų bei fibrilių) ir antikūno kompleksai nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos nekeitė ir jis išliko panašus kaip kontrolinėje ląstelių grupėje (20 s. f. v.) (3.2.2.2 pav.). Tarp imuninių kompleksų grupių, esant 6 val. ir 24 val. inkubaciniams laikotarpiams, nustatytas statistiškai patikimas su SNAP-25 susijęs fluorescencijos pokytis.

Duomenys patvirtina ankstesniuose tyrimuose darytą prielaidą, kad statistiškai reikšmingam sinaptotoksiniam imuninių kompleksų poveikiui pasireikšti reikalingas ilgesnis nei 6 val. inkubacinis laikotarpis.

Nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumo mažėjimas po 24 val. inkubacijos gali būti siejamas su SNAP-25 kiekio mažėjimu neuronuose. Gauti duomenys taip pat parodo, kad imuninių kompleksų toksiškumas neuritams gali būti siejamas su kompleksuose esančio $A\beta_{1-42}$ agregacinės būsenos, t. y. mažėjant $A\beta_{1-42}$ oligomerizacijos laipsniui didėja imuninių kompleksų toksinis poveikis neuritams.

Po 6 val. ir 24 val. inkubacijos su $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksais buvo stebimas SNAP-25 kiekio neuronuose mažėjimas (3.2.2.3 pav. A ir B). Nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas, nustatytas po 24 val. inkubacijos su anti- $A\beta$ ir mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksais, atspindi ir neuritų pokyčiuose: SNAP-25 baltymo ribos tampa neaiškios, stebimas neuronų skaičiaus mažėjimas bei neuritų struktūriniai pokyčiai, nykimas. Mažesni, tačiau panašūs sinapsių pokyčiai buvo stebimi kultūroje, veiktoje kompleksais su dideliais $A\beta_{1-42}$ oligomerais ir fibrilėmis (3.2.2.3 pav. B ir C). Duomenys rodo ryšį tarp $A\beta_{1-42}$ toksiškumo, nulemtą ne tik jo agregacinės būsenos, tačiau ir jo dydžio bei inkubacijos trukmės. Mažėjant $A\beta_{1-42}$ agregacijos laipsniui stebimas su SNAP-25 susijusios fluorescencijos intensyvumo mažėjimas ir neuritų struktūriniai pokyčiai. Ilgalaikių inkubacijų metu imuniniai kompleksai pasižymi stipresniu sinaptotoksiniu poveikiu ląstelėms.

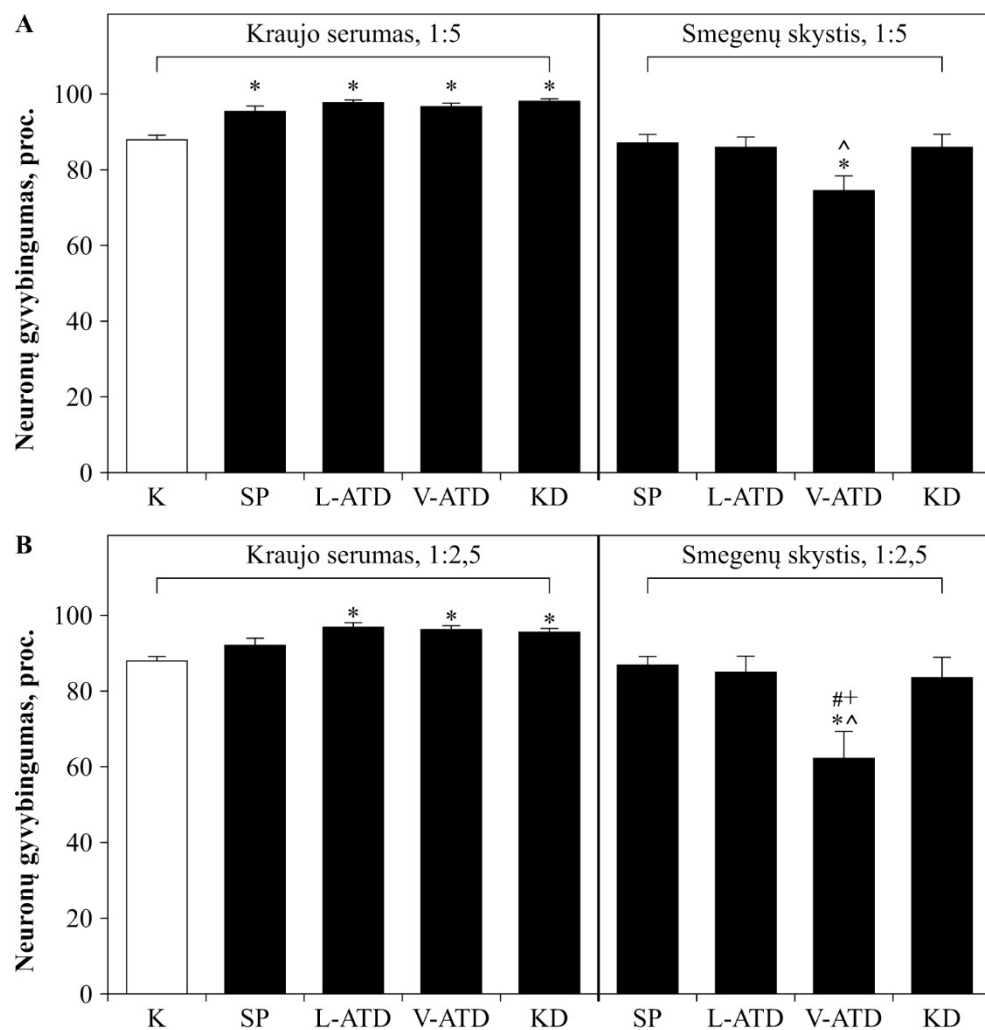


3.2.2.3 pav. *Anti- $A\beta$ #11E12 + $A\beta_{1-42}$ kompleksų poveikis SNAP-25 baltymo kiekiui CGC kultūroje*

Fluorescencinės 2D nuotraukos, objektyvas $\times 20$, padidinimas – 200 kartų, nuotraukų mastelis 100 μm . Imuninių kompleksų su mažais $A\beta_{1-42}$ oligomerais (1–3 nm) **(A)**, dideliais $A\beta_{1-42}$ oligomerais (4–6 nm) **(B)** ir $A\beta_{1-42}$ fibrilėmis (>6 nm) **(C)** 6 ir 24 val. inkubacija CGC ląstelių kultūroje. Tyrimo naudotų medžiagų koncentracijos aprašytos 3.2.2.2 pav. (žr. 74 psl.). **Mėlyna spalva** nudažyti ląstelių branduoliai (Hoechst 33342); **žalia spalva** – mikroglijos ląstelės (GS-IB4); **raudona spalva** – neuritai (SNAP-25); **K** – kontrolinė CGC ląstelių kultūra, $n=3$.

3.3. Pacientų biologinių skysčių poveikio CGC ląstelių kultūrose tyrimas

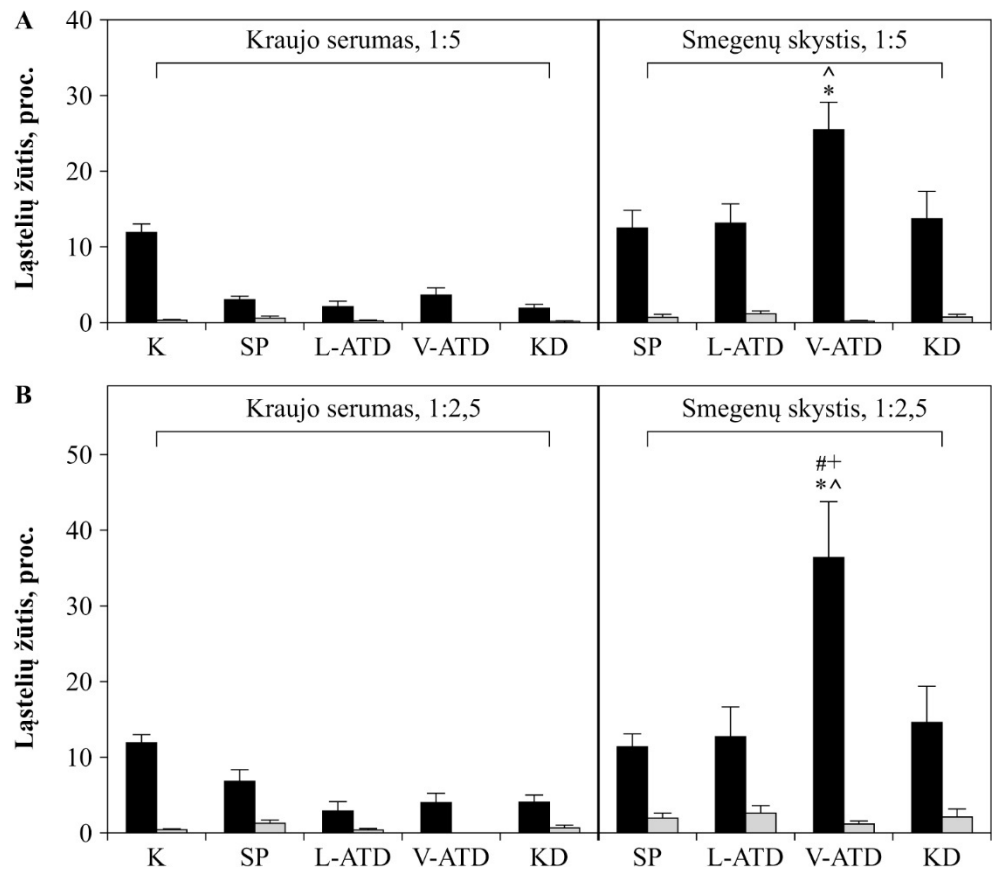
Vieni perspektyviausių AL diagnostinių metodų laikomi A β bei Tau baltymo koncentracijų pokyčio tyrimai smegenų skystyje (SS) ir kraujo serume (KS). Nors A β ir Tau kiekis dažnai matuojamas klinikinių tyrimų metu, iki šiol nėra įrodyta, kad pacientų biologiniuose skysčiuose esantys minėti baltymai sukelia neuronų žūtį. Eksperimentų metu siekėme iširti AL biologinių skysčių poveikį smegenų ląstelėms. Tiriamąsias grupes sudarė: kognityvinių sutrikimų neturinčių pacientų grupė (SP), kita demencijos forma sergančių pacientų grupė (KD) ir Alzheimerio tipo demencija sergančių pacientų grupė (ATD), atitinkamai L-ATD – lengva bei V-ATD – vidutine AL forma sergantys pacientai. Iš šių pacientų buvo gauti biologiniai skysčių pavyzdžiai. Kraujo serumo ir smegenų skysčio mėginiai buvo inkubuojami 24 val. su CGC ląstelių kultūromis, esant 1:5 ir 1:2,5 biologinių skysčių ir ląstelių augimo terpės santykiui, t.y. 100 μ l ir 200 μ l serumo bei smegenų skysčio buvo pridedama į 400 μ l bei 300 μ l ląstelių augimo terpės. 3.3.1 pav. matome, kad demencija sergančių pacientų (L-ATD, V-ATD ir KD) kraujo serumas nesukėlė CGC kultūros neuronų žūties (3.3.1 pav. A ir B).



3.3.1 pav. Biologinių skysčių poveikis neuronų gyvybingumui

CGC kultūros terpė buvo papildyta kraujo serumu ar smegenų skysčiu: **(A)** – santykiu su augimo terpe 1:5. **(B)** – santykiu su augimo terpe 1:2,5. Detalus tyrimo aprašymas pateiktas metodų dalyje, 2.8 skyrius (žr. 47–48 psl.). Neuronų gyvybingumo vertinimas aprašytas metodų dalyje, 2.3 skyrius (žr. 43 psl.) bei 3.2.1 pav. (žr. 58 psl.). **Juoda spalva** pateikiamos tiriamųjų grupių biologinių skysčių poveikio stulpelinės diagramos, kuriose SP – kognityvinių sutrikimų neturintys pacientai ($n = 19$); L-ATD – lengva AL forma ($n = 15$) ir V-ATD – vidutine AL forma ($n = 10$) sergantys pacientai; KD – kita demencijos forma sergantys pacientai ($n = 11$). * – $p < 0,05$, lyginant su kontroline CGC ląstelių kultūros grupe; ^ – $p < 0,05$, lyginant su SP grupe; # – $p < 0,05$, lyginant su L-ATD grupe; + – $p < 0,05$, lyginant su KD grupe.

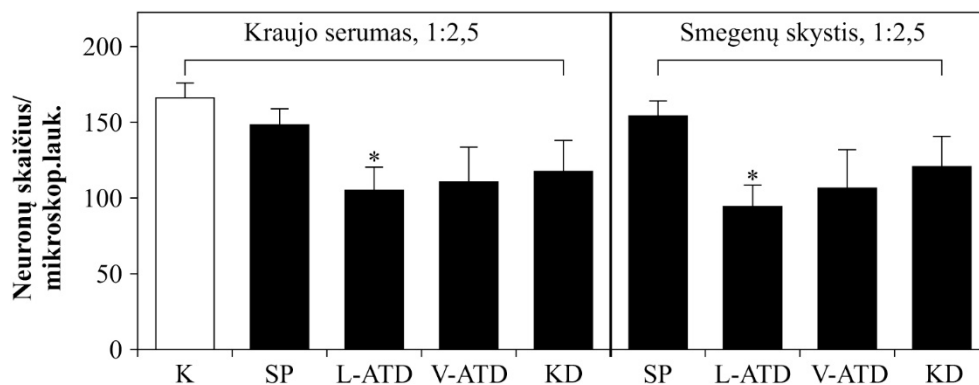
Kognityvinių sutrikimų neturinčių pacientų kraujo serumas, lyginant su kontroline ląstelių grupe, taip pat nesukėlė neuronų žūties. Panašus poveikis neuronų gyvybingumui išliko ląsteles inkubuojant su smegenų skysčio mėginiais, esant 1:5 ir 1:2,5 smegenų skysčio ir ląstelių augimo terpės santykiui. Nustatyta, kad tiriamųjų pacientų grupių smegenų skystis nekeitė neuronų gyvybingumo ir jis išliko panašus kaip kontrolinėje ląstelių grupėje (88 proc.): 87 proc. SP, 85 proc. L-ATD ir 84 proc. KD grupėse. Visgi, toksiniu poveikiu neuronams pasižymėjo V-ATD pacientų grupė. V-ATD smegenų skystis esant 1:5 smegenų skysčio ir ląstelių augimo terpės santykiui, lyginant su kontroline CGC ląstelių kultūros grupe sumažino neuronų gyvybingumą 14 proc., o su SP grupe – 13 proc. (3.3.1 pav. A). Stipriausias V-ATD citotoksinis poveikis buvo stebimas esant 1:2,5 smegenų skysčio ir ląstelių augimo terpės santykiui (3.3.1 pav. B). Nustatyta, kad V-ATD, lyginant su kontroline ir SP grupėmis sumažino neuronų gyvybingumą 25 proc. Statistiškai reikšmingas neuronų gyvybingumo sumažėjimas buvo stebimas ir V-ATD grupę lyginant su L-ATD (22 proc.) bei KD (21 proc.) pacientų grupių smegenų skysčiais (3.3.1 pav. B). Toks statistiškai patikimas neuronų gyvybingumo sumažėjimas buvo nulemtas nekrozinės ląstelių žūties (3.3.2 pav. A ir B).



3.3.2 pav. Biologinių skysčių poveikis neuronų žūčiai

(A) ir (B) – kraujo serumo ir smegenų skysčio mėginiai po 24 val. inkubacijos su CGC kultūros ląstelėmis, atitinkamai esant 1:5 ir 1:2,5 biologinių skysčių ir ląstelių augimo terpės santykiui. Stulpelinės diagramos **juoda spalva** – nekrozės būdu žuvę neuronai (proc.), **pilka spalva** – apoptozės būdu žuvę neuronai (proc.). Tiriamųjų grupių santrumpos pateiktos 3.3.1 pav. (žr. 78 psl.). * – $p < 0,05$, lyginant su kontroline grupe; ^ – $p < 0,05$, lyginant su SP grupe; # – $p < 0,05$, lyginant su L-ATD grupe; + – $p < 0,05$, lyginant su KD grupe.

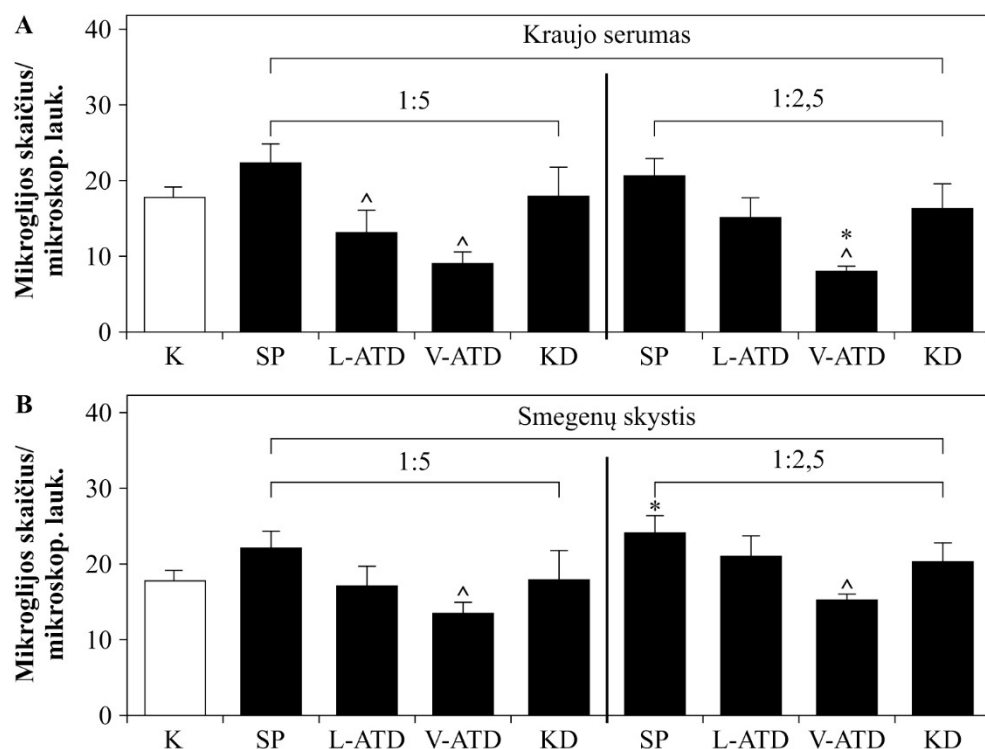
Nustatyta, kad visų demencija sergančių pacientų grupių (L-ATD, V-ATD ir KD) kraujo serumas (1:2,5) ir smegenų skystis (1:2,5), bet ne SP grupės minėtieji biologiniai skysčiai turi tendenciją mažinti neuronų tankį CGC kultūroje. Kaip matyti 3.3.3 pav. statistiškai reikšmingu neuronų tankį mažinančiu poveikiu pasižymėjo tik L-ATD sergančių pacientų grupės kraujo serumas ir smegenų skystis (1:2,5), kurie lyginant su kontroline ląstelių grupe, sumažino bendrą neuronų skaičių kultūroje atitinkamai 37 proc. ir 44 proc.



3.3.3 pav. Biologinių skysčių poveikis bendram neuronų skaičiui

Tiriamųjų grupių santrumpas pateiktos 3.3.1 pav. (žr. 78 psl.). Bendras neuronų skaičius (gyvų, nekrozinų ir apoptozinių neuronų suma) buvo vertinamas penkiuose eksperimentinės lėkštelės šulinėlio laukeliuose (du šulinėliai vienam eksperimentui). * – $p < 0,05$ – statistiškai patikimas neuronų skaičiaus mažėjimas CGC kultūroje, lyginant su kontroline CGC ląstelių kultūros grupe.

Ivertinome ir biologinių skysčių įtaką mikroglijos ląstelių skaičiui. Kaip matyti 3.3.4 pav., po 24 val. inkubacijos L-ATD ir V-ATD biologiniai skysčiai (santykiu 1:5 ir 1:2,5) slopino mikroglijos proliferaciją (3.3.4 pav. A ir B).



3.3.4 pav. *Biologinių skysčių poveikis mikroglijos ląstelių skaičiui*

(A) – kraujo serumo ir (B) – smegenų skysčio mėginiai po 24 val. inkubacijos su CGC kultūrų ląstelėmis, esant 1:5 ir 1:2,5 biologinių skysčių ir ląstelių augimo terpės santykiui. Tiriamųjų grupių santrumpas pateiktos 3.3.1 pav. (žr. 78 psl.). Mikroglijos ląstelių skaičius įvertintas kaip aprašyta 3.2.4B pav. (žr. 61 psl.). * – $p < 0,05$ – statistiškai patikimas mikroglijos skaičiaus mažėjimas CGC kultūroje, lyginant su kontroline grupe; ^ – $p < 0,05$ – statistiškai patikimas mikroglijos skaičiaus mažėjimas CGC kultūroje, lyginant su SP grupe.

Mikroglijos ląstelių skaičius jas veikus L-ATD ir V-ATD grupių kraujo serumu (1:5), lyginant su SP grupe (22 ląstelės mikroskopiniame laukelyje) sumažėjo atitinkamai 41 proc. ir 59 proc. Tik V-ATD grupės kraujo serumas (1:2,5) statistiškai reikšmingai sumažino mikroglijos ląstelių skaičių atitinkamai 56 proc. lyginant su kontroline ir 62 proc. lyginant su SP grupėmis (3.3.4 pav. A). Tyrimai su smegenų skysčiu parodė, kad vienintelės V-ATD sergančių pacientų grupės smegenų skystis (santykiu 1:5 ir 1:2,5) turėjo statistiškai reikšmingą mikroglijos ląstelių skaičių mažinantį poveikį ir lyginant su SP grupe mikroglijos skaičius sumažėjo 41 proc. (3.3.4 pav. B). KD grupės kraujo serumas ir smegenų skystis poveikio mikroglijos ląstelių skaičiui neturėjo ir jis išliko panašus kaip kontrolinėje ląstelių grupėje

(3.3.4 pav. A ir B). Kognityvinių sutrikimų neturinčių pacientų (SP) biologiniai skysčiai (santykiu 1:5 ir 1:2,5) buvo linkę skatinti mikroglijos ląstelių proliferaciją, tačiau statistiškai patikimas mikroglijos ląstelių skaičiaus didėjimas buvo stebimas tik ląsteles inkubuojant SP grupės smegenų skysčiu (santykis 1:2,5). Nustatyta, kad mikroglijos ląstelių skaičius, lyginant su kontroline ląstelių grupe išaugo trečdaliu (3.3.4 pav. B). Tai rodo, kad Alzheimerio tipo demencija sergančių pacientų (L-ATD ir V-ATD) biologiniai skysčiai pasižymi mikroglijos proliferaciją slopinančiu poveikiu, o SP grupės biologiniai skysčiai yra linkę mikroglijos ląstelių proliferaciją skatinti. Toks mikroglijos ląstelių mažėjimas demencijų grupėse bei mikroglijos aktyvacija kognityvinių sutrikimų neturinčių pacientų grupėje gali būti siejami su biologinių žymenų koncentracijos pokyčiais, kurie remiantis literatūros šaltiniais, gali rodyti sąsajas su mikroglijos ląstelių skaičiaus kitimu.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Amiloido beta baltymo ($A\beta$) kaupimasis tarpląstelinėje smegenų erdvėje yra laikomas vienu iš svarbiausių veiksnių, inicijuojančių AL [45]. Amiloidinė hipotezė teigia, kad pirminė AL priežastis yra neuronų disfunkcija ir neuronų žūtis, kurią sukelia $A\beta_{1-42}$ peptidai [52, 254–256]. Nors $A\beta_{1-42}$ peptidų poveikis smegenų ląstelėms yra žinomas, tačiau iki šiol $A\beta$ oligomerų toksiškumo mechanizmai nėra aiškūs.

Yra išskiriami du pagrindiniai mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų toksinio poveikio neuronams keliai. Jie gali sukelti neuronų žūtį mišrioje ir grynoje ląstelių kultūrose tiesiogiai – neveikdami mikroglijos ląstelių gyvybingumo [52], ir netiesiogiai – per sąveiką su glijos ląstelėmis [6, 149, 153, 155]. Pastebėta, kad agreguotos $A\beta$ formos pažeidžia sinapsinį perdavimą ir inicijuoja apoptozę per lipidų membranos sutrikdymą, porų susidarymą, tau baltymo hiperfosforilinimą ar kaspazės-3 aktyvaciją [257, 258]. Yra tyrimų atskleidžiančių, jog $A\beta$ sąveika su neuronų plazminė membrana gali tiesiogiai sutrikdyti neuronų funkcijas [259] ar inicijuoti jų žūtį. Visgi, $A\beta$ sąveikos su smegenų ląstelių membranomis mechanizmai, esant skirtingoms $A\beta$ agregacinėms būsenoms nėra visiškai aiškūs [260].

Toksiškiausi maži $A\beta$ oligomerai [52, 260], priešingai nei monomerinės $A\beta$ formos bei didesni $A\beta$ agregatai, gali prisijungti prie fosfolipidinių pūslelių, kurių sudėtis yra panaši į neuronų membranos sudėtį [52, 261]. Žinoma, jog $A\beta$ oligomerai padidina membranos pralaidumą tiesiogiai, suformuodami $A\beta$ kanalus ar poras [129], ir netiesiogiai, be kanalų ar porų suformavimo [141, 261]. Šios priežastys lemia neuronų membranos pažeidimus ir jonų srautų sutrikdymą, kurie yra laikomi vieni iš svarbiausių $A\beta$ toksinio poveikio pasireiškimo veiksnių [59]. $A\beta$ veikimas sąlygojamas įvairių mechanizmų, kurie siejami su $A\beta$ oligomerų sukelta neuronų žūtimi, įskaitant ląstelinio Ca^{2+} homeostazės sutrikdymą [137] bei signalinių baltymų aktyvaciją [262]. Vienas potencialių $A\beta$ oligomerų veikimo mechanizmų yra minėta endogeninių Ca^{2+} laidžių receptorių/kanalų, tokių kaip AMPA ir NMDA sukelta tiesioginė aktyvacija [263, 264]. Nepaisant didelio tyrimų skaičiaus, aiškaus $A\beta$ peptidų poveikio mechanizmo pirminių smegenų ląstelių membranoms nėra.

Mikroglijos ląstelių vaidmuo $A\beta$ sukelta neuronų žūtyje [143] bei neuronų fagocitozės procesuose [155] yra plačiai nagrinėjamas, tačiau mažai žinoma apie šių peptidų poveikį mikroglijos ląstelių membranoms. Nors tyrimų, siekiančių paaiškinti NMDA-R vaidmenį mikroglijos ląstelių aktyvacijoje skaičius auga, tačiau gilesnių žinių apie NMDA-R buvimą besivystančių bei suaugusių smegenų mikroglijos ląstelėse atsirado palyginti neseniai

[265, 266]. Todėl vienas iš svarbiausių $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikio ląstelių membranoms rezultatų šiame darbe yra nuo NMDA-R priklausomos mikroglijos ląstelių depoliarizacijos mechanizmo nustatymas, kurio metu atskleistas detalesnis glutaminerginių receptorių vaidmuo mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukelta mikroglijos ląstelių depoliarizacijoje.

Ankstesni darbai rodo, kad astrocitų, žmogaus hNT ir žiurkės PC12 neuroninių ląstelių kultūrose $A\beta_{1-42}$ oligomerai sukelia ląstelių membranų depoliarizaciją, kuri pasireiškia membranos vientisumo pažeidimais ir Ca^{2+} išėjimu iš ląstelių [267, 268]. Tačiau išsamių duomenų apie $A\beta$ poveikį mikroglijos ląstelių membranoms iki šiol nėra. Šiame darbe atskleidėme, jog egzistuoja skirtingas ląstelinis atsakas į mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukeltą ląstelių membranų potencialo kitimą. Pirmą kartą buvo parodyta, jog maži oligomerai, kurie veikia toksiškai ir sukelia neuronų žūtį CGC kultūrose [52], skirtingai veikia neuronų bei mikroglijos ląstelių membranų potencialus, sukeldami nuo NMDA-R ar AMPA-R nepriklausomą membranų depoliarizaciją neuronuose ir nuo NMDA-R priklausomą mikroglijos ląstelių membranų depoliarizaciją. Priešingai nei neuronų ir mikroglijos ląstelėse, maži $A\beta_{1-42}$ oligomerai astrocitų membranos potencialo neveikė. Buvo nustatytas nuo laiko priklausomas neuronų membranos potencialo didėjimas, kurio didžiausias intensyvumas pasireiškia būtent ankstyvuojau inkubaciniu laikotarpiu (30–60 min.). Likusios inkubacijos metu (2–4 val.), neuronų membranos potencialas nekito. Nustatėme, kad $A\beta_{1-42}$ oligomerai sukėlė greitesnę ir didesnę mikroglijos ląstelių plazminės membranos depoliarizaciją CGC kultūroje, kuri buvo stebima jau pačioje inkubacijos pradžioje (0–30 min.) ir priešingai neuronams, buvo visiškai sustabdyta NMDA-R slopiklio MK-801. Toks pat apsauginis MK-801 poveikis nustatytas ir grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje. Tai gali būti siejama su NMDA-R aktyvacija mikroglijos ląstelėse. Kadangi neuronų plazminės membranos depoliarizacija nėra tiesiogiai susijusi su NMDA-R aktyvacija, iškėlėme prielaidą, jog depoliarizacijos procesą gali inicijuoti kiti glutaminerginiai AMPA-R. $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukelta neuronų ir mikroglijos ląstelių membranos depoliarizacija nebuvo jautri AMPA-R antagonistui NBQX, kas rodo, jog AMPA-R nebuvo susiję su ląstelių membranos potencialo pokyčiais nei viename iš ląstelių tipų. Svarbu pažymėti, kad mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukelta ansktyva nuo NMDA-R ir AMPA-R nepriklausoma neuronų depoliarizacija pasireiškė mišrioje ir grynoje neuronų kultūrose, todėl tikėtina, kad $A\beta_{1-42}$ veikimo mechanizmas yra bendras visoms neuroninėms ląstelėms, ir maži $A\beta_{1-42}$ oligomerai tiesiogiai veikia neuronų membranos potencialą [269–271].

$A\beta_{1-42}$ oligomerų tiesioginė sąveika su membraniniais fosfolipidais, suformuojant aukšto katijoninio laidumo poras [129, 272] arba fosfolipidų dvisluoksnio destabilizavimas [273], kurio metu gali būti pažeidžiamas neuronų

membranos laidumas, laikomi viena iš neuronų membranų depoliarizacijos priežasčių. Glutamatas yra vienas iš pagrindinių CNS neuromediatorių, kurio pusiausvyros sutrikdymas yra siejamas su daugeliu neurodegeneracinių susirgimų, o taip pat ir AL. Viena jo funkcijų – aktyvinti metabotropinius ir jonotropinius receptorius (NMDA, AMPA) [266]. Šių receptorių aktyvacija yra siejama su NMDA-R inicijuojamu neurotoksinio poveikiu ir Ca^{2+} lygio kitimu neuronuose [244]. Žinoma, jog $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomerų sukelti plazminės membranų įtampos pokyčiai (membranų depoliarizacija) gali sąlygoti glutamato ištekėjimą iš neuronų [268], o galiausiai sukelti neuronų žūtį [244]. Tyrimai su pirminėmis CGC ląstelių kultūromis parodė, jog kalio jonų sąlygotos neuronų membranų depoliarizacijos metu buvo stebimas nuo kalcio priklausomas glutamato ištekėjimas. Šie procesai sukėlė nuo NMDA ir GABA receptorių priklausomą neuronų žūtį [244]. Naujausi tyrimai su mišria neuronų-glijos ląstelių kultūra taip pat parodė, jog ląstelių membranų įtampos pokyčiai bei glutamato patekimas į užląstelinę erdvę yra siejami su ląstelių žūtimi [274]. Mes nustatėme, kad jau po trumpo inkubacinio laikotarpio $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomerai sukėlė glutamato išėjimą į CGC ląstelių augimo terpę, o ilgalaikė inkubacija sukėlė užląstelinio glutamato koncentracijos padidėjimą, kuris išnyko veikiant MK-801. Šie rezultatai patvirtina membranų depoliarizacijos ryšį su glutamato išėjimu iš ląstelės ankstyvuoju inkubaciniu laikotarpiu [243], todėl tikėtina, kad mūsų nustatytas $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomerų inicijuotas glutamato koncentracijos didėjimas ląstelių terpėje siejamas su greita neuronų membranų depoliarizacija ir neuronų glutamato nešiklių slopinimu [275]. Svarbu pažymėti, kad užląstelinio glutamato koncentracija grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje, priešingai nei CGC ląstelių terpėje, nekito. Tai leidžia teigti, jog glutamato koncentracijos padidėjimo priežastis susijusi su pokyčiais vykstančiais tik neuronuose ir nėra susijusi su mikroglijos ląstelių buvimu kultūroje.

Taip pat nustatėme, kad nuo $\text{A}\beta_{1-42}$ priklausoma neuronų žūtis buvo sustabdyta NMDA-R antagonistu MK-801. Kitų tyrėjų rezultatai atskleidė, jog $\text{A}\beta$ prisijungimas prie NMDA-R pažeidžia ląstelių plazminę membraną ir sukelia nekontroliuojamą kalcio išėjimą [264, 276], vedantį prie tokių oksidacinių pažeidimų, kaip aktyvių deguonies formų susiformavimas [277]. $\text{A}\beta$ inicijuota NMDA-R aktyvacija taip pat siejama ne tik su ląstelių Ca^{2+} homeostazės sutrikdymu [21, 263, 264], bet ir neuronų disfunkcija [278], neuronų žūtimi [21] bei galimu oksidaciniu stresu [279]. Todėl mūsų tyrimuose nustatytas apsauginis MK-801 poveikis neuronuose leidžia teigti, jog NMDA-R aktyvacija yra lydimas $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomerų sukeltos membranų depoliarizacijos, vedančios prie neuronų žūties.

Mūsų tyrimai taip pat parodė, kad maži $A\beta_{1-42}$ oligomerai pasižymi savybe įjautrinti mitochondrijų nespecifinio pralaidumo porą taip sumažindami izoliuotų smegenų mitochondrijų gebėjimą kaupti Ca^{2+} . Tai leidžia manyti, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukeltas sumažėjęs ląstelių jautrumas Ca^{2+} ir mitochondrijų nespecifinio pralaidumo poros atsidarymas, sukelia mitochondrijų pažeidimą ir galiausiai – neuronų žūtį. Naujausi tyrimai parodė, kad $A\beta$ oligomerai inicijuoja kalcio jonų sąlygotą mitochondrijų pralaidumo poros atsidarymą bei tolesnius morfologinius ir struktūrinius pokyčius, tokius kaip mitochondrijų brinkimas ir kristų suardymas, sumažėjęs mitochondrijų potencialas, citochromo c išėjimas ir galiausiai – neuronų žūtis [280]. Šie tyrimai sustiprina mūsų prielaidą ir rodo, kad neuroninių ląstelių kultūras veikiant $A\beta$ oligomerais yra stebima mitochondrijose vykstančių procesų kaskada, vedanti prie neuronų žūties.

Maži $A\beta_{1-42}$ oligomerai sukelia greitą neuronų ir mikroglijos ląstelių depoliarizaciją ir neuronų žūtį, tačiau neturi poveikio mikroglijos ląstelių gyvybingumui. Visgi nėra žinoma, ar nuo NMDA-R priklausoma mikroglijos ląstelių depoliarizacija gali sukelti neuronų žūtį. Naujausia klinikinė *in vivo* studija [171] remiasi mūsų gautais ir aukščiau aptartais rezultatais ir teigia, kad $A\beta$ oligomerų ir metabotropinių receptorių sąveikos nulemta membranų depoliarizacija ir kalcio homeostazės sutrikdymas neuronuose bei mikroglijos ląstelėse [247, 281, 282] gali prisidėti prie neuronų žūties [171]. Tyrėjai nustatė, kad monokloninis anti- $A\beta$ antikūnas adukanumabas normalizuoja kalcio lygį transgeninių pelių neurituose [283], todėl antikūno gebėjimą šalinti amiloidines sankaupas autoriai sieja su anti- $A\beta$ savybe užkirsti kelią $A\beta$ oligomerų prisijungimui prie metabotropinių receptorių [171]. Kiti *in vitro* tyrimai parodė, kad NMDA sužadinimas sukelia mikroglijos NMDA-R aktyvaciją ir prouždegiminių veiksnių, tokių kaip $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ ar NO išleidimą į ląstelių kultūros augimo terpę pirminėse mikroglijos ir neuronų kultūrose. Smegenų žievės neuronų kultūrą inkubuojant su aktyvintos mikroglijos ląstelių terpe, nustatyta neuronų žūtis buvo sumažinta MK-801, susiejant toksinio poveikio pasireiškimą su mikroglijos ląstelių NMDA-R aktyvacija. Ši NMDA-R aktyvacijos sukelta neuronų žūtis buvo sąlygota $TNF-\alpha$ [284]. Mūsų tyrimai parodė, kad $A\beta_{1-42}$ oligomerai bendro $TNF-\alpha$ lygio CGC ląstelių augimo terpeje nekeitė. Tai leidžia teigti, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerų toksinis poveikis neuronams nėra susijęs su mikroglijos ląstelių gaminamo $TNF-\alpha$ išsiskyrimu. Visgi, $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukelta mikroglijos ląstelių aktyvacija galėjo sukelti aktyvių deguonies ar azoto junginių susidarymą [143, 285] ar kitų prouždegiminių citokinų gamybą [146, 286, 287] ir taip netiesiogiai inicijuoti neuronų žūtį.

Mikroglijos ląstelės yra uždegiminio atsako reguliatoriai, kurie AL metu telkiasi aplink amiloidines plokšteles, glaudžiai sąveikauja su plokštelėmis

paviršiumi ir veikia kaip barjeras, užkertantis kelią tirpiems A β oligomerams formuotis į fibrilines plokšteles [288]. Fagocitinis mikroglijos ląstelių aktyvumas nustatomas tik ankstyvuoju amiloidinių plokštelių formavimosi laikotarpiu [169, 288], todėl vėliau pasireiškiantis uždegiminis ląstelių atsakas siejamas su mikroglijos ląstelių aktyvacija. Naujausi klinikiniai tyrimai rodo, kad anti-A β efektyviai mažina amiloidines sankaupas ankstyvuoju AL laikotarpiu ir ši poveikį sieja su mikroglijos Fc γ receptorių sąlygota fagocitoze, antikūnų epitopu ir jų gebėjimu prisijungti prie tirpių A β oligomerinių formų [171]. Tačiau nepaisant daug žadančių rezultatų, iki šiol mažai žinomi monokloninių antikūnų skirtingo poveikio neuronams mechanizmai.

Maži 1–2 nm A β_{1-42} oligomerai sukelia laipsnišką ir nuo koncentracijos priklausomą neuronų žūtį grynoje neuronų ir CGC kultūroje, kuri tiesiogiai priklauso nuo A β_{1-42} dydžio, tuo tarp monomerinės ir fibrilinės A β_{1-42} formos bei dideli 4–10 nm A β_{1-42} oligomerai poveikio neuronų gyvybingumui neturi [52]. Nustatėme, kad A β_{1-42} agregatai kompleksuose su anti-A β #11E12 antikūnais sukėlė stiprią neuronų žūtį bei pasižymėjo neuronų skaičių mažinančiu poveikiu. Didžiausiu toksiniu poveikiu išsiskyrė imuniniai kompleksai su A β_{1-42} oligomerais. Pastebėjome, kad A β_{1-42} agregatai kompleksuose su antikūnais skatino mikroglijos ląstelių proliferaciją, kuri pasireiškia kaip pagrindinis aktyvios mikroglijos atsakas į A β poveikį [289]. Teigiama, kad mišrioje ir grynoje neuronų kultūroje A β_{1-42} oligomerai sukelia nuo mikroglijos ląstelių nepriklausomą [52] ir mikroglijos ląstelių aktyvacijos sąlygotą neuronų žūtį bei mikroglijos ląstelių proliferaciją [155, 289–291]. Pašalinus mikroglijos ląsteles iš CGC kultūros nustatėme, kad imuniniai kompleksai poveikio neuronų gyvybingumui neturi. Tai leidžia daryti prielaidą, kad imuniniai kompleksai CGC kultūroje sukelia neuronų žūtį ne tiesiogiai, o per sąveiką su mikroglijos ląstelėmis.

A β_{1-40} peptidai taip pat siejami su AL patologija, tačiau pasižymi mažesniu toksiniu poveikiu nei A β_{1-42} [65, 292]. Nustatyta, kad A β_{1-42} peptidai yra linkę spontaniškai agreguotis į didesnius darinius [65, 235], tuo tarpu A β_{1-40} išlaiko mažesnę oligomerizacijos laipsnį, lyginant su A β_{1-42} [293]. Mūsų naudoto monokloninio antikūno anti-A β epitopas (#11E12) yra A β_{1-42} N-galinėje pozicijoje ir formuoja imuninius kompleksus su abejomis A β (A β_{1-40} ir A β_{1-42}) formomis [235], todėl tyrėme, ar imuninių kompleksų toksinis poveikis priklauso nuo A β_{1-40} oligomerizacinės būsenos. Nustatyta, kad analogiškai tirtiems A β_{1-42} peptidų ir anti-A β kompleksams, anti-A β ir A β_{1-40} oligomerų imuniniai kompleksai pasižymėjo ląstelių gyvybingumą mažinančiu poveikiu. Imuniniai kompleksai sudaryti iš monomerinės A β_{1-40} struktūros neuronų žūtis nesukėlė. Tai leidžia daryti prielaidą, jog oligomerinė/multimerinė A β struktūra gali būti esminis veiksnys, lemiantis imuninių kompleksų toksiškumą smegenėlių kultūroje.

Tyrimuose naudotas monokloninis antikūnas anti-A β buvo sukurtas prieš toksiškus mažus A β ₁₋₄₂ oligomerus, kurių imunodominuojantis regionas aptinkamas tarp 1 ir 19 aminorūgščių. Žinoma, kad šis antikūnas geba reaguoti su 1–6 aminorūgščių bei 1–13 aminorūgščių ilgio sintetiniais peptidais, kurie atitinka monomerinius A β fragmentus ir negali suformuoti didesnių struktūrų [235]. Nustatėme, kad patys vieni sintetiniai peptidų fragmentai A β ₁₋₆ ir A β ₁₋₁₃ bei sudarydami kompleksus su anti-A β , toksinio poveikio smegenų ląstelėms neturėjo. Kiti monomerinio MeNP baltymo fragmentai MeNP₄₄₀₋₄₅₂ ir jam specifinio antikūno prieš raudoniukės baltymą anti-MeNP (#10F7) kompleksai neuronų žūties taip pat nesukėlė. Maži, linijinės struktūros, neagreguotų peptidų ir specifinių antikūnų kompleksai sustiprino ankstesnę prielaidą, jog imuninių kompleksų toksiškumas nėra susijęs su monomerine antigeno struktūra. Tai leidžia teigti, kad neuronų žūtis CGC kultūroje gali būti apspręsta antigeno konformacijos ir oligomerinės struktūros.

Su mikroglijos ląstelėmis siejama neuronų žūtis gali būti sąlygota mikroglijos ląstelių aktyvacijos [171, 289, 294–296] ir antikūnų prisijungimo prie mikroglijos ląstelių specifinių Fc γ receptorių [295, 297]. Tyrėme ar antikūnų Fab-fragmentai su pašalinta Fc dalimi kompleksuose su A β ₁₋₄₂ oligomerais gali sukelti tokį pat toksinį poveikį CGC ląstelėms kaip anti-A β + A β ₁₋₄₂ imuniniai kompleksai. Nustatėme, kad anti-A β (Fab)₂ + A β ₁₋₄₂ poveikio neuronų gyvybingumui neturėjo. Mikroglijos Fc γ receptorių vaidmuo buvo nustatytas ir naujausių tyrimų su pelių C8-B4 mikroglijos ląstelėmis metu [297]. Buvo parodyta, kad rekombinantinio IgG2a monokloninio antikūno mA β -11 inkubacija mikroglijos ląstelių kultūroje sukėlė stiprią antikūnų ir A β ₁₋₄₂ fibrilių bei amiloidinių plokštelių sąveiką, kurios metu buvo stebima nuo mikroglijos Fc γ receptorių priklausoma fagocitozė ir amiloidinių sankaujų šalinimas. Antikūnų mA β -11 Fab-fragmentai amiloidines sankaujas mažinančiu poveikiu nepasižymėjo [297]. Šie tyrimai sustiprina mūsų prielaidą ir rodo, kad imuninių kompleksų toksiškumas yra susijęs su mikroglijos ląstelių Fc γ receptorių aktyvacija.

Imuninių kompleksų poveikis neuronų gyvybingumui buvo įvertintas CGC kultūrą inkubuojant su kitų oligomerinių baltymų ir jiems specifinių antigenų kompleksais. Nustatėme, kad A β ₁₋₄₂ oligomerai ir A β ₁₋₄₂ fibrilės kompleksuose su monokloniniais anti-VP1 antikūnais prieš rekombinantinę į virusą panašią oligomerinę struktūrą VP1 neveikė CGC kultūros gyvybingumo. Tai gali būti aiškinama tuo, jog matyt šiuo atveju imuniniai kompleksai nesusidaro. Visgi buvo parodyta, kad imuniniai kompleksai sudaryti iš anti-VP1 ir jo specifinio antigeno VP1 (anti-VP1 + VP1) pasižymėjo neuronus žudančiu poveikiu. Antikūnų Fab-fragmentų anti-VP1(Fab)₂ + VP1 kompleksai poveikio neuronų gyvybingumui neturėjo. Rezultatai leidžia

teigti, jog citotoksinis anti-VP1 ir VP1 kompleksų poveikis yra sąlygotas antikūno Fc dalies, kuri jungdamasi prie mikroglijos ląstelių Fcγ receptorių lemia neuronų žūtį ir imuninių kompleksų toksiškumo pasireiškimą ląstelių kultūroje. CGC kultūras inkubuojant su kitais dviem antikūnais prieš oligomerinius baltymus, sustiprino anksčiau iškeltą prielaidą, jog imuninių kompleksų citotoksiškumui pasireikšti būtina antigeno prisijungimui reikalinga antikūno Fc dalis. Nustatyta, kad monokloninių antikūnų prieš žmogaus metapneumoviruso N baltymą (MTP-N) ir raudonukės N baltymą (MeNP) ir jiems specifinių baltymų kompleksai sumažino neuronų gyvybingumą bei ląstelių skaičių kultūrose. Antikūnų Fab-fragmentų ir oligomerinių baltymų kompleksai (anti-MTP-N(Fab)₂ + MTP-N; anti-MeNP(Fab)₂ + MeNP) poveikio neuronams neturėjo.

Pasireiškęs toksinis imuninių kompleksų poveikis žiurkės CGC ląstelių kultūroms gali būti siejamas su tarprūšine kryžmine reakcija dėl tyrimuose naudotų pelių monokloninių antikūnų. Naudodami pelių CGC kultūras, įvertinome imuninių kompleksų poveikį neuronų gyvybingumui. Nustatėme, kad didžiausiu toksiniu poveikiu pasižymėję anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ ir anti-VP1 + VP1 kompleksai veikė citotoksiškai ir sumažino neuronų gyvybingumą abeiose pirminėse CGC kultūrose. Rezultatai rodo, kad oligomerinių baltymų ir antikūnų kompleksų toksinis poveikis nepriklauso nuo gyvūno rūšies, todėl stebimas vienodas jų poveikis žiurkės ir pelės CGC kultūroms.

Antikūnų veikimas yra nulemtas jo specifiskumo ir gebėjimo atpažinti Aβ epitopą [298]. Publikuoti darbai rodo, kad antikūnai, turintys tą patį epitopą, gali pasižymėti nevienodu veiksmingumu šalinti amiloidines sankauņas ir sąlygoti skirtingo laipsnio mikroglijos ląstelių aktyvaciją [299]. Antikūno epitopas taip pat lemia ir jo gebėjimą apsaugoti ląsteles nuo Aβ kaupimosi ir galimo toksinio poveikio pasireiškimui neuroninėms ląstelėms. Žinoma, kad polikloniniai ir monokloniniai anti-Aβ antikūnai, kurie jungiasi prie Aβ N-galinės pozicijos gali sumažinti arba visiškai pašalinti amiloidinių sankauņas kaupimąsi transgeninių pelių modeliuose [172, 174, 300], visgi toks antikūnų poveikis gali būti lydimas ir uždegiminio atsako. Yra tyrimų teigiančių, kad antikūnai, atpažįstantys Aβ₁₋₄₂ N-galinę poziciją, sukelia stiprią mikroglijos ląstelių aktyvaciją [301]. N-galinės pozicijos anti-Aβ, lyginant su monokloniniais antikūnais, kurie atpažįsta C-galą, veiksmingiau mažina Aβ kaupimąsi neuronų sinapsėse *in vitro* ir apsaugo nuo sinapsių praradimo *in vivo* [302]. Žinoma, kad antikūnai atpažįstantys C-galinę poziciją, pasižymi savybe pagerinti kognityvines funkcijas [177] bei sumažinti amiloido kaupimąsi transgeninių pelių smegenyse [303]. Tačiau šie antikūnai turi ir šalutinį poveikį, nulemtą Aβ persiskirstymo iš smegenų parenchimos į smegenų kraujagysles. Antikūnų skirtingas Aβ šalinimo mechanizmas nusakomas atsižvelgiant prieš kokius skirtingų Aβ peptidų epitopus yra nukreipti antikūnai [298]. Nustatyta,

kad $A\beta_{1-42}$ N-galinę poziciją atpažįstantys anti- $A\beta_{1-42}$ pasižymi skirtingu amiloidines sankaupas šalinančiu poveikiu bei priešingai nei $A\beta$ C-galo ir centrinio $A\beta$ domeno anti- $A\beta$, geba inicijuoti stiprų mikroglijos ląstelių kaupimąsi aplink amiloidines plokšteles [301, 304]. Toks antikūnų veikimas rodo, kad imuninių kompleksų poveikis gali būti nulemtas ne tik antikūno epitopo padėties, tačiau ir giminingumo Fc receptoriams. Šią prielaidą patvirtino ir mūsų darbai, kurie parodė, kad žiurkės mikroglijos ląstelių Fc γ receptoriai gali specifiskai prisijungti ne tik anti- $A\beta$ #11E12 + $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksus, tačiau taip pat komercinio monokloninio antikūno anti- $A\beta_{1-42}$ (#G2-13), atpažįstančio $A\beta_{1-42}$ C-galinę poziciją, ir $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksus. Nustatyta, kad skirtingų IgG izotipų monokloniniai anti- $A\beta$, atpažįstantys skirtingus $A\beta_{1-42}$ grandinės galus (N- ir C-galą), kompleksuose su $A\beta_{1-42}$ oligomerais sukėlė neuronų žūtį. Rezultatai patvirtina, jog antikūno epitopo padėtis neapsprendžia imuninių kompleksų toksinio poveikio CGC kultūroms. Kito komercinio polikloninio triušio antikūno anti- $A\beta_{42}$ ir $A\beta_{1-42}$ oligomerų kompleksai neveikė neuronų gyvybingumo bei neuronų ir mikroglijos ląstelių skaičiaus kultūroje. Tai gali būti siejama su šio antikūno mažu giminingumu žiurkės Fc γ receptoriams, kadangi yra žinoma, kad polikloninis antikūnas anti- $A\beta_{42}$ neatpažįsta žiurkės ląstelių Fc γ receptorių, todėl ir nesukelia uždegiminio ląstelių atsako. Iki šiol yra mažai duomenų apie žiurkių Fc γ receptorių ir ypač apie šių receptorių giminingumą pelių IgG tipams. Žinoma, kad žiurkės makrofagai turi Fc γ receptorių, specifiskus žiurkės IgG2a, o taip pat IgG1, IgG2b bei IgE [305]. Pelių mikroglijos ląstelės ekspresuoja keturių skirtingų tipų IgG specifinius Fc receptorių (Fc γ receptorių): didelio giminingumo Fc γ RI ir mažo giminingumo Fc γ RII, Fc γ RIII bei Fc γ RIV. Funkciškai jie skirti į du tipus: aktyvuojantieji (Fc γ RI, -III, -IV) ir slopinamieji (Fc γ RII) [306]. Fc γ RI ir Fc γ RIII pasižymi dideliu giminingumu IgG2a ir kiek mažesniu IgG1 bei IgG2b [307]. Nustatyta, jog kai kurių patologijų atvejais stebimas Fc γ RI bei Fc γ RIII vaidmuo [234, 308]. Imuninių kompleksų toksiškumas mūsų tyrimuose yra stebimas su antikūnais, kurie priskiriami IgG2b (anti- $A\beta$ #11E12, anti-MTP-N #4A2 ir anti-MeNP#10F7), IgG2a (anti-VP1#6D11) ir IgG1 (anti- $A\beta_{1-42}$ #G2-13) izotipams. Vieninteliai anti-MeNP + MeNP skatino mikroglijos ląstelių proliferaciją, tuo tarpu kiti oligomerinių baltymų ir jų specifinių antikūnų kompleksai poveikio mikroglijos ląstelėms neturėjo. Rezultatai patvirtina kitų tyrėjų prielaidą, jog Fc γ R gebėjimas jungtis skirtingo subtipo IgG yra nevienodas: aukšto giminingumo Fc γ RI gali teikti pirmenybę prisijungti IgG2a subtipą [309], kai tuo tarpu mažo giminingumo Fc γ RIII – IgG1, IgG2a ir IgGb subtipus [310] ar Fc γ RIV – IgG2a bei IgG2b subtipus [311]. Šie skirtumai gali būti siejami su antikūnų toksiškumu [312]. Apibendrinus

rezultatus galima teigti, kad žiurkės mikroglijos FcγR gali prisijungti skirtingus pelės IgG subklasės oligomerinius imuninius kompleksus ir sukelti neuronų žūtį CGC ląstelių kultūrose. Parodyta, jog antigeno konformacija yra toksiškumą lemiantis veiksnys ląstelių kultūrose. Nustatyta, kad Aβ₁₋₄₀, Aβ₁₋₄₂ oligomerų ir kitų oligomerinės struktūros virusinės kilmės baltymų (VP1, MTP-N, MeNP) ir jų specifinių antikūnų kompleksai inicijuoja nuo Fc receptorių priklausomos mikroglijos aktyvacijos ir fagocitozės sąlygotą neuronų žūtį.

Tyrimų su anti-Aβ ir Aβ₁₋₄₂ oligomerų kompleksais metu buvo stebimas ir minėtųjų imuninių kompleksų toksinio poveikio neuronų ląstelėms sumažėjimas ar visiškas toksiškumo išnykimas, lydimas išaugusio mikroglijos ląstelių skaičiaus. Susiedami padidėjusį mikroglijos ląstelių tankį kultūroje su imuninių kompleksų toksinio poveikio pasikeitimais, tyrėme anti-Aβ ir Aβ₁₋₄₂ kompleksų poveikį ilgalaikėse (28 dienų) CGC ląstelių kultūrose, kurios kaip teigiama kitų tyrėjų, lyginant su trumpalaikėmis CGC kultūromis, yra jautresnės įvairių patogeninių veiksnių ar dirgiklių poveikiui [251]. Eksperimentuose CGC ląstelių kultūra papildomai buvo inkubuota su 10 proc. grynos mikroglijos ląstelių. Parodėme, kad ląstelių kultūra veikta anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ oligomerų kompleksais ir papildyta mikroglijos ląstelėmis, poveikio neuronų gyvybingumui neturėjo, tuo tarpu CGC kultūroje be papildytos mikroglijos, kompleksai pasižymėjo neuronų gyvybingumą mažinančiu poveikiu. Tai rodo, kad imuninių kompleksų toksinio poveikio išnykimas gali būti susijęs su didesniu mikroglijos ląstelių skaičiumi kultūroje, t. y. padidėjus mikroglijos skaičiui, jos gali efektyviau ir greičiau pašalinti pažeistas ar žuvusias neuronines ląsteles. Žinoma, kad susitelkę aktyvios mikroglijos ląstelių klasteriai prisideda prie neuronų žūties [313]. Būdamos ramybės būsenoje mikroglijos ląstelės neaktyvios, tačiau nuolatos sąveikauja su mikroaplinka. Alternatyvios aktyvacijos metu, veikiant įvairiems stimulams, mikroglijos ląstelės kaip atsaką į dirgiklius išskiria prouždegiminius veiksnius, o ameboidinės aktyvacijos metu pasižymi antiuždegiminėmis savybėmis [314]. Dėl jų gebėjimo keisti savo būseną, mikroglijos ląstelėse kinta jų metabolinis aktyvumas. Daugėja įrodymų teigiančių, jog mikroglijos ląstelių metabolinių funkcijų keitimasis iš ameboidinės aktyvacijos būsenos į alternatyvią gali keisti ir mikroglijos atsaką ląstelių kultūrose [315]. Mikroglijos ląstelių aktyvacija ir metabolinio ląstelių aktyvumo keitimas gali būti siejamas su imuninių kompleksų toksinio poveikio pokyčiais CGC kultūroje. Žinoma, kad aktyvinta mikroglijos kultūra į terpę išskiria įvairius prouždegiminius veiksnius, kurie gali sukelti neuronų žūtį. Tyrimai su grynais 28 dienų neuronų kultūromis, inkubuotomis su ląstelių augimo terpe, nusiurbta nuo imuniniais kompleksais veiktų mikroglijos ląstelių, parodė, kad ir šiuo atveju nebuvo stebimas imuninių kompleksų toksinis poveikis neuronams. Grynoje

smegenėlių neuronų kultūroje be papildytos mikroglijos, imuniniai kompleksai nesukėlė neuronų žūties, tuo tarpu papildytoje mikroglijos ląstelėmis neuronų kultūroje buvo stebima neuronų gyvybingumo mažėjimo tendencija. Visgi tarp grupių skirtumo nustatyta nebuvo. Todėl tikėtina, kad imuninių kompleksų poveikis ląstelėms gali būti siejamas su kitų baltyminių veiksnių (kaip prionai PrPc) veikimu, sukeliant toksinį A β ar antikūnų poveikį [316]. Apibendrinus galima daryti prielaidą, jog imuninių kompleksų toksiškumui pasireikšti didelę reikšmę gali turėti mikroglijos ląstelių ir neuronų sąveika, o taip pat imuninių kompleksų poveikis ląstelėms gali būti siejamas su kitų baltyminių veiksnių veikimu. Nors iki šiol mažai žinoma apie biocheminius antikūnų toksinio poveikio mechanizmus, dauguma tyrimų remia idėją naudoti A β oligomerams specifinius antikūnus kaip potencialius gydymo bei prevencijos įrankius [171, 299]. Naujausi tyrimai sustiprina mūsų išvadą, teigiančią, kad A β_{1-42} toksiškumo bei antikūnų uždegiminio atsako mechanizmų suvokimas gali prisidėti prie diagnostinių ir gydymo priemonių bei saugesnių vakcinų, stabdančių Alzheimerio ligos progresavimą, kūrimo.

A β agregatų kaupimasis smegenyse sukelia sinapsines pažaidas ir sinapsių praradimą. Žinoma, kad A β inicijuoti sinapsių pokyčiai atsiranda anksčiau nei pasireiškia neuronų žūtis [317]. Su sinaptosomomis susijęs SNAP-25 baltymas yra vienas iš svarbiausių SNARE komplekso, kuris dalyvauja sinapsiniuose ryšiuose ir inicijuoja sinapsinių pūslelių gamybą, komponentų [318]. SNAP-25 yra specifinis presinapsinio poliaus žymuo, kurio pagalba įvertinamas sinapsių tankis ląstelių kultūrose [319]. Didžioji šio baltymo dalis yra aptinkama neuronų aksonuose – neurituose [155]. CGC ląstelių kultūrą inkubuojant su anti-A β + A β_{1-42} agregatų (mažų ir didelių oligomerų ir fibrilių) kompleksais nustatėme, kad trumpos minėtųjų imuninių kompleksų inkubacijos nedidino nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumo neurituose. Visgi ilgalaikės anti-A β + A β_{1-42} kompleksų inkubacijos sukėlė SNAP-25 raiškos sumažėjimą CGC kultūrose. Žinoma, kad tirpūs A β peptidai, bet ne netirpios fibrilės prisideda prie sinapsių pažeidimų ir praradimo transgeninių pelių modeliuose [320], o neuronų ląstelių kultūrose ir organotipiniuose audinių pjūviuose stebimas tiesioginis mažų A β oligomerų poveikis sinapsėms [321, 322]. Galimas mažų A β_{1-42} oligomerų poveikis sinapsėms buvo patvirtintas ir mūsų tyrimų. Parodėme, kad anti-A β ir mažų A β_{1-42} oligomerų kompleksai sąlygojo stipriausią SNAP-25 baltymo degradaciją bei neuritų nykimą, lyginant su kitų imuninių kompleksų grupėmis. Trumpalaikės imuninių kompleksų inkubacijos (2–6 val.) nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumo nekeitė, tačiau po paros inkubacijos buvo stebimas fluorescencijos intensyvumo mažėjimas anti-A β ir mažų A β_{1-42} oligomerų grupėje. Kitų A β_{1-42} agregatų (didelių oligomerų bei fibrilių) ir anti-A β kompleksai poveikio nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos

intensyvumui neurituose neturėjo. Nustatyta, kad anti-A β ir mažų A β_{1-42} oligomerų kompleksai taip pat pasižymėjo ir neuritų tankį mažinančiu poveikiu. Toks SNAP-25 baltymo lygio kitimas, stebima neuritų degeneracija bei minėtųjų pokyčių iššauktas nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumo mažėjimas po ilgalaikės inkubacijos gali būti siejamas su A β_{1-42} agregacine būseną, t.y. toksiškiausia A β_{1-42} forma – maži A β_{1-42} oligomerai, pasižymi nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumą mažinančiu poveikiu, todėl buvo stebimas sinaptotoksinis imuninių kompleksų poveikis CGC ląstelėms. Literatūroje teigiama, kad mikromolinės mažų A β_{1-42} oligomerų (1–2 nm) koncentracijos sukelia laipsnišką ir nuo koncentracijos priklausomą neuroninių ląstelių žūtį CGC kultūroje, kuri tiesiogiai siejama su A β_{1-42} dydžiu, tuo tarpu monomerinės ir fibrilinės A β_{1-42} formos, o taip pat dideli A β_{1-42} oligomerai (4–10 nm) toksiniu poveikiu nepasižymi ir ląstelių gyvybingumui poveikio neturi [52]. Remiantis minėtais tyrimais, galima teigti, kad nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos pokyčiai neurituose gali tiesiogiai priklausyti nuo A β_{1-42} agregatų dydžio ir toksiškumo laipsnio – didėjant A β_{1-42} agregatų dydžiui yra stebimas A β_{1-42} toksiškumo mažėjimas, lemiantis mažesnę sinapsių pažeidimo laipsnį. A β_{1-42} toksiškumas sinapsėms taip pat siejamas ir su inkubacinio laikotarpio trukme. Pastebėta, kad toksinis A β_{1-42} poveikis sinapsėms buvo stebimas tik po ilgalaikės inkubacijos (t. y. >24 val.) [144, 323], remiantis tuo, galima daryti prielaidą, jog todėl po trumpų inkubacijų su imuniniais kompleksais, poveikio neuritams nebuvo nustatyta ir CGC kultūroje. Trumpalaikių inkubacijų su imuniniais kompleksais metu buvo stebimas nežymus SNAP-25 raiškos sumažėjimas bei galima neuritų degeneracija. Visgi, nuo SNAP-25 priklausomos fluorescencijos intensyvumo įvertinimas nėra pakankamai išsamus, siekiant nustatyti galimą imuninių kompleksų sinaptotoksinį poveikį CGC ląstelėms. Stebimi SNAP-25 baltymo pokyčiai gali būti siejami su kitais molekuliniais veiksniais, o ryškūs neuritų struktūriniai pakitimai po 24 val. inkubacinio laikotarpio, ypač veikiant mažų A β_{1-42} oligomerų kompleksams, gali būti susiję ir su mišrioje CGC ląstelių kultūroje esančių mikroglijos ląstelių aktyvacija. Publikuoti darbai rodo, kad 3 parų CGC ląstelių inkubacija su A β_{1-42} sukelia sinapsių tankio sumažėjimą, kuris veikiant fagocitozės slopikliais aneksinuiV bei cRGD, buvo sustabdytas. Papildoma ląstelių inkubacija su sinapsių SNAP-25 baltymu taip pat sukėlė ir SNAP-25 intensyvumo sumažėjimą neurituose. Minėtas neuritų praradimas bei SNAP-25 intensyvumo mažėjimas, sukeltas A β_{1-42} , buvo sustabdytas ląsteles inkubuojant kartu su minėtaisiais fagocitozės slopikliais [155]. Autorių teigimu, atskirų mikroglijos fagocitozės etapų slopinimas buvo pakankama priežastis apsaugoti ląsteles nuo A β_{1-42} sukeltos ir nuo mikroglijos ląstelių priklausomos

neuronų žūties bei praradimo, paliekant neuronus su nepažeistomis sinapsėmis bei sinapsinėmis ataugomis.

Aβ poveikis sinapsėms yra plačiai ištirtas ir yra žinoma, kad Aβ sukelia sinapsių pažaidas ir nykimą [323], tačiau, kad imuniniai kompleksai veiktų sinapses – darbų nėra.

Nors dauguma diagnostinių AL tyrimų atliekami jau pasireiškus pirmiesiems ligos simptomams, AL pradžia stebima žymiai anksčiau, nei ši liga diagnozuojama. Amiloidinės plokštelės, kurių pagrindą sudaro toksiškų Aβ oligomerų ir fibrilių sankaupos bei neurofibriliniai raizginiai, sudaryti iš Tau baltymo, yra išskiriami kaip pagrindiniai AL ligą sukeliantys patologiniai žymenys [324–327]. Pastaraisiais dešimtmečiais vieni iš perspektyviausių biologinių žymenų AL diagnostinių metodų paieškose laikomi smegenų skystyje (SS) ir kraujyje aptinkamų bei nustatomų Aβ_{1–40/42} bei Tau baltymo koncentracijų pokyčiai, kurie tiek tiesiogiai, tiek netiesiogiai siejami su AL progresija [327–331]. Vieni dažniausiai taikomų bei analizuojamų diagnostinių kriterijų išlieka Aβ_{1–42} koncentracijos mažėjimas ir t-Tau bei f-Tau koncentracijos didėjimas smegenų skystyje [332], tačiau vis plačiau vystomi tų pačių biologinių žymenų tyrimai, paremti kraujyje esančių biologinių žymenų analize [333]. AL pacientų kraujo plazmoje stebimas Aβ_{1–42} bei Aβ_{1–40} koncentracijos didėjimas, dažnai aptinkamas kognityvinių sutrikimų neturinčių pacientų grupėse (SP), visgi pasitaiko tyrimų, kuriuose patikimo žymenų koncentracijų skirtumo nenustatoma nei vienoje iš grupių [334]. Pastebėta, kad kai kuriose biologinių žymenų analizėse, SP grupių kraujo plazmoje esančio Aβ_{1–42}, tačiau ne Aβ_{1–40} koncentracijų didėjimas, pasireiškia ir AL grupėje. Tai siejama su netiksliu pacientų priskirimu SP grupei [335], [336], todėl susiduriama su rezultatų persidengimo bei netikslios analizės problema. Mažas Aβ_{1–42} jautrumo bei specifiškumo procentas [337] bei Tau lygio kitimas [338], o taip pat didžiąjai daliai AL pacientų pasireiškiantys mišrios patologijos požymiai sukelia sunkumų atskirti AL nuo kitų demencijos formų, ypač jos ankstyvajame etape [339, 340], todėl reikalauja papildomų tyrimų. Nors Aβ ir Tau kiekis dažnai įvertinamas klinikinių tyrimų metu, iki šiol nėra atlikta jokia klinikinė ar mokslinė studija, kurios metu būtų paskelbti mokslinių tyrimų duomenys apie kraujo serume (KS) ir smegenų skystyje (SS) esančių biologinių žymenų pokyčius Lietuvos populiacijoje. Iki šiol nėra nustatyta, kad pacientų biologiniuose skysčiuose esantys minėti junginiai sukelia neuronų žūtį, todėl AL biologinių skysčių poveikiui ląstelėms įvertinti pirmą kartą buvo panaudota pirminė CGC ląstelių kultūra, kuri morfologiškai ir funkciškai panaši į neuronus *in vivo*, bei yra taikoma kaip tyrimų modelis neurodegeneracinėms ligoms tirti [341]. Biocheminiai tyrimai buvo atlikti ne tik dirbtinėse terpėse, bet serume bei smegenų skystyje, paimtame iš AL, taip parodant jog smegenėlių kultūra yra jautri sukeltiems biologinių skysčių

poveikiams. Ląstelių kultūrose vystančius pokyčius, kaip vieną iš galimų alternatyvių biologinių rodiklių, susiejome su ligonių klinicine būkle. CGC ląstelių kultūrą inkubuojant SP, lengvos Alzheimerio tipo demencijos (L-ATD) bei kitomis demencijos formomis (KD) sergančių pacientų KS ir SS nustatėme, kad biologiniai skysčiai neuroninių ląstelių gyvybingumui poveikio neturėjo ir pasižymėjo neuronų gyvybingumą skatinančiu poveikiu. Vienintelės vidutinės Alzheimerio tipo demencijos (V-ATD) SS išsiskyrė ryškiu citotoksiniu poveikiu ir sukėlė neuronų žūtį. Naujausi tyrimai su žiurkės smegenų pjūviais rodo, kad žmogaus SS geba pagerinti neuroninių ląstelių išgyvenamumą minėtose pjūvių kultūrose. Tyrėjai nustatė, jog 7–10 dienų Wistar veislės žiurkės smegenų didžiųjų pusrutulių pjūviai inkubuoti su žmogaus SS, pagerino neuroninių ląstelių gyvybingumą organotipinėse hipokampo pjūvių kultūrose. Ištyrę kaspazių 3/7, kurios susijusios su neuroninių ląstelių žūtimi raišką, tyrėjai nustatė, kad hipokampo pjūvių kultūros SS poveikyje pasižymėjo statistiškai mažesne kaspazių 3/7 raiška, bei mažesne apoptoze, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, inkubuotomis tik su ląstelių augimo terpė be SS [342]. Kaip buvo minėta anksčiau, mūsų tirtų kognityvinių sutrikimų neturinčių pacientų grupių SS taip pat nesukėlė toksinio poveikio neuronų gyvybingumui, visgi, lyginant kitų tyrėjų ir mūsų gautus rezultatus svarbu pažymėti, jog SS poveikis neuroninėms ląstelėms buvo nustatomas taikant skirtingus tyrimų modelius. Tyrėjai naudojo tik patologiniu požiūriu sveikų pacientų smegenų skystį ir neatliko SS biologinių žymenų koncentracijų analizės, kuri leistų susieti gautus rezultatus. Publikuoti darbai rodo, kad PC12 ląstelių liniją inkubuojant su AL sergančių bei sveikų pacientų smegenų skysčio pavyzdžiais, reikšmingo skirtumo tarp grupių nebuvo nustatyta [343]. Svarbu paminėti, jog tyrimo metu buvo papildomai keičiama ląstelių augimo terpė, bei dedamas mažesnis SS kiekis, kuris užkirto kelią ląstelių augimui, bei apsaugojo nuo SS esančių medžiagų galimo apsauginio poveikio. Smegenų skysčio pavyzdžiai taip pat buvo inaktyvuojami karščiu, taip išvengiant ląstelių žūties galimybes, inicijuotos komplemento sistemos veiksmų, esančių smegenų skystyje [343].

Įvertinę neuroninių ląstelių skaičiaus kitimą CGC kultūroje nustatėme, kad demencijų KS ir SS mėginiai veikė neuroninių ląstelių skaičių vienodai. Nustatyta, kad L-ATD, V-ATD ir KD biologiniai skysčiai pasižymėjo neuronų skaičių mažinančiu poveikiu, tačiau tik L-ATD šis sumažėjimas buvo stipriausias, o SP poveikio neuroninių ląstelių skaičiui neturėjo. Mikroglijos ląstelių skaičiaus kitimas parodė, kad Alzheimerio tipo demencija sergančių pacientų (L-ATD ir V-ATD) biologiniai skysčiai pasižymėjo mikroglijos ląstelių proliferaciją slopinančiu poveikiu, kuris reikšmingai skyrėsi nuo SP grupės. Didžiausiu mikroglijos proliferaciją slopinančiu poveikiu išsiskyrė V-ATD kraujo serumas ir smegenų skystis. SP grupės KS ir SS buvo linę

skatinti mikroglijos ląstelių proliferaciją, o KD sergančių pacientų grupė pasižymėjo silpnesniu nei AL grupių mikroglijos ląstelių skaičių mažinančiu poveikiu. Yra duomenų, kad SP grupė pasižymi didžiausia $A\beta_{1-42}$ koncentracija, lyginant su AL bei KD grupėmis [343, 344]. Atlikta AL, Parkinsono ligos demencijos (PDD), demencijos su Levi kūneliais (LD) bei kognityvinių sutrikimų neturinčių pacientų SS $A\beta_{1-42}$ koncentracijų lyginamoji analizė parodė, kad AL metu stebimas mažesnis $A\beta_{1-42}$ koncentracijos kiekis nei KD ir SP, o KD $A\beta_{1-42}$ koncentracija buvo mažesnė lyginant su SP grupe [344]. Aukščiau aprašyti tyrimai leidžia daryti prielaidą, jog CGC kultūroje nustatytas mikroglijos ląstelių mažėjimas demencijų grupėse (L-ATD, V-ATD ir KD) bei mikroglijos aktyvacija SP grupėje gali būti siejama su $A\beta_{1-42}$ koncentracijos pokyčiais, t. y. $A\beta_{1-42}$ koncentracijos didėjimas gali būti siejamas su mikroglijos skaičiaus didėjimu bei proliferacijos aktyvinimu. Visgi svarbu paminėti, kad tyrėjai neišskyrė AL pagal ligos sunkumo laipsnius, todėl mikroglijos ląstelių pokyčiams CGC kultūroje įtakos galėjo turėti ir kiti veiksniai.

Mikroglijos ląstelių pokyčiai taip pat siejami ir su f-Tau pokyčiais. Tyrimai rodo, kad mikroglijos ląstelių skaičiaus mažėjimas ir degeneraciniai procesai gali būti siejami su tirpaus f-Tau kaupimusi smegenyse [345]. Ištyrę žmogaus ir transgeninių APP/PS1 ir Thy-tau22 pelių autopsinius hipokampo mėginius *in vivo*, tyrėjai nustatė, kad žmonių hipokampo mėginiuose stebimas regioninis mikroglijos ląstelių skaičiaus mažėjimas bei susilpnėjusi ląstelių aktyvacija, tuo tarpu Thy-tau22 pelių modeliuose panašus poveikis nebuvo nustatytas. *In vitro* tyrimai su BV2 mikroglijos ląstelių kultūromis parodė, kad AL pacientų homogenizuoto hipokampo tirpios frakcijos, sudarytos iš viduląstelinų ir citozolinių baltymų, kuriose stebimas f-Tau kaupimasis, sukėlė mikroglijos ląstelių žūtį. Poveikis buvo stebimas tik pažengusios AL grupėse. Thy-tau22 transgeninių pelių modeliai taip pat pasižymėjo mikroglijos ląstelių gyvybingumą mažinančiu poveikiu, patvirtinant, jog tirpus f-Tau gali būti siejamas su mikroglijos ląstelių žūtimi. Žinoma, kad mikroglijos ląstelės gali fagocituoti neuronus, kuriuose fiziologiškai aptinkamas viduląstelinis f-Tau [345, 346]. Pastebėta, kad gryną mikroglijos ląstelių kultūrą papildžius gryna neuronų ląstelių kultūra SH-SY5Y, vyko apoptozinių neuronų fagocitozė, kuri nebuvo toksiška mikroglijos ląstelėms. Visgi gryną mikroglijos ląstelių kultūrą papildžius gryna neuronų kultūra, gebančia papildomai gaminti Tau baltymą (SH-SY5Y-tau), neuronų fagocitozė sukėlė mikroglijos ląstelių žūtį [345]. Literatūros duomenų analizė ir mūsų rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog neuronų tankio ir mikroglijos ląstelių skaičiaus mažėjimas gali būti siejami su biologiniuose skysčiuose esančių žymenų koncentracijų, ypač f-Tau pokyčiais. Tačiau svarbu pažymėti, kad aukščiau aprašytose skirtingose AL sunkumo laipsnio grupėse buvo stebimas

duomenų persidengimas, todėl f-Tau reikšmė mikroglijos ląstelių degeneraciniuose procesuose yra tik prielaida. Atsižvelgiant į taikytą skirtingą tyrimo modelį skirtinguose smegenų regionuose bei ląstelių kultūrose, negalime daryti išvados, jog mūsų stebimas neuronų tankio ir mikroglijos skaičiaus sumažėjimas demencijų grupėse, ypačiai AL grupėje, buvo sąlygotas tik padidėjusios f-Tau koncentracijos KD ir AL grupėse. Pasireiškę poveikiai galėjo būti nulemti ir kitų veiksnių, tokių kaip komplemento sistemos [347]. Žinoma, kad komplemento inaktyvavimas karščiu, inaktyvuoja ir komplemento baltymus [348]. Tyrimai su žmogaus CHME-5 mikroglijos ląstelėmis parodė, kad sergančių AL kraujo plazma statistiškai reikšmingai mažino mikroglijos ląstelių proliferaciją, lyginant su SP grupių pavyzdžiais, ir šis poveikis buvo panaikintas karščiu inaktyvuojant komplemento sistemą [347]. Amnestinio tipo lengvo kognityvinio sutrikimo (aLKS) grupės pacientų plazmos mėginiai taip pat pasižymėjo ląstelių proliferaciją slopinančiu poveikiu, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo nustatyta. Kraujo plazmos mėginius inaktyvuojant karščiu buvo stebimas išnykęs aLKS ir AL poveikis skatinti mikroglijos proliferaciją [347]. Atskyrus plazmos mėginius į metabolitus bei baltymus nustatyta, kad būtent baltymų dalis buvo atsakinga už mikroglijos ląstelių proliferacijos sumažėjimą tyrimų metu. Gauti duomenys leidžia daryti prielaidą, jog mūsų tyrimuose naudoti karščiu neinaktyvuoti biologiniai skysčiai, būtent per komplemento sistemos veikimą galėjo sukelti mikroglijos ląstelių skaičiaus mažėjimą demencijų grupėse (AL bei KD), o SP grupėje aktyvinti mikroglijos ląstelių proliferaciją. Visgi mūsų tyrime papildomi neurouždegiminiai veiksniai nebuvo analizuojami.

Apibendrinant rezultatus galima teigti, kad biologiniai skysčiai, tokie kaip kraujo serumas ir smegenų skystis, paimti iš AL sergančių pacientų, bet ne SP ar KD sergančių pacientų, sukelia neurotoksinio poveikio pasireiškimą pirminėse neuronų-glijos ląstelių kultūrose. Kitų tyčių darbai sustiprina mūsų aptartus rezultatus ir leidžia daryti prielaidą, jog neuronų žūtis bei skaičiaus kitimas, o taip pat mikroglijos ląstelių skaičiaus mažėjimas CGC kultūrose galimai susijęs ne tik su pagrindinių biologinių žymenų ($A\beta_{1-40/42}$ bei t-Tau ir f-Tau) koncentracijų skirtumais, tačiau gali būti inicijuoti ir biologiniuose skysčiuose esančių komplemento sistemos komponentų, kas buvo patvirtinta tyrimuose su žmogaus neuroninių ląstelių linijomis [349], žiurkių neuroninių ląstelių [343] bei žmogaus mikroglijos ląstelių kultūromis [347]. Tai, jog pats $A\beta$ gali sukelti komplemento sąlygotą toksiškumo pasireiškimą neuroninių ląstelių kultūrose rodo, kad $A\beta$ inicijuota komplemento aktyvacija gali prisidėti prie AL neuropatogenezės [350]. Toksinis poveikis CGC kultūroms taip pat gali būti siejamas ir su įvairių neurouždegiminių aktyviklių – įskaitant minėtuosius komplemento aktyvatorius bei slopiklius, chemokinus, citoki-

nus, aktyvias deguonies formas, uždegiminius fermentus – pokyčiais, nustatomais AL metu ir lydimais tokių pataloginių procesų, kaip neuronų žūtis bei mikroglijos ląstelių aktyvacija [351, 352]. Ląstelių gyvybingumo tyrimai yra unikalūs tuo, jog buvo atliekami su mišria ląstelių kultūra, atskleidžiant KS ir SS poveikį neuronams ir mikroglijos ląstelėms, labiau atspindint *in vivo* sąlygas. Mūsų darbe buvo parodyta, kad egzistuoja skirtumai ne tik tarp kognityvinių sutrikimų neturinčių pacientų (SP) ir AL grupių, tačiau ir tarp AL sunkumo laipsnio, bei AL ir KD forma sergančių pacientų. Rezultatai pateikia detalesnę bei tikslesnę analizę, skirtumams tarp demencinių grupių identifikuoti. Šie pirminiai duomenys rodo, jog modelinių sistemų, tokių kaip pirminės ląstelių kultūros panaudojimas biologinių žymenų iš KS bei SS poveikio įvertinimui gali būti vystomi kaip vieni iš metodų ankstyvajai AL diagnostikai ir gali suteikti daugiau informacijos apie AL pataloginius procesus, susiejant juos su klinicine pacientų būkle.

IŠVADOS

1. Maži $A\beta_{1-42}$ oligomerai tiesiogiai sukelia greitą, nuo NMDA receptorių nepriklausomą neuronų membranos depoliarizaciją smegenėlių ir žievės neuronų kultūrose ir sąlygoja nuo NMDA receptorių priklausomą glutamato kiekio didėjimą ląstelių augimo terpėje, lydimą neuronų žūtis. Maži $A\beta_{1-42}$ oligomerai sukelia greitą nuo NMDA receptorių priklausomą mikroglijos ląstelių membranos depoliarizaciją smegenėlių ir žievės mikroglijos ląstelių kultūrose.
2. $A\beta$ ir kitų multimerinių baltymų kompleksai su atitinkamais antikūnais sukelia neuronų skaičiaus mažėjimą ir jų žūtį bei skatina mikroglijos proliferaciją smegenėlių ląstelių kultūrose. Anti- $A\beta$ + $A\beta$ bei kitų multimerinių baltymų ir antikūnų kompleksų neurotoksiškumas priklauso nuo antikūnų Fc domenų sąveikos su mikroglijos ląstelėmis.
3. Mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų imuniniai kompleksai pasižymi sinapsių tankio mažėjimą ir neuritų nykimą sukeliančiu poveikiu smegenėlių ląstelių kultūrose.
4. Skirtingai nuo pacientų, neturinčių kognityvinių sutrikimų, ir kita demencijos forma sergančių pacientų, smegenų skystis paimtas iš AL sergančių pacientų pasižymi neurotoksinio ir mikroglijos proliferaciją slopinančiu poveikiu smegenėlių ląstelių kultūrose. Neuronų gyvybingumą smegenėlių kultūrose labiausiai mažina smegenų skysčiai, paimti iš vidutinio sunkumo AL sergančiųjų pacientų, o neuronų skaičiaus mažėjimas stebimas kultūrose, paveiktose sergančių pacientų biologiniais skysčiais.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Heusinkveld HJ, Wahle T, Campbell A, Westerink RHS, Tran L, Johnston H, et al. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *Neurotoxicology* 2016;56: 94–106.
2. Martin Prince A, Wimo A, Guerchet M, Gemma-Claire Ali M, Wu Y-T, Prina M, et al. World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An Analysis of prevalence, Incidence, cost And Trends. Alzheimer's Disease International (ADI) 2015. Available at: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>
3. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8: 101–112.
4. Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Talebi M, Farhoudi M, Mahmoudi J. Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Med Princ Pract.* 2015;24: 1–10.
5. Sengupta U, Nilson AN, Kaye R. The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine.* 2016;6: 42–9.
6. Brown GC, Neher JJ. Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons. *Mol Neurobiol.* 2010;41: 242–247.
7. Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2: a006338.
8. Streit WJ. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res.* 2004;77: 1–8.
9. Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015;14: 388–405.
10. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 2016;8: 595–608.
11. Ringman JM, Goate A, Masters CL, Cairns NJ, Danek A, Graff-Radford N, et al. Genetic heterogeneity in Alzheimer disease and implications for treatment strategies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014;14: 499.
12. Dubravka C-D, Milica S-G, Slobodan D. Neuropathological hallmarks of Alzheimer's disease. 2001;9.
13. Ohnishi T, Matsuda H, Tabira T, Asada T, Uno M. Changes in brain morphology in Alzheimer disease and normal aging: is Alzheimer disease an exaggerated aging process? *J Neuroradiol.* 2001;22: 1680–5.
14. Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2013;12: 92–104.
15. Isik AT. Late onset Alzheimer's disease in older people. *Clin Interv Aging.* 2010;5: 307–11.
16. Musiek ES, Holtzman DM. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen”. *Nat Neurosci.* 2015;18: 800–6.
17. Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2010;19: R12–20.
18. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1: a006189.
19. Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol.* 1989;24: 173–82.

20. Vehmas AK, Kawas CH, Stewart WF, Troncoso JC. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24: 321–331.
21. Texidó L, Martín-Satué M, Alberdi E, Solsona C, Matute C. Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium*. 2011;49: 184–190.
22. Findeis MA. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*. 2007;116: 266–286.
23. Niikura T, Tajima H, Kita Y. Neuronal cell death in Alzheimer's disease and a neuroprotective factor, humanin. *Curr Neuroparmacol*. 2006;4: 139–47.
24. Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 2008;283: 29615–9.
25. Haass C, Hung AY, Schlossmachers MG, Teplow DB, Selkoe DJ. p-Amyloid Peptide and a 3-kDa Fragment Are Derived by Distinct Cellular Mechanisms. *J Biol Chem*. 1993;268: 3021–3024.
26. Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci*. 1993;13: 3136–42.
27. Selkoe DJ. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis*. 2001;3: 75–80.
28. Caillé I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Müller U, et al. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development*. 2004;131.
29. Bolós M, Hu Y, Young KM, Foa L, Small DH. Neurogenin 2 mediates amyloid- β precursor protein-stimulated neurogenesis. *J Biol Chem*. 2014;289: 31253–61.
30. Small DH, Hu Y, Bolós M, Dawkins E, Foa L, Young KM. β -Amyloid precursor protein: function in stem cell development and Alzheimer's disease brain. *Neurodegener Dis*. 2014;13: 96–8.
31. Hoe H-S, Fu Z, Makarova A, Lee J-Y, Lu C, Feng L, et al. The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity. *J Biol Chem*. 2009;284: 8495–506.
32. Wang Z, Wang B, Yang L, Guo Q, Aithmitti N, Songyang Z, et al. Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J Neurosci*. 2009;29: 10788–801.
33. Billnitzer AJ, Barskaya I, Yin C, Perez RG. APP independent and dependent effects on neurite outgrowth are modulated by the receptor associated protein (RAP). *J Neurochem*. 2013;124: 123–32.
34. Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2014;129: 756–69.
35. Bergström P, Agholme L, Nazir FH, Satir TM, Toombs J, Wellington H, et al. Amyloid precursor protein expression and processing are differentially regulated during cortical neuron differentiation. *Sci Rep*. 2016;6: 29200.
36. Mileusnic R, Lancashire CL, Johnston AN, Rose SP. APP is required during an early phase of memory formation. *Eur J Neurosci*. 2000;12: 4487–95.
37. Han S-W, Shin H-K, Adachi T. Nanolithography of Amyloid Precursor Protein Cleavage with β -Secretase by Atomic Force Microscopy. *J Biomed Nanotechnol*. 2016;12: 546–53.
38. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8: 499–509.

39. Kumar S, Walter J. Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY). Impact Journals* 2011;3: 803–12.
40. Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X, et al. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med.* 2000;6: 397–404.
41. Kumar S, Walter J. Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY). Impact Journals* 2011;3: 803–12.
42. Klein WL. A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int.* 2002;41: 345–352.
43. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297: 353–6.
44. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88: 7247–51.
45. Hardy J, Higgins G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256.
46. Koh J, Yang LL, Cotman CW. β -Amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Research.* 1990; 533: 315–320.
47. Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, et al. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med.* 2007;13: 1029–31.
48. Zou K, Gong J-S, Yanagisawa K, Michikawa M. A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci.* 2002;22: 4833–41.
49. Puzzo D, Privitera L, Fa' M, Staniszevski A, Hashimoto G, Aziz F, et al. Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol.* 2011;69: 819–30.
50. López-Toledano MA, Shelanski ML. Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci.* 2004;24: 5439–44.
51. Gu L, Guo Z. Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem.* 2013;126(3): 305–11.
52. Cizas P, Budvytyte R, Morkuniene R, Moldovan R, Broccio M, Lösche M, et al. Size-dependent neurotoxicity of beta-amyloid oligomers. *Arch Biochem Biophys.* 2010;496: 84–92.
53. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16: 358–372.
54. Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, et al. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci.* 2009;29: 10582–7.
55. Ni C-L, Shi H-P, Yu H-M, Chang Y-C, Chen Y-R. Folding stability of amyloid-beta 40 monomer is an important determinant of the nucleation kinetics in fibrillization. *FASEB J.* 2011;25: 1390–401.
56. Glabe CG. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol Aging.* 2006;27: 570–5.
57. Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry.* 2000;39: 10831–9.

58. Ahmed M, Davis J, Aucoin D, Sato T, Ahuja S, Aimoto S, et al. Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1–42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17: 561–7.
59. Sengupta U, Nilson AN, Kaye R. The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine.* 2016;6: 42–9.
60. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci.* 2012;15: 349–357.
61. Chang Y-J, Chen Y-R. The coexistence of an equal amount of Alzheimer's amyloid- β 40 and 42 forms structurally stable and toxic oligomers through a distinct pathway. *FEBS J.* 2014;281: 2674–2687.
62. Stine WB, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem.* 2003;278: 11612–22.
63. Yang C-N, Shiao Y-J, Shie F-S, Guo B-S, Chen P-H, Cho C-Y, et al. Mechanism mediating oligomeric A β clearance by naïve primary microglia. *Neurobiol Dis.* 2011;42: 221–230.
64. Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem.* 2002;277: 32046–53.
65. Manzoni C, Colombo L, Bigini P, Diana V, Cagnotto A, Messa M, et al. The molecular assembly of amyloid a β controls its neurotoxicity and binding to cellular proteins. *PLoS One.* 2011;6: e24909.
66. Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;924: 17–25.
67. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva J V., Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 2002;416: 535–539.
68. Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, et al. A β deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci.* 1997;17: 7053–9.
69. Masliah E, Sisk A, Mallory M, Mucke L, Schenk D, Games D. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1996;16: 5795–811.
70. Lee H, Zhu X, Castellani RJ, Nunomura A, Perry G, Smith MA. Amyloid- β in Alzheimer Disease: The Null versus the Alternate Hypotheses. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321(3):823–9.
71. Karran E, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem.* 2016; 2:237–252.
72. DaRocha-Souto B, Scotton TC, Coma M, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Serenó L, et al. Brain oligomeric β -amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70: 360–76.
73. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Watzet A, Vermersch P, et al. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology.* 1999;52: 1158–65.

74. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1999;46: 860–6.
75. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, et al. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 2005;8: 79–84.
76. Shrestha BR, Vitolo O V., Joshi P, Lordkipanidze T, Shelanski M, Dunaevsky A. Amyloid β peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2006;33: 274–282.
77. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008;14: 837–42.
78. Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J. Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci.* 2006;26: 6011–8.
79. Ono K, Condrón MM, Teplow DB. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106: 14745–50.
80. Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, et al. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1999;155: 853–62.
81. Johnson RD, Steel DG, Gafni A. Structural evolution and membrane interactions of Alzheimer's amyloid-beta peptide oligomers: New knowledge from single-molecule fluorescence studies. *Protein Sci.* 2014;23: 869–883.
82. McGeer PL, McGeer EG. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathol.* 2013;126: 479–497.
83. Kalara RN. Microglia and Alzheimer's disease. *Curr Opin Hematol.* 1999;6: 15–24.
84. Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJM, van Gool WA, Hoozemans JJM. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2006;113: 1685–1695.
85. Griffin WST. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006;83: 470S–474S.
86. Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. A Cell Surface Receptor Complex for Fibrillar β -Amyloid Mediates Microglial Activation. *J Neurosci.* 2003; 23(7):2665-74.
87. Carty M, Bowie AG. Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochemical Pharmacology.* 2011; 81(7):825-37.
88. Arancio O, Zhang HP, Chen X, Lin C, Trinchese F, Puzzo D, et al. RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J.* 2004;23: 4096–105.
89. Wang W-Y, Tan M-S, Yu J-T, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med.* 2015; 3(10): 136.
90. Cai Z, Hussain MD, Yan L-J. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci.* 2014;124: 307–321.
91. Doens D, Fernández PL, Glabe C, Sastre M, Klockgether T, Heneka M, et al. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation.* 2014;11: 48.
92. Fernández PL, Britton GB, Rao KS. Potential immunotargets for Alzheimer's disease treatment strategies. *J Alzheimers Dis.* 2013;33: 297–312.

93. Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, et al. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a "cytokine cycle" in disease progression. *Brain Pathol.* 1998;8: 65–72.
94. Griffin WS, Sheng JG, Roberts GW, Mrak RE. Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995;54: 276–81.
95. Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55: 273–9.
96. Walker DG, Kim SU, McGeer PL. Complement and cytokine gene expression in cultured microglia derived from postmortem human brains. *J Neurosci Res.* 1995;40: 478–493.
97. Ganter S, Northoff H, Männel D, Gebicke-Härter PJ. Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res.* 1992;33: 218–230.
98. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol.* 1993;150: 2659–67.
99. Sébire G, Emilie D, Wallon C, Héry C, Devergne O, Delfraissy JF, et al. In vitro production of IL-6, IL-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha by human embryonic microglial and neural cells. *J Immunol.* 1993;150: 1517–23.
100. Contestabile A. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res.* 2011;221: 334–340.
101. 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: 137–47.
102. Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci.* 2010;13: 812–8.
103. Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R. Amyloid β -Peptide Inhibits High-Affinity Choline Uptake and Acetylcholine Release in Rat Hippocampal Slices. *J Neurochem.* 2002;70: 2179–2187.
104. Aztiria E, Cataudella T, Spampinato S, Leanza G. Septal grafts restore cognitive abilities and amyloid precursor protein metabolism. *Neurobiol Aging.* 2009;30: 1614–25.
105. Antonini V, Marrazzo A, Kleiner G, Coradazzi M, Ronsisvalle S, Prezzavento O, et al. Anti-amnesic and neuroprotective actions of the sigma-1 receptor agonist (-)-MR22 in rats with selective cholinergic lesion and amyloid infusion. *J Alzheimers Dis.* 2011;24: 569–86.
106. Grimaldi M, Marino S Di, Florenzano F, Ciotta MT, Nori SL, Rodriguez M, et al. β -Amyloid-acetylcholine molecular interaction: new role of cholinergic mediators in anti-Alzheimer therapy? *Future Med Chem.* 2016;8: 1179–1189.
107. Pedersen WA, Kloczewiak MA, Blusztajn JK. Amyloid β -protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Pharmacology.* 1996;93: 8068–8071.
108. Harkany T, Jong GI de, Soós K, Penke B, Luiten PGM, Gulya K. β -Amyloid(1–42) affects cholinergic but not parvalbumin-containing neurons in the septal complex of the rat. *Brain Res.* 1995;698: 270–274.
109. Hu W, Gray NW, Brimijoin S. Amyloid-beta increases acetylcholinesterase expression in neuroblastoma cells by reducing enzyme degradation. *J Neurochem.* 2004;86: 470–478.

110. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci.* 2005;8: 1051–8.
111. Cuellar AC. Intracellular and Extracellular A β , a Tale of Two Neuropathologies. *Brain Pathol.* 2006;15: 66–71.
112. Boncristiano S, Calhoun ME, Kelly PH, Pfeifer M, Bondolfi L, Stalder M, et al. Cholinergic Changes in the APP23 Transgenic Mouse Model of Cerebral Amyloidosis. *J Neurosci.* 2002;22.
113. Contestabile A, Ciani E, Contestabile A. The Place of Choline Acetyltransferase Activity Measurement in the “Cholinergic Hypothesis” of Neurodegenerative Diseases. *Neurochem Res.* 2008;33: 318–327.
114. Pákási M, Kálmán J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer’s disease. *Neurochem Int.* 2008;53: 103–111.
115. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer’s disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842: 1219–31.
116. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. Mitochondria are a direct site of A accumulation in Alzheimer’s disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet.* 2006;15: 1437–1449.
117. Takuma K, Yao J, Huang J, Xu H, Chen X, Luddy J, et al. ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction. *FASEB J.* 2005;19: 597–8.
118. Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin M-A, Avadhani NG. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer’s amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol.* 2003;161: 41–54.
119. Khan SM, Cassarino DS, Abramova NN, Keeney PM, Borland MK, Trimmer PA, et al. Alzheimer’s disease cybrids replicate beta-amyloid abnormalities through cell death pathways. *Ann Neurol.* 2000;48: 148–55.
120. Cardoso SM, Santana I, Swerdlow RH, Oliveira CR. Mitochondria dysfunction of Alzheimer’s disease cybrids enhances Abeta toxicity. *J Neurochem.* 2004;89: 1417–26.
121. Cassarino DS, Fall CP, Smith TS, Bennett JP. Pramipexole reduces reactive oxygen species production in vivo and in vitro and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion. *J Neurochem.* 1998;71: 295–301.
122. Herrup K. Reimagining Alzheimer’s Disease—An Age-Based Hypothesis. *J Neurosci.* 2010; 30(50):16755–62.
123. Armstrong RA. The pathogenesis of Alzheimer’s disease: a reevaluation of the “amyloid cascade hypothesis”. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011: 630865.
124. Reitz C. Alzheimer’s disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012: 369808.
125. Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, Shen J, Tsai L-H. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer’s disease pathogenesis. *J Neurosci.* 2010;30: 14946–54.
126. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci.* 2015;18: 794–799.
127. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci.* 2007;27: 2866–75.
128. Demuro A, Parker I, Stutzmann GE. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2010;285: 12463–8.

129. Demuro A, Smith M, Parker I. Single-channel Ca(2+) imaging implicates A β 1–42 amyloid pores in Alzheimer's disease pathology. *J Cell Biol.* 2011;195: 515–24.
130. Kayed R, Lasagna-Reeves CA. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis.* 2013;33 Suppl 1: S67-78.
131. Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci.* 2004;24(13):3370-8.
132. Yamin G. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid β -protein disruption of LTP in the hippocampus. *J Neurosci Res.* 2009;87: 1729–1736.
133. LIN H. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* 2001;15: 2433–2444.
134. Shi J, Townsend M, Constantine-Paton M. Activity-dependent induction of tonic calcineurin activity mediates a rapid developmental downregulation of NMDA receptor currents. *Neuron.* 2000;28: 103–14.
135. Stevens TR, Krueger SR, Fitzsimonds RM, Picciotto MR. Neuroprotection by nicotine in mouse primary cortical cultures involves activation of calcineurin and L-type calcium channel inactivation. *J Neurosci.* 2003;23: 10093–9.
136. Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N, Rojas E. Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J Biol Chem.* 2000;275: 14077–83.
137. Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem.* 2005;280: 17294–300.
138. Kaye R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, et al. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem.* 2004;279: 46363–6.
139. Arispe N, Diaz JC, Simakova O. A β ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with A β channel blockers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2007;1768: 1952–1965.
140. McLaurin J, Chakrabarty A. Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity. *J Biol Chem.* 1996;271: 26482–9.
141. Sokolov Y, Kozak JA, Kaye R, Chanturiya A, Glabe C, Hall JE. Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure. *J Gen Physiol.* 2006;128: 637–47.
142. Cappai R, Barnham KJ. Delineating the Mechanism of Alzheimer's Disease A β Peptide Neurotoxicity. *Neurochem Res.* 2008;33: 526–532.
143. Maezawa I, Zimin PI, Wulff H, Jin L-W. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J Biol Chem.* 2011;286: 3693–706.
144. Neniskyte U, Neher JJ, Brown GC. Neuronal death induced by nanomolar amyloid β is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J Biol Chem.* 2011;286: 39904–13.
145. Brown GC, Vilalta A. How microglia kill neurons. *Brain Res.* 2015;1628: 288–297.

146. Lindberg C, Selenica M-LB, Westlind-Danielsson A, Schultzberg M. β -Amyloid Protein Structure Determines the Nature of Cytokine Release From Rat Microglia. *J Mol Neurosci*. 2005;27: 001–012.
147. Floden AM, Li S, Combs CK. β -Amyloid-Stimulated Microglia Induce Neuron Death via Synergistic Stimulation of Tumor Necrosis Factor α and NMDA Receptors. *J Neurosci*. 2005; 25(10):2566–75.
148. Thornton P, Pinteaux E, Gibson RM, Allan SM, Rothwell NJ. Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *J Neurochem*. 2006;98: 258–266.
149. Neniskyte U, Vilalta A, Brown GC. Tumour necrosis factor alpha-induced neuronal loss is mediated by microglial phagocytosis. *FEBS Lett*. 2014;588: 2952–6.
150. Parvathy S, Rajadas J, Ryan H, Vaziri S, Anderson L, Murphy GM. A β peptide conformation determines uptake and interleukin-1 α expression by primary microglial cells. *Neurobiol Aging*. 2009;30: 1792–1804.
151. Garwood CJ, Pooler AM, Atherton J, Hanger DP, Noble W. Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. *Cell Death Dis*. 2011;2: e167.
152. Wallach D. Cell death induction by TNF: a matter of self control. *Trends Biochem Sci*. 1997;22: 107–9.
153. Neniskyte U, Fricker M, Brown GC. Amyloid β induces microglia to phagocytose neurons via activation of protein kinase Cs and NADPH oxidase. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016; 81:346–355.
154. Combs CK, Karlo JC, Kao S-C, Landreth GE. β -Amyloid Stimulation of Microglia and Monocytes Results in TNF α -Dependent Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci*. 2001; 21(4):1179–88.
155. Neher JJ, Neniskyte U, Zhao J-W, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC. Inhibition of Microglial Phagocytosis Is Sufficient To Prevent Inflammatory Neuronal Death. *J Immunol*. 2011;186: 4973–4983.
156. Jekabsone A, Mander PK, Tickler A, Sharpe M, Brown GC. Fibrillar beta-amyloid peptide A β 1–40 activates microglial proliferation via stimulating TNF-alpha release and H₂O₂ derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *J Neuroinflammation*. 2006;3: 24.
157. Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation. *J Neurosci*. 2009;29: 11982–92.
158. Bal-Price A, Matthias A, Brown GC. Stimulation of the NADPH oxidase in activated rat microglia removes nitric oxide but induces peroxynitrite production. *J Neurochem*. 2002;80: 73–80.
159. Mander P, Brown GC, Eddleston M, Mucke L, Kreutzberg G, Polazzi E, et al. Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2005;2: 20.
160. Selkoe DJ. The therapeutics of Alzheimer's disease: Where we stand and where we are heading. *Ann Neurol*. 2013;74: 328–336.
161. Sanchez-Mejia RO, Newman JW, Toh S, Yu G-Q, Zhou Y, Halabisky B, et al. Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2008;11: 1311–8.

162. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999;400: 173–177.
163. Cynis H, Frost JL, Crehan H, Lemere CA. Immunotherapy targeting pyroglutamate-3 A β : prospects and challenges. *Mol Neurodegener*. 2016;11: 48.
164. Li Y, Liu Y, Wang Z, Jiang Y. Clinical trials of amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease: end of beginning or beginning of end? *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13: 1515–1522.
165. Sarazin M, Dorothée G, de Souza LC, Aucouturier P. Immunotherapy in Alzheimer's Disease: Do We Have All the Pieces of the Puzzle? *Biol Psychiatry*. 2013;74: 329–332.
166. Montoliu-Gaya L, Villegas S. A β -Immunotherapeutic strategies: a wide range of approaches for Alzheimer's disease treatment. *Expert Rev Mol Med*. 2016;18: e13.
167. Lemere CA, Perrin R, Fagan A, Holtzman D, Selkoe D, Lemere C, et al. Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles. *Mol Neurodegener*. 2013;8: 36.
168. Lee EB, Leng LZ, Zhang B, Kwong L, Trojanowski JQ, Abel T, et al. Targeting amyloid-beta peptide (A β) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in A β precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biol Chem*. 2006;281: 4292–9.
169. Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, et al. Gantenerumab: a novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β . *J Alzheimers Dis*. 2012;28: 49–69.
170. Miles LA, Crespi GAN, Doughty L, Parker MW, Selkoe DJ, Barnes DE, et al. Bapineuzumab captures the N-terminus of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide in a helical conformation. *Sci Rep*. 2013;3: 1488–1492.
171. Sevigny J, Chiao P, Bussi re T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016;537: 50–56.
172. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, et al. A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000;408: 982–985.
173. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98: 8850–5.
174. Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, et al. A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000;408: 979–982.
175. Dodart J-C, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, et al. Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci*. 2002; 5(5):452–7.
176. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*. 2000;6: 916–9.
177. Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Levkowitz G, Subbarao S, Alamed J, et al. Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J Neurosci*. 2004;24: 6144–51.

178. Bayer AJ, Bullock R, Jones RW, Wilkinson D, Paterson KR, Jenkins L, et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology* 2005;64: 94–101.
179. Orgogozo J-M, Gilman S, Dartigues J-F, Laurent B, Puel M, Kirby LC, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A 42 immunization. *Neurology* 2003;61: 46–54.
180. Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, et al. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 2005;64: 1553–62.
181. Black RS, Sperling RA, Safirstein B, Motter RN, Pallay A, Nichols A, et al. A single ascending dose study of bapineuzumab in patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2010;24: 198–203.
182. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2014;370: 322–333.
183. Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, et al. Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2014;370: 311–321.
184. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 2010;9: 119–28.
185. Siemers ER, Sundell KL, Carlson C, Case M, Sethuraman G, Liu-Seifert H, et al. Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Dement.* 2016;12: 110–120.
186. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Paul SM, Holtzman DM. Brain to Plasma Amyloid-beta Efflux: a Measure of Brain Amyloid Burden in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Science* 2002;295: 2264–2267.
187. Farlow M, Arnold SE, van Dyck CH, Aisen PS, Snider BJ, Porsteinsson AP, et al. Safety and biomarker effects of solanezumab in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2012;8: 261–71.
188. Ferrero J, Williams L, Stella H, Leitermann K, Mikulskis A, O'Gorman J, et al. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv.* 2016;2: 169–176.
189. Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK, Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, et al. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biol.* 2010;8: e1000527.
190. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990;39: 151–170.
191. Akiyama H, McGeer PL. Brain microglia constitutively express β -2 integrins. *J Neuroimmunol.* 1990;30: 81–93.
192. Graeber MB. Changing Face of Microglia. *Science* 2010;330: 783–788.
193. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007;10: 1387–1394.
194. Nimmerjahn A. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* 2005;308: 1314–1318.

195. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *J Neurosci*. 2009; 29(13):3974-80.
196. Southam KA, Vincent AJ, Small DH. Do Microglia Default on Network Maintenance in Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Dis*. 2016;51: 657–69.
197. Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan W-B, et al. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci*. 2006;9: 1512–1519.
198. Kim HJ, Ajit D, Peterson TS, Wang Y, Camden JM, Gibson Wood W, et al. Nucleotides released from A β _{1–42}-treated microglial cells increase cell migration and A β _{1–42} uptake through P2Y₂ receptor activation. *J Neurochem*. 2012;121: 228–38.
199. Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, et al. Extracellular ATP or ADP Induce Chemotaxis of Cultured Microglia through Gi/o-Coupled P2Y Receptors. *J Neurosci*. 2001; 21(6):1975-82.
200. Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S. Involvement of P2X₄ and P2Y₁₂ receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* 2007;55: 604–616.
201. Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Production and Release of Neuroprotective Tumor Necrosis Factor by P2X₇ Receptor-Activated Microglia. *J Neurosci*. 2004; 24(1):1-7.
202. Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HWGM. Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends Neurosci*. 2007;30: 596–602.
203. Gomez-Nicola D, Perry VH. Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *Neuroscientist* 2015;21: 169–84.
204. Wilkinson K, El Khoury J. Microglial Scavenger Receptors and Their Roles in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012: 1–10.
205. Fu H, Liu B, Frost JL, Hong S, Jin M, Ostaszewski B, et al. Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clearance of fibrillar A β by microglia. *Glia* 2012;60: 993–1003.
206. Noda M, Nakanishi H, Nabekura J, Akaike N. AMPA–Kainate Subtypes of Glutamate Receptor in Rat Cerebral Microglia. *J Neurosci*. 2000; 20 (1) 251-258.
207. Kuhn SA, van Landeghem FKH, Zacharias R, Färber K, Rappert A, Pavlovic S, et al. Microglia express GABA(B) receptors to modulate interleukin release. *Mol Cell Neurosci*. 2004;25: 312–22.
208. Färber K, Kettenmann H. Physiology of microglial cells. *Brain Res Rev*. 2005;48: 133–143.
209. Domercq M, Vázquez-Villoldo N, Matute C. Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Front Cell Neurosci*. 2013;7: 49.
210. Acarin L, González B, Castellano B, Castro AJ. Microglial response to N-methyl-D-aspartate-mediated excitotoxicity in the immature rat brain. *J Comp Neurol*. 1996;367: 361–74.
211. Streit WJ, Morioka T, Kalebica AN. MK-801 prevents microglial reaction in rat hippocampus after forebrain ischemia. *Neuroreport* 1992;3: 146–8.
212. Thomas DM, Kuhn DM. MK-801 and dextromethorphan block microglial activation and protect against methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res*. 2005;1050: 190–8.
213. Piani D, Spranger M, Frei K, Schaffner A, Fontana A. Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory

- amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur J Immunol*. 1992;22: 2429–36.
214. Wu S-Z, Bodles AM, Porter MM, Griffin WST, Basile AS, Barger SW. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. *J Neuroinflammation*. 2004; 1(1): 2.
 215. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19: 312–8.
 216. Block ML, Zecca L, Hong J-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8: 57–69.
 217. Bell-Temin H, Culver-Cochran AE, Chaput D, Carlson CM, Kuehl M, Burkhardt BR, et al. Novel Molecular Insights into Classical and Alternative Activation States of Microglia as Revealed by Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)-based Proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14: 3173–84.
 218. Colton CA, Wilcock DM. Assessing Activation States in Microglia. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*. 2010;9: 174–191.
 219. Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, et al. Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation and Neuroprotection against Experimental Brain Injury Is Independent of Hematogenous TLR4. *J Neurosci*. 2012; 32(34):11706–15.
 220. Herber DL, Roth LM, Wilson D, Wilson N, Mason JE, Morgan D, et al. Time-dependent reduction in A β levels after intracranial LPS administration in APP transgenic mice. *Exp Neurol*. 2004;190: 245–253.
 221. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27: 119–145.
 222. Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré M-V, Celador IL, Josserand J, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*. 2013;32: 70–85.
 223. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*. 2006;80: 1298–1307.
 224. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim Y-K, Chen NY, Cohn L, et al. Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. *Science* 2004;304: 1678–1682.
 225. Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Levkowitz G, Subbarao S, Alamed J, et al. Passive Amyloid Immunotherapy Clears Amyloid and Transiently Activates Microglia in a Transgenic Mouse Model of Amyloid Deposition. *J Neurosci*. 2004; 24(27):6144–51.
 226. Wilcock DM. A changing perspective on the role of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012: 495243.
 227. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003;73: 209–12.
 228. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2006;6: 318–328.
 229. Giulian D, Baker T. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*. 1986; 6(8):2163–78.
 230. Elkabes S, DiCicco-Bloom E, Black I. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci*. 1996; 16(8):2508–21.

231. Mohajeri MH, Gaugler MNM, Martinez J, Tracy J, Li H, Crameri A, et al. Assessment of the Bioactivity of Antibodies against β -Amyloid Peptide in vitro and in vivo. *Neurodegener Dis.* 2004;1: 160–167.
232. Magga J, Puli L, Pihlaja R, Kanninen K, Neulamaa S, Malm T, et al. Human intravenous immunoglobulin provides protection against A β toxicity by multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2010;7: 90.
233. Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci.* 2005;25: 8240–9.
234. Teeling JL, Carare RO, Glennie MJ, Perry VH. Intracerebral immune complex formation induces inflammation in the brain that depends on Fc receptor interaction. *Acta Neuropathol.* 2012;124: 479–90.
235. Dalgediene I, Lasickiene R, Budvytyte R, Valincius G, Morkuniene R, Borutaite V, et al. Immunogenic properties of amyloid beta oligomers. *J Biomed Sci.* 2013;20: 10.
236. Zvirbliene A, Samonskyte L, Gedvilaite A, Voronkova T, Ulrich R, Sasnauskas K. Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. *J Immunol Methods.* 2006;311: 57–70.
237. Zvirbliene A, Kucinskaite I, Sezaite I, Samuel D, Sasnauskas K. Mapping of B cell epitopes in measles virus nucleocapsid protein. *Arch Virol.* 2007;152: 25–39.
238. Petraitytė-Burneikienė R, Nalivaiko K, Lasickienė R, Firantienė R, Ėmužytė R, Sasnauskas K, et al. Generation of recombinant metapneumovirus nucleocapsid protein as nucleocapsid-like particles and development of virus-specific monoclonal antibodies. *Virus Res.* 2011;161: 131–139.
239. Williams TL, Day IJ, Serpell LC. The Effect of Alzheimer's A β Aggregation State on the Permeation of Biomimetic Lipid Vesicles. *Langmuir.* 2010;26: 17260–17268.
240. Adams DS, Levin M. General principles for measuring resting membrane potential and ion concentration using fluorescent bioelectricity reporters. *Cold Spring Harb Protoc.* 2012;2012: 385–97.
241. Wang X, Zaidi A, Pal R, Garrett AS, Bracerar R, Chen X, et al. Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. *BMC Neurosci.* 2009;10: 12.
242. Neniskyte U, Brown GC. Lactadherin/MFG-E8 is essential for microglia-mediated neuronal loss and phagoptosis induced by amyloid β . *J Neurochem.* 2013;126: 312–317.
243. Vale C, Alfonso A, Suñol C, Vieytes MR, Botana LM. Modulation of calcium entry and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by palytoxin. *J Neurosci Res.* 2006;83: 1393–1406.
244. Babot Z, Cristòfol R, Suñol C. Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci.* 2005;21: 103–12.
245. Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Front Cell Neurosci.* 2015;9: 91.
246. Guadagno J, Xu X, Karajgikar M, Brown A, Cregan SP. Microglia-derived TNF α induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma. *Cell Death Dis.* 2013;4: e538.
247. Morkuniene R, Cizas P, Jankeviciute S, Petrolis R, Arandarcikaite O, Krisciukaitis A, et al. Small A β 1–42 oligomer-induced membrane depolarization of neuronal and

- microglial cells: Role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurosci Res.* 2015;93: 475–486.
248. Gedvilaite A, Frömmel C, Sasnauskas K, Micheel B, Özel M, Behrsing O, et al. Formation of Immunogenic Virus-like Particles by Inserting Epitopes into Surface-Exposed Regions of Hamster Polyomavirus Major Capsid Protein. *Virology.* Academic Press; 2000;273: 21–35.
 249. Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D, et al. Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 2023–8.
 250. Morkuniene R, Zvirbliene A, Dalgediene I, Cizas P, Jankeviciute S, Baliutyte G, et al. Antibodies bound to Ab oligomers potentiate the neurotoxicity of Ab by activating microglia. *J Neurochem.* 2013;126: 604–615.
 251. Finn R, Kovács AD, Pearce DA. Altered sensitivity of cerebellar granule cells to glutamate receptor overactivation in the Cln3(Δ ex7/8)-knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurochem Int.* 2011;58: 648–55.
 252. Shankar GM, Walsh DM, Ferri C, Prince M, Brayne C, Brodaty H, et al. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . *Mol Neurodegener.* 2009;4: 48.
 253. Nieweg K, Andreyeva A, van Stegen B, Tanriöver G, Gottmann K. Alzheimer's disease-related amyloid- β induces synaptotoxicity in human iPS cell-derived neurons. *Cell Death Dis.* 2015;6: e1709.
 254. Pike C, Burdick D, Walencewicz A, Glabe C, Cotman C. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci.* 1993; 13(4):1676–87.
 255. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95: 6448–53.
 256. Resende R, Ferreira E, Pereira C, Resende de Oliveira C. Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1–42: Involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience* 2008;155: 725–737.
 257. Sakono M, Zako T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS J.* 2010;277: 1348–1358.
 258. Williams TL, Serpell LC. Membrane and surface interactions of Alzheimer's A β peptide - insights into the mechanism of cytotoxicity. *FEBS J.* 2011;278: 3905–3917.
 259. Ungureanu A-A, Benilova I, Krylychikina O, Braeken D, De Strooper B, Van Haesendonck C, et al. Amyloid beta oligomers induce neuronal elasticity changes in age-dependent manner: a force spectroscopy study on living hippocampal neurons. *Sci Rep.* 2016;6: 25841.
 260. Sarkar B, Das AK, Maiti S. Thermodynamically stable amyloid- β monomers have much lower membrane affinity than the small oligomers. *Front Physiol.* 2013;4: 84.
 261. Valincius G, Heinrich F, Budvytyte R, Vanderah DJ, McGillivray DJ, Sokolov Y, et al. Soluble amyloid beta-oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: implications for cell toxicity. *Biophys J.* 2008;95: 4845–61.
 262. Koh S-H, Noh MY, Kim SH. Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Brain Res.* 2008;1188: 254–262.
 263. Alberdi E, Sánchez-Gómez MV, Cavaliere F, Pérez-Samartín A, Zugaza JL, Trullas R, et al. Amyloid β oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium.* 2010;47: 264–272.

264. Ferreira IL, Bajouco LM, Mota SI, Auberson YP, Oliveira CR, Rego AC. Amyloid beta peptide 1–42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in cortical cultures. *Cell Calcium*. 2012;51: 95–106.
265. Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, et al. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann Neurol*. 2012;72: 536–549.
266. Domercq M, Vázquez-Villoldo N, Matute C. Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Front Cell Neurosci*. 2013;7: 49.
267. Harkany T, Ábrahám I, Timmerman W, Laskay G, Tóth B, Sasvári M, et al. β -Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci*. 2000;12: 2735–2745.
268. Blanchard BJ, Thomas VL, Ingram VM. Mechanism of membrane depolarization caused by the Alzheimer A β 1–42 peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293: 1197–1203.
269. Noda M. Possible Contribution of Microglial Glutamate Receptors to Inflammatory Response upon Neurodegenerative Diseases. *J Neurol Disord*. 2013;1: 131.
270. Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S, et al. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110: E2518–27.
271. Noda M. Dysfunction of Glutamate Receptors in Microglia May Cause Neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res*. 2016;13: 381–6.
272. Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, et al. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102: 10427–32.
273. Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, et al. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem*. 2004;279: 46363–6.
274. Vaarmann A, Kovac S, Holmström KM, Gandhi S, Abramov AY. Dopamine protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity. *Cell Death Dis*. 2013;4: e455.
275. Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*. 2009;62: 788–801.
276. Peters C, Sepúlveda FJ, Fernández-Pérez EJ, Peoples RW, Aguayo LG. The Level of NMDA Receptor in the Membrane Modulates Amyloid- β Association and Perforation. *J Alzheimer's Dis*. 2016;53: 197–207.
277. De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, et al. A β oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem*. 2007;282: 11590–601.
278. Strodel B, Lee JWL, Whittleston CS, Wales DJ. Transmembrane structures for Alzheimer's A β (1–42) oligomers. *J Am Chem Soc*. 2010;132: 13300–12.
279. Molokanova E, Akhtar MW, Sanz-Blasco S, Tu S, Piña-Crespo JC, McKercher SR, et al. Differential effects of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors on A β -induced nitric oxide production in cerebrocortical neurons. *J Neurosci*. 2014;34: 5023–8.
280. Arrázola MS, Ramos-Fernández E, Cisternas P, Ordenes D, Inestrosa NC. Wnt Signaling Prevents the A β Oligomer-Induced Mitochondrial Permeability Transition

- Pore Opening Preserving Mitochondrial Structure in Hippocampal Neurons. Thomas B, editor. PLoS One. 2017;12: e0168840.
281. Um JW, Kaufman AC, Kostylev M, Heiss JK, Stagi M, Takahashi H, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer $\text{A}\beta$ oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron* 2013;79: 887–902.
 282. Jarosz-Griffiths HH, Noble E, Rushworth J V, Hooper NM. Amyloid- β Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein. *J Biol Chem*. 2016;291: 3174–83.
 283. Kastanenka K, Bussiere T, Weinreb P, Qian F, Rhodes K, Bacskai B. Amelioration of calcium dyshomeostasis by immunotherapy with BIIB037 in Tg2576 mice. *Alzheimer's Dement*. 2013;9: P508.
 284. Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, et al. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann Neurol*. 2012;72: 536–49.
 285. Schilling T, Eder C. Amyloid- β -induced reactive oxygen species production and priming are differentially regulated by ion channels in microglia. *J Cell Physiol*. 2011;226: 3295–3302.
 286. Parajuli B, Sonobe Y, Horiuchi H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Oligomeric amyloid β induces IL-1 β processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*. 2013;4: e975.
 287. Taneo J, Adachi T, Yoshida A, Takayasu K, Takahara K, Inaba K. Amyloid β oligomers induce interleukin-1 β production in primary microglia in a cathepsin B- and reactive oxygen species-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; 458(3):561-7.
 288. Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar $\text{A}\beta_{42}$ hotspots around plaques. *Nat Commun*. 2015;6: 6176.
 289. Maezawa I, Zimin PI, Wulff H, Jin L-W. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J Biol Chem*. 2011;286: 3693–706.
 290. Jekabsone A, Mander PK, Tickler A, Sharpe M, Brown GC. Fibrillar beta-amyloid peptide Abeta1–40 activates microglial proliferation via stimulating TNF-alpha release and H2O2 derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *J Neuroinflammation*. 2006;3: 24.
 291. Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β . *J Neuroimmunol*. 2009;210: 3–12.
 292. Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*. 2002;277: 32046–53.
 293. Snyder SW, Lador US, Wade WS, Wang GT, Barrett LW, Matayoshi ED, et al. Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys J*. 1994;67: 1216–28.
 294. Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE, et al. Intracranially Administered Anti- $\text{A}\beta$ Antibodies Reduce β -Amyloid Deposition by Mechanisms Both Independent of and Associated with Microglial Activation. *J Neurosci*. 2003; 23 (9): 3745-3751.
 295. Adolfsson O, Pihlgren M, Toni N, Varisco Y, Buccarello AL, Antonello K, et al. An Effector-Reduced Anti-Amyloid (A) Antibody with Unique A Binding Properties

- Promotes Neuroprotection and Glial Engulfment of A. *J Neurosci.* 2012;32: 9677–9689.
296. Fuller JP, Stavenhagen JB, Christensen S, Kartberg F, Glennie MJ, Teeling JL. Comparing the efficacy and neuroinflammatory potential of three anti- β antibodies. *Acta Neuropathol.* 2015;130: 699–711.
 297. Lathuilière A, Laversenne V, Astolfo A, Kopetzki E, Jacobsen H, Stampanoni M, et al. A subcutaneous cellular implant for passive immunization against amyloid- β reduces brain amyloid and tau pathologies. *Brain* 2016;139: 1587–1604.
 298. Lichtlen P, Mohajeri MH. Antibody-based approaches in Alzheimer's research: safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools. *J Neurochem.* 2008;104: 859–874.
 299. Fuller JP, Stavenhagen JB, Christensen S, Kartberg F, Glennie MJ, Teeling JL. Comparing the efficacy and neuroinflammatory potential of three anti- β antibodies. *Acta Neuropathol.* 2015;130: 699–711.
 300. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400: 173–7.
 301. Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D, et al. Epitope and isotype specificities of antibodies to β -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 2023–8.
 302. Zago W, Buttini M, Comery TA, Nishioka C, Gardai SJ, Seubert P, et al. Neutralization of Soluble, Synaptotoxic Amyloid Species by Antibodies Is Epitope Specific. *J. Neurosci.* 2012; 32 (8): 2696-2702.
 303. Asami-Odaka A, Obayashi-Adachi Y, Matsumoto Y, Takahashi H, Fukumoto H, Horiguchi T, et al. Passive Immunization of the A β 42(43) C-Terminal-Specific Antibody BC05 in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurodegener Dis.* 2005;2: 36–43.
 304. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.* 2000;6: 916–9.
 305. Boltz-Nitulescu G, Bazin H, Spiegelberg HL. Specificity of Fc receptors for IgG2a, IgG1/IgG2b, and IgE on rat macrophages. *J Exp Med.* 1981;154: 374–84.
 306. Tutt AL, James S, Laversin SA, Tipton TRW, Ashton-Key M, French RR, et al. Development and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for Mouse and Human Fc γ Receptors. *J Immunol.* 2015;195: 5503–16.
 307. Fossati-Jimack L, Ioan-Facsinay A, Reininger L, Chicheportiche Y, Watanabe N, Saito T, et al. Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fc γ receptor III. *J Exp Med.* 2000;191: 1293–302.
 308. Song X, Shapiro S, Goldman DL, Casadevall A, Scharff M, Lee SC. Fc γ receptor I- and III-mediated macrophage inflammatory protein 1 α induction in primary human and murine microglia. *Infect Immun.* 2002;70: 5177–84.
 309. Sears DW, Osman N, Tate B, McKenzie IF, Hogarth PM. Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fc receptor for IgG. *J Immunol.* 1990;144: 371–8.
 310. Weinshank RL, Luster AD, Ravetch J V. Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, Fc γ R- α . *J Exp Med.* 1988;167: 1909–25.
 311. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012;119: 5640–9.

312. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ Receptors: Old Friends and New Family Members. *Immunity*. 2006;24: 19–28.
313. Lull ME, Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 2010;7: 354–365.
314. Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2012;9: 577.
315. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. 2016;173: 649–665.
316. Aguzzi A, Falsig J. Prion propagation, toxicity and degradation. *Nat Neurosci*. 2012;15: 936–939.
317. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002;298: 789–91.
318. Jahn R, Südhof TC. Membrane Fusion and Exocytosis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68: 863–911.
319. Bailey JA, Lahiri DK. Neuronal differentiation is accompanied by increased levels of SNAP-25 protein in fetal rat primary cortical neurons: implications in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1086: 54–65.
320. Koffie RM, Hyman BT, Spires-Jones TL. Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Mol Neurodegener*. 2011;6: 63.
321. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95: 6448–53.
322. Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, et al. Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid β Oligomers. *J Neurosci*. 2004; 24 (45): 10191–10200.
323. Evans NA, Facci L, Owen DE, Soden PE, Burbidge SA, Prinjha RK, et al. Abeta(1–42) reduces synapse number and inhibits neurite outgrowth in primary cortical and hippocampal neurons: a quantitative analysis. *J Neurosci Methods*. 2008;175: 96–103.
324. Walsh DM, Selkoe DJ. A? Oligomers ? a decade of discovery. *Neurochem*. 2007;101: 1172–1184.
325. Karran E, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem*. 2016; 139(2):237–252.
326. Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC, et al. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement*. 2012;8: S1–68.
327. Insel PS, Mattsson N, Donohue MC, Mackin RS, Aisen PS, Jack CR, et al. The transitional association between β-amyloid pathology and regional brain atrophy. *Alzheimers Dement*. 2015;11: 1171–9.
328. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Andreasson U, Londos E, Minthon L, et al. Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Abeta42/Abeta40 ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;23: 316–20.
329. Lewczuk P, Kornhuber J, Vanmechelen E, Peters O, Heuser I, Maier W, et al. Amyloid β peptides in plasma in early diagnosis of Alzheimer's disease: A multicenter study with multiplexing. *Exp Neurol*. 2009;223: 366–370.
330. Spies PE, Slats D, Sjogren JMC, Kremer BPH, Verhey FRJ, Olde Rikkert MGM, et al. The Cerebrospinal Fluid Amyloid β42/40 Ratio in the Differentiation of Alzheimers Disease from Non-Alzheimers Dementia. *Curr Alzheimer Res*. 2010;7: 470–476.
331. Sattlecker M, Kiddle SJ, Newhouse S, Proitsi P, Nelson S, Williams S, et al. Alzheimer's disease biomarker discovery using SOMAscan multiplexed protein technology. *Alzheimer's Dement*. 2014;10: 724–734.

332. Lehmann S, Teunissen CE. Editorial: Biomarkers of Alzheimer's Disease: The Present and the Future. *Front Neurol.* 2016;7: 158.
333. Snyder HM, Carrillo MC, Grodstein F, Henriksen K, Jeromin A, Lovestone S, et al. Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014;10: 109–14.
334. Hampel H, Broich K, Hoessler Y, Pantel J. Biological markers for early detection and pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11: 141–57.
335. Mayeux R, Honig LS, Tang M-X, Manly J, Stern Y, Schupf N, et al. Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 2003;61: 1185–90.
336. Pomara N, Willoughby LM, Sidtis JJ, Mehta PD. Selective reductions in plasma Abeta 1–42 in healthy elderly subjects during longitudinal follow-up: a preliminary report. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2005;13: 914–7.
337. Ritchie C, Smailagic N, Noel-Storr AH, Takwoingi Y, Flicker L, Mason SE, et al. Plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2014;6:1-90.
338. Andreasen N, Vanmechelen E, Van de Voorde A, Davidsson P, Hesse C, Tarvonen S, et al. Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;64: 298–305.
339. Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet.* 2001;357: 169–175.
340. Jicha GA, Abner EL, Schmitt FA, Kryscio RJ, Riley KP, Cooper GE, et al. Preclinical AD Workgroup staging: pathological correlates and potential challenges. *Neurobiol Aging.* 2012;33: 622.e1-622.e16.
341. Krämer D, Minichiello L. Cell Culture of Primary Cerebellar Granule Cells. *Methods in Molecular Biology* 2010; 633: 233–239.
342. Perez-Alcazar M, Culley G, Lyckenvik T, Mobarrez K, Bjorefeldt A, Wasling P, et al. Human Cerebrospinal Fluid Promotes Neuronal Viability and Activity of Hippocampal Neuronal Circuits In Vitro. *Front Cell Neurosci.* 2016;10: 54.
343. Yaka E, Egrilmez MY, Keskinoglu P, Cavdar Z, Genc S, Genc K, et al. Biological markers in cerebrospinal fluid (CSF) and evaluation of in vitro effect of CSF on PC12 cell line viability in Alzheimer's disease. *Cell Biochem Funct.* 2009;27: 395–401.
344. Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, Lewczuk P, Klafki H-W, Sparbier K, et al. CSF amyloid- β -peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Brain* 2006; 129(5):1177-87.
345. Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico M, Sanchez-Varo R, Nuñez-Diaz C, et al. Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol.* 2016;132: 897–916.
346. Luo W, Liu W, Hu X, Hanna M, Caravaca A, Paul SM. Microglial internalization and degradation of pathological tau is enhanced by an anti-tau monoclonal antibody. *Sci Rep.* 2015;5: 11161.
347. Jayasena T, Poljak A, Braidy N, Smythe G, Raftery M, Hill M, et al. Upregulation of glycolytic enzymes, mitochondrial dysfunction and increased cytotoxicity in glial cells treated with Alzheimer's disease plasma. *PLoS One.* 2015;10: e0116092.
348. Triglia RP, Linscott WD. Titers of nine complement components, conglutinin and C3b-inactivator in adult and fetal bovine sera. *Mol Immunol.* 1980;17: 741–8.

- 349. Agoropoulou C, Wing MG, Wood A. CD59 expression and complement susceptibility of human neuronal cell line (NTera2). *Neuroreport*. 1996;7: 997–1004.
- 350. Haga S, Ikeda K, Sato M, Ishii T. Synthetic Alzheimer amyloid beta/A4 peptides enhance production of complement C3 component by cultured microglial cells. *Brain Res*. 1993;601: 88–94.
- 351. Rojo LE, Fernández JA, Maccioni AA, Jimenez JM, Maccioni RB. Neuroinflammation: Implications for the Pathogenesis and Molecular Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Arch Med Res*. 2008;39: 1–16.
- 352. Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Fariás GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci*. 2014;8: 112.

MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS

Leidiniuose referuojamuose Mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje ISI Web of Science ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. Morkūnienė R., Žvirblienė A., Dalgedienė I., Čižas P., Jankevičiūtė S., Baliutytė G., Jokubka R., Jankuncė M., Valinčius G., Borutaitė V. Antibodies bound to A β oligomers potentiate the neurotoxicity of A β by activating microglia. *Journal of Neurochemistry* 2013; 126: 604-615 p.
2. Morkūnienė R., Čižas P., Jankevičiūtė S., Petrolis R., Arandarčikaitė O., Kriščiukaitis A., Borutaitė V. Small Ab1–42 Oligomer-Induced Membrane Depolarization of Neuronal and Microglial Cells: Role of N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *Journal of Neuroscience Research (JNR)* 2015; 93:475–486 p.

Kitos publikacijos:

1. Morkūnienė R., Čižas P., Jankevičiūtė S., Budvytytė R., Valinčius G., Borutaitė V. „Maži ir dideli beta amiloido oligomerai sukelia neuronų žūtį skirtingais mechanizmais“. IV-oji mokslinė Lietuvos Neuromokslų Asociacijos (LNA) konferencija: 2012 m. gruodžio 7 d. Vilnius, Lietuva.
2. Jankevičiūtė S., Morkūnienė R., Čižas P., Borutaitė V. „Monokloninių antikūnų kompleksų su sintetiniais antigenais poveikio neuronų–glijos ląstelių kultūroms tyrimas“, LSMU VI-oji nacionalinė mokslinė doktorantų konferencija „Mokslas – sveikatai“: 2013 m. balandžio 05 d. Kaunas, Lietuva.
3. Čižas P., Jankevičiūtė S., Baginskaitė J., Morkūnienė R., Borutaitė V. “Hypoxia and A β _{1–42} act synergistically inducing neuronal death”. 5th Conference on Advances in molecular mechanisms underlying neurological disorders: 2013 m. birželio 23-26 d., Bath, UK.
4. Jankevičiūtė S., Morkūnienė R., Čižas P., Borutaitė V. „Effect of A β _{1–42} antibody–antigen complexes on viability of neuronal–glial cell cultures”. 5th Conference on Advances in molecular mechanisms underlying neurological disorders: 2013 m. birželio 23–26 d., Bath, UK.
5. Čižas P., Jankevičiūtė S., Borutaitė V. „Synergistical effect of hypoxia and A β _{1–42} on neuronal viability“. Fifth conference of Lithuanian Neuroscience Association: 2013 m. gruodžio 6–7 d., Vilnius, Lithuania
6. Borutaitė V., Žvirblienė A., Dalgedienė I., Jankevičiūtė S., Čižas P., Morkūnienė R. “Neurotoxic effects of immune complexes of antibodies with oligomeric antigens”. Fifth conference of Lithuanian Neuroscience Association: 2013 m. gruodžio 6–7 d., Vilnius, Lithuania.

7. Jankevičiūtė S., Čižas P., Morkūnienė R., Borutaitė V. "Aβ₁₋₄₂ antibody-antigen complexes kill neurons via activation of microglia". Fifth conference of Lithuanian Neuroscience Association: 2013 m. gruodžio 6–7 d., Vilnius, Lithuania
8. Jankevičiūtė S., Morkūnienė R., Čižas P., Petrolis R., Kriščiukaitis A., Borutaitė V. „MK-801 apsauginio poveikio prieš Aβ₁₋₄₂ oligomerų sukeltą neuronų žūtį tyrimas“. VII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“: 2014 m. balandžio 9 d., Kaunas, Lithuania.
9. Morkūnienė R., Jankevičiūtė S., Čižas P., Dalgedienė I., Žvirblienė A., Borutaitė V. "Immune complexes of antibodies with Aβ oligomers cause neuronal death in primary neuronal-glial culture by activating microglia". XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society "50th anniversary of FEBS", 2014 m. birželio 17–20 d., Birštonas, Lithuania.
10. Jekabsone A., Jankevičiūtė S., Čižas P., Morkūnienė R., Borutaitė V. "Small Aβ₁₋₄₂ oligomers increase intramicroglial Ca²⁺ in NMDAR-sensitive manner". XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society "50th anniversary of FEBS", 2014 m. birželio 17–20 d., Birštonas, Lithuania.
11. Jankevičiūtė S., Morkūnienė R., Čižas P., Petrolis R., Kriščiukaitis A., Borutaitė V. "MK-801 protective effect against Aβ₁₋₄₂ oligomer-induced neuronal death". XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society "50th anniversary of FEBS", Symposium "Young biochemistry", 2014 m. birželio 17 d., Birštonas, Lithuania.
12. Borutaitė V., Morkūnienė R., Žvirblienė A., Dalgedienė I., Čižas P., Jankevičiūtė S., Valinčius G. „Immune complexes of beta amyloid with specific monoclonal antibodies induce neuronal loss via microglial activation“. Glia: 11th European meeting on Glial cell function in health and disease, 2014 liepos 03–06 d., Berlin, Germany.
13. Jankevičiūtė S., Morkūnienė R., Čižas P., Petrolis R., Kriščiukaitis A., Borutaitė V. "Protective effect of MK-801 against small Aβ₁₋₄₂ oligomer-induced neuronal death". VI-oji mokslinė Lietuvos Neuro-mokslų Asociacijos (LNA) konferencija: 2014 m. gruodžio 5 d., Vilnius, Lietuva.
14. Jankevičiūtė S., Morkūnienė R., Čižas P., Petrolis R., Kriščiukaitis A., Borutaitė V. "Protective effect of NMDA receptor antagonist MK-801 against small beta-amyloid(1–42) oligomer-induced neuronal death". 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders (AD/PD™ 2015) "Mechanisms,

- Clinical Strategies, and Promising Treatments of Neurodegenerative Diseases”: 2015 m. kovo 18–22 d., Nica, Prancūzija.
15. Morkūnienė R., Jankevičiūtė S., Čižas P., Dalgedienė I., Žvirblienė A., Borutaitė V. “Antibodies dramatically increase the neurotoxicity of amyloid beta oligomers in primary neuronal-glia cultures by activating microglia“. 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders (AD/PD™ 2015) “Mechanisms, Clinical Strategies, and Promising Treatments of Neurodegenerative Diseases”: 2015 m. kovo 18–22 d., Nica, Prancūzija.
 16. Jankevičiūtė S., Rimgaila S., Bučinskis E., Morkūnienė R., Borutaitė V. „Multimerinių antikūno-antigeno kompleksų citotoksiškumo tyrimai smegenų ląstelių kultūrose“, LSMU VIII-oji nacionalinė mokslinė doktorantų konferencija „Mokslas – sveikatai“: 2015 m. balandžio 10 d., Kaunas, Lietuva.
 17. Jankevičiūtė S., Morkūnienė R., Pšemeneckienė G., Grušauskienė E., Petrikonis K., Borutaitė V. “Neurotoxic effects of biological fluids of Alzheimer's disease patients' on cerebellar granule cell cultures”. Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and the Baltic Physiological Societies: 2015 rugpjūčio 26–29 d., Kaunas, Lietuva. (Stendinis pranešimas. Geriausio jaunojo tyrėjo stendinio pranešimo apdovanojimas).
 18. Jankevičiūtė S., Pšemeneckienė G., Grušauskienė E., Petrikonis K., Morkūnienė R., Borutaitė V. „Alzheimer's disease patients' cerebrospinal fluid induces neuronal death“: VII-oji mokslinė Lietuvos Neuromokslų Asociacijos (LNA) konferencija: 2015 m. lapkričio 27 d. Vilnius, Lietuva. (Stendinis pranešimas. Geriausio stendinio pranešimo apdovanojimas).
 19. Bružas A., Jankevičiūtė S., Čižas P., Borutaitė V., Morkūnienė R. „Mitochondria derived ros mediate A β ₁₋₄₂ induced neurotoxicity in primary neuronal cultures“: VII-oji mokslinė Lietuvos Neuromokslų Asociacijos (LNA) konferencija: 2015 m. lapkričio 27d. Vilnius, Lietuva.
 20. Jankevičiūtė S., Morkūnienė R., Pšemeneckienė G., Grušauskienė E., Petrikonis K., Borutaitė V. „Neurotoksinis Alzheimerio liga sergančiųjų pacientų biologinių skysčių poveikis pirminėms neuronų-glijos ląstelių kultūroms“: Lietuvos mokslo akademijos (LMA) organizuojama jaunųjų mokslininkų konferencija „BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“: 2015 m. gruodžio 10 d., Vilnius, Lietuva.
 21. Jankevičiūtė S., Morkūnienė R., Borutaitė V. „Pirminės ląstelių kultūros – ankstyvajai Alzheimerio ligos diagnostikai“: IX nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“: 2016 m. balandžio

13 d., Kaunas. Lietuva. (Žodinis pranešimas. I-oji vieta Eksperimentinės medicinos sekcijoje).

22. Morkūnienė R., Jankevičiūtė S., Čižas P., Jekabsone A., Borutaitė V. “How amyloid beta damage brain cells in Alzheimer's disease?”: XIV-oji tarptautinė Lietuvos biochemikų draugijos (LBD) organizuojama mokslinė konferencija: 2016 m. birželio 27–30 d., Druskininkai, Lietuva.
23. Jankevičiūtė, S., Morkūnienė R., Borutaitė V. “Primary neuronal-glia cell cultures – basis for developing early Alzheimer's disease diagnostic methods”: XIV-oji tarptautinė Lietuvos biochemikų draugijos (LBD) organizuojama mokslinė konferencija: 2016 m. birželio 27–30 d., Druskininkai, Lietuva.
24. Jankevičiūtė, S., Pšemeneckienė G., Grušauskienė E., Petrikonis K., Morkūnienė R., Borutaitė, V. “Neurotoxic effects of Alzheimer's disease patients' cerebrospinal fluid on cerebellar granule cell cultures”: 10-oji Europos neuromokslų asociacijų federacijos mokslinė konferencija: 2016 m. liepos 2-6 d., Kopenhaga, Danija.
25. Ambrazevičiūtė D., Bružas A., Jankevičiūtė S., Borutaitė V., Morkūnienė R. “Mitochondria-derived superoxide mediates A β ₁₋₄₂ oligomer-induced neurotoxicity in primary brain cell cultures”: VIII-oji tarptautinė mokslinė Lietuvos Neuromokslų Asociacijos (LNA) organizuojama konferencija: 2016 m. gruodžio 09 d. Vilnius, Lietuva.
26. Morkūnienė R., Jankevičiūtė S., Čižas P., Jekabsone A., Burutaitė V. “Size dependent toxicity mechanisms of A β ₁₋₄₂ aggregates in neuronal-glia cell cultures”: 2-oji Baltijos šalių fiziologų draugijų mokslinė konferencija “New Frontiers in Neurophysiology and Neurology”: 2017 m. kovo 23–24 d., Kaunas, Lietuva.

ORIGINAL
ARTICLEAntibodies bound to A β oligomers potentiate the
neurotoxicity of A β by activating microgliaRamune Morkuniene,^{*,†} Aurelija Zvirbliene,[‡] Indre Dalgediene,[‡]
Paulius Cizas,^{*,†} Silvija Jankeviciute,^{*} Giedre Baliutyte,^{*} Ramunas Jokubka,^{*}
Marija Jankunec,[§] Gintaras Valincius[§] and Vilmante Borutaite^{*}^{*}Institute of Neurosciences, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania[†]Department of Biochemistry, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania[‡]Vilnius University, Institute of Biotechnology, Vilnius, Lithuania[§]Vilnius University, Institute of Biochemistry, Vilnius, Lithuania

Abstract

Beta amyloid (A β) oligomers are thought to contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. However, clinical trials using A β immunization were unsuccessful due to strong brain inflammation, the mechanisms of which are poorly understood. In this study we tested whether monoclonal antibodies to oligomeric A β would prevent the neurotoxicity of A β oligomers in primary neuronal–glial cultures. However, surprisingly, the antibodies dramatically increased the neurotoxicity of A β . Antibodies bound to monomeric A β fragments were non-toxic to cultured neurons, while antibodies to other oligomeric proteins: hamster polyomavirus major capsid protein, human metapneumovirus nucleocapsid protein, and measles virus nucleocapsid protein, strongly potentiated the neurotoxicity of their antigens. The neurotoxicity of antibody-

oligomeric antigen complexes was abolished by removal of the Fc region from the antibodies or by removal of microglia from cultures, and was accompanied by inflammatory activation and proliferation of the microglia in culture. In conclusion, we find that immune complexes formed by A β oligomers or other oligomeric/multimeric antigens and their specific antibodies can cause death and loss of neurons in primary neuronal–glial cultures via Fc-dependent microglial activation. The results suggest that therapies resulting in antibodies to oligomeric A β or oligomeric brain virus proteins should be used with caution or with suppression of microglial activation.

Keywords: Alzheimer's disease, antibodies, beta amyloid, neurons, neurotoxicity, oligomers.

J. Neurochem. (2013) **126**, 604–615.

Alzheimer disease (AD) is the most common dementia disorder in the elderly. There is substantial evidence that the disease arises from the accumulation of amyloid-beta (A β) peptide in the brain, which may form soluble oligomeric species and insoluble A β fibrils. The A β oligomers have been found to be the most toxic forms of A β peptide in neuronal cultures and animal AD models (Lambert *et al.* 1998; Deshpande *et al.* 2006; Cizas *et al.* 2010). The levels of soluble A β were found to be increased in brains from AD patients and correlated highly with disease severity (McLean *et al.* 1999). Accordingly, A β has been suggested as a potential therapeutic target in AD. A number of *in vitro* and *in vivo* studies have indicated the beneficial effects of immunotherapy for AD including immunization with A β or administration of A β antibodies. For example, A β antibodies

were shown to be effective in reducing the toxicity of A β oligomers in cell cultures (Kayed *et al.* 2003), to prevent A β plaque formation and synaptic impairment in transgenic AD

Received January 28, 2013; revised manuscript received June 4, 2013; accepted June 5, 2013.

Address correspondence and reprint requests to Ramune Morkuniene, Institute of Neurosciences, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu 4, LT-50009 Kaunas, Lithuania. E-mail: ramunem@med.kmu.lt

Abbreviations used: A β , beta amyloid; AD, Alzheimer's disease; AFM, atomic force spectroscopy; BBB, blood–brain barrier; CGC, cerebellar granule cell culture; DMSO, dimethyl sulfoxide; Fc γ R, Fc γ receptors; LME, L-leucine-methyl-ester; LPS, lipopolysaccharide; MeN, measles virus N protein; MTP-N, human metapneumovirus nucleocapsid protein; NLP, nucleocapsid-like particle; PI, propidium iodide; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VLP, virus-like particle; VP1, hamster polyomavirus major capsid protein.

animal models (Schenk *et al.* 1999; Morgan *et al.* 2001; Hillen *et al.* 2010) and to slow cognitive decline in human AD patients (Hock *et al.* 2003).

Several mechanisms have been proposed to account for the protective effects of A β antibodies. It has been suggested that anti-A β may act in the periphery to bind plasma A β leading to an efflux of A β from the brain (DeMattos *et al.* 2001) or if the antibodies cross the blood-brain barrier (BBB), they may trigger Fc-receptor mediated phagocytosis of A β (Bard *et al.* 2000), or they may induce disaggregation of A β fibrils (Solomon *et al.* 1996).

Despite possible beneficial effects, many of the clinical trials of A β vaccines were terminated because of the development of meningoencephalitis, an inflammatory reaction in brain, in some AD patients (Nicoll *et al.* 2003; Orgogozo *et al.* 2003). In addition, A β antibody-induced encephalitis and vasogenic edema have been found to develop in transgenic animal models of AD (Furlan *et al.* 2003; Minami *et al.* 2010). The precise mechanism(s) by which anti-A β antibodies induce neurotoxicity and/or neuroinflammation remain unclear.

The aim of this study was to elucidate whether complexes of specific antibodies with A β aggregates may prevent or cause neurotoxicity in mixed neuronal-glial cultures and whether microglia are involved in this process.

We found that antibodies when in complexes with A β or other oligomeric/multimeric antigens exert strong toxic effects on neuronal cells *in vitro* which are dependent on microglial activation. Our study not only provides new insight into the mechanism of possible A β neurotoxicity in the presence of A β -specific antibodies in AD brain but may also be important clinically in the development of better and safer vaccines for AD treatment.

Materials and methods

Monoclonal antibodies, peptides, and reagents

Murine monoclonal antibody against N-terminal epitope of A β ₁₋₄₂, reactive both with A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀ (clone #11E12, subtype IgG2b), was generated by hybridoma technology after immunization of BALB/c mice with A β ₁₋₄₂ oligomers sized 1–2 nm (Dalgediene *et al.* 2013). Monoclonal antibodies against recombinant oligomeric proteins: hamster polyomavirus major capsid protein VP1 (clone #6D11, IgG2a), human metapneumovirus (MTP) nucleocapsid (N) protein, (clone #4A2, IgG2b), measles (Me) virus N protein (clone #10F7, IgG2b) were described previously (Zvirbliene *et al.* 2006, 2007; Petraityte-Burkeikiene *et al.* 2011). Monoclonal antibody against A β ₄₂, subtype IgG1, clone #G2-13 was purchased from Millipore (Temecula, CA, USA), rabbit polyclonal A β ₁₋₄₂ antibody was from Abbiotec LLC (San Diego, CA, USA). The F(ab')₂ fragments of monoclonal antibodies were prepared using Pierce™ F(ab')₂ Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Peptides and reagents are described in Figure S1.

Preparation of synthetic A β aggregates

Various A β ₁₋₄₂ forms (oligomers, monomers, fibrils) were generated as described previously (Cizas *et al.* 2010), (see Figure S1). The size and morphology of the preparations of A β ₁₋₄₂ oligomers and fibrils were characterized by AFM as described (Cizas *et al.* 2010).

Neuronal-glial cell culture

Primary mixed neuronal-glial cultures from rat cerebella (referred to as CGC cultures below) were prepared from 7–8 days old male and female Wistar rats, or from mouse cerebella from 4–6 days old BALB/c both genders mice as described previously (Bal-Price and Brown 2001). Rats and mice were bred and maintained at our University animal house under controlled conditions. The procedures used in this study were approved by The State Food and Veterinary Service of the Republic of Lithuania in accordance with European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other purposes, and ARRIVE guidelines.

After 7 days *in vitro* cultures were used for experiments. In average, the rat cultures contained 8.5 ± 2.1% microglia, as assessed by staining with isolectin GS-IB4, 7.3 ± 4.9% astrocytes and 84.2% cerebellar granule neurons, as assessed by cellular morphology.

Treatment of CGC cultures and cell viability assay

For toxicity assays the cultures were treated for 24 h with full-length monoclonal antibodies or the respective F(ab')₂ fragments (2 µg/mL) with or without the corresponding antigens: A β ₁₋₄₂ or A β ₁₋₄₀ (1 µM, hereinafter concentration of oligomeric antigens is indicated as an amount of peptide monomer per volume, or 4.5 µg/mL), VP1, MTP-N, MeN proteins or synthetic peptides representing their fragments (all at 2 µg/mL concentration). To allow formation of antibody-antigen complexes antibodies were pre-incubated with the respective antigens in culture medium for 10 min prior to the treatment of CGC.

Lipopolysaccharide (LPS) contamination test was done with LPS-binding antibiotic polymyxin B (1000 U/mL). Solutions of antibody complexes (antibody #11E12 + A β ₁₋₄₂ or anti-VP1 + VP1) were pre-incubated with polymyxin B for 30 min at 37°C and then added to CGCs at concentrations indicated above.

For depletion of microglia, CGC cultures were incubated for 4 h with 15 mM lysosomotropic reagent L-leucine-methyl-ester (LME) which selectively removes microglia (Neniskyte *et al.* 2011). Then medium was replaced with medium from sister cultures and further incubations were performed as described above.

The viability of neurons in cultures after 24 h incubation was assessed by propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 staining using a fluorescence microscope OLYMPUS IX71SIF-3 (OLYMPUS AMERICA INC., Melville, NY, USA) as described in Cizas *et al.* 2010. Cells were counted in at least five microscopic fields per well (two wells per treatment). Data are expressed as percentage of specific neuronal cells of the total number of neuronal cells per field.

Neuronal densities in CGC cultures were assessed by counting neuronal cells in at least five microscopic fields/well and expressed as an average number of neuronal cells per field.

ELISA for TNF- α

After indicated time of treatment with antibodies-antigens complexes, the aliquots of culture media were collected from CGCs.

TNF- α content in cell culture medium was determined using the TNF- α (Rat) ELISA kit (IBL International GmbH, Hamburg, Germany), assaying the samples according to manufacturer's protocol.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SE of 3–11 experiments on separate CGC cultures. Statistical comparison between experimental groups was performed using Student's *t*-test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Monoclonal antibody #11E12 increases the neurotoxicity of A β

We investigated the effect of antigen–antibody complexes formed by A β_{1-42} and its specific monoclonal antibody on the viability of neurons in mixed neuronal–glial cultures. For this, monoclonal antibody #11E12 (2 μ g/mL) generated against oligomeric forms of synthetic A β_{1-42} (Dalgiediene *et al.* 2013), was pre-incubated with different A β_{1-42} aggregates – either large, non-toxic oligomers (with average size of particles of 4–10 nm z-height) or A β_{1-42} monomers, or A β_{1-42} fibrils (all at 1 μ M concentration) – and then added to cultures for 24 h. As shown in Fig. 1a, complexes of #11E12 antibody with A β_{1-42} oligomers caused strong increases in both neuronal apoptosis (40%) and necrosis (49%) so that only 11% of neurons remained viable. Similar decreases of neuronal viability were observed when CGC cultures were incubated with #11E12 antibody plus A β_{1-42} monomers or A β_{1-42} fibrils: the neuronal viability decreased to 42% (antibody + monomers) and to 35% (antibody + fibrils) because of extensive apoptosis and necrosis (Fig. 1a). When either antibody #11E12 or A β_{1-42} oligomers (Fig. 1a) were added separately at the same concentrations, there was no neuronal death. A β_{1-42} monomers and fibrils added by themselves were also non-toxic for CGC as we demonstrated in our previous study (Cizas *et al.* 2010).

Complexes of #11E12 + A β_{1-42} oligomers or #11E12 + A β_{1-42} fibrils were strongly neurotoxic even at significantly lower concentrations of the antibody in CGC cultures: the neuronal viability was $52 \pm 15\%$ and $47 \pm 19\%$, respectively, with 0.5 μ g/mL of antibody, and $30 \pm 14\%$ when 0.2 μ g/mL #11E12 with 2 μ M A β_{1-42} oligomers was used. Vehicle without A β_{1-42} added together with #11E12 had no effect on cell viability (data not shown).

A β_{1-42} tends to aggregate quickly when added to aqueous solutions (Snyder *et al.* 1994). We observed that 10 min pre-incubation of A β_{1-42} monomers in Dulbecco's modified Eagle's medium caused formation of various oligomeric forms of A β_{1-42} (see Figure S2). This was confirmed by AFM data showing that oligomers of various sizes were formed immediately after addition of A β_{1-42} monomers to phosphate buffer, and remained nearly at the same aggrega-

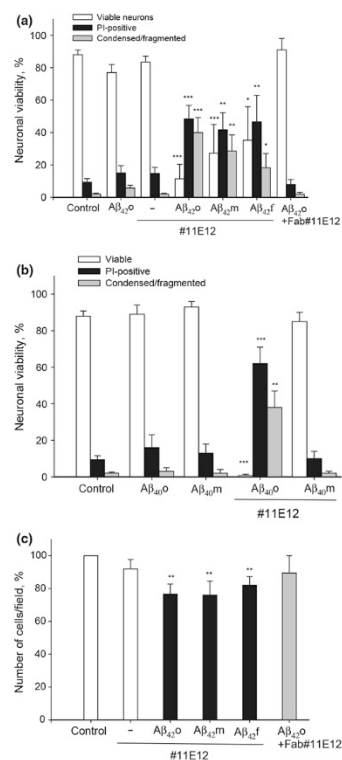


Fig. 1 Effect of complex of antibody #11E12 + beta amyloid (A β) on neuronal cell viability and density in CGC cultures. (a) Effect of antibody #11E12 + A β_{1-42} on neuronal cell viability; (b) effect of antibody #11E12 + A β_{1-42} on neuronal cell viability; (c) effect of antibody #11E12 + A β_{1-42} on the number of neurons; CGC cultures were treated with monoclonal intact or fragmented antibody #11E12 (2 μ g/mL) and A β_{1-42} (oligomers, fibrils, or monomers) or A β_{1-42} (oligomers or monomers), at 1 μ M, for 24 h. The neuronal viability was quantified by nuclei morphology analysis by propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 staining. The total number of neurons (viable, necrotic, and apoptotic) was quantified in five randomly chosen microscopic fields in each well (two wells per treatment) and was taken as 100%. There were 133 ± 10 neurons/field in control group. Total number of cells counted per treatment varied between 1000 and 1500. A β_{1-42} o, A β_{1-42} oligomers; A β_{1-42} m, A β_{1-42} monomers; A β_{1-42} f, A β_{1-42} fibrils; A β_{1-42} o, A β_{1-42} oligomers; A β_{1-42} m, A β_{1-42} monomers; Fab, Fab#11E12; fragments; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control, $n = 4-8$.

tion state during 24 h incubation (see Figure S3a–c). In contrast, A β_{1-40} has been reported to have a substantially lower rate of oligomerization/fibrilization (Snyder *et al.* 1994) and we also detected that during 10 min – 2 h incubation in Dulbecco's modified Eagle's medium A β_{1-40} stayed mostly in monomeric form (see Figure S2). As the epitope of monoclonal antibody #11E12 is at the N-terminal end of the A β molecule and this antibody forms complexes with A β_{1-40} (Dalgiediene *et al.* 2013), we investigated whether toxicity of immune complexes depends on the oligomerization status of the A β_{1-40} . As can be seen in Fig. 1b, complexes of #11E12 antibody + A β_{1-40} oligomers were highly toxic and caused death of nearly all neurons in the culture during 24 h incubation because of necrosis (68%) and apoptosis (38%), though added alone A β_{1-40} oligomers did not cause any significant neuronal death. In contrast, the #11E12 antibody + A β_{1-40} monomers had no effect on neuronal viability in CGC (Fig. 1b) indicating that oligomeric/multimeric structure of A β may be essential determinant for neurotoxicity of complexes of the antibody with A β .

To test whether the cytotoxic effect of the antibody–antigen complex is caused by the binding of the Fc domain of #11E12 antibody to the Fc γ receptors (Fc γ R) on microglia present in cell cultures causing their activation, we generated the F(ab')₂ fragment of #11E12 antibody and tested the effect of F(ab')₂ (2 μ g/mL) complex with A β_{1-42} oligomers on the viability of neurons in CGC cultures. As shown in Fig. 1a, 24 h exposure of cells to F(ab')₂ #11E12 + A β_{1-42} oligomers did not cause any significant cell death: the viability of neurons was very similar to that of the control cells. This suggests that the Fc region of the #11E12 antibody in complex with A β_{1-42} is crucial for inducing neuronal death in neuronal–glial cultures.

Interestingly, as shown in Fig. 1c, the exposure of cells to #11E12 antibody + A β_{1-42} oligomers not only induced cell death but also decreased the total number of neurons in CGC cultures. After 24 h exposure of CGC cultures to antibody plus A β_{1-42} oligomer complexes neuronal densities decreased by 23% as compared with control cultures. Similarly, the number of neurons decreased by 24% in cultures treated with #11E12 + A β_{1-42} monomers and by 18% in those treated with #11E12 + A β_{1-42} fibrils as compared with the control (Fig. 1c). In contrast, immune complex of F(ab')₂ #11E12 + A β_{1-42} oligomers did not reduce neuronal density over 24 h. The intact #11E12 antibody itself had no effect on cell number in CGC cultures (Fig. 1c).

To rule out the possible effect of contamination with bacterial LPS of the antibody or A β_{1-42} preparations causing immune reaction and neurotoxicity (Rietschel *et al.* 1994), we performed experiments in which antibody #11E12 and A β_{1-42} preparations were pre-incubated with 1000 U/mL polymyxin B, a potent antibiotic that binds to and neutralizes LPS (Cooperstock 1974). Polymyxin B did not prevent the toxic effect of the complexes of #11E12 antibody with A β_{1-42} oligomers: the percentage of viable cells was similar (14% and

19%) in #11E12 + A β_{1-42} and #11E12 + A β_{1-42} + polymyxin B groups and was statistically significantly lower than in control cultures incubated without the immune complexes (see Figure S4). This suggests that the neurotoxic effect of #11E12 antibody + A β_{1-42} oligomers is not caused by LPS contamination.

Complexes of other oligomeric proteins with the respective antibodies reduce the viability of neurons in CGC cultures. To investigate whether complexes of other oligomeric proteins bound to their specific antibodies are able to induce similar neurotoxicity, we used monoclonal antibodies raised against recombinant virus-like particles (VLPs) and nucleocapsid-like particles (NLPs) that represent highly ordered oligomeric structures (Gedvilaite *et al.* 2000; Zvirbliene *et al.* 2007). When CGC cultures were incubated with such monoclonal antibody #6D11 raised against hamster polyomavirus major capsid protein VP1 pre-incubated with A β_{1-42} oligomers or fibrils, no significant loss of neuronal viability was detected (Fig. 2a), indicating that specific antibody–antigen interaction was necessary to cause neuronal death in cell cultures. However, complexes of anti-VP1 #6D11 with its target antigen VP1 protein forming VLPs decreased neuronal viability to 37% compared to 80% viability of control cultures (Fig. 2a). Polymyxin B did not change the toxic effect of the immune complexes anti-VP1 and VP1 (Fig. 2a), indicating that there was no contribution of LPS to neurotoxicity. Removal of the Fc region of the anti-VP1 monoclonal antibody #6D11 reduced its toxicity: complexes formed by the F(ab')₂ fragments plus VP1 did not cause any significant cell death (Fig. 2a). Thus, the neurotoxicity of anti-VP1 + VP1 required the Fc part of the IgG molecule.

In the next series of experiments, we used two other monoclonal antibodies: #10F7 raised against the MeN protein and antibody #4A2 raised against the MTP-N (both added at concentrations of 2 μ g/mL). Both proteins are self-assembled to NLPs (Zvirbliene *et al.* 2007; Petraityte-Burkeikiene *et al.* 2011). The complexes of anti-MTP-N + MTP-N and anti-MeN + MeN reduced neuronal viability to 50% and 67%, respectively, whereas complexes of the F(ab')₂ fragments of the respective antibodies with their specific antigens [F(ab')₂ anti-MTP-N + MTP-N and F(ab')₂ anti-MeN + MeN], did not cause any significant neuronal death during a 24 h incubation (Fig. 2a). The antibodies by themselves (without antigens) were non-toxic (data not shown).

Neuronal loss was also observed in cultures treated with the immune complexes formed by these antibodies and their oligomeric antigens. After incubation of cultures with anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N, and anti-MeN + MeN, neuronal densities were reduced by 14, 14, and 22%, respectively, compared with control cultures after 24 h (Fig. 2b). And again, complexes of antigens with respective F(ab')₂ fragments had no significant effect on neuronal densities during 24 h incubations (Fig. 2b).

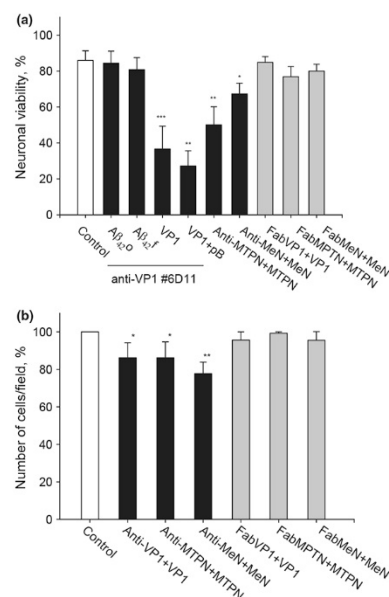


Fig. 2 Effect of complexes of anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N and anti-MeN + MeN on neuronal cell viability and density in CGC cultures. (a) Effect of antibody-antigen complexes on neuronal cell viability; (b) Effect of antibody-antigen complexes on the number of neurons; CGCs were treated with antibody-antigen complexes (anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N, anti-MeN + MeN), intact or fragmented antibodies F(ab)₂, all at concentration 2 µg/mL for 24 h. In addition, complexes of anti-VP1 plus Aβ₁₋₄₂ oligomers or fibrils (1 µM) were added to CGC cultures for 24 h. In anti-VP1 + VP1 + polymyxin B group, solutions of anti-VP1 and VP1 were pre-incubated with polymyxin B as described in 'Treatment of CGC cultures and cell viability assay' section. Neuronal viability and neuronal density were assessed by fluorescent microscopy as described in Fig. 1. Aβ₄₂o, Aβ₁₋₄₂ oligomers; Aβ₄₂f, Aβ₁₋₄₂ fibrils; pB, polymyxin B; Fab, F(ab)₂; MTPN, MTP-N; ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 compared with control, *n* = 3–11.

Altogether, these results suggest that complexes of the monoclonal antibody #11E12 with Aβ₁₋₄₂ of any state of aggregation, as well as complexes of other monoclonal antibodies with their specific oligomeric antigens (anti-VP1 #6D11 + VP1, anti-MTP# 4A2 + MTP-N and anti MeN #10F7 + MeN) exert strong neurotoxic effect on neuronal-glial cultures and that the Fc region of these antigen-bound antibodies is essential to cause neuronal death.

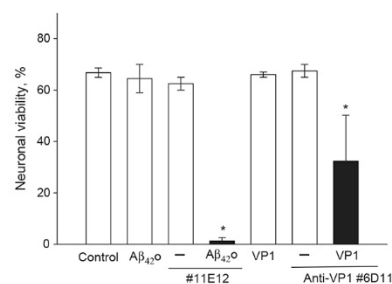


Fig. 3 Complexes antibody #11E12 + Aβ₁₋₄₂ oligomers and anti-VP1 + VP1 reduce the viability of mouse neurons. Primary neuronal-glial cultures from mouse cerebella were prepared from 4–6 days old BALB/c mouse. In average, the mouse cultures contained 13% microglia, as assessed by staining with isolectin GS-IB4, 10% astrocytes and 77% cerebellar granule neurons, as assessed by cellular morphology. Mouse neuronal-glial cultures were treated with #11E12 (2 µg/mL) + Aβ₁₋₄₂ oligomers (1 µM) and anti-VP1 + VP1 (both at 2 µg/mL) for 24 h. Neuronal viability was measured as described in Fig. 1. There were 105 ± 18 neurons/field in control group. **p* < 0.05 compared with control, *n* = 3–6.

Complexes of antibodies plus antigens reduce the viability of mouse neurons

To test whether cross-species reactivity is not involved in neurotoxicity when rat CGC cultures are treated with immune complexes formed by mouse monoclonal antibodies, we performed analogous experiments using primary neuronal-glial cultures isolated from mouse cerebellum. Similar as in rat cultures, we found the substantial decline of viability of mouse neurons when CGC cultures were treated with both complexes #11E12 antibody + Aβ₁₋₄₂ oligomers and anti-VP1 + VP1 (to 1.25% and 32.3%, respectively, compared to 66.8% neuronal viability in control) (Fig. 3). The antibodies or antigens added separately had no effect on neuronal viability (Fig. 3). This indicates that mouse primary neurons are similarly sensitive to mouse antibody + antigen complexes as rat primary neurons.

Complexes of #11E12 antibody plus synthetic peptides representing monomeric Aβ fragments have no effect on neuronal viability

To investigate more deeply whether the neurotoxicity of antibody-antigen complexes was dependent on the oligomeric/multimeric structure of the antigen, we used short peptides of Aβ₁₋₄₂ protein representing the epitope of monoclonal antibody #11E12. Based on the epitope mapping studies, the binding site of #11E12 antibody was localized at the amino (N)-terminus of Aβ₁₋₄₂, between amino acid (aa) residues 1 and 6, and the strong interaction between the

#11E12 antibody and A β ₁₋₁₃ peptide was estimated with an indirect ELISA (Dalgiedine *et al.* 2013). Therefore, as a model of the monomeric A β antigen we employed synthetic peptides spanning the N-terminal sequence of A β ₁₋₄₂: A β ₁₋₆ peptide and A β ₁₋₁₃ peptide (aa 1-6 and aa 1-13 of A β , respectively). Their monomeric state was confirmed by AFM experiments – A β ₁₋₆ and A β ₁₋₁₃ in phosphate buffer did not form any detectable aggregates (see Figure S3d and e). To evaluate the cytotoxicity of immune complexes formed by other monomeric antigens, we have used synthetic peptide MeN₄₄₀₋₄₅₂ representing the fragment of MeN protein recognized by the monoclonal antibody #10F7 (Zvirbliene *et al.* 2007). As shown in Fig. 4, complexes #11E12 antibody + A β ₁₋₆, #11E12 antibody + A β ₁₋₁₃ and anti-MeN + MeN₄₄₀₋₄₅₂ had no effect on neuronal viability, and neuronal densities were not affected (data not shown).

These results confirm that oligomeric/multimeric structure of antigen is an essential factor in neurotoxicity of antigen-antibody complexes.

Antibody plus antigen-induced neurotoxicity is microglia-dependent

To test whether #11E12 antibody plus A β ₁₋₄₂-induced neuronal death was dependent on the presence of microglia, we performed experiments on glial-neuronal cultures from which microglial cells were selectively eliminated by incubating them with LME. In these experiments, cell cultures were pre-incubated with 15 mM LME for 4 h. This resulted in destruction of microglial cells whereas neurons and astrocytes remained intact. Then the cultures were

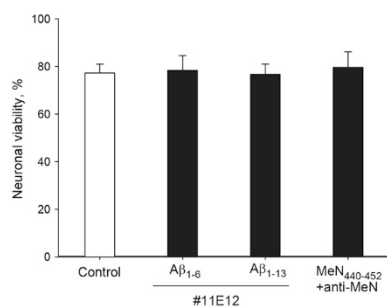


Fig. 4 Effect of immune complexes formed by antibody + monomeric peptide: #11E12 + A β ₁₋₆, #11E12 + A β ₁₋₁₃ and anti-MeN + MeN₄₄₀₋₄₅₂ on neuronal viability in CGC cultures. CGC cultures were treated with indicated complexes antibody + peptide fragment, all at concentration 2 μ g/mL for 24 h. Neuronal viability was measured as described in Fig. 1, $n = 6$.

exposed to #11E12 + A β ₁₋₄₂ oligomers for further 24 h. As shown in Fig. 5, there was no significant loss of neuronal viability over 24 h period in microglia-depleted cultures treated with #11E12 + A β ₁₋₄₂ compared with the control cultures. This suggests that the #11E12 antibody + A β ₁₋₄₂-induced neuronal death in neuronal-glia cultures was microglia-dependent.

Complexes of #11E12 antibody plus A β ₁₋₄₂ stimulate microglial proliferation in cultures

As shown in Fig. 6a, the complex of #11E12 + A β ₁₋₄₂ oligomers increased the number of microglia in neuronal-glia cultures from 9.8 cells/field in control to 13.6 cells/field after 24 h. A similar effect was observed when cell cultures were incubated with complexes of #11E12 + A β ₁₋₄₂ monomers or #11E12 + A β ₁₋₄₂ fibrils: the number of microglia was increased to 13.3 cells/field and 14.2 cells/field, respectively (Fig. 6a). The complex of F(ab')₂ #11E12 + A β ₁₋₄₂ oligomers had no effect on microglial proliferation (Fig. 6a), indicating a requirement for the Fc region of the antibody to induce microglial proliferation. A β ₁₋₄₂ oligomers, monomers or fibrils in the absence of #11E12 antibody did not change the number of microglia during 24 h (Fig. 6a).

Microglial proliferation (up to 13.6 cells/field) was also observed when neuronal-glia cultures were incubated with anti-MeN + MeN complexes but not with F(ab')₂ anti-MeN + MeN for 24 h (Fig. 6b). The other two antibodies, anti-VP1 + VP1 and anti-MTP-N + MTP, intact and F(ab')₂, had no statistically significant effect on microglial proliferation over 24 h (Fig. 6b). All antibodies tested alone or in complexes with short monomeric synthetic peptides (A β ₁₋₆, A β ₁₋₁₃ and MeN₄₄₀₋₄₅₂) did not change the number of microglia in cultures (data not shown).

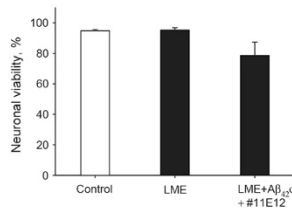


Fig. 5 The neurotoxicity of antibody #11E12 + A β ₁₋₄₂ oligomers complexes in neuronal-glia cultures is microglia dependent. CGCs were pre-incubated with 15 mM L-leucine-methyl-ester (LME) for 4 h and then medium was replaced with medium from sister cultures. The LME-pretreated CGC cultures were incubated with #11E12 (2 μ g/mL) + A β ₁₋₄₂ oligomers (1 μ M), for 24 h. Viability of neurons in culture was assessed as described in Fig. 1. A β ₄₂0, A β ₁₋₄₂ oligomers; $n = 3$.

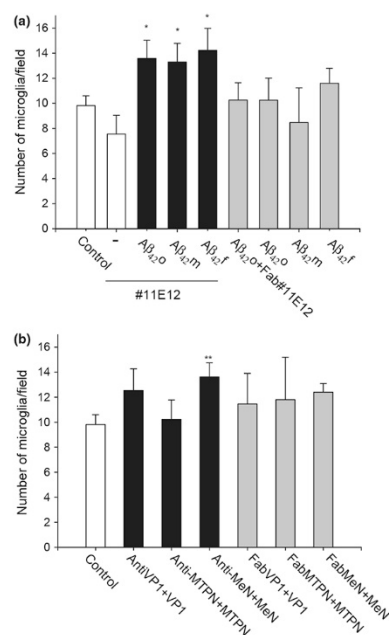


Fig. 6 Effect of antibody-antigen complexes on microglia proliferation in neuronal-glia cultures. (a) Effect of #11E12 + anti-Aβ₁₋₄₂; (b) effect of anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N, and anti-MeN + MeN; CGCs were treated with antibody-antigen complexes for 24 h at the same concentrations as indicated in Fig. 1. Microglial cells were identified by using Isolectin GS-IB4 conjugated with AlexaFluor488 (7 ng/mL). Cells were counted in five microscopic fields per each well (two wells per treatment). Aβ₄₂O, Aβ₁₋₄₂ oligomers; Aβ₄₂m, Aβ₁₋₄₂ monomers; Aβ₄₂f, Aβ₁₋₄₂ fibrils; Fab, F(ab)₂ of indicated antibody; MTPN, MTP-N; ***p* < 0.01, **p* < 0.05 compared with control, *n* = 4–8.

Complexes of antibodies with oligomeric/multimeric antigens cause release of TNF-α

As the complexes of #11E12 antibody + Aβ₁₋₄₂ can cause microglia-dependent neuronal death, loss of neurons and proliferation of microglia, and taking into account that the Fc region of #11E12 antibody is important to induce these effects, we tested whether the antibody-antigen complexes activated the microglia to release pro-inflammatory cytokines. First, we measured TNF-α levels in the cell culture media collected after 1, 2, 4, 8, and 24 h incubation with #11E12 + Aβ₁₋₄₂ oligomers. As shown in Fig. 7a, TNF-α

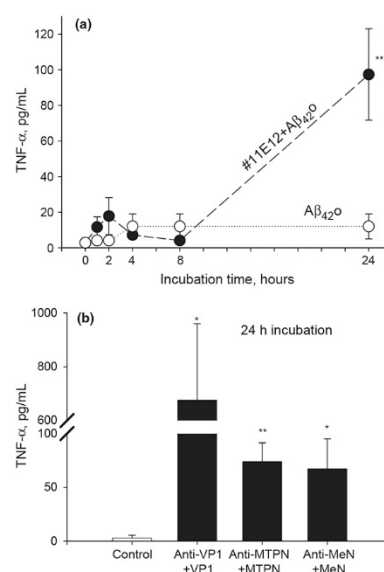


Fig. 7 Effect of antigen-antibody complexes on TNF-α release in CGC culture media. (a) Effect of Aβ₁₋₄₂ oligomers ± #11E12; (b) effect of anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N, and anti-MeN + MeN; CGCs were treated with indicated antibody-antigen complexes at the same concentration as described in Fig. 1. TNF-α level was measured in cell culture medium collected after 1, 2, 4, 8, and 24 h incubation with antibody #11E12 + Aβ₁₋₄₂ oligomers and after 24 h incubation with anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N, and anti-MeN + MeN. ***p* < 0.01, **p* < 0.05 compared with control, *n* = 3–7.

was undetectable in control as well as after 1 to 8 h incubation of cells with immune complexes, however, a significant increase in TNF-α in culture medium (up to 98 ± 26 pg/mL) was observed after 24 h incubation with #11E12 antibody + Aβ₁₋₄₂. In contrast, Aβ₁₋₄₂ oligomers alone (Fig. 7a) or #11E12 alone (data not shown) did not induce production of TNF-α during 24 h period.

A much higher TNF-α concentration, 676 ± 284 pg/mL, was detected in the medium of cells treated with anti-VP1 + VP1 complex for 24 h (Fig. 7b). The other two investigated immune complexes, anti-MTP-N + MTP-N and anti-MeN + MeN, moderately increased TNF-α level in culture medium, to 74 ± 18 and 67 ± 28 pg/mL, respectively, after 24 h (Fig. 7b). VP1, MTP-N or MeN or their antibodies alone did not induce production of TNF-α during 24 h (data not shown).

Importantly, anti-inflammatory agent minocycline at 500 μ M concentration completely blocked the #11E12 antibody + A β_{1-42} -induced TNF- α release and partially protected against immune complexes-induced neuronal death (see Figure S5).

Effects of monoclonal anti-A β_{1-42} of IgG1 subtype and rabbit polyclonal anti-A β_{1-42} complexes on CGC cultures. The next series of experiments were performed to investigate further the mechanism of the toxicity of antibody-antigen complexes on cultured neurons. We used a commercial mouse monoclonal antibody (anti-A β_{1-42} , clone #G2-13) that recognizes linear A β_{1-42} peptide at the carboxy (C) terminus (Ida *et al.* 1996). According to the manufacturer's information, this antibody is of IgG1 subtype and therefore might have different affinity to Fc receptors of rat macrophages as compared to the antibody #11E12 of IgG2b subtype (Nimmerjahn and Ravetch 2006). The second control antibody used in our experiments was rabbit polyclonal antibody specific to A β_{1-42} sequence but lacking specificity to rat Fc receptors. Similar to experiments described above, we treated CGC cultures with complexes anti-A β_{42} #G2-13 + A β_{1-42} oligomers or with rabbit polyclonal anti-A β_{1-42} + A β_{1-42} oligomers for 24 h and measured neuronal viability, number of neurons and microglia, and TNF- α level. As shown in Fig. 8, the anti-A β_{42} #G2-13 + A β_{1-42} oligomers decreased neuronal viability from 89% (control culture) to 61%. As expected, the immune complexes of rabbit polyclonal anti-A β_{1-42} + A β_{1-42} oligomers did not influence neuronal viability. None of the antibodies added separately had an effect on cell viability after 24 h (Fig. 8). The number of neurons and microglia cells, and medium TNF- α level did not change after incubation of cultures with complexes anti-A β_{42} #G2-13 + A β_{1-42} oligomers and rabbit polyclonal anti-A β_{1-42} + A β_{1-42} oligomers for 24 h (data not shown). These data suggest that neurotoxicity of immune complexes of antibodies with A β_{1-42} oligomers does not strongly depend on the isotype of immunoglobulin involved, but does depend on the specific interaction of the complexes with Fc receptors on the competent cells.

Discussion

In this study we show that antigen-antibody complexes formed by A β_{1-42} and specific monoclonal antibodies of IgG isotype can cause death and loss of neurons in primary neuronal-glial cultures by a mechanism that involves microglial activation by the Fc region of antibody-antigen complexes. This conclusion is supported by our findings that the neurotoxic effects of immune complexes were abolished by the removal of microglia from cultures or by removal of the Fc region of #11E12 monoclonal antibody, suggesting that activation of microglial Fc γ R was required for microglial inflammation and neuronal death. These effects were seen

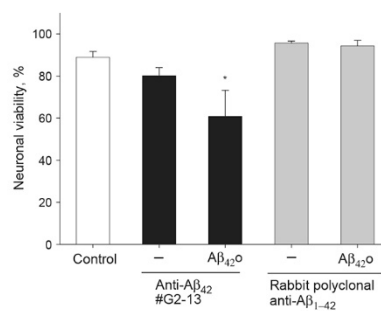


Fig. 8 Effects of anti-A β_{42} #G2-13 + A β_{1-42} oligomers and rabbit polyclonal anti-A β_{1-42} + A β_{1-42} oligomers on neuronal cell viability in CGC culture. CGCs were treated with anti-A β_{42} #G2-13 (2 μ g/mL) + A β_{1-42} oligomers (1 μ M) or with rabbit polyclonal anti-A β_{1-42} (2 μ g/mL) + A β_{1-42} oligomers (1 μ M) for 24 h. Neuronal viability was measured as described in Fig. 1. A $\beta_{42}o$, A β_{1-42} oligomers; * p < 0.05 compared with control, n = 3–6.

not only with the antibody raised against A β_{1-42} but also with other antibodies raised against recombinant oligomeric antigens – VLPs and NLPs – when they were bound to their target antigens. The neurotoxicity of the antibodies was lost when the same antibodies were applied in complexes with short peptides that do not form oligomeric structures. Therefore, our study demonstrates for the first time that the multimeric structure of antigen-antibody complexes is essential to causing neurotoxicity in mixed neuronal-glial cultures.

Understanding this mechanism may have important implications for developing new strategies for prevention and treatment of AD. The antibody-based immunotherapy to treat AD either via the immunization with A β or by the use of A β antibodies have shown controversial results in many pre-clinical and clinical studies, however, why the treatment complications such as meningoencephalitis (Nicoll *et al.* 2003; Orgogozo *et al.* 2003; Ferrer *et al.* 2004) does occur in some immunization cases is unclear. The immune response mechanism based on T-cell activation has been suggested which may initiate toxic events (Orgogozo *et al.* 2003). Passive immunization does not involve T-cell activation, however, significant microglia activation and Fc receptor dependent-phagocytosis was observed in AD patients (Nicoll *et al.* 2003; Ferrer *et al.* 2004) and in AD transgenic mice (Bard *et al.* 2000; Wilcock *et al.* 2004). Furthermore, auto-antibodies to A β were significantly elevated in AD patients and in serum of APP transgenic mice, which have been shown to enhance the neurotoxicity of A β (Nath *et al.* 2003).

Our data are in agreement with these findings and suggest that the neurotoxic effect may result from the interaction of oligomeric complexes of A β with antibodies causing Fc receptor mediated activation of microglia. The involvement of microglia in antibody-mediated removal of A β aggregates in primary cultures was recently documented for anti-A β antibodies (Mohajeri *et al.* 2006) and human intravenous immunoglobulin IVIG, which contained naturally occurring auto-antibodies, including antibodies against A β peptides (Magga *et al.* 2010). It was shown that peripheral administration of IVIG (Magga *et al.* 2010) or anti-A β antibodies (Koenigsknecht-Talboo and Landreth 2005) caused their penetration into mouse brain tissue and binding to A β deposits together with co-localization of microglia. This suggests that peripheral antibodies indeed may cross BBB and interact with the A β aggregates and may activate microglia cells. Recently, it has been shown that immune complexes formed in mice brain parenchyma induced a neuroinflammatory response and behavioral changes through recruitment and activation of microglia via Fc γ R (Teeling *et al.* 2012). Activated microglia, via production of reactive oxygen species and other inflammatory mediators, may be sufficient to induce neuronal death (Brown and Neher 2010) and neuronal loss (Neniskyte *et al.* 2011).

We have previously determined that the epitope of #11E12 antibody was localized at the N-terminus of A β ₁₋₄₂, between amino acid residues 1 and 6, and that #11E12 antibody reacted with the peptide representing the N terminal sequence (aa 1–13) (Dalgiediene *et al.* 2013). However, the complexes of #11E12 antibody plus A β ₁₋₆ or #11E12 antibody plus A β ₁₋₁₃ were not toxic to cultured neurons. This indicates that neurotoxicity of the antibody–antigen complex is dependent on the structure of antigen. Multimeric antigens may bind multiple antibodies, which may bring together multiple Fc γ R and thereby activate them to induce inflammation. Whereas monomeric antigens may bind single antibodies recruiting single Fc γ R resulting in minimal inflammation. Therefore, development of short A β immunogens that target monomeric A β may be a promising approach for AD treatment.

We also showed that the cytotoxic effects of antibody–antigen complexes disappeared when microglia cells were removed from the culture or when the Fc part of the antibody was cleaved off, indicating the involvement of microglia Fc γ R. These data are consistent with results obtained with deglycosylated anti-A β , which were shown to reduce microglia phagocytosis and cytokine production because of reduced affinity to Fc γ R in primary cultured microglia (Takata *et al.* 2007). In addition, deglycosylated anti-A β (Carty *et al.* 2006) or F(ab')₂ fragments (Tamura *et al.* 2005) were able to suppress the microhemorrhages in AD mice. In accordance, our data showed that minocycline, which is known to inhibit microglial activation in animal models of neurodegenerative diseases (Fan

et al. 2007), was neuroprotective against anti-A β + A β induced release of TNF- α and neuronal death.

Rodent microglia cells have four types of Fc γ R (Ravetch and Kinet 1991; Nimmerjahn *et al.* 2005). The IgG subclass specificities of mouse and rat phagocytic cells Fc γ R are likely to be more similar to each other (Song *et al.* 1990). Fc γ RII lack phagocytic activity (Takai *et al.* 1994), however, Fc γ RI, Fc γ RIII, and Fc γ RIV exhibit affinity to mouse IgG (Fossati-Jimack *et al.* 2000; Nimmerjahn *et al.* 2005). All three subtypes of IgG were able to reduce A β deposits in mouse microglia cultures (Bard *et al.* 2003). Moreover, the deleterious effects of anti-A β in AD mice also have been obtained with different IgG subtypes: microhemorrhage with IgG2a (Schroeter *et al.* 2008), encephalomyelitis with IgG1, IgG2a (Furlan *et al.* 2003), and IgG2b (Carty *et al.* 2006), microglia activation with IgG1 (Wilcock *et al.* 2004). We used primary rat and mouse cultures and found cytotoxic effects of different mouse IgG subtype complexes, IgG2b (anti-A β , clone #11E12, anti-MTP-N, clone #4A2 and anti-MeN, #10F7), IgG2a (anti-VP1, clone #6D11), and IgG1 (anti-A β ₁₂, clone #G2-13) indicating that neurotoxic effect was not animal species dependent as mouse antibody complexes were similarly toxic to rat as well as to mouse neurons. However, the capacity of Fc γ R to bind various IgG subtypes may be different, the high-affinity Fc γ RI is capable to bind preferentially IgG2a (Sears *et al.* 1990), the low-affinity Fc γ RIII binds IgG1, IgG2a, and IgG2b (Weinshank *et al.* 1988), and a recently identified high-affinity Fc γ RIV binds IgG2a and IgG2b (Nimmerjahn *et al.* 2005; Bruhns 2012). These divergent activities might have contribution to antibody-mediated cytotoxicity (Nimmerjahn and Ravetch 2006). Indeed, our study suggests that rat microglia Fc γ R can bind oligomeric antigen–antibody of different mouse IgG isotypes and initiate the sequence of toxic reactions at different level. In contrast, the complexes of polyclonal rabbit anti-A β ₁₂ were non-toxic to cultured neurons suggesting that rat microglia do not recognize rabbit antibodies possibly because of a low affinity for rat Fc γ R.

We used two different monoclonal A β ₁₋₄₂ antibodies, the clone #11E12, that targeted N-terminal epitope and clone #G2-13, that targeted the C-terminus, and both in complexes with A β ₁₋₄₂ oligomers induced death of neurons in cultures indicating that the epitope position does not play any role in oligomeric antigen–antibody complex-induced cytotoxicity. Our results are in agreement with those obtained in passive immunization studies where microhemorrhage appearance and microglia activation followed treatment with N-terminal A β antibodies (Racke *et al.* 2005) as well as after C-terminal A β antibodies (Carty *et al.* 2006).

We did not find any significant differences in induction of neuronal death when either A β ₁₋₄₂ oligomers, fibrils, and monomers bound to the specific monoclonal antibody #11E12 were used most likely because of rapid oligomerization/fibrilization of A β ₁₋₄₂ monomers in aqueous

solutions. However, our data revealed the difference in toxicity caused by complexes of #11E12 antibody with monomeric and oligomeric forms of A β ₁₋₄₀. The aggregation of A β ₁₋₄₀ monomers has been shown to be slow in aqueous media (hours to days) in contrast to rapid aggregation (minutes) of A β ₁₋₄₂ (Snyder *et al.* 1994), therefore, the A β ₁₋₄₀ monomeric preparation were likely to be in the monomeric state during experiments and therefore did not cause neurotoxicity when complexed with antibodies.

Our data also demonstrate that various oligomeric proteins when complexed with specific antibodies such as the antibodies raised against recombinant VLPs and NLPs can induce microglial Fc-receptor dependent death of cultured neurons. In contrast, complexes of short linear epitope MeN₄₄₀₋₄₅₂ bound to anti-MeN were non-toxic to neurons. This confirms the finding that antigen oligomeric conformation of immune complexes is crucial in causing cell death *in vitro*. Such mechanism may be involved in neuroinflammatory responses caused by various viral infections particularly in the cases of disruption of BBB leading to penetration of viral oligomeric proteins and virus-specific antibodies into brain. Human polyomaviruses include the JC virus that infects the brain causing progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) accompanied by brain inflammation and neuronal loss. Measles virus can also infect the brain causing acute encephalitis or more rarely subacute sclerosing panencephalitis, driven by brain inflammation and neuronal loss (Hayashi *et al.* 2002). If endogenous antibodies to oligomeric viral proteins enter the brain, they might cause neuroinflammation and neurotoxicity by the mechanism described here, and if so pathology might be limited by inhibiting microglial activation e.g. with minocycline.

The data presented here demonstrate that oligomeric/multimeric antigens complexed with their specific antibodies can exert cytotoxic effects on primary neurons by Fc-dependent microglia activation. Thus, if these antibodies cross the BBB and bind their oligomeric/multimeric antigens in the brain, they may induce microglia activation and neurotoxicity by this mechanism. Elucidation of the detailed mechanism of antibody-antigen complex-mediated neuroinflammation may help limit the neurotoxicity and potentially increase the effectiveness of immunotherapy for AD.

Acknowledgements

Authors thank Prof. Guy C. Brown for discussions and critical reading of the manuscript. This study was supported by the Research Council of Lithuania (grant LIG-04/2012 MALPAMA).

The authors declare no conflict of interest.

Authors' contributions: RM, AZ and VB designed the research and wrote the manuscript, ID, GV, PC, SJ, RJ, MJ and GB performed the research. All authors contributed to the final version of the manuscript.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Figure S1. Morphological characterization of CGC cultures.

Figure S2. NuPAGE electrophoresis and Western blot analysis of A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀ monomers.

Figure S3. AFM images of freshly cleaved mica exposed to solutions.

Figure S4. Effect of polymyxin B on the antibody #11E12 + A β ₁₋₄₂ oligomer-caused neurotoxicity in CGC.

Figure S5. Effect of minocycline on CGC affected by antibody #11E12 + A β ₁₋₄₂ oligomers.

References

- Bal-Price A. and Brown G. C. (2001) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J. Neurosci.* **21**, 6480–6491.
- Bard F., Cannon C., Barbour R. *et al.* (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* **6**, 916–919.
- Bard F., Barbour R., Cannon C. *et al.* (2003) Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 2023–2028.
- Brown G. C. and Neher J. J. (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol. Neurobiol.* **41**, 242–247.
- Bruhns P. (2012) Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* **119**, 5640–5649.
- Carty N. C., Wilcock D. M., Rosenthal A., Grimm J., Pons J., Ronan V., Gottschall P. E., Gordon M. N. and Morgan D. (2006) Intracranial administration of deglycosylated C-terminal-specific anti-A β antibody efficiently clears amyloid plaques without activating microglia in amyloid-depositing transgenic mice. *J. Neuroinflammation* **10**, 11.
- Cizas P., Budvytyte R., Morkuniene R., Moldovan R., Broccio M., Losche M., Niaura G., Valincius G. and Borutaite V. (2010) Size-dependent neurotoxicity of beta-amyloid oligomers. *Arch. Biochem. Biophys.* **496**, 84–92.
- Cooperstock M. S. (1974) Inactivation of endotoxin by polymyxin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**, 422–425.
- Dalgediene I., Lasickiene R., Budvytyte R., Valincius G., Morkuniene R., Borutaite V. and Zvirbliene A. (2013) Immunogenic properties of amyloid beta oligomers. *J. Biomed. Sci.* **20**, 10.
- DeMattos R. B., Bales K. R., Cummins D. J., Dodart J. C., Paul S. M. and Holtzman D. M. (2001) Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 8850–8855.
- Deshpande A., Mina E., Glabe C. and Busciglio J. (2006) Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J. Neurosci.* **26**, 6011–6018.
- Fan R., Xu F., Previti M. L., Davis J., Grande A. M., Robinson J. K. and Van Nostrand W. E. (2007) Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *J. Neurosci.* **27**, 3057–3063.
- Ferrer L., Boada R. M., Sanchez Guerra M. and L., Rey M. J. and Costa-Jussa F. (2004) Neuropathology and pathogenesis of encephalitis

- following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **14**, 11–20.
- Fossati-Jimack L., Ioan-Facsinay A., Reiningner L. et al. (2000) Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fc gamma receptor III. *J. Exp. Med.* **191**, 1293–1302.
- Furlan R., Brambilla E., Sanvito F., Roccatagliata L., Olivieri S., Bergami A., Pluchino S., Uccelli A., Comi G. and Martino G. (2003) Vaccination with amyloid-beta peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57/BL6 mice. *Brain* **126**, 285–291.
- Gedvilaitė A., Frommel C., Sasnauskas K., Micheel B., Ozel M., Behrsing O., Staniulis J., Jandrig B., Scherneck S. and Ulrich R. (2000) Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* **273**, 21–35.
- Hayashi M., Arai N., Satoh J., Suzuki H., Katayama K., Tamagawa K. and Morimatsu Y. (2002) Neurodegenerative mechanisms in subacute sclerosing panencephalitis. *J. Child Neurol.* **17**, 725–730.
- Hillen H., Barghorn S., Striebing A., Labkovsky B., Muller R., Nimmich V., Nolte M. W., Perez-Cruz C. and van d. A., I. van L. F., van G. M., Bespalov A. Y., Schoemaker H., Sullivan J. P. and Ebert U. (2010) Generation and therapeutic efficacy of highly oligomer-specific beta-amyloid antibodies. *J. Neurosci.* **30**, 10369–10379.
- Hock C., Konietzko U., Streffer J. R. et al. (2003) Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* **38**, 547–554.
- Ida N., Hartmann T., Pantel J., Schroder J., Zerfass R., Forstl H., Sandbrink R., Masters C. L. and Beyreuther K. (1996) Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J. Biol. Chem.* **271**, 22908–22914.
- Kayed R., Head E., Thompson J. L., McIntire T. M., Milton S. C., Cotman C. W. and Glabe C. G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486–489.
- Koenigsnecht-Talboo J. and Landreth G. E. (2005) Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J. Neurosci.* **25**, 8240–8249.
- Lambert M. P., Barlow A. K., Chromy B. A. et al. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6448–6453.
- Magga J., Puli L., Pihlaja R. et al. (2010) Human intravenous immunoglobulin provides protection against Abeta toxicity by multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **7**, 90.
- McLean C. A., Cherny R. A., Fraser F. W., Fuller S. J., Smith M. J., Beyreuther K., Bush A. I. and Masters C. L. (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **46**, 860–866.
- Minami S. S., Sidahmed E., Aid S. et al. (2010) Therapeutic versus neuroinflammatory effects of passive immunization is dependent on Abeta/amyloid burden in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **7**, 57.
- Mohajeri M. H., Gaugler M. N., Martinez J., Tracy J., Li H., Cramer A., Kuehnle K., Wollmer M. A. and Nitsch R. M. (2006) Assessment of the bioactivity of antibodies against beta-amyloid peptide in vitro and in vivo. *Neurodegener. Dis.* **1**, 160–167.
- Morgan D., Diamond D. M., Gottschall P. E. et al. (2001) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**, 982–985.
- Nath A., Hall E., Tuzova M. et al. (2003) Autoantibodies to amyloid beta-peptide (Abeta) are increased in Alzheimer's disease patients and Abeta antibodies can enhance Abeta neurotoxicity: implications for disease pathogenesis and vaccine development. *Neuromolecular Med.* **3**, 29–39.
- Neniskyte U., Neher J. J. and Brown G. C. (2011) Neuronal death induced by nanomolar amyloid beta is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J. Biol. Chem.* **286**, 39904–39913.
- Nicoll J. A., Wilkinson D., Holmes C., Steart P., Markham H. and Weller R. O. (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat. Med.* **9**, 448–452.
- Nimmerjahn F. and Ravetch J. V. (2006) Fc gamma receptors: old friends and new family members. *Immunity* **2**, 19–28.
- Nimmerjahn F., Bruhns P., Horiuchi K. and Ravetch J. V. (2005) Fc gamma RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* **23**, 41–51.
- Orgogozo J. M., Gilman S., Dartigues J. F. et al. (2003) Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* **61**, 46–54.
- Petraityte-Burneikiene R., Nalivaiko K., Lasickiene R., Firantiene R., Emuzyte R., Sasnauskas K. and Zvirbliene A. (2011) Generation of recombinant metapneumovirus nucleocapsid protein as nucleocapsid-like particles and development of virus-specific monoclonal antibodies. *Virus Res.* **161**, 131–139.
- Racke M. M., Boone L. I., Hephurn D. L. et al. (2005) Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta. *J. Neurosci.* **25**, 629–636.
- Ravetch J. V. and Kinet J. P. (1991) Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 457–492.
- Rietschel E. T., Kirika T., Schade F. U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A. J., Zahring U., Seydel U. and Di P. F. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**, 217–225.
- Schenk D., Barbour R., Dunn W. et al. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173–177.
- Schroeter S., Khan K., Barbour R. et al. (2008) Immunotherapy reduces vascular amyloid-beta in PDAPP mice. *J. Neurosci.* **28**, 6787–6793.
- Sears D. W., Osman N., Tate B., McKenzie I. F. and Hogarth P. M. (1990) Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fc receptor for IgG. *J. Immunol.* **144**, 371–378.
- Snyder S. W., Lador U. S., Wade W. S., Wang G. T., Barrett L. W., Matayoshi E. D., Huffaker H. J., Kraft G. A. and Holzman T. F. (1994) Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys. J.* **67**, 1216–1228.
- Solomon B., Koppel R., Hanan E. and Katav T. (1996) Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 452–455.
- Song E. S., Young K. and Sears D. W. (1990) Rat and human natural killers exhibit contrasting immunoglobulin G subclass specificities in antibody-dependent cellular cytotoxicity reflecting differences in their Fc receptors (Fc gamma R). *J. Leukoc. Biol.* **48**, 524–530.
- Takai T., Li M., Sylvestre D., Clynes R. and Ravetch J. V. (1994) FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* **3**, 519–529.
- Takata K., Hirata-Fukae C., Becker A. G. et al. (2007) Deglycosylated anti-amyloid beta antibodies reduce microglial phagocytosis and cytokine production while retaining the capacity to induce amyloid beta sequestration. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 2458–2468.

- Tamura Y., Hamajima K., Matsui K., Yanoma S., Narita M., Tajima N., Xin K. Q., Klinman D. and Okuda K. (2005) The F(ab)'2 fragment of an A β -specific monoclonal antibody reduces A β deposits in the brain. *Neurobiol. Dis.* **20**, 541–549.
- Teeling J. L., Carare R. O., Glennie M. J. and Perry V. H. (2012) Intracerebral immune complex formation induces inflammation in the brain that depends on Fc receptor interaction. *Acta Neuropathol.* **124**, 479–490.
- Weinshank R. L., Luster A. D. and Ravetch J. V. (1988) Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, Fc gamma R-alpha. *J. Exp. Med.* **167**, 1909–1925.
- Wilcock D. M., Rojiani A., Rosenthal A. *et al.* (2004) Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J. Neurosci.* **24**, 6144–6151.
- Zvirbliene A., Samonskyte L., Gedvilaite A., Voronkova T., Ulrich R. and Sasnauskas K. (2006) Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. *J. Immunol. Methods* **311**, 57–70.
- Zvirbliene A., Kucinskaite I., Sezaite I., Samuel D. and Sasnauskas K. (2007) Mapping of B cell epitopes in measles virus nucleocapsid protein. *Arch. Virol.* **152**, 25–39.

Small A β_{1-42} Oligomer-Induced Membrane Depolarization of Neuronal and Microglial Cells: Role of N-Methyl-D-Aspartate Receptors

Ramune Morkuniene,* Paulius Cizas, Silvija Jankeviciute, Robertas Petrolis, Odeta Arandarcikaite, Algimantas Krisciukaitis, and Vilmante Borutaite

Institute of Neurosciences, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

Although it is well documented that soluble beta amyloid (A β) oligomers are critical factors in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) by causing synaptic dysfunction and neuronal death, the primary mechanisms by which A β oligomers trigger neurodegeneration are not entirely understood. We sought to investigate whether toxic small A β_{1-42} oligomers induce changes in plasma membrane potential of cultured neurons and glial cells in rat cerebellar granule cell cultures leading to neuronal death and whether these effects are sensitive to the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R) antagonist MK801. We found that small A β_{1-42} oligomers induced rapid, protracted membrane depolarization of both neurons and microglia, whereas there was no change in membrane potential of astrocytes. MK801 did not modulate A β -induced neuronal depolarization. In contrast, A β_{1-42} oligomer-induced decrease in plasma membrane potential of microglia was prevented by MK801. Small A β_{1-42} oligomers significantly elevated extracellular glutamate and caused neuronal necrosis, and both were prevented by MK801. Also, small A β_{1-42} oligomers decreased resistance of isolated brain mitochondria to calcium-induced opening of mitochondrial permeability transition pore. In conclusion, the results suggest that the primary effect of toxic small A β oligomers on neurons is rapid, NMDA-R-independent plasma membrane depolarization, which leads to neuronal death. A β oligomers-induced depolarization of microglial cells is NMDA-R dependent. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: A β oligomers; membrane potential; cell death; NMDA receptors; mitochondria

Beta amyloid (A β) is a peptide generated from large transmembrane amyloid precursor protein after multiple proteolytic cleavages (Glennner and Wong, 1984). Imbalance between A β production and clearance leads to accumulation and aggregation of A β , which was considered to be a crucial event in pathogenesis of Alzheimer's disease (AD; Selkoe, 1991; Hardy and Higgins, 1992). Recent evidence suggests that small soluble A β oligomers are the most neurotoxic species (Lambert et al., 1998; Walsh

et al., 2002) and that toxicity of A β strongly depends on the size of A β oligomeric particles, such that the most toxic species that induce rapid neuronal dysfunction and death were found to be dimers–hexamers (Ono et al., 2009; Cizas et al., 2010). Various mechanisms have been proposed to be involved in A β oligomer-induced neuronal death, including destabilization of cellular Ca²⁺ homeostasis (Demuro et al., 2005) and activation of signalling protein kinases such as GSK-3 β (Koh et al., 2008), c-Jun (Ma et al., 2009), CAMKK2-AMPK (Mairret-Coello et al., 2013). However, the primary targets of A β oligomers and the sequence of toxic events have not yet been determined definitively. The fact that A β originates from a transmembrane protein points to a possible interaction of A β with cellular membranes. The interaction of A β with artificial phospholipid membranes has been previously investigated. We and other have reported that highly neurotoxic small A β_{1-42} oligomers but not larger aggregates or monomers were able to bind to phospholipid vesicles whose composition mimics those of neuronal membranes (Hung et al., 2008; Cizas et al., 2010). It has also been demonstrated that heterogeneous preparations of A β oligomers may permeabilize such membranes by 1) formation of A β pores or channels in lipid bilayers (Arispe et al., 1993; Lin et al., 2001; Demuro et al., 2011) or 2) by inducing phospholipid membrane bilayer thinning and increased permeation without formation of channels or pores (Kayed et al., 2004; Sokolov et al., 2006; Valincius et al., 2008). It has

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Contract grant sponsor: Research Council of Lithuania; Contract grant number: LIG-04/2012, MALPAMA

*Correspondence to: Ramune Morkuniene, Institute of Neurosciences, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu 4, LT-50009 Kaunas, Lithuania. E-mail: ramune.morkuniene@lsmuni.lt

Received 14 March 2014; Revised 1 October 2014; Accepted 2 October 2014

Published online 00 Month 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23510

© 2014 Wiley Periodicals, Inc.

been also suggested that oligomeric forms of A β may permeabilize cellular membranes by direct activation of various membrane receptors such as $\alpha 7$ nAChR (Chen et al., 2006), mGluR5 (Renner et al., 2010), AMPA and NMDA (Shankar et al., 2008; Alberdi et al., 2010; Ferreira et al., 2012), leading to Ca²⁺ influx into cells. The disruption of membrane integrity may lead to plasma membrane depolarization, which may be deleterious for neuronal functions. It has been previously reported that high micromolar (20 μ M) concentration of A β _{1–42} oligomers induced membrane depolarization in neuronal hNT and PC12 cell lines (Blanchard et al., 2002) and in cultured astrocytes (Harkany et al., 2000). However, these types of cells do not form synapses and do not exhibit excitability. It has also been demonstrated that A β _{25–35} species caused a dose-dependent decrease of resting plasma membrane potential of excitable skeletal muscle cells (Mukhamedyarov et al., 2009), although these cells are not neuronal and in that study relatively less information was available regarding the size and aggregation state of A β species. Therefore, despite intensive investigations, the effects of toxic small A β oligomers on the membrane potential of primary neurons, which are electrically excitable cells, remains poorly understood. There is also limited knowledge regarding the effects A β oligomers on membrane potential of microglial cells that can actually promote neuronal cell death (Maczawa et al., 2011) or phagocytosis of viable neurons (Neniskyte et al., 2011).

In this study we sought to investigate the effects of highly neurotoxic small A β _{1–42} oligomers at low micromolar concentration (1 μ M) on membrane potential of neurons and glia cells in primary mixed neuronal/glial cerebellar granule cell cultures and pure neuronal and microglia cultures and whether these effects are related to participation of NMDA receptors (NMDA-R), which are known to contribute to membrane conductance as well as to excitotoxicity and neuronal degeneration in AD. We found that A β _{1–42} oligomers induced early and long-lasting membrane depolarization of neurons and microglial, however, only microglial depolarization was prevented by the NMDA-R blocker MK801. A β _{1–42} oligomers also caused elevation of extracellular glutamate and neuronal death, and both were prevented by MK801. Our data suggest that A β _{1–42} oligomers induce rapid, NMDA-R-independent depolarization of neurons. In contrast, microglial NMDA-R might be rapidly activated by small A β _{1–42} oligomers leading to microglial depolarization, although the detailed mechanism and consequences remain to be established.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Synthetic A β _{1–42} was from American Peptide, isolectin GS-IB4 conjugated with Alexa Fluor488 from Invitrogen (Carlsbad, CA), glucose from Roth, penicillin-streptomycin from Biochrom (Berlin, Germany), Versene from Gibco (Petersborough, United Kingdom), Amplex red glutamic acid/glutamate oxidase assay kit from Invitrogen U.K., and calcium

green-5N from Molecular Probes/Invitrogen (Eugene, OR). All other materials were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Preparation of Small A β _{1–42} Oligomers

Small A β _{1–42} oligomers of 1–3 nm z-height as measured by atomic force microscopy (AFM) were generated as described by Cizas et al. (2010). Briefly, oligomers were prepared by dissolving 1 mg peptide in 400 μ l 1.1.1.3.3.3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) for 30–60 min at room temperature (RT). One hundred microliters of the resulting seedless solution was added to 900 μ l H₂O in a siliconized Eppendorf tube. After 10–20 min of incubation at RT, the samples were centrifuged for 15 min at 12,000 rpm, the supernatant was transferred to a new siliconized tube, and HFIP was evaporated keeping open vial for several hours. Then samples were incubated for 16 hr at 20°C. Vehicle was prepared in the same way as oligomeric forms but without A β _{1–42}. The average size of A β _{1–42} oligomers ranged between 1 and 3 nm z-height as measured by AFM (Cizas et al., 2010).

Primary Neuronal–Glial, Pure Neuronal, and Pure Microglial Culture Preparation

Primary neuronal–glial cultures from rat cerebellum (referred to as CGC cultures below) were prepared from 7–8-day-old Wistar rats as described by Bal-Price and Brown (2001). The procedures used in this study were approved by The State Food and Veterinary Service of the Republic of Lithuania in accordance with the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other purposes. The rats were bred and maintained at the Lithuanian University of Health Sciences animal house under controlled conditions.

Cells were grown for 7 days in vitro (DIV) before exposure to A β . The neuronal–glial culture contained 79.7 % neurons and 7.1 % astrocytes as assessed by cellular morphology and 13.2 % microglia as assessed by staining with isolectin GS-IB4 conjugated with Alexa Fluor488. Pure neuronal CGC cultures were prepared from 7–8-day-old Wistar rats as described above, and 10 μ M cytosine arabinoside was added within 48 hr of plating to prevent glial cell proliferation. Cells were grown for 7 DIV before exposure to A β . The cultures contained 0.7 % microglial cells, as assessed by staining with isolectin GS-IB4, and 2.2 % astrocytes, as assessed by cellular morphology. Cortical neurons were prepared from 1-day-old Wistar rats as described in Supporting Information Figure 1.

Primary pure microglial cultures from rat cerebral cortices were prepared from 7–8-day-old Wistar rats as described by Jekabsone et al. (2006), with some modifications. Briefly, rats of both genders were euthanized with CO₂ and decapitated. Then the brain was removed and placed in a Petri dish containing 4°C phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 13 mM glucose and 1% penicillin-streptomycin. The tissue was dissociated in a Versene solution (1:5,000) and centrifuged at 270g for 5 min (Eppendorf 5810R). Cells were plated in 25-cm² flasks coated with 0.0005 % poly-L-lysine. Cultured cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin in a humidified 37°C incubator

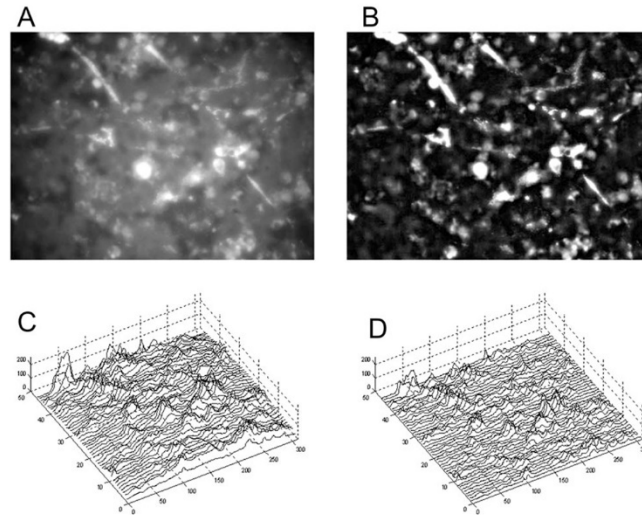


Fig. 1. Processing of the images of the cells. Pixel values of the raw image (C) and of the image after preprocessing (D). Profile of unevenness of background illumination clearly noticeable in the left graph is removed on the right (every sixteenth line and every fourth pixel in it shown for clarity). **A:** Raw image. **B:** Image with subtracted general profile. **C:** Convex surface with peaks representing fluorescent cells. **D:** Corrected image with peaks.

with 5% CO₂. Four days after initial seeding, one-half of the medium was replaced with fresh, warm culture medium. After 10–14 DIV of initial seeding, microglia were removed by bashing flask, centrifuged, and plated into the 24-well tissue culture plates at 15×10^4 cells/cm² for 24 hours after plating; these cultures were used for experiments. The purity of the cultures was 95%.

Fluorescence-Based Plasma Membrane Potential Measurements

Membrane potential of cells was monitored with the fluorescent dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxanol (DiBAC4(3)), an anionic lipophilic molecule that is distributed between the extracellular space and the cell cytosol according to the electrical plasma membrane potential difference. The DiBAC4(3) enters the cell upon depolarization and binds to intracellular components, leading to an increase in the fluorescence intensity. The fluorescence measurement was carried out according to a method previously reported (Jekabsone et al., 2007), with a minor modification. CGC, cortical neuronal, or pure microglial cultures were pretreated with small A β_{1-42} oligomers (1 μ M) $\pm$ MK801 (10 μ M) or $\pm$ NBQX (10 μ M) for 30 min, 1, 2, or 4 hr. After incubation, DMEM was removed from cultures, fresh medium with 3 μ M DiBAC4(3) was added, and cells were incubated for 10 min. The ability of the dye to

respond to plasma membrane potential changes was tested by acute additions of 60 mM KCl to untreated cultures to depolarize cells rapidly. Plates with cells were kept in the incubator, and measurements of fluorescence were made at indicated times after which cells were returned back to the incubator as quickly as possible. Pictures of at least three randomly selected fields per well were taken with a fluorescence microscope (Olympus IX71S1F-3) with 450–490-nm bandpass filters for excitation and 515–565-nm bandpass for observation of emission, by means of a digital camera (Olympus SP-510UZ).

Transportation and remounting of the container caused significant differences in levels of absolute illumination in the image, due to which estimates of the intensity of fluorescence in absolute values were incomparable between each other. Unevenness of background illumination was the second issue causing significant distortions in estimation of fluorescence of the cells. It was eliminated by subtraction of its profile from the initial array of the pixel values of the picture. A profile of the image illumination was obtained by means of spatial filtering of the image by means of “opening,” a mathematical morphology procedure (Boonagard and Balen, 1992), using a circle structural element larger than any of the cells. The sample result of the method is shown in Figure 1. Pixel values of the raw image (Fig. 1A) form a convex surface with numerous small peaks representing fluorescent cells (Fig. 1C). Space filtering determines the general profile of this surface, which is subtracted

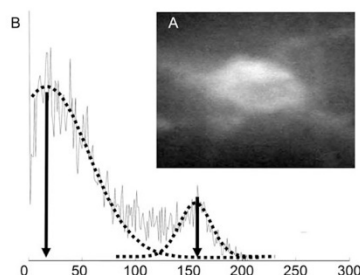


Fig. 2. Example of evaluation of fluorescence of the cell by best fit of the histogram of pixel values with Gaussian functions. Higher peak on the left represents background illumination (areas with no cells), and fluorescent cell is represented by smaller peak on the right. Mean values (arrows) of Gaussian functions (dotted lines) are the estimates of background illumination and fluorescence intensity, respectively. **B:** Peaks representing areas with different fluorescence. **A:** Image of fluorescent cell.

from it. The result of the procedure is an array of pixel values forming a flat surface with small peaks representing fluorescence of cells in standardized values (Fig. 1D). An image corrected in this way is shown in Figure 1B.

Image histograms of pixel values usually consisted of several peaks, the largest most left of which usually represented pixel values of dark areas containing no cells (see example in Fig. 2A). Standardization of absolute pixel values among all the pictures was performed by alignment of their histograms according to this peak. Adjustment of the whole pixel values range was made by comparing distance between peaks of histograms representing dark areas containing no cells and peaks representing maximally fluorescent (totally depolarized) cells by acute addition of KCl (highest peak on the histogram).

Pixels of ordinary fluorescent cells should form a peak on the histogram. Fluorescence of the whole area covered by one cell could be unevenly fluorescent because of the complex morphology of the cell itself. The peak representing such a cell will have a complex shape. However, in THE histogram of the image with many cells, the peaks overlap with each other, usually resulting in one peak, which was best fitted with A Gaussian function. The mean of such functions represented average intensity of fluorescence and was considered as a fluorescence measure, a parameter reflecting transmembrane potential. An illustration of the method is given in Figure 2B.

Measurement of Glutamate Content in Cell Culture Medium

Extracellular glutamate was measured with the commercially available Amplex red glutamic acid/glutamate oxidase assay kit (Invitrogen U.K.) according to manufacturer's protocol. CGC or pure microglial cultures were pretreated with A β_{1-42} oligomers for the indicated times. After incubation, 50- μ l aliquots of culture medium were taken and mixed with working solution of 100 μ M Amplex red reagent containing

0.25 U/ml horseradish peroxidase, 0.08 U/ml L-glutamate oxidase, 0.5 U/ml L-glutamate-pyruvate transaminase, and 200 μ M L-alanine and were incubated for 30 min at 37°C, protected from light. The fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader (Fluoroskan Ascent; Thermo Scientific) using excitation in the range of 530–560 nm and emission at 590 nm. Glutamate concentrations of the test samples were calculated with an L-glutamic acid standard curve.

Cell Viability Assay

The viability of neurons in CGCs was assessed by propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 staining in a fluorescence microscope (Olympus IX71S1F-3) as described by Cizas et al. (2010). CGC cultures were treated with 1 μ M of small A β_{1-42} oligomers (1–3 nm) in the presence/absence of 10 μ M MK801 for 24 hr. Cells were counted in at least five microscopic fields per well (two wells per treatment). Data are expressed as percentage of specific neuronal cells of the total number of neuronal cells per field.

Measurement of Tumor Necrosis Factor- α

After the indicated time for treatment with A β_{1-42} $\pm$ MK801, the aliquots of pure microglial culture media were collected. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) content in culture medium was determined with a TNF- α (rat) ELISA kit, assaying the samples according to the manufacturer's protocol.

Isolation of Rat Brain Mitochondria

Rat brain mitochondria were isolated from the total brain of adult Wistar rats by a differential centrifugation method. After removal, brains were placed in isolation media, which contained 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM HEPES buffer, 1 mM EGTA (pH 7.4), and homogenized with a glass-Teflon homogenizer. After two centrifugation procedures (5 min $\times$ 2,000g, 9 min $\times$ 12,000g), the pellet of mitochondria was suspended in isolation medium, and total mitochondrial protein was determined by the modified Biuret method (Gornal et al., 1949).

Measurement of Mitochondrial Calcium Retention Capacity

Mitochondrial calcium retention capacity (CRC) of brain mitochondria was determined fluorimetrically with calcium green-5N (excitation at 506 nm, emission at 535 nm) in medium (200 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM KH₂PO₄, 10 μ M EGTA, 0.3 mM pyruvate plus 0.3 mM malate, pH 7.4) by measuring the point at which pulse-loaded calcium was released from mitochondria. Calibration of the signal was achieved by the addition of known amounts of CaCl₂. Experiments were started by the addition of 0.05 mg/ml of mitochondria, and then pulses of 125 nM CaCl₂ were applied that caused the increase of extramitochondrial fluorescence. As mitochondria take up calcium, the fluorescence signal decreases. Calcium ions were continually loaded into mitochondria (by about 2-min intervals) until a large increase of extramitochondrial calcium fluorescence was observed, which indicated the release of stored calcium from opening of the mitochondrial permeability

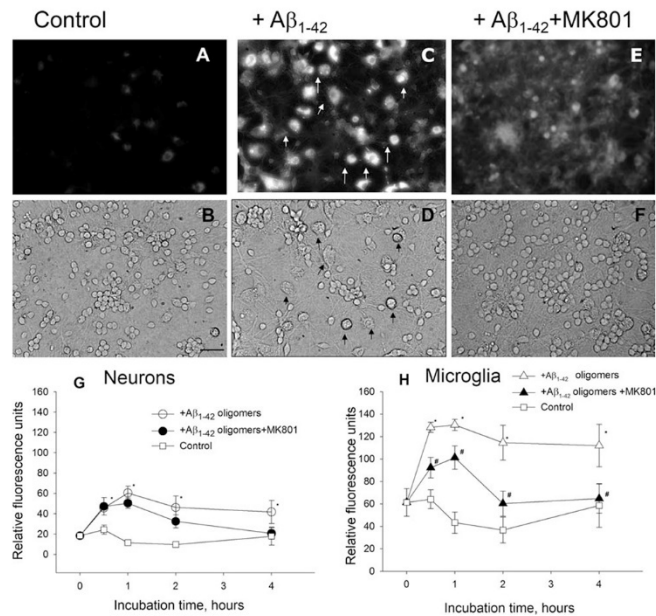


Fig. 3. Small A β_{1-42} oligomers induce depolarization of neurons and microglia in CGC cultures. DiBAC4(3) fluorescence images of normal (A), A β_{1-42} -oligomer-treated (C), and A β_{1-42} -oligomer + MK801-treated cells (E); brightfield images of the same fields of normal (B), A β_{1-42} -oligomer-treated (D), and A β_{1-42} -oligomer + MK801-treated cells (F). G: Relative fluorescence intensity of neurons in CGCs. H: Relative fluorescence intensity of microglia in CGCs. CGCs were treated with 1 μ M A β_{1-42} oligomers or with vehicle for 0.5, 1, 2, or 4 hr with or without 10 μ M MK801 and then loaded with

DiBAC4(3). Pictures were taken with a fluorescence microscope (Olympus IX71SIF-3). The arrows represent a few microglial cells in CGCs. Advanced methods of image processing, including mathematical morphology and structural analysis, were applied to obtain the quantitative estimates of fluorescence of cell membranes (see Materials and Methods). * $P < 0.05$ compared with control; # $P < 0.05$ compared with A β -treated cells. Means $\pm$ SE of five to eight experiments on separate CGC cultures are presented. Scale bar = 100 μ m.

transition pore (mPTP). In experiments with A β_{1-42} , mitochondria were preincubated for 2 min with 0.5–2 μ M A β_{1-42} oligomers. In some experiments, 0.2 μ M cyclosporine A (CsA) was used.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SE of four to eight experiments on separate CGC cultures. Statistical comparison between experimental groups was performed by a one-way ANOVA followed by a Tukey's or LSD post hoc test using SPSS 20.0 software. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Small A β_{1-42} Oligomers Induce Rapid Depolarization of Neurons and Microglia

We investigated whether small neurotoxic A β_{1-42} oligomers cause plasma membrane depolarization of cells

in primary neuronal–glial (CGC cultures) and pure microglial cultures. CGC cultures were exposed to 1 μ M A β_{1-42} for 0.5, 1, 2, and 4 hr, and membrane potential was monitored by using the fluorescent dye DiBAC4(3) (Jekabsone et al., 2007). As can be seen in Figure 3A, the control, untreated CGCs did not exhibit any significant fluorescence, indicating that cells under these conditions are hyperpolarized. Figure 3B is a brightfield image of the same field of control cells. However, fluorescence was highly increased when cells were treated with A β_{1-42} oligomers for 60 min (Fig. 1C), indicating plasma membrane depolarization of neurons and microglia (a few microglial cells are indicated by arrows in Fig. 3C,D). MK801, a high-affinity NMDA channel blocker (10 μ M), did not significantly alter A β_{1-42} oligomer-induced neuronal membrane depolarization during 60 min of incubation (Fig. 3E; Fig. 3F is a brightfield image of the same field of the A β_{1-42} + MK801 group), suggesting

that NMDA-R were not involved in early neuronal depolarization by $A\beta_{1-42}$ oligomers. Figure 3G summarizes the data on neuronal relative fluorescence levels (representing depolarization of the plasma membranes) measured after exposure of CGCs to $A\beta_{1-42}$ oligomers $\pm$ MK801 for 0–4 hr. A time-dependent increase of fluorescence in neurons was observed during 30–60 min incubation of CGCs with $A\beta_{1-42}$: from 18.4 units in control to 45 units after 30 min and to 60 units after 60 min of incubation (Fig. 3G). Neuronal fluorescence remained at about the same level for another 2–4 hours in the presence of $A\beta_{1-42}$ oligomers (Fig. 3G). This indicates that, under exposure to toxic $A\beta$ oligomers, neuronal plasma membrane depolarization occurred rapidly within approximately 1 hr and stayed at that level for at least 4 hr of incubation. MK801 did not modulate $A\beta$ -induced neuronal depolarization during 30 min to 2 hr (Fig. 3G). We additionally tested various concentrations of MK801 (1, 50, and 100 μ M) on $A\beta_{1-42}$ -induced neuronal membrane depolarization in CGCs during 1 hr of treatment. However, MK801 at any concentration tested did not protect neurons against depolarization caused by small $A\beta_{1-42}$ oligomers (fluorescence levels stayed at 40–60 fluorescence units; data not shown). The preparation of small $A\beta_{1-42}$ oligomers involves the solvent HFIP, which in further steps is evaporated; however, because even trace amounts of HFIP in $A\beta_{1-42}$ solutions (if not fully evaporated during preparation of oligomers) might affect the properties of biological membranes (Capone et al., 2009; Lioudyno et al., 2012), we performed additional control experiments in which CGCs were treated with solutions prepared in exactly the same way as $A\beta_{1-42}$ oligomers but in the absence of peptides. As shown in Figure 3G, the vehicle (control group) had no effect on relative fluorescence of neurons during 0.5–4 hr of incubation.

Small $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced depolarization of microglial plasma membrane in CGC cultures was greater and faster than neuronal depolarization: by 30 min from the start of incubation with $A\beta_{1-42}$ oligomers, the relative fluorescence of microglial cells had increased from 61 units to 128 units and remained at a similar level for 4 hr (Fig. 3H). In contrast to the case for neuronal cells, NMDA-R antagonist MK801 significantly reduced microglial fluorescence during 30–60 min of incubation with $A\beta_{1-42}$ oligomers (the relative fluorescence was 92 and 101 units, respectively, in microglia + $A\beta_{1-42}$ + MK801 group) and completely prevented the $A\beta_{1-42}$ -induced depolarization of microglia after 2 and 4 hr of treatment (Fig. 3H). A representative image of fluorescence of microglial cells in CGC affected by $A\beta_{1-42}$ + MK801 is shown in Figure 3E. The vehicle had no effect on microglial membrane potential (Fig. 3H, control group). $A\beta_{1-42}$ oligomers had no significant effect on astrocyte membrane potential during 0.5–4 hr of incubation (data not shown).

To determine whether the $A\beta$ -induced depolarization is CGC neuron specific, we performed experiments evaluating the action of $A\beta_{1-42}$ oligomers $\pm$ MK801 on

membrane potential of cultured primary cortical neurons during 0–4 hr of incubation. Similarly to CGCs, 1 μ M $A\beta_{1-42}$ oligomers were able to increase fluorescence of cortical neurons from 27 ± 1.7 units in control to 41 ± 0.7 , 36 ± 4.8 , 44 ± 0.8 , and 48 ± 3.5 units after 0.5, 1, 2, and 4 hr of incubation, respectively. MK801 had no statistically significant effect on $A\beta_{1-42}$ -induced neuronal membrane depolarization during 0.5–4 hr (see Supp. Info. Fig. 1). These data indicate that $A\beta_{1-42}$ oligomers may depolarize neurons isolated from different parts of brain and that NMDA-R did not participate in the neuronal depolarization caused by $A\beta_{1-42}$.

$A\beta_{1-42}$ -induced neuronal membrane depolarization in mixed CGC cultures, where neurons are surrounded by glial cells, may be indirect and related to the factors released by microglia and/or astrocytes (Jung et al., 2012; Talantova et al., 2013). Therefore, we tested the effects of $A\beta_{1-42}$ oligomers on pure CGC cultures, in which the number of glial cells was decreased to 2.9%. We found that the effect of $A\beta_{1-42}$ oligomers on neuronal membrane potential in pure CGCs in principal was similar to that observed in mixed CGC cultures: the level of fluorescence had risen from 18 ± 1.2 units in control to 29 ± 1.7 units after 1 hr and remained at the same level during 2–4 hr, whereas MK801 had no effect on $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced neuronal membrane depolarization (see Supp. Info. Fig. 2). These data indicate that $A\beta_{1-42}$ oligomers can directly affect neuronal membrane potential and that the NMDA-R was not involved.

Alternatively, we studied $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced microglial membrane potential fluorescence in pure primary microglial culture and obtained similar results: the exposure to small $A\beta_{1-42}$ oligomers only slightly increased the fluorescence during 1 and 2 hr of treatment (from 66 units in control to 80 and 68 units, respectively; Fig. 4A), however, 4 hr of incubation forced membrane potential fluorescence to 159 units, indicating depolarization of microglia membrane with $A\beta_{1-42}$ (Fig. 4A,D). MK801 eliminated $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced membrane depolarization after 4 hr in pure microglial culture (Fig. 4A,E). MK801 by itself did not change dye fluorescence during 0–4 hr of incubation (Fig. 4A,C).

Depolarization of neuronal and microglial membranes was not sensitive to the AMPA/kainate receptor antagonist NBQX (10 μ M) in CGCs treated with $A\beta_{1-42}$ oligomers for 0–4 hr (Fig. 5), suggesting that AMPA/kainate receptors are not involved in $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced depolarization of neurons and microglia. NBQX by itself had no effect on dye fluorescence during 0–4 hr of incubation (data not shown).

$A\beta$ Oligomers Induce Release of Glutamate From Neurons

Plasma membrane depolarization may lead to the release of glutamate (Zheng et al., 2000; Vale et al., 2006; Godfrey et al., 2012) and neuronal death (Babot et al., 2005). Therefore, we measured the level of glutamate in CGC culture medium after treatment with $A\beta_{1-42}$

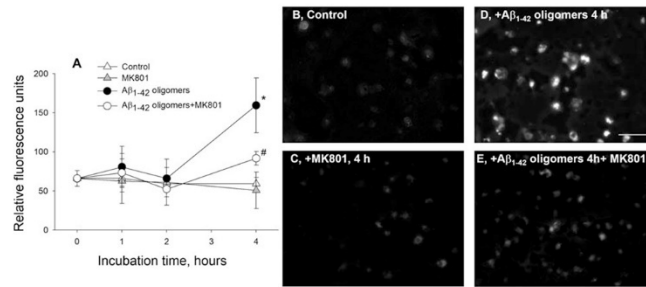


Fig. 4. Small A β_{1-42} oligomers induce MK801-dependent membrane depolarization of microglia in pure microglial cultures. **A**: Relative fluorescence intensity of microglia; representative DiBAC4(3) fluorescence images of normal (**B**), MK801-treated (**C**), A β_{1-42} oligomer-treated (**D**), and A β_{1-42} oligomer + MK801-treated (**E**) cells. Primary pure microglial cultures were treated with 1 μ M A β_{1-42} oligomers

and with or without 10 μ M MK801 and then loaded with DiBAC4(3). The cells were viewed and images were taken with a fluorescence microscope as described for Figure 3. * $P < 0.05$ compared with control; # $P < 0.05$ compared with A β -treated cells. Means $\pm$ SE of five to nine experiments on separate microglial cultures are presented. Scale bar = 100 μ m.

oligomers. Figure 6A shows that after 1 hr exposure of CGCs to A β_{1-42} glutamate concentration in culture medium increased to $1.48 \pm 0.27 \mu$ M compared with the initial 0.69 μ M concentration in untreated cells. Longer incubation of CGCs with A β_{1-42} oligomers induced further elevation of extracellular glutamate concentration up to 3.4 μ M after 4 hr of incubation. However, when MK801 was added prior to A β_{1-42} oligomers, the extracellular glutamate concentration remained at the control level (Fig. 6A), indicating that NMDA-R may be involved in the extracellular glutamate dysregulation in CGC cultures treated with A β_{1-42} oligomers. In contrast to mixed CGC cultures, extracellular glutamate concentration did not change when pure microglial cultures were treated with A β_{1-42} oligomers for 1, 2, or 4 hr and stayed at 2.0–2.78 μ M in all experimental groups (Fig. 6B). This suggests that glutamate was released from neurons rather than from microglial cells in an NMDA-R-dependent manner.

Small A β Oligomer-Induced Neuronal Death Is Prevented by MK801

Neuronal membrane depolarization caused a release of glutamate, which may, in turn, activate NMDA-R. This may lead to influx of Ca $^{2+}$, which may further contribute to plasma membrane depolarization or have other effects inside the neurons leading to cell death. We tested whether suppression of NMDA-R by MK801 can protect neurons against A β_{1-42} oligomer-induced cell death. In these experiments, CGCs were treated with 1 μ M A β_{1-42} oligomers for 24 hr in the presence/absence of 10 μ M MK801. As shown in Figure 7, neuronal viability in CGCs was reduced from 88% in control to 51% in the A β_{1-42} oligomer-treated group. However, addition of MK801 to cultures completely prevented A β_{1-42} oligomer-induced neuronal death (viability of neurons in

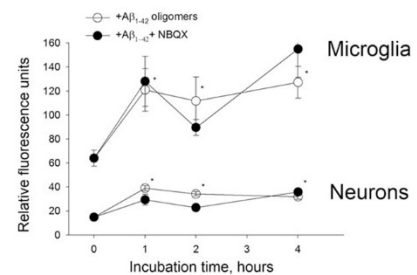


Fig. 5. AMPA receptors do not affect A β_{1-42} oligomer-induced membrane depolarization in CGC culture. CGCs were treated with 1 μ M A β_{1-42} oligomers or with vehicle for 1, 2, or 4 hr with or without 10 μ M NBQX and then loaded with DiBAC4(3). Pictures were taken with a fluorescence microscope as described for Figure 3. * $P < 0.05$ compared with control; Means $\pm$ SE of three experiments on separate CGC cultures are presented.

the A β_{1-42} + MK801 group was 82%). Microglial cells and astrocytes remained viable during treatment of CGC cultures with small A β_{1-42} oligomers (see Supp. Info. Fig. 3). The data suggest that activation of NMDA-R may be involved in A β_{1-42} oligomer-induced neuronal death.

Small A β Oligomers Did Not Induce Release of TNF- α in Pure Microglial Cultures

Small A β_{1-42} oligomers can cause rapid neuronal and microglial depolarization and later neuronal death, so we tested whether A β_{1-42} oligomers might activate the microglia to release proinflammatory cytokines and whether the level of cytokines may be modulated by

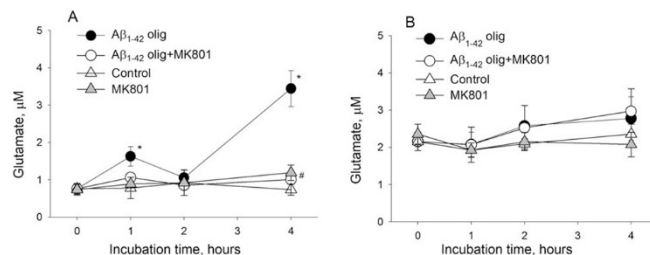


Fig. 6. Small Aβ₁₋₄₂ oligomers increase the level of glutamate in CGC culture medium. **A:** Glutamate level in CGC culture medium. **B:** Glutamate level in pure microglial culture medium; CGC or pure microglial cultures were pretreated with 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers for 1, 2, or 4 hr ± 10 μM MK801. Then, medium of both cultures was

collected, and concentration of glutamate was measured by using an Amplex red glutamic acid/glutamate oxidase assay kit. **P* < 0.05 compared with control; #*P* < 0.05 compared with Aβ-treated cells. Means ± SE five to eight experiments on separate cultures are presented.

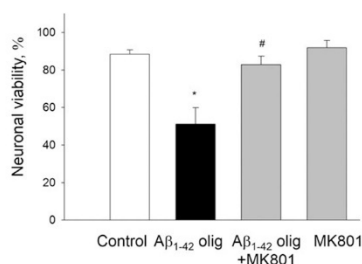


Fig. 7. MK801 prevents Aβ₁₋₄₂ oligomer-induced neuronal death in CGC cultures. CGCs were exposed to 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers with or without 10 μM MK801 for 24 hr. Cell death was quantified by assessing nuclei morphology after staining with propidium iodide and Hoechst 33342 (See Supp. Info. Fig. 3). **P* < 0.05 compared with control; #*P* < 0.05 compared with Aβ-treated cells. Means ± SE of four experiments on separate CGC cultures are presented.

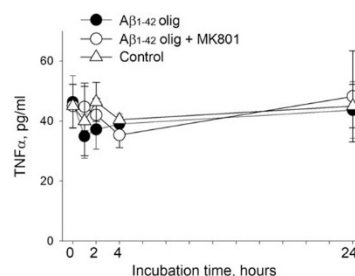


Fig. 8. Small Aβ oligomers did not induce release of TNF-α in pure microglial cultures. Pure microglial cultures were treated with 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers for 1, 2, 4, or 24 hr ± 10 μM MK801. Then, medium of the cultures was collected and TNF-α content was measured with a TNF-α (rat) ELISA kit. Means ± SE of three to six separate experiments are presented.

MK801. We measured TNF-α level in pure microglia cell culture media collected after 1, 2, 4, and 24 hr of incubation with Aβ₁₋₄₂ oligomers. Incubation of cells with Aβ₁₋₄₂ oligomers did not change the total level of TNF-α in microglia cell cultures: TNF-α level varied between 31 and 48 pg/ml in control and Aβ₁₋₄₂ oligomers group (Fig. 8). MK801 also had no effect on the amount of this cytokine in culture medium of microglia affected by small Aβ₁₋₄₂ oligomers after 1, 2, 4, or 24 hr (Fig. 8).

Small Aβ₁₋₄₂ Oligomers Decrease the Capacity of Isolated Brain Mitochondria To Retain Calcium

To characterize further the possible mechanism of neuronal death caused by small Aβ₁₋₄₂ oligomers, we analyzed the capacity of isolated brain mitochondria to retain calcium in the presence of Aβ₁₋₄₂. Mitochondrial

CRC was investigated fluorimetrically by measuring the amount of Ca²⁺ that can be sequestered by mitochondria before opening the mPTP. As can be seen in Figure 9A, treatment of brain mitochondria with Aβ₁₋₄₂ oligomers caused a gradual decrease of CRC in a concentration-dependent manner, from 100% in control to 74% at 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers and to 64% at 2 μM Aβ₁₋₄₂. However, in mitochondria treated with 1 μM Aβ₁₋₄₂ and the mPTP blocker CsA, the CRC was the same as in normal mitochondria (Fig. 9B). This indicates that small Aβ₁₋₄₂ oligomers may cause opening of the mPTP at lower concentration of calcium compared with untreated brain mitochondria.

DISCUSSION

We used CGC cultures, which allowed comparing the effect of small Aβ₁₋₄₂ oligomers on various types of cells

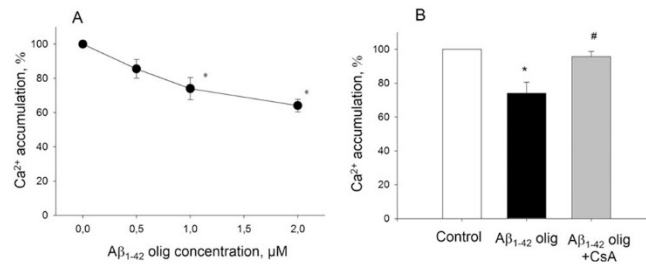


Fig. 9. Small A β ₁₋₄₂ oligomers decrease the capacity of isolated brain mitochondria to retain calcium. **A:** Dependence of mitochondrial CRC on the concentration of A β ₁₋₄₂ oligomers. **B:** Effect of 1 μ M A β ₁₋₄₂ oligomers plus/minus 0.2 μ M cyclosporine A on mitochondrial CRC. Mitochondrial CRC was determined fluorimetrically by

using calcium green-5N as described in Materials and Methods. Ca²⁺ retention capacity (CRC) of control mitochondria was 3.92 ± 0.0521 mmol/mg protein and was equated to 100%. * $P < 0.05$ compared to control; [#] $P < 0.05$ compared with A β -treated cells. Means $\pm$ SE of four to six separate experiments are presented.

in the same culture, neurons, microglia, and astrocytes. The main novel finding from this study was that these cells exhibited different responses to treatment with small A β oligomers; there was no change in membrane potential of astrocytes, whereas plasma membrane of neurons and microglia was rapidly depolarized but by different mechanisms. A β ₁₋₄₂ oligomer-induced neuronal membrane depolarization was insensitive to MK801 and NBQX, indicating that NMDA-R and AMPA-R are not involved in this pathway. Meanwhile, depolarization of membranes of microglial cells was substantially prevented in the presence of MK801 (but not NBQX), suggesting that it was mediated by NMDA-R. Treatment with A β ₁₋₄₂ oligomers resulted in extracellular accumulation of glutamate, which was observed only in mixed neuronal–glial and not pure microglial cultures, suggesting that microglia did not release glutamate. MK801 eliminated accumulation of glutamate and preserved neuronal viability during 24 hr of treatment in CGC cultures. Therefore, we assume that NMDA-R activation in neuronal cells follows A β ₁₋₄₂ oligomer-induced membrane depolarization, initiating the excitotoxic cascade leading to neuronal death. This is in line with previous findings showing that A β oligomers can induce NMDA-R-dependent Ca²⁺ influx (Alberdi et al., 2010; Ferreira et al., 2012) and NMDA-R-dependent oxidative stress (De Felice et al., 2007; Decker et al., 2010). We observed an initial increase of extracellular glutamate concentration after 1 hr of incubation with A β ₁₋₄₂ oligomers, and this increase might be a result of rapid membrane depolarization because depolarizing agents can cause glutamate efflux from neuronal cells after 10–30 min of incubation (Zheng et al., 2000; Vale et al., 2006; Godfrey et al., 2012). Further increase of extracellular glutamate, which peaked at 4 hr of incubation with A β oligomers, may be due to inhibition of neuronal glutamate transporters (Li et al., 2009).

Small A β ₁₋₄₂ oligomers caused MK801/NBQX-independent membrane depolarization of both cerebellar

and cortical neurons, suggesting that this is a common mechanism of neuronal depolarization by A β ₁₋₄₂ oligomers. We observed that the action of A β ₁₋₄₂ oligomers on neuronal membrane potential was direct and not related to the intermediates released by glia, which in fact may participate and modulate membrane permeability (Jung et al., 2012; Talantova et al., 2013), inasmuch as A β ₁₋₄₂ oligomer-induced neuronal depolarization was similar in both mixed and pure CGC cultures. Our data support the idea that small A β ₁₋₄₂ oligomers might directly interact with membrane phospholipids, likely forming A β pores (Lin et al., 2001; Demuro et al., 2011) or destabilizing phospholipid bilayers (Kayed et al., 2004) and thus disrupting the electrical potential across neuronal membranes.

An important and novel result of our study is elucidation of a strong depolarizing effect of small A β ₁₋₄₂ oligomers on microglial membrane and that the A β ₁₋₄₂-induced microglial depolarization was completely blocked by MK801. These data suggest that NMDA-R are involved in microglial depolarization elicited by small A β ₁₋₄₂ oligomers. Note that A β ₁₋₄₂ oligomer-induced depolarization of microglia was observed in pure microglial cultures in the absence of glutamate. As a noncompetitive NMDA-R antagonist, MK801 can block conductance of agonist-activated, open NMDA channels (Kemp et al., 1987); we suppose that small A β oligomers rather than glutamate can rapidly activate microglial NMDA-R, leading to enhancement of Ca²⁺ influx and membrane depolarization. The presence of NMDA-R in microglial cells in the developing and mature brain has been recently reported (Murugan et al., 2011; Kaindl et al., 2012), but their involvement in small A β oligomer-induced microglial depolarization is demonstrated here for the first time.

We found that fluorescence of DiBAC4(3)-loaded control microglial cells was about three times higher than that of neuronal cells, which indicates that microglial membrane potential was normally lower than neuronal

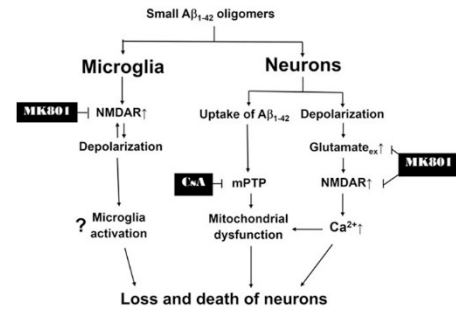


Fig. 10. Proposed scheme by which small $A\beta_{1-42}$ oligomers induce neuronal death. Small $A\beta_{1-42}$ oligomers induce neuronal depolarization and elevation of extracellular glutamate, which may lead to NMDA-R activation, increase in intracellular Ca^{2+} concentration, and neuronal death. Elevation of extracellular glutamate and neuronal death can be prevented by MK801. Also, $A\beta$ oligomers may be taken up by neurons and may cause opening of mPTP, which may lead to mitochondrial dysfunction and cell death. Also, small $A\beta_{1-42}$ oligomers induce depolarization of microglial cells, which can be blocked by MK801 and may cause deleterious microglial activation.

membrane potential. It has been previously reported that the resting membrane potential of microglial cells is about -40 to -45 mV (Newell and Schlichter, 2005) and that neuronal NMDA-R are functionally active at membrane potential of about -40 mV as a result of a voltage-dependent Mg^{2+} block (Mayer et al., 1984). Therefore, the lower initial membrane potential of microglia may promote rapid NMDA-R activation in response to $A\beta_{1-42}$ oligomers. $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced microglial depolarization seems not to be mediated by AMPA receptors.

Although small $A\beta_{1-42}$ oligomers induced microglial membrane depolarization, this did not cause microglial death during prolonged incubation of cells with $A\beta_{1-42}$ oligomers. Whether microglial depolarization and participation of NMDA-R contribute to neuronal death is not entirely clear. Recently, it has been shown that activation of microglial NMDA-R by NMDA or by endotoxin LPS triggered inflammation and neuronal cell death in the brain (Kaindl et al., 2012). Small $A\beta_{1-42}$ oligomers can directly induce neuronal death (Cizas et al., 2010), but neuroinflammatory activated microglia might contribute to phagocytosis of neurons and promote further damage to the $A\beta_{1-42}$ -affected brain. However, we did not observe production of proinflammatory $TNF-\alpha$ following treatment with small $A\beta_{1-42}$ oligomers, at least during 24 hr of incubation. On the other hand, microglia can become overactivated through the generation of reactive oxygen and nitrogen species in response to small $A\beta_{1-42}$ oligomers (Maezawa et al., 2011) or through production of other types of proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 α or interferon- γ (Lindberg et al., 2005). Therefore, the nature of microglial activation and

NMDA-R participation in response to $A\beta_{1-42}$ should be further investigated.

Plasma membrane depolarization and NMDA-R activation may lead to elevation of intracellular Ca^{2+} (Demuro et al., 2005; Ferreira et al., 2012), which in turn may lead to mitochondrial dysfunction. In this study, we showed that small $A\beta$ oligomers sensitized isolated brain mitochondria to Ca^{2+} -induced opening of mPTP (measured as CRC). This indicates that small $A\beta_{1-42}$ oligomers may cause opening of mPTP and depolarization of the mitochondrial inner membrane at lower intracellular calcium concentrations compared with normal, nontreated mitochondria. We have recently demonstrated that small $A\beta$ oligomers may be endocytosed into cultured cells (Cizas et al., 2011), so it is likely that they could promote opening of mPTP in $A\beta_{1-42}$ oligomer-treated neurons, which may lead to mitochondrial dysfunction and cell death.

Taken together, our data show that the initial event in small $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced toxicity is depolarization of both neuronal and microglial plasma membranes, but by different mechanisms. $A\beta_{1-42}$ oligomer-neuronal membrane interaction induces NMDA-R-independent neuronal depolarization, which leads to NMDA-R-dependent release of glutamate in CGC cultures. $A\beta_{1-42}$ oligomer-microglial interaction leads to NMDA-R-dependent microglial plasma membrane depolarization. Small $A\beta$ oligomers may be taken up by neurons, and this may lead to impaired capacity of mitochondria to accumulate calcium, causing opening of mPTP and subsequent neuronal death. Hence, pharmacological inhibition of NMDA-R and mPTP can protect neurons from small $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced damage in AD (Fig. 10).

REFERENCES

- Alberdi E, Sanchez-Gómez MV, Cavaliere F, Pérez-Samartín A, Zugaza JL, Trullas R, Domercq M, Matute C. 2010. Amyloid beta oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* 47:264–272.
- Arispe N, Rojas E, Pollard HB. 1993. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:567–571.
- Babot Z, Cristofol R, Suñol C. 2005. Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABA_A receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci* 21:103–112.
- Bal-Price A, Brown GC. 2001. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 21:6480–6491.
- Blanchard BJ, Thomas VL, Ingram VM. 2002. Mechanism of membrane depolarization caused by the Alzheimer Abeta1–42 peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 293:197–203.
- Boomgard R, Balen R. 1992. Methods for fast morphological image transforms using bitmapped binary images. *CVGIP Graphical Models and Image Processing*, vol 54.
- Capone R, Quiroz FG, Prangkio P, Saluja I, Sauer AM, Bautista MR, Turner RS, Yang J, Mayer M. 2009. Amyloid-beta-induced ion flux in artificial lipid bilayers and neuronal cells: resolving a controversy. *Neurotox Res* 16:1–13.
- Chen L, Yamada K, Nabeshima T, Sokabe M. 2006. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP

- induction in beta-amyloid infused rats. *Neuropharmacology* 50:254–268.
- Cizas P, Budvytyte R, Morkuniene R, Moldovan R, Broccio M, Losche M, Niaura G, Valincius G, Borutaitė V. 2010. Size-dependent neurotoxicity of beta-amyloid oligomers. *Arch Biochem Biophys* 496:84–92.
- Cizas P, Jekabsone A, Borutaitė V, Morkūniene R. 2011. Prevention of amyloid-beta oligomer-induced neuronal death by EGTA, estradiol, and endocytosis inhibitor. *Medicina (Kaunas)* 47:107–112.
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL. 2007. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282:11590–11601.
- Decker H, Jurgensen S, Adrover MF, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Klein WL, Epstein AL, De Felice FG, Jerusalinsky D, Ferreira ST. 2010. N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- β peptide oligomers. *J Neurochem* 115:1520–1529.
- Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280:17294–17300.
- Demuro A, Smith M, Parker I. 2011. Single-channel Ca²⁺ imaging implicates A β ₁₋₄₂ amyloid pores in Alzheimer's disease pathology. *J Cell Biol* 195:515–524.
- Ferreira IL, Bajouco LM, Mota SI, Auberson YP, Oliveira CR, Rego AC. 2012. Amyloid beta peptide 1–42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in cortical cultures. *Cell Calcium* 51:95–106.
- Glenner GG, Wong CW. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 125:885–890.
- Godfrey DA, Sun Y, Frisch C, Godfrey MA, Rubin AM. 2012. Depolarization-induced release of amino acids from the vestibular nuclear complex. *Neurochem Res* 37:732–739.
- Gornal AG, Bardavill GJ, David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177:751–766.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184–185.
- Harkany T, Abraham I, Timmerman W, Laskay G, Tóth B, Sasvari M, Kónya C, Sebens JB, Korf J, Nyakas C, Zarandi M, Penke B, Luiten PG. 2000. Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci* 12:2735–2745.
- Hung LW, Cicciotosto GD, Giannakis E, Tew DJ, Perez K, Masters CL, Cappai R, Wade JD, Barnham KJ. 2008. Amyloid-beta peptide (A β) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: A β dimers and trimers correlate with neurotoxicity. *J Neurosci* 28:11950–11958.
- Jekabsone A, Mander PK, Tickler A, Sharpe M, Brown GC. 2006. Fibrillar beta-amyloid peptide A β ₁₋₄₀ activates microglial proliferation via stimulating TNF- α release and H₂O₂ derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *J Neuroinflammation* 7:3–24.
- Jekabsone A, Neher JJ, Borutaitė V, Brown GC. 2007. Nitric oxide from neuronal nitric oxide synthase sensitizes neurons to hypoxia-induced death via competitive inhibition of cytochrome oxidase. *J Neurochem* 103:346–356.
- Jung ES, An K, Hong HS, Kim JH, Mook-Jung I. 2012. Astrocyte-originated ATP protects A β ₁₋₄₂-induced impairment of synaptic plasticity. *J Neurosci* 32:3081–3087.
- Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, Le Charpentier T, Jossierand J, Ali C, Vivien D, Collingridge GL, Lombet A, Issa L, Rene F, Loeffler JP, Kavelaars A, Verney C, Mantz J, Gressens P. 2012. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann Neurol* 72:536–549.
- Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG. 2004. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem* 279:46363–46366.
- Kemp JA, Marshall GR, Wong EH, Woodruff GN. 1987. The affinities, potencies and efficacies of some benzodiazepine-receptor agonists, antagonists and inverse-agonists at rat hippocampal GABA_A-receptors. *Br J Pharmacol* 91:601–608.
- Koh SH, Noh MY, Kim SH. 2008. Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Brain Res* 1188:254–262.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β ₁₋₄₂ are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448–6453.
- Li S, Hong S, Shepardso NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. 2009. Soluble oligomers of amyloid β -protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62:788–801.
- Lin H, Bhatia R, Lal R. 2001. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J* 15:2433–2444.
- Lindberg C, Selenica ML, Westlind-Danielsson A, Schultzberg M. 2005. Beta-amyloid protein structure determines the nature of cytokine release from rat microglia. *J Mol Neurosci* 27:1–12.
- Lioudyno MI, Broccio M, Sokolov Y, Rasool S, Wu J, Alkire MT, Liu V, Kozak JA, Dennison PR, Glabe CG, Losche M, Hall JE. 2012. Effect of synthetic A β peptide oligomers and fluorinated solvents on Kv1.3 channel properties and membrane conductance. *PLoS One* 7:e35090.
- Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, Chen PP, Hudspeth B, Chen C, Zhao Y, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM. 2009. 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* 29:9078–9089.
- Maezawa I, Zimin PI, Wulff H, Jin LW. 2011. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J Biol Chem* 286:3693–3706.
- Mairet-Coello G, Courchet J, Pieraut S, Courchet V, Maximov A, Polleux F. 2013. The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of A β oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron* 78:94–108.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261–263.
- Mukhamedyarov MA, Grishin SN, Yusupova ER, Zefirov AL, Palots A. 2009. Alzheimer's beta-amyloid-induced depolarization of skeletal muscle fibers: implications for motor dysfunctions in dementia. *Cell Physiol Biochem* 23:109–114.
- Murugan M, Sivakumar V, Lu J, Ling EA, Kaur C. 2011. Expression of N-methyl D-aspartate receptor subunits in amoeboid microglia mediates production of nitric oxide via NF- κ B signaling pathway and oligodendrocyte cell death in hypoxic postnatal rats. *Glia* 59:521–539.
- Neniskyte U, Neher JJ, Brown GC. 2011. Neuronal death induced by nanomolar amyloid beta is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J Biol Chem* 286:39904–39913.
- Newell EW, Schlichter LC. 2005. Integration of K⁺ and Cl[−] currents regulate steady-state and dynamic membrane potentials in cultured rat microglia. *J Physiol* 567:869–890.

- Ono K, Condrón MM, Teplow DB. 2009. Structure neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14745–14750.
- Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, Klein WL, Triller A. 2010. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66:739–754.
- Selkoe DJ. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487–498.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe D. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837–842.
- Sokolov Y, Kozak JA, Kaye R, Chanturiya A, Glabe C, Hall JE. 2006. Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure. *J Gen Physiol* 128:637–647.
- Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW. 2013. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E2518–E2527.
- Vale C, Alfonso A, Sunol C, Vieytes MR, Botana LM. 2006. Modulation of calcium entry and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by palytoxin. *J Neurosci Res* 83:1393–1406.
- Valincius G, Heinrich F, Budvytyte R, Vanderah DJ, McGilivray DJ, Sokolov Y, Hall JE. 2008. Soluble amyloid beta-oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: implications for cell toxicity. *Biophys J* 95:4845–4861.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535–539.
- Zheng L, Godfrey DA, Waller HJ, Waller HJ, Godfrey TG, Chen K, Sun Y. 2000. Effects of high-potassium-induced depolarization on amino acid chemistry of the dorsal cochlear nucleus in rat brain slices. *Neurochem Res* 25:823–835.

SUMMARY

1. INTRODUCTION

Alzheimer disease (AD) is one of the most common dementia disorders in the elderly. According to the main hypothesis on AD, gradual and chronic imbalance in the production and clearance of amyloid beta ($A\beta$) leads to gradual accumulation and aggregation of the peptide in the brain, initiating a neurodegenerative cascade. Worldwide, life expectancy of older people continues to rise so dementia is becoming one of the major health problems [1]. Recent data show that about fifty million people in the world are living with dementia and this number will almost double every twenty years [2]. Because the rapidly increasing prevalence of dementia and AD, effective diagnostic and treatment tools are becoming an important research priorities. $A\beta$ is considered to be one of the main factors in the brain which plays the central role in disease pathology [3, 4, 59], however, the primary molecular mechanisms by which $A\beta$ oligomers trigger neurodegeneration are not entirely understood. Synaptic and non-synaptic neuronal changes, as well as other non-neuronal cell functional and structural variations can occur at almost the same time as AD develops. This suggest that $A\beta$ may directly affect neurons and cause synaptic damage or neuronal death, and act indirectly through the activation of microglial cells [6, 7]. Neurotoxic effects of $A\beta$ peptides and inflammatory processes are thought to contribute and be related to possible interaction of $A\beta$ with cellular membranes. For this reason much attention is paid to neuroinflammatory processes and amyloid interaction with other cells. Misfolded and aggregated $A\beta$ proteins, binding to pattern recognition receptors on microglia, may trigger an innate immune response characterised by release of inflammatory mediators and may contribute to AD progression [8, 9]. However, little is known about the mechanisms through which different aggregate forms of $A\beta$ are cytotoxic and can disrupt various biochemical processes. For this reason there are no effective pharmacotherapeutic options for prevention and treatment of AD. Treatment methods based on immunization using antibodies against $A\beta$ peptide are considered as one of the most effective and promising treatments for AD. Many *in vitro* and *in vivo* $A\beta$ immunotherapies resulted in reduction of $A\beta$ accumulation and have been shown to lower cerebral $A\beta$ levels and improve cognition in animal models of AD. Despite possible beneficial effects described in extensive animal studies, many of the clinical trials using $A\beta$ immunization were terminated due to unexpected toxicity and the development of inflammatory reactions in brain in some patients. The precise underlying causes why immunotherapies exert inflammation and neurotoxic effects

remain unclear. Little is known about molecular mechanisms of A β and microglia interactions in triggering neuronal death.

AIM AND OBJECTIVES

The aim of the study

The aim of the study was to investigate the molecular mechanisms of amyloid beta neurotoxicity that may be implicated in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

Objectives and tasks of the study

1. To investigate effects of small A β_{1-42} oligomers on membrane potential and viability of cerebellar granule cells and whether these effects are mediated by NMDA receptors.
2. To investigate whether immune complexes of specific antibodies with various A β_{1-42} aggregates induce neuronal death and by which mechanism.
3. To determine effects of immune complexes of anti-A β and various A β_{1-42} aggregates in synaptic densities.
4. To investigate effects of AD patients' blood sera and cerebrospinal fluids on viability of cerebellar granule cells in cultures and compare them with the effects of samples of patients with other dementias and cognitively healthy persons.

Scientific novelty and practical value

In this study, for the first time it was shown that small A β_{1-42} oligomers (1–3 nm) can induce rapid NMDA receptor–independent neuronal depolarization and NMDA receptor–dependent release of glutamate in CGC cultures leading to excitotoxic neuronal death. We demonstrated that A β_{1-42} oligomers can directly affect neuronal membrane potential and that the NMDA receptors were not involved in the initiation of this process. An important and novel result of our study is elucidation of a strong depolarizing effect of small A β_{1-42} oligomers on microglial membrane. We determined that A β_{1-42} oligomers induced depolarization of microglial plasma membrane was associated with activation of NMDA receptors.

This study for the first time has shown increased toxicity of A β_{1-42} oligomers when complexed with A β antibodies. Our research revealed that multimeric antibody–antigen complexes cause neuronal death in mixed neuronal–glial cultures which is dependent on activation of Fc receptors in microglial cells. It was demonstrated that immune complexes cause not only

neuronal death but also a decline in neuronal cell density and proliferation of microglia. For the first time it has been shown that oligomeric/multimeric structure of antigen is essential factor in neurotoxicity of antibody–antigen complexes. This study determined the relationship between size and aggregation states of A β _{1–42} in antibody–antigen complexes and revealed incubation time importance causing synaptotoxicity on CGCs. Our study revealed that biological fluids from patients with AD but not other dementia patients and cognitively healthy individuals exhibit neurotoxic effects on primary neuronal–glial cultures.

These novel results suggest that various A β aggregates may cause neuronal death via multiple mechanisms. Elucidation of the detailed mechanism of antibody–antigen complex-mediated neuroinflammation indicates that combination of immunotherapy with anti-inflammatory agents might be a future strategy for the effective treatment of AD. This can be used as a basis for development of diagnostic methods for early diagnostics of Alzheimer's disease.

2. METHODS

The procedures used in this study are approved by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other purposes and according to the Republic of Lithuania law on the care, keeping and use of animals.

In order to perform the study with patients biological fluids (blood serum – BS and cerebrospinal fluid – CSF), permission were obtained from Kaunas Regional Research Ethics Committee (2011-12-12, No. P1-71/2010). Biological materials were obtained from Department of Neurology, Hospital of LUHS Kaunas Clinics (Pšemeneckienė G., Grušauskienė E. MD and prof. PhD. Petrikonis K. (MD)).

Monoclonal antibodies anti-A β , anti-VP1, anti-MeNP, anti-MTP developed by dr. A. Žvirblienė and colleagues at the Institute of Biotechnology, Vilnius University.

Dissertation has been prepared at the laboratory of Biochemistry, Neuroscience institute, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences and “Santaka“ valley centre for the Advanced Pharmaceutical and Health Technologies during the period of 2012–2016.

All reagents were purchased from *Sigma-Aldrich* unless otherwise stated.

Primary neuronal–glial, pure microglial and pure neuronal culture preparation

Cerebellar granule cell culture preparation

Primary neuronal–glial cultures from rat cerebella (referred to as CGC cultures below) were prepared from 5–7 days old *Wistar* rats pups (both genders). All procedures were performed under sterile conditions. Rats were euthanized with increasing concentrations of CO₂ and decapitated. Then brains were removed and placed in a Petri dish containing 4° C phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 13 mM glucose and 1% penicillin–streptomycin. Cerebella were dissected out and put in another small Petri dish with sterile PBS. Brains were cleaned of meninges and blood vessels and cut into smaller cubes (0.5 mm³). The minced tissue was into a falcon tube containing about 7 ml of Versene solution (1:5,000; *Gibco*, UK) and incubated at 37° C for 5 min (*Thermo Scientific*, USA). After incubation, the tissue was triturated with a sterile 2 mm and 1 mm diameter Pasteur pipettes and suspension of dissociated/separated cells was collected in a separate falcon tube with cell culture growth medium DMEM GlutaMAX (*Gibco*, UK) supplemented with heat-inactivated 5% horse serum, 5% fetal calf serum, 38 mM glucose, 25 mM KCL, and 1% penicillin–streptomycin. Tissue were triturated in Versene solution. The cells suspension was centrifuged at 270 × g, 5 min (*Eppendorf 5810R*, Canada) and plated at 1 000 000 cells/ml in 24-well plates, coated with 0.0001% poly-L-lysine. Cells were maintained at 37° C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The trypan blue dye exclusion test was used to determine the number of viable cells present in a cell suspension after cell isolation procedures. Cells were grown *in vitro* for 4–7 days. In average, the CGC cultures contained 8.5 ± 2.1% microglia, 7.3 ± 4.9% astrocytes and 84.2% cerebellar granule neurons, as assessed by cellular morphology.

Preparation of pure microglial cultures

Primary pure microglial cultures were prepared from cerebral cortices of 5–7 days old *Wistar* rats pups (both genders). All procedures were performed under sterile conditions as described previously in CGC preparation, with some modifications described below. Rats were euthanized with CO₂ and decapitated. Then the brain was removed and placed in a Petri dish containing 4° C PBS supplemented with 13 mM glucose and 1% penicillin–streptomycin. The brain was cleaned of meninges and blood vessels, transferred to another Petri dish with cold PBS and cut up into smaller pieces. The tissue was dissociated in a Versene solution (1:5,000) and centrifuged at 290 × g, 5 min.

Cells were plated in 25 cm² flasks coated with 0.0005% poly-L-lysine. Cultured cells were maintained in DMEM GlutaMAX supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin in a humidified 37° C incubator with 5% CO₂. Four days after initial seeding one half of the medium was replaced with fresh warm culture medium. Microglia were used for experiments after 10–14 days of initial seeding.

Preparation of pure neuronal cultures from cerebellum

Primary pure neuronal cultures were prepared from cerebella of 5–7 days old *Wistar* rats pups (both genders). All procedures were performed under sterile conditions as described previously in CGC preparation with some modifications described below. The suspension of cells was centrifuged at 270 × g, 5 min (*Eppendorf 5810R*, Canada) and plated at 1 000 000 cells/ml in 24-well plates coated with 0.0001% poly-L-lysine.

Cytosine-d-arabioside (10 μM Ara-C) was added to cultures 48 hours after plating to inhibit non-neuronal cell proliferation. Cells were grown *in vitro* for 28 days.

Preparation of Aβ_{1–42} monomers, oligomers and fibrils

Synthetic Aβ_{1–42} peptides were from *Bachem* (Switzerland) and *American Peptide* (California, USA). The size and morphology of the preparations of Aβ_{1–42} peptides were characterized by AFM as described [52].

Monomers were prepared by dissolving 1 mg of Aβ_{1–42} in 400 μl 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) at room temperature. After removal of HFIP by evaporation Aβ_{1–42} was resuspended in DMSO at a concentration of 0.5 mM.

Soluble oligomers were prepared by dissolving 1 mg of peptide in 400 μl HFIP for 30–60 min at room temperature. 100 μl of the resulting seedless solution was added to 900 μl H₂O in a siliconized Eppendorf tube. After 10–20 min incubation at room temperature, the samples were centrifuged for 15 min at 12,000 rpm, the supernatant was transferred to a new siliconized tube and HFIP was evaporated. Samples were incubated in open vials for 24 h at 20° C (protocol I). To generate larger oligomers, typically 4–10 nm in diameter (according to analysis by atomic force microscopy), the supernatant was transferred to a non-siliconized Eppendorf tube after the centrifugation and was gently purged with nitrogen (protocol II). Fibrils were formed by protocol in which the aqueous peptide solution obtained after evaporation of HFIP was incubated for 7 days at room temperature. Solutions of peptides were stored at –20° C.

Antibodies used in the study and treatments

Murine monoclonal antibody against N- terminal epitope of A β _{1–42}, reactive both with A β _{1–42} and A β _{1–40} (clone #11E12, subtype IgG2b) were used in assays [235]. The following monoclonal antibodies were used: antibodies against recombinant oligomeric proteins – hamster polyomavirus major capsid protein VP1 (clone #6D11, IgG2a), human metapneumovirus (MTP) nucleocapsid (N) protein, (clone #4A2, IgG2b), measles (Me) virus N protein (clone #10F7, IgG2b) [236–238]. Commercial monoclonal antibody anti-A β _{1–42} (clone#G2-13, subtype IgG1) was purchased from *Millipore* (USA) and commercial rabbit polyclonal antibody anti-A β _{1–42} was from *Abbiotec LLC* (USA).

For toxicity assays the cultures were treated with full-length monoclonal antibodies or the respective (Fab)2 fragments (2 μ g/ml) with or without the corresponding antigens: A β _{1–42} or A β _{1–40} (1 μ M, hereinafter concentration of oligomeric antigens is indicated as an amount of peptide monomer per volume, or 4.5 μ g/ml), VP1, MTP-N, MeN proteins or synthetic peptides synthetic peptides A β _{1–6}, A β _{1–13}, MeN_{440–452} representing their fragments (all at 2 μ g/ml concentration). To allow formation of antibody–antigen complexes antibodies were pre-incubated with the respective antigens in culture medium for 10–15 min prior to the treatment of CGC. Then solutions were transferred on cell cultures and incubated for 24 h with antibodies with or without the corresponding antigens. 28-day-old (long-term) CGC cultures were treated for 24 h with monoclonal antibodies (4 μ g/ml) with or without the corresponding antigen A β _{1–42} (1 μ M).

Assessment of cell viability

The viability of neurons in cultures was assessed by propidium iodide (PI, 7 μ M) and Hoechst 33342 (Hoechst 33342, 4 μ g/ml) staining using a fluorescence microscope *OLYMPUS IX71SIF-3* (*OLYMPUS AMERICA INC.*, USA), 20 $\times$ magnification. Microglial cells were additionally identified by using Isolectin GS-IB4 conjugated with AlexaFluor488 (7 ng/ml). Neuronal cells were distinguished from glial cells according to their characteristic shape and nuclear morphology: PI-positive cells were classified as necrotic, cells showing nuclear shrinkage or fragmentation were classified as chromatin condensed/fragmented (apoptotic) and PI-negative cells with weak Hoechst-staining were considered to be viable. Cells were counted in at least five microscopic fields per well (two wells per treatment). Data visualization was carried out using the integrated microscope *OLYMPUS IX71SIF-3* camera. Experimental data fluorescence analyses were performed using the software *ImageJ* and *ImageProExpress 6.3* programs.

Immunofluorescence analysis

Effect of immune complexes on synaptic protein synapsin changes were assessed by immunofluorescence method. For toxicity assays the CGCs were treated for 24 h with monoclonal anti-A β antibodies (1 μ g/ml) and various A β ₁₋₄₂ aggregates (1 μ M). Guideline procedure for immunofluorescence staining of cell cultures: after incubation cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature and washed in PBS three times for 15 min each wash. Cell membranes were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature and washed in PBS three times for 15 min each wash. Subsequently, the cells were incubated at room temperature for 1 h in filtered blocking buffer (10% BSA). After incubation cells were incubated with primary antibody anti-SNAP-25 (*Abcam*, USA) for 1 h at room temperature in dark and then with secondary antibody Alexa Fluor 555 (*Abcam*, USA) for 30 min at room temperature in dark. After multiple staining cells were washed in PBS three times for 15 min each wash. Cells were visualized under a fluorescence microscope *OLYMPUS IX71SIF-3*.

Fluorescence-based plasma membrane potential measurements

Membrane potential of cells was monitored with the fluorescent dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxanol (DiBAC4(3)), an anionic lipophilic molecule that is distributed between the extracellular space and the cell cytosol according to the electrical plasma membrane potential difference. The DiBAC4(3) enters the cell upon depolarization and binds to intracellular components, leading to an increase in the fluorescence intensity. Cell cultures (CGC, cortical neuronal or pure microglial cultures) were pretreated with small A β ₁₋₄₂ oligomers (1 μ M) with or without 10 μ M MK-801 or 10 μ M NBQX. After incubation cell culture media were removed from cultures, fresh medium with 3 μ M DiBAC4(3) was added and cells were incubated for 10 min. Plates with cells were kept in the incubator and measurements of fluorescence were made at indicated times after which cells were returned back to the incubator as quickly as possible. Pictures of at least three randomly selected fields per well were taken with a fluorescence microscope (*OlympusIX71SIF-3*). Advanced methods of image processing, including mathematical morphology and structural analysis, were applied to obtain the quantitative estimates of fluorescence of cell membranes. All mathematical calculations were made at the laboratory of Biophysics and Bioinformatics of Neuroscience Institute of Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences (PhD. R. Petrolis).

Measurement of glutamate content in cell culture medium

Extracellular glutamate was measured spectrophotometrically with the commercially available *Amplex red glutamic acid/glutamate oxidase assay kit* (Invitrogen, U.K.) according to manufacturer's protocol. CGC or pure microglial cultures were pretreated with A β _{1–42} oligomers for the indicated times. After incubation 50 μ l aliquots of culture medium were taken and mixed with working solution of 100 mM Amplex red reagent and were incubated for 30 min at 37° C, protected from light. The fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader (*Fluoroskan Ascent*, Thermo Scientific, USA) using excitation in the range of 530–560 nm and emission at 590 nm. Glutamate concentrations of the test samples were calculated with an L-glutamic acid standard curve.

Measurement of TNF- α

After the indicated time for treatment the aliquots of cell culture media were collected. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) content in culture medium was determined with a TNF- α (rat) ELISA kit (*IBL International GmbH*, Germany), assaying the samples according to the manufacturer's protocol.

Assessment of effects of biological fluids of Alzheimer's disease patients' on cerebellar granule cell cultures

Patients and study design

Blood serum (BS) and cerebrospinal fluid (CSF) samples from 55 patients were taken. Main groups consisted of 19 patients without cognitive impairment (with zero degree of dementia, HP), 25 patients with Alzheimer's disease (DAT) and 11 patients with other dementia (OD) who revealed symptoms of cognitive diseases during the period of observation (from 6 to 24 months). AD group consisted of individuals with 15 mild/early-stage (E-DAT) and 10 moderate-stage (M-DAT) of dementia of the Alzheimer's Type. Patients were grouped according to severity of dementia and age of onset (55–85 year). Cognitive status was assessed by Mini-Mental State Examination (MMSE), Clock Drawing Test (CDT), Trail Making Test part A (TMT-A) and Blessed dementia scale. For more accurate diagnosis, screening for pseudo-dementia, all demented patients were tested with shorter version of Geriatric Depression Scale (GDS). All clinical investigations were carried out by Pšemenekienė G., Grušauskienė E., MD and prof. PhD Petrikonis K. at the Department of Neurology of the Hospital of Lithuanian University of Health Sciences (MD.). Samples of biological fluids were centrifuged at 5000 rpm for 15 min. CGC cultures were treated with 100 μ l and 200 μ l of BS and

CSF, and placed in 400 μ l and 300 μ l cell culture media (ratio 1:5 and 1:2,5). CGCs were incubated with BS and CSF for 24 hours. Viability of neurons in CGC cultures after 24 h incubation was assessed by propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 staining as described above. Neuronal densities and number of microglia in CGC cultures were assessed by counting neuronal and microglial cells in at least five microscopic fields/well and expressed as an average number of neuronal and microglial cells per field.

Statistical Analysis

Statistical comparison between experimental groups was performed using *Student's t-test* and one-way ANOVA followed by a Tukey's or LSD post hoc test. A value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. The statistical package SPSS v.17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and *SigmaPlot 2011* (Systat Software Inc, UK) was used for data analysis.

3. RESULTS

3.1. Effect of small A β ₁₋₄₂ oligomers on membrane potential of cultured brain

In this study we investigated whether small A β ₁₋₄₂ oligomers induce plasma membrane depolarization of cells in primary neuronal–glial and pure microglial cultures. CGC cultures were exposed to 1 μ M A β ₁₋₄₂ for, and membrane potential was monitored after 0.5–4 hours of incubation by using the fluorescent dye DiBAC4(3). The dye enters depolarized cells where it binds to intracellular proteins or membranes and exhibits enhanced fluorescence. We found that A β ₁₋₄₂ oligomers caused rapid plasma membrane depolarization in both neurons and microglia but by different mechanisms. A time-dependent increase of fluorescence in neurons was observed during 30-60 min incubation of CGCs with A β ₁₋₄₂ (Fig. 3.1.1 A). Neuronal fluorescence remained at about the same level for another 2–4 hours in the presence of A β ₁₋₄₂ oligomers. This indicates that under exposure to toxic small A β ₁₋₄₂ oligomers, neuronal plasma membrane depolarization occurred rapidly within approximately 1 hour and stayed at that level for at least 4 hours of incubation. MK-801 did not modulate A β ₁₋₄₂-induced neuronal depolarization during 30 min to 2 hours (Fig. 3.1.1 A). In the control group, there was no change in relative fluorescence of neurons during 0.5–4 h of incubation. Small A β ₁₋₄₂ oligomers-induced depolarization of microglial plasma membrane in CGC cultures was greater and faster than neuronal depolarization: by 30 min from the start of incubation with A β ₁₋₄₂ oligomers, the relative fluorescence of microglial cells had increased from 61 units to

128 units and remained at a similar level for 4 h (Fig. 3.1.1 B). In contrast to neurons, MK-801 significantly reduced microglial fluorescence during 30–60 min of incubation and completely prevented the A β _{1–42}-induced depolarization of microglia after 2 and 4 h of treatment.

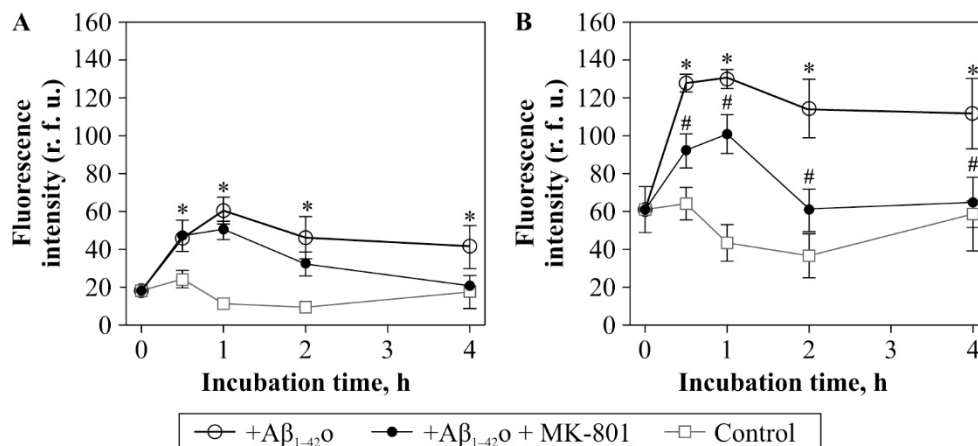


Fig. 3.1.1. Effect of MK-801 on neuronal and microglial membrane potential in small A β _{1–42} oligomer-treated CGC cultures

(A) – relative fluorescence intensity of neurons in CGC cultures; (B) – relative fluorescence intensity of microglia in CGC cultures. CGCs were treated with 1 μ M A β _{1–42} oligomers for 0–4 h with or without 10 μ M MK-801 and then loaded with DiBAC4(3). Fluorescence intensity expressed in relative fluorescence units (r.f.u.). * – $p < 0.05$ compared with control, # – $p < 0.05$ compared with A β _{1–42}-treated cells, $n = 5–8$.

To determine whether the A β _{1–42}-induced depolarization is specific for CGC neurons, we performed experiments evaluating the action of A β _{1–42} oligomers with or without MK-801 on membrane potential of cultured primary cortical and neuronal cultures from cerebellum. Similarly to CGCs, A β _{1–42} oligomers were able to increase fluorescence of neurons. MK-801 had no statistically significant effect on A β _{1–42}-induced neuronal membrane depolarization during 0.5–4 hours. Results indicate that A β _{1–42} oligomers may directly affect neuronal membrane potential and depolarize neurons and that NMDA-R did not participate in the neuronal depolarization caused by A β _{1–42}. Similar results were obtained in small A β _{1–42} oligomer- treated pure microglial culture: the exposure to small A β _{1–42} oligomers only slightly increased the fluorescence during 1 and 2 hours of treatment (Fig. 3.1.2), however, 4 hours of incubation forced membrane potential fluorescence to 159 units, indicating depolarization of microglia membrane with A β _{1–42}. MK-801 eliminated A β _{1–42} oligomer-induced membrane depolarization after 4 hours in pure microglial culture.

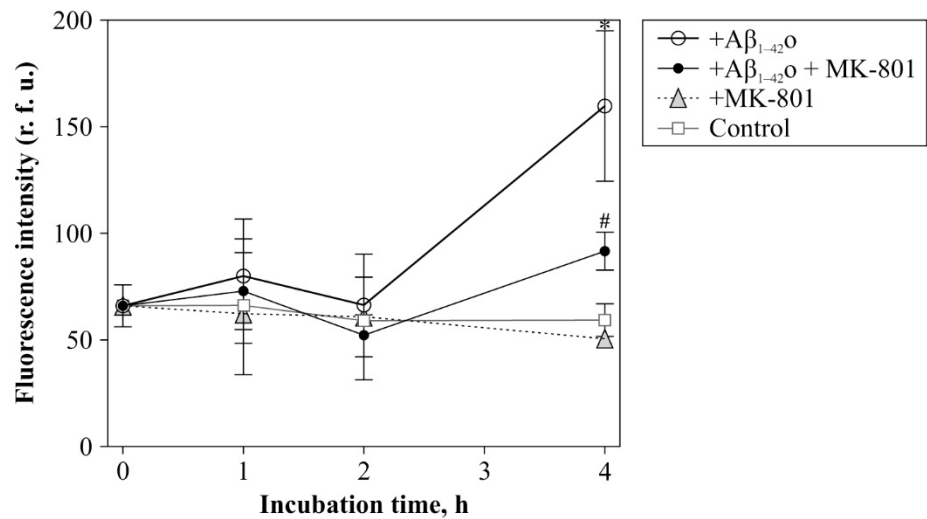


Fig. 3.1.2. *Effect of MK-801 on microglia membrane potential in small Aβ₁₋₄₂ oligomer-treated pure microglial culture*

Microglial cultures were treated with 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers with or without 10 μM MK-801 and then loaded with DiBAC4(3). Fluorescence intensity expressed in relative fluorescence units (r. f. u.). * – p<0.05 compared with control, # – p<0.05 compared with Aβ₁₋₄₂ treated cells, n=5–9.

We showed that depolarization of neuronal and microglial membranes was not sensitive to the AMPA/kainate receptor antagonist NBQX (10 μM) in CGCs treated with small Aβ₁₋₄₂ oligomers for 0–4 hours (Fig. 3.1.3), suggesting that AMPA/kainate receptors are not involved in Aβ₁₋₄₂ oligomer-induced depolarization of neurons and microglia.

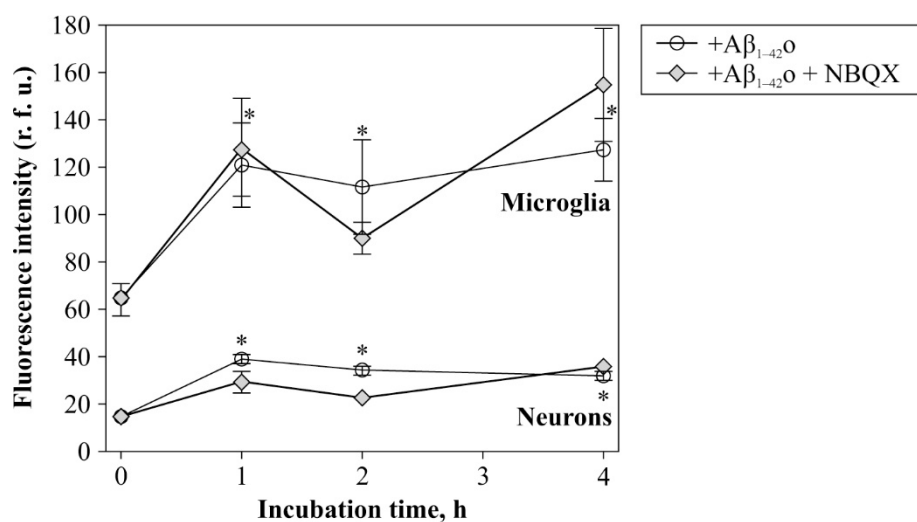


Fig. 3.1.3. *Effect of NBQX on microglia and neuron membrane potential in small Aβ₁₋₄₂ oligomer-treated CGC culture*

CGCs were treated with 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers in the presence/absence of 10 μM NBQX and then loaded with DiBAC4(3). Fluorescence intensity expressed in relative fluorescence units (r. f. u.). * – p<0.05 compared with control, n=3.

Measuring glutamate levels in pure microglial culture media we found that during 0.5–4 hours incubation of cells with Aβ₁₋₄₂ oligomers there was no significant release of glutamate, while in CGC cultures Aβ₁₋₄₂ oligomers increased glutamate level and this was prevented by MK-801 (Fig. 3.1.4).

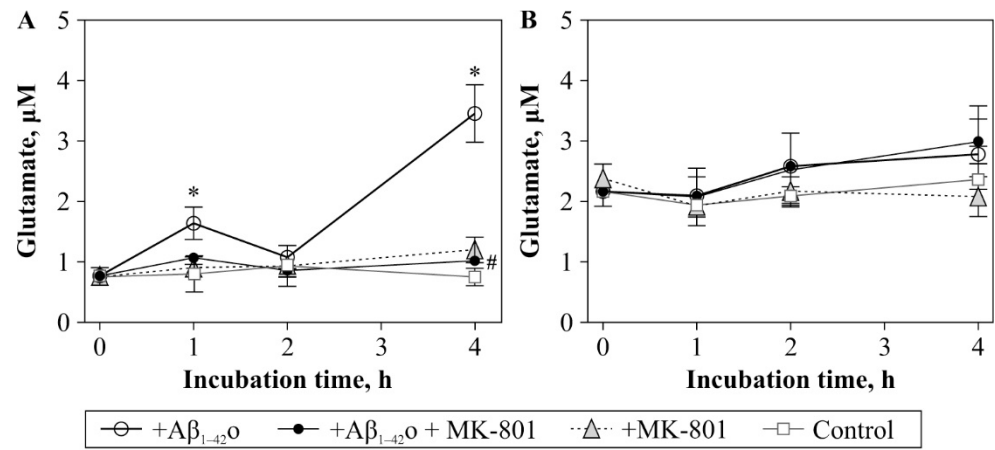


Fig. 3.1.4. Small Aβ₁₋₄₂ oligomers increase levels of glutamate in CGC culture medium

(A) – glutamate level in CGC culture medium; (B) – glutamate level in pure microglial culture medium. Cell cultures were treated with 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers with or without 10 μM MK-801. * – p<0.05 compared with control, # – p<0.05 compared with Aβ₁₋₄₂ treated cells, n=5–8.

We also found that MK-801 preserved neuronal viability and protected CGC from Aβ₁₋₄₂-induced neurotoxicity during 24 h incubation (Fig. 3.1.5).

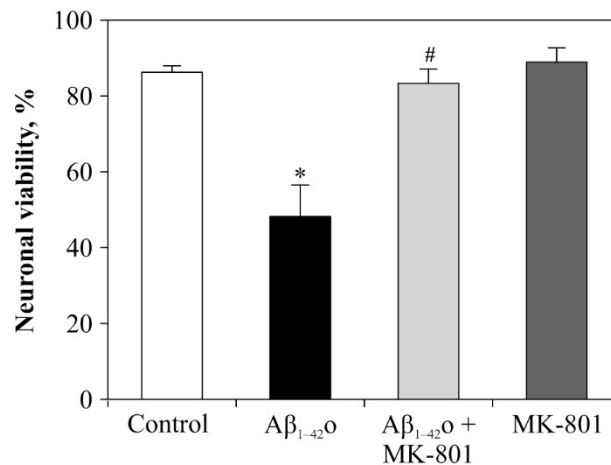


Fig. 3.1.5. Effect of MK-801 on neuronal viability in small Aβ₁₋₄₂ oligomer-treated CGC cultures

CGCs were treated with 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers for 24 h with or without 10 μM MK-801. * – p<0.05 compared with control group; # – p<0.05 compared with Aβ₁₋₄₂-treated cells, n=4.

To assess whether A β ₁₋₄₂ oligomers activate microglia we measured TNF- α level in pure microglia cell culture media collected after 1–24 hours of incubation with small A β ₁₋₄₂ oligomers. We found that incubation of cells with A β ₁₋₄₂ oligomers did not change the total level of TNF- α in microglia cell cultures (Fig. 3.1.6). MK-801 also had no effect on the amount of this cytokine in culture medium of microglia affected by small A β ₁₋₄₂ oligomers.

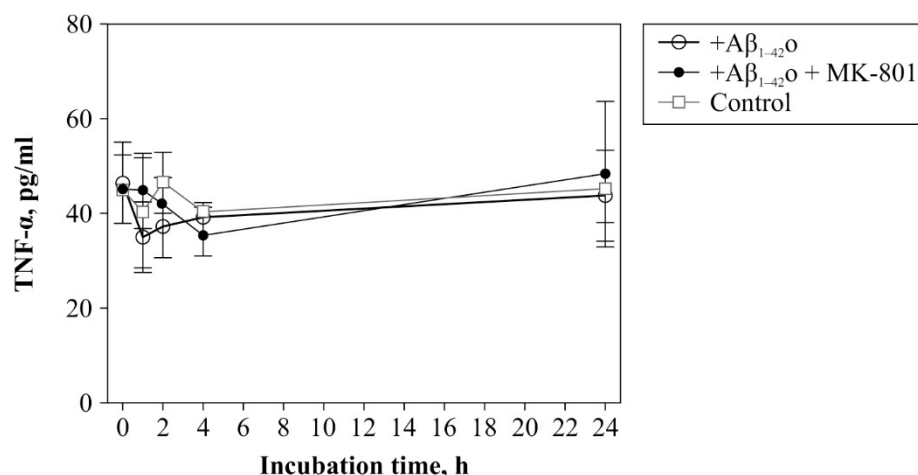


Fig. 3.1.6. Small A β ₁₋₄₂ oligomers did not induce release of TNF- α in pure microglial cultures

Cell cultures were treated with 1 μ M A β ₁₋₄₂ oligomers in the presence/absence of 10 μ M MK-801. n=3–6.

(Detailed information is presented in research paper [247], p. 138).

3.1. Investigation of neurotoxic effects of immune complexes formed by antibodies and A β ₁₋₄₂

We investigated effects of antigen–antibody complexes formed by A β ₁₋₄₂ and its specific monoclonal antibody on viability of neurons in CGC cultures. Monoclonal anti-A β #11E12 antibody (2 μ g/ml) generated against oligomeric forms of synthetic A β ₁₋₄₂ [235], was pre-incubated with various A β ₁₋₄₂ aggregates – either large, non-toxic oligomers, monomers, or fibrils (1 μ M) – and then added to cultures for 24 hours. As shown in Fig. 3.2.1, complexes of anti-A β antibody with A β ₁₋₄₂ oligomers, caused strong increases in both neuronal apoptosis and necrosis so that only 11% of neurons remained viable. Similar decreases of neuronal viability were observed when CGC cultures were incubated with immune complexes formed by A β ₁₋₄₂ monomers or

fibrils. When either antibody anti-A β or A β ₁₋₄₂ oligomers were added separately at the same concentrations, there was no neuronal death.

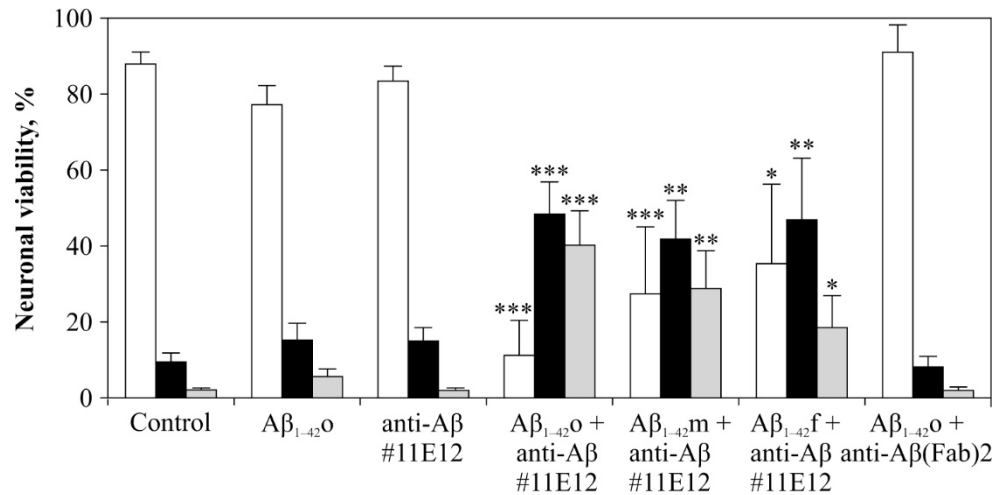


Fig. 3.2.1. Effect of anti-A β plus various A β ₁₋₄₂ aggregates on viability of neurons in CGC cultures

CGC were treated with monoclonal intact or fragmented antibodies 2 μ g/ml anti-A β #11E12 and 1 μ M A β ₁₋₄₂ (oligomers or fibrils, or monomers) for 24 h. **Control** – CGC cultures; **A β ₁₋₄₂o** – A β ₁₋₄₂ oligomers; **A β ₁₋₄₂m** – A β ₁₋₄₂ monomers; **A β ₁₋₄₂f** – A β ₁₋₄₂ fibrils; **A β ₁₋₄₂o + anti-A β (Fab)2** – fragmented anti-A β #11E12 plus A β ₁₋₄₂ oligomer complex. **White column** – viable neurons (%), **black** – necrosis (%), **grey** – apoptosis (%). *** – p<0.001, ** – p<0.01, * – p<0.05 compared with control, n=4–8.

In order to test whether the toxic effect of antibody-antigen complex is related to Fc fragment of anti-A β , we generated fragmented anti-A β (Fab antibody), containing 2 Fab domains, without Fc region, and tested effect of complexes of anti-A β (Fab)2 plus A β ₁₋₄₂ oligomers on viability of CGCs. As shown in Fig. 3.2.1, 24 h exposure of CGC to anti-A β (Fab)2 + A β ₁₋₄₂ oligomers complex did not cause any significant cell death. This suggests that the Fc region of the antibody in complexes with A β ₁₋₄₂ is crucial for inducing neuronal death in neuronal–glial cultures.

As shown in Fig. 3.2.2, the exposure of cells to full length anti-A β + A β ₁₋₄₂ aggregates not only induced cell death but also decreased the total number of neurons in CGC cultures.

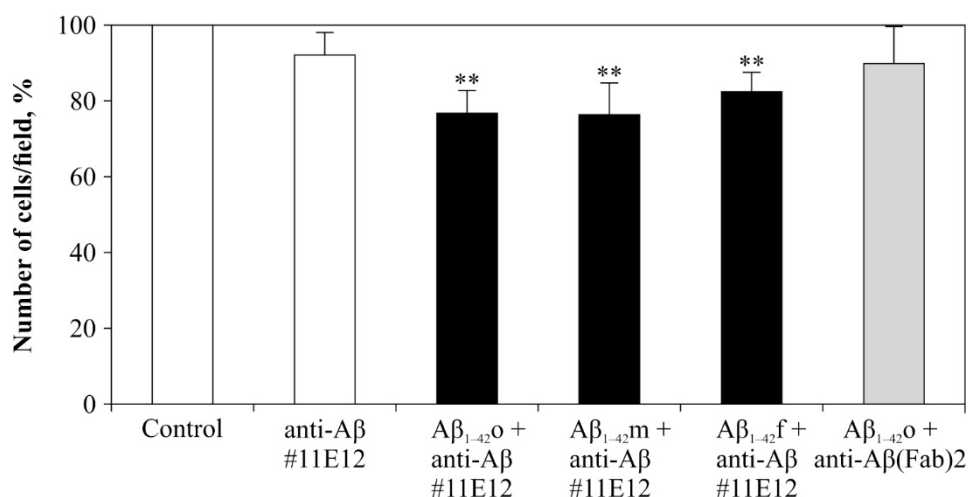


Fig. 3.2.2. Effect of anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ on neuronal density in CGC cultures

CGC were treated with monoclonal intact (**black columns**) or fragmented (**grey column**) antibodies 2 μg/ml anti-Aβ #11E12 and 1 μM Aβ₁₋₄₂ (oligomers or fibrils, or monomers) for 24 h. **White columns:** **Control** – CGC culture; **anti-Aβ#11E12** – monoclonal antibody anti-Aβ (clone #11E12). After treatment, the total number of viable, necrotic and apoptotic neurons was quantified in five randomly chosen microscopic fields in each well (two wells per treatment). Experimental groups described in Fig. 3.2.1 (p. 164). ** – p<0.01, compared with control, n=4–8.

In contrast, anti-Aβ(Fab)2 + Aβ₁₋₄₂ oligomers did not reduce neuronal density over 24 h. The intact anti-Aβ itself had no effect on cell number in CGC cultures.

As the epitope of monoclonal antibody anti-Aβ #11E12 is at the N-terminal end of the Aβ molecule and this antibody forms complexes with Aβ₁₋₄₀ [235], we investigated whether toxicity of immune complexes depends on the oligomerization status of Aβ₁₋₄₀. As can be seen in Fig. 3.2.3, complexes of anti-Aβ + Aβ₁₋₄₀ oligomers were highly toxic and caused death of nearly all neurons in the culture during 24 h incubation because of necrosis and apoptosis. Added alone Aβ₁₋₄₀ oligomers did not cause any significant neuronal death. Anti-Aβ + Aβ₁₋₄₀ monomers had no effect on neuronal viability in CGC.

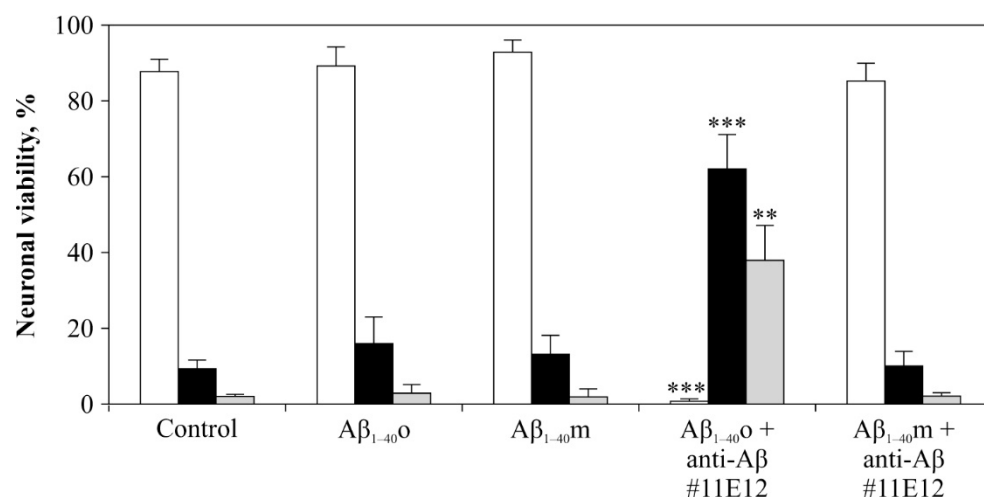


Fig. 3.2.3. Effect of anti-Aβ + Aβ₁₋₄₀ aggregates on neuronal viability in CGC cultures

CGC were treated with 2 μg/ml anti-Aβ #11E12 and 1 μM Aβ₁₋₄₀ (oligomers or monomers). Aβ₁₋₄₀ o – Aβ₁₋₄₀ oligomers, Aβ₁₋₄₀ m – Aβ₁₋₄₀ monomers. **White column** – viable neurons (%), **black** – necrosis (%), **grey** – apoptosis (%). *** – p<0.001, ** – p<0.01, compared with control, n=4–8.

To investigate more deeply whether the neurotoxicity of antibody–antigen complexes was dependent on the oligomeric/multimeric structure of the antigen, we used short peptides of Aβ protein representing the epitope of monoclonal antibody anti-Aβ. As a model of the monomeric Aβ antigen we employed synthetic peptides spanning the N-terminal sequence of Aβ₁₋₄₂: Aβ₁₋₆ peptide and Aβ₁₋₁₃ peptide (aa 1–6 and aa 1–13 of Aβ, respectively). To evaluate cytotoxicity of immune complexes formed by other monomeric antigens, we used synthetic peptide MeN₄₄₀₋₄₅₂ representing the fragment of MeN protein recognized by the monoclonal antibody anti-MeNP#10F7 [237]. As shown in Fig. 3.2.4 A, all immune complexes with short linear peptides (anti-Aβ + Aβ₁₋₆, anti-Aβ + Aβ₁₋₁₃ and anti-MeN + MeN₄₄₀₋₄₅₂) had no effect on neuronal viability. These complexes also had no effect on number of microglia in cultures (Fig. 3.2.4 B).

Together, these data indicate that oligomeric/multimeric structure of antigen is an essential factor in neurotoxicity of antigen–antibody complexes.

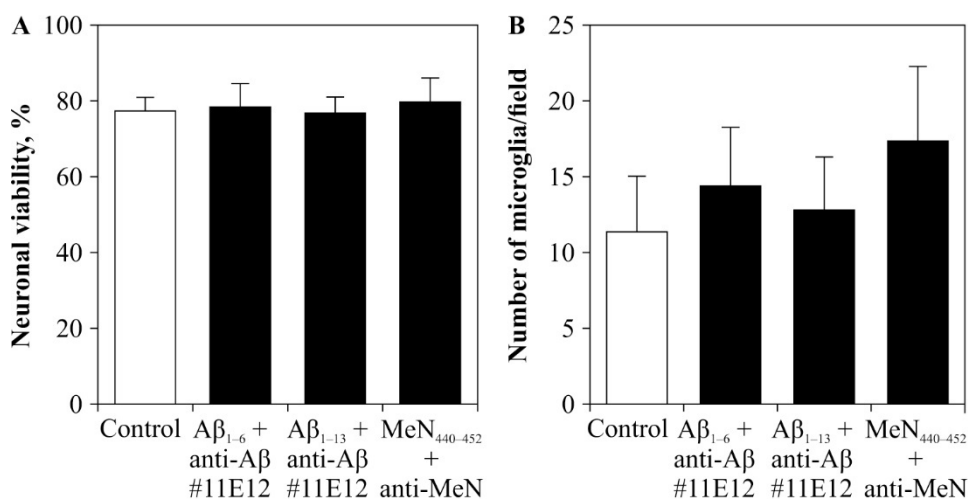


Fig. 3.2.4. Effects of anti-Aβ plus synthetic Aβ₁₋₄₂ peptides fragment on CGC cultures

(A) – neuronal viability (%); (B) – number of microglia. CGC were treated with 2 μg/ml anti-Aβ#11E12 + Aβ₁₋₆ or with Aβ₁₋₁₃ complexes and with 2 μg/ml anti-MeNP + MeNP₄₄₀₋₄₅₂ for 24 h. Microglial cells were identified by using Isolectin GS-IB4 conjugated with AlexaFluor488 (7 ng/ml). Cells were counted in five microscopic fields per each well (two wells per treatment). n=6.

To investigate whether complexes of other oligomeric proteins bound to their specific antibodies are able to induce similar neurotoxicity, we used monoclonal antibodies raised against recombinant virus-like particles (VLPs) and nucleocapsid-like particles (NLPs) that represent highly ordered oligomeric structures [248, 237]. When CGC cultures were treated with monoclonal antibodies raised against hamster polyomavirus major capsid protein VP1 (anti-VP1#6D11) plus Aβ₁₋₄₂ oligomers and fibrils, no significant loss of neuronal viability was detected (Fig. 3.2.5). This indicates that specific antibody–antigen interaction is necessary to cause neuronal death in cell cultures. However, complexes of anti-VP1 #6D11 with its target antigen VP1 protein decreased significantly neuronal viability.

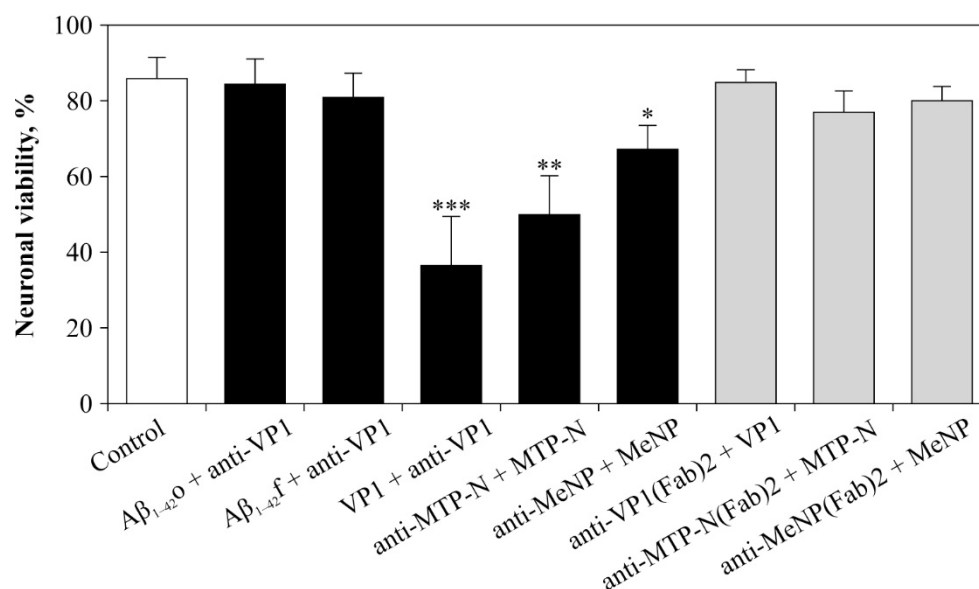


Fig. 3.2.5. Effects of anti-VP1 + Aβ₁₋₄₂, anti-VP1 + VP1 and other oligomeric protein complexes on neuronal viability in CGC cultures

CGC were treated with antibody-antigen complexes with monoclonal intact or fragmented antibodies at concentration 2 µg/ml for 24 h. **Anti-VP1+VP1** – monoclonal antibody raised against hamster polyomavirus major capsid protein VP1 with its target antigen VP1; **anti-MTP-N+MTP-N** – human metapneumovirus (MTP) nucleocapsid (N) protein with its target antigen MTP; **anti-Me-NP+MeNP** – measles (Me) virus N protein with its target antigen MeNP. Aβ₁₋₄₂^o – Aβ₁₋₄₂ oligomers, Aβ₁₋₄₂^f – Aβ₁₋₄₂ fibrils. **Black column** – non-fragmented immune complexes, **grey** – fragmented (Fab)2 immune complexes. *** – p<0.001, ** – p<0.01, * – p<0.05 compared with control, n=3-11.

Removal of the Fc region of the anti-VP1 monoclonal antibody reduced its toxicity: anti-VP1(Fab)2 + VP1 did not cause any significant cell death (Fig. 3.2.5). We used two other monoclonal antibodies: anti-MeNP#10F7 raised against the MeNP protein and antibody anti-MTP#4A2 raised against the MTP-N. The complexes of anti-MTP-N + MTP-N and anti-MeNP + MeNP reduced neuronal viability to 50% and 67%, respectively, whereas complexes of the (Fab)2 fragments of the respective antibodies with their specific antigens did not cause any significant neuronal death during 24 hours incubation (Fig. 3.2.5).

We found that immune complexes with anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N and anti-MeNP + MeNP, reduced neuronal density in CGCs (Fig. 3.2.6). Complexes of antigens with respective (Fab)2 fragments had no significant effect on neuronal densities during 24 h incubations (Fig. 3.2.6).

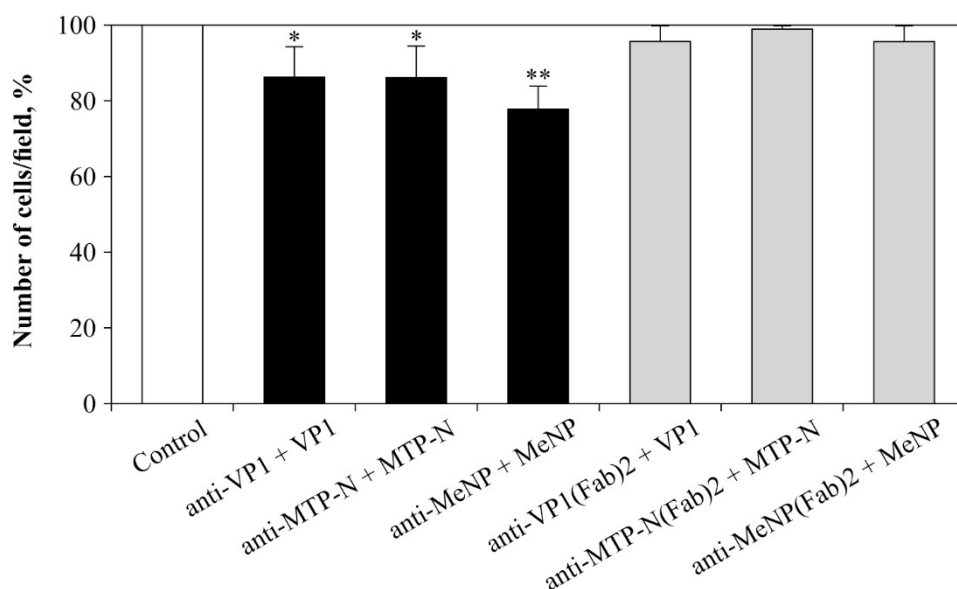


Fig. 3.2.6. Effect of anti-VP1 + VP1, anti-MTP-N + MTP-N and anti-MeN + MeN on neuronal density in CGC cultures

CGC were treated as described in Fig. 3.2.5 (p. 168). Number of neurons was determined as described in Fig. 3.2.2. (p. 165). ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$ compared with control, $n = 3-11$.

These results suggest that immune complexes formed by antibodies and multimeric proteins exert strong neurotoxic effect on neuronal–glial cultures and that the Fc region of these antigen-bound antibodies is essential to cause neuronal death.

To test whether cross-species reactivity is not involved in neurotoxicity when rat CGC cultures are treated with immune complexes formed by mouse monoclonal antibodies, we performed analogous experiments using primary neuronal–glial cultures isolated from mouse cerebellum. Similar as in rat cultures, we found the substantial decline of viability of mouse neurons when CGC cultures were treated with both anti-A β + A β_{1-42} oligomers and anti-VP1 + VP1 (Fig. 3.2.7). The antibodies or antigens added separately had no effect on neuronal viability. This indicates that primary mouse neurons are similarly sensitive to mouse antibody plus antigen complexes as primary rat neurons.

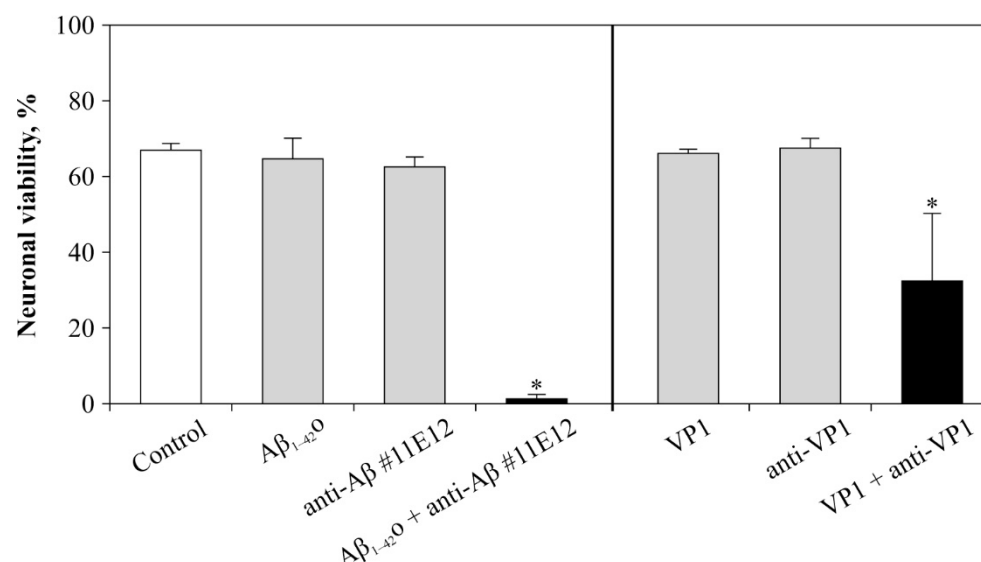


Fig. 3.2.7. *Effect of anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ oligomer and anti-VP1 + VP1 complexes on neuronal viability in mouse CGC cultures*

CGC were treated with 2 μg/ml anti-Aβ#11E12 with or without 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers and with 2 μg/ml anti-VP1 + VP1 for 24 h. * – p<0.05 compared with control, n=3–6.

The next series of experiments were performed to investigate further the mechanism of the toxicity of antibody–antigen complexes on cultured neurons. We used a commercial mouse monoclonal antibody (anti-Aβ₁₋₄₂, clone #G2-13) that recognizes linear Aβ₁₋₄₂ peptide at the carboxyl C-terminus. This antibody is of IgG1 subtype and therefore might have different affinity to Fc receptors of rat macrophages as compared to the antibody anti-Aβ #11E12 of IgG2b subtype. The second control antibody used in our experiments was rabbit polyclonal antibody specific to Aβ₁₋₄₂ sequence but lacking specificity to rat Fc receptors. Similar to experiments described above, we treated CGC cultures with complexes anti-Aβ₁₋₄₂#G2-13 + Aβ₁₋₄₂ oligomers or with rabbit polyclonal anti-Aβ₁₋₄₂ + Aβ₁₋₄₂ oligomers for 24 h. As shown in Fig. 3.2.8, anti-Aβ₁₋₄₂# G2-13 + Aβ₁₋₄₂ oligomers decreased neuronal viability from 89% (control group) to 61%.

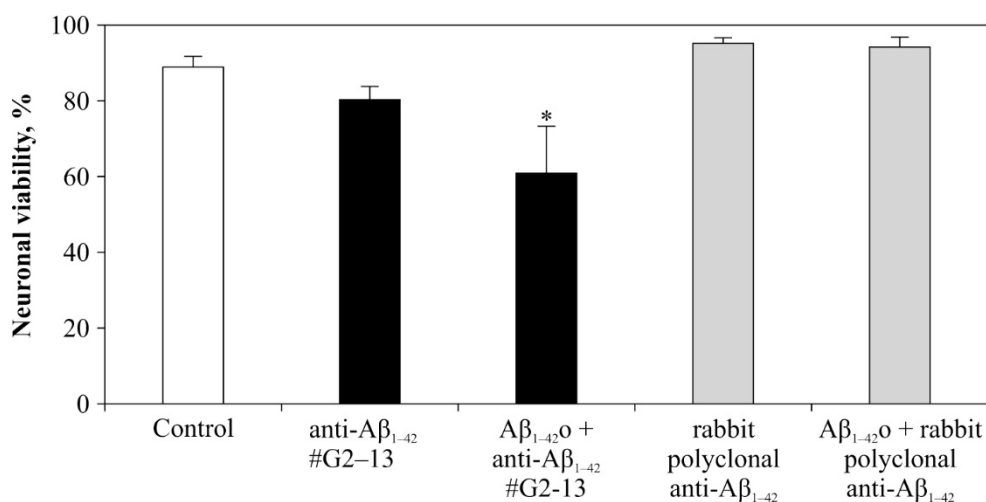


Fig. 3.2.8. Effects of anti-Aβ₁₋₄₂ #G2-13 + Aβ₁₋₄₂ and rabbit polyclonal anti-Aβ₁₋₄₂ + Aβ₁₋₄₂ on neuronal viability in CGC cultures

CGC were treated with 2 μg/ml anti-Aβ₁₋₄₂ clone #G2-13 with 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers (**black columns**) or with rabbit polyclonal 2 μg/ml anti-Aβ₁₋₄₂ + 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomers (**grey columns**) for 24 h. **White column** – control group. * – p<0.05 compared with control, n=3-6.

Immune complexes of rabbit polyclonal anti-Aβ₁₋₄₂ + Aβ₁₋₄₂ oligomers did not influence neuronal viability. None of the antibodies added separately had effect on cell viability after 24 h (Fig. 3.2.8). These data suggest that neurotoxicity of immune complexes does not depend on the isotype of antibody, but does depend on the specific interaction of the complexes with Fc receptors on the competent cells.

We found that incubation of CGC with anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ for 24 h stimulated microglial proliferation. As shown in Fig. 3.2.9 A, anti-Aβ plus Aβ₁₋₄₂ oligomers increased the number of microglia cells from 9.8 in control to 13.6 per microscopic field. Similar effect was observed when CGC were incubated with anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ monomers or fibrils for 24 hours, (Fig. 3.2.9 A). Importantly, complex of fragmented anti-Aβ(Fab)2 + Aβ₁₋₄₂ oligomers had no effect on microglial proliferation.

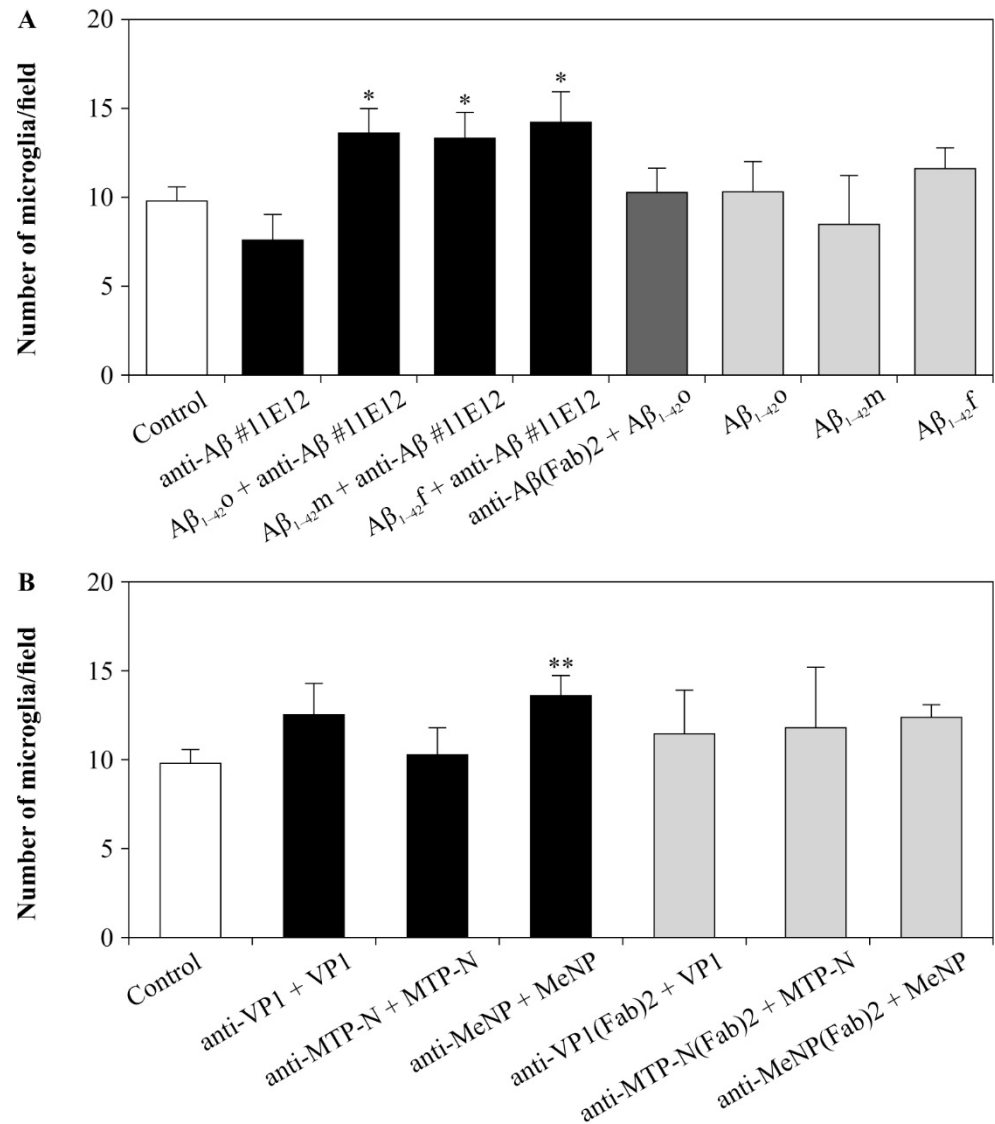


Fig. 3.2.9. *Effect of antibody–antigen complexes on microglia proliferation in CGC cultures*

(A) – effect of anti-Aβ #11E12 + Aβ₁₋₄₂ aggregate complexes. CGC were treated with various Aβ₁₋₄₂ aggregates for 24 h with or without anti-Aβ₁₋₄₂, intact and fragmented (Fab)2, at concentrations indicated in Fig. 3.2.1 (p. 164). (B) – effect of anti-VPI + VPI, anti-MTP-N + MTP-N, and anti-MeNP + MeNP complexes. CGC were treated with immune complexes, intact and fragmented (Fab)2, at concentrations indicated in Fig. 3.2.5. (p. 168). ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$ compared with control, $n = 4-8$.

Proliferation of microglia was also observed when CGC were incubated with anti-MeNP + MeNP complex for 24 h (Fig. 3.2.9 B). Contrary to intact anti-MeNP, anti-MeNP(Fab)2 + MeNP did not have any effect on the number of cells. However, anti-VP1 + VP1 and anti-MTP-N + MTP, intact and fragmented forms, had no statistically significant effect on microglial proliferation (Fig. 3.2.9 B).

We tested whether the neurotoxic action of antibody–antigen complexes on CGC was related to possible activation of microglia and release of inflammatory cytokines. After treatment with anti-A β + A β _{1–42} oligomers significant increase in TNF- α in CGC culture medium (98 $\pm$ 26 pg/ml) was observed. The extremely high TNF- α amount (676 $\pm$ 284 pg/ml), was detected in medium of CGC cultures treated with anti-VP1 + VP1 complex, anti-MTP-N + MTP-N and anti-MeNP + MeNP, moderately increased TNF- α level in culture medium, to 74 $\pm$ 18 and 67 $\pm$ 28 pg/ml, respectively. Anti-inflammatory agent minocycline completely blocked anti-A β + A β _{1–42}-induced TNF- α release and partially protected against immune complexes-induced neuronal death (detailed information is presented in research paper [250], p. 126).

3.2.1. Effect of antibody–antigen complexes on neuronal cell viability on long-term cerebellum cell cultures

Experiments showed that after 24 hours incubation, effects of immune complexes formed by A β _{1–42} oligomers on CGCs have changed, i.e. anti-A β + A β _{1–42} oligomers had much smaller effects on neuronal cell viability. Meanwhile, the effects of anti-A β + A β _{1–42} complexes on proliferation of microglia cells remain unchanged. This would suggest that presence of glial cells may influence changes of immune complex neurotoxicity. It is known that neurons in long-term CGC cultures, as compared to short-term CGC cultures, are more sensitive to various pathogens [251]. Therefore, we investigated effects of complexes of anti-A β + A β _{1–42} oligomers on neuronal viability in 28 days *in vitro* (DIV) CGC cultures. In some experiments CGC cultures were supplemented with 10% microglia. We found that A β _{1–42} oligomers as well as anti-A β antibodies added separately were non-toxic to 28 DIV CGC neurons after 24 h (Fig. 3.2.1.1). Significant reduction of neuronal viability was observed in CGC cultures incubated with complexes of anti-A β + A β _{1–42} oligomers without extra 10% microglia cells: there was no significant loss of neuronal viability over 24 h periods in CGC cultures with added 10% microglia cells.

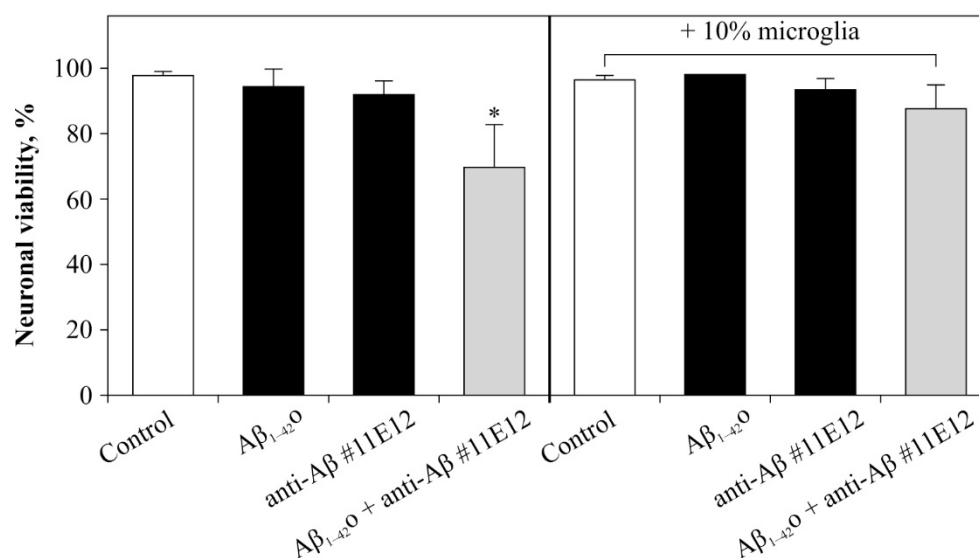


Fig. 3.2.1.1. Effect of anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ complex on neuronal viability in 28 DIV CGC cultures

28 DIV CGC, with and without 10% additional microglia cells, were treated with 4 µg/ml anti-Aβ and 1 µM Aβ₁₋₄₂ oligomers for 24 h. **Control** – 28 DIV CGC culture (**white column**); **Aβ₁₋₄₂o** – Aβ₁₋₄₂ oligomer or anti-Aβ #11E12 (**black column**); **grey column** present anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ complexes. * – p < 0.05 compared with control; n=2–5.

These results indicate that decrease of anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ oligomers toxicity may be associated with a large number of microglia in CGCs, so microglia can effectively and quickly remove damaged or dead neuronal cells. We were interested whether affected microglia release soluble factors that can induce neuronal death or a physical contact between affected microglia and neurons is necessary to cause neuronal death. For that pure microglial cultures were pre-incubated with complexes for 24 h and then media were transferred to neurons from cerebellum and incubated for another 24 h (*group 1*). In another group (*group 2*), pre-incubated with complexes media from pure microglial cells were transferred to neurons from cerebellum supplemented with 10% microglia. Neurons from cerebellum supplemented with 10% microglia (*group 2*) had a tendency to decrease neuronal viability by necrosis after 24 h. *Group 1* did not cause any significant cell death. There were no statistically significant difference between the groups with or without added microglia. Altogether, these results suggest that toxic anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ effect on primary cerebellum cultures depends on interaction between microglia and neurons and may be related with other factors.

3.2.2. Effect of anti-A β + A β ₁₋₄₂ complexes on neuronal synaptic densities in CGC cultures

Loss of synapses is an early and invariant feature of AD [252]. It has been reported that post-synaptic actions of A β oligomers result in the loss of functional glutamate receptors and lead to impairments of axonal transport regulation, degeneration of axons and degradation of dendritic spines [253]. Further experiments were designed to determine whether antibody–antigen complexes induce synaptotoxicity and synaptic loss in cerebellar cells. Primary CGC cultures were treated with anti-A β #11E12 + A β ₁₋₄₂ oligomers for 2–6 h. Effects of antibody–antigen complex were examined by immunofluorescence staining of synapsin which reflects synaptic structures/distribution in neurons. To examine whether anti-A β + A β ₁₋₄₂ oligomers-mediated toxicity contribute to the changes in synaptic protein levels we measured SNAP-25 – related fluorescence intensity in CGC cultures. Cells were fixed and immunostained using antibodies against synaptosomal-associated synaptic protein 25 (SNAP-25) known as the neuron-specific, pre-synaptic protein specifically localized in neuronal processes (neurites) [144].

As shown in Fig. 3.2.2.1 A, there were no change in SNAP-25 – related fluorescence during 6 h incubation of CGC cultures with anti-A β + A β ₁₋₄₂ oligomer. It shows that complexes of A β ₁₋₄₂ oligomers with anti-A β during 2–6 hours incubation did not affect expression and distribution of SNAP-25. However, after 6 h there was a tendency for a decrease in SNAP-25 staining and loss of neurites (Fig. 3.2.2.1 B). This short-term incubation period (6 hours) was chosen for further investigations to determine changes of SNAP-25 fluorescence intensity as primary indicator of neurite degeneration and neuronal cell damage, defining synaptotoxic effects of immune complexes in CGC cultures.

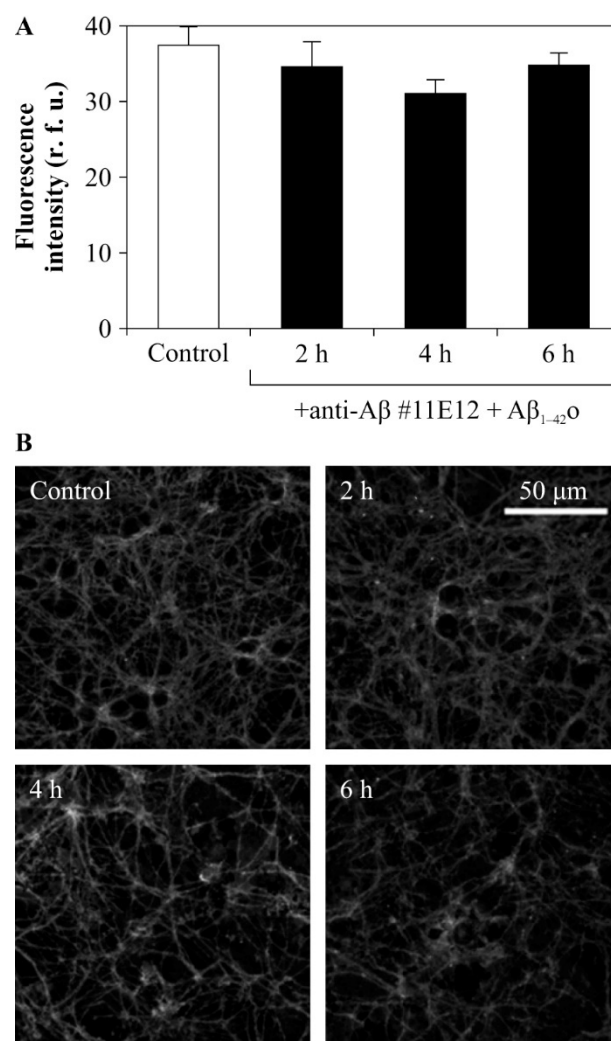


Fig. 3.2.2.1. *Effect of anti-Aβ + Aβ₁₋₄₂ on SNAP-25 distribution in CGC cultures*

(A) – SNAP-25 -relative fluorescence intensity after incubation with 1 μg/ml anti-Aβ #11E12 and 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomer. (B) – distribution of neuron-specific protein SNAP-25 in neurites after incubation with 1 μg/ml anti-Aβ #11E12 and 1 μM Aβ₁₋₄₂ oligomer. Fluorescence intensity expressed in relative fluorescence units (r. f. u.) in standardized (0.02 mm²) microscope field. Microscope images of immunofluorescence stained CGC cells, ×20 microscope objective, magnification – 200 times, scale bar, 50 μm; n = 3.

We found that after 6 h CGCs treatment with immune complex there was statistically significant increase of SNAP-25-related fluorescence intensity compared to control group (Fig. 3.2.2.2). The highest increase in fluorescence

intensity was observed after treatment with immune complexes formed by small $A\beta_{1-42}$ oligomers (1–3 nm) and $A\beta_{1-42}$ fibrils (> 6 nm). Large $A\beta_{1-42}$ oligomers (4–6 nm) also had a tendency to increase fluorescence intensity however, there were no significant differences of SNAP-25 – related fluorescence intensity among anti- $A\beta$ and various $A\beta_{1-42}$ aggregate groups after 6 hours period.

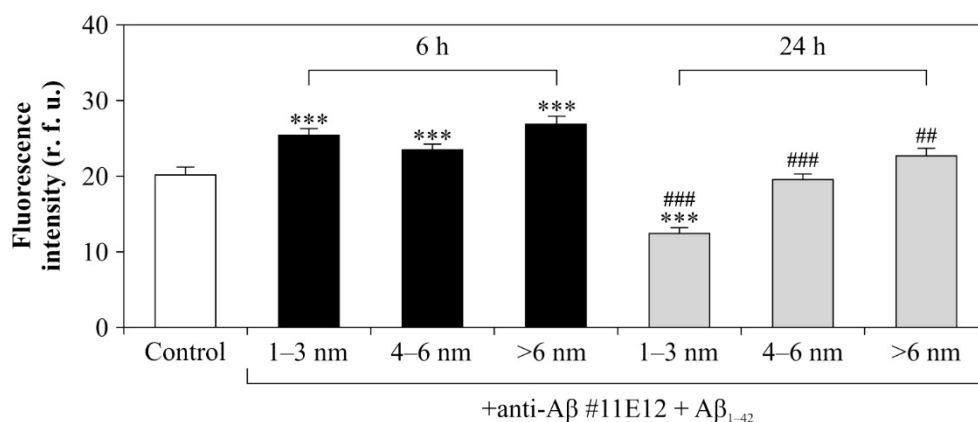


Fig. 3.2.2.2. *Effect of anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-42}$ aggregate complexes on SNAP-25-related fluorescence intensity*

CGC were treated with 1 μ g/ml anti- $A\beta$ #11E12 with 1 μ M $A\beta_{1-42}$ aggregates (small and large oligomers and fibrils). **1–3 nm** – small $A\beta_{1-42}$ oligomers; **4–6 nm** – large $A\beta_{1-42}$ oligomers; **>6 nm** – $A\beta_{1-42}$ fibrils. **Black columns** – short-term (6 hour) incubation period; **grey columns** – long-term (24 hours) incubation period; **white column** – control CGCs group. Fluorescence intensity expressed in relative fluorescence units (r. f. u.). *** – $p < 0.001$ – compared with control; ### – $p < 0.001$, ## – $p < 0.01$ – compared with immune complex groups after 6 h incubation, $n=3$.

CGC treatment with complexes of anti- $A\beta$ and small $A\beta_{1-42}$ oligomers for 24 h caused a decrease of SNAP-25-related fluorescence intensity (Fig. 3.2.2.2). However, large $A\beta_{1-42}$ oligomer and $A\beta_{1-42}$ fibril complexes with anti- $A\beta$ had no effects on CGCs after 24 hours. SNAP-25 -related fluorescence intensity of mentioned immune complexes group did not differ from the control and stayed at the same level. Comparison of SNAP-25 -related fluorescence intensity among all groups of immune complexes after 6 and 24 hours incubation showed statistically significant difference in SNAP-25 level. Our results show that decrease of SNAP-25-related fluorescence intensity reflect toxic effects of immune complexes on neurites and anti- $A\beta$ + $A\beta_{1-42}$ -induced toxicity are depended on size of $A\beta$ particles, i. e., synaptotoxicity of immune complexes increases with decrease in the size of $A\beta_{1-42}$. These findings are in line with the results showing that after short- and long-term (6 and 24 hours) incubation,

small 1–3 nm A β _{1–42} oligomers are the most toxic aggregates which induce SNAP-25 degradation and structural changes of CGCs neurites (Fig. 3.2.2.3 A). Similar but slightly weaker effects were seen with complexes of anti-A β and large (4–6 nm) A β _{1–42} oligomers (Fig. 3.2.2.3 B).

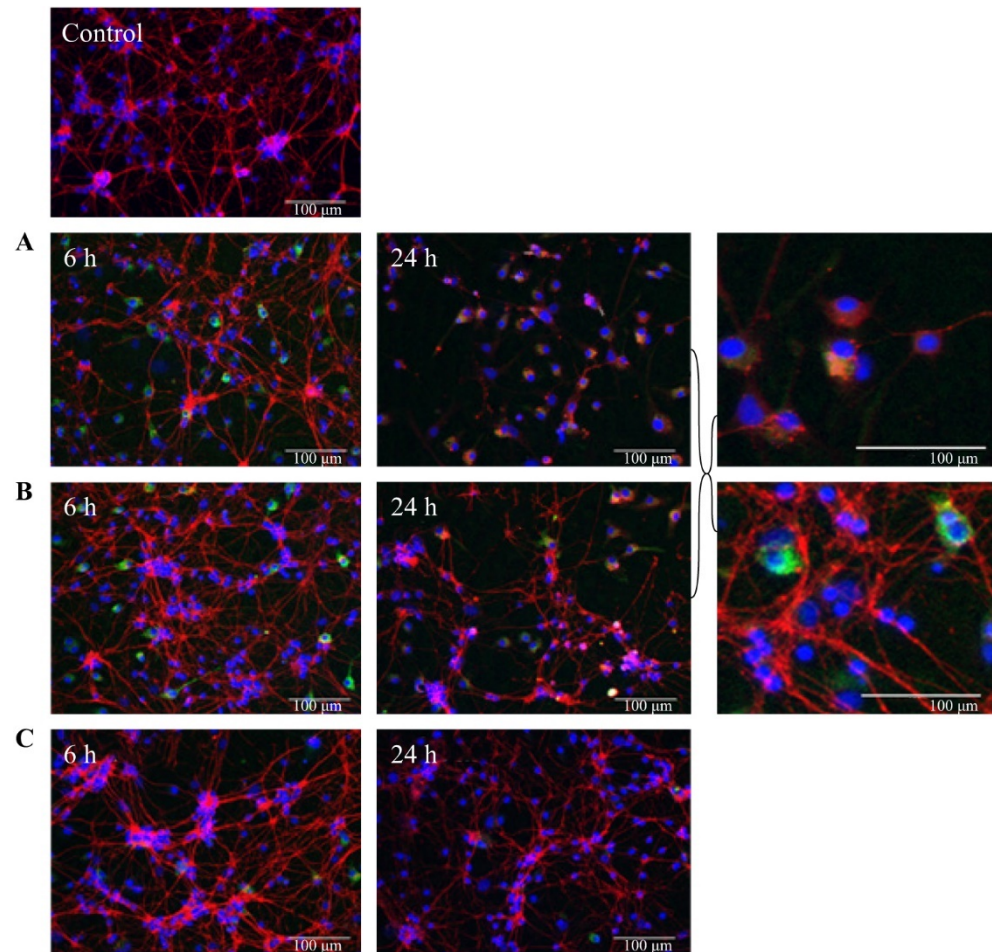


Fig. 3.2.2.3. *Effect of anti-A β + A β _{1–42} complexes on distribution of SNAP-25 in CGC cultures*

CGC were treated as described in Fig. 3.2.2.2 (p. 177). Fluorescence microscopy images after immunofluorescence staining, 2D, $\times 20$ microscope objective, magnification – 200 times, scale bar, 100 μ m, n = 3. Neurites were labeled with neuron-specific protein SNAP-25. **Control** – CGC culture. CGC culture treated with anti-A β #11E12 and small 1–3 nm A β _{1–42} oligomers (**A**), large 4–6 nm A β _{1–42} oligomers (**B**) and >6 nm A β _{1–42} fibrils (**C**) for 6 and 24 hours. Cell nucleus were counterstained with Hoechst 33342 (the **blue color**), microglia were visualized by using Isolectin GS-IB4 conjugated with AlexaFluor488 (**green color**), SNAP-25 staining was on neuronal processes (neurites) (**red color**).

3.3. Effect of patients' biological fluids on CGC cultures

Biological fluids from patients contain various compounds that are thought to be toxic including A β and Tau which are also considered as potential biomarkers for AD. However, little is known whether such fluids can directly cause neurotoxic effects on cells in culture. However, there is no research specifically on the effect of biological fluid's on neuronal cells viability. We investigated whether blood serum (BS) and cerebrospinal fluid (CSF) from patients with dementia can cause neurotoxic effects on CGC cultures. For this study 55 samples from patients were taken. Patients were divided into four experimental groups: 19 elderly patients without cognitive impairment (cognitively healthy patients with zero degree of dementia (HP), 25 Alzheimer's disease patients (AD) which were subdivided into 15 mild/early stage (E-DAT) patients and 10 moderate stage (M-DAT) patients; and 11 patients who were admitted to the Neurology department with initial diagnosis of AD, but further investigation revealed other type of dementia (OD). Neuronal–glial cells were treated with 100 μ l and 200 μ l BS and CSF. The appropriate volume of CGC medium (400 μ l and 300 μ l, respectively) was replaced with mentioned volume of biological fluids and incubated for 24 h at dilution 1:5 and 1:2,5.

As shown in Fig. 3.3.1 B, 1:2,5 BS of E-DAT, M-DAT and OD have no effect on cell viability as those used in 1:5 group (Fig. 3.3.1 A).

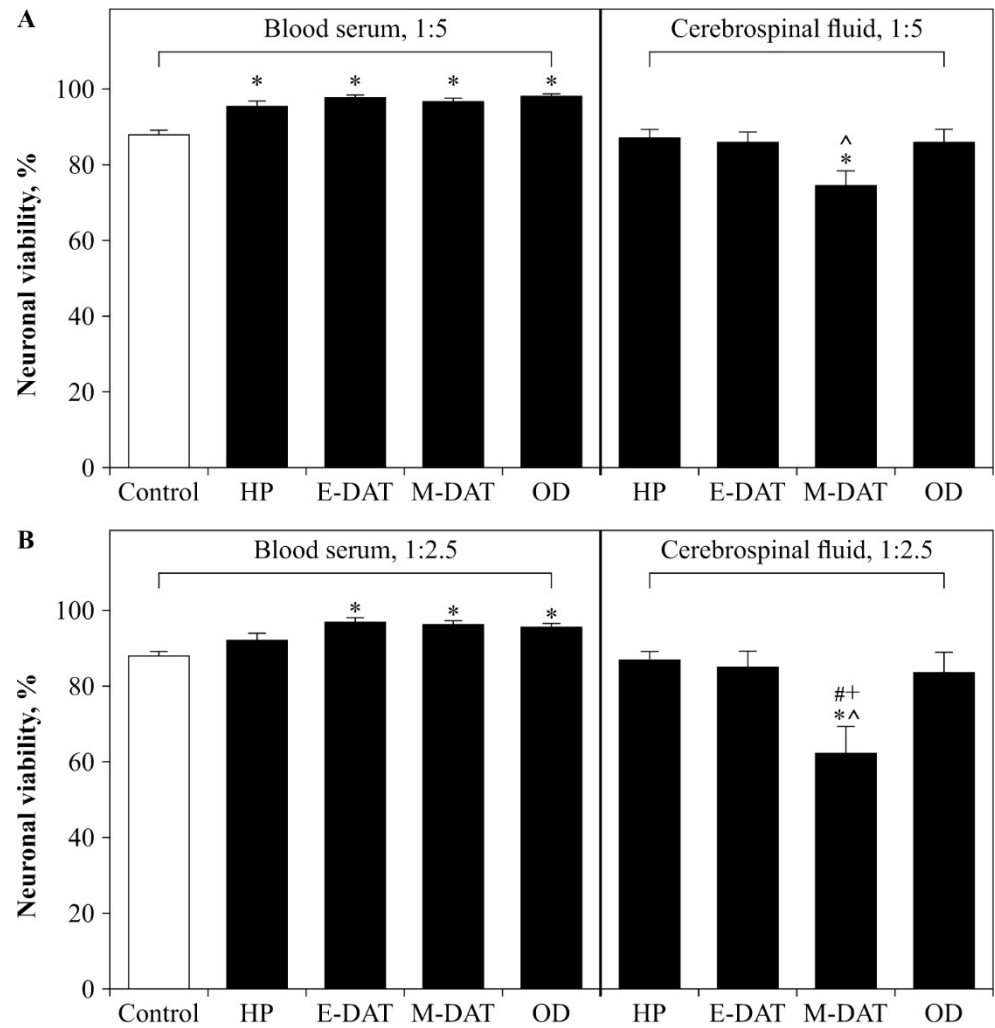


Fig. 3.3.1. Effect of patient's biological fluids on neuronal cell viability in CGC cultures

(A) – effect of BS and CSF (at dilution 1:5) on neuronal cell viability in CGC cultures. (B) – effect of BS and CSF (at dilution 1:2.5) on neuronal cell viability in CGC cultures. **Black columns** – treated CGC culture; **white column** – untreated CGC culture (control). * – $p < 0.05$ versus control group (CGC culture); ^ – $p < 0.05$ versus cognitively healthy patients (HP); # – $p < 0.05$ versus early stage of Alzheimer's disease (E-DAT); + – $p < 0.05$ versus OD group.

We found that BS (at both dilutions) in all groups had significant stimulating effects on cell viability vs. control group, except HP sera at 1:2.5 dilution (Fig. 3.3.1 B). Increase in neuronal viability in the presence of patients' BS was related to decreased necrosis though these effects of patients' BS on necrotic neuronal death were not statistically significant (Fig. 3.3.2).

CSFs in HP, E-DAT and OD groups had no effect on neuronal viability at both dilutions. However, in M-DAT group CSF significantly reduced neuronal viability by 25% and 14% compared to control group at 1:2.5 and 1:5 dilution, respectively (Fig. 3.3.1). This decrease on neuronal viability was caused by strong increase of neuronal necrosis (Fig. 3.3.2). CSFs of other patients' groups had no effect on viability or necrosis of neurons at both dilutions (Figs. 3.3.1 and 3.3.2). Levels of neuronal apoptosis were the same in all experimental groups (Fig. 3.3.2).

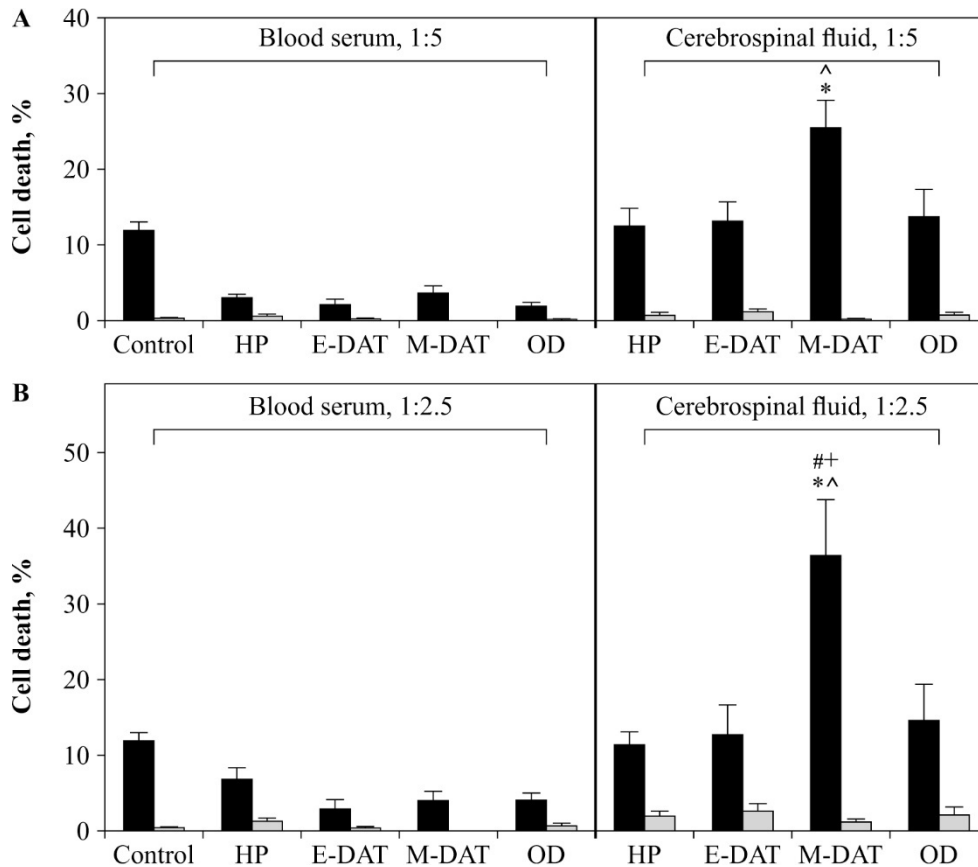


Fig. 3.3.2. Effects of patients' biological fluids on neuronal cell death

A more complete description indicated above (Fig. 3.3.1, p. 180). **Black columns** - necrotic cell death; **grey columns** - apoptotic cell death. * – $p < 0.05$ versus control group (CGC culture); ^ – $p < 0.05$ versus cognitively healthy patients (HP); # – $p < 0.05$ versus early stage of Alzheimer's disease (E-DAT); + – $p < 0.05$ versus OD group.

We also analyzed effects of BS and CSF on density of neurons (viable plus apoptotic plus necrotic neurons) after 24 h incubation. As shown in Fig. 3.3.3, BS and CSFs in dementia groups – E-DAT, M-DAT and OD, except HP, caused reduction of neuronal densities in cultures though statistically significant effect compared to control was observed only in E-DAT group. HP sera and CSFs had no effect on neuronal numbers in CGC cultures.

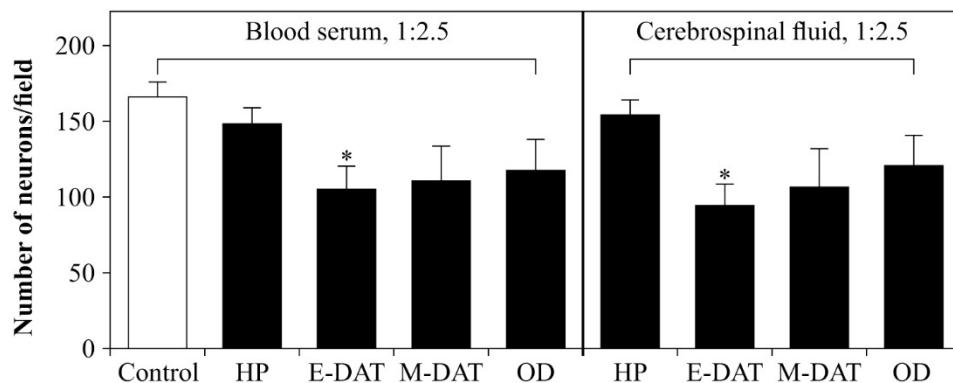


Fig. 3.3.3. *Effect of patients' biological fluids on the number of neurons in CGC cultures*

CGC cultures were treated with biological fluids as indicated above (Fig. 3.3.1, p. 180). Density of neuronal cells was observed counting viable plus apoptotic plus necrotic neurons after 24 h incubation. * – $p < 0.05$ versus control group (CGC culture).

These data suggest that BS stimulates neuronal viability and protects from neuronal death while CSF may be involved in processes which cause cytotoxic effects and therefore could be considered as potential determinant to distinguish Alzheimer's disease from other dementias.

We also investigated effects of patients' fluids on microglial proliferation. Biological fluids in HP group exhibited tendency (BS at both dilutions or CSF at 1:5 dilution) or significantly stimulated (CSF at 1:2.5 dilution) microglial proliferation. BS and CSFs of OD patients had no effect on microglial numbers in CGC cultures (Fig. 3.3.4). The incubation of CGCs with BS in E-DAT group inhibited (at 1:5 dilution) or showed tendency of inhibition (BS at 1:2.5) of microglial proliferation. The strongest microglia proliferation-inhibiting effect was observed in M-DAT group where both BS and CSFs at both dilutions significantly reduced numbers of microglia in CGC cultures (Fig. 3.3.4). These data suggest that biological fluids from moderate stage AD patients affect not only neuronal viability but also suppress microglial proliferation.

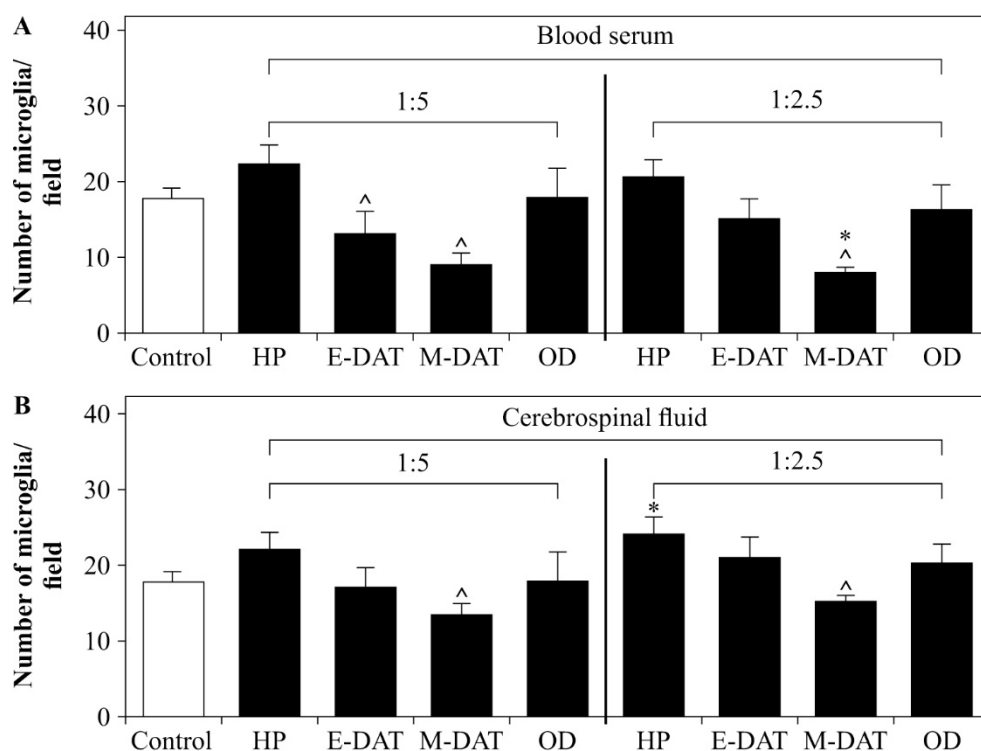


Fig. 3.3.4. Effect of patients's biological fluids on microglia proliferation

(A) – effect of BS on the number of microglia in CGCs; (B) – effect of CSF on the number of microglia in CGCs; CGC cultures were treated with biological fluids as indicated above (Fig. 3.3.1, p. 180). Microglial cells were identified by using Isolectin GS-IB4 conjugated with Alexa Fluor 488 (7 ng/ml). * – $p < 0.05$ versus control group; ^ – $p < 0.05$ versus cognitively healthy patients (HP).

CONCLUSIONS

1. Small $A\beta_{1-42}$ oligomers directly induce rapid NMDA receptor-independent neuronal depolarization in cerebellar and cortical neuronal cell cultures and NMDA receptor-dependent release of glutamate into media leading to neuronal death. Small $A\beta_{1-42}$ oligomers induce rapid and NMDA receptor-dependent microglial plasma membrane depolarization in cerebellar and cortical microglial cell cultures.
2. Immune complexes formed by $A\beta$ oligomers or other multimeric antigens and their specific antibodies cause loss and death of neurons accompanied by proliferation of the microglia in cerebellar granule cell cultures. Interaction of Fc domains of antibodies with microglial

cells is necessary to cause neurotoxicity of complexes of antibody with multimeric antigens.

3. Immune complexes formed by small $A\beta_{1-42}$ oligomers with antibodies cause decrease in synaptic densities and neuritic damage in cerebellar granule cell cultures.
4. Cerebrospinal fluids from patients with AD but not cognitively healthy individuals and other dementia patients exhibit neurotoxic and microglial proliferation inhibiting effects in cerebellar granule cell cultures. The strongest neurotoxic, neuronal viability reducing effect was observed in moderate stage AD patients group whereas neuronal loss was exhibited in cultures treated with biological fluids of demented patients.

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: **Silvija Jankevičiūtė**
Address: Institute of Neurosciences, Lithuanian University of Health Sciences, Eivenių str. 4, LT-50161 Kaunas, Lithuania
Phone: +370 684 34847
E-mail: silvija.jankeviciute@lsmuni.lt

Education

2012–2016 PhD Student of Lithuanian University of Health Sciences, Institute of Neurosciences, Laboratory of Biochemistry.
2010–2012 Student of Vytautas Magnus University, Faculty of Environment sciences, Master degree in Molecular biology and biotechnology.
2006–2010 Student of Vytautas Magnus University, Faculty of Environment sciences, Bachelor degree in Biology.

Job positions

2014–present Young scientist. Lithuanian University of Health Sciences “Santakos” Valley Latest Pharmaceutical and Health Technology Center, Institute of Neurosciences, Laboratory for Research of Pharmacological Regulation of Pathological Processes and Drug Metabolism.
2014–2016 Senior technician. Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology.
2012–2014 Young scientist. Lithuanian University of Health Sciences, Institute of Neurosciences, Laboratory of Biochemistry, the project „Molecular mechanisms of Alzheimer’s disease pathogenesis (MALPAMA)“, LIG-04/2012.
2012–2013 Technician. Lithuanian University of Health Sciences, Institute of Neurosciences.

PADEKA

Su meile ir pagarba – viskuo, ką gražiausia gali jausti ir kurti žmogus, už besąlygišką paramą, meilę ir visas nesuskaičiuojamas akimirkas, kurios buvo, yra ir bus, dėkoju savo šeimai.

Už disertaciniam darbui skirtą laiką bei kantrybę, už mokslines idėjas ir palaikymą dėkoju mokslinio darbo vadovei prof. dr. Vilmantei Borutaitei.

Už patarimus, visapusišką pagalbą, palaikymą ir geranoriškumą dėkoju prof. dr. Ramunei Morkūnienei.

Už vertingas mikroskopavimo pamokas, polėkį ir optimizmą dėkoju Aistei Jekabsonei.

Už šiltą bei darbingą atmosferą, bendrumo jausmą, visada gerą nuotaiką, visada emocingas, bet konstruktyvias gyvenimiškas ir mokslines diskusijas prie arbatos ir kavos puodelių dėkoju Kristinai Škėmienei, Evelinai Rekuvienei, Giedrei Jablonskienei, Katrynai Pampuščenko, Ramūnui Jokubkai, Pauliui Čižui, Adolfui Toleikiui, Juliiui Liobikui, Daivai Majienei, Odetai Arandarčikaitei, Rasai Banienei, Sonatai Trumbeckaitei.

Už nuolatinį palaikymą dėkoju visiems savo draugams.

Už bendradarbiavimą ir draugiškumą dėkoju Robertui Petroliui.

Už antikūnus dėkoju A. Žvirblienei ir I. Dalgedienei, už AFM analizę – G. Valinčiui, už klinikinę medžiagą dėkoju K. Petrikoniui, G. Pšemeneckienei ir E. Grušauskienei.

Šis darbas buvo finansuojamas Lietuvos mokslų tarybos (projektas „MALPAMA“) ir 2013–2016 LSMU MA Mokslo fondo.

*Ačiū visiems kartu ir kiekvienam atskirai –
Jūs visi kuriat tas nepakartojamas akimirkas, kurios kuria mane.*